

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Woś

**Przetrwale zakażenie dolnych dróg oddechowych rynowirusem
a stan kliniczny chorych na astmę oskrzelową.**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Marek Sanak

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków 2009

Pragnę złożyć podziękowania:

Promotorowi, Panu Profesorowi Markowi Sanakowi, za zaangażowanie, cenne rady i uwagi, wszechstronną pomoc, jakiej udzielił mi w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Panu Profesorowi, Andrzejowi Szczeklikowi, za umożliwienie wykonania badań w II Katedrze Chorób Wewnętrznych, zdobycia niezbędnej wiedzy i środków w celu ich realizacji, inspirację, życzliwość i zainteresowanie.

Panu Doktorowi Jerzemu Soji, za pomoc w rekrutacji pacjentów i pobieranie materiału do badań.

Panu Profesorowi Williamowi Busse za udostępnienie posiadanych zasobów wiedzy i umiejętności w zakresie badań nad rynowirusami.

Panu Doktorowi Henrykowi Olechnowiczowi i pracownikom oddziału torakochirurgii Specjalistycznego Szpitala im. Jana Pawła II w Krakowie za pobieranie materiału do badań.

Panu Profesorowi Jerzemu Stachurze i pracownikom Katedry Patomorfologii CMUJ, w szczególności Pani Magister Teresie Korpak-Złotogórskiej za pomoc w przygotowywaniu preparatów.

Pracownikom II Katedry Chorób Wewnętrznych za pomoc w realizacji zadania badawczego.

Rodzicom.

Spis treści

I.	Wstęp	5
	Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego	5
	Definicja astmy oskrzelowej, wybrane zagadnienia	6
	Zapalenie dolnych dróg oddechowych	7
	Astma aspirynowa	8
	Epidemiologia zakażeń	10
	Rynowirusy w astmie oskrzelowej	11
	Budowa i cykl rozwojowy wirusa	13
	Diagnostyka zakażeń HRV	16
	Opis wybranych metod biologii molekularnej	17
	Przeciwwirusowe mechanizmy obronne gospodarza	21
	Zapalenie w dolnych drogach oddechowych a zakażenie rynowirusem	29
	Zakażenia ostre, przewlekłe, nosicielstwo	31
	Perspektywy leczenia	33
II.	Cele pracy	34
III.	Materiał i metodyka	35
	Charakterystyka osób badanych	35
	Kryteria rozpoznania wybranych stanów klinicznych	36
	Badania wykonane u osób kierowanych na bronchoskopię diagnostyczną	37
	Badania wykonane w grupie operowanych	39
	Metody biologii molekularnej	39
	Materiał do badań	39
	Startery do reakcji RT-PCR	40
	Izolacja RNA	41
	Sonda genetyczna do wykrywania HRV	42
	Pośrednia RT-PCR <i>in situ</i>	44
	Pośrednia immunohistochemia (IHC)	47
	Klonowanie sondy cDNA	48
	Sekwencjonowanie sondy genetycznej	50
	Obliczenia statystyczne	52
IV.	Wyniki	53
	Charakterystyka populacji	53
	Częstość wykrywania rynowirusów	55
	Obecność rynowirusów a charakterystyka kliniczna populacji	57
	Obecność rynowirusów a objawy zapalenia	66
	Obraz mikroskopowy zakażenia rynowirusem	71
	Obecność rynowirusów u chorych na POChP	77
	Analiza podobieństwa sekwencji sondy hybrydacyjnej do serotypów HRV	77
V.	Dyskusja	80
	Porównanie częstości wykrywania rynowirusów w badanych grupach	80
	Trudności związane z metodami badania	93
	Porównanie wyników RT-PCR <i>in situ</i> i immunohistochemii	96
	Wykrywanie rynowirusów a charakterystyka kliniczna populacji	98
	Obraz mikroskopowy zakażenia rynowirusem	109
	Wykrywanie rynowirusa u chorych na POChP	112
VI.	Podsumowanie	113

VII. Streszczenie	114
VIII. Summary	116
IX. Piśmiennictwo	118
X. Załączniki	131
Lista tabel, rysunków, wykresów	131
Indeks skrótów	132
Odczynniki	137
1. Izolacja RNA	137
2. Odwrotna transkrypcja (RT)	137
3. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)	137
4. Elektroforeza	137
5. Znakowanie sondy	138
6. Izolacja i oczyszczanie produktów reakcji PCR	138
7. Pośrednia RT-PCR <i>in situ</i>	138
8. Metody immunohistochemiczne	140
9. Klonowanie	140
10. Sekwencjonowanie	141

I. Wstęp

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Rynowirusy (HRV) to najczęstsza przyczyna zwykłych przeziębień. Odpowiadają za 50% wszystkich przeziębień u osób dorosłych w ciągu roku i do 90% lub więcej w sezonie jesiennym. (1,2) W ciągu ostatnich lat wzrasta liczba doniesień, że te stosunkowo niegroźne patogeny, mogą być przyczyną poważnych chorób. Patogeneza zakażeń HRV jest nadal słabo poznana. (3)

Rynowirusy wykrywa się aż w 2/3 zaostrzeń astmy spowodowanych przez wirusy. (4) Nieliczne badania odnoszą się zakażeń HRV w stabilnym okresie choroby. Podawana w literaturze częstość wykrywania HRV w okresach bezobjawowych waha się w szerokim zakresie (4% do 36%).

Wydaje się, że astmatycy są bardziej podatni na zakażenia wirusami. (5, 6, 7) Nieprawidłowości morfologiczne, immunologiczne w tej chorobie mogą ułatwiać zakażenia HRV. (7, 8, 9)

Szereg wirusów, w tym rynowirusy, korzysta ze strategii modyfikowania odpowiedzi immunologicznej organizmu, których celem jest jej osłabienie i ułatwienie przetrwania w organizmie. (10) Stan przetrwałego zakażenia, o skąpoobjawowym przebiegu, jest zjawiskiem ewolucyjnie korzystnym dla patogenu.

Zakażenie wirusami powoduje długotrwałe nasilenie nadreaktywności oskrzeli i stan zapalny. (11, 12, 13) Zmiany te przypominają fenotyp astmy. (13, 14) Z tego powodu, według niektórych nieprawidłowa reakcja na zakażenie może być przyczyną manifestacji choroby. (8, 11, 14) Za taką hipotezą przemawia obserwowany związek pomiędzy przebytymi, objawowymi zakażeniami wirusami w dzieciństwie i rozwojem astmy w wieku późniejszym. (9, 14, 15) Rynowirusy mogą także pogarszać przebieg choroby. (16,17)

Przetrwałe zakażenie HRV wydaje się atrakcyjną hipotezą wyjaśniającą przyczynę i przebieg astmy. (18, 19, 20) Już 19 lat temu zaproponowano, że przetrwałe zakażenie wirusem może prowadzić do astmy aspirynowej. (21) Inna z akceptowanych hipotez zakłada, że zakażenie wirusem trwa krótko, natomiast prowadzi do długotrwałych zmian w organizmie, co ujawnia fenotyp astmy. (14) Jak dotąd nie ma jednoznacznych dowodów, która z nich jest prawdziwa.

Postęp wiedzy na temat zakażeń HRV opóźniał brak odpowiednich „narzędzi badawczych”. Tradycyjne metody wykrywania HRV to techniki o niskiej czułości.

Identyfikacja za pomocą hodowli komórkowych jest procesem czasochłonnym i wymaga zapewnienia ściśle określonych warunków, co ogranicza jej zastosowanie, natomiast diagnostyka serologiczna jest niemożliwa z uwagi na dużą liczbę serotypów wirusa. (22) Badanie związków pomiędzy zakażeniem HRV a astmą utrudnia również brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Pewne informacje przyniosły wyniki eksperymentalnych zakażeń ludzi. Wprowadzenie metod biologii molekularnej, znacznie przyspieszyło i ułatwiło diagnostykę oraz istotnie poprawiło czułość i swoistość testów diagnostycznych.

Nie mamy skutecznych leków przeciw zakażeniom HRV. Dostępne metody leczenia zarówno zaostrzeń astmy, jak i sposoby zapobiegania objawom zakażenia są mało skuteczne. Lepsze zrozumienie patomechanizmów, jak i podatności organizmu na zakażenie z pewnością pozwoli na poszukiwanie skuteczniejszych leków w przyszłości.

Głównym celem niniejszego opracowania jest próba oceny za pomocą możliwie najczulszych metod, czy u astmatyków w okresach między zaostrzeniami choroby, przy braku objawów przeziębienia, rynowirusy są obecne w dolnych drogach oddechowych. Ich obecność może wskazywać na przetrwałe zakażenie.

Dla celów tego badania opracowano i po raz pierwszy zastosowano metodę RT-PCR *in situ*. W odróżnieniu od zwykłego RT-PCR, w przypadku RT-PCR *in situ* reakcja odbywa się bezpośrednio w komórkach, z zachowaniem ich struktury. Wydaje się, że metoda ta może łączyć szczególnie wysoką czułość i swoistość, a ponadto pozwala ocenić dystrybucję zakażenia w ścianie oskrzela.

Definicja astmy oskrzelowej, wybrane zagadnienia

Astma oskrzelowa jest chorobą dolnych dróg oddechowych manifestującą się odwracalnym upośledzeniem przepływu powietrza przez oskrzela, o zróżnicowanej etiologii. Szczególną postacią tej choroby jest astma aspirynowa, choroba nabywana podczas życia, której wystąpienie często poprzedzają objawy przypominające typowe przeziębienie. Dla astmy aspirynowej charakterystyczne jest występowanie napadowego skurczu oskrzeli po spożyciu niesteroidowych leków przeciwzapalnych. (21, 23)

Astma jest jedną z najczęstszych przewlekłych chorób na świecie i stanowi ważny problem społeczno-ekonomiczny. Chorobowość jest zmienna w różnych populacjach, w Polsce w grupie osób dorosłych wynosi 5,4%. (24) Zgodnie z obecnie obowiązującą definicją, zaproponowaną przez NHLBI/WHO w 1997 roku, jest ona przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych. Przewlekły proces zapalny prowadzi do nadreaktywności oskrzeli, czego następstwem są napady świszczącego oddechu, duszności, uczucia ściskania w klatce

piersiowej, kaszlu, zwłaszcza w nocy lub wcześniej nad ranem. Epizodom tym towarzyszy rozległe, zmienne ograniczenie przepływu przez drogi oddechowe, zazwyczaj odwracalne spontanicznie lub po leczeniu. (25) Pod względem etiologii wyróżniamy astmę alergiczną i niealergiczną. Pierwsza dotyczy przede wszystkim dzieci i młodych dorosłych, u jej podłoża leżą mechanizmy alergiczne, a w około 40% stwierdza się atopię.

Mechanizmy regulujące przebieg zapalenia w oskrzelach są złożone. Na podstawie profilu wydzielanych cytokin uważa się, że w astmie dominuje odpowiedź typu Th₂. Jedną z hipotez tłumaczących patomechanizm choroby zakłada, że kluczowe jest zaburzenie równowagi pomiędzy odpowiedzią immunologiczną typu Th₁, a Th₂. Patomechanizm astmy niealergiczej nie jest w pełni poznany, uważa się, że ma związek z zakażeniem i być może jest procesem immunologicznym wyzwalanym przez zakażenie. (24, 25)

Zapalenie dolnych dróg oddechowych

Przewlekły stan zapalny błony śluzowej ściany oskrzela w astmie oskrzelowej cechuje nacieki komórek zapalnych: eozynofiliów, mastocytów, makrofagów, neutrofilów, bazofilów i limfocytów T. Równoległe z zapaleniem obserwuje się uszkodzenie nabłonka ścian dróg oddechowych, co pobudza procesy naprawcze, prowadząc do ich przebudowy. Nawracające napady pogorszenia przepływu w drogach oddechowych są wyrazem ostrej reakcji zapalnej. (25) W badaniach histologicznych stwierdza się uszkodzenie nabłonka i upośledzony proces jego regeneracji. (26) Dochodzi do nadprodukcji śluzu, poszerzenia naczyń, obrzęku i odsłonięcia zakończeń nerwowych. Miejscowo uwalniane są mediatory zapalenia, czynniki wzrostu: IL-1, IL-6, GM-CSF, RANTES, TGF-β. (26, 28) Już we wczesnych etapach choroby pogrubieniu ulega warstwa siateczkowata błony podstawnej. Towarzyszy temu zwiększenie liczby miofibroblastów w jej sąsiedztwie (tzw. remodeling ścian oskrzeli).

Przebieg reakcji zapalnej u astmatyków można przedstawić w sposób uproszczony, jako kolejne etapy reakcji alergicznej. Pierwszy etap to aktywacja mastocytów i uwalnianie mediatorów syntetyzowanych *de novo* (prostaglandyny, leukotrieny, tromboksan, czynnik aktywujący płytki) i preformowanych (jak: histamina, tryptaza, cytokiny). Aktywacja odbywa się na drodze zależnej lub niezależnej od IgE. Pierwsza zachodzi z udziałem receptorów IgE o wysokim powinowactwie na powierzchni komórek (FcεRI). Ich wiązanie ze swoistym alergenem zapoczątkowuje szereg procesów enzymatycznych, prowadzących do degranulacji komórek tucznych. Reakcja niezależna od IgE to uwalnianie mediatorów w odpowiedzi na inne czynniki, jak: składniki dopełniacza, toksyny bakteryjne, substancja P. Następstwem są:

skurcz mięśni gładkich, pobudzenie zakończeń nerwów, poszerzenie naczyń, czy wydzielanie śluzu.

W późnej fazie zapalenia mobilizowane są leukocyty. W błonie śluzowej oskrzela stwierdza się także zwiększoną liczbę eozynofików, których stopień aktywacji koreluje z ciężkością choroby i nadreaktywnością oskrzeli. Produkują i uwalniają one toksyczne białka, leukotrieny cysteinylowe, czynnik aktywujący płytki (PAF), RNA-zy, cytokiny Th₂-zależne, modyfikujące przebieg zapalenia. Stwierdza się także obecność mastocytów i neutrofilów. Uwalniane przez nie proteazy rozkładają elementy macierzy międzykomórkowej. Neutrofile są źródłem wolnych rodników i cytokin (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8). Elastaza neutrofilowa powoduje przewlekłe zapalenie, przerost gruczołów śluzowych, nadprodukcję śluzu, uszkodzenie nabłonka i tkanki łącznej, a także nasila rekrutację neutrofilów do oskrzeli, migrację fibroblastów, zwiększa nadreaktywność oskrzeli. (28) Rola neutrofilów w patogenezie choroby pozostaje niejasna. Ich liczba wzrasta w astmie ciężkiej, po zakażeniu wirusami, ekspozycji na zanieczyszczenia. Wydaje się, że mogą mieć związek ze szczególnymi postaciami astmy oskrzelowej, jak: astma ciężka fatalna, astma nocna, czy astma steroidooporna. (25, 28) Makrofagi są najliczniejszymi komórkami światła oskrzeli. Uwalniane przez nie metaloproteinazy, czynniki wzrostu (PDGF, b-FGF, TGF- β) uważane są za kluczowe w procesach przebudowy ściany oskrzeli. (25, 28)

Eozynofile, neutrofile, makrofagi to komórki wrodzonej obrony immunologicznej, wykazują zdolność do fagocytozy bakterii, uszkodzonych komórek. Kontrolę nad zapaleniem alergicznym pełnią aktywowane limfocyty uwalniające cytokiny typu Th₂. (25, 28)

Astma aspirynowa

Astma aspirynowa (AIA) jest szczególną postacią astmy oskrzelowej objawiającą się napadami świszczącego oddechu, duszności, kaszlu, czy uczucia ucisku w klatce piersiowej, którym towarzyszy wydzielina z nosa, w odpowiedzi na podanie aspiryny lub innego leku z grupy niesteroidowych przeciwzapalnych. Chorobowość, oceniana wyłącznie na podstawie danych z wywiadu, szacuje się na około 3-5% populacji dorosłych astmatyków. Odsetek ten wzrasta nawet dwu-, trzykrotnie w przypadku weryfikacji rozpoznań za pomocą prób prowokacyjnych z aspiryną. W badaniu, obejmującym dużą próbę polskiej populacji (12 971 osób) wykazano, że chorobowość wynosi 0,6%, a wśród astmatyków 4,3%. (29, 30)

Astma aspirynowa rozpoczyna się podstępnie. Często pierwszym objawem jest wirusowe zakażenie dróg oddechowych. (21, 23, 31). Stwierdza się przewlekły nieżyt nosa z obecnością wodnistej wydzieliny. Jest on trudny w leczeniu i często prowadzi do nawracającego, a

następnie przewlekłego zapalenia zatok. Dopiero po 1 do 5 latach od pierwszych objawów do obrazu klinicznego dołączają się: astma i nadwrażliwość na aspirynę. Zażycie aspiryny lub innych leków z grupy niesteroidowych przeciwzapalnych (NSAID, NLPZ) prowadzi do napadów duszności w ciągu około 3 godzin, którym towarzyszy wyciek z nosa, podrażnienie spojówek, pokrzywka, obrzęk wokół oczu, czy ból brzucha. Choroba ma charakter postępujący, niezależnie od unikania leków tej grupy. (23, 29, 31) Rozpoznanie ustalane jest na podstawie typowego obrazu klinicznego, który potwierdza się testami prowokacyjnymi. (32)

Już ponad 30 lat temu zaproponowano, że choroba ta spowodowana jest blokadą cyklooksygenaz przez leki NSAID. (33) U człowieka występuje kilka izoform tego enzymu: COX-1, COX-2 kodowanych przez różne geny. Niedawno opisano także trzy izoformy powstałe w wyniku „alternatywnego składowania” cząsteczki mRNA dla COX-1 oraz w pełni funkcjonalne produkty translacji dla tych wariantów mRNA. (34) Wyniki badań wskazują, że blokada izoformy COX-1, a nie COX-2 powoduje wystąpienie objawów po podaniu aspiryny. Jedną z hipotez tłumaczy patologię astmy aspirynowej przetrwałym zakażeniem wirusowym. Na skutek zakażenia rozwija się odpowiedź immunologiczna limfocytów T, których aktywność w warunkach prawidłowych jest hamowana przez endogenną prostaglandynę E. Podanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych powoduje zahamowanie wytwarzania PGE₂, co prowadzi do nadmiernej reakcji limfocytów T na zakażenie, czego następstwem jest astma oskrzelowa. (21) Hipotezę powyższą wydaje się potwierdzać badanie Yoshidy i współpracowników. Badali oni wpływ leku przeciwwirusowego acyklowiru na skurcz oskrzeli po prowokacji NLPZ i wykazali, że lek znamienne zmniejsza nadreaktywność oskrzeli na te leki, jak również zmniejsza stężenie LTE₄ w moczu chorych na astmę aspirynową. (35)

Leukotrieny cysteinylowe są ważnymi mediatorami procesów zachodzących u chorych z nadwrażliwością na aspirynę. Obserwowano wzrost leukotrienów cysteinylowych w moczu i popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych u chorych po dooskrzelowym podaniu aspiryny, który był znamienne wyższy wśród chorych na astmę aspirynową. (36, 37, 38, 39) Nie jest jasne, dlaczego blokada COX prowadzi do zwiększenia wytwarzania leukotrienów cysteinylowych u AIA. Możliwe jest występowanie różnic w aktywnościach enzymów biorących udział w szlaku przemian kwasu arachidonowego. Wykazano między innymi, że astmatycy z nadwrażliwością na aspirynę mają w porównaniu do astmatyków tolerujących aspirynę w błonie śluzowej oskrzeli znamienne większą liczbę komórek, w których obecny jest końcowy enzym przemian leukotrienów cysteinylowych: syntaza leukotrienu C₄ (LTC₄S).

(38) Za opisywane powyżej różnice odpowiadać może polimorfizm genetyczny w regionie promotorowym genu LTC₄S w pozycji -444. (40) W badaniu z udziałem populacji polskiej wykazano związek pomiędzy wariantem C promotora, a obecnością astmy aspirynowej. Opisany polimorfizm może prowadzić do powstania nowego motywu rozpoznawanego przez czynnik transkrypcyjny AP2, co może zwiększać ekspresję genu dla tego enzymu. (41)

Epidemiologia zakażeń

Rynowirusy są wirusami najczęściej powodującymi ostre nieżyty dróg oddechowych u ludzi. Zakażenie rozprzestrzenia się drogą kropelkową. Dla celów eksperymentalnych stosuje się rozpylenie cząstek wirusa do jamy nosa. Wrotami zakażenia jest przednia jama nosa. Replikację HRV stwierdzano również w tylnej jamie nosa, zatokach przynosowych, migdałkach, uchu środkowym, oraz dolnych drogach oddechowych. (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49). Odnotowano nieliczne przypadki wiremii. (50)

Do niedawna nie było wiadomo, czy rynowirusy są zdolne do przetrwania w oskrzelach. Przewaga objawów z górnych dróg oddechowych oraz przekonanie, że temperatura w oskrzelach jest zbyt wysoka przemawiały raczej przeciw. (51, 52) W ciągu ostatnich lat wykazano jednak metodami immunohistochemicznymi, PCR oraz hybrydyzacji *in situ*, że HRV może przetrwać w komórkach oskrzeli. (47, 53, 54) Ponieważ wirusa wykrywano tylko w nielicznych komórkach opisywano zazwyczaj obraz niejednorodnego, mozaikowego zakażenia. (47, 53)

Typowo, po krótkim, kilkugodzinnym okresie inkubacji występują ostre objawy, jak zapalenie gardła, kichanie, uczucie zatkania nosa, surowiczy wysięk z nosa. Obserwuje się również zmiany ogólnoustrojowe: dreszcze, gorączkę, bóle głowy. Objawy osiągają największe nasilenie w drugim, trzecim dniu i ustępują średnio po 7 dniach. (55) Około 25% zakażonych osób zgłasza utrzymywanie się dolegliwości przez 2 tygodnie. (56, 57) Liczba cząsteczek rynowirusa w popłuczynach nosa z namiennie spada po 3 dniach od zakażenia, niemniej wykryć go można do 3 tygodni, lub dłużej. (55)

Zakażenie HRV jest zazwyczaj łagodnym, samoograniczającym się procesem, nierzadko jednak przebiegającym z powikłaniami. Rynowirusy odpowiadają za większość spowodowanych przez wirusy zaostrzeń astmy. (4) Nicholson i współpracownicy wykazali, że aż 89% objawowych przeziębień wiąże się z nasileniem astmy oskrzelowej u dorosłych. Wśród wszystkich zidentyfikowanych wirusów 64% stanowią rynowirusy. (58)

Co najmniej połowę zaostrzeń POChP poprzedzają przeziębienie lub zapalenie gardła. Również w tym przypadku najczęściej wykrywa się rynowirusy. (19) Chorzy na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc mają cięższy i dłuższy przebieg zakażenia. (3, 59)

HRV są drugą co do częstości (po RSV) przyczyną hospitalizacji małych dzieci z powodu zapaleń oskrzelików, czy zapaleń płuc, jak również powodują poważniejsze w przebiegu zapalenia oskrzelików w porównaniu do RSV. (3, 60) Są także często wykrywane u dzieci z objawami ostrego zapalenia ucha środkowego, a mieszane zakażenia wirusowo-bakteryjne z obecnością HRV wydają się wiązać z większą opornością na działanie antybiotyków. (43, 61) HRV wiąże się z ryzykiem wystąpienia ostrego zapalenia zatok przynosowych. U większości badanych osób obserwuje się wówczas nieprawidłowości w badaniu tomograficznym zatok. (62) Pitkaranta i współpracownicy, stosując metodę hybrydyzacji *in situ* w komórkach nabłonka zatok, wykazali obecność RNA rynowirusa aż u 50% osób z objawami ostrego zapalenia zatok. (63)

Pikornawirusy wykrywano aż u 40% dzieci z mukowiscydozą i objawami przeziębienia. (64) Dzieci z częstymi przeziębieniami wydają się mieć szybszą progresję choroby. (3) Poważne następstwa mają zakażenia HRV u osób z niedoborami odporności. Mogą prowadzić do ciężkiego zapalenia płuc i śmierci aż u 30% biorców szpiku kostnego. (65) Rynowirusy wykrywano w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych u 30% chorych z nowotworami hematologicznymi i wirusowymi zapaleniami płuc. (66)

Ciężki przebieg zakażeń HRV dotyczy osób starszych (67, 68, 69) W tej grupie choroba częściej dotyczy dolnych dróg oddechowych, ma dłuższy i poważniejszy przebieg oraz może mieć charakter epidemiczny. (70, 67)

Rynowirusy w astmie oskrzelowej

Zakażenie HRV zwiększa nadreaktywność oskrzeli po prowokacji histaminą i alergenem. Jest ona większa u alergików i może się utrzymywać przez 7 tygodni lub dłużej. (71, 72) HRV nasila nie tylko natychmiastową (uwalnianie histaminy), lecz także późną fazę reakcji alergicznej. (12, 72, 73)

Wydaje się, że rynowirusy mogą mieć związek patogenezą choroby. (8) Zaobserwowano bowiem, że zapalenie oskrzelików spowodowane przez HRV we wczesnym okresie życia jest ważnym czynnikiem ryzyka wystąpienia „świszczącego oddechu” u dzieci w wieku późniejszym. (15, 74, 75)

Chorzy na astmę mogą być bardziej podatni na zakażenia rynowirusami. (76, 77) Nieprawidłowa, upośledzona reakcja obronna organizmu w odpowiedzi na zakażenie mogłaby

powodować wystąpienie objawów choroby. Holtzman zasugerował, że zmiany obserwowane w astmie przypominają upośledzoną reakcję immunologiczną w odpowiedzi na zakażenie wirusem. Organizm uruchamiając kompensacyjne, nieprawidłowe mechanizmy w celu zwalczania zakażenia, może przyczyniać się do przewlekłego zapalenia dróg oddechowych. (14)

Odpowiedź Th₂ jest hamowana przez cytokiny Th₁, jak IFN γ , czy IL-12. U chorych na astmę produkcja interferonów w odpowiedzi na zakażenie HRV może być upośledzona. (5) Leukocyty krwi obwodowej osób chorych na astmę oskrzelową wykazują inne reakcje w odpowiedzi na zakażenie rynowirusem w porównaniu do osób zdrowych. Osoby zdrowe reagują uwolnieniem dużej ilości IFN γ i IL-12, podczas gdy astmatycy produkują mniej tych cytokin, natomiast więcej immunosupresyjnej IL-10 i IL-4. (78) Taki niedobór odpowiedzi Th₁ skutkuje nadprodukcją cytokin Th₂, jak również ułatwia przetrwanie wirusa w oskrzelach. Niedawno opisano także defekt uwalniania interferonu β przez nabłonek oskrzeli w odpowiedzi na zakażenie HRV. (6) W astmie obserwuje się ponadto zwiększoną ekspresję cząsteczek ICAM-1 (CD45) na nabłonku dróg oddechowych, które są receptorami komórkowymi rynowirusów. (28) Rynowirusy nasilają dodatkowo ekspresję ICAM-1 na powierzchni nabłonka oraz zmniejszają syntezę rozpuszczalnych cząsteczek ICAM-1. Opisane zjawiska mogą ułatwiać zakażenie i przetrwanie HRV w dolnych drogach oddechowych. (79)

Do rozwoju astmy oskrzelowej i alergii może przyczyniać się pierwotne upośledzenie mechanizmów naprawczych nabłonka dróg oddechowych. (14) Zakażenie HRV działa cytotoksycznie na komórki nabłonka, upośledza funkcje obronne i naprawcze, opóźnia jego odnowę, zwiększa lokalną produkcję cytokin, czynników wzrostu, co powoduje napływ leukocytów do miejsca zakażenia, nasila produkcję śluzu. Wszystko to może ujawnić fenotyp astmy oskrzelowej. (6, 8, 80, 81) Upośledzenie bariery jaką jest nabłonek, pogłębione przez zakażenie HRV, zwiększa także ekspozycję głębszych warstw błony śluzowej na czynniki środowiskowe, co sprzyja przewlekłemu procesowi zapalnemu.

Wydaje się, że zaburzenie równowagi immunologicznej, czy pewien pierwotny defekt może powodować nieprawidłową obronę przeciwwirusową u chorych na astmę oskrzelową, ułatwiać replikację i przetrwanie rynowirusów, prowadząc do przewlekłego zakażenia. Można sobie wyobrazić, że liczba kopii wirusa w utajonym zakażeniu jest wystarczająco niewielka, aby możliwe było ich wykrycie dostępnymi metodami (podobnie jak to jest w niektórych przypadkach wirusowego zapalenia wątroby typu C). Alternatywną hipotezą, tłumaczącą obecność przewlekłych zmian zapalnych w odpowiedzi na zakażenie u osób predysponowanych jest hipoteza „*hit and run*”. Według niej wirus powoduje zmiany

zapalne w oskrzelach u osób predysponowanych, które trwają znacznie dłużej niż samo zakażenie. (14)

Opublikowano niewiele prac, w których badano obecność rynowirusów u astmatyków przy braku objawów klinicznych zakażenia. Odnotowane częstości wahają się szerokich granicach i zależą od zastosowanej metody diagnostycznej, sposobu i rodzaju pobierania materiału do badań, czy doboru populacji. W starszych opracowaniach rynowirusy stwierdzano przypadkowo u 4 do 12% chorych na astmę oskrzelową podczas dobrej kontroli choroby. W najnowszych doniesieniach odsetek ten jest wyższy i wynosi 16-36%. (8, 16, 69, 74, 82, 83, 84) Marin i współpracownicy stwierdzili obecność DNA dla adenowirusa aż u 78% dzieci z astmą bez objawów choroby, a RNA dla rynowirusa u 32% z nich. (18) Doniesienia wskazują, że rynowirusy u astmatyków mogą przetrwać nawet do 6 miesięcy po zakażeniu, a u osób z ciężką astmą są wykrywane w oskrzelach również w okresach między zaostrzeniami choroby. (8, 16, 84)

Możliwość przetrwania HRV potwierdzają wyniki innych prac. Wykazano metodami molekularnymi rynowirusy w okresie klinicznie bezobjawowym u dzieci podatnych na zapalenie ucha środkowego oraz z przerostem migdałków podniebiennych. (5, 16, 46, 48, 84) Wirusy oddechowe wykrywane są także u dużego odsetka chorych ze stabilną postacią przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (40% chorych, w tym u 7% wykrywano rynowirusy). (19)

Budowa i cykl rozwojowy wirusa

Rodzaj *Rhinoviridae* należy do rodziny wirusów *Picoraviridae*, których genom zbudowany jest z jednoniciowej dodatniej cząsteczki RNA. W obrębie pikornawirusów ogólnie wyróżnić możemy sześć rodzajów: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Parechovirus*. Ze względu na podobieństwo budowy molekularnej możemy je podzielić na dwie grupy: jedna obejmuje enterowirusy i rynowirusy, w drugiej znajdowałyby się hepatowirusy, kardiowirusy i aftowirusy.

Opierając się na właściwościach antygenowych oraz zdolności do pobudzania syntezy swoistych przeciwciał, wyróżniono ponad 100 serotypów rynowirusów. Ostatnie doniesienia wskazują na istnienie większej liczby niezidentyfikowanych dotychczas serotypów. (85) Chociaż pierwotnie zakładano, że nie występują pomiędzy nimi reakcje krzyżowe przeciwciał, obecnie wiadomo, że w wielu przypadkach przeciwciała swoiste dla danego serotypu mogą również wiązać się z antygenami innych serotypów. (86)

Analiza rynowirusów pod względem wrażliwości na czynniki przeciwwirusowe pozwoliła podzielić rodzaj *Rhinoviridae* na dwie grupy A i B. W grupie A uwzględniono 33 serotypy, które wykazały dużą wrażliwość na takie czynniki przeciwwirusowe, jak WIN51711, natomiast w grupie B umieszczono 67 serotypów wrażliwych na strukturalnie krótsze cząsteczki, jak R61837. (87)

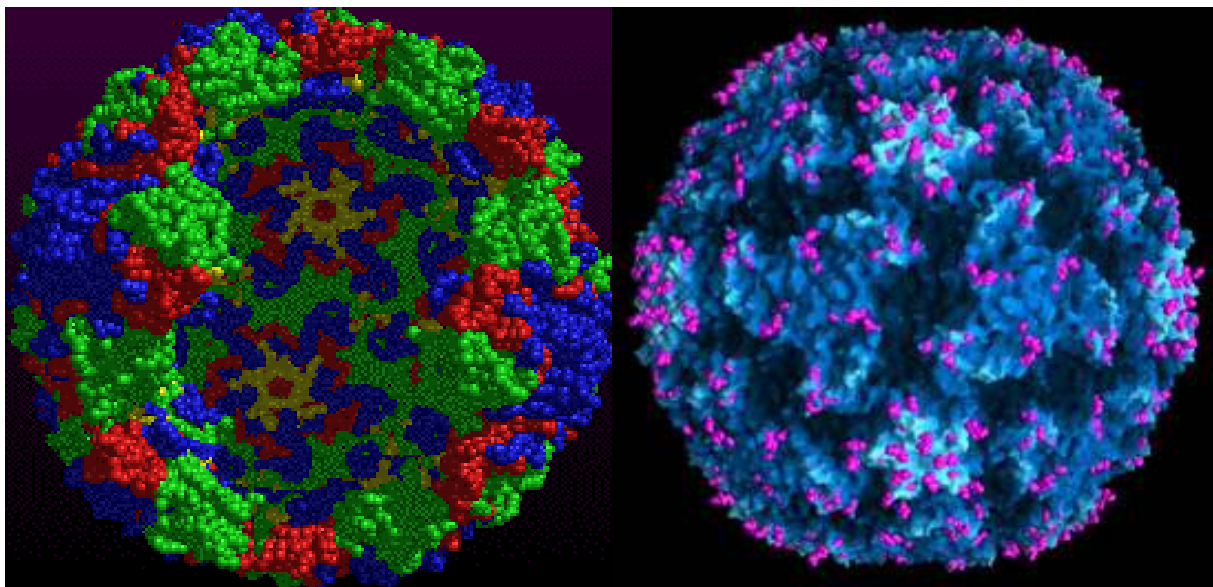
W zależności od receptora komórkowego rynowirusy można podzielić na dwie grupy: większą, obejmującą około 87 serotypów oraz mniejszą, w której zidentyfikowano 12 serotypów. Receptorem komórkowym pierwszej, w tym HRV 14, HRV 16, jest ICAM-1. Receptorem mniejszej grupy rynowirusów, w tym HRV2 są cząsteczki należące do rodziny komórkowych receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości (low-density lipoprotein receptor, LDLR). (88)

W zależności od różnic sekwencji RNA rozróżniamy typy: *human rhinovirus A* oraz *human rhinovirus B*. Do pierwszego włączonych zostało 76, a do drugiego 25 serotypów rynowirusów. (89) Ostatnio zidentyfikowane szczepy rynowirusów nie należą do żadnego ze znanych serotypów. Wśród nich wyodrębniono nową grupę rynowirusów, grupę C, różniącą się od znanych grup A i B sekwencją nukleotydów.

Kapsyd wirusa buduje 60 kopii czterech podjednostek białkowych: VP1 - VP4. Wywodzą się one z poliproteiny syntetyzowanej na matrycy RNA, ulegającej następnie proteolitycznej obróbce. Tworzą strukturę o regularnym, ikosahedralnym kształcie. Białka VP1-VP3 mają konformację typu harmonijki β , a ich karboksylowe końce znajdują się na powierzchni, natomiast części aminowe wewnątrz otoczki. Białko VP4 umiejscowione jest wewnątrz otoczki, w bezpośrednim sąsiedztwie RNA. Na powierzchni każdej ściany kapsydu znajduje się zagłębienie, nazywane kanionem (ryc.1) Budowa kanionu, jak i układ aminokwasów w jego wnętrzu zapewnia przyłączanie głównego receptora komórkowego: ICAM-1. Jego ukształtowanie zabezpiecza przed działaniem układu odpornościowego, ponieważ cząsteczki ludzkich immunoglobulin są zbyt duże, aby mogły wnikać do wnętrza kanionu. To z kolei powoduje, że budowa aminokwasowa kanionu wykazuje małą zmienność genetyczną. (90) Na rycinie poniżej przedstawiono schemat budowy rynowirusa, uzyskany za pomocą krystalografii z użyciem promieni rentgenowskich.

Rycina 1. Budowa otoczki ludzkich rynowirusów. Z lewej rekonstrukcja budowy kapsydu wirusa (HRV 16) w oparciu o badania krystalograficzne, kolorami zaznaczono poszczególne podjednostki; po prawej rekonstrukcja rynowirusa 14 z wyraźnie przedstawionymi „kanionami” oraz zaznaczonymi miejscami antygenowymi.

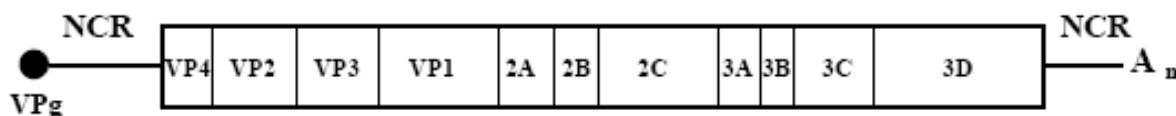
http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNApicorn.html



W wyniku przyłączenia cząsteczki ICAM-1 dochodzi do usunięcia reszty lipidowej z kieszonki wytworzonej przez białko VP1, co powoduje destabilizację struktury kapsydu i uwalnianie RNA wirusa do wnętrza komórki. (90)

Genom rynowirusów jest zbudowany z pojedynczej nici kodującej RNA (dodatniej polarności), materiał genomowy pełni także rolę matrycowego RNA. Na obydwu jej końcach znajdują się sekwencje niekodujące (NTR). Koniec 5' jest połączony za pomocą wiązania fosfodiesterowego z białkiem VPg. Sekwencja aminokwasowa tego białka jest bardzo podobna u wszystkich rynowirusów. Fragment NTR końca 5' RNA genomowego ma długość 600 do 1300 nukleotydów i skomplikowaną strukturę drugorzędową. Region ten zawiera sygnały dla replikacji oraz składania cząsteczek wirusa. Tutaj znajduje się także miejsce inicjacji transkrypcji (wewnętrzne miejsce inicjacji transkrypcji, IRES). Koniec 3' zakończony jest niekodującą sekwencją poli(A), analogiczną do sekwencji poli(A) komórkowego mRNA. (90) Region pomiędzy fragmentami NCR koduje poliproteinę o długości 2100 do 2200 aminokwasów. Schematyczną strukturę RNA rynowirusów przedstawiono na rycinie poniżej.

Rycina 2. Schemat budowy RNA rynowirusa z zaznaczeniem miejsc kodujących kolejne białka rynowirusa.



W wyniku translacji powstaje jedna poliproteina (250 kDa), zawierająca prekursory wszystkich białek wirusa. Obróbka proteolityczna pierwotnego białka następuje jeszcze przed zakończeniem transkrypcji i jest zależna od proteaz wirusowych, wchodzących w skład poliproteiny. W genomie rynowirusów zakodowane są dwie proteazy: 2A i 3C. Proteaza 2A powoduje także zahamowanie syntezy białek gospodarza, ponieważ trawi białka wiążące czapkę mRNA, translacja RNA wirusa odbywa się za pomocą IRES. (90)

W obrębie poliproteiny wyróżnić można trzy prekursory białek: P1, P2, P3. Produkt translacji zawiera: białka otoczki - VP4, VP2, VP3, VP1 (początkowo w obrębie prekursora P1), picornarin 2A, białka rdzenia P2B, P2C (w obrębie P2), białko rdzenia - P3A, białko związane z genomem VPg - P3B, proteaza 3C, polimeraza RNA zależna od RNA - P3D (w obrębie P3).

Najwcześniejszym etapem obróbki proteolitycznej jest odcięcie fragmentu P1, zawierającego białka strukturalne od fragmentu, gdzie znajdują się białka niestrukturalne. Następnie w wyniku proteolizy fragmentu P1 powstają białka kapsydu wirusa: VP0 (a następnie VP2 i VP4), VP1, VP3.

Wirusowa polimeraza RNA syntetyzuje ujemną nić RNA, komplementarną do nici genomowej, ta z kolei służy do wytworzenia dużej liczby kolejnych kopii dodatniej cząsteczki RNA. W pierwszych etapach cyklu dodatnie RNA stanowią matrycę do syntezy białek, dopiero później pakowane są do nowych kapsydów. Proces składania nowych cząsteczek wirusa zachodzi w cytoplazmie komórki. (90, 56)

Cykl replikacji w hodowli komórkowej wynosi od około 5 do 8 godzin, tyle również wynosi okres wylegania pierwszych objawów. (55)

Diagnostyka zakażeń HRV

Tradycyjnymi metodami wykrywania wirusa jest izolacja w hodowlach komórkowych. Wzrost rynowirusów możliwy jest tylko w wybranych liniach komórkowych, jak nabłonek oskrzeli, płuc ludzkich, linia HeLa, czy komórki nerki małpiej. (91) Przekonanie, że optymalna temperatura wzrostu rynowirusów wynosi 33 stopnie doprowadziło do wieloletniego sporu, czy są one zdolne przetrwać w oskrzelach, gdzie temperatura jest wyższa.

Stosunkowo niedawno udowodniono, że rynowirusy mogą równie dobrze replikować się w wyższych temperaturach. (52)

Oceny wzrostu rynowirusów w hodowlach dokonuje się na podstawie efektu cytopatycznego. Podobieństwo zmian wywoływanych przez rynowirusy i enterowirusy obniża wiarygodność metody. Dodatkowe testy z badaniem wrażliwości na niskie pH (HRV są niestabilne w niskim pH) pomagają różnicować te dwa rodzaje. Serotypy wirusa identyfikuje się za pomocą przeciwciał, pobranych z immunizowanych zwierząt. Duża liczba serotypów utrudnia jednak diagnostykę i wymaga przeprowadzenia szeregu doświadczeń. Metoda jest czasochłonna i ma niską czułość.

Poszukiwanie antygenów rynowirusa lub przeciwciał anti-HRV we krwi ma również ograniczoną wartość diagnostyczną z uwagi na dużą liczbę serotypów wirusa. Stosowanymi do wykrywania przeciwciał anti-HRV są metody neutralizacji homologicznych serotypów w hodowlach komórkowych, ELISA, techniki hamowania aglutynacji, czy wiązania dopełniacza. (91)

Opis wybranych metod biologii molekularnej

Metody biologii molekularnej coraz częściej zastępują opisane wcześniej techniki. W porównaniu do metod konwencjonalnych, których czułość wynosi około 45%, czułość metody RT-PCR to 83%. Swoistość obydwu metod wynosi odpowiednio: 100% i 93%. (22)

Dzięki nowym metodom diagnostycznym możliwe było wykrycie szeregu dotychczas niezidentyfikowanych szczepów rynowirusów, których identyfikacja za pomocą hodowli komórkowych była niemożliwa ze względu na brak efektu cytopatycznego. (85)

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT), jak i łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) są metodami enzymatycznymi *in vitro*, pozwalającymi na zsyntezowanie nici DNA komplementarnej (cDNA) do poszukiwanej sekwencji RNA (metoda RT), a następnie powielenia tego fragmentu (PCR). Swoistość reakcji zależy między innymi od starterów, krótkich fragmentów DNA, odpowiadających końcowym fragmentom poszukiwanej sekwencji. W odpowiednich warunkach startery przyłączają się do matrycy, a do ich końca 3' – enzym, odwrotna transkryptaza (RT-PCR) lub polimeraza (PCR) dobudowuje kolejne nukleotydy tak, że powstaje komplementarna nić DNA. W reakcji RT powstaje komplementarny do RNA odcinek DNA (cDNA). W reakcji PCR polimeraza powiela docelowy fragment DNA, cDNA. RT jest jednoetapowa, natomiast PCR wieloetapowa. Kolejne etapy powtarzane są cyklicznie 20 do 40 razy. Możliwe jest uzyskanie nawet miliarda kopii cDNA. Pierwszym etapem PCR jest denaturacja w temperaturze 90-96°C, co powoduje

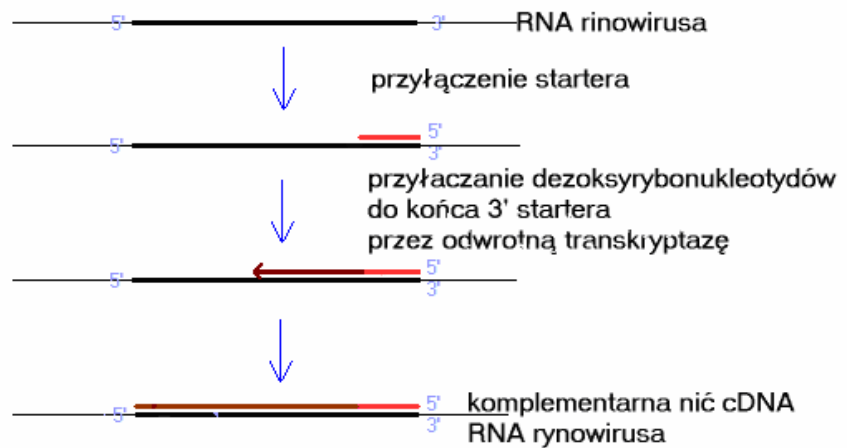
rozdzielenie podwójnej nici DNA. W drugim etapie startery przyłączają się do poszukiwanych sekwencji na matrycy DNA. Proces ten zachodzi w niższej temperaturze (40 do 60°C) i nosi nazwę hybrydyzacji (ang. annealing). Trzeci etap, elongacja zachodzi w temperaturze 72°C i prowadzi do dobudowywania kolejnych nukleotydów przez termostabilną polimerazę. Każda skopioną cząsteczka DNA staje się matrycą do syntezy nowej nici w czasie kolejnego cyklu reakcji PCR. Produkty reakcji można ocenić za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Pod wpływem promieniowania UV rozdzielone prążki fluoryzują, co można zarejestrować na kliszy fotograficznej. Szybkość migracji kwasu nukleinowego zależy od ilości par zasad fragmentu, tzn. im większa odległość od miejsca startu migracji, tym produkt reakcji jest krótszy.

Powielony fragment genomu rynowirusów może służyć do sekwencjonowania, syntezy sondy hybrydyzacyjnej lub klonowania.

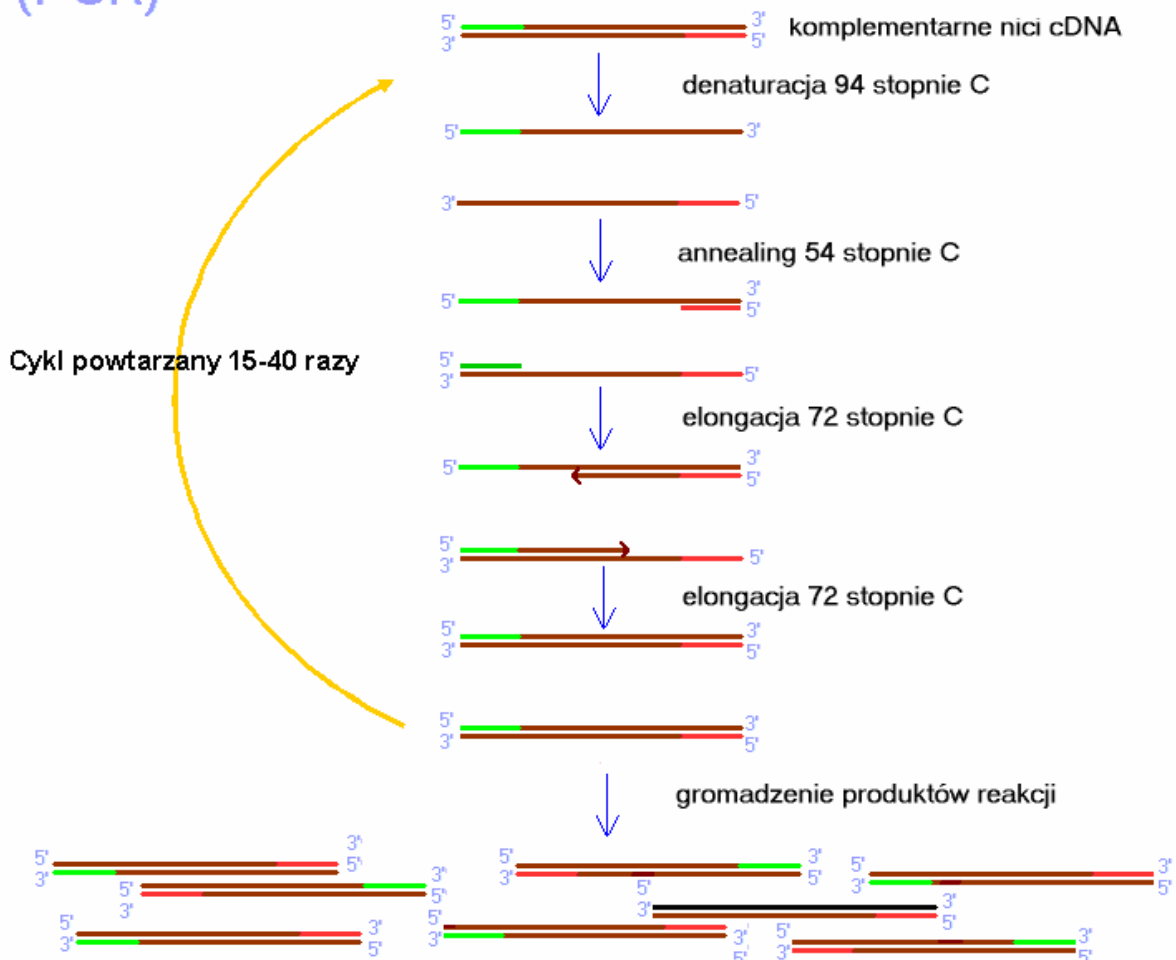
Na rycinie przedstawiono kolejne etapy RT oraz PCR.

Rycina 3. Kolejne etapy wykrywania RNA rynowirusa: odwrotna transkrypcja oraz reakcja PCR.

ODWROTNA TRANSKRYPCJA (RT)



REAKCJA ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY (PCR)



Metoda hybrydyzacji wykorzystuje zdolność jednoniciowych kwasów nukleinowych o komplementarnych sekwencjach do hybrydyzacji i tworzenia dwuniciowych hybryd. Możliwe jest powstanie następujących hybryd: DNA/DNA, DNA/RNA oraz RNA/RNA. Poszukiwaną sekwencję wykrywa się za pomocą sond, znakowanych fragmentów kwasów nukleinowych komplementarnych do poszukiwanej sekwencji, które w odpowiednich warunkach przyłączają się do niej. Sondy oligonukleotydowe lub sondy RNA są jednoniciowe. W przypadku dwuniciowych sond DNA, konieczna jest wstępna denaturacja w wysokiej temperaturze. Znakowane są radioaktywnymi izotopami lub związkami nieradioaktywnymi i wykrywane za pomocą autoradiografii, immunohistochemii, bądź ocenia się je pod mikroskopem fluorescencyjnym. (92)

Ideą hybrydyzacji *in situ* jest możliwość wykrywania poszukiwanych sekwencji bezpośrednio w komórkach o nienaruszonej strukturze. Skrawki tkanek lub rozmazy zawiesiny komórek po odpowiednim przygotowaniu umieszcza w roztworze zawierającym sondę. Sonda wnika do komórek i hybryduje z poszukiwaną sekwencją. Pod mikroskopem świetlnym widoczne są zabarwione obszary komórek, w których obecna jest poszukiwana sekwencja. Reakcja PCR (PCR *in situ*) lub RT i PCR (RT-PCR *in situ*) przeprowadzana jest bezpośrednio w preparatach cytologicznych lub histologicznych. Produkty reakcji mogą być znakowane za pomocą zmodyfikowanych nukleotydów, wbudowywanych podczas reakcji PCR (metoda bezpośrednia) lub poprzez hybrydyzację produktów reakcji ze znakowaną antygenowo lub izotopowo sondą (metoda pośrednia).

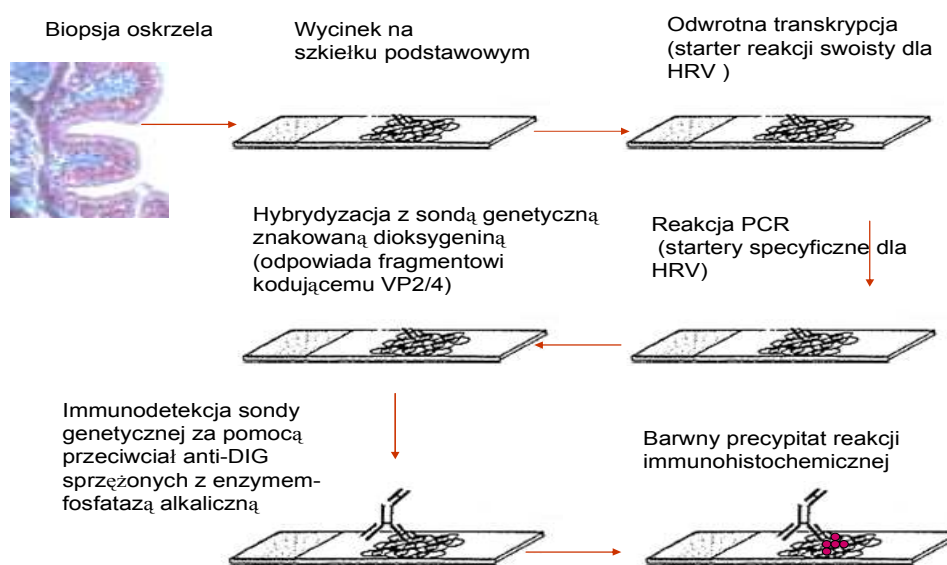
Główną zaletą technik *in situ* jest uwidocznienie poszukiwanego fragmentu bezpośrednio w preparacie, możliwość oceny aktywności określonych genów, dystrybucji komórkowej i tkankowej poszukiwanych transkryptów. Wydaje się, że połączenie metody PCR z hybrydyzacją *in situ* zapewnia wyższą czułość i swoistość reakcji w porównaniu z samą hybrydyzacją *in situ*. (93, 94, 95) W przypadku obecności wirusa w pojedynczych komórkach w tkance, RT-PCR *in situ* może być metodą czulszą niż RT-PCR, gdyż pozwala na lokalną amplifikację RNA wirusa i uzyskanie dużych lokalnych stężeń cDNA. RT-PCR *in situ* może być metodą z wyboru w badaniach, gdy spodziewana jest niewielka liczba kopii RNA wirusa. (94) Inną zaletą tej metody jest mniejsze ryzyko zanieczyszczenia próbek pobieranych z dolnych dróg oddechowych, materiałem z górnych dróg oddechowych, co jest głównym zarzutem w przypadku wielu innych metod molekularnych. (54)

Parametry poszczególnych etapów reakcji są każdorazowo określone eksperymentalnie i mają kluczowe znaczenie dla powodzenia reakcji. Najważniejszymi są: odpowiedni czas ekspozycji na proteazy, warunki reakcji PCR, czy hybrydyzacji *in situ*, w tym temperatury

poszczególnych etapów reakcji, skład mieszanin reakcyjnych. (93, 94) Stanowi to podstawową trudność metody i może prowadzić do różniących się wyników prezentowanych w literaturze. (93, 94)

Kolejne etapy reakcji pośredniej RT-PCR *in situ*, zastosowanej w prezentowanej pracy, przedstawiono na rycinie.

Rycina 4. Kolejne etapy reakcji pośredniej RT-PCR *in situ*.



Fragment błony śluzowej oskrzela umieszczano na szkiełku podstawowym. Po odpowiednim przygotowaniu, bezpośrednio w wycinkach przeprowadzono odwrotną transkrypcję z zastosowaniem swoistego startera dla rynowirusów. Tak uzyskany cDNA, odpowiadający poszukiwanej sekwencji HRV, został zwielokrotniony podczas reakcji PCR. Fragment cDNA wykrywano sondą genetyczną znakowaną digoksygeniną podczas hybrydyzacji *in situ*. Po usunięciu nadmiaru sondy, przyłączano do niej przeciwciało wykrywające digoksygeninę, sprzężone z fosfatazą alkaliczną. Miejsca obecności rynowirusów uwidoczniono po dodatniu substratu barwnej reakcji enzymatycznej, zachodzącej z udziałem fosfatazy.

Przeciwwirusowe mechanizmy obronne gospodarza

W następstwie uszkodzenia zakażonych komórek organizm uruchamia mechanizmy obronne. Wyróżnić możemy dwa typy zapalenia: ostre lub przewlekłe. Pierwsze trwa krótko,

godziny lub dni i jest następstwem krótkotrwałego narażenia na czynnik uszkodzający. Druga postać ma przebieg długotrwały, charakteryzuje ją naciek komórek jednojądrzastych, co odzwierciedla długotrwałe narażenie na uszkodzenie, jednoczesowe niszczenie tkanek oraz naprawa z proliferacją naczyń krwionośnych i włóknieniem. Ostre zapalenie może poprzedzać rozwój zapalenia przewlekłego. W odróżnieniu od fazy ostrej, przewlekłe zapalenie może przebiegać bezobjawowo, a zmiany zapalne mają zazwyczaj niewielkie nasilenie. (26)

Wielu autorów zwraca uwagę na lokalne mechanizmy obronne jako kluczowe w przebiegu zapalenia dolnych dróg oddechowych. (26) Pierwszym etapem lokalnego zapalenia jest napływ leukocytów do miejsca uszkodzenia. Odbywa się to przy pomocy cząsteczek przylegania międzykomórkowego. Przechodzenie leukocytów z krwi, przez światło naczyń, do błon śluzowych warunkują co najmniej 3 rodzaje oddziaływań pomiędzy leukocytami i śródbłonkiem. E-selektyny wiążą się z receptorem sialyl-Lewis x na powierzchni leukocytów, VCAM-1 z $\beta 1$ -integryną, a VLA-4 oraz cząsteczka ICAM-1 wiążą $\beta 2$ -integryny, LFA-1 lub Mac-1. O napływie leukocytów do miejsca zapalenia w drogach oddechowych decyduje oddziaływanie pomiędzy ICAM-1 a $\beta 2$ -integrynami. (26). Wnikanie poszczególnych populacji limfocytów do tkanek docelowych uzależniony jest od ekspresji szeregu receptorów, zwanych adresynami. Jak dotąd nie zidentyfikowano adresyn odpowiadających za napływ limfocytów do płuc. (26) Duże znaczenie w kontrolowaniu lokalnego procesu zapalnego mają czynniki chemotaktyczne, warunkujące migrację leukocytów do miejsca zapalenia. Biorą one także udział w modyfikowaniu reakcji immunologicznej.

Lokalnym zmianom zapalnym towarzyszą nierzadko objawy ogólnoustrojowe. Są nimi: gorączka, senność, utrata apetytu, zwiększona synteza białek ostrej fazy (jak białko C-reaktywne, amyloid A, białka dopełniacza, białka krzepnięcia), zmiany obrazu leukocytów krwi obwodowej, wzmożony katabolizm, niedociśnienie, czy zaburzenia hemodynamiczne. Mediatorami tych procesów są: interleukina 1(IL-1), interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów (TNF). Leukocytoza wynika z uwalniania rezerw leukocytów ze szpiku kostnego do krwi obwodowej (powodowane między innymi przez IL-1 i TNF), a także zwiększenia produkcji leukocytów w szpiku kostnym na skutek nadprodukcji czynników wzrostu kolonii. W przebiegu zakażeń wirusowych obserwuje się zarówno leukocytozę, jak i leukopenię. (26)

W poniższej tabeli przedstawiono udział wybranych mediatorów w procesie zapalnym i mechanizmach immunologicznych.

Tabela 1. Funkcje wybranych mediatorów procesu zapalnego.

Mediator	Komórki produkujące	Działanie biologiczne
IL-1	Monocyty, makrofagi	Reakcja ostrej fazy, Wzrost temperatury ciała, Wzrost przepuszczalności naczyń, Synteza IL-2 i jej receptora, Wydzielanie czynników stymulujących wzrost kolonii, Powstawanie i chemotaksja neutrofilów i monocytów, Wydzielanie PAF, prostaglandyn, NO, Czynność komórek dendrytycznych.
IL-6	Monocyty, makrofagi	Reakcja ostrej fazy, Wzrost temperatury ciała, Różnicowanie limfocytów B, Aktywacja limfocytów T rozpoznających antygen, Różnicowanie LT w kierunku limfocytów cytotoksycznych, Wytwarzanie IL-1.
IL-8	Nabłonek dróg oddechowych	Aktywacja funkcji neutrofilów: chemotaksja, degranulacja, uwolnienie enzymów lizosomalnych, działanie cytotoksyczne.
TNF- α	Monocyty, makrofagi, Limfocyty	Reakcja ostrej fazy, Odporność przeciwwakaźna, Prolifercja i różnicowanie LB, Ekspresja cząsteczek MHC I, MHC II, Prolifercja LT, proliferacja i cytotoksyczność komórek NK, LAK, LTc, Chemotaksja i aktywacja monocytów, neutrofilów, Indukuje uwalnianie IFN- γ , IL-1, IL-6, GM-CSF, G-CSF, EGF, PAF oraz produktów przemian kwasu arachidonowego.
Histamina	Mastocyty, bazofile	Poszerzenie i wzrost przepuszczalności małych naczyń, Stymulacja wydzielania gruczołów egzokrynych, Pobudzenie zakończeń nerwów.
Kininy	Różne komórki	Poszerzenie i wzrost przepuszczalności małych naczyń, Pobudzenie uwalniania histaminy z mastocytów, Synteza prostaglandyn, Pobudzenie zakończeń bólowych nerwów.
Prostaglandyny	Mastocyty, różne komórki	Różne działania: PGE ₂ , PGD ₂ - rozszerzenie naczyń, PGE ₂ - właściwości immunosupresyjne, PGE, PGD ₂ - ból, przepuszczalność naczyń, rozszerzenie oskrzeli, PGF _{2α} , PGD ₂ - skurcz mięśni gładkich, skurcz oskrzeli, PGD ₂ - agregacja i degranulacja płytek.

Leukotrieny cysteinyłowe	Mastocyty, bazofile, Leukocyty	Wzrost przepuszczalności naczyń, Chemotaksja leukocytów, przyleganie do śródbłonka, Pobudza wytwarzanie IL-1, IFN- γ , Stymulacja wydzielania gruczołów egzokrynych, Skurcz mięśni gładkich.
Tlenek azotu	Nabłonek dróg oddechowych, Makrofagi, leukocyty, Komórki nerwowe, śródbłonek	Działanie przeciwwirusowe, Rozszerzenie naczyń krwionośnych, Rozszerzenie oskrzeli, Hamowanie funkcji płytek, Neuroprzebieżnik hamujących neuronów układu NANC, Nitrozylacja białek i zmiana ich aktywności, w tym czynnika NF- κ B.

Pierwszym etapem obrony przeciwwirusowej są mechanizmy wrodzonej odporności nieswoistej. Wpływają na kontrolę zakażenia na najwcześniejszych etapach, lecz także na zapoczątkowanie i przebieg nabytych mechanizmów obronnych.

Uważa się, że nabłonek dróg oddechowych odgrywa ważną rolę we wczesnych mechanizmach obrony przeciwwirusowej. (8, 14) Stanowi on barierę oddzielającą środowisko zewnętrzne od środowiska wewnętrznego organizmu. Odpowiada za mechaniczne usuwanie zanieczyszczeń, w tym cząstek wirusów za pomocą aparatu śluzowo-rzęskowego, mobilizację komórek układu odpornościowego. Śluz pokrywający powierzchnię nabłonka „zlepia” cząsteczki zanieczyszczeń, mikroorganizmy, a także zawiera szereg aktywnych biologicznie substancji. Są to między innymi β -defensyny o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych i przeciwgrzybiczych. (28) Prezentacja na powierzchni komórek cząsteczki ICAM-1 umożliwia adhezję limfocytów T, jak i prawie wszystkich innych komórek układu immunologicznego do nabłonka, co warunkuje napływ leukocytów do miejsca zapalenia. Adhezja limfocytów zależy od obecności interferonu γ . Drugim sygnałem są produkowane przez nabłonek chemokiny RANTES. (26) Komórki nabłonka są również ważnym źródłem tlenu azotu o właściwościach przeciwwirusowych i modyfikujących przebieg procesu zapalnego. (28) Działając chemotaktycznie na niedojrzałe komórki dendrytyczne oraz limfocyty T pamięci, stanowią jeden z wielu pomostów pomiędzy wrodzonymi i nabytymi mechanizmami odporności komórkowej. (96)

W obrębie pęcherzyków płucnych funkcje ochronne pełnią kolektyny- białka surfaktantu A i D. Ułatwiają one między innymi eliminację mikroorganizmów przez makrofagi. (97)

Komórkami odpowiedzi nieswoistej są makrofagi/monocyty i granulocyty. Makrofagi, najliczniejsze komórki światła oskrzeli ulegają szybkiej rekrutacji do dróg oddechowych w odpowiedzi na zakażenie. (98) Pobudzone czynnikami mikroorganizmów, a w późniejszym

okresie cytokinami, komórki obrony nieswoistej fagocytują bakterie i wirusy. Hamująco na ich aktywność mogą działać: nowotworowy czynnik wzrostu $TGF\beta$, prostaglandyna E_2 , czy IL-10. (97) Fagocytozę może zapoczątkować bezpośrednio rozpoznanie struktur mikroorganizmu (za pomocą receptorów PRR) lub ich opłaszczenie przez białka zwane opsoninami. Są nimi przeciwciała i składniki dopełniacza, białko C-reaktywne, białka surfaktantu. Najefektywniejszymi opsoninami są immunoglobuliny IgG, rozpoznawane przez trzy typy receptorów ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$, $Fc\gamma RIII$). Receptorami dla immunoglobulin E są: $Fc\epsilon RI$, o dużym powinowactwie do IgE, który powoduje uwolnienie z mastocytów i bazofilów mediatorów reakcji alergicznej, $Fc\epsilon RII$, o niskim powinowactwie do IgE, może zapoczątkować fagocytozę, uczestniczyć w cytotoksyczności zależnej od przeciwciał. Na powierzchni komórek odpowiedzi nieswoistej wykrywa się receptory rozpoznające wzorzec patogenów, w tym TLR, które aktywują szereg szlaków wewnątrzkomórkowych. W wyniku pobudzenia nasilają one fagocytozę, produkcję cytokin, mediatorów prozapalnych, czynników wzrostu. Mikroorganizmy zabijane są za pomocą mechanizmów tlenowych i beztlenowych. W wyniku pierwszych powstają toksyczne związki tlenu. W mechanizmach beztlenowych udział biorą toksyczne białka, jak defensyny, lizozym, kolagenaza, elastaza, proteazy, lipazy, DNAzy, RNAzy, główne białko zasadowe, białko kationowe eozynofilów i inne. (97) Ponieważ makrofagi i granulocyty mogą prezentować antygeny limfocytom T, uwalniają szereg cytokin, stanowią kolejny pomost pomiędzy nieswoistymi i swoistymi mechanizmami obronnymi. Aktywowane neutrofile mogą między innymi przyspieszać dojrzewanie komórek dendrytycznych i zwiększać ich aktywność, a pośrednio poprzez nasilenie proliferacji limfocytów T, nasilać odpowiedź typu Th_1 . (99)

Ostatnio zwraca się uwagę, że eozynofile, tradycyjnie uważane są za komórki obrony przeciw pasożytom, biorą udział także w obronie przeciwwirusowej. Eozynofile są bogatym źródłem rybonukleaz, dzięki którym mogą niszczyć RNA wirusów. Posiadają również receptory dla RNA, jak TLR-3, TLR-7, TLR-8. W następstwie pobudzenia wzrasta produkcja rybonukleaz eozynofilowych, tlenu azotu, $IFN\beta$, o właściwościach przeciwwirusowych i proapoptotycznych. (100, 101)

W mechanizmach odporności przeciwwirusowej biorą udział komórki także NK oraz inne subpopulacje komórek limfoidalnych. NK niszczą komórki zakażone wirusem w mechanizmie cytotoksycznym, niezależnym od prezentacji antygeny. Celem ataku są komórki z niską ekspresją antygenów MHC (zakażone przez wirusy). NK mogą także bezpośrednio rozpoznawać bakterie i wirusy. Są ważnym źródłem interferonu γ , $TNF-\alpha$. (97, 102)

Jednymi z najwcześniej uwalnianych czynników obrony przeciwwirusowej są interferony (IFN). Stanowią również istotny „pomost” pomiędzy odpornością wrodzoną i nabytą. Interferony typu I (α , β , κ , ω) są produkowane przede wszystkim przez leukocyty, komórki dendrytyczne, fibroblasty, natomiast interferony II typu (IFN γ) – przez limfocyty T, NK, czy makrofagi. (97) Regulacja aktywności interferonów odbywa się przy współdziałaniu czynników transkrypcyjnych, jak NF- κ B, ATF/JUN oraz czynników IRF. W wyniku działania interferonów dochodzi do ekspresji szeregu genów zależnych od interferonów o właściwościach przeciwwirusowych i immunomodulujących. Wzrasta ekspresja między innymi: ICAM-1, RANTES, kinazy białkowej R, syntetazy oligoizoadenylationowej, deaminazy adenozyliny, IL-1, IL-6, IRF, STAT i wielu innych. (103)

Syntetaza oligoizoadenylationowa warunkuje powstanie oligonukleotydów adenylationowych, aktywujących endorybonukleazę (RNAzę L), niszczącą wirusowe RNA. Kinaza białkowa R (PKR) w obecności dwuniciowego RNA fosforyluje podjednostkę α czynnika inicjującego syntezę białka (eIF-2). Fosforylacja dotyczy także innych białek komórki. W rezultacie zahamowana zostaje produkcja białek wirusowych. IFN I nasilają także produkcję białek Mx, które są GTP-azami. MxA upośledza składanie cząsteczek wirusa. Deaminazy adenozyliny działają w obrębie dwuniciowego RNA, w wyniku czego wirusowy RNA staje się niefunkcjonalny. (10)

Interferony, zwłaszcza IFN γ , przyspieszają różnicowanie i nasilają aktywność limfocytów cytotoksycznych, komórek K, NK, LAK, czy makrofagów. Biorą również udział w zapoczątkowywaniu apoptozy w nabłonku dróg oddechowych, ułatwiając w ten sposób eliminację wirusów. Nasilają ekspresję cząsteczek MHC klasy I, a w przypadku IFN γ również MHC II i następnie prezentację antygenów limfocytom T. (97)

Interferony mogą uczestniczyć w nieprawidłowej reakcji na zakażenie u chorych na astmę. Opisywano związek pomiędzy niedoborem produkcji interferonu β , upośledzeniem apoptozy, a wrażliwością astmatyków na zakażenia HRV. (6) Ostatnio odkrytym interferonom typu III (IFN- λ 1, IFN- λ -2/3), o właściwościach podobnych do IFN I typu, przypisuje się również ważną rolę w patogenezie astmy oskrzelowej. (5)

Mechanizmem obronnym przed zakażeniem wirusowym jest apoptoza, programowana śmierć komórki. Dzięki niej organizm może wyeliminować nieprawidłowe komórki łącznie z wirusem, zapobiegając rozprzestrzenianiu się zakażenia, rozwojowi zakażenia przetrwałego, czy nadmiernej reakcji zapalnej w jego przebiegu. (90) Apoptozę zapoczątkowują zarówno sygnały zewnętrzne, jak i wewnątrzkomórkowe. Drogę zewnątrzkomórkową rozpoczyna wiązanie Fas z Fas-ligandem lub TNF z jego receptorem na powierzchni zakażonej komórki.

Aktywacja drogi wewnątrzpochodnej przebiega ze zwiększeniem przepuszczalności błon komórkowych mitochondriów, co powoduje uwolnienie cytochromu C do cytoplazmy. (97)

Wirusy wytworzyły szereg mechanizmów zaburzających proces apoptozy na różnych etapach. Białka wirusowe mogą powodować zarówno jej zahamowanie, jak i aktywnie ją nasilać. Zablokowanie apoptozy przedłuża czas replikacji wirusa w komórce, która nie ulega przedwczesnej śmierci, co może prowadzić do uwalniania większej liczby cząsteczek wirusa. (6) Z drugiej strony apoptoza może być także zjawiskiem korzystnym dla wirusów, gdyż umożliwia szerzenie się zakażenia bez pobudzania reakcji zapalnej, jak odbywa się to w przypadku lizy zakażonych komórek. (6, 90, 104)

Obecnie duże znaczenie w odporności nieswoistej przypisuje się grupie konserwatywnych receptorów, należących do receptorów rozpoznających wzorzec patogenów (PRR), a wśród nich receptorom TLR. Warunkują one wczesną odpowiedź na zakażenie. (105) Receptorom TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-9 przypisuje się zdolność do rozpoznawania wirusów. (5, 106) TLR-7, TLR-8, wykrywane są między innymi w komórkach dendrytycznych, eozynofilach, neutrofilach, mogą ulegać aktywacji w odpowiedzi na obecność jednoniciowego genomowego RNA wirusów. (106, 107, 108) TLR-3 jest receptorem dla dwuniciowego RNA, cząsteczki często obecnej podczas replikacji wielu wirusów RNA. (105) W badaniu *in vitro* udowodniono, że TLR-3 ma istotne znaczenie w zapoczątkowywaniu odpowiedzi na zakażenie rynowirusem. (109)

Nabyte mechanizmy odporności rozpoczyna prezentacja antygenów limfocytom T. Antygeny po obróbce wewnątrzkomórkowej, zostają związane przez białka MHC i prezentowane limfocytom T. Cząsteczki MHC I występują na wszystkich komórkach organizmu i wiążą antygeny wewnątrzkomórkowe, na przykład wirusowe, natomiast cząsteczki MHC II – antygeny pozakomórkowe. W wyniku prezentacji antygenów w kontekście MHC I aktywowane zostają limfocyty cytotoksyczne, niszczące zakażone komórki docelowe. Prezentacja antygenów przez cząsteczki MHC II nie prowadzi do śmierci komórek, lecz pobudzenia limfocytów pomocniczych, kontrolujących dalsze etapy odpowiedzi immunologicznej. Do skutecznej prezentacji antygeny limfocytom Th, oprócz pierwszego sygnału (rozpoznawanie prezentowanego antygeny przez limfocyt za pomocą receptora TCR i białka koreceptorowego CD4) konieczny jest drugi sygnał. Jest nim pobudzenie receptorów na limfocytach, takich jak: CD28, OX40, CD40L przez ligandy na komórkach prezentujących antygen (APC), odpowiednio: CD80 lub CD86, OX40L, CD40. W wyniku aktywacji limfocytów Th, w odpowiednim środowisku (cytokin, jak IL-4, IL-12, IFN γ) dochodzi do ich

polaryzacji w kierunku limfocytów Th₁ lub Th₂. W pierwszym przypadku powstają komórki efektorowe, w drugim produkowane są swoiste przeciwciała. (97)

Głównymi komórkami prezentującymi antygen limfocytom T są: komórki dendrytyczne (DC), makrofagi, czy limfocyty B, lecz także inne komórki. Komórkami APC mogą być eozynofile, wykazano ich zdolność do aktywacji HRV-swoistych limfocytów T. (110) DC pochodzą ze szpiku kostnego, stamtąd poprzez krew przedostają się do tkanki limfatycznej, następnie tkanek docelowych, jak płuca. Tam dojrzewają i uzyskują zdolność do fagocytozy i przetwarzania antygenów. Prezentacja antygenów limfocytom odbywa się w okolicznych węzłach chłonnych. Naiwne limfocyty ulegają wówczas różnicowaniu do subpopulacji komórek: regulatorowych, pomocniczych lub efektorowych. Prezentacja obojętnych antygenów przez tolerogenne DC limfocytom T pobudza ich różnicowanie w kierunku komórek regulatorowych, hamujących dalszą odpowiedź immunologiczną na niegroźne antygeny. Nieprawidłowy przebieg tego procesu może prowadzić do nadmiernej reakcji zapalnej, czy objawów astmy alergicznej. Istnieją dowody na to, że zdolność DC do promowania odpowiedzi immunologicznej Th₁ lub Th₂ uzależniona jest od kontaktu tych komórek z limfocytami NK, czy neutrofilami. Aktywowane komórki NK ułatwiają dojrzewanie komórek dendrytycznych i nasilają sekrecję IL-12. Następstwem jest selekcja DC, promujących odpowiedź immunologiczną typu Th₁. (99, 102) NK w obecności IL-4 pobudzają odpowiedź typu Th₂ oraz reakcje tolerancji. (102) Na aktywność DC wpływa również poziom IL-10 oraz prostaglandyny E₂. PGE₂ hamuje produkcję IL-12 przez DC za pośrednictwem IL-10. Zatem stężenie PGE₂ i IL-10 może osłabiać różnicowanie DC i odpowiedź Th₁. (111) Komórki dendrytyczne, dzięki licznym receptorom PRR, biorą również udział w procesach odporności nieswoistej. (102)

Głównymi efektorami obrony przeciwwirusowej są limfocyty cytotoksyczne T, mające na swojej powierzchni cząsteczkę CD8. Rozpoznają one bezpośrednio antygeny wirusowe prezentowane przy pomocy cząsteczek MHC I na powierzchni zakażonych komórek. Niszczenie komórek docelowych odbywa się poprzez uwolnienie cytolitycznych ziarnistości cytoplazmatycznych (perforyny, granzymy) lub aktywację receptorów dla cząsteczek nadrodziny TNF na komórkach docelowych: Fas, DR4, DR5. Chociaż limfocyty T cytotoksyczne zazwyczaj odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciw wirusom o niewielkich właściwościach cytopatycznych (takich jak HRV), jak dotąd brak jest publikacji potwierdzających udział limfocytów CD8 w mechanizmach obronnych przeciwko HRV. (10)

Produkcja przeciwciał jest kolejnym ważnym mechanizmem obrony przeciwwirusowej. Przeciwciała neutralizujące pojawiają się we krwi i wydzielinach, uznawane są za najważniejszy mechanizm nabytej odporności przeciwko HRV. (10) Wiążą się one specyficznie z powierzchnią wirusa w sposób uniemożliwiający jego przyłączenie do receptora komórkowego i wnikanie do wnętrza komórki. Mogą też spełniać rolę opsonin, prowadzić do aktywacji dopełniacza i lizy komórki, aktywować limfocyty NK do cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Pojawiają się we krwi po 1-2 tygodniach od zakażenia HRV. Najwyższe poziomy występują po 5 tygodniach, a wykrywa się je do roku. (10) Z uwagi na różnorodność antygenową, wytworzenie swoistych przeciwciał nie zabezpiecza przed zakażeniem innym serotypem rynowirusa. Odporność humoralna ma prawdopodobnie ograniczone znaczenie w zakażeniach HRV. Świadczy o tym krótki okres występowania objawów i szybkie zdrowienie, objawy kliniczne choroby trwają od 7 do 10 dni, zanim pojawią się we krwi przeciwciała neutralizujące. Ponadto swoiste przeciwciała podczas naturalnych zakażeń HRV wykrywane są tylko u 50% pacjentów. (10, 97)

Odpowiedź organizmu na zakażenie jest stanem swoistej równowagi pomiędzy czynnością komórek efektorowych a komórek supresorowych. Limfocyty regulatorowe T (opisano wiele subpopulacji: CD8⁺ Treg, Th₃, Tr1) hamują odpowiedź innych limfocytów T poprzez produkcję IL-10, TGF-β. Komórki supresorowe T CD4⁺/CD25⁺ działają także poprzez bezpośredni kontakt z drugą komórką. (112) Obecność komórek regulatorowych ma na celu zapobieżenie nadmiernej reakcji immunologicznej organizmu. Hamując nadmierną reakcję zapalną, opisana populacja komórek może w pewnych sytuacjach ułatwiać przetrwanie patogenów i wytworzenie stanu przewlekłego zakażenia. (28, 113)

Zapalenie w dolnych drogach oddechowych a zakażenie rynowirusem

Rynowirusy mogą działać cytotoksycznie na komórki nabłonka dróg oddechowych. Komórki zakażone wykazują mniejszą zdolność do regeneracji i podziałów komórkowych, niemniej ich uszkodzenie jest stosunkowo niewielkie. (80) Uszkodzenie ściany oskrzela jest znacznie mniejsze w porównaniu do zmian na przykład podczas grypy, gdzie nabłonek dróg oddechowych jest całkowicie niszczone. (55) Stąd popularne przekonanie, że nie bezpośrednie działanie rynowirusa, lecz raczej reakcja organizmu w odpowiedzi na zakażenie jest główną przyczyną objawów klinicznych.

Podczas eksperymentalnych zakażeń HRV obserwowano wzrost stężenia kluczowych mediatorów ostrej reakcji zapalnej: IL-1, IL-6. Prawdopodobną rolę w zakażeniu rynowirusem przypisuje się także histaminie, gdyż u niektórych osób obserwowano podwyższone

poziomy histaminy w wydzielinach nosa i oskrzeli, a leki antyhistaminowe niekiedy zmniejszają objawy przeziębienia. (55, 73) W wydzielinie z nosa stwierdzano podwyższony poziom kinin oraz metabolitów kwasu arachidonowego, prostaglandyn, czy tlenku azotu. (55, 97). Po zakażeniu nasila się również ekspresja enzymów przemian kwasu arachidonowego: cykloksygenazy 2 (COX-2) oraz 5-lipoksygenazy, czemu towarzyszy zwiększenie lokalnej produkcji leukotrienów cysteinylowych. (114, 115) HRV nasilają produkcję czynników aktywujących i działających chemotaktycznie, jak i czynników prozapalnych: ECP, IL-8, IL-16, GM-CSF, G-CSF, RANTES, MCP-1, IP-10, IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , IL-10, IFN- α , tlenku azotu, czy wazoaktywnych peptydów, jak bradykinina (10, 54, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122)

Nasilenie nacieków komórek zapalnych, neutrofilowych i limfocytowych, podczas zakażenia potwierdzają badania kliniczne. (12, 119, 123) W nielicznych badaniach odnotowano nasiloną i przedłużającą się eozynofilię w błonie śluzowej oskrzeli alergików. (12, 73)

Jak dotąd molekularne mechanizmy związane z przebiegiem zakażenia wywołanego przez różne wirusy oddechowe oraz lokalnego zapalenia pozostają w dużej mierze nieznane. Częstymi sygnałami rozpoznawanymi przez komórki gospodarza są cząsteczki dwuniciowego RNA (dsRNA). (121) W komórkach niezakażonych struktury dsRNA o długości przekraczającej ponad 100 par zasad nie występują, natomiast takie formy budują genom wielu wirusów RNA, powstają jako forma przejściowa w czasie replikacji wirusa, albo występują w strukturach „szpilki do włosów” w jednoniciowej cząsteczce wirusowego RNA. (124) Dwuniciowe fragmenty RNA mogą aktywować szereg szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania, poprzez kinazę białkową R (PKR), aktywowaną mitogenem kinazę białkową (MAPK), czy czynnik transkrypcyjny NF κ B. (121, 124) Aktywacja kinazy białkowej R prowadzi do fosforylacji czynnika I κ B, odłączenia go od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i transkrypcję zależnych genów. W następstwie pobudzenia kinaz białkowych ulega ekspresji szereg genów, między innymi dla cytokin prozapalnych, włączając produkcję IL-6, IL8, RANTES. (105) Aktywacja kinazy białkowej R prowadzi do zahamowania syntezy białek wirusowych.

Wirusy, w tym rynowirusy, powodują wystąpienie zapalenia neurogennego. Mogą one nasilać skurcz oskrzeli pobudzając układ cholinergiczny, prawdopodobnie w następstwie zaburzonej funkcji receptorów muskarynowych M₂, co prowadzi do lokalnego nadmiaru acetylocholiny. W zjawisku tym uczestniczyć może główne białko zasadowe, uwalniane podczas aktywacji eozynofilów. (11, 118, 125) Bronchospazm nasilają także neuropeptydy

uwalniane z zakończeń nerwowych włókien C, czy upośledzona funkcja hamujących neuronów nieadrenergicznych, niecholinergiczych (NANC), które są źródłem między innymi tlenku azotu. (11, 126) Zniszczenie szczelnej bariery nabłonka przez wirusy ułatwia bezpośredni kontakt zakończeń nerwowych z innymi czynnikami uszkodzającymi środowiska zewnętrznego. Zwiększona aktywność neuronalna prowadzi do uwolnienia histaminy z mastocytów, których skupienia obserwowano wokół zakończeń nerwowych. (11)

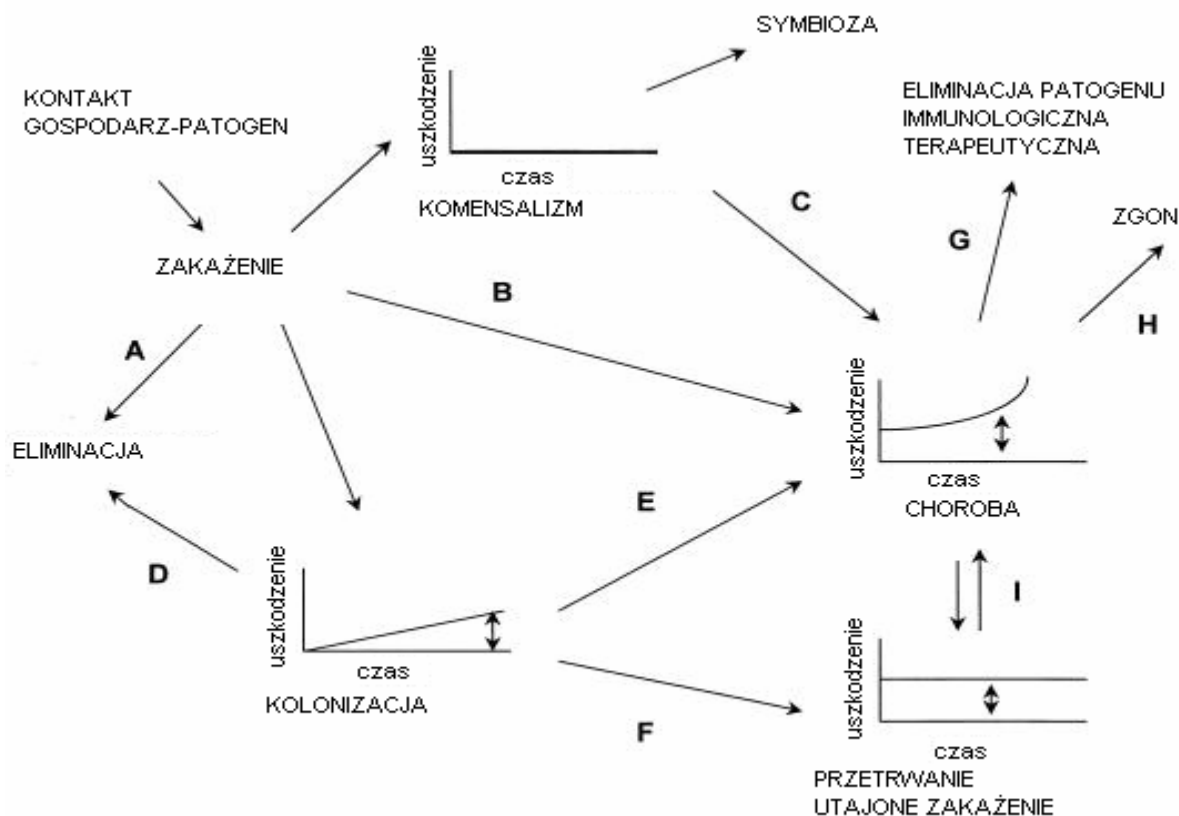
Zakażenia ostre, przewlekłe, nosicielstwo

Ponad 100 lat temu Robert Koch ogłosił teorię, zgodnie z którą przyczyną chorób są czynniki zakaźne. Za patogeny uznano mikroorganizmy spełniające tzw. postulaty Kocha. Zgodnie z nimi, zarazek wywołujący chorobę: musi być obecny w organizmie wszystkich chorych, nie powinien występować u osób zdrowych, natomiast powinno być możliwe wyizolowanie go z organizmu chorego i namnażanie w czystych hodowlach poza organizmem. Wyizolowany z hodowli powinien powodować pojawienie się choroby u zakażonych zwierząt. Powinno być także możliwe ponowne jego wyizolowanie ze sztucznie zakażonych osobników.

Wraz z rozwojem mikrobiologii zaobserwowano, że nierzadkie są odstępstwa od powyższych reguł. Po pierwsze, poszczególne patogeny nie zawsze muszą wywoływać chorobę u wszystkich osobników. Jak powszechnie wiadomo niektóre mikroorganizmy, nie będąc uznawane za chorobotwórcze, mogą w szczególnych sytuacjach wywoływać chorobę (na przykład w stanie immunosupresji). Wiele innych mikroorganizmów może bytować wewnątrz organizmu gospodarza, nie wywołując choroby.

Obecnie uznaje się istnienie szeregu różnych zależności pomiędzy mikroorganizmem i gospodarzem. Powstało wiele terminów, opisujących wzajemne relacje gospodarz-patogen. Złożoność oddziaływań patogen-gospodarz ilustruje rycina poniżej.

Rycina 5. Zależności pomiędzy patogenem i gospodarzem. Za: (127)



Zakażenie organizmu można określić jako nabycie patogenu przez gospodarza. W wyniku obrony immunologicznej, czy naturalnych barier ochronnych patogen może zostać wyeliminowany. Skuteczna odpowiedź immunologiczna lub skuteczne leczenie może zredukować stopień uszkodzenia i zapobiec chorobie. W niektórych przypadkach, eliminacja patogenu nie zapobiega uszkodzeniu tkanek, gdyż mechanizmy immunologiczne mogą przetrwać pomimo to. Wynika stąd fakt, że zjawiska zakażenia i choroby nie mogą być traktowane jak synonimy.

Jedną z postaci zależności gospodarz-mikroorganizm jest komensalizm. Jest to typ zależności o charakterze symbiozy między gatunkami, w której jeden z gatunków czerpie korzyści. Stan ten można zdefiniować jako zależność, która nie prowadzi do wykrywalnego, trwającego i/lub przetrwałego uszkodzenia tkanek gospodarza. Obecność endogennej mikroflory jest zjawiskiem korzystnym dla gospodarza, między innymi: chroni przed nabywaniem chorobotwórczych mikroorganizmów, pobudza rozwój układu immunologicznego, stanowi źródło substancji odżywczych.

Kolonizacja jest stanem obecności, replikacji drobnoustroju w organizmie przez pewien, nieokreślony czas. Przedłużony stan kolonizacji prowadzić może do nowego stanu w

organizmie (tworzenie ziarniaków, przebudowa struktury tkanek), czego wynikiem jest przetrwałe zakażenie. Obecność patogenu może powodować uszkodzenie tkanek gospodarza i stan choroby, lub wyzwolenie odpowiedzi immunologicznej i usunięcie drobnoustroju. Stan postępującego uszkodzenia prowadzi do pełnoobjawowej choroby, a nawet śmierci.

Zgodnie z współczesną wiedzą, komensalizm, kolonizacja, przetrwałe zakażenie to ciągle stany wynikające z zakażenia, potencjalnie ze sobą połączone, a różnice pomiędzy nimi to między innymi obecność uszkodzenia tkanek gospodarza.

Wzajemne oddziaływania gospodarz-patogen zależą od rodzaju drobnoustroju (patogenność) i indywidualnych uwarunkowań gospodarza (stan układu immunologicznego, wiek, uwarunkowania środowiskowe). Aktualnie stosowane pomiary uszkodzenia, jak: śmiertelność, objawy kliniczne, uszkodzenie tkanek, wydają się niewystarczająco dokładnie opisywać wzajemne zależności pomiędzy gospodarzem i mikroorganizmem, utrudniając w praktyce definitywne rozróżnienie tych stanów. (127)

Perspektywy leczenia

Jak dotąd nie udało się stworzyć skutecznego leku przeciwko HRV. Z uwagi na dużą liczbę serotypów wydaje się również mało prawdopodobne, aby kiedykolwiek możliwe było wynalezienie skutecznej szczepionki. Z tego też powodu nie są dostępne skuteczne środki profilaktyczne czy przeciwwirusowe. Co prawda wykazano korzystne działanie niektórych preparatów, jak interferon α , czy czynnik przeciwwirusowy pleconaril, niemniej z powodu działań niepożądanych nie zostały one dopuszczone do leczenia w praktyce klinicznej. (55, 76) Badania randomizowane oceniające skuteczność innych leków, jak rozpuszczalne cząsteczki ICAM-1, czy inhibitory proteazy 3C wykazały, co prawda korzystne ich działanie w porównaniu z placebo, niemniej skuteczność była umiarkowana. (76, 128) Antybiotyki makrolidowe zmniejszają ekspresję cząsteczek ICAM-1 na powierzchni komórek nabłonka, ich skuteczność w zakażeniach HRV nie została jednak jednoznacznie udowodniona. (129)

Leczenie zakażeń HRV w astmie oskrzelowej opiera się przede wszystkim na stosowaniu leków przeciwzapalnych, jak glikokortykosteroidy, czy antagoniści receptorów leukotrienowych. Korzyści ich stosowania w zakażeniach HRV nie zostały jednak ostatecznie zweryfikowane. Jak dotąd nie jest też jasne, czy leki swoiste przeciw rynowirusom pozwolą na zmniejszenie liczby zaostrzeń astmy, lub zmienią przebieg choroby. (76) Wydaje się także, że stanowisko dotyczące stosowania swoistej terapii przeciw HRV, zwłaszcza w grupach zwiększonego ryzyka, jak osoby starsze, z niedoborami odporności, czy chorzy na astmę oskrzelową, powinno zostać w przyszłości zweryfikowane. (68)

II. Cele pracy

Podjęte badanie miało na celu:

1. wykrycie, czy u osób chorych na astmę oskrzelową stwierdza się obecność rynowirusa w dolnych drogach oddechowych, pomimo braku objawów klinicznych zakażenia,
2. porównanie częstości wykrywania RNA rynowirusów w oskrzelach u astmatyków i u osób nie chorujących na astmę,
3. porównanie wyników dwóch metod wykrywania wirusa: na podstawie obecności białek otoczki lub RNA,
4. próbę korelacji obecności rynowirusów w oskrzelach astmatyków ze stopniem ciężkości choroby, nadwrażliwością na aspirynę, atopią i innymi wybranymi parametrami charakteryzującymi postać i przebieg kliniczny choroby.

III. Materiał i metodyka

Charakterystyka osób badanych

W badaniu wzięło udział 30 osób chorych na astmę oskrzelową. W grupie tej znaleźli się również chorzy z nadwrażliwością na aspirynę, potwierdzoną wziewnym lub doustnym testem prowokacyjnym z aspiryną, a także dodatnim wywiadem w kierunku takiej nadwrażliwości. Kwalifikację do badania przeprowadzono w grupie osób kierowanych na bronchofiberoskopię przez lekarzy prowadzących.

Warunkiem włączenia do badania było rozpoznanie astmy oskrzelowej przez lekarza specjalistę chorób płuc lub alergologa zgodnie z kryteriami diagnostycznymi Światowej Strategii Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Astmy (25). Do badania włączono zarówno osoby z łagodną do umiarkowanej, jak i ciężką postacią choroby.

Kryteriami wykluczającymi z badania były:

- zaostrzenie choroby w okresie 2 tygodni poprzedzających badanie,
- objawy nieżyty górnych dróg oddechowych w ciągu 3 tygodni poprzedzających badanie,
- inne choroby współistniejące, które w ocenie badacza mogłyby mieć wpływ na wyniki, w tym: kliniczne cechy zakażenia dolnych dróg oddechowych, przewlekłe choroby oskrzeli i płuc, niewydolność układu krążenia lub układu oddechowego, pierwotne i wtórne zaburzenia odporności.

Za chorobę bez zaostrzenia uznawano astmę bez objawów klinicznych pogorszenia w wywiadzie lub w badaniu fizykalnym w ciągu 2 tygodni poprzedzających bronchoskopię, oraz jeżeli w wynikach spirometrii podstawowej przed badaniem nie stwierdzano różnic w porównaniu do wyników optymalnych (ustalonych indywidualnie dla każdego pacjenta na podstawie poprzednich, seryjnych pomiarów spirometrycznych). Alternatywnie, wystąpienie zaostrzenia choroby oceniano na podstawie wyników pomiarów szczytowego przepływu wydechowego (PEF), które w ciągu dwóch tygodni poprzedzających bronchoskopię powinny być porównywalne do wartości optymalnych dla każdego chorego.

Kryteria włączenia i wyłączenia z badania weryfikowano w oparciu o przygotowaną ankietę oraz na podstawie badania fizykalnego.

Grupa kontrolna liczyła 30 osób. Włączono do niej 8 osób, które zostały skierowane na bronchoskopię diagnostyczną z powodu obwodowego guza płuca, bez cech naciekania oskrzeli, bez uczucia duszności. U osób tych przeprowadzona diagnostyka nie wykazała

innych chorób układu oddechowego. Pozostałą część grupy kontrolnej stanowiło 22 chorych, zakwalifikowanych do lobektomii lub pulmonektomii z powodu obwodowego guza płuca. Osoby te rekrutowano w Specjalistycznym Szpitalu imienia Jana Pawła II w Krakowie. W grupie porównawczej znaleźli się wyłącznie chorzy z obwodową lokalizacją guza bez cech klinicznych, wskazujących na uogólnienie choroby nowotworowej. Kwalifikację chorych do badania przeprowadzono wspólnie z lekarzami prowadzącymi pacjentów, w oparciu o dostępną dokumentację medyczną, wywiad i badanie lekarskie.

Podobnie jak w przypadku astmatyków kryterium wykluczającym w tej grupie były objawy kliniczne zakażenia dróg oddechowych w czasie rekrutacji lub w trzytygodniowym okresie poprzedzającym badanie. Wypełniano ankietę, dotyczącą objawów klinicznych, aktualnego leczenia, wykonanych testów diagnostycznych i chorób współistniejących. Opierano się na wywiadach i wynikach badań dodatkowych, opinii lekarzy prowadzących chorych.

Innymi kryteriami wykluczającymi były: przewlekła obturacyjna choroba płuc, rozstrzenie oskrzeli, rozedma płuc, niewydolność układu krążenia lub układu oddechowego, pierwotne i wtórne zaburzenia odporności, inne choroby płuc, które w ocenie lekarza mogły wpłynąć na wyniki badania.

Osoby objęte badaniem zostały poinformowane o korzyściach i zagrożeniach płynących z udziału w badaniu i wyraziły świadomą zgodę na uczestnictwo. Projekt badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego (nr zgody KBET/142/B/2004 z dnia 27.01.2005r).

Kryteria rozpoznania wybranych stanów klinicznych

Rozpoznanie astmy oskrzelowej zostało postawione przez lekarza pulmonologa lub alergologa, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi Światowej Strategii Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Astmy, GINA. (25)

Za zaostrzenie astmy oskrzelowej uznano: epizod szybko narastającej duszności, kaszlu, świszczącego oddechu i/lub uczucia ściskania w klatce piersiowej z/bez towarzyszącej niewydolności oddechowej, który cechowało zmniejszenie przepływu szczytowego powietrza objawiające się obniżeniem wartości PEF lub FEV₁.

Astmę aspirynową (AIA) rozpoznawano na podstawie występowania co najmniej jednego zagrażającego życiu epizodu duszności po zażyciu aspiryny lub innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAIDS). Rozpoznanie potwierdzano dodatnim wynikiem doustnej lub

inhalacyjnej próby prowokacyjnej z aspiryną. Dozwolone było rozpoznanie AIA bez wykonania próby aspirynowej, jeżeli wywiad jednoznacznie wskazywał na takie rozpoznanie.

Astmę ciężką definiowano zgodnie z wytycznymi GINA, jak i opinią lekarzy specjalistów pulmonologów, prowadzących chorych. Za postać ciężką uznawano chorobę powodującą codzienne objawy, częste zaostrzenia oraz objawy nocne, która znacznie ograniczała codzienną aktywność, a wartości szczytowego przepływu wydechowego (PEF) i pierwszosekundowej natężonej objętości wydechowej (FEV₁) były równe lub mniejsze od 60% i/lub wykazywały zmienność większą lub równą 30%. U chorych otrzymujących leczenie, rozpoznanie ciężkiej astmy opierano na nasileniu objawów oraz intensywności terapii, zgodnie z zaleceniami GINA. Stosowanie doustnych glikokortykosteroidów traktowano jako kryterium rozpoznania ciężkiej postaci astmy.

Atopię rozpoznawano u osób z chorobami alergicznymi w wywiadzie, u których przynajmniej jeden z alergicznych testów skórnych był dodatni lub osób z wysokim poziomem całkowitego IgE w surowicy IgE (>400 IU/ml).

Zakażenie dróg oddechowych w okresie poprzedzającym badanie rozpoznawano w przypadku zgłaszania przez pacjenta typowych objawów przeziębienia w okresie 3 tygodni poprzedzających badanie. W tym celu wypełniano specjalnie przygotowaną ankietę.

Przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) rozpoznawano na podstawie kryteriów ustalonych przez Światową Strategię Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc (GOLD). (130) Za rozpoznaniem POChP przemawiały: typowy wywiad chorobowy oraz wyniki badań spirometrycznych (obniżenie wskaźnika FEV₁/VC poniżej 70%). POChP rozpoznawano także u chorych, u których takie rozpoznanie postawione zostało uprzednio przez lekarza specjalistę.

Badania wykonane u osób kierowanych na bronchoskopię diagnostyczną

Weryfikację rozpoznania, kryteriów włączenia i wyłączenia z badania przeprowadzano na podstawie ankiety, która również zawierała inne istotne informacje o chorym. Ankietę wypełniano, wspólnie z pacjentem. Informacje uzupełniane były o wyniki badań z udostępnionej dokumentacji medycznej. Formularz zawierał pytania dotyczące astmy oskrzelowej, jak: objawy choroby i ich nasilenie (w tym częstość objawów w ciągu tygodnia, częstość objawów nocnych, zaostrzeń, wpływ choroby na aktywność w ciągu dnia, liczba zaostrzeń w ocenie pacjenta w zdefiniowanym przedziale czasu), rodzaj i dawki zużywanych leków, wyniki testów diagnostycznych (spirometria, pomiary PEF, wykonane testy alergiczne, radiogramy i tomogramy płuc i zatok, o ile czas pomiędzy wykonaniem badań obrazowych, a

bronchoskopią nie był dłuższy niż 2 miesiące, wartość eozynofilii bezwzględnej, IgE, próba aspirynowa), obecność objawów ze strony układu oddechowego, w tym wskazujących na zakażenie dróg oddechowych, występowanie chorób współistniejących, nikotynizm, wywiad rodzinny w kierunku chorób alergicznych.

Spirometrię wykonywano w pracowni spirometrycznej II Katedry Chorób Wewnętrznych w Krakowie za pomocą aparatu PNEUMO 2000 (abcMED, Kraków, Polska). Badanie przed oraz po podaniu leku rozszerzającego oskrzela (betamimetyku krótkodziałającego) wykonano w dniu bronchofiberoskopii, przed badaniem, a jeżeli nie było to możliwe, dopuszczano możliwość interpretacji wyników wykonanych najwyżej 10 dni przed planowaną bronchofiberoskopią.

Doustny lub wziewny test nadwrażliwości na aspirynę wykonywano wyłącznie u osób z rozpoznaną astmą oskrzelową i wywiadem sugerującym taką nadwrażliwość. Przeprowadzono je w pracowni spirometrycznej II Katedry Chorób Wewnętrznych w Krakowie, zgodnie z wcześniej ustalonymi zaleceniami. (32) Aspirynę podawano doustnie we wzrastających dawkach przez 10 godzin aż do osiągnięcia dawki kumulacyjnej 500 mg. Spirometrię powtarzano co 30 minut. W teście prowokacyjnym wziewnym stosowano roztwory aspiryny lizynowej podawanej za pomocą nebulizatora (Spire Electro 2, Hameenlinna, Finlandia) we wzrastających dawkach, aż do osiągnięcia wziewnej dawki kumulacyjnej 182 mg. Próbę uznawano za dodatnią, jeżeli obserwowano spadek FEV_1 większy niż 20% lub wystąpiły inne poważne reakcje pozaoskrzelowe.

Badanie cytologiczne popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelikowych, jak i ocenę histologiczną wycinków oskrzeli przeprowadzono, zgodnie z rutynowymi procedurami, w Zakładzie Patomorfologii Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Popłuczyny oskrzelowe, pobierane w trakcie bronchofiberoskopii badano w kierunku zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, wywołanych przez *Chlamydia pneumoniae* lub *Pneumocystis carinii*, o ile lekarz prowadzący chorego uznał takie badanie za wskazane. Metodami stosowanymi były: hodowle na odpowiednich podłożach, zgodnie ze standardowymi procedurami pracowni wykonującej badania (Katedra Mikrobiologii Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego).

W dniu zaplanowanej bronchofiberoskopii, przed jej wykonaniem, pobierano kilka mililitrów krwi żyłnej do probówki z EDTA oraz na skrzep w celu oceny eozynofilii bezwzględnej, całkowitego poziomu IgE oraz badania morfologii krwi.

Morfologię krwi żyłnej oznaczano za pomocą automatu Sysmex K-1000 (TOA Medical Electronics, Tokio, Japonia).

Całkowity poziom immunoglobulin klasy E oceniano metodą nefelometryczną (Behring Nephelometer Analzer II, Marburg, Niemcy), a eozynofilię bezwzględną obliczano w komorze Fuchsa-Rosenthala.

Badania wykonane w grupie operowanych

Podobnie jak w grupie chorych na astmę informacje o chorym, uzyskane od lekarza prowadzącego oraz z całości dokumentacji medycznej, umieszczano w ankiecie. Uwzględniono wyniki badań dodatkowych, w tym biochemicznych, wykonanych bezpośrednio przed zabiegiem operacyjnym. Wyniki spirometrii uznawano za adekwatne, jeżeli wykonane były bezpośrednio przed zabiegiem (w ciągu poprzedzających 10 dni), niezależnie od ośrodka wykonującego badanie. Nie uwzględniono badań radiologicznych płuc osób z rozpoznaną chorobą nowotworową płuc. Ocenę histopatologiczną wycinków pobranych w czasie operacji przeprowadzono w pracowni patomorfologicznej Specjalistycznego Szpitala im. Jana Pawła II w Krakowie. Przed operacją nie pobierano krwi do badań laboratoryjnych, lecz uwzględniono wyniki badań wykonanych w dniu poprzedzającym zabieg operacyjny (sporadycznie czas ten był dłuższy i wynosił co najwyżej trzy dni).

Badanie morfologii krwi wykonane było także na aparacie Sysmex K-1000, eozynofilię bezwzględną obliczono z dostępnych wyników obrazu odsetkowego krwinek białych.

Metody biologii molekularnej

Material do badań

Bronchofiberoskopie wykonano w znieczuleniu ogólnym w pracowni bronchoskopowej II Katedry Chorób Wewnętrznych w Krakowie. Procedurę zabiegu, jak i metodykę pobierania materiału przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Brytyjskiego Towarzystwa Chorób Klatki Piersiowej (British Thoracic Society). (131)

Dwa lub trzy wycinki z błony śluzowej oskrzeli utrwalano w 5% formalinie i przechowywano w temperaturze 4°C. Pobierano również materiał do innych badań, zgodnie z decyzją lekarza prowadzącego chorego. Były to: popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe, popłuczyny oskrzelowe do badań mikrobiologicznych, czy dodatkowe wycinki do rutynowej oceny histopatologicznej.

W przypadku chorych, zakwalifikowanych do operacji usunięcia fragmentu lub całego płuca, wycinki uzyskiwano z makroskopowo niezmienionych oskrzeli, których średnica

odpowiadała tym dostępnym w badaniu bronchofiberoskopowym. Utrwalano je również w 5% formalinie.

Wszystkie poniżej opisane etapy wykonywano z zachowaniem zasad aseptyki, mając na uwadze zmniejszenie ryzyka kontaminacji.

Wycinki na bieżąco przesyłano do Katedry Patomorfologii CMUJ w Krakowie, gdzie zostały zatopione w parafinie. Z blozków parafinowych przygotowano 4 um skrawki, które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Pozostałe etapy reakcji RT-PCR *in situ* wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych w Krakowie.

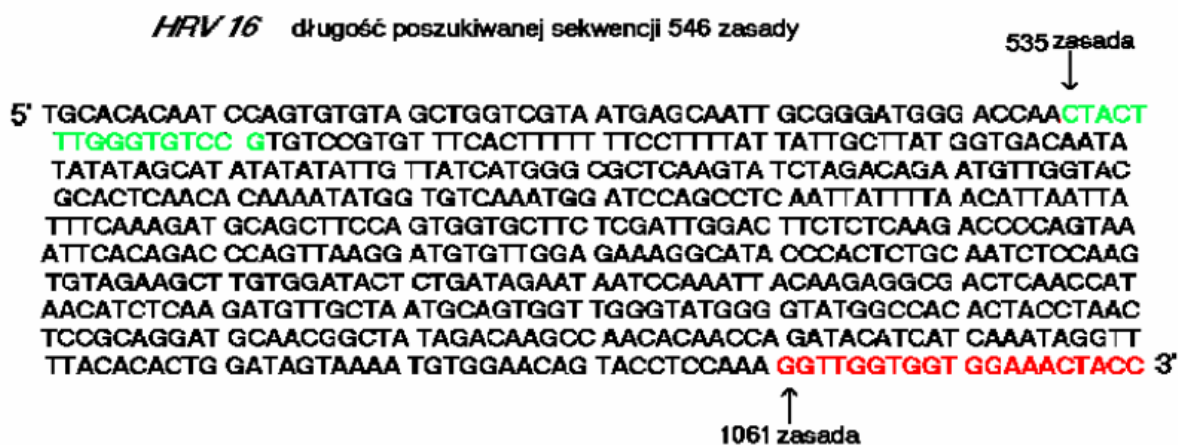
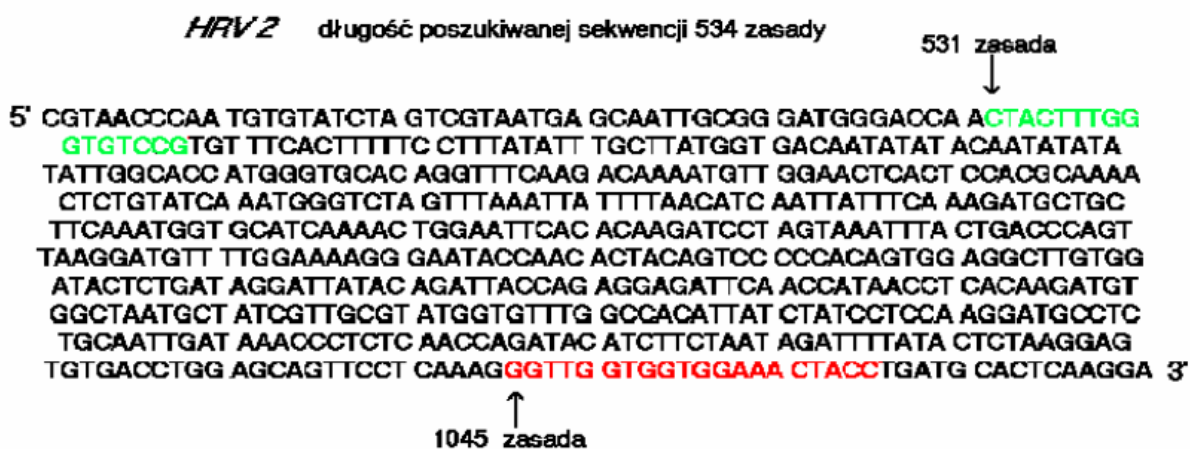
Reakcje immunohistochemiczne (IHC) przeprowadzono w laboratorium Uniwersytetu Wisconsin w Madison, pod opieką pana profesora Williama Busse.

Startery do reakcji RT-PCR

Startery do reakcji odwrotnej transkrypcji oraz reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wybrano z bazy VirOligo. (132) Dobrano je tak, aby umożliwiły rozpoznanie jak największej liczby serotypów rynowirusa przy zachowanej wysokiej swoistości reakcji (chęć uniknięcia wykrywania innych wirusów o zbliżonych sekwencjach RNA, na przykład enterowirusów). Odnalezione w bazie VirOligo startery zostały częściowo zmodyfikowane, aby wykazywały większe podobieństwo do sekwencji serotypów rynowirusów HRV16 oraz HRV2. Sekwencje wybranych starterów są następujące: starter F- 5'-CTACTTTGGGTGTCCG (OL24 w bazie VirOligo) oraz starter R- 5'-GGTAGTTTCCACCACCAACC (OL86-1 w bazie VirOligo, zmodyfikowany). Ich temperatury topnienia wynoszą odpowiednio: 47,5°C oraz 56,4°C. Starter F odpowiada względnie niezmienną sekwencji w zakresie odcinka NCR genomu, starter R odnosi się do sekwencji o większej zmienności kodującej początkowy odcinek poliproteiny (region VP4/VP2).

Poniżej przedstawiono fragmenty sekwencji serotypów HRV2 oraz HRV16 wraz z zaznaczonymi miejscami przyłączenia starterów.

Rycina 6. Fragmenty sekwencji wybranych serotypów rynowirusów (HRV2 oraz HRV16) z zaznaczeniem miejsc przyłączenia starterów.



Izolacja RNA

Osobom z objawami przeziębienia i nieżytu górnych dróg oddechowych podawano do każdego z nozdrzy po 2,5 ml roztworu 0,9% chlorku sodu. Po około około 10 sekundach płyn zbierano w jałowym pojemniku. 200 µl popłuczyn przenoszono do jałowej probówki i rozpuszczano w 800 ul Trizolu. Tak przygotowane próbki przechowywano w -70°C.

Izolację RNA przeprowadzono zgodnie z protokołem podanym przez producenta. Zawiesinę ogrzewano do temperatury pokojowej, następnie do każdej probówki dodawano po 0,2 ml chloroformu i wstrząsano przez 15 sekund. Roztwory odwirowano w temperaturze 4°C (12000 g, 15 minut). Fazę bezbarwną roztworu przenoszono do czystej probówki, dodawano 0,5 ml alkoholu izopropylowego i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10 minut. Po

ponownym odwirowaniu (4°C, 12000 g, 10 minut), osad płukano w 1 ml 75% etanolu, po czym ponownie odwirowano (7500 g, 5 minut, 4°C). Po usunięciu nadsącza, osad RNA rozpuszczono w 20 ul wody destylowanej, a następnie ogrzano do temperatury 55°C. Stężenie wyizolowanego w ten sposób RNA zmierzono za pomocą spektrofotometru GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech).

Sonda genetyczna do wykrywania HRV

Pierwszym etapem syntezy sondy hybrydazyjnej była reakcja RT w celu uzyskania cDNA poszukiwanej sekwencji. W tym celu do 10 µl wyizolowanego RNA dodano starter R oraz bufor 5x. Próbkę poddano temperaturze 75°C przez 2 do 3 minut i schłodzono na lodzie. Następnie dodawano pozostałe składniki reakcji RT.

Skład 20 ul mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 50 mM Tris-HCl,
- 10 mM MgCl₂,
- 100 mM KCl,
- 4 mM DTT,
- 10 j. odwrotnej transkryptazy AMV,
- 2 mM każdego z nukleotydów dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
- 1 uM startera R,
- 0,5 ul/20 ul inhibitora RNAz.

Reakcję przeprowadzono w termocyklerze T3 Thermocycler (Biometra). Temperatura reakcji wynosiła 42°C, a czas trwania 60 minut. RT zakończono inaktywacją AMV w temperaturze 75°C. Produkt reakcji schłodzono do 4°C.

Tak uzyskane cDNA zwielokrotniono za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w termocyklerze (T3 Thermocycler) z użyciem starterów R i F.

Skład 25 µl mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- 10 mM Tris-HCl,
- 50 mM KCl,
- 1,5 mM MgCl₂,
- 0,1% Triton X-100,
- 0,4 uM każdego startera (F, R),
- 0,2 mM każdego z nukleotydów,
- 1 j. polimerazy DNA,
- 1 ul cDNA.

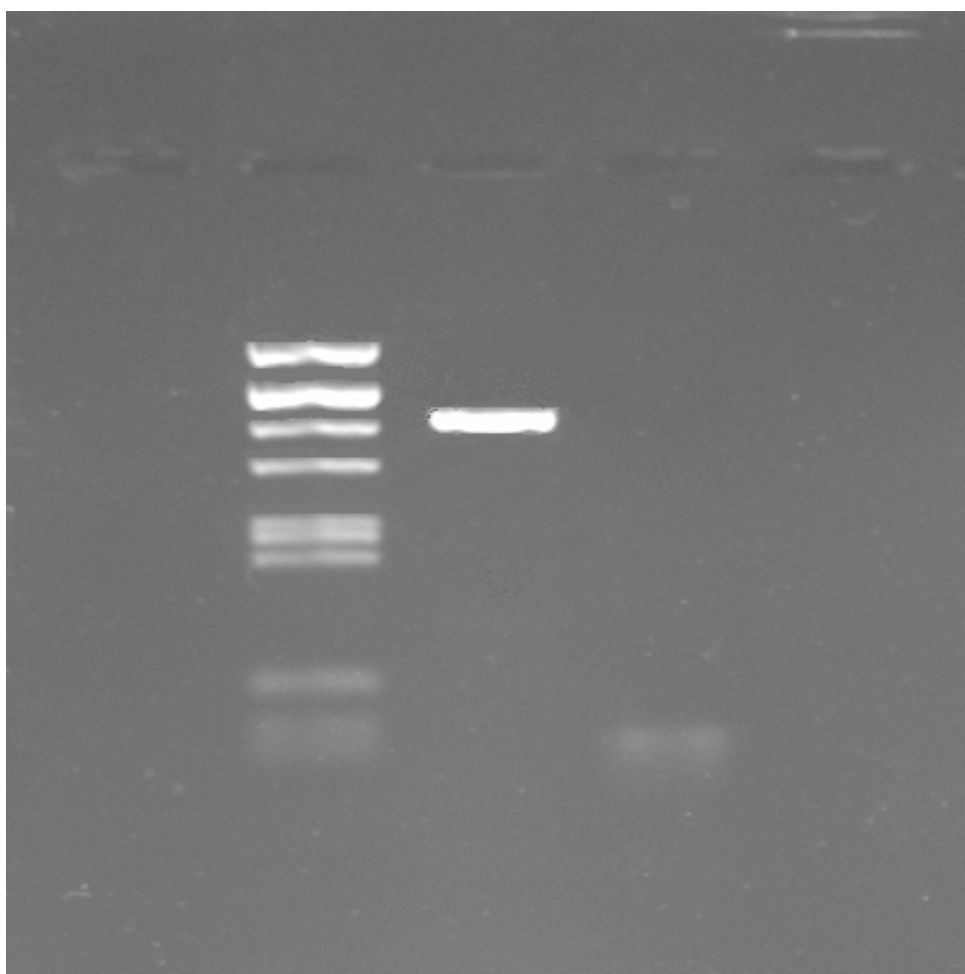
Profil termiczny reakcji przedstawiono poniżej:

1. wstępna denaturacja	} 38 cykli	94°C, 2 minuty,
2. denaturacja DNA		94°C, 45 sekund,
3. przyłączenie starterów (annealing)		55°C, 45 sekund,
4. wydłużanie nici DNA (elongation)		72°C, 1 minuta,
5. elongacja końcowa		72°, 10 minut.

Etapy 2,3 i 4 powtarzano cyklicznie (38 cykli).

Obecność poszukiwanego fragmentu cDNA potwierdzono za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym.

Rycina 7. Elektroforeza na żelu agarozowym produktu reakcji PCR. Amplifikowany fragment odpowiada odcinkowi cDNA o długości 537 par zasad (linia środkowa). Po lewej wzorzec wielkości DNA (pBR322/AluI), po prawej próbka bez matrycy – kontrola ujemna.



Zidentyfikowany produkt reakcji PCR wycięto z żelu i oczyszczono za pomocą systemu QIAEX II Gel Extraction Kit. Oczyszczony odcinek cDNA, stanowił matrycę dla reakcji PCR z zastosowaniem nukleotydów znakowanych digoksygeniną.

Skład 50 μ l mieszaniny reakcyjnej był następujący:

10 mM Tris-HCl,

50 mM KCl,

1,5 mM MgCl₂,

0,1% Triton X-100,

nukleotydy: 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP;

0,19 mM dTTP; 0,01 mM DIG-11-dUTP,

0,3 μ M startera R,

0,3 μ M startera F,

1,4 j. polimerazy Taq,

1 μ l cDNA.

Parametry reakcji PCR były takie same, jak reakcji PCR z zastosowaniem nieznakowanych deoksyrybonukleotydów. Zwielokrotniony produkt reakcji PCR zobrazowano ponownie za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym. Prążki, odpowiadające poszukiwanemu fragmentowi, wycięto z żelu i oczyszczono. Obecność oczyszczonego cDNA w roztworze potwierdzono za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym. Stężenie sondy genetycznej w roztworze oceniano półilościowo na podstawie obrazu elektroforezy.

Pośrednia RT-PCR *in situ*

Reakcje przeprowadzono w wycinkach o grubości 4 μ m. Za każdym razem uwzględniano kontrole pozytywne i negatywne reakcji. Kontrolami negatywnymi były skrawki, w których pominięto dodanie startera R podczas reakcji RT. Pozostałe etapy eksperymentu były identyczne we wszystkich wycinkach. Kontrolą pozytywną był wycinek silnie HRV-dodatni, co stwierdzono podczas wstępnych eksperymentów.

Przygotowanie tkanek do odwrotnej transkrypcji odbywało się w środowisku wolnym od rybonukleaz. Inaktywowano je poprzez każdorazowe umieszczenie narzędzi laboratoryjnych w temperaturze 180 stopni przez 4 do 6 godzin przed planowanym doświadczeniem. Nukleazy usuwano z wody za pomocą dietylopirowęgłanu (DEPC). Roztwór wodny DEPC o stężeniu 0,1% pozostawiono, mieszając, na 5 godzin. DEPC usuwano za pomocą autoklawowania.

Nadmiar parafiny usuwano, umieszczając szkiełka w ksylenie w temperaturze 37 stopni (30 minut). Skrawki uwodniono w roztworach wodnych etanolu o malejącym gradiencie

stężeń. Po przepłukaniu w buforze PBS, pozostawiono je na 20 minut w 4% roztworze paraformaldehydu i ponownie przemywano PBS. Wycinki poddano działaniu proteiny K (4 µg/ml) przez 4 minuty. Proteazę wymywano wodą destylowaną, następnie 95% etanolem. Osuszone skrawki tkanek umieszczono na 10 minut w 4% roztworze paraformaldehydu. Po ponownym przepłukaniu PBS, umieszczono je w wodnym 100 mM roztworze trietanolaminy (TEA), do którego dodawano bezwodnik octowy do stężenia 0,25%, mieszając przez 10 minut. Wycinki ponownie przepłukano buforem PBS i odwodniono w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu. Po osuszeniu wykonano odwrotną transkrypcję *in situ*.

Na tak przygotowane preparaty nakładano zbuforowany roztwór startera R, następnie umieszczano je w temperaturze 75 stopni (2-3 minuty) i schłodzono na lodzie. Pozostałe składniki reakcji dodawano, tak aby uzyskać po 60 µl mieszaniny reakcyjnej na każdy skrawek. Jej skład był następujący:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8.3, 25 °C),
- 10 mM MgCl₂,
- 100 mM KCl,
- 4 mM DTT,
- 30 j. odwrotnej transkryptazy AMV,
- 2 mM każdego z nukleotydów dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
- 1 uM startera R,
- 1,5 µl inhibitora RNAz na 60 µl roztworu.

Skrawki zamykano w szczelnych komorach, za pomocą odpowiednich dysków (AmpliCoverTM Discs, Perkin Elmer) i klipsów (AmpliCoverTM Clips, Perkin Elmer). RT przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp In Situ PCR System 1000 (Perkin Elmer) w temperaturze 42°C przez 60 minut. Reakcję przerywano podnosząc temperaturę reakcji do 75°C na 15 minut. Nadmiar roztworu usuwano i dodawano mieszaninę PCR o składzie:

- 10 mM Tris-HCl,
- 50 mM KCl,
- 1,5 mM MgCl₂,
- 0,1% Triton X-100,
- 0,4 uM każdego startera (F, R),
- 0,2 mM każdego nukleotydów,
- 2,4 j. polimerazy DNA.

Biopsje ponownie zamykano w szczelnych komorach i przeprowadzono reakcję PCR w termocyklerze GeneAmp In Situ PCR System 1000. Temperatury w czasie kolejnych etapów reakcji były następujące:

1. wstępna denaturacja		92°C przez 1 minutę,
2. denaturacja DNA	} 15 cykli	94°C, 2 minuty,
3. przyłączenie starterów (annealing)		55°C, 2 minuty,
4. wydłużanie nici DNA (elongation)		72°C, 4 minuty,
5. końcowa elongacja		72°C, 10 minut.

Etapy 2 do 4 powtarzano cyklicznie 15 razy. Po zakończeniu reakcji próbki schłodzono do temperatury 4 °C. Usunięto nadmiar mieszaniny, szkiełka wysuszono, a następnie przemyto roztworem cytrynianu sodu (2xSSC). Na skrawki naniesiono po 30 do 50 µl roztworu do hybrydyzacji z sondą genetyczną, której stężenie wynosiło 250 do 500 ng/ml. Sondę zdenaturowano w temperaturze 95°C (5 minut), a następnie przeprowadzono hybrydyzację w temperaturze 42°C przez 16 godzin. Po upływie 16 godzin nadmiar niezwiązanej z matrycą sondy wypłukano roztworem 2xSSC. Preparaty mieszczone w 2xSSC w temperaturze 55°C na 30 minut, a następnie, na kolejne 15 minut w tej samej temperaturze w roztworze o 10-krotnie niższym stężeniu (0,2x SSC).

Ostatnim etapem eksperymentu była reakcja immunohistochemiczna z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko digoksygeninie, zgodnie z zaleceniami producenta (Boehringer Ingelheim). Po przepłukaniu preparatów w roztworze płuczącym, umieszczano je na 30 minut w roztworze blokującym. Przeciwciała przeciwko digoksygeninie odwirowano (10 000 RPM, 5 minut), rozcieńczono w roztworze blokującym 1:1000. Inkubacja z wycinkami wynosiła 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie usunięto nadmiar przeciwciała w roztworze płuczącym (15 minut) i przemyto roztworem wykrywającym. Do każdego preparatu dodano substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforanu (BCIP) i inkubowano przez 16 godzin.

Na drugi dzień skrawki przemywano wodą destylowaną i oglądano pod mikroskopem. Fioletowo-niebieskie zabarwienie biopsji świadczyło o obecności RNA rynowirusów. Wycinki uznawano za HRV-pozytywne, jeżeli stwierdzano wyraźne zabarwienie cytoplazmy komórek, w porównaniu z kontrolą negatywną.

Badanie RT-PCR *in situ* wykonywano dwukrotnie dla każdej biopsji. W wybranych przypadkach, gdy wyniki dwukrotnej oceny tych samych wycinków różniły się lub wystąpiły wątpliwości w trakcie ich oglądania pod mikroskopem, ponownie wykonywano RT-PCR *in situ*. Jeżeli nadal wyniki budziły wątpliwości, powtarzano badanie po raz kolejny. Ostatecznie,

na podstawie łącznej oceny wszystkich preparatów stawiano rozpoznanie. Jeżeli, w konkretnych przypadkach, wynik metody wydawał się nadal niepewny, nie włączano go do dalszej analizy.

Oceny histologicznej dokonywał „zaślepiiony” obserwator. W tym celu wycinkom nadano numery kodu, które odkodowywano po zakończeniu wszystkich etapów badania mikroskopowego.

Nasilenie reakcji RT-PCR in situ wyrażano w 6-stopniowej skali (0; 0,5; 1; 2; 3; 4), gdzie „0” oznaczało wynik negatywny (brak reakcji barwnej), a „4” najsilniejszą reakcję (największy w porównaniu do innych biopsji obszar z reakcją barwną).

Pośrednia immunohistochemia (IHC)

Metodą tą poszukiwano białek rynowirusów oraz eozynofików w wycinkach oskrzeli. Kolejne etapy obydwu reakcji były identyczne, różniły się jedynie pierwotnym przeciwciałem. W pierwszym przypadku zastosowano poliklonalne przeciwciało mysie RV16-7, otrzymane dzięki uprzejmości prof. W.W. Busse z Laboratorium Alergii i Immunologii Uniwersytetu Wisconsin w Madison, w drugim zastosowano monoklonalne przeciwciało mysie, wykrywające białko kationowe eozynofików (EG2). Kontrolą pozytywną reakcji z zastosowaniem RV16-7 były komórki linii Hela zakażone rynowirusem 16, pochodzące z laboratorium prof. W.W. Busse, natomiast kontrolą negatywną - komórki nie zakażone.

Reakcje przeprowadzono na skrawkach o grubości 4 um. Po odparafinowaniu i uwodnieniu, preparaty przemyto roztworem TBS i umieszczono w roztworze peroksydazy na 10 minut, a następnie w roztworze blokującym również na 10 minut. Nadmiar roztworu usuwano i dodawano pierwotne przeciwciała. Ich rozcieńczenia, czasy inkubacji ustalane były doświadczalnie i wynosiły: dla EG2- 1:50; 1 godzina; dla RV16-7- 1:60000; 30 minut. Po wypłukaniu nadmiaru przeciwciała dodawano wtórne, przeciwciało biotynylowane na 15 minut. Wycinki ponownie przepłukano w TBS i umieszczono w roztworze streptawidyny-HRP na 15 minut. Nadmiar kompleksów usuwano w roztworze TBS i dodawno chromogen DAB. Po 40 minutach preparaty ponownie przepłukano i zabarwiono zielenią metylową.

Biopsje oskrzela uznawano za HRV-dodatnie, jeżeli stwierdzono w niej obecność co najmniej dwóch brązowo zabarwionych komórek, przy jednoczesnym braku takich komórek w kontrolach negatywnych. Obecność wyłącznie jednej dodatniej komórki lub niewielkie nasilenie zabarwienia w komórkach, graniczne w ocenie badającego, nie były wystarczającymi do uznania preparatu za pozytywny.

W przypadku reakcji z zastosowaniem przeciwciała EG2 stwierdzano w preparacie obecność pojedynczych, silnie zabarwionych na brązowo komórek, odpowiadających eozynofilom.

Dwóch niezależnych obserwatorów oceniało wyniki IHC. Preparaty kodowano, podobnie jak w przypadku RT-PCR *in situ*. Reakcje IHC w każdym przypadku powtarzano. Każdy obserwator dokonywał oceny poszczególnych preparatów dwukrotnie. Rozbieżności (biopsja pozytywna/negatywna) rozwiązywano poprzez powtórzenie reakcji immunohistochemicznej. W tym przypadku ocena trzech preparatów (przez dwóch niezależnych, zaślepionych obserwatorów) stanowiła podstawę do ustalenia wspólnego stanowiska. Jeżeli, w konkretnych przypadkach, wynik metody wydawał się nadal niepewny, nie włączano go do dalszej analizy. Nasilenie zakażenia rynowirusami, jak i nacieków eozynofilowych w dolnych drogach oddechowych wyrażono w półilościowej, 6-stopniowej skali, gdzie „0” oznaczało brak reakcji, a „4” obraz o największym nasileniu zmian.

Klonowanie sondy cDNA

Oczyszczony fragment cDNA poddano reakcji PCR, w sposób opisany powyżej. Produkty reakcji rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym i oczyszczono za pomocą zestawu Quiagex. Tak zwielokrotniony cDNA wprowadzano do wektora plazmidowego (ligacja) przy użyciu zestawu TOPO TA-Cloning Kit. Reakcję przeprowadzono w mieszaninie o następującym składzie:

- 3 µl produktu PCR,
- 2 M NaCl,
- 0,01 M MgCl₂,
- 10 ng wektora pCRII-TOPO vector ,
- 1 µl wody destylowanej.

Roztwór inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

Kompetentne bakterie *Escherichia coli* rozmrożono na lodzie (50 µl) i dodano 2 µl produktu ligacji. Mieszaninę pozostawiono na lodzie na kolejne 30 minut. Następnie przeniesiono do łaźni wodnej o temperaturze 42°C na 30 sekund i ponownie schłodzono na lodzie. Bakterie zawieszono w 0,25 ml roztworu LB i pozostawiono na 60 minut we wstrząsarce temperaturze 37°C.

Dzień wcześniej przygotowywano podłoże do hodowli bakterii *E. Coli*. Tabletki LB Agar rozpuszczano w wodzie destylowanej. Roztwór autoklawowano, a następnie, po schłodzeniu dodawano kanamycynę (40 µg/ml). Mieszaninę wylewano na szalki Petriego i pozostawiono

do zastygnięcia. Dnia następnego na powierzchni rozprowadzono 20 μ l substratu dla β -galaktozydazy – X-gal (40 mg/ml), a następnie analogu laktozy - IPTG (100 mM, 5 μ l), zachowując warunki jałowe. Szalki pozostawiono w komorze laminarnej do wyschnięcia. Na tak przygotowanej powierzchni rozprowadzono 130 μ l roztworu LB zawierającego bakterie, po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez całą noc.

Po około 16 godzinach na powierzchni podłoża obserwowano skupiska kolonii bakterii. Kolonie białe odpowiadały klonom bakterii zawierającym plazmid z wbudowanym cDNA, produktem reakcji PCR, kolonie niebieskie odpowiadały bakteriom zawierającym plazmidy bez żadnego insertu.

Obecność wbudowanego plazmidu w wybranych koloniach bakterii potwierdzono metodą PCR. Warunki reakcji PCR były jak opisano powyżej. W poprzednio opisanych reakcjach PCR matrycę stanowił cDNA, uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji wirusowego RNA. W opisywanym przypadku matrycą reakcji był plazmidy bakteryjne z wbudowanym insertem cDNA. Zastosowano startery zewnętrzne: M13 Forward, o sekwencji: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' oraz M13 Reverse, o sekwencji: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Wyniki reakcji oceniano na 1,5% żelu agarozowym, jak opisano powyżej. Uzyskany fragment cDNA odpowiadał sekwencji sondy wraz z fragmentem plazmidu i miał długość 779 bp.

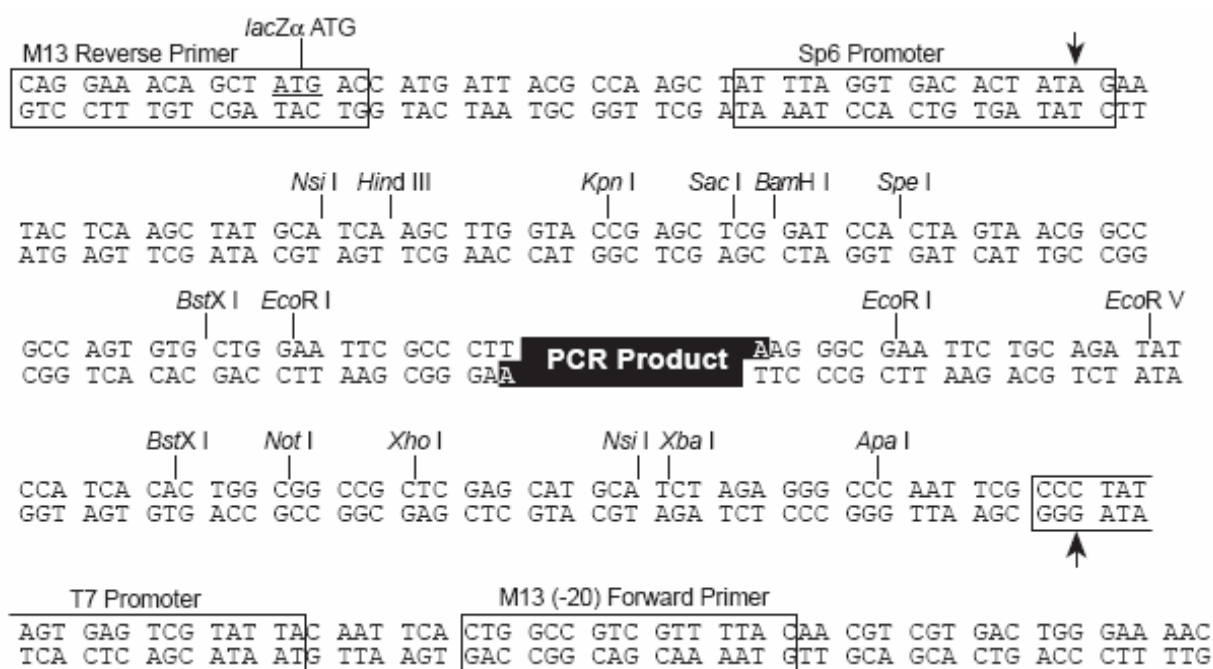
Reakcję PCR, przeprowadzono także z zastosowaniem starterów R i F. Produkt amplifikacji, oceniono także za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym. Odpowiadał od sekwencji sondy i miał długość 537 bp.

Wyselekcjonowane białe kolonie bakterii z wbudowaną sekwencją sondy przeniesiono do oddzielnych probówek zawierających 3 ml roztworu LB. Próbkę inkubowano we wstrząsarce przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie plazmidowe DNA izolowano z bakterii za pomocą zestawu do izolacji Plasmid Miniprep. W tym celu osad z hodowli zawieszono w 200 μ l roztworu L1, dodano 200 μ l roztworu L2 i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 3 minuty. Po dodaniu 400 μ l roztworu zobojętniającego GL3 i wymieszaniu, całość odwirowano (15000 RPM, minuta). Nadsącz przenoszono do minikolumny, ponownie odwirowano (15000 RPM, minuta). Dodano 500 μ l roztworu płuczającego W, odwirowywano (15000 RPM, minuta). Ponownie dodano 700 μ l roztworu płuczającego A1, odwirowywano (15000 RPM, 2 minuty). W osuszonej minikolumnie umieszczano 60 μ l wody destylowanej i pozostawiano na 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym ponownie odwirowano (12000 RPM, minuta). Tak oczyszczone plazmidowe DNA, rozpuszczone w wodzie, przechowywano w temperaturze 4°C.

Obecność oczyszczonego, plazmidowego DNA potwierdzano za pomocą elektroforezy na 1% żelu agarozowym produktu trawienia restryktazą EcoR I w temperaturze 37°C przez całą noc.

Miejsce w którym EcoR I przecina plazmid, jak również miejsce przyłączenia starterów M13 przedstawiono na rycinie poniżej.

Rycina 8. Fragment plazmidowego DNA z wbudowanym produktem reakcji PCR. Na rycinie zaznaczono miejsca przyłączenia starterów M13, jak i miejsce przecinane przez enzym EcoR I (rycina z materiałów udostępnionych przez producenta, Invitrogen).



Wycięty fragment plazmidu z wbudowaną sekwencją komplementarną do RNA rynowirusów ma 555 i jest 18 par nukleotydów dłuższy od poszukiwanego fragmentu.

Sekwencjonowanie sondy genetycznej

Sekwencjonowanie przeprowadzono z użyciem zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. We wszystkich reakcjach stosowano zewnętrzne w stosunku do insertu startery plazmidowe M13 Forward lub M13 Reverse z zestawu TOPO TA-Cloning Kit. Wykonywano osobne reakcje z każdym ze starterów.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 8 µl Terminator Ready Reaction Mix,
- 0,5 µg plazmidu,

3,2 pmol startera M13 Forward lub M13 Reverse,
woda destylowana do 20 μ l.

Reakcje PCR przeprowadzano w cyklerze w GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Jej etapy były, jak poniżej:

1. wstępna denaturacja	} 25 cykli	96°C przez 1 minutę,
2. denaturacja		96°C przez 10 sekund,
3. przyłączenie starteru		54°C przez 5 sekund,
4. annealing		65°C przez 4 minuty,
5. zatrzymanie reakcji		4°C.

Produkt reakcji oczyszczono zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Do 20 μ l produktu reakcji PCR dodano 5 μ l 125 mM EDTA, 55 μ l 100% etanolu. Składniki zmieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut, następnie odwirowano (3000xg, 30 minut, 4°C). Nadsącz usunięto, a do osadu dodano 60 μ l 70% etanolu. Próbkę ponownie odwirowano (1650xg, 15 minut, 4°C) i usunięto nadsącz. Osad na dnie próbówki rozpuszczono w 5 μ l buforu ładującego, zawierającego w stosunku 5:1:

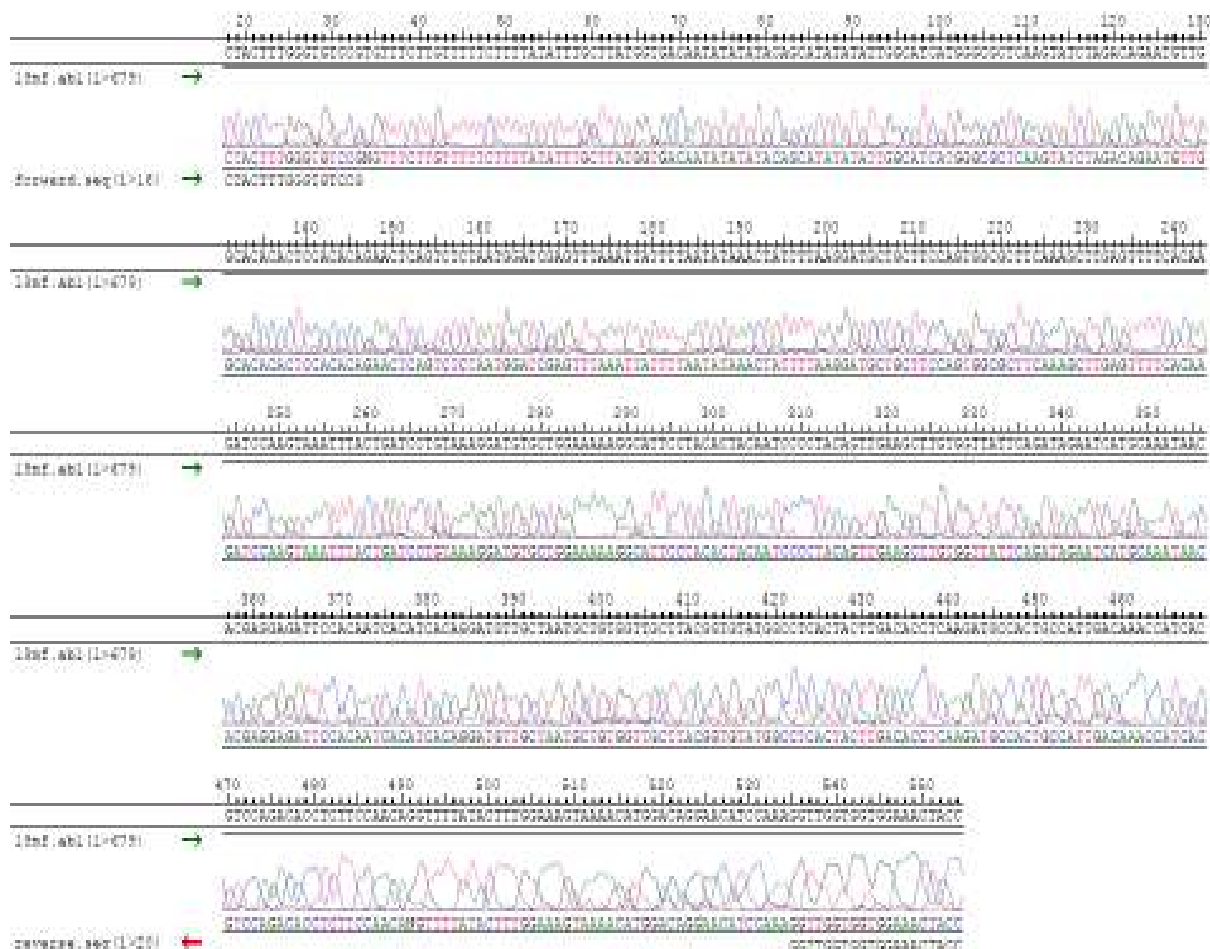
dejonizowany formamid

dekstran niebieski (50 mg/ml) i EDTA (25 mM, pH = 8,0).

Całość denaturowano w temperaturze 92°C przez 5 minut. Rozdział produktów reakcji przeprowadzono na żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem automatycznego sekwenatora ABI Prism 377 oraz programu komputerowego ABI Prism Genotyper 2.5 (Applied Biosystems).

Zidentyfikowany fragment sekwencji ma długość 537 zasad. Sekwencję wraz z zaznaczonymi miejscami przyłączenia starterów przedstawia rycina.

Rycina 9. Sekwencja sondy hybrydacyjnej stosowanej do wykrycia RNA rynowirusów w metodzie RT-PCR *in situ*.



Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonano na komputerze ACER za pomocą pakietu statystycznego Statistica 5.1 (StatSoft), wersji polskiej. W analizach stosowano testy nieparametryczne, jak i parametryczne. Różnice pomiędzy zmiennymi dychotomicznymi w określonych grupach obliczano testem Fischera, χ^2 . Porównanie grup pod względem zmiennych ciągłych oraz porządkowych oceniano testem U-Mann Whitney, t-studenta dla zmiennych niezależnych. Korelacje parametrów oceniano stosując testy nieparametryczne: test Spearmana, tau Kendalla. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonywano z wyłączeniem chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, w innym wypadku zaznaczono w tekście, że uwzględniono także chorych na POChP.

Za istotne statystycznie przyjęto wyniki testów, dla których poziom ufności był mniejszy lub równy 0,05.

IV. Wyniki

Charakterystyka populacji

Obecność RNA rynowirusów w błonie śluzowej oskrzeli zbadano metodą RT-PCR *in situ* łącznie u 60 osób, w tym 30 osób chorych na astmę oskrzelową oraz 23 osoby z grupy porównawczej. W pierwszej grupie u 18 osób postawiono rozpoznanie astmy łagodnej lub umiarkowanej, a u 12 ciężkiej. Ponadto w grupie chorych na astmę znalazło się 7 osób z nadwrażliwością na aspirynę. Rozpoznanie potwierdzono badaniem wziewnej lub doustnej próby aspirynowej u pięciu z nich. U dwóch nie wykonano próby z powodu braku zgody na badanie, a rozpoznanie postawiono na podstawie wywiadu choroby. Pozostałe osoby biorące udział w badaniu nie zgłaszały żadnych reakcji niepożądanych po zażyciu aspiryny lub innych NLPZ. Łącznie u połowy chorych na ATA wykonano próbę aspirynową, której wynik był ujemny.

Do grupy kontrolnej wstępnie włączono 30 osób. W przypadku 8 osób fragmenty błony śluzowej oskrzela pobierano w trakcie bronchofiberoskopii, natomiast u pozostałych 22 materiałem do badania był wycinek oskrzela pobierany podczas torakotomii. Analiza retrospektywna wykazała, że 7 osób spośród 30 wstępnie włączonych do tej grupy spełniało kryteria rozpoznania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Osoby te wykluczono z grupy kontrolnej, jednak utworzono oddzielną grupę (POChP) i wyniki RT-PCR przedstawiono oddzielnie. Ostatecznie grupa kontrolna liczyła 23 osoby, w tym 15 osób zakwalifikowanych wcześniej do operacyjnego usunięcia płata lub całego płuca i 8 osób kierowanych na bronchoskopię diagnostyczną.

Obecność białka otoczki wirusa oznaczono metodą immunohistochemiczną u 20 osób, w tym 14 chorych na astmę i 6 nie chorujących na tę chorobę. Wszystkie wycinki pobrane zostały podczas bronchoskopii.

Podstawową charakterystykę kliniczną grup włączonych do badania przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Charakterystyka grup włączonych do badania.

	Pośrednia <i>in situ</i> RT-PCR		Pośrednia IHC		
	Astma n=30	Kontrola n=23	POChP n=7	Astma n=14	Kontrola n=6
Wiek (lata)	41±12	55±15	66±9	41±10	49±24
Płeć (K/M proporcja)	22/8	14/9	0/7	7/7	3/3
Czas trwania astmy (lata)	6±7	0	0	10±12	0
Atopia (T/N)	14/14	b.d.	b.d.	5/9	b.d.
Palenie tytoniu (T/N)	4/26	8/15	5/2	1/13	b.d.
Eozynofilia (na mm ³) / n	312±339 27	147±143 11	429±306 4	400±328 14	201±99 2
IgE w surowicy (UI/mL) /n	354±14 19	31 1	b.d.	463±819 14	35±6 2
FEV1 (% wart. należnej) /n	83±25 29	95±18 15	77,7±11 6	86±23 /14	99±1 2
Glikokortykosteroidy wziewne (T/N proporcja)	27/3	1/22	1/6	14/0	0/6
Glikokortykosteroidy systemowe (% populacji)	30	9	0	14	0

n- liczba osób, u których dostępne były wybrane dane

Grupy, które badano metodą RT-PCR *in situ* różniły się znamienne wiekiem. Średnia wieku chorych na astmę oskrzelową wynosiła 41 lat i była znamienne niższa niż obliczona dla osób z grupy kontrolnej (54 lata; U Mann-Whitney, p=0,003). Różnice dotyczyły również proporcji płci (brak kobiet z POChP, różnice między astmą i kontrolą niezamienne statystycznie). W grupie kontrolnej więcej osób paliło papierosy niż w grupie chorych na astmę (53% vs 15%), różnice te nie są istotne statystycznie (Fisher, p=0,984).

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach spirometrycznych pomiędzy chorymi na astmę oskrzelową, a osobami z grupy kontrolnej, z wyjątkiem wartości wskaźnika Tiffneau- wynik jest na granicy znamienności statystycznej (test U Mann-Whitney, $p=0,052$). Wykazane podobieństwo objętości oddechowych w porównywanych grupach może wynikać z założeń pracy, bowiem do badania kwalifikowano astmatyków ze stabilnymi wynikami badań spirometrycznych.

Większość astmatyków otrzymywała glikokortykosteroidy wziewne, natomiast w pozostałych dwóch grupach leki te podawano znamienne rzadziej. Chorzy na astmę oskrzelową częściej też stosowali glikokortykosteroidy doustne (30% badanych), w tym wypadku różnice między grupami nie były znamienne statystycznie.

Wśród chorych na astmę stwierdzono istotnie wyższą granulocytozę krwi obwodowej (wyrażoną zarówno w wartościach bezwzględnych, jak i jako odsetek wszystkich leukocytów) w porównaniu z grupą kontrolną (U Mann-Whitney, $p<0,05$). Nie stwierdzono różnicy w eozynofilii obwodowej. Porównanie poziomu IgE między grupami nie było możliwe, ponieważ badanie to wykonano u 19 astmatyków i jedynie 1 osoby z grupy kontrolnej.

W populacji osób, u których oceniano obecność rynowirusa metodą immunohistochemiczną nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy chorymi na astmę, a grupą kontrolną w zakresie danych uwzględnionych w tabeli 2.

Częstość wykrywania rynowirusów

Wyniki uzyskane metodą pośredniej RT-PCR *in situ* oraz immunohistochemii dla wszystkich grup przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 3. Liczba dodatnich wyników badania na obecność HRV w oskrzelach, ocenianych metodami: pośredniej RT-PCR *in situ* oraz pośredniej immunohistochemii.

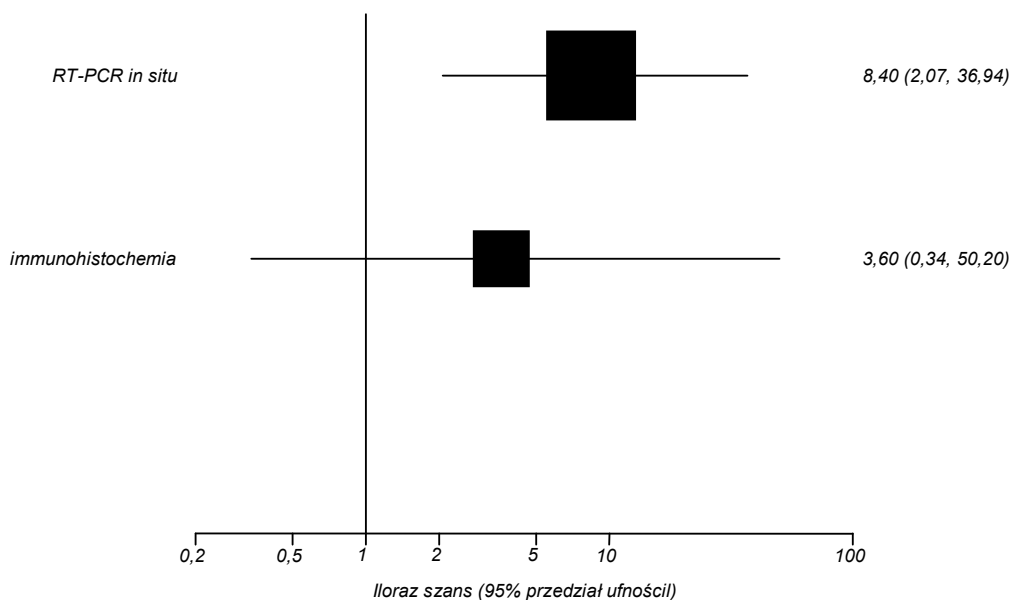
Pośrednia RT-PCR <i>in situ</i>					Pośrednia IHC			
n=53					n=20			
ATA N=23		AIA n=7 100%	Kontrola n=23		POCHP n=7 71%	ATA	AIA	Kontrola n=6 33%
Łagodna/ umiarkowana 57%	Ciężka 67%		Bronchoskopia 25%	Operacja 20%		n=11 73%	n=3 33%	
Łącznie: 61%			Łącznie: 22%			Łącznie: 64%		
Łącznie: 73%								

Metodą RT-PCR *in situ* stwierdzono obecność RNA rynowirusów w błonie śluzowej oskrzeli u 73% osób chorych na astmę oraz u 22% osób z grupy kontrolnej. Różnica między grupami jest wysoce znamienne statystycznie (test Fischera, $p=0,0008$). Iloraz szans wynosi $OR=8,40$ (95% przedział ufności: 2,07-36,94), co oznacza, że szansa stwierdzenia materiału genetycznego rynowirusa w dolnych drogach oddechowych była 8,4 razy większa w grupie chorych na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej.

Metodą immunohistochemii pośredniej obecność białka kapsydu stwierdzono u 64% chorych na astmę oskrzelową oraz 33% osób z grupy kontrolnej. Porównanie tych częstości nie było znamienne statystycznie, prawdopodobnie z uwagi na małą liczebność grup. Iloraz szans wynosi $OR=3,6$ (95% przedział ufności 0,34-50,20)

Obliczone ilorazy szans obecności rynowirusa w grupie chorych na astmę i grupie kontrolnej przedstawiono na wykresie poniżej.

Wykres 1. Ilorazy szans obecności rynowirusa w oskrzelach chorych na astmę oskrzelową w porównaniu z grupą kontrolną, wyniki dla pośredniej RT-PCR *in situ* i IHC.



U 12 osób wykonano badanie na obecność rynowirusa dwiema metodami: RT-PCR *in situ* oraz immunohistochemiczną, w tym: u 9 astmatyków i 3 osób z grupy kontrolnej. Obydwie metody przyniosły podobne rezultaty u połowie przypadków. Metodą *in situ* wykryto

rynowirusa dodatkowo u 4 osób, u których badanie IHC było negatywne. Natomiast u dwóch osób z dodatnim wynikiem w metodzie IHC, wynik PCR *in situ* był ujemny.

Obecność rynowirusów a charakterystyka kliniczna populacji

Nie stwierdzono, aby osoby mające lub niemające rynowirusa w dolnych drogach oddechowych różniły się znamienne wiekiem, czy płcią. Średnia wieku astmatyków z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* jest niemniej wyższa (44 ± 12 lat) w porównaniu do osób z wynikiem ujemnym (36 ± 13 lat). Nie wykazano różnic między grupami w częstości występowania atopii, chorób alergicznych, jak katar sienny, alergiczne zapalenie spojówek, czy pokrzywka. Osoby z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* nie różniły się od pozostałych pod względem częstości dodatnich testów skórnych (test Fischera, $p > 0,05$), czy poziomu IgE w surowicy krwi (test U Mann-Whitney, $p > 0,05$). Nie zaobserwowano także, aby osoby, które cierpiały na przewlekłe objawy ze strony górnych dróg oddechowych (przewlekłe zapalenie zatok i/lub polipy nosa i/lub przewlekły katar) miały częściej rynowirusa w oskrzelach. Podobny brak różnic stwierdzono dla wyników metody immunohistochemicznej.

Porównując częstość wykrywania rynowirusów metodą RT-PCR *in situ* u osób z ciężką oraz łagodną/umiarkowaną astmą, stwierdzono częstsze występowanie tych zakażeń w pierwszej grupie (67% vs 57%; tabela 3). Różnica między grupami nie jest jednak znamienna statystycznie. Nie zaobserwowano także znamiennego statystycznie związku pomiędzy częstością wykrywania rynowirusa, a leczeniem glikokortykosteroidami w postaci doustnej lub wziewnej (test Fischera, $p > 0,05$), jak również dawką steroidów wziewnych (U-Mann Whitney, $p > 0,05$). Natomiast, po łącznym uwzględnieniu wyników astmatyków i grupy kontrolnej, wykazano istotny związek pomiędzy stosowaniem glikokortykosteroidów w postaci wziewnej lub doustnej, a częstszą obecnością rynowirusa w oskrzelach. (test Fishera, $p = 0,002$)

Podobne analizy dla metody immunohistochemicznej nie wykazały znamienności statystycznych.

U wszystkich AIA (7 osób) stwierdzono obecność RNA rynowirusów metodą RT-PCR *in situ* (tabela 3). Różnica częstości wykrywania HRV pomiędzy grupą AIA i ATA jest bliska znamienności statystycznej (test Fishera, $p = 0,07$). Metodą immunohistochemiczną stwierdzono natomiast obecność białka otoczki wirusa tylko u jednego spośród 3 chorych na astmę aspirynową.

Zaobserwowano, że chorzy u których wykrywano rynowirusy metodą RT-PCR *in situ* znamienne rzadziej palili papierosy (test Fischera, $p=0,019$). Podobna analiza dla wyników metody immunohistochemicznej nie była znamienne statystycznie ($p=0,48$).

W tabeli 4 porównano średnie wartości wskaźników spirometrycznych u osób z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ* w grupach: astmy, kontroli i obydwu grupach łącznie.

Tabela 4. Porównanie średnich wartości spirometrycznych w grupach z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ*.

Parametr	Grupa z RNA dla HRV			Grupa bez RNA dla HRV			Wartość p
	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe	
Astma							
FEV1 (%)	20	79	26,15	9	94	18,10	n.s.
FVC (%)	20	91	20,10	8	97	18,18	n.s.
FEV1/FVC	20	71	14,81	9	81	8,26	0,049
FEF25 (%)	14	72	30,58	6	89	31,30	n.s.
FEF50 (%)	14	57	23,54	6	75	23,18	n.s.
FEF75 (%)	14	53	28,54	6	64	22,93	n.s.
Grupa kontrolna							
FEV1 (%)	4	84	20,32	11	99	15,48	n.s.
FVC (%)	4	87	21,26	11	99	19,97	n.s.
FEV1/FVC	4	80	1,50	13	84	8,31	n.s.
FEF25 (%)	1	84	-	3	105	13,17	n.s.
FEF50 (%)	1	57	-	3	85	7,29	0,015
FEF75 (%)	1	40	-	3	77	14,46	n.s.
Astma i grupa kontrolna łącznie							
FEV1 (%)	24	79	25,96	20	97	16,46	0,016
FVC (%)	24	90	19,89	19	98	18,76	n.s.
FEV1/FVC	24	72	13,88	22	83	8,22	0,004
FEF25 (%)	15	73	29,62	9	94	26,75	0,073
FEF50 (%)	15	57	22,69	9	78	19,41	0,016
FEF75 (%)	15	53	27,74	9	68	20,69	0,073

n.s.- nieznamienne statystycznie

Obliczono także nieparametryczne korelacje pomiędzy wartościami wskaźników spirometrycznych a nasileniem zakażenia, ocenianego w skali sześciostopniowej na podstawie wyników badania RT-PCR *in situ*.

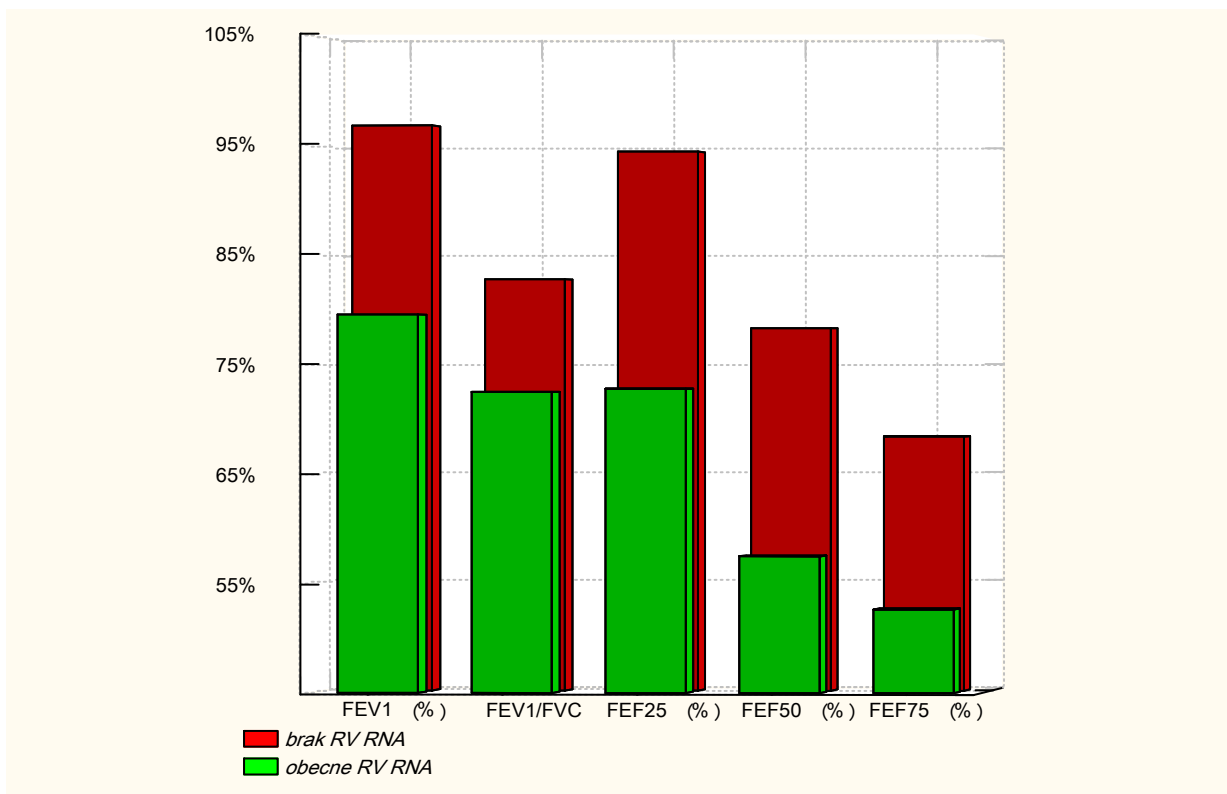
Tabela 5. Wyniki korelacji nieparametrycznych pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem w dolnych drogach oddechowych, ocenianym w skali 6-stopniowej na podstawie RT-PCR *in situ*, a wartościami wskaźników spirometrycznych.

Parametr	Astma			Grupa kontrolna			Astma i grupa kontrolna łącznie		
	n	Tau	Wartość p	n	Tau	Wartość p	n	Tau	Wartość p
FEV1 (%)	28	0,04	n.s	15	-0,34	n.s	43	-0,2	0,046
FVC (%)	27	0,006	n.s	15	-0,20	n.s	42	0,11	n.s
FEV1/FVC	28	-0,10	n.s	17	-0,30	n.s	45	-0,21	0,038
FEF 25 (%)	19	-0,02	n.s	4	-0,71	n.s	23	-0,13	n.s
FEF 50 (%)	19	-0,08	n.s	4	-0,71	n.s	23	-0,18	n.s
FEF 75 (%)	19	-0,11	n.s	4	-0,71	n.s	23	-0,22	n.s

Wśród astmatyków z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* stwierdzono znamienne niższe wartości współczynnika FEV₁/FVC (U Mann-Whitney test, p=0,049) w porównaniu do chorych z wynikiem ujemnym. Gdy w analizie uwzględniono wszystkich zbadanych łącznie z grupą kontrolną, zaobserwowano, że osoby HRV-dodatnie mają znamienne niższe objętości (odsetki wartości należnych): FEV₁ (U Mann-Whitney, p=0,016), FEV₁/FVC (U Mann-Whitney, p=0,004), FEF50 (U Mann-Whitney, p=0,016), a różnice w wartościach FEF25 oraz FEF75 są na granicy znamienności statystycznej (U Mann-Whitney, p=0,073). W grupie kontrolnej analizowanej oddzielnie, stwierdzono jedynie istotny statystycznie związek pomiędzy wynikiem RT-PCR *in situ*, a współczynnikiem FEF50. Wyniki przedstawiono

graficznie na rycinie 10. Stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem, a wynikiem FEV₁ i wskaźnika FEV₁/FVC.

Rycina 10. Porównanie średnich wartości wybranych parametrów spirometrycznych w grupie chorych z dodatnim oraz z ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ*; chorzy na astmę łącznie z grupą kontrolną.



Nie wykazano różnic w wynikach spirometrii pomiędzy osobami, u których stwierdzono lub nie stwierdzono rynowirusa w metodzie immunohistochemicznej.

Morfologię krwi obwodowej oznaczono 22 astmatykom i 17 osobom z grupy kontrolnej. Średnie wartości leukocytozy, limfocytozy, granulocytozy oraz eozynofilii w zależności od wyniku RT-PCR *in situ* przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 6. Porównanie średniej liczby leukocytów i ich subpopulacji w grupach z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ*.

Parametr	Grupa HRV-dodatnia			Grupa HRV-ujemna			Wartość p
	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	
Astma							
Leukocytoza (tys. kom./ul)	15	8400	2229 [5900-13000]	7	6750	1853 [3320-8437]	0,072
Granulocytoza (kom./ul)	15	5901	2211 [3328-11168]	7	4269	1853 [3524-3320]	0,024
Granulocytoza (%)	15	69,25	8,93 [56,40-92,30]	7	61,94	5,74 [57,00-70,90]	0,036
Limfocytoza (kom./ul)	15	1899	620 [813-2951]	7	2070	551 [1280-3130]	n.s
Limfocytoza (%)	15	23,32	7,73 [6,72-36,60]	7	31,00	4,16 [25,10-36,00]	0,017
Eozynofilia bezwzględna (kom./ul)	19	393	371 [16-1295]	8	119	117 [6-365]	0,049
Grupa kontrolna							
Leukocytoza (tys. kom./ul)	4	7597	4152 [3190-12300]	13	6743	1585 [4900-9800]	n.s.
Granulocytoza (kom./ul)	4	5345	3708 [2048-9754]	13	3671	1276 [1550-6111]	n.s.
Granulocytoza (%)	4	66,17	13,37 [48,40-79,30]	13	53,36	13,14 [22,80-67,90]	n.s
Limfocytoza (kom./ul)	4	1747	579 [912-2192]	13	2425	1116 [1182-4876]	n.s
Limfocytoza (%)	4	26,45	10,62 [14,70-39,90]	13	35,89	13,87 [22,30-71,70]	n.s
Eozynofilia bezwzględna (kom./ul)	2	80	30 [59-101]	10	156	147 [5-419]	n.s

Astma i grupa kontrolna łącznie							
Leukocytoza (tys. kom./ul)	19	8231	2617 [3190-13000]	20	6758	1807 [4900-11900]	0,034
Granulocytoza (kom./ul)	18	5771	2511 [2048-11168]	20	3880	1483 [1550-8437]	0,007
Granulocytoza (%)	18	68,53	9,76 [48,40-92,30]	20	57,01	11,54 [22,80-70,90]	0,0015
Limfocytoza (kom./ul)	18	1865	598 [813-2951]	20	2300	996 [1182-4876]	n.s
Limfocytoza (%)	18	24,01	8,21 [6,72-39,90]	20	34,18	11,52 [22,30-71,70]	0,002
Eozynofilia bezwzględna (kom./ul)	21	363	364 [16-1295]	18	140	132 [5-419]	0,036

Wyniki nieparametrycznych korelacji pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusami w dolnych drogach oddechowych a leukocytozą krwi obwodowej przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 7. Wyniki korelacji nieparametrycznych pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem w dolnych drogach oddechowych, a obrazem leukocytów krwi obwodowej.

Parametr	Astmacy		Grupa kontrolna		Astmacy i grupa kontrolna łącznie	
	Tau	Wartość p	Tau	Wartość p	Tau	Wartość p
Leukocyty (tys. kom./ul)	0.41	0.009	0.02	n.s.	0.30	0.008
Limfocyty (tys.kom./ul)	-0.006	n.s.	-0.37	0.04	-0.19	n.s.
Granulocyty (tys.kom./ul)	0.48	0.004	0.09	n.s.	0.36	0.002
Limfocyty %	-0.44	0.007	-0.27	n.s.	-0.41	0.0004
Granulocyty %	0.36	0.03	0.32	0.07	0.42	0.0003
Eozynofile (tys.kom./ul)	0.42	0.003	-0.13	n.s.	0.28	0.005

Wśród chorych na astmę, u których wykryto RNA rynowirusa liczba leukocytów i granulocytów krwi obwodowej była większa w porównaniu do osób z ujemnym wynikiem testu (U Mann-Whitney odpowiednio: $p=0,07$ i $p=0,024$). W tej grupie stwierdzano także wyższy odsetek granulocytów (U Mann-Whitney, $p=0,036$) i niższy limfocytów (U Mann-Whitney, $p=0,017$).

Gdy w analizie uwzględniono astmatyków i grupę kontrolną łącznie, stwierdzono znamienne statystycznie różnice w leukocytozie krwi obwodowej pomiędzy osobami z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ* (U Mann-Whitney, $p=0,034$). W grupie HRV-dodatniej średni poziom leukocytów we krwi obwodowej wynosił 8231 kom/ul, a w HRV-ujemnej: 6758 kom/ul. W pierwszej grupie stwierdzano znamienne więcej granulocytów (U Mann-Whitney, $p=0,0015$) oraz mniej limfocytów (U Mann-Whitney, $p=0,002$) w obrazie odsetkowym krwi obwodowej. Średnia granulocytoza bezwzględna w grupie HRV-dodatniej

wynosi 5771 kom/ul, natomiast w grupie HRV-ujemnej: 3880 kom/ul. Różnica ta jest także znamienne statystycznie (U Mann-Whitney, $p=0,007$).

Stwierdzono znamienne statystycznie korelacje pomiędzy leukocytozą, liczbą i odsetkiem granulocytów, odsetkiem limfocytów a nasileniem zakażenia HRV, ocenianym w 6-stopniowej skali, zarówno w grupie chorych na astmę, jak i w obydwu grupach łącznie (tab. 7).

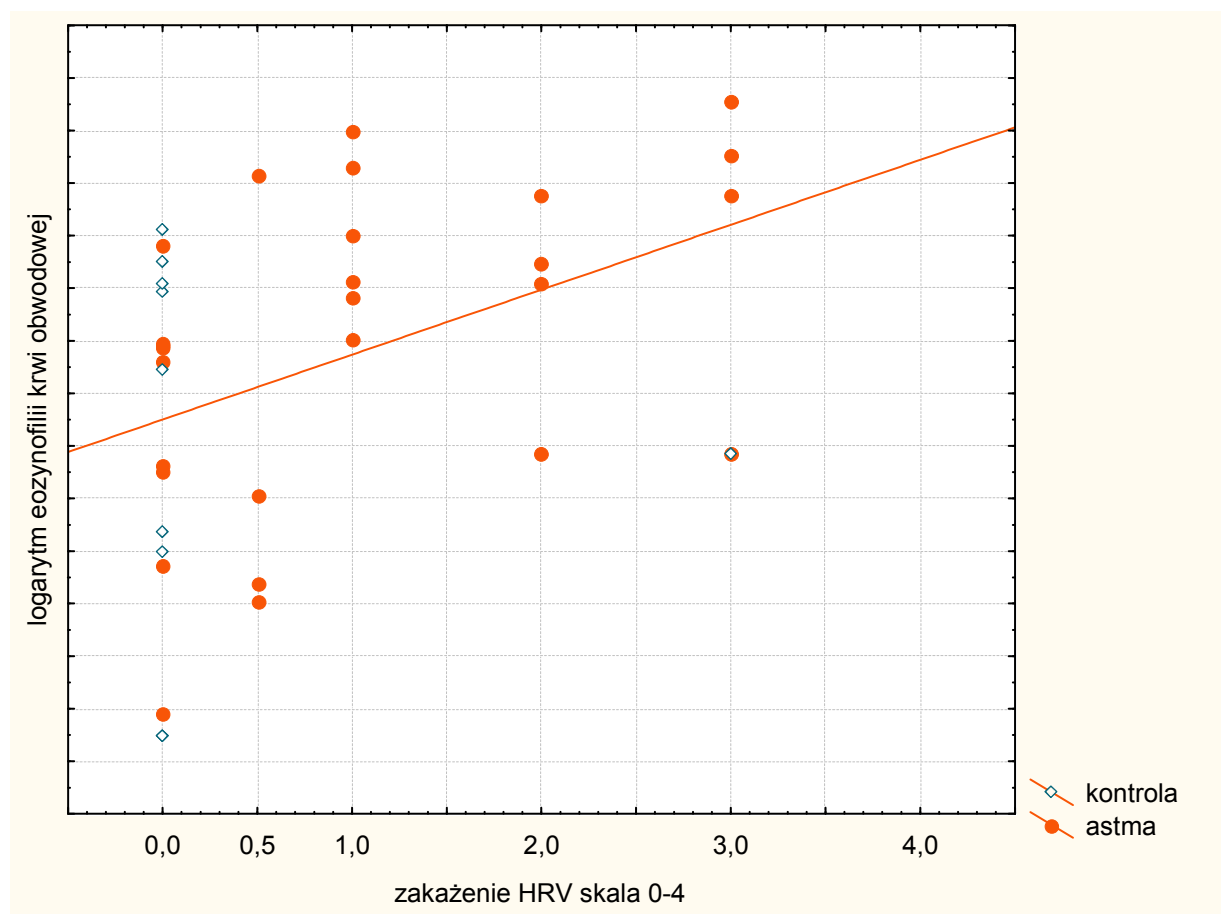
Po wyłączeniu z analizy chorych otrzymujących glikokortykosteroidy systemowe ponownie stwierdzono znamienne statystycznie zwiększenie odsetka granulocytów i zmniejszenie odsetka limfocytów we krwi obwodowej ($p=0,045$) wśród astmatyków z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ*. W grupie kontrolnej nie stwierdzono żadnych znamienych statystycznie różnic między grupami. Natomiast po uwzględnieniu wyników dla chorych na astmę oskrzelową i dla grupy kontrolnej łącznie, stwierdzono: znamienne większy odsetek oraz liczbę granulocytów we krwi obwodowej oraz znamienne mniejszy odsetek limfocytów. Nie stwierdzono różnic między grupami w liczbie leukocytów, czy eozynofilii bezwzględnej.

Osoby z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* miały istotnie więcej eozynofilów we krwi obwodowej (U Mann-Whitney, $p=0,036$): średnia eozynofilia bezwzględna w grupie HRV-dodatniej wynosi: 363/ul, a w grupie HRV-ujemnej: 140/ul. Gdy uwzględniono wyłącznie wyniki astmatyków, różnice były także istotne statystycznie (U Mann-Whitney, $p=0,049$). Średni poziom eozynofilów we krwi obwodowej u HRV-dodatnich astmatyków wynosi 393/ul, a HRV-ujemnych: 119/ul. Stwierdzono także dodatnią korelację pomiędzy ilością materiału wirusa w oskrzelach (skala 6-stopniowa), a nasileniem eozynofilii we krwi obwodowej wśród chorych na astmę (Tau Kendall, $\tau=0,42$, $p=0,0026$). Podobnych zależności nie obserwowano w grupie kontrolnej. Współczynnik korelacji po uwzględnieniu wyników wszystkich 3 grup (ATA, kontrola, POChP) wynosi $\tau=0,4$, $p=0,0002$.

Opisanych wyżej zależności nie stwierdzono, gdy analizowano wyniki metody immunohistochemicznej.

Na wykresie przedstawiono rozrzut wyników zależności eozynofilii obwodowej względem nasilenia zakażenia HRV w dolnych drogach oddechowych, ocenianego metodą RT-PCR *in situ*.

Wykres 2. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV (RT-PCR *in situ*) i eozynofili krwi obwodowej (skala logarytmiczna), zależność jest znamienna statystycznie ($p < 0,05$).



Aczkolwiek na podstawie zebranego wywiadu, badania lekarskiego i badań dodatkowych wykluczono z badania chorych z objawami zakażenia wirusowego lub bakteryjnego, to w niektórych przypadkach wykrywano patogenne szczepy bakterii w badaniach mikrobiologicznych, pobieranych w czasie bronchofiberoskopii. Dodatkowo wyniki posiewów bakteriologicznych popłuczyn BAL stwierdzono u 10 osób (33% badanych w tym kierunku), w tym u 7 z nich wykryto także obecność RNA rynowirusa w dolnych drogach oddechowych. Obecność *Chlamydia pneumoniae* potwierdzono u 5 osób, spośród 13 badanych w tym kierunku, 3 osoby były równocześnie zakażone rynowirusem. U jednej osoby (spośród 16 badanych w tym kierunku) stwierdzono zakażenie *Pneumocystis carinii*, wynik RT-PCR *in situ* był w tym przypadku ujemny. U 4 osób, spośród 25 badanych, stwierdzono obecność drożdżaków (*Candida*), u 2 z nich rozpoznano także zakażenie rynowirusem.

Zidentyfikowano jedną osobę z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ*, u której stwierdzono równocześnie obecność bakterii (paciorkowiec) i chlamydii w popłuczynach BAL.

Nie wykazano istotnych statystycznie związków pomiędzy obecnością rynowirusów w dolnych drogach oddechowych, a obecnością innych drobnoustrojów (test Fischera, $p>0,05$).

W przypadku części osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej operacja guza nie była radykalna, a całość dokumentacji medycznej wskazywała na uogólnioną chorobę nowotworową (podejrzenie przerzutów odległych). Nie wykazano jednak, aby osoby z większym zaawansowaniem choroby nowotworowej miały częściej rynowirusa w oskrzelach (test Fischera, $p>0,05$). Nie stwierdzono także, aby istniała zależność pomiędzy typem histologicznym nowotworu (raka płaskonabłonkowego lub gruczołowego rozpoznano u 17 osób) a częstością wykrywania RNA rynowirusów (test Fischera, $p>0,05$).

Obecność rynowirusów a objawy zapalenia

Porównanie średnich odsetków i liczb komórek w popłuczynach BAL (tys/ml płynu) w grupach z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ* oraz dodatnim i ujemnym wynikiem immunohistochemii przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 8. Porównanie obrazu cytologicznego popłuczyn BAL astmatyków z dodatnim i ujemnym wynikiem badania w kierunku HRV (RT-PCR *in situ* lub IHC).

Parametr	Grupa HRV-dodatnia RT-PCR <i>in situ</i>			Grupa HRV-ujemna RT-PCR <i>in situ</i>			Wartość p
	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	
Liczba komórek BAL (tys. kom/ul)	15	64,26	55,61	6	48,37	39,55	n.s.
Makrofagi BAL (kom./ul)	14	51,56	47,41	6	42,93	38,04	n.s.
Limfocyty BAL (kom/ul)	14	6,87	7,66	6	3,68	1,94	n.s.
Neutrofile BAL (kom./ul)	14	1,77	2,19	6	1,23	1,73	n.s.

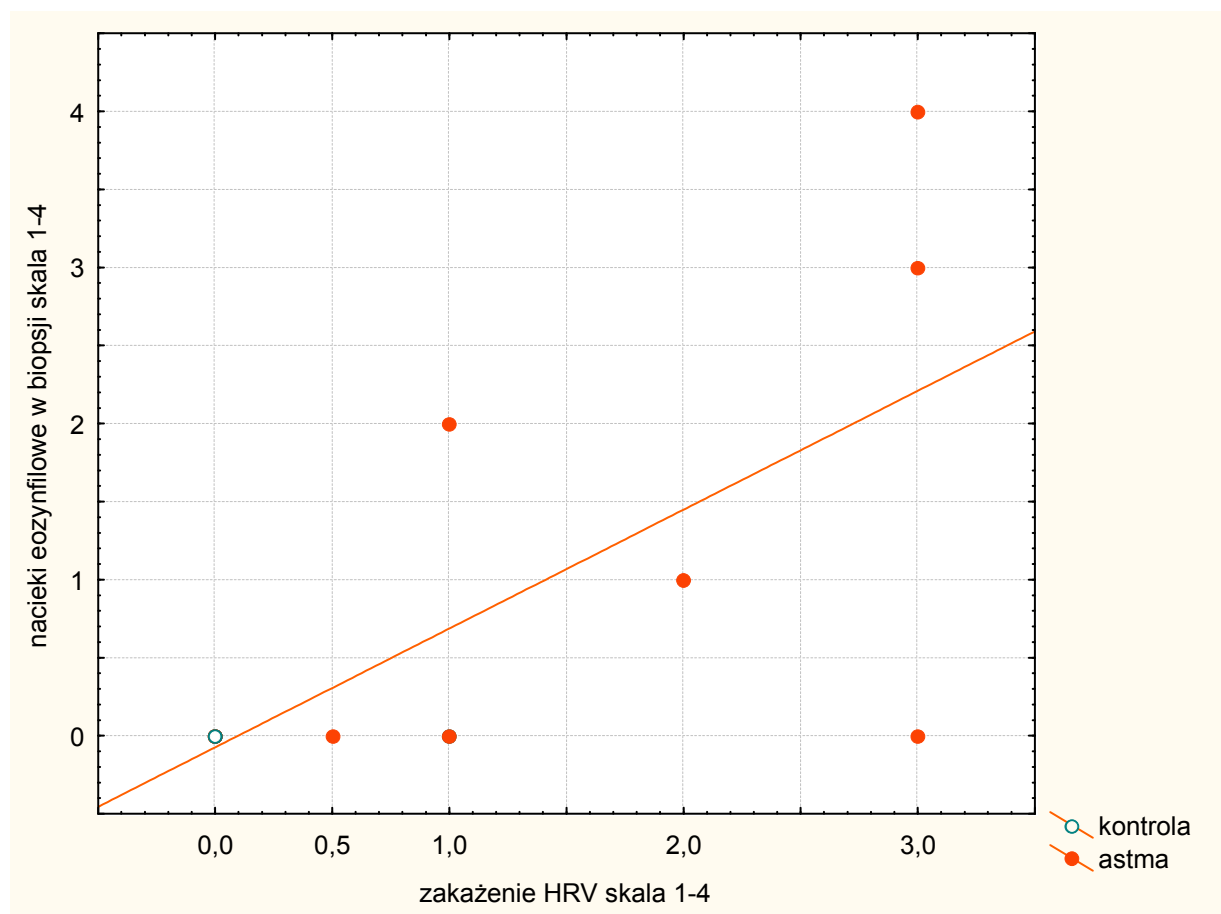
Eozynofile BAL (kom./ul)	14	3,42	9,14	6	0,52	0,57	n.s.
Makrofagi BAL (%)	15	82,58	8,60	7	78,86	21,86	n.s.
Limfocyty BAL (%)	15	10,78	8,20	7	12,00	7,07	n.s.
Neutrofile BAL (%)	15	3,63	2,57	7	2,43	2,30	n.s.
Eozynofile BAL (%)	15	2,92	6,52	7	2,71	5,91	n.s.
	Grupa HRV-dodatnia IHC			Grupa HRV-ujemna IHC			
Parametr	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	Liczba badanych	Średnia	Odchylenie standardowe [zakres]	Wartość p
Liczba komórek BAL (tys. kom/ul)	9	75,63	54,92	4	67,37	31,07	n.s.
Makrofagi BAL (kom./ul)	9	62,93	42,86	4	55,58	31,24	n.s.
Limfocyty BAL (kom/ul)	9	5,65	6,96	4	9,05	6,51	n.s.
Neutrofile BAL (kom./ul)	9	1,48	1,45	4	1,49	1,01	n.s.
Eozynofile BAL (kom./ul)	9	4,32	7,71	4	1,53	1,02	n.s.
Makrofagi BAL (%)	9	85,22	7,98	4	81,25	10,47	n.s.
Limfocyty BAL (%)	9	7,28	3,00	4	14,00	10,23	n.s.
Neutrofile BAL (%)	9	3,26	3,01	4	2,25	1,50	n.s.
Eozynofile BAL (%)	9	5,42	11,10	4	2,75	2,50	n.s.

Nie wykazano znamienych różnic pomiędzy astmatykami z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ* w łącznej liczbie komórek, liczbach (oraz odsetkach) makrofagów, granulocytów, eozynofików, limfocytów przypadających na jednostkę objętości BAL (U Mann-Whitney, $p>0,05$). Podobny brak zależności stwierdzono w przypadku zastosowania metody immunohistochemicznej. Z uwagi na niewielką liczbę wyników cytologicznych w grupie kontrolnej, nie przeprowadzono analizy w tej grupie.

W większości biopsji pobieranych w trakcie bronchofiberoskopii na podstawie rutynowego badania histopatologicznego rozpoznano wyłącznie cechy przewlekłego procesu zapalnego (23 z 29 ocenionych). W czasie lobektomii lub pulmonektomii pobierano większe wycinki do badania histopatologicznego, co umożliwiło dokładniejszą ich ocenę. Łącznie uwzględniono 19 opisów wycinków pobieranych w czasie operacji (w tym 7 osób z POChP). W 7 biopsjach stwierdzono cechy przewlekłego zapalenia. Nie wykazano, aby u operowanych, u których stwierdzono HRV w badaniach RT-PCR *in situ*, częściej obserwowano proces zapalny miąższu płuc, cechy przebudowy tkanek w postaci włóknienia, czy rozedmy (test Fischera, $p>0,05$).

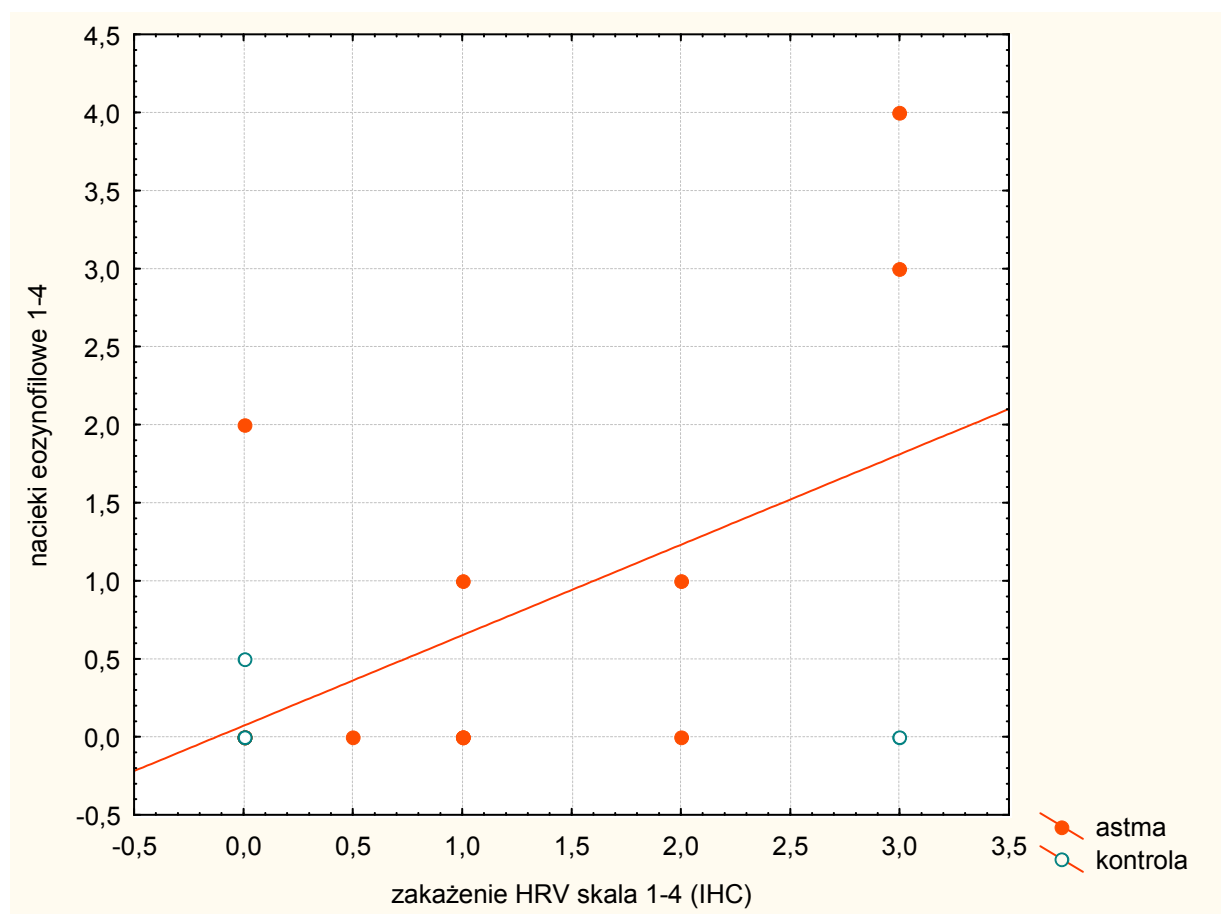
U 14 osób (w tym 10 chorych na astmę) wykonano badanie RT-PCR *in situ* łącznie z immunohistochemicznym barwieniem eozynofików w błonie śluzowej oskrzeli. 4 osoby z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* (wszyscy chorujący na astmę oskrzelową) miały eozynofile w wycinkach oskrzeli, u pozostałych osób nie wykryto nacieków eozynofilowych. Różnice między grupami są na granicy znamienności statystycznej (test Fischera, $p=0,085$). Stwierdzono znamienne statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem, a nasileniem zapalenia eozynofilowego. Współczynnik korelacji tau Kendalla wynosi 0,62; $p=0,002$. Na poniższym wykresie przedstawiono rozrzut wyników dla opisywanej zależności. Współczynnik obliczony wyłącznie dla chorych na astmę oskrzelową wynosi $\tau=0,59$; $p=0,017$.

Wykres 3. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV i liczby eozynofilów w tkance; RT-PCR *in situ*, zależność jest znamiennej statystycznie ($p < 0,05$).



Podobne porównania wykonano dla metody immunohistochemicznej. Białka otoczki wirusa oraz eozynofilów w biopsjach błony śluzowej oskrzeli poszukiwano u 19 osób, w tym 14 astmatyków i 5 osób z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono, aby u osób, u których wykryto rynowirusa tą metodą częściej występowały eozynofile w tkance obwodowej (test Fischera, $p=0,63$). Jednak stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ilością antygenu rynowirusów w tkance, a liczbą eozynofilów. Współczynnik korelacji tau Kendalla wynosi 0,34; $p=0,045$. Współczynnik korelacji obliczony wyłącznie dla astmatyków wynosi $\tau=0,46$, $p=0,02$. Wykres przedstawia rozrzut wyników dla opisywanej zależności.

Wykres 4. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV i liczby eozynofiliów w tkance, metoda immunohistochemiczna, zależność jest znamienne statystycznie ($p < 0,05$).



Tomografię oraz radiogramy klatki piersiowej wykonano w okresie okołozabiegowym (2 miesiące) u 26 osób. Wszystkie te osoby chorowały na astmę oskrzelową, a 4 były nadwrażliwe na aspirynę. Nie stwierdzono związku pomiędzy zmianami o charakterze zapalnym w płucach w badaniach obrazowych, a obecnością RNA rynowirusów w dolnych drogach oddechowych. U 5 osób HRV-dodatnich obecne były także zagęszczenia w tkance śródmiąższowej płuc, jednak u pozostałych 12 (71% osób z wynikiem dodatnim) badanie CT klatki piersiowej nie wykazało zmian. Tylko u 1 osoby HRV-negatywnej obserwowano zmiany zapalne w tomografii komputerowej płuc. Odnotowane różnice nie są znamienne statystycznie. Podobnie, nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania zmian o charakterze pogrubień ścian oskrzeli w CT pomiędzy osobami, u których stwierdzono lub nie stwierdzono rynowirusów metodą *in situ*. U większej liczby osób z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* (65% osób) opisywano zmiany oskrzelowe w CT, natomiast występowały one u mniejszego odsetka osób z wynikiem ujemnym (33% osób).

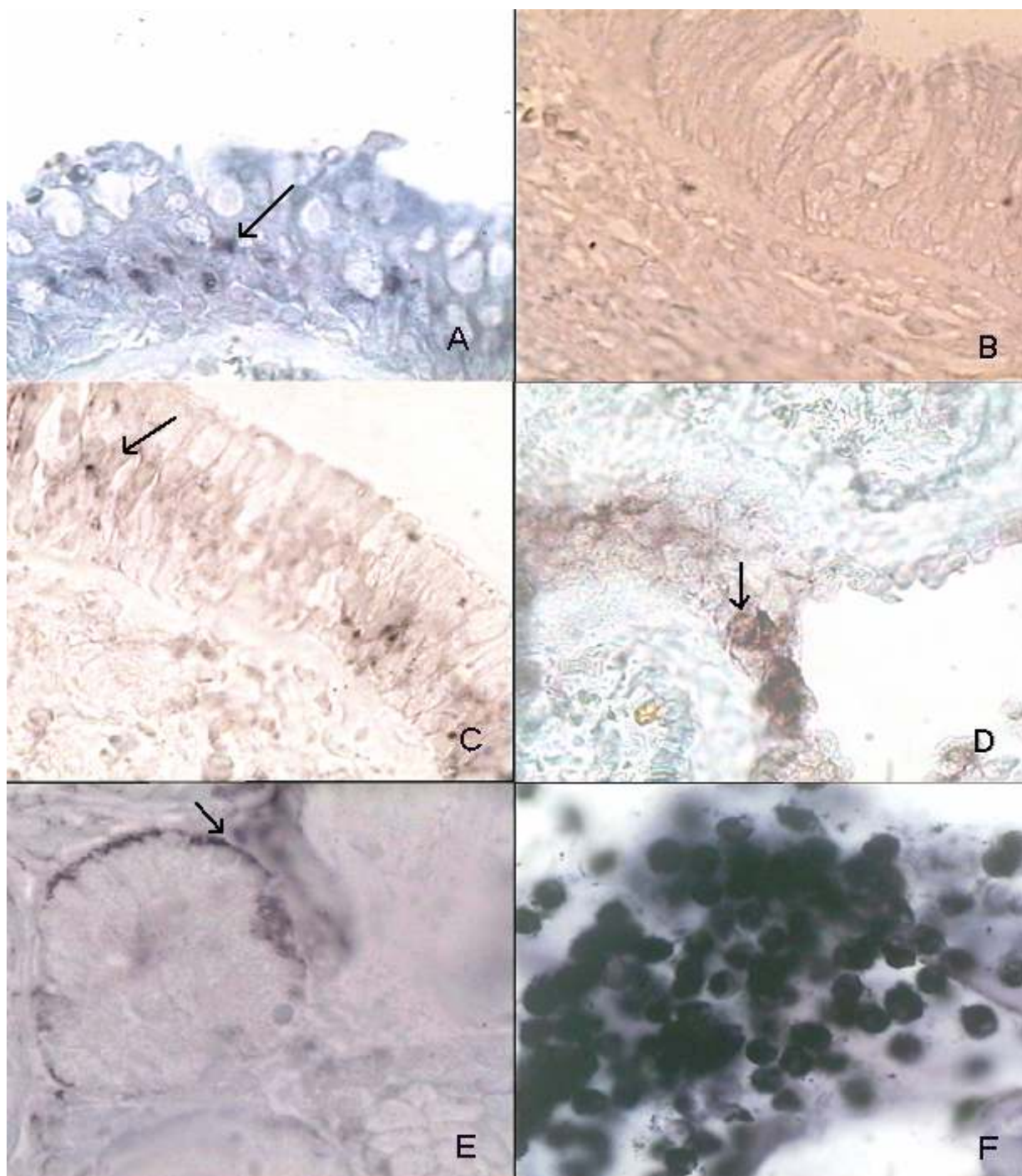
Tomografię komputerową obrazującą zatoki oboczne nosa wykonano u 12 osób. We wszystkich CT wykazano obecność zmienionej śluzówki zatok i stan zapalny błony śluzowej zatok o różnym stopniu nasilenia, a badanie na obecność rynowirusów we wszystkich tych przypadkach było również pozytywne.

Obraz mikroskopowy zakażenia rynowirusem

Długotrwała i wieloetapowa procedura RT-PCR *in situ* naruszała strukturę skrawków, tkanek, co utrudniało ocenę zakażenia, identyfikację zakażonych komórek.

Rycina poniżej przedstawia przykładowe wyniki RT-PCR *in situ*.

Rycina 11. Obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzela, uzyskane za pomocą pośredniej RT-PCR *in situ*. Kolor purpurowy odpowiada miejscom z dodatnim wynikiem reakcji (strzałki). A,C,D- nabłonek oskrzeli, wynik dodatni, B-nabłonek oskrzeli, kontrola negatywna, E- okrągłe struktury widoczne podnabłonkowo, morfologicznie odpowiadające gruczołom, wynik pozytywny, F- limfocytopodobne komórki w okolicy wycinka błony śluzowej oskrzela, wynik silnie dodatni.



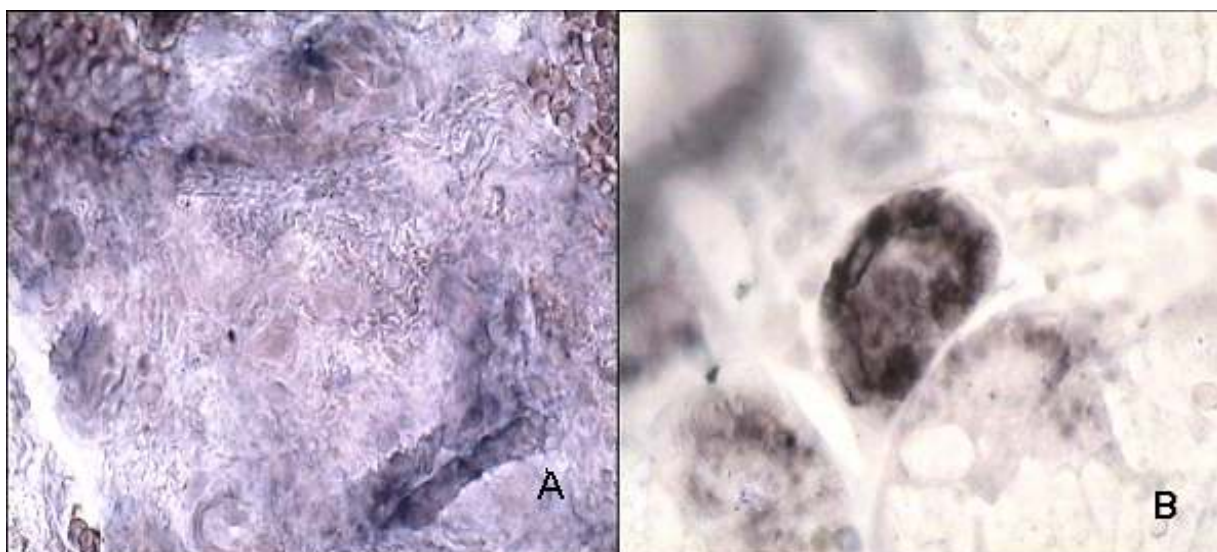
Spośród 60 biopsji ocenianych metodą *in situ* 31 uznano za dodatnie. W trzynastu biopsjach odnaleziono swoście zabarwione komórki w obrębie nabłonka dróg oddechowych. W jednej z nich dodatnie komórki stwierdzono wyłącznie poza nabłonkiem, a w kolejnych trzech zakażenie HRV w nabłonku uznano za prawdopodobne. Stwierdzenie obecności rynowirusa w obrębie epitelium nie było możliwe w pozostałych 14 wycinkach z powodu uszkodzenia tkanek. We wszystkich biopsjach uznanych za dodatnie, w których jakość obrazów pozwalała na ocenę struktur podnabłonkowych (20 biopsji), stwierdzono HRV-dodatnie komórki w tym obszarze.

Powtarzającymi się obrazami zakażenia były: ogniskowe skupienia barwnika, odpowiadające pojedynczym komórkom, jak również obecność barwnika w obrębie okrągłych struktur, przypominających morfologią gruczoły zewnątrzwydzielnicze. Zakażenie tych okrągłych struktur stwierdzono w 11 biopsjach. W 2 innych wycinkach dodatnie komórki odnaleziono w rozmazie wynaczynionej krwi. W jednej biopsji widoczne były niewielkie skupienia luźno związanych ze sobą, silnie HRV-dodatnich komórek znajdujących się poza błoną śluzową, które przypominały limfocyty (ryc. 11.F).

W niektórych wycinkach miejsca zakażenia były wyraźnie odgraniczone od pozostałych, ujemnych obszarów. W innych biopsjach większość komórek wydawała się pozytywna i nie obserwowano opisanych wyżej wyraźnych granic. Były one jednak bez wątpienia HRV-pozytywne, gdy porównano je z kontrolą negatywną. Opierając się na wynikach RT-PCR *in situ* rozróznilo dwa rodzaje zakażenia HRV: „ogniskowe” lub „rozlane”.

Poniższa rycina przedstawia obydwa opisane wyżej typy zakażenia.

Rycina 12. Przykładowe obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzela, uzyskane za pomocą pośredniej RT-PCR *in situ*. A - obraz zakażenia opisywany jako „rozlany”, B – typ „ogniskowy”.



Porównano charakterystykę kliniczną i wyniki badań laboratoryjnych tak wyróżnionych grup.

Nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami w zakresie takich zmiennych, jak: wiek, płeć, rozpoznanie (astma, kontrola, POChP, astma aspirynowa), czas trwania i ciężkość astmy oskrzelowej, palenie papierosów, leczenie glikokortykosteroidami wziewnymi, jak i doustnymi, dawka glikokortykosteroidów wziewnych, obecność atopii, wynik próby aspirynowej, testów skórnych. W badaniach krwi obwodowej nie stwierdzono różnic w poziomie całkowitego IgE, leukocytozy obwodowej. Natomiast osoby z „ogniskowym” obrazem zakażenia (łącznie: chorzy na astmę, POChP, grupa kontrolna) miały znamienne niższą eozynofilię krwi obwodowej niż osoby z zakażeniem „rozlanym” (U Mann-Whitney, $p=0,004$).

Średnia eozynofilia krwi obwodowej w grupach z „ogniskowym” oraz „rozlanym” zakażeniem wynosi odpowiednio: 193 ± 297 oraz 629 ± 334 . Różnice te były nadal znamienne statystycznie, gdy uwzględniono w analizie wyłącznie chorych na astmę oskrzelową ($p=0,007$).

Istniała również znamienne statystycznie zależność pomiędzy limfocytozą krwi obwodowej a obrazem zakażenia w dolnych drogach oddechowych. Osoby z „ogniskowym” typem zakażenia miały znamienne niższy poziom limfocytów we krwi w porównaniu z osobami z typem „rozlanym” (U Mann-Whitney, $p=0,025$). Średnia limfocytoza krwi u

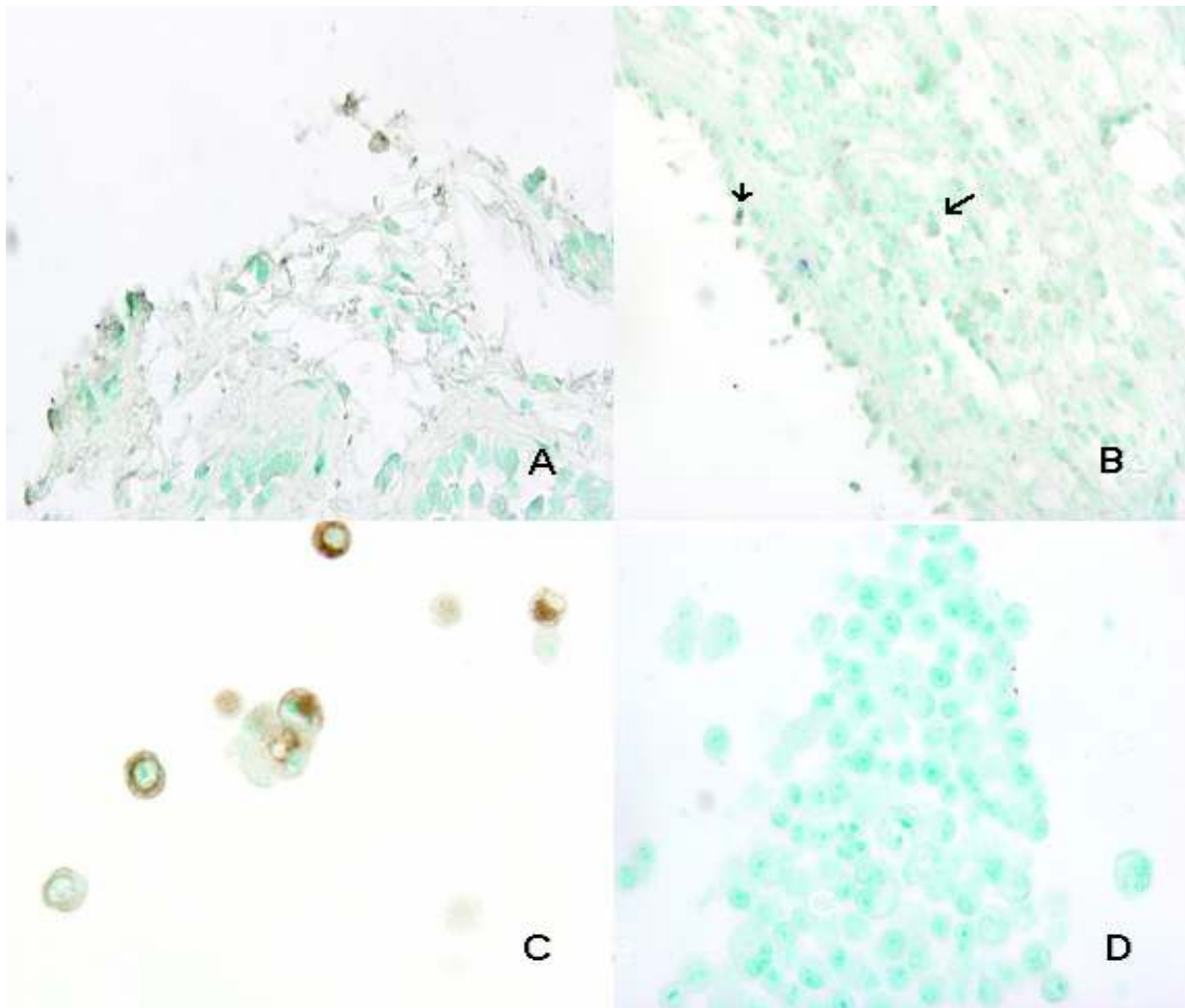
chorych „ogniskowym” zakażeniem w dolnych drogach oddechowych wynosiła 1498 kom/ul, natomiast u chorych z „rozlanym” zakażeniem – 2057 kom/ul. Gdy uwzględniono wyłącznie chorych na astmę oskrzelową, stwierdzono również znamienne różnicę limfocytozy bezwzględnej (U Mann-Whitney, $p=0,03$). Nie stwierdzono różnic w liczbach granulocytów we krwi obwodowej.

Porównano obraz odsetkowy, jak i bezwzględne wartości leukocytów w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych. Grupy z „ogniskowym” i „rozlanym” obrazem zakażenia nie różniły się między sobą w liczbie komórek zapalnych, przypadających na jednostkę objętości płynu, jak również odsetku makrofagów, granulocytów, limfocytów, czy stosunku limfocytów CD4 do CD8. Natomiast stwierdzono znamienne różnice w odsetku eozynofiliów (U Mann-Whitney, $p=0,01$) i liczbie eozynofiliów przypadających na jednostkę objętości (U Mann-Whitney, $p=0,024$). Brak danych uniemożliwił wykonanie analizy statystycznej w grupach POChP oraz kontrolnej. Odsetek eozynofiliów wśród osób z „ogniskowym” zakażeniem w dolnych drogach oddechowych wynosi 0% natomiast w grupie z „rozlanym” zakażeniem – 6 ± 9 . Nie stwierdzono znamienych różnic pomiędzy tymi grupami w wydolności wentylacyjnej układu oddechowego, mierzonej spirograficznymi testami czynnościowymi płuc.

Obraz histopatologiczny zakażenia HRV uzyskany za pomocą immunohistochemii różnił się od obrazów, uzyskanych metodą RT-PCR *in situ* przede wszystkim nasileniem reakcji barwnej, a także liczbą dodatnich komórek w preparacie. Badanie tą metodą wykonano u 20 pacjentów.

Poniżej przedstawiono obrazy uzyskane tą metodą.

Rycina 13. Przykładowe obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzeli, uzyskane za pomocą pośredniej immunohistochemii. A, B - pojedyncze komórki, w których stwierdza się obecność antygeny rynowirusa (kolor brązowy); C - kontrola pozytywna; zakażone HRV 16 komórki linii Hela, D - kontrola negatywna; komórki Hela niezakażone.



Za pomocą metody immunohistochemicznej uwidoczniono w wycinkach oskrzeli tylko pojedyncze HRV-dodatnie komórki. Niewielkie nasilenie reakcji prowadziło do rozbieżności w ocenach i wymagało ustalania wspólnego stanowiska przez dwóch niezależnych badaczy. W nielicznych biopsjach nasilenie reakcji barwnej było tak niewielkie, że nie pozwalało uznać wyników za pozytywne, barwienie uznano za nieswoiste, a biopsje za ujemne.

W 8 przypadkach dwukrotnie przeprowadzona reakcja IHC w tych samych wycinkach prowadziła do sprzecznych wyników. Po kolejnym powtórzeniu procedury, ostatecznie wszystkie powyższe wycinki uznano za dodatnie.

Komórki pozytywne stwierdzano najczęściej w nabłonku dróg oddechowych, lecz także jako luźno związane lub niezwiązane z warstwą nabłonka, w świetle oskrzeli (ryc. 15; A, B). Obserwowano także pojedyncze komórki dodatnie w warstwach podnabłonkowych. Nie uwidoczniło się zajęć gruczołów podnabłonkowych w żadnej z ocenianych tą metodą biopsji.

Z uwagi na niewielkie nasilenie reakcji barwnej w badaniu immunohistochemicznym (pojedyncze komórki wyraźnie pozytywne), dokładniejsza analiza obrazu zakażenia rynowirusami, a w tym podział na zakażenia „ogniskowe” i „rozlane” w sposób analogiczny do RT-PCR *in situ* nie był możliwy.

Obecność rynowirusów u chorych na POChP

Grupa chorych z POChP znamienne różniła się wiekiem w porównaniu z chorymi na astmę oskrzelową (U Mann-Whitney, $p=0,0001$). Osoby te częściej paliły papierosy w porównaniu do astmatyków (71%, test Fishera $p=0,0049$). Wśród siedmiu badanych nie było żadnej kobiety. Chorzy z POChP mieli istotnie niższe wartości FEV_1 (wyrażone jako procent wartości należnych) oraz stosunek FEV_1 do FVC w porównaniu do grupy kontrolnej. Pomimo małej liczebności, stwierdzono więcej granulocytów i mniej limfocytów we krwi obwodowej w porównaniu do grupy kontrolnej, wyrażonych jako wartości bezwzględne, jak i odsetkowe (U Mann-Whitney, $p<0,05$).

Wśród 7 osób, które były operowane z powodu obwodowego guza płuca i spełniały kryteria rozpoznania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, RNA rynowirusa wykryto u 5 osób, co stanowi 71% badanych w tej grupie. Różnica częstości wykrywania RNA rynowirusa w dolnych drogach oddechowych pomiędzy chorymi na POChP, a grupą kontrolną jest znamienna statystycznie (test Fishera, $p=0,026$).

Na podstawie analiz wykonanych w tej grupie, stwierdzono istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy nasileniem eozynofilii bezwzględnej krwi obwodowej a zakażeniem wyrażonym w 6-stopniowej skali (tau Kendall, $\tau=1$, $p=0,0415$). Nie stwierdzono innych znamiennych związków pomiędzy parametrami klinicznymi, charakteryzującymi chorych na POChP a wynikiem RT-PCR *in situ*. Niewielka liczebność tej grupy może odpowiadać za brak obserwowanych różnic.

Analiza podobieństwa sekwencji sondy hybrydizacyjnej do serotypów HRV

Na podstawie analizy bazy danych udostępnionej w programie BLAST odnaleziono 70 sekwencji o istotnym podobieństwie do sekwencji sondy hybrydizacyjnej. Wszystkie odnalezione, z wyjątkiem jednej (małpi pikornawirus), odpowiadają ludzkim rynowirusom.

Sonda wykazała największe podobieństwo do serotypu 24 (90% homologii). W tabeli poniżej przedstawiono wyniki przeszukiwania bazy BLAST.

Tabela 9. Wyniki przeszukiwania bazy BLAST, odnalezione sekwencje wykazujące podobieństwo do zastosowanej w metodzie RT-PCR *in situ* sondy genetycznej.

Nazwa rynowirusa	Punkty za zgodność	Odcinek porównywanej sekwencji sondy	Prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności	Procent homologii Sekwencji
HRV 24	699	100%	0.0	90%
HRV 44	483	99%	4e-133	83%
HRV 94	459	98%	7e-126	82%
HRV 55	453	99%	3e-124	82%
HRV A	453	99%	3e-124	82%
HRV izolat NAT046	451	98%	1e-123	82%
HRV 38	444	100%	2e-121	81%
HRV izolat NAT051	440	92%	3e-120	82%
HRV 28	436	99%	3e-119	81%
HRV 10	407	98%	3e-110	81%
HRV 16	390	98%	3e-105	80%
HRV izolat NAT065	381	83%	2e-102	82%
HRV 2	379	100%	6e-102	79%
HRV izolat NAT008	372	81%	1e-99	82%
HRV 50	366	78%	5e-98	82%
HRV 12	364	99%	2e-97	79%
HRV 82	324	77%	3e-85	80%
HRV izolat NAT009	320	79%	4e-84	80%
HRV szczep QPID03-0002	318	61%	1e-83	84%
HRV izolat NAT040	294	79%	2e-76	79%
HRV 81	270	60%	4e-69	81%
HRV szczep QPID03-0009	257	61%	3e-65	80%
A HRV isolate 6939sep95	254	60%	4e-64	80%
HRV szczep QPID03-0005	250	61%	5e-63	80%

Nazwa rynowirusa	Punkty za zgodność	Odcinek porównywanej sekwencji sondy	Prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności	Procent homologii Sekwencji
HRV szczep QPID03-0007	250	60%	5e-63	81%
A HRV isolate 7160nov95	248	60%	2e-62	80%
A HRV isolate 237aug96	248	60%	2e-62	80%
HRV 80	222	60%	1e-54	79%
HRV 85	215	33%	2e-52	88%
HRV 68	126	14%	9e-26	95%
HRV 20	124	14%	3e-25	95%
HRV 90	122	13%	1e-24	96%
HRV 66	111	14%	2e-21	92%
HRV 9	108	15%	3e-20	91%
HRV izolat NAT001	106	21%	1e-19	84%
HRV 33	104	13%	4e-19	91%
HRV 32	102	11%	1e-18	96%
HRV 77	99.0	13%	2e-17	91%
HRV 61	97.1	14%	7e-17	89%
HRV 56	97.1	13%	7e-17	90%
HRV 98	91.6	11%	3e-15	93%
HRV 67	89.8	11%	1e-14	93%
HRV 54	91.6	11%	3e-15	93%
HRV C szczep 026	89.8	21%	1e-14	81%
HRV 96	78.7	11%	2e-11	90%
Simian picornavirus 17	58.4	5%	3e-05	100%

V. Dyskusja

Porównanie częstości wykrywania rynowirusów w badanych grupach

W przedstawionym powyżej opracowaniu zastosowano dwie różne metody wykrywania rynowirusów w dolnych drogach oddechowych. RNA rynowirusów poszukiwano metodą RT-PCR *in situ*. Oceniono biopsje pobrane od 30 astmatyków i 23 osób nie chorujących na astmę. Białek kapsydu wirusa poszukiwano natomiast metodą immunohistochemii pośredniej. Za pomocą IHC zbadano wycinki pobrane od 14 osób chorych na astmę i 6 osób z grupy kontrolnej. Rynowirusy wykazano u: 73% astmatyków i 22% osób z grupy kontrolnej metodą RT-PCR *in situ* oraz, odpowiednio u 64% i 33% metodą immunohistochemiczną. Uzyskano znamiennej statystycznie różnicę wyników pomiędzy grupami w przypadku metody RT-PCR *in situ*.

Odsetki wyników HRV-dodatnich są zaskakująco wysokie, wyższe niż odnalezione w literaturze. Podobieństwo wyników uzyskanych dwiema niezależnymi metodami, wydaje się zwiększać ich wiarygodność.

W odróżnieniu do prezentowanego powyżej badania, przeważająca większość odnalezionych informacji w literaturze odnosi się do oceny efektów zakażeń HRV w zaostrzeniach, a nie w okresach dobrej kontroli astmy. Odnaleziono niewiele badań oceniających obecność rynowirusów w drogach oddechowych osób zdrowych lub w stabilnym okresie choroby (3, 46, 84, 82, 83, 133, 134). Również metodyka odnalezionych badań różni się od opisanego powyżej. Nie odnaleziono żadnych informacji dotyczących zastosowania metody RT-PCR *in situ* w celu wykrywania pikornawirusów w dolnych drogach oddechowych. Opisane różnice ograniczają możliwość dokonywania porównań prezentowanych wyników do danych z piśmiennictwa.

Oszacowana na podstawie danych z literatury częstość zakażeń HRV w astmie zaostrzonej waha się w szerokim zakresie, pomiędzy 11 a 80%, a częstość wykrywania rynowirusa u bezobjawowych astmatyków wynosi od kilku do kilkunastu procent. (3, 83, 135, 136). W starszych badaniach epidemiologicznych rynowirusa wykrywano tylko u 1,5 do 4 % bezobjawowych, dorosłych astmatyków, a odsetek ten był wyższy w przypadku dzieci. (3, 82, 83) Wyniki najnowszych badań wskazują, że rynowirusy mogą być obecne w drogach oddechowych znacznie częściej. Johnston w badaniu prospektywnym wykrył RNA

rynowirusa w płucach z nosa metodą RT-PCR u 12% dzieci z astmą oskrzelową bez objawów klinicznych. (83) Obecność rynowirusów w okresie bezobjawowym potwierdza badanie Harju i współpracowników. Populacją badaną w tym przypadku było 103 astmatyków w stabilnym okresie choroby i 30 zdrowych osób. (134) Rynowirusy odnaleziono w indukowanej płwocinie u blisko 10% astmatyków z łagodną i 16% z umiarkowaną postacią choroby. Zastosowano w tym wypadku metodę izolacji w hodowlach komórkowych, a następnie RT-PCR i hybrydyzację. Marin i współpracownicy stwierdzili natomiast obecność rynowirusa aż u 32% dzieci z astmą oskrzelową w okresie wolnym od objawów. (18) W badaniu Corne'a obecność HRV w płucach z nosa występowała łącznie z objawami klinicznymi tylko u 20-60% badanych. (77) Kirchberger potwierdza, że bezobjawowe zakażenia HRV mogą występować aż w 40% zachorowań. (10) W przedstawionej pracy odsetek wyników dodatnich, uzyskanych metodą RT-PCR *in situ* wynosi ponad 70%.

Na obserwowane duże różnice w częstości wykrywania HRV u chorych na astmę może mieć wpływ metodyka badań, jak: charakterystyka badanych populacji, sposób rekrutacji pacjentów, czas od wystąpienia objawów, rodzaj, sposób pobierania i przechowywania materiału do badań. Wydaje się, że czułość i swoistość stosowanych metod diagnostycznych może znamienne wpływać na uzyskane wyniki. (3, 83)

Starsze metody izolacji HRV w hodowlach komórkowych wydają się być bardziej zawodne w porównaniu do metod molekularnych (RT-PCR), co może powodować heterogenność wyników badań. (135) Teichtal i współpracownicy za pomocą metod serologicznych oraz hodowli wirusów w liniach komórkowych wykrywali rynowirusy w zaostrzeniach astmy tylko u 11% badanych. (135) Natomiast Johnston, stosując bardziej czułą PCR, stwierdzał rynowirusy aż w 50% przypadkach zaostrzeń choroby. (83)

Zakres niniejszej pracy nie umożliwił obiektywnej oceny czułości stosowanych metod (RT-PCR *in situ* i immunohistochemii pośredniej), ponieważ nie porównano wyników do innej, wystandaryzowanej metody. Niewiele także odnaleziono badań porównujących czułość wykrywania rynowirusów metodami *in situ* z innymi, referencyjnymi testami. (45, 93) Nie opublikowano jak dotychczas badań, które porównywałyby metodę RT-PCR *in situ* z innymi metodami. Pitkaranta i współpracownicy przedstawili wyniki badania wskazujące, że w przypadku rynowirusów hybrydyzacja *in situ* może być metodą czulszą od PCR. (45) W przypadku reakcji immunohistochemicznej z zastosowaniem przeciwciała RV16-7, otrzymanym dzięki uprzejmości prof. W. Busse, wyniki poprzednio przeprowadzonych w tamtejszym ośrodku badań sugerują, że czułość metody można porównywać do real-time

PCR. (47) Wydaje się, że zastosowanie PCR z hybrydyzacją *in situ* zwiększa swoistość testu. (52, 54)

Wysoki odsetek wyników HRV-pozytywnych stwierdzony za pomocą RT-PCR *in situ* u bezobjawowych osób, sugeruje utajone lub przewlekłe zakażenie lub proces przedłużonej eliminacji wirusa po ostrym zakażeniu. (5, 16, 133, 134) Jak dotąd nie jest w pełni jasne, czy osoby bez objawów klinicznych mogą być „nosicielami” rynowirusa w drogach oddechowych. (82) Tradycyjnie uważa się, że bezobjawowe zakażenia HRV są raczej rzadkie. (82, 84)

W prezentowanym badaniu jednym z kryteriów wyłączenia było wystąpienie przeziębienia w okresie trzech tygodni poprzedzających badanie. Taki dobór pacjentów miał na celu wykluczyć z badania osoby, u których wynik RT-PCR *in situ* mógłby odzwierciedlać niedawno przebyte zakażenie. Kierowano się w tym przypadku powszechnie przyjętym przekonaniem, że objawowe zakażenie HRV trwa najczęściej do tygodnia oraz, że usuwanie rynowirusa z nosa po eksperymentalnym zakażeniu może trwać do 3 tygodni. (45, 46, 55, 84)

Zdolność do zakażenia/kolonizacji dróg oddechowych przez rynowirusy w okresie wolnym od objawów potwierdzają wyniki niektórych badań. Suvilehto i współpracownicy metodą hybrydyzacji *in situ* oraz PCR wykryli HRV w migdałkach aż u 60% bezobjawowych dzieci. Populacją badaną były dzieci z nawracającymi lub przewlekłymi zapaleniami migdałków. Jednym z kryteriów wyłączenia z badania były objawy ostrego zakażenia. (5) W innym badaniu poszukiwano HRV u dzieci z nawracającymi infekcjami ucha środkowego. Rynowirusy wykazano metodą RT-PCR u 10-30% dzieci w ciągu 24 tygodni obserwacji. Nie wykazano korelacji pomiędzy obecnością objawów klinicznych zapalenia ucha środkowego i wykrywaniem rynowirusów. (46) Opisano również częste występowanie rynowirusa u osób z przewlekłym zapaleniem zatok obocznych nosa (21% badanych). (137)

Wyniki najnowszych badań potwierdzają możliwość przetrwania rynowirusów po ostrym zakażeniu, zaostrzeniu astmy oskrzelowej. Jarri i współpracownicy wykazali, że po 2 tygodniach od zaostrzenia, w okresie już bezobjawowym RNA rynowirusa nadal było obecne aż u 50% dzieci. Po takim samym czasie zaledwie 3% dzieci z rozpoznanymi zakażeniami enterowirusami miało nadal enterowirusy w nosie. (84) Kling i współpracownicy wykrywali RNA rynowirusów w górnych drogach oddechowych w czasie zaostrzenia u ponad 80% dzieci z ciężką astmą, aż 44% dzieci miało rynowirusy po 6 tygodniach, a 25% - po 6 miesiącach. (16)

Nie można wykluczyć, że przyczyną obserwowanego wysokiego odsetka wyników HRV-dodatnich jest ostre zakażenie w stadium eliminacji wirusa lub we wczesnym okresie przed

rozwojem objawów klinicznych. (5, 16, 44, 133) Metodyka przedstawianej powyżej pracy uniemożliwia jednoznaczne wyjaśnienie czy obserwowany wysoki odsetek zakażeń HRV jest wynikiem przewlekłego zakażenia. Jednoznaczne rozróżnienie ostrego zakażenia od przewlekłego lub nosicielstwa wymaga przeprowadzenia badań prospektywnych z wielokrotnym badaniem tych samych chorych i molekularną analizą genomu wyizolowanych szczepów wirusa. (46) Ostatnio opublikowano pracę, która potwierdza możliwość przewlekłego zakażenia HRV u osób z niedoborami odporności. Za pomocą analizy sekwencji odcinka niekodującego 5'NCR potwierdzono, że w kolejnych próbkach pobranych od 3 osób po przeszczepie płuc i z objawami klinicznymi, obecny jest ten sam szczep HRV przez co najmniej 12 miesięcy. (138)

Częstsze występowanie rynowirusów w oskrzelach astmatyków w porównaniu z osobami nie chorującymi na astmę może być to wynikiem większej podatności tej grupy na zakażenia. Nie ustalono jednak jak dotąd jednoznacznej opinii ekspertów co do podatności astmatyków na zakażenia HRV. (7, 11, 47, 76) Pewne wnioski nasuwają wyniki badania Corne'a. (77) Obserwował on 76 par wspólnie mieszkających, w każdej parze jedna osoba była chora na astmę. Chociaż nie stwierdzono różnic w częstości wykrywania rynowirusów w nosie oraz w nasileniu objawów ze strony górnych dróg oddechowych podczas zakażenia, autorzy odnotowali statystycznie istotną zwiększoną częstość, natężenie, jak i dłuższe trwanie objawów ze strony dolnych dróg oddechowych u astmatyków. (77) Opisane różnice między astmatykami i osobami zdrowymi można tłumaczyć większą podatnością na zakażenia, lecz także nadmierną reakcją organizmu na zakażenie, na które w rzeczywistości astmatycy nie są bardziej podatni. Harju opisał częstsze występowanie rynowirusów w okresie wolnym od objawów zakażenia u astmatyków (12,6%) niż osób zdrowych (6,7%), jednak wyniki również nie uzyskały znamienności statystycznej (10-16% vs 7%). (134) W innym opublikowanym badaniu porównywano częstość wykrywania RNA i białek kapsydu rynowirusa w górnych i dolnych drogach oddechowych podczas eksperymentalnych zakażeń u trzynastu chorych na astmę atopową i sześciu zdrowych ochotników. Nie wykazano różnic między grupami w częstości wykrywania HRV. Niemniej ich brak może wynikać z niewielkiej liczebności populacji. (47)

Jest prawdopodobne, że pewien „defekt” występujący u astmatyków może upośledzać usuwanie wirusa po etapie ostrego zakażenia, lub ułatwiać kolonizację dróg oddechowych przez HRV. Taka kolonizacja oskrzeli u astmatyków w następstwie zwiększonej podatności na zakażenie lub upośledzonej eliminacji wirusa mogłaby przewlekle pobudzać układ

immunologiczny i ułatwiać wystąpienie stanu przewlekłego zakażenia, w którym utrzymują się procesy niszczenia, przebudowy i zapalenia na względnie stałym poziomie. (127)

Uszkodzenie nabłonka obserwowane u chorych na astmę może ułatwiać przetrwanie rynowirusów w oskrzelach. (26) Utrata tej warstwy upośledza mechaniczne usuwanie cząsteczek wirusa, jak również wrodzone mechanizmy obrony przeciwwirusowej, jakimi dysponuje nabłonek. Ułatwia to wnikanie wirusa do komórek i może opóźnić proces jego eliminacji. W następstwie uszkodzenia odsłonięciu ulegają głębsze warstwy błony śluzowej, które są najbardziej podatne na zakażenie. Komórki bardziej morfologicznie zróżnicowane (czyli położone na powierzchni warstwy nabłonka i ulegające najłatwiej zniszczeniu) są bowiem mniej wrażliwe na zakażenie HRV w porównaniu do komórek przypodstawnych. (139) Wrażliwość na zakażenie wzrasta wraz z utratą ścisłych połączeń międzykomórkowych w uszkodzonym nabłonku. (139) Ponadto u astmatyków obserwuje się zwiększoną ekspresję cząsteczek przylegania międzykomórkowego ICAM-1, co może ułatwiać wnikanie większości HRV do cytoplazmy. (139, 140).

Tradycyjnie atopową astmę oskrzelową rozpatruje się jako zaburzenie równowagi odpowiedzi komórkowych Th_2 i Th_1 z relatywną przewagą odpowiedzi Th_2 i nadmiarem cytokin typu Th_2 (IL-4, IL-5, IL-13) nad cytokinami typu Th_1 (IFN γ , IL-12). (13, 28) Antygeny wirusów pobudzają głównie odpowiedź immunologiczną typu Th_1 i nasilają produkcję IL-12 i IFN- γ . Sugerowano, że zaburzenie tej równowagi u chorych na astmę może mieć związek z większą podatnością na zakażenia.

Obserwowane zaburzenia mogą także wynikać z nieprawidłowego „dojrzewania” układu immunologicznego we wczesnym okresie życia, na przykład w wyniku zmniejszonej ekspozycji na zakażenia. (7)

Nie wykluczone, że nie nadmiar cytokin typu Th_2 , lecz niedobór odpowiedzi Th_1 ma związek z nieprawidłową reakcją na zakażenie. (78) Wykazano bowiem, że monocyty krwi obwodowej, pobrane od chorych na astmę, wykazują zmniejszoną produkcję IFN- γ i IL-12 po ekspozycji na HRV. (78) Stosunek indukowanego poziomu interferonu γ do interleukiny 5, opisującego równowagę Th_1/Th_2 , koreluje z FEV $_1$. (142) Im wyższy opisywany stosunek cytokin w indukowanej płwocinie, tym mniejsze są objawy zakażenia i szybsza eliminacja rynowirusa. (143) Defekt produkcji IFN- γ opisano już u niemowląt. U tych, u których nie obserwowano uwalniania IFN- γ w odpowiedzi na zakażenie HRV, występowały częściej epizody świszczącego oddechu w pierwszym roku życia. (9) Niedobór interferonu γ u osób z ciężką postacią astmy potwierdzają wyniki badania kohortowego z 42-letnim okresem obserwacji. (144)

Zaburzenie może dotyczyć nie tylko IFN- γ , opisywano także lokalny niedobór IFN- α/β i interferonów typu III (IFN $\lambda 1$; IFN $\lambda 2/3$) w komórkach nabłonka dróg oddechowych chorych na astmę. (6) Niedobór nie zależy od podawania kortykosteroidów, czym można tłumaczyć brak ich skuteczności w objawach astmy powodowanych HRV. (7)

Nieprawidłowe uwalnianie interferonów może wynikać z upośledzenia szlaków regulujących ich produkcję w odpowiedzi na zakażenie. Wydzielanie interferonów typu I zależy między innymi od pobudzenia przez wirusy takich białek, jak: TLR-3, TLR-7/8, kinazy białkowej RNA-zależnej (PKR), czy RNA-helikaz, jak RIG-I; MDA-5. (7, 145, 146, 147) Receptory TLR aktywują szereg białek adaptorowych, jak: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, SARM. Za pośrednictwem białek IRAK 1/4 (kinazy związane z receptorem dla interleukiny-1), TRAF 3/6, IKK, OPN, TBK1, kinazy MAPK, dochodzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych IRF, AP-1, czy NF κ B. Kinaza fosfatydyloinzytolu 3 aktywuje czynnik IRF-3. Cytoplazmatycznymi adaptorami dwuniciowych fragmentów RNA są helikazy RIG-I, MDA-5. Poprzez interakcje z białkiem IPS-1, aktywują czynnik TRAF 3, kinazy TBK1/IKK, co prowadzi do fosforylacji czynników IRF. Innymi szlakami są: oddziaływanie IPS-1 z FADD, kaspazami 8 i 10 (białkami uczestniczącymi w procesach apoptozy) i aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF κ B, lub aktywacja czynnika transkrypcyjnego AP-1 poprzez kinazy MAPK. (7, 145, 147, 148) Nieprawidłowa ekspresja któregośkolwiek z tych przekaźników może odpowiadać za niedobór interferonów, obserwowany u chorych na astmę. (7)

Zaburzenie procesu apoptozy, opisywane u chorych na astmę, również może ułatwiać zakażenia wirusami. Apoptoza, która jest mechanizmem wrodzonej odporności, zapewnia eliminację zakażonych wirusem komórek, zapobiegając ich lizie i niekontrolowanemu uwalnianiu do środowiska nowych cząsteczek wirusa. (6, 105). Zaobserwowano, że podczas zakażenia HRV nabłonek oddechowy astmatyków w mniejszym stopniu ulega apoptozie niż u osób zdrowych, a w hodowlach komórek pobranych od chorych stwierdza się nadmierną replikację wirusa. (5, 6, 7)

Nie wykluczone, że zaburzenie produkcji innych niż interferony czynników w astmie oskrzelowej może ułatwiać zakażenie lub zwiększać potencjał proliferacyjny wirusa. (80) Wykazano, że komórki nabłonka po kontakcie z nadsączem zebrany z hodowli zakażonych HRV produkują mniejszą ilość czynników prozapalnych oraz gorzej usuwają wirusa. (50)

Równowagę immunologiczną kontrolują komórki regulatorowe. Wynikiem ich dysfunkcji w astmie oskrzelowej mogłaby być nadmierna produkcja cytokin typu Th₂ (IL-4, IL-5, IL-13). (149) Pobudzone komórki regulatorowe, poprzez nieswoiste hamowanie odpowiedzi na

niektóre patogeny osłabiają mechanizmy obronne organizmu. (97, 113) Uwalniane przez nie cytokiny o właściwościach immunosupresyjnych: IL-10, TGF- β ułatwiają przetrwanie wirusów w określonych warunkach.

Innym proponowanym zaburzeniem zwiększającym podatność astmatyków na zakażenia jest pierwotna dysproporcja pomiędzy czynnikami prozapalnymi i hamującymi procesy zapalne. Obserwowano zwiększone stężenia interleukiny IL-1 β i zmniejszone poziomy rozpuszczalnego antagonisty receptora dla IL-1 u astmatyków, co może prowadzić do nadmiernej reakcji zapalnej w odpowiedzi na zakażenie. (150) Podczas zaostrzeń choroby spowodowanych przez HRV opisywano także zwiększoną ekspresję immunosupresyjnej interleukiny 10, co może osłabiać usuwanie wirusa z dróg oddechowych. (151)

Podsumowując, powyższe nieprawidłowości opisywane u osób chorych na astmę mogą zwiększać podatność na zakażenia, nasilać objawy ze strony dolnych dróg oddechowych lub nawet ułatwiać przetrwanie wirusów.

Przetrwanie wirusów w organizmie jest zjawiskiem dla nich ewolucyjnie korzystnym, gdyż umożliwia długotrwałą replikację. Zatem większość wirusów, jeśli nie wszystkie, wytworzyło na drodze ewolucji szereg mechanizmów obronnych, ułatwiających „ucieczkę” przed układem immunologicznym. Obejmują one rozmaite jego modyfikacje, mające na celu głównie hamowanie funkcji. Niewykluczone, że bezpośrednie działanie rynowirusa, w obecności pewnych nieznanych uwarunkowań, może prowadzić do jego przetrwania w oskrzelach i być może do zaburzenia równowagi immunologicznej w astmie oskrzelowej. (10, 113)

Jedną z cech ułatwiających „ucieczkę” przed układem immunologicznym jest zmienność antygenowa i genetyczna wirusa. Utrudnia ona rozpoznawanie patogenów przez komórki pamięci immunologicznej. Duża liczba serotypów HRV (ponad 100), łącznie z wysokim odsetkiem mutacji mogą częściowo tłumaczyć sukces rynowirusów. Wewnętrzna zmienność antygenowa nie tłumaczy jednak wszystkich zaburzeń immunologicznych podczas zakażeń HRV, jak na przykład zwiększonej wtórnie podatności na zakażenia bakteryjne. Wykazano bowiem, że HRV zwiększają przyleganie pneumokoków do komórek nabłonka dróg oddechowych, czy ułatwiają wnikanie gronkowca złocistego do pneumocytów. (152, 153)

Częste mutacje wirusów to skuteczny sposób wymykania się spod kontroli immunologicznej. Polimerazę RNA zależną od RNA cechuje niedokładność replikacji i duży odsetek mutacji. Ważną rolę przypisuje się powstawaniu cząstek defektywnych (krótkich fragmentów RNA, produktów nieprawidłowej transkrypcji przez polimerazę RNA). Cząstki defektywne replikują się wydajniej w stosunku do formy rodzicielskiej wirusa. Blokują one

składanie prawidłowych cząsteczek, zmniejszają efekt cytopatyczny, a w niektórych przypadkach ułatwiają przeżycie komórek gospodarza i ustalenie stanu przewlekłej infekcji. (90)

Zdolność do rozpoznawania ważnego immunologicznie receptora komórkowego jest kolejną strategią stosowaną przez wirusy. Receptorem tym dla większości rynowirusów jest cząsteczka ICAM-1. W organizmie ICAM-1 ułatwia wnikanie komórek układu immunologicznego z krwi do płuc, aktywuje komórki, pobudza produkcję cytokin prozapalnych. (97, 154, 155) Odgrywa również ważną rolę w patogenezie astmy. Jak wykazano w warunkach *in vitro* i *in vivo*, zakażenie rynowirusami dodatkowo nasila ekspresję tych cząsteczek. (139, 140, 156) Odbywa się to poprzez czynnik aktywujący transkrypcję NFκB. (140) Nasiloną przez HRV produkcja innych rozpuszczalnych cytokin, takich jak: interleukina 1α i interleukina 1β dodatkowo pobudza ekspresję ICAM-1. (157) Zwiększenie liczby receptora ICAM-1 ułatwia wnikanie wirusa do wnętrza komórek, lecz także osłabia mechanizmy obrony przeciwwirusowej. Przyłączenie rynowirusów do ICAM-1 na powierzchni komórek APC upośledza oddziaływanie z limfocytami T i ich aktywację. (10) Przyleganie HRV do fibroblastów zmniejsza adhezję do komórek T, a wiązanie ICAM-1 na powierzchni monocytów istotnie hamuje proliferację limfocytów T. (158, 159)

Budowa kapsydu rynowirusów teoretycznie umożliwia przyłączenie aż 60 cząsteczek ICAM-1 do jednej cząsteczki wirusa. Zmiany konformacyjne kanionów podczas wiązania receptora dodatkowo ułatwiają przyłączanie kolejnych cząsteczek. Właściwość ta tłumaczy proadhezyjny efekt HRV na leukocyty. Wykazano bowiem, że zakażenie HRV może powodować agregację monocytów lub komórek dendrytycznych, wywodzących się z monocytów. (10) Następstwem tego zjawiska mogłoby być wydłużenie czasu przebywania komórek APC w płucach i opóźnienie ich migracji do węzłów chłonnych. Może wydłużyć czas niezbędny do wytworzenia skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciw HRV. (10)

Wydaje się, że rynowirusy mogą także hamować wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej na zakażenie, poprzez upośledzenie produkcji interferonów. W niedawno opublikowanej pracy Peng i współpracownicy wykazali, że po zakażeniu HRV 14 nie obserwuje się homodimeryzacji czynnika transkrypcyjnego IRF-3 w komórkach nabłonka, co warunkuje jego aktywność. Wykazano także, że wcześniejsze zakażenie rynowirusem zmniejsza produkcję IFN-β przez komórki nabłonka oddechowego po ekspozycji na dwuniciowe fragmenty RNA. (160)

HRV może upośledzać odpowiedź immunologiczną na poziomie prezentacji antygeny. HRV 14 zmniejsza aktywność i proliferację limfocytów T za pośrednictwem cytokin

uwalnianych przez monocyty, zwłaszcza IL-10, o właściwościach immunomodulujących i immunosupresyjnych. (10) IL-10 zmniejsza także ekspresję cząsteczek MHC II, molekuł kostymulujących CD80, CD86, produkcję IL-12. Przeciwwzapalny efekt IL-10 jest następstwem hamowania produkcji cytokin prozapalnych, jak IL-1, IL-6, TNF- α . Powyższy profil cytokin może upośledzać lokalną odpowiedź immunologiczną w miejscach zakażenia HRV, ułatwiać zakażenie, jak i przetrwanie wirusa. (10, 161) Zaburzenie funkcji komórek dendrytycznych podczas zakażenia rynowirusem także upośledza prezentację antygenów, czy funkcje limfocytów T. Wykazano, że podczas zakażenia rynowirusem, wzrasta ekspresja cząsteczek B7-H1 (CD274) oraz sialoadhezyzny na komórkach dendrytycznych. Cząsteczka B7-H1 poprzez receptor PD-1 blokuje funkcje limfocytów T. Interakcja sialoadhezyzny z CD43 na limfocytach upośledza uzyskanie przez nie stanu pełnej aktywności. (10)

Wydaje się, że wiele mikroorganizmów powodujących przewlekłe zakażenia oddziałuje na komórki regulatorowe. (113) Następstwem ich dysfunkcji może być nadprodukcja IL-10 w odpowiedzi na zakażenie HRV. (113) Wyniki badań nad innym wirusem RNA, wirusem zapalenia wątroby typu C, potwierdzają udział komórek regulatorowych w rozwoju przewlekłego zakażenia. U osób z przewlekłym zakażeniem HCV obserwowano wyższe poziomy komórek CD4+25+ *in vivo*, w porównaniu do osób zdrowych oraz wyleczonych, a w badaniu *in vitro* mniejszą proliferację HCV-swoistych limfocytów cytotoksycznych i mniejszą produkcję przez nie IFN- γ . (162)

Wyniki prezentowanego badania wskazują na częstsze występowanie HRV w dolnych drogach oddechowych chorych na astmę w porównaniu z populacją kontrolną. Może to sugerować związek rynowirusa z patogenezą choroby. Holtzman i współpracownicy zwracają uwagę na kluczową rolę komórek nabłonka dróg oddechowych w mechanizmach zapalnych i obronnych w odpowiedzi na zakażenie HRV. Dowodzą, że zakażenie wirusem w obecności pewnych genetycznych predyspozycji i innych narażeń (alergeny) może trwale „przeprogramować” fenotyp tych komórek. (13, 14, 26) Poprzez produkcję molekuł adhezyjnych (ICAM-1) i czynników chemotaktycznych (RANTES) komórki nabłonka regulują lokalny napływ komórek zapalnych do dróg oddechowych oraz zapoczątkowują procesy immunologiczne i zapalne. Mechanizmy te podlegają regulacji przez szereg genów, których aktywność kontrolowana jest na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Podczas zakażenia wirusami zaobserwowano między innymi: zwiększoną lokalną aktywność chemokiny RANTES i podjednostki p40 IL-12, co wydaje się być wynikiem permanentnej aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT-1 i szlaków komórkowych, zależnych od interferonów. Zwiększona ekspresja genów może wynikać z wydłużonego okresu półtrwania

mRNA pod wpływem replikacji wirusa lub aktywacji transkrypcji przez wirusy. (163, 164) Podobna wzmożona aktywność wyżej wymienionych szlaków wewnątrzkomórkowych występuje w stabilnej astmie oskrzelowej, pomimo braku widocznych objawów zakażenia. (26, 164, 165) Być może po zakażeniu wirusem u astmatyków pozostają pewne cząstki wirusa, które nie są zdolne wywołać zakażenia, lecz mają zdolność do modyfikacji procesów immunologicznych. (164)

Pewne informacje dotyczące związku zakażeń wirusami z wystąpieniem astmy oskrzelowej przyniosły eksperymenty na myszach. Zakażenie paramyksowirusem (wirusem Sendai) powoduje dwa typy reakcji w dolnych drogach oddechowych u myszy. W czasie ostrej reakcji zapalnej aktywowane są geny zależne od interferonów, a zwiększona ekspresja ICAM-1 nasila napływ komórek zapalnych do oskrzeli. Obserwuje się nadreaktywność dróg oddechowych, która osiąga swoje maksimum po około 3 tygodniach, następnie objawy ustępują samoistnie. Ten typ reakcji przypomina zaostrzenie astmy oskrzelowej. Drugi typ reakcji charakteryzuje przetrwała nadreaktywność oskrzeli i obraz przebudowy ich ścian z przerostem komórek kubkowych nabłonka i nadprodukcją śluzu. Zmiany w oskrzelach przypominają te obserwowane w astmie przewlekłej. Proces nie zależy od ekspresji ICAM-1 na komórkach, czy obecności IFN- γ . (165) Wydaje się, że te dwa opisane typy reakcji występują niezależnie od siebie i podlegają innej kontroli genetycznej. (26) Jak pokazują wyniki eksperymentu, zakażenie wirusem może prowadzić do ujawnienia fenotypu astmy oskrzelowej, zarówno zaostrzenia choroby, jak i zmian obserwowanych w chorobie przewlekłej. Autorzy uważają, że przewlekły typ reakcji na zakażenie wirusem być następstwem zaburzeń genetycznie uwarunkowanych mechanizmów obronnych organizmu. (26) Wystąpienie zmian przypominających astmę przewlekłą po zakażeniu zależy prawdopodobnie nie tylko od genetycznych uwarunkowań gospodarza, lecz także od genomu wirusa. Autorzy sugerują, że zapalenie w astmie oskrzelowej nie tylko przypomina odpowiedź organizmu na zakażenie, lecz może być przez nie zapoczątkowane, lub nawet może być wynikiem lokalnego przetrwania wirusa. Chociaż w opisanym eksperymencie nie wykrywano wirusa po 10-12 dniach badania, to stosowano techniki o niskiej czułości, nieswoiste wobec zmutowanych form wirusa. (26)

W świetle ostatnich badań wirusy RNA, których replikację cechuje wysoki odsetek błędów, mogą przetrwać w tkankach jako formy zmutowane, niepełnowartościowe. Obecność takich form ułatwia przetrwanie niewielkiej liczby kopii wirusa, nie wykrywanej technikami molekularnymi, lecz wystarczającej do zaburzenia prawidłowej funkcji organizmu. (26, 90) Wydaje się więc prawdopodobne, że przetrwała obecność rynowirusów w drogach

oddechowych osób predysponowanych, mogłaby ujawnić fenotyp astmy. (10) Jak dotąd brak jest jednoznacznych dowodów na potwierdzenie tej hipotezy. Według drugiej hipotezy przetrwanie wirusa nie jest konieczne do wystąpienia przewlekłych zmian w oskrzelach. Zakłada ona, że przemijające zakażenie powoduje długotrwałe zaburzenia funkcji komórek (hipoteza „hit-and-run”). (13, 14, 26)

Wirusy mogą ujawniać fenotyp astmy oskrzelowej poprzez zaburzenie równowagi immunologicznej na korzyść Th₂. Pośrednio świadczą o tym wyniki badań, w których obserwowano synergistyczny efekt działania alergenów i HRV na objawy choroby. (72, 73) U alergików HRV nasila nadreaktywność oskrzeli na histaminę i alergen, jak również częstość reakcji typu późnego. (72) W czasie zakażenia obserwuje się zwiększone uwalnianie mediatorów reakcji alergicznej i zapalnej po prowokacji alergenem (histaminy, TNF- α). (73) Jak wykazano na modelu zwierzęcym, zakażenie innymi wirusem oddechowym, RSV, może prowadzić do produkcji swoistych przeciwciał klasy E i zwiększonej ekspresji ich receptorów. (166) Wiązanie antygenów wirusa przez znajdujące się na powierzchni uczulonych mastocytów swoiste IgE powoduje degranulację tych komórek, uwalnianie mediatorów i w następstwie obturację oskrzeli. Obecność swoistych IgE dla RSV po zakażeniu wirusem obserwowano także u ludzi. (167) Również profil cytokin, uwalnianych podczas zakażenia może zaburzać równowagę immunologiczną.

Zakażenie HRV działa cytotoksycznie na nabłonek dróg oddechowych i upośledza jego odnowę poprzez hamowanie proliferacji jego komórek. (80) Nasila zatem jeden z typowych objawów astmy oskrzelowej. Nabłonek astmatyków cechuje zwiększona wrażliwość na uszkodzenie, nadmierna aktywacja, upośledzone procesy naprawy i zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami wzrostu (EGF, TGF β), cytokinami. Nieprawidłowa proliferacja nabłonka skutkuje wydłużeniem okresu naprawy, zwiększonym uwalnianiem czynników profibrogennych i przebudową ściany oskrzela. Zakażenie HRV może nasilić uszkodzenie nabłonka i niewydolne procesy naprawy, również poprzez wpływ na migrację, proliferację i różnicowanie komórek, gromadzenie składników macierzy międzykomórkowej. (168)

Innym dowodem na udział wirusów w ujawnieniu fenotypu astmy oskrzelowej są badania Lo i współpracowników. Wykazali oni, że wirus RSV, wiązany głównie z patogenezą astmy oskrzelowej u dzieci, może upośledzać przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych, zależnych od interferonów typu I, za pomocą wirusowych niestrukturalnych białek NS1, NS2, co prowadzić może do ujawnienia niedoboru interferonów, opisywanego w astmie. (7, 169)

W grupie kontrolnej stwierdzono obecność RNA rynowirusów aż u 22%, a białek otoczki wirusa u 33% osób. Wyniki te są niespodziewanie wysokie, jednak odnaleziono niewiele

informacji w literaturze dotyczących bezobjawowych zakażeń HRV u osób zdrowych. Chociaż odsetek bezobjawowych zakażeń u zdrowych dorosłych wydaje się być niewielki (około 7%), to wysokie odsetki odnotował Rakes i współpracownicy w populacji dzieci. Wykryli oni rynowirusy w nosie w grupie kontrolnej aż u 41% dzieci poniżej 2 roku życia i 36% dzieci powyżej 2 roku życia. W innym badaniu pikornawirusy stwierdzono w górnych drogach oddechowych u 16% dzieci z grupy kontrolnej. (84, 134)

Kilka cech charakteryzujących badanych w obydwu grupach może wpływać na obserwowany wysoki odsetek uzyskanych wyników pozytywnych. Po pierwsze, w odróżnieniu od wyżej przytoczonych badań, w grupie kontrolnej znalazły się osoby, które nie były w pełni zdrowe. Wynikało to ze względów etycznych i metodyki badania. Większość miała chorobę nowotworową. W rozrostach nowotworowych opisywano osłabienie reaktywności immunologicznej, co może zwiększać ryzyko zakażeń w tej grupie chorych. Ghosh wykazał na przykład, że u 32% chorych w stanie mielospuresji i zakażonych rynowirusem stwierdza się objawy ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, często zakończonych zgonem. (65) W innym badaniu obecność HRV stwierdzono u 10% osób z nowotworami hematologicznymi i potwierdzonym radiologicznie zapaleniem płuc. (66) Przyczynami zwiększonej podatności na zakażenia w chorobach nowotworowych mogą być zaburzenia regulacji na poziomie genów. Nasilenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych, takich jak ICAM-1 może zwiększać podatność na zakażenie HRV. Nadmiar mediatorów immunosupresyjnych, jak interleukina 10, czy TGF- β także ułatwia przetrwanie wirusa. (97) W chorobach hematologicznych stwierdza się nieprawidłowe funkcje zmienionych leukocytów.

Kryterium włączenia do grupy kontrolnej był dobry stan ogólny, brak objawów wskazujących na uogólnienie choroby nowotworowej. Po uzyskaniu wyników oceny histopatologicznej i innych badań dodatkowych, grupę poddawano powtórnej weryfikacji. Operacja była radykalna u większości operowanych, a badania dodatkowe nie wskazywały na uogólnienie procesu (15 osób). Jednak 8 osób miało cechy uogólnienia choroby nowotworowej: operacja nie była radykalna, lub stwierdzono przerzuty odległe. Nie wykazano, aby osoby z cechami uogólnienia choroby częściej zapadały na zakażenia HRV. Niemniej powodem braku znamienych statystycznie różnic może być mała liczebność porównywanych grup, jak niedokładność kwalifikacji do nich. Nie stwierdzono również różnic w częstości występowania HRV w zależności od typu histologicznego guza.

Porównano częstość wykrywania HRV w dolnych drogach oddechowych w grupie kontrolnej z obserwowanymi zmianami na poziomie mikroskopowym, jak rozedma,

włóknienie, przewlekły proces zapalny. Tego typu zmiany opisywano w wycinkach pobranych podczas operacji aż u 83% badanych. Niestety nie wiemy czy występowały u tych chorych częściej niż u astmatyków (małe wycinki), czy osób zdrowych. Nie stwierdzono znamienych statystycznie powiązań pomiędzy zakażeniem HRV a przebudową oskrzeli i zapaleniem w obrazie patomorfologicznym, niemniej wieloczynnikowość uszkodzenia i przebudowy dolnych dróg oddechowych (na przykład palenie papierosów) utrudnia lub uniemożliwia wykazanie prostych zależności.

Na podstawie analizy retrospektywnej dokumentacji medycznej oraz wyników bieżących badań, wyłączono z grupy kontrolnej osoby spełniające kryteria rozpoznania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. (130) Jest prawdopodobne, że w ten sposób nie udało się wyłączyć wszystkich przypadków POChP. Ponieważ zaostrzenia choroby są często powodowane przez rynowirusy, które także mogą być obecne w okresie stabilizacji klinicznej, niewykrycie wszystkich chorych z POChP mogła zawyżyć odnotowane częstości zakażeń. (4, 19, 67, 170).

Średni wiek osób z grupy kontrolnej wyniósł 55 lat (27 r.ż. do 90 r.ż.). Nie można wykluczyć, że zmienna ta wpłynęła na odsetek wyników dodatnich w tej grupie. Choć niektórzy uważają, że udział rynowirusów w zakażeniach u osób starszych jest nieduży, inne prace dowodzą, że wraz z wiekiem wzrasta podatność na zakażenia HRV. (70, 171) Wykazano, że osoby powyżej 40 roku życia zakażone rynowirusem mają częściej objawy z dolnych dróg oddechowych w porównaniu do osób w przedziale wieku 20 do 39 lat (65% wobec 34%), a czas trwania choroby jest dłuższy (20 dni wobec 13 dni). Istnieją dowody, że zakażenia HRV u osób starszych mogą mieć poważniejszy przebieg i częściej prowadzić do zajęcia dolnych dróg oddechowych, zwłaszcza u osób chorujących przewlekle z innego powodu. (70) Nicholson i współpracownicy, w badaniu prospektywnym z udziałem 533 osób w wieku 60 do 80 lat, stwierdzili u 62% zakażonych HRV objawy z dolnych dróg oddechowych. Obecność przewlekłych chorób zwiększała ryzyko wystąpienia zmian w oskrzelach o 40%. (69) Podobne wyniki uzyskano w retrospektywnym badaniu z udziałem 67 osób, rezydentów domu pomocy społecznej - 66% miało objawy z dolnych dróg oddechowych. (70)

W starszych grupach wiekowych przebieg zakażeń rynowirusem mieć charakter epidemii. Epidemiczne zakażenie HRV opisano u starszych pacjentów domu opieki społecznej (średnia wieku 88 lat, 56 osób). 30% rezydentów miało radiologiczne objawy zapalenia płuc, a aż 12 osób zmarło w przebiegu ostrej infekcji. (172)

Trudności związane z metodami badania

Opisywana metoda RT-PCR *in situ* została samodzielnie opracowana dla celów tego badania, a przeprowadzone powyżej doświadczenia są pierwszymi tego rodzaju w Polsce i na świecie. Metoda zatem nie jest wystandaryzowana, nie została porównana do „złotego standardu” i nie było możliwe obliczenie jej czułości, swoistości. O ile wiadomo, że PCR cechuje wyższa czułość niż metody immunohistochemiczne, mniej wiadomo o czułości RT-PCR *in situ*. Z jednej strony należy się spodziewać, że wykonanie PCR w biopsji poprawia jej czułość (zwłaszcza jeżeli zakażone są pojedyncze komórki w tkance), z drugiej jednak wieloetapowość, złożoność metody może pogarszać jakość i czułość wyników. Wydaje się, że wynik tak złożonej metody, zwłaszcza w przypadku oceny wirusów o dużej zmienności genetycznej jest w dużym stopniu uzależniony od ustalonych każdorazowo warunków poszczególnych etapów reakcji. Bates i współpracownicy porównywali RT-PCR z hybrydyzacją *in situ* oraz *in situ* RT-PCR w zakażonych hodowlach komórek Hela. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazali, że czułość *in situ* RT-PCR jest porównywalna z RT-PCR z wykorzystaniem wyizolowanego RNA. Metoda *in situ* w przytoczonym badaniu różniła się od prezentowanej powyżej między innymi tym, że nie przeprowadzono hybrydyzacji ze znakowaną sondą. (93) W innym doniesieniu Pitkaranta i współpracownicy stwierdzili wyższą czułość hybrydyzacji *in situ* w porównaniu z konwencjonalnym RT-PCR, badano 32 chorych na obecność HRV w błonie śluzowej jamy nosa. (45)

Czułość PCR oraz złożoność RT-PCR *in situ* niosą ze sobą pewne zagrożenia. Po pierwsze wzrasta ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Mogą być one skutkiem zanieczyszczenia badanych próbek obcym RNA, czy DNA podczas pobierania, czy obróbki materiału. Przewagą RT-PCR *in situ* w porównaniu do zwykłego PCR jest uwidocznienie RNA rynowirusów bezpośrednio w komórkach oskrzeli, co ma zmniejszać ryzyko wynikające z zanieczyszczenia próbek. Aby zapobiec kontaminacji stosowano wszelkie środki ostrożności podczas pobierania i przygotowania materiału. W eksperymentach uwzględniono wewnętrzne kontrole negatywne i pozytywne. Do analizy włączono jedynie wyniki eksperymentów, w których wynik kontroli negatywnych był prawidłowy, i stwierdzono co najmniej jeden wynik pozytywny.

Swoistość i czułość reakcji PCR zależy od sekwencji wybranych starterów. Zazwyczaj stosuje się w tym celu krótkie fragmenty genomu wirusa, zawierające najmniej zmienne odcinki. Dobierając odpowiednie startery można zmieniać liczbę wykrywanych serotypów

HRV, jak i innych organizmów o podobnej sekwencji (np. enterowirusy). (173) Większość metod molekularnych odnosi się do regionu niekodującego 5' (5'-NCR) rynowirusów. (82, 173, 174) Jest to obszar o małej zmienności, nie ulegający translacji, o rozbudowanej strukturze drugo- i trzeciorzędowej, który odpowiada za wiązanie rybosomów i inicjację translacji w komórkach eukariotycznych. (90) W prezentowanym badaniu jeden ze starterów odpowiada fragmentowi o stałej sekwencji odcinka NCR rynowirusów, drugi znajduje się w obszarze większej zmienności i odpowiada regionowi VP4/VP2.

Czułość metod molekularnych determinuje sposób izolacji kwasów nukleinowych, przechowywania i przygotowywania próbek do badań. (135) Niewłaściwe przechowywanie może fałszywie zaniżyć wyniki. W odróżnieniu od DNA, RNA jest znacznie mniej odporny na czynniki środowiskowe i szybko ulega degradacji. W opisanym badaniu, biopsje natychmiast po pobraniu umieszczano w roztworze formaliny, a początkowe etapy przeprowadzano w środowisku wolnym od rybonukleaz, co miało zahamować rozpad RNA. Powszechnie uważa się, że struktura RNA w bloczkach parafinowych zachowywana jest przez wiele lat.

HRV zakaża tylko w niewielki odsetek eksponowanych komórek, co zwiększa ryzyko uzyskania fałszywie ujemnego wyniku, zwłaszcza jeżeli pobierane wycinki są zbyt małe. (42, 175) Aby zapobiec temu, pobierano kilka wycinków z oskrzeli, a eksperymenty powtarzano.

Jednym z problemów metod *in situ*, podobnie jak i immunohistochemicznych, jest obecność „tła”, wynikającego z niespecyficznego wiązania sondy genetycznej lub przeciwciał w tkance. (94) Ryzyko zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia sondy w roztworze hybrydyzacyjnym, jak również po niewystarczającym usunięciu jej nadmiaru. Właściwe przyłączanie sondy do komplementarnych sekwencji cDNA zależy od warunków hybrydyzacji: stężenia jonów, formamidu, temperatury roztworu, jak i kolejnych etapów. (94) W przypadku metod immunohistochemicznych fałszywie dodatnie wyniki są następstwem niespecyficznego przyłączania przeciwciał z powodu zbyt dużego stężenia, przedłużonego czasu inkubacji, niedostatecznego usunięcia ich nadmiaru, lub produktu reakcji.

„Tło” reakcji, przypominające fałszywie dodatnie wyniki może być odzwierciedleniem dyfuzji poszukiwanych fragmentów RNA lub cDNA z komórek, gdzie pierwotnie występowały na zewnątrz. Zjawisku temu sprzyjają: nadmierne trawienie proteazą przed reakcją RT-PCR, niewłaściwe utrwalenie materiału, parametry samej reakcji PCR, jak czas trwania cykli PCR. Ostro odgraniczone miejsca w których obserwuje się gromadzenie znacznika i brak zabarwienia w innych miejscach wskazuje na brak dyfuzji produktów reakcji z wnętrza rzeczywiście zakażonych komórek do przestrzeni pozakomórkowej. (94) W przeprowadzonych doświadczeniach niejednokrotnie obserwowano gromadzenie znacznika

tylko w pojedynczych strukturach lub komórkach biopsji. Podobnie często RT-PCR *in situ* przedstawiał „rozlany”, słabo odgraniczony od pozostałych struktur obszar, zazwyczaj o niewielkim natężeniu zabarwienia. Obraz budził wątpliwości, jednak uznawano go za swoisty, jeżeli wygląd kontroli negatywnych był prawidłowy. Jest możliwe, że w niektórych preparatach produkt reakcji PCR mógł przedostawać się z miejsca rzeczywistego występowania (komórki) do otoczenia (przestrzeń pozakomórkowa). Różnice mogą odzwierciedlać także stopień nasilenia zakażenia HRV w organizmie.

Trawienie proteazą może nasila sygnał hybrydyzacji, natomiast przedłużone utrwalanie preparatów w formalinie zmniejsza natężenie reakcji. Wycinki pobierane w czasie bronchofiberoskopii umieszczano w 5% formalinie i jak najszybciej przekazywano do Katedry Patomorfologii CMUJ. Przygotowanie bloczków parafinowych trwało przeważnie 3 dni. W niektórych przypadkach czas utrwalania w formalinie z przyczyn technicznych był dłuższy. Przeprowadzono szereg wstępnych eksperymentów, podczas których dostosowano stężenie, czas inkubacji w roztworze proteazy, aby uzyskać możliwie najlepszy wynik. Im dłuższe trawienie proteazą, tym lepsza czułość metody, jednak większe ryzyko uszkodzenia tkanek i gorsze zachowanie struktury mikroskopowej.

W celu zoptymalizowania poszczególnych etapów reakcji RT-PCR *in situ*, w sposób eksperymentalny ustalono: stężenie proteiny K, czas i temperaturę trawienia, czas inkubacji w roztworze paraformaldehydu, czas odwrotnej transkrypcji, czasy oraz temperatury poszczególnych etapów reakcji PCR, liczbę cykli PCR, stężenie starterów i polimerazy Taq, stężenie sondy hybrydyzacyjnej, skład roztworu do hybrydyzacji, temperaturę i czas hybrydyzacji, skład, temperatury roztworów po hybrydyzacji.

We wszystkich eksperymentach uwzględniano kontrole negatywne. Były to wycinki oskrzeli, w których przeprowadzona reakcja różniła się wyłącznie pominięciem startera R podczas odwrotnej transkrypcji. W ten sposób, niezależnie od obecności RNA rynowirusów w biopsjach, nie powstawało cDNA, które miało być zwielokrotnione podczas PCR i wykrywane znakowaną sondą w czasie hybrydyzacji.

Aby potwierdzić skuteczność opracowanej metody dodatkowo przeprowadzono wstępne doświadczenia PCR *in situ*, w których zastosowano startery dla genu beta-aktyny. Wynikiem swoistej reakcji było gromadzenie barwnego produktu w jądrach komórkowych. W przypadku rynowirusów obserwowano barwienie cytoplazmatyczne, gdyż tam replikuje się rynowirus.

Swoistość reakcji *in situ* potwierdzono poprzez sekwencjonowanie cDNA, który posłużył do syntezy znakowanej sondy. Na podstawie przeszukiwania internetowej bazy BLAST

ustalono, że sekwencja ta odpowiada RNA rynowirusów i nie wykazuje istotnego podobieństwa do żadnej innej sekwencji DNA, RNA ludzkiego, czy innych organizmów.

W około 10% przypadków wyniki reakcji *in situ* wymagały powtórzenia. W trzech przypadkach nie udało się ostatecznie ustalić rozpoznania, pomimo wielokrotnego powtarzania reakcji. Wynik RT-PCR *in situ* wydawał się być pozytywny, jednak nasilenie zabarwienia było niewielkie i budziło podejrzenie reakcji nieswoistej. Jest możliwe, że u tych pacjentów obecna była bardzo mała liczba cząsteczek wirusa, lub rynowirusy różniły się sekwencją poszukiwanego fragmentu w zakresie użytej sondy. Mogło to być przyczyną słabszego jej przyłączania i nikłego sygnału hybrydyzacji. Wynik wątpliwy mógł także dotyczyć osób zakażonych innymi niż HRV wirusami o podobnej sekwencji. Jak wiadomo wiele podobieństw łączy spokrewnione ze sobą rynowirusy i enterowirusy. Stosowane metody powinna charakteryzować zdolność do rozróżnienia tych podobnych rodzajów. (5, 82) W powyższym badaniu zastosowano metodę hybrydyzacji zamplifikowanego fragmentu cDNA ze znakowaną sondą genetyczną, co zwiększa swoistość PCR. (82) Teoretycznie, na podstawie przeszukiwania bazy BLAST, nie potwierdzono, aby sonda hybrydyzacyjna wykazywała podobieństwo sekwencji do innych organizmów (wśród innych mikroorganizmów jedynie małpi pikornawirus wykazywał podobieństwo sekwencji w odcinku stanowiącym 5% sekwencji sondy), niemniej nie można wykluczyć istnienia innych, nieznanych mikroorganizmów o zbliżonej sekwencji.

Porównanie wyników RT-PCR in situ i immunohistochemii

Wybrano dwie metody oceny rynowirusów: RT-PCR *in situ* oraz immunohistochemiczną. Cechą dla nich wspólną jest możliwość oceny dystrybucji zakażenia pod mikroskopem na poziomie komórek i tkanek. (175) Jedną z podstawowych różnic między nimi jest poszukiwanie innych składników wirusa: RNA lub białka. Pierwsza z nich pozwala stwierdzić obecność genomu, lecz niekoniecznie kompletnych cząsteczek wirusa, druga - kapsydu wirusa. Metodę RT-PCR *in situ* wybrano ze względu na przekonanie o większej czułości i swoistości w porównaniu do metod konwencjonalnych. (2, 82, 176, 177)

Za pomocą immunohistochemii pośredniej stwierdzono obecność białka otoczki rynowirusa u 64% osób chorych na astmę oskrzelową i 33% osób z grupy kontrolnej, natomiast za pomocą RT-PCR *in situ* – obecność RNA u 73% chorych na astmę i 22% osób z grupy kontrolnej. Odsetki wyników pozytywnych w obydwu grupach są porównywalne, niemniej tylko 20 biopsji oceniono metodą immunohistochemiczną. Z powodu niskiej liczebności drugiej próby nie można wysuwać wniosków wynikających z porównania tych

dwóch metod. Nie przeprowadzono również porównania powyższych metod z testem referencyjnym (na przykład RT-PCR), stąd nie można ocenić czułości, swoistości i wartości predykcyjnej wyników.

Jedynie 12 osób poddano badaniu na obecność rynowirusów dwiema metodami: RT-PCR *in situ* i immunohistochemiczną. W połowie przypadków (6 biopsji) uzyskane wyniki były zgodne. W czterech przypadkach wirusa wykryto wyłącznie metodą RT-PCR *in situ*, natomiast w dwóch – wyłącznie metodą immunohistochemiczną. Ponieważ wiadomo, że czułość metod molekularnych jest wyższa niż immunohistochemicznych, obecność czterech biopsji w których stwierdzono HRV wyłącznie metodą RT-PCR *in situ* nie budzi wątpliwości. Zwraca uwagę obecność RNA rynowirusa u wszystkich astmatyków z nadwrażliwością na aspirynę, jednakże metodą immunohistochemiczną wirusa wykryto wyłącznie u jednego z trzech badanych.

Różnice wyników dwóch metod mogą być następstwem różnej ich swoistości. Ze względu na dużą zmienność antygenową i różnice w sekwencji genetycznych pomiędzy poszczególnymi serotypami rynowirusów wydaje się niemożliwe uzyskanie przeciwciała i jednocześnie wybranie takiego fragmentu RNA, aby obydwie metody wykrywały dokładnie ten sam panel serotypów HRV. Duża zmienność wewnątrz rodzaju wynika z niedokładnej replikacji przez RNA-zależną polimerazę. W czasie replikacji, dochodzić może także do zamiany nici kodujących co dodatkowo zwiększa zasięg rekombinacji i liczbę wariantów genetycznych. (178, 179) Zmianę sekwencji genomowego RNA podczas replikacji rynowirusów obserwowano w warunkach *in vitro* już po kilku pasażach komórek zakażonych hodowli. Zmienność genetyczna prowadzi do zmian antygenowości. Dodatkowa obecność cząstek defektywnych RNA, upośledza replikację pełnowartościowych cząstek wirusa i powstawanie białek wirusa.

Różnice antygenów powierzchniowych doprowadziły do wyróżnienia ponad 100 serotypów HRV. Zgodnie z definicją, każdy serotyp powoduje powstanie w organizmie przeciwciał o innej swoistości. Zgodnie z tradycyjnym rozumieniem tego pojęcia różne serotypy wirusa, nie powodują reakcji krzyżowych między sobą. Obecnie wiadomo, że swoiste przeciwciała mogą reagować krzyżowo z wieloma różnymi serotypami. (86, 179, 180) Wykazano nawet, że odpowiedź immunologiczna w warunkach naturalnych na inny serotyp rynowirusa może być równie silna, co na serotyp, który wywołał chorobę. (181) Oprócz licznych reakcji krzyżowych między serotypami, obserwuje się zmienność antygenową w obrębie danego serotypu, czego następstwem jest wytwarzanie swoistych przeciwciał o różnym powinowactwie w obrębie jednego typu HRV. (179) Obserwowano także, że podanie

tego samego wirusa innym osobnikom może prowadzić do powstania różnych przeciwciał i istotnych różnic w odpowiedzi humoralnej. (180) W praktyce utrudnia to identyfikację rynowirusów metodami z użyciem przeciwciał.

W metodzie immunochemicznej zastosowano przeciwciało, otrzymane dzięki uprzejmości prof. W. Busse z laboratorium Uniwersytetu Wisconsin. Jest to monoklonalne przeciwciało mysie, wiążące się z białkiem otoczki rynowirusów VP2, lecz nie wszystkich serotypów. Przeciwciało to pozwala na wykrycie typów RV1A oraz RV16, natomiast nie wiąże się z białkiem VP2 rynowirusów RV2, RV14, RV49. (53) Nie znana jest swoistość przeciwciała względem innych serotypów HRV.

Porównując sekwencję zastosowanej sondy hybrydacyjnej z sekwencjami dostępnymi w bazie danych BLAST odnaleziono wiele typów HRV wykazujących duże podobieństwo do sekwencji sondy. Znalazły się tu również rynowirusy RV2 i RV49, nie wykrywane za pomocą przeciwciała. (53) Należy jednocześnie pamiętać, że zdolność sondy hybrydacyjnej do rozpoznawania poszczególnych serotypów HRV, oceniona w sposób opisany powyżej, jest wyłącznie teoretyczna i nie została potwierdzona eksperymentalnie.

Ciekawą obserwację przedstawiła Mosser i współpracownicy. Stwierdzili oni, obecność białka otoczki rynowirusa w 46% biopsji oskrzeli pobranych od astmatyków po dwóch tygodniach od zakażenia HRV, natomiast w żadnej nie stwierdzono RNA metodą RT-PCR. Na podstawie wyników tego badania nie można wnioskować, czy opisane różnice są wynikiem dłuższego przetrwania białek kapsydu po zakażeniu w porównaniu do RNA, różnic swoistości metod, czy ze względu na niewielką liczbę badanych, jak i liczbę pobranych wycinków (co najmniej dwa) uzyskane wyniki są jedynie następstwem przypadku. (47) Jak wiadomo, obraz zakażenia rynowirusem (w górnych i dolnych drogach oddechowych) ma charakter ogniskowy, tzn. występują skupienia wirusa w otoczeniu obszarów nie zakażonych. Zwiększa to ryzyko uzyskania fałszywie ujemnych wyników i pogarsza czułość metody w przypadku pobrania zbyt małej liczby wycinków. (47, 53)

Wykrywanie rynowirusów a charakterystyka kliniczna populacji

Nie stwierdzono, aby osoby zakażone HRV (na podstawie RT-PCR *in situ*) różniły się wiekiem, czy płcią w porównaniu do osób nie zakażonych (analiza łącznie dla grupy chorych na astmę i kontroli oraz wyłącznie dla chorych na astmę). Nie wykazano także związku pomiędzy obecnością rynowirusów, a atopią, czy alergiami. Stwierdzono natomiast, że osoby HRV-pozytywne (astmatycy i kontrola łącznie) znamienne częściej otrzymywały glikokortykosteroidy w postaci wziewnej lub doustnej ($p=0,002$). Należy zaznaczyć, że

wykazany związek może być pozorny, bowiem większość astmatyków stosowała glikokortykosteroidy i jednocześnie częściej wykrywano w tej grupie rynowirusy w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Analiza wykonana wyłącznie dla astmatyków nie wykazała podobnych znamienych różnic.

Wyniki badań oceniających związek pomiędzy stosowaniem kortykosteroidów, a częstością zakażeń HRV są niejednoznaczne. Według niektórych, stosowanie tej grupy leków zwiększa zapadalność na zakażenia HRV. (182) Jak wykazano w randomizowanym badaniu z placebo, podawanie prednizolonu astmatykom może upośledzać usuwanie wirusa z górnych dróg oddechowych. (183) W innym badaniu randomizowanym nie wykazano wpływu podawania glikokortykosteroidów wziewnych na obraz zapalenia w oskrzelach podczas zakażenia HRV. (184) W badaniu z udziałem 101 astmatyków w stadium zaostrzenia, po uwzględnieniu poprawki na ciężkość choroby, wykazano odwrotną zależność pomiędzy leczeniem hormonami kory nadnerczy, a szansą wykrycia rynowirusów w badaniach laboratoryjnych (szansa wystąpienia zakażenia HRV u chorych nie otrzymujących GKS była 11 razy większa w porównaniu do osób leczonych). (185)

Osoby, u których stwierdzono RNA rynowirusów (grupa kontrolna i astmatycy łącznie) znamienne rzadziej paliły papierosy w porównaniu z grupą HRV-negatywną ($p=0,019$). Wyniki te wydają się być w sprzeczności z doniesieniami dużych badań epidemiologicznych, odnalezione publikacje wskazują raczej na większą zapadalność na zakażenia HRV wśród osób palących. (69, 185) Nicholson i współpracownicy wykazali, że palenie tytoniu zwiększa ryzyko wystąpienia powikłań ze strony dolnych dróg oddechowych o 47%. (69) W innym badaniu wykazano, że astmatycy hospitalizowani z powodu zaostrzeń, których przyczyną są rynowirusy częściej palą i rzadziej stosują glikokortykosteroidy. (185) Opisana zależność może być pozorna i wynikać przewagi zakażeń HRV u astmatyków, którzy jednocześnie rzadziej palili papierosy. Należy także zaznaczyć, że informacje o paleniu papierosów zbierano od samych pacjentów, co nie było wiarygodnym źródłem informacji. W prezentowanym badaniu jedynie 4 osoby z astmą paliły, co uniemożliwiło wiarygodną ocenę zależności wewnątrz grupy. W grupie kontrolnej również nie wykazano zależności pomiędzy paleniem a zakażeniem HRV.

Tematem do niedawna trwającej debaty było pytanie, czy HRV powoduje objawy astmy oskrzelowej w mechanizmie bezpośredniego oddziaływania na drogi oddechowe, czy poprzez mechanizmy pośrednie. (52) Jest prawdopodobne, że HRV, który przede wszystkim zakaża nabłonek górnych dróg oddechowych, wpływa pośrednio na przebieg choroby dolnych dróg oddechowych (poprzez uwalnianie cytokin do krwiobiegu i wyzwalamie odruchów

nerwowych). Drugi mechanizm to lokalne oddziaływania pomiędzy mikroorganizmem, a komórkami dolnych dróg oddechowych. (126) W większości odnalezionych badań, w odróżnieniu od prezentowanego powyżej, HRV poszukiwano w górnych drogach oddechowych (na przykład w popłuczynach nosa) i uzyskane wyniki porównywano do objawów z dolnych dróg oddechowych. Odnaleziono niewiele badań porównujących bezpośrednio obecność HRV w oskrzelach z objawami klinicznymi z dolnych dróg oddechowych. (47, 54, 134) Zatem, najczęściej prezentowane w literaturze wyniki badań odnoszą się raczej do oceny pośrednich oddziaływań HRV na objawy choroby i pozwalają tylko domniemywać o bezpośrednich, lokalnych oddziaływaniach HRV na komórki oskrzeli. Pomocne w tym wypadku są wyniki eksperymentów *in vitro*.

Częstość wykrywania RNA rynowirusa była wyższa u osób z ciężką astmą w porównaniu do astmy łagodnej i umiarkowanej (67% wobec 57%). Zaobserwowane różnice nie są znamienne statystycznie. Wiadomo, że zakażenia pogarszają przepływy w drogach oddechowych, co powoduje nasilone objawy podczas zaostrzeń. Przetrwale zakażenie HRV mogłoby także powodować trwałe upośledzenie przepływów oddechowych, a w następstwie tego nasilać objawy choroby.

Tan i współpracownicy opisali częstsze występowanie pikornawirusów i adenowirusów u osób z astmą fatalną w porównaniu do innych astmatyków oraz chorych na POChP. (17) Rynowirusy mogą powodować poważniejsze objawy w zakresie dolnych dróg oddechowych w porównaniu z innymi wirusami. Zapalenie oskrzelików u niemowląt, stan chorobowy poprzedzający rozwój astmy u dzieci, ma cięższy przebieg, jeżeli jest wywołane przez rynowirusy. (60) Kling wykazał, że dzieci u których wykrywano rynowirusy po 6 tygodniach od zakażenia, mają gorsze szczytowe przepływy wydechowe w trakcie zaostrzenia. (16)

Być może u astmatyków z upośledzonymi mechanizmami eliminacji rynowirusów zakażenia HRV są cięższe, bardziej długotrwałe. Przyczyną mogą być pierwotne defekty opisywane w astmie ciężkiej, na przykład obniżona produkcja interferonu γ . Taki niedobór odpowiedzi immunologicznej Th_1 może zwiększać podatność na zakażenia. (144)

Badaniem RT-PCR *in situ* stwierdzono obecność RNA rynowirusów u wszystkich siedmiu osób z rozpoznaniem astmy aspirynowej. Różnica w częstości wykrywania HRV w tej grupie w porównaniu do osób bez nadwrażliwości na aspirynę była bliska znamienności statystycznej ($p=0,07$), niemniej może być wynikiem przypadku. Metodą IHC nie potwierdzono wyników RT-PCR *in situ*. Obecność białek rynowirusa stwierdzono bowiem tylko u jednego spośród trzech badanych AIA. Liczba badanych jest niewielka, co zmusza do ostrożnej interpretacji wyników.

Jak dotychczas nie wykazano związku pomiędzy zakażeniami HRV a astmą aspirynową. Przebieg kliniczny choroby przypomina jednak zakażenie rynowirusem. Pacjenci często skarżą się na nieżyt nosa, objawy grypopodobne poprzedzające na kilka lat wystąpienie astmy oskrzelowej, nietolerancji na aspirynę i polipów nosa. (31) Już ponad 20 lat temu zaproponowano hipotezę astmy aspirynowej jako przewlekłej choroby wirusowej. (21, 187) Zgodnie z tą hipotezą przewlekłe zakażenie powoduje powstanie swoistych dla wirusa limfocytów cytotoksycznych, których aktywność hamowana jest przez PGE₂. Mechanizm jest wrażliwy na działanie inhibitorów cyklooksygenazy. Niesterydowe leki przeciwzapalne blokując cyklooksygenazę, zmniejszają produkcję PGE₂, co uwalnia limfocyty od jej hamującego wpływu i nasila atak na zakażone wirusem komórki. Następstwem będą objawy po spożyciu aspiryny w tej grupie chorych.

Obecnie immunosupresyjny efekt PGE₂ jest dobrze udokumentowany. PGE₂ może między innymi hamować dojrzewanie komórek dendrytycznych i ich zdolność do prezentacji antygenów, hamować odpowiedź immunologiczną typu 1. (111) Powstawanie prostaglandyny E zależy od aktywności enzymów przemiany kwasu arachidonowego, w tym aktywności cyklooksygenazy 1 lub 2, syntazy prostaglandyny E. Jak wiadomo zakażenia rynowirusem mogą powodować między innymi zwiększenie aktywności COX-2 w oskrzelach. (114) Dwuniciowe struktury RNA, pośrednie formy podczas replikacji HRV, aktywują między innymi zależną od dwuniciowego RNA kinazę białkową (PKR), kinazę białkową p38, NF-kappa-β. (121, 188) Nasilenie ekspresji COX-2 następuje w wyniku zwiększonej aktywności czynników transkrypcyjnych NF-kappa-β, kinazy p38. (111, 121, 160) Skutkuje to zwiększeniem lokalnego stężenia PGE₂. (111) PGE₂ działając na komórki dendrytyczne zwiększa natomiast produkcję IL-10. PGE₂ oraz IL-10 regulują nabyte mechanizmy odpowiedzi immunologicznej Th₁/Th₂, hamują produkcję IL-12 przez komórki dendrytyczne, cytokiny aktywacji limfocytów T i różnicowania odpowiedzi Th₁. PGE₂ i IL-12 mają działanie przeciwstawne, a różnice stężeń pomiędzy nimi mogą mieć zasadnicze znaczenie w ustaleniu, która z odpowiedzi immunologicznych Th₁, czy Th₂ będzie dominować. (111)

Podczas zakażeń HRV obserwowano nadmierną, lokalną produkcję leukotrienów cysteinylowych, co nasila skurcz oskrzeli i objawy zaostrzenia choroby. Nadprodukcja leukotrienów cysteinylowych może wynikać ze zwiększonej aktywności 5-LO w czasie zakażenia. (114, 115)

Immunosupresyjne działanie zwiększonych stężeń PGE₂ i IL-10 HRV może sprzyjać przetrwaniu wirusa w oskrzelach chorych na astmę aspirynową. Stan przewlekłego zakażenia sprzyja natomiast permanentnej aktywacji różnych szlaków przemian metabolicznych, w tym

przemian kwasu arachidonowego. Podanie aspiryny może hamować immunosupresyjne działanie PGE₂, aktywować limfocyty typu Th₁, zwiększać produkcję leukotrienów cysteinylowych, co prowadzi do nasilonych objawów zapalenia, skurczu oskrzeli.

Nie wiadomo w jaki sposób podanie aspiryny wpływa na replikację rynowirusa w dolnych drogach oddechowych. Odnaleziono jedną pracę w której wykazano na podwójnie zaślepionej próbie, że podanie aspiryny podczas zakażenia HRV znamienne zwiększa wykrywane stężenia rynowirusa. Jednocześnie lek zmniejszał niektóre objawy choroby. (189)

W powyższym badaniu nie wykazano, aby obecność RNA rynowirusów u bezobjawowych osób związana była z atopią. Podobne wyniki uzyskał Kling i współpracownicy, którzy również nie stwierdzili, aby obecność atopii u dzieci miała związek z przetrwaniem rynowirusów w drogach oddechowych po 6 tygodniach. (16)

Wiele badań potwierdza efekt synergistyczny atopii i zakażeń wirusami w zaostrzeniach astmy oskrzelowej. Są one czynnikami ryzyka wystąpienia świszczącego oddechu u dzieci, a zakażenia mogą nasilać odpowiedź na alergen. (72, 190) Szansa wystąpienia świszczącego oddechu u dzieci powyżej 2 roku życia jest największa u tych, u których stwierdzono obecność rynowirusa metodą RT-PCR łącznie z wykryciem swoistych IgE w surowicy krwi, zapalenia eozynofilowego w nosie lub eozynofilowego białka kationowego. (74) Inni dowodzą, że zapalenie alergiczne w błonie śluzowej nosa nie pogarsza objawów przeziębienia, lecz nawet opóźnia ich wystąpienie i skraca czas ich trwania. (191)

Jedna z hipotez tłumaczy związek wirusów z atopią i astmą alergiczną powstawaniem specyficznych dla wirusa immunoglobulin E, które w odpowiedzi na zakażenie powodują degranulację uczulonych mastocytów i uwalnianie mediatorów zapalenia. Stan atopii może nasilać proliferację komórek, jak i cytotoksyczność w odpowiedzi na zakażenie rynowirusem. (50, 80)

W przedstawionym badaniu nie stwierdzono, aby obecność rynowirusów w dolnych drogach oddechowych znamienne częściej występowała wśród osób z objawami z górnych dróg oddechowych, takimi jak: polipy nosa, przewlekły katar, przewlekłe zapalenie zatok w wywiadzie. Biorąc jednak pod uwagę różnorodność patomechanizmów prowadzących do wymienionych wyżej chorób, prawdopodobnego niedoszacowania częstości występowania wyżej wymienionych chorób na podstawie badania fizykalnego, przedstawiony brak związku nie budzi wątpliwości.

Badanie tomograficzne zatok przynosowych wykonano u 12 osób, które brały udział w badaniu. We wszystkich przypadkach obserwowano zmiany śluzówki o charakterze przewlekłych zmian zapalnych. Jednocześnie u wszystkich dwunastu osób wynik RT-PCR *in*

situ był dodatni. Dane z wywiadu wskazują na obecność przewlekłego procesu zapalnego zatok u jedenastu spośród nich. Obserwowane wyniki wskazują na możliwy związek pomiędzy zmianami w zatokach, a zakażeniem rynowirusami w dolnych drogach oddechowych. Niemniej metodyka badania nie pozwoliła na bardziej dokładną ocenę tej zależności.

Wiadomo, że HRV mogą powodować zapalenie zatok przynosowych. Pitkaranta i współpracownicy wykrywali rynowirusy w materiale pobranym z zatok obocznych nosa aż u 40% osób z objawami ostrego ich zapalenia. (44) Badania obrazowe zatok uwidaczniają zmiany błony śluzowej u około 90% pacjentów z objawami typowego przeziębienia. (62, 203)

Analiza wyników spirometrycznych osób włączonych do badania i porównanie ich z RT-PCR *in situ* wykazały, że chorzy na astmę HRV-dodatni mają niższe wartości FEV₁/FVC w porównaniu z osobami HRV-ujemnymi. Po uwzględnieniu wyników łącznie dla grupy kontrolnej i chorych na astmę, uzyskano znamienność statystyczną również dla FEV₁ oraz FEF₅₀. W grupie kontrolnej stwierdzono związek pomiędzy obecnością RNA rynowirusów, a pogorszeniem FEF₅₀. Wyniki w grupie kontrolnej należy interpretować ostrożnie, ponieważ pomiary FEF₂₅, FEF₅₀ i FEF₇₅ dostępne były wyłącznie dla 4 osób. Nie stwierdzono natomiast, aby w grupie kontrolnej obecność RNA rynowirusów wiązała się ze zmianą FEV₁, czy FEV₁/FVC (15-17 osób). Przedstawione wyniki wskazują, że bezobjawowa obecność rynowirusów w dolnych drogach oddechowych jest związana ze znamienne większą obturacją oskrzeli u chorych na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej.

Odnalezione badania potwierdzają wpływ ostrych zakażeń HRV na pogorszenie pomiarów testów czynnościowych. Odnotowano spadki szczytowych przepływów wydechowych, FEV₁ u astmatyków oraz wzrost nadreaktywności oskrzeli podczas zakażeń rynowirusami. (83, 192) U osób z alergicznym nieżytem nosa, bez astmy, po eksperymentalnych zakażeniach HRV także opisywano wzrost nadreaktywności oskrzeli oraz zwiększenie częstości reakcji późnych w odpowiedzi na alergen. (72) Wyniki obserwacji wśród zdrowych osób nie są jednoznaczne. Aczkolwiek odnotowano wzrost maksymalnej odpowiedzi oskrzeli na metacholinę w czasie zakażeń HRV, nie wszyscy potwierdzają tę obserwację. (193, 194)

Chorzy na astmę, u których stwierdzono wirusa w dolnych drogach oddechowych metodą RT-PCR *in situ*, pomimo braku objawów wskazujących na zaostrzenie choroby, czy ostre zakażenie, mają gorsze przepływy i większy stopień obturacji w dolnych drogach oddechowych. Jest to w zgodzie z hipotezą, że przetrwałe zakażenia HRV mogą pogarszać przebieg choroby, nasilać jej ciężkość, czy oporność na leczenie.

Istnieją dowody, że rynowirusy nasilają steroidoporność w astmie oskrzelowej. Wykazano na przykład, że podczas przeziębienia, maleje odpowiedź limfocytów T na kortykosteroidy u chorych na astmę. Podobnej zależności nie obserwowano u osób zdrowych. (195) W innym badaniu wykazano jednakże korzystny synergistyczny efekt leczenia wziewnymi glikokortykosteroidami i lekami rozszerzającymi oskrzela na uwalnianie mediatorów remodelingu w odpowiedzi na zakażenie HRV. (196) Wydaje się, że glikokortykosteroidy mogą poprawiać nadreaktywność oskrzeli i zapalenie eozynofilowe, lecz nie zapobiegają zmianom zapalnym podczas zakażenia HRV. Rola tych leków w zapobieganiu i leczeniu ciężkich objawów astmy, wywołanych zakażeniem HRV wymaga zatem wnikliwej oceny. (184)

Chorzy na astmę z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* mieli wyższą leukocytozę bezwzględną (wynik na granicy znamienności statystycznej), więcej granulocytów, a w obrazie odsetkowym krwi znamienne więcej granulocytów i mniej limfocytów. Ponieważ większość granulocytów we krwi obwodowej stanowią neutrofile, założono, że porównania statystyczne dotyczą tej podgrupy komórek. Przewaga granulocytów w grupie HRV-dodatniej utrzymywała się również po wyłączeniu z badania osób otrzymujących glikokortykosteroidy systemowe.

Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek wnikającymi do dróg oddechowych podczas prowokacji alergenem i po zakażeniu wirusami. Zapalenie neutrofilowe charakteryzuje niektóre z postaci astmy oskrzelowej, zwłaszcza astmę fatalną o gwałtownym przebiegu, czy astmę ciężką steroidooporną. (186, 197) Podczas eksperymentalnych zakażeń rynowirusami obserwowano wzrost neutrofilów we krwi obwodowej i w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych. (118, 123, 143) W płwocinie astmatyków z zaostrzeniami i obecnością wirusów w drogach oddechowych obserwowano wyższe poziomy elastazy neutrofilowej w porównaniu do osób, u których nie wykrywano wirusów. (198) Opisywano także związek pomiędzy wielkością zmiany liczby neutrofilów, a nasileniem objawów zakażenia. (118) Wydaje się, że podczas zakażeń HRV, pod wpływem czynników wzrostu i chemotaktycznych, wzrasta liczba neutrofilów w miejscu zakażenia, lecz także uwalniane zostają rezerwy szpikowe. (118) Zakażenie rynowirusem nasila produkcję interleukiny 8, G-CSF, CXCL5, leukotrienu LTB₄. (11, 105, 118) Są one ważnymi czynnikami chemotaktycznymi dla neutrofilów, a G-CSF pobudza także produkcję neutrofilów w szpiku kostnym. (143, 191)

W prezentowanym badaniu nie wykazano związku pomiędzy granulocytozą, a wynikiem RT-PCR *in situ* w grupie kontrolnej ($p > 0,05$), co może wynikać z mniejszej liczebności ocenianej grupy lub mniejszego wpływu zakażeń HRV na zmiany obrazu krwi obwodowej w

tej grupie. Niemniej analiza przeprowadzona łącznie dla chorych na astmę i grupy kontrolnej zwiększyła znamienność statystyczną porównania.

Nie badano nasilenia zapalenia neutrofilowego w błonie śluzowej oskrzeli, co pozwoliłoby na lokalną ocenę korelacji zapalenia neutrofilowego z obecnością rynowirusów.

Przedstawione wyniki prac wskazują, że neutrofile mogą mieć udział w przebiegu przewlekłego zakażenia rynowirusami. Niemniej nie opublikowano dotychczas prac, które potwierdzałyby wpływ przewlekłej obecności rynowirusów w oskrzelach na liczbę neutrofilów, czy ogólnie leukocytów krwi obwodowej.

U chorych na astmę, u których stwierdzono rynowirusa w dolnych drogach oddechowych, odsetek limfocytów we krwi obwodowej był znamienne niższy. Po uwzględnieniu w analizie łącznie astmatyków i grupy kontrolnej, zależność była silniejsza ($p=0,002$). Ponieważ nie zaobserwowano istotnej statystycznie zmiany bezwzględnej liczby limfocytów w zależności od obecności rynowirusa w dolnych drogach oddechowych można sądzić, że obserwowane różnice między grupami są tylko wynikiem zwiększenia liczby neutrofilów we krwi obwodowej.

Odnaleziono jednak doniesienia potwierdzające występowanie limfopenii podczas zakażeń rynowirusami. (12, 126) Nasilenie limfopenii korelowało z natężeniem objawów zakażenia i nadreaktywnością oskrzeli. (126) Wykazano również lokalny wzrost liczby limfocytów w wydzielinie z nosa, błonie śluzowej dolnych dróg oddechowych, czemu towarzyszyło zwiększenie reaktywności oskrzeli. Obserwowany spadek limfocytów krwi obwodowej podczas zakażenia HRV może być następstwem ich przechodzenia do tkanek obwodowych. (12, 126)

Wykazano związek pomiędzy obecnością RNA dla rynowirusów w oskrzelach, a nasileniem eozynofilii krwi obwodowej. Osoby HRV-dodatnie miały znamienne wyższą eozynofilię w porównaniu z osobami HRV-ujemnymi. Gdy analizę przeprowadzono wyłącznie w grupie chorych na astmę, wynik był nadal istotny statystycznie. Poziom eozynofilii obwodowej korelował także z nasileniem zakażenia rynowirusami, ocenianym w 6-stopniowej skali. Wykazano również istotną zależność pomiędzy obecnością HRV i lokalnym zapaleniem eozynofilowym w oskrzelach. Nasilenie zapalenia eozynofilowego w oskrzelach korelowało z nasileniem zakażenia HRV w dolnych drogach oddechowych, ocenianym zarówno metodą RT-PCR *in situ*, jak i immunohistochemiczną.

Związek pomiędzy zapaleniem eozynofilowym i rynowirusami potwierdzają dane z piśmiennictwa. Podczas zakażeń HRV u dorosłych astmatyków wzrasta stężenie kationowego białka eozynofilowego (ECP) w indukowanej plwocinie, a liczba eozynofilów i poziom ECP

korelują z nadreaktywnością oskrzeli. (116) Szansa wystąpienia świszczącego oddechu u dzieci powyżej 2 roku życia jest największa, jeżeli stwierdza się łącznie zakażenie HRV i swoiste IgE w surowicy krwi (pozytywny wynik testu RAST), eozynofilię bezwzględną, lub podwyższony poziom ECP w popłuczynach nosa. (74) Opisywano także nasilenie lokalnego zapalenia eozynofilowego w biopsjach oskrzeli po eksperymentalnych zakażeniach rynowirusem u astmatyków i osób zdrowych. U chorych na astmę zapalenie eozynofilowe utrzymywało się przez 6 tygodni obserwacji, efekt ten był nieobecny u osób zdrowych. (12) Przetrwwały wzrost eozynofilów w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych obserwowano także u chorych z alergicznym nieżytem nosa po zakażeniu rynowirusem i segmentarnej prowokacji z alergenem. (73)

Lokalne gromadzenie eozynofilów w ścianie oskrzela może wynikać ze zwiększonego uwalniania czynników chemotaktycznych w odpowiedzi na zakażenie, takich jak: RANTES, eotaksyna-1, IL-5, GM-CSF. (199, 200) Czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytarnych i makrofagów (GM-CSF) ułatwia dojrzewanie i wzrost komórek progenitorowych szeregu granulocytarnego. Interleukina 5 pobudza między innymi proliferację i różnicowanie prekursorów eozynofilów, przedłuża ich przeżycie, nasila degranulację. Zwiększona mobilizacja eozynofilów ze szpiku kostnego (GM-CSF, IL-5) zwiększa eozynofilię bezwzględną. Udział w opisywanych zjawiskach przypisuje się pobudzeniu receptora TLR-3 w miejscu zakażenia, rozpoznającego struktury dwuniciowego RNA. (200) Lokalną migrację eozynofilów dodatkowo nasila zwiększona ekspresja cząsteczki ICAM-1 w odpowiedzi na zakażenie. (105)

Rola eozynofilów w zakażeniach wirusami u chorych na astmę nie jest ostatecznie wyjaśniona, nie można wykluczyć ich działania ochronnego. Uwalniane przez nie białka, jak ECP, czy neurotoksyna o aktywności rybonukleaz mogą mieć udział w obronie przeciwwirusowej, jak i nasileniu objawów zakażenia. (191) Wykazano, że u osób z alergicznym nieżytem nosa, po zakażeniu rynowirusem i prowokacji alergenem, nasilenie i czas trwania objawów przeziębienia był odwrotnie skorelowany z poziomem eozynofilów w popłuczynach nosa. (191) Wyniki innych badań nie potwierdzają tego związku. (143) Należy pamiętać, że pozorny brak eozynofilów w tkankach, czy opisana odwrotna korelacja pomiędzy eozynofilami i objawami zakażenia HRV, mogą być wynikiem z nadmiernego pobudzenia i degranulacji eozynofilów.

Eozynofile uczestniczą w mechanizmach odporności nieswoistej, jak również nabytej odporności immunologicznej jako komórki prezentujące antygen. Przyłączają cząsteczki rynowirusa. Jak wykazano, efekt ten jest zależny od GM-CSF i prawdopodobnie wynika ze

zwiększonej ekspresji cząsteczek ICAM-1 na powierzchni pobudzonych eozynofilów. Prezentacja antygenów wirusa limfocytom T przez eozynofile prowadzi do zwiększonej produkcji interferonu gamma. (110) Nie jest jasny udział receptorów Toll-like, znajdujących się na powierzchni eozynofilów, niemniej wykazano związek pobudzenia TLR-7 i TLR-8 ze zdolnością do przetrwania eozynofilów i ich aktywnością. (101)

Ponieważ znany jest wpływ kortykoterapii systemowej na poziom leukocytów i neutrofilów we krwi obwodowej porównano poziomy krwinek białych u osób z zakażeniem i bez zakażenia rynowirusem po wyłączeniu z analizy chorych otrzymujących te leki doustnie. Nadal istotna była zależność pomiędzy obecnością HRV, a limfocytami i poziomem neutrofilów we krwi obwodowej. Zależność pomiędzy zakażeniem a poziomem eozynofili bezwzględnej nie była już jednak znamienna. Wydaje się, że stosowanie glikokortykoidów systemowych nie miało wpływu na różnice w obrazie krwi między grupami, ponieważ w każdej z grup była podobna liczba osób otrzymujących takie leczenie (5 osób w grupie astmatyków HRV-dodatnich i 4 osoby w grupie HRV-ujemnych). Osłabienie opisanych powyżej zależności może wynikać ze zmniejszenia liczebności grup.

Obserwacja, że względnie bezobjawowa obecność rynowirusów w dolnych drogach oddechowych jest związana ze zmianami ogólnoustrojowymi, podobnymi do obserwowanych w zaostrzeniach choroby po zakażeniu HRV, sugeruje, że rynowirusy mogą powodować nie tylko zaostrzenia, lecz także wpływać na przebieg astmy poza okresami zaostrzeń. Przewlekłe zakażenie rynowirusami może nasilać przewlekły proces zapalny w oskrzelach, stopień przewlekłego zwężenia dróg oddechowych, czy steroidooporność chorych.

Porównując popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe u osób z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR *in situ* nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami w ich obrazie cytologicznym. Podobny brak zależności wykazano w przypadku metody immunohistochemicznej. Nie wykazano jednocześnie, aby obecność, jak i poziom eozynofilów w popłuczynach BAL korelował z obecnością, czy nasileniem zapalenia eozynofilowego w biopsjach błony śluzowej. Należy zaznaczyć, że odzysk płynu BAL po podaniu odoskrzelowym 200 ml soli fizjologicznej był indywidualnie zmienny. Nierówne objętości odzyskanego płynu mogą być powodem obserwowanego braku różnic w wynikach cytologicznych.

Znane są publikacje, których wyniki wskazują na zmiany obrazu cytologicznego BAL podczas zakażeń HRV. Jarjour i współpracownicy wykazali, że po 96 godzinach od eksperymentalnego zakażenia HRV16, wzrasta stężenie neutrofilów w porównaniu do wartości wyjściowych. (123) W innym badaniu odnotowano wzrost liczby eozynofilów w

czasie zakażenia po 48 godzinach od prowokacji z alergenem w BAL, a efekt ten utrzymywał się miesiąc po zakażeniu. (73) Nie odnaleziono badań opisujących zmiany obrazu BAL podczas bezobjawowego zakażenia HRV.

U badanych, kierowanych na diagnostyczną bronchoskopię pobierano również wycinki do rutynowego badania histopatologicznego. Opisywano zazwyczaj przewlekły proces zapalny. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania zmian zapalnych pomiędzy grupami HRV-dodatnią i HRV-ujemną. Ocena wycinków o niewielkich rozmiarach nie pozwoliła na zbadanie nasilenia zapalenia neutrofilowego, czy liczby limfocytów w biopsjach i porównanie z wynikami RT-PCR *in situ*, tak jak było to w przypadku eozynofiliów.

RT-PCR *in situ* porównano natomiast z obrazami radiologicznymi i tomograficznymi płuc. U 29% astmatyków z dodatnim wynikiem RT-PCR *in situ* opisywano także zmiany śródmiąższowe w płucach. Różnice między osobami zakażonymi i nie zakażonymi rynowirusem nie są istotne statystycznie. Aż 65% chorych na astmę z pozytywnym wynikiem RT-PCR *in situ* miało zmiany o charakterze pogrubień oskrzeli. Także w tym przypadku różnice między grupami nie są znamienne statystycznie.

Aczkolwiek rynowirusy uznawane są za łagodne patogeny przede wszystkim górnych dróg oddechowych, opisywano przypadki ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, z zapaleniem płuc włącznie, zwłaszcza u osób w starszym wieku lub z niedoborami odporności. (201) W jednym z badań aż 52% rezydentów domu opieki zakażonych HRV miało objawy ze strony dolnych dróg oddechowych, w tym zmiany osłuchowe nad płucami. Natomiast nieprawidłowości w przeglądowych radiogramach występowały rzadko. (70) W innym badaniu odsetek potwierdzonych radiologicznie zapaleń płuc wywołanych przez rynowirusy wśród pacjentów domów opieki społecznej wyniósł aż 30%, a śmiertelność sięgała 20%. (172) Zmiany o charakterze pogrubień oskrzeli są charakterystyczne dla astmy oskrzelowej i świadczą o przebudowie ich ściany (remodelingu). Obecność zakażenia HRV w dolnych drogach oddechowych łącznie ze zmianami oskrzelowymi w tomografii komputerowej u 65% osób może być wynikiem przypadku. Niemniej istnieją dowody, że HRV mogą przyczyniać się do remodelingu. Rynowirusy pobudzają komórki nabłonka dróg oddechowych do produkcji ważnych mediatorów przebudowy ścian oskrzeli, jak: VEGF (nasilający miejscową angiogenezę), TGF- β (o właściwościach profibrogennych i modulujących proces zapalny) oraz FGF, a ekspresja VEGF jest większa w środowisku atopowym. Przetrwale lub nawracające zakażenie rynowirusami może nasilać skutki ekspresji VEGF i prowadzić do rozwoju fenotypu astmy przewlekłej. (202) Rynowirusy działając cytotoksycznie na komórki, zwłaszcza w przypadku już wcześniej uszkodzonego nabłonka, zmniejszają ich zdolność do

odnowy i regeneracji. Upośledzając procesy naprawy mogą nasilać przebudowę ścian oskrzeli. (80) Niewykluczone, że przetrwałe zakażenie wirusem zmienia zachowanie komórek nabłonka, prowadząc do fenotypu permanentnej proliferacji, różnicowania w kierunku komórek produkujących śluz i przebudowy ścian oskrzeli. (26)

Nie wykazano statystycznie znamiennego związku pomiędzy zakażeniem rynowirusami, a obecnością innych mikroorganizmów w dolnych drogach oddechowych. Aczkolwiek aż u 64% spośród tych, u których wykonano zarówno badanie RT-PCR *in situ*, jak i pobrano materiał do badań bakteriologicznych stwierdzono współistnienie zakażenia rynowirusem i obecność bakterii w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych. Dane z piśmiennictwa potwierdzają, że zakażenie rynowirusem może predysponować do bakteryjnego zapalenia zatok. (44). Pitkaranta i współpracownicy stwierdzili współistnienie zakażeń bakteryjnych i HRV u 15% osób z ostrym zapaleniem zatok obocznych nosa. Mieszane zakażenia rynowirusem i bakteryjne pogarszają przebieg ostrego zapalenia ucha środkowego leczonego anybiotykami. (44, 61). Jak powszechnie wiadomo, nie zawsze obecność bakterii w popłuczynach z dolnych dróg oddechowych świadczy o zakażeniu, zwłaszcza przy braku objawów klinicznych. Jednocześnie wykrywane w BAL bakterie mogą pochodzić z górnych dróg oddechowych. Obecność RNA rynowirusa oceniana metodą RT-PCR *in situ* wydaje się zmniejszać ryzyko kontaminacji. (54)

Spośród 13 osób badanych w kierunku *Chlamydia pneumoniae* u pięciu stwierdzono obecność tego patogenu w popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelikowych. Badaniem RT-PCR *in situ* stwierdzono rynowirusy u trzech spośród tych pięciu osób, co stanowi 60% tych przypadków. *Pneumocystis carinii* wykryto w popłuczynach dróg oddechowych u jednej osoby, a grzybów u czterech (w tym dwie były również HRV-pozytywne). Mała liczba obserwacji nie pozwala na interpretację wyników.

Obraz mikroskopowy zakażenia rynowirusem

Uważa się, że zakażenie HRV typowo lokalizuje się w nabłonku. (47, 53, 54) W większości biopsji, w których możliwa była ocena morfologiczna wyników RT-PCR *in situ*, potwierdzono obecność dodatnich komórek w warstwie nabłonka dróg oddechowych. Często najsilniej barwiły się komórki położone w pobliżu błony podstawnej. Taka lokalizacja jest typowa dla komórek macierzystych, stanowiących rezerwę regeneracyjną nabłonka. Obecność sygnału pozytywnego przede wszystkim w tych komórkach jest zgodne z tezą, że komórki mniej niezróżnicowane są bardziej podatne na zakażenie rynowirusami. (80, 139)

RNA rynowirusów stwierdzono także w warstwie podnabłonkowej u zaskakująco dużej liczby osób. Barwny produkt reakcji obecny był często w strukturach przypominających gruczoły wydzielnicze, lub ich przewody, lecz nie tylko. Papadopolous i współpracownicy za pomocą hybrydyzacji *in situ*, a Mosser i współpracownicy metodą immunohistochemiczną potwierdzili obecność pojedynczych, zakażonych rynowirusem komórek podnabłonkowych. (47, 53, 54)

Niektórzy uważają, że gruczoły śluzowe mogą być miejscem replikacji wirusa, bowiem w czasie zakażeń HRV obserwuje się nadmierną produkcję wydzieliny śluzowo-surowiczej. (157) Ponieważ gruczoły to zespół komórek nabłonkowych wyspecjalizowanych w czynnościach wydzielniczych, zdolność rynowirusów do ich zakażenia wydaje się prawdopodobna. We wnętrzu gruczołów naturalne mechanizmy oczyszczania dróg oddechowych są gorsze (brak aparatu śluzowo-rzęskowego), co może sprzyjać przetrwaniu rynowirusów. Gruczoły podśluzówkowe dróg oddechowych są ważnym źródłem komórek progenitorowych, bardziej podatnych na zakażenie, które w przypadku uszkodzenia nabłonka przemieszczają się na powierzchnię i odbudowują uszkodzone warstwy nabłonka. (204) Zdolność do replikacji rynowirusa w gruczołach podśluzowych wykazał Yamada i współpracownicy na modelu *in vitro*. (157) Komórki gruczołowe w odpowiedzi na zakażenie produkowały: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , czy GM-CSF, obserwowano także zwiększoną ekspresję receptora ICAM-1.

HRV-dodatnie komórki odnajdowano sporadycznie w obrębie skrzepów krwi, jak i w skupieniach komórek nie związanych z podłożem, przypominających limfocyty. Niewiele jest wiadomo o zdolności rynowirusów do przebywania w komórkach krwi. Prawdopodobnie HRV mogą powodować krótkotrwałą wiremę. (50) Wiadomo również, że przyłączają się do eozynofiliów i monocytów. (110, 205) Funkcja makrofagów płucnych, obecność licznych cząsteczek ICAM-1 oraz receptora dla LDL sugerują, że rynowirusy mogą zakażać te komórki (także monocyty). W obecności HRV, komórki mononuklearne, monocyty, czy makrofagi produkują czynniki pozapalne, jak IL-8, IL-10, IL-12, TNF α i zmieniają ekspresję białek błonowych, jak CD 14, CD 80, CD 69. (78, 161, 98, 205, 206, 207, 208) Do niedawna nie było dowodów na to, że rynowirusy mogą przetrwać w tych komórkach. Badania *in vitro* wskazywały raczej na zdolność do ich aktywacji, lecz nie do replikacji wirusa. (205). Ostatnio udowodniono jednak, że jest możliwe aktywne namnażanie rynowirusów w makrofagach. (98) Nie wiadomo, czy HRV mogłyby zakażać limfocyty. Obserwowano jedynie, że po eksperymentalnych zakażeniach wzrasta liczba limfocytów CD3+, CD4+ oraz CD 8+ w błonie śluzowej oskrzeli, czemu towarzyszy obniżenie limfocytozy krwi obwodowej. (12)

Komórki dendrytyczne są również celem ataku wielu wirusów, a ich antygeny mogą przebywać w komórkach dendrytycznych miesiącami. (209, 210) Nie ma jednak dowodów na możliwość przetrwania rynowirusów w tych komórkach.

Ostatnio wykazano podatność na zakażenie HRV komórek mięśni gładkich ściany oskrzela. W odpowiedzi produkują IL-6, IL-8. (211)

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują istnienie dwóch różnych obrazów zakażenia rynowirusem. W pierwszym typie, „ogniskowym” obszary gromadzenia znacznika, zazwyczaj nieliczne i nieregularnie rozproszone w biopsji są dobrze odgraniczone od otoczenia. Drugi typ nazwano „rozlanym”, bowiem pozytywne były większe obszary tkanki, intensywność zabarwienia mniejsza, a granice tych obszarów słabo widoczne. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że zakażenie rynowirusem w dolnych drogach oddechowych jest nieregularne w dystrybucji, ze skupiskami zakażonych komórek, których jest niewiele. (47, 53, 54) Taki obraz odpowiada opisanemu w pracy zakażeniu „ogniskowemu”.

Nie odnaleziono publikacji, w której opisywano podobny obraz do zakażenia „rozlanego”. Powodem może być fakt, że przypomina on nieswoistą reakcję, tak zwane „tło”. Przeciwnie niespecyficznemu reakcji RT-PCR *in situ* przemawiają: utrzymywanie się tego obrazu pomimo wielokrotnie powtarzanych eksperymentów, prawidłowy wynik kontroli negatywnych oraz fakt uzyskania podobnych obrazów metodą immunohistochemiczną. W przypadku IHC nasilenie sygnału pozytywnego było często na granicy rozdzielczości oka badacza, część tych biopsji uznano za negatywne.

Za prawdziwością podziału zakażeń HRV na „ogniskowe” i „rozlane” przemawia także obecność znamienych statystycznie różnic pomiędzy tymi grupami w parametrach charakteryzujących proces zapalny. Stwierdzono znamienne statystycznie różnice w eozynofilii krwi obwodowej, jak i odsetku eozynofiliów w badaniu cytologicznym popłuczyn BAL. Osoby z ogniskowym zakażeniem miały znamienne mniejszą eozynofilię bezwzględną oraz nie stwierdzono u nich eozynofiliów w BAL-u. W rozmazie krwi obwodowej w tej grupie było znamienne mniej limfocytów i więcej neutrofilów. Być może te dwie postaci różnią się stopniem uwalniania rynowirusów z komórek do otoczenia, lub cytotoksycznością wirusa (która może zależeć od serotypu HRV). Różna dostępność antygenów dla komórek układu immunologicznego mogłaby powodować zmiany w odpowiedzi immunologicznej organizmu. „Rozlany” i „ogniskowy” obraz zakażenia może również odzwierciedlać różnice w sile wiązania sondy hybrydazyjnej do poszczególnych serotypów rynowirusów.

Wykrywanie rynowirusa u chorych na POChP

Metodą RT-PCR *in situ* wykazano obecność rynowirusów u zaskakująco dużego odsetka chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (71% badanych). Wynik ten jest znamieny statystycznie w porównaniu z uzyskanym dla grupy kontrolnej. W czasie pobierania materiału chorzy na POChP byli w okresie wolnym od ostrych objawów zakażenia.

Nieliczne badania opisują możliwość przetrwania wirusów w tej grupie chorych. (212) Wykazano, że DNA adenowirusa może przetrwać po ostrym zakażeniu, a antygen E1A ulega ekspresji na powierzchni komórek nabłonka dróg oddechowych długo po tym, jak wirus przestał się replikować, a objawy kliniczne zakażenia ustąpiły. Matsuse i współpracownicy opisywali większe ilości DNA dla białka E1A u palaczy z obturacją oskrzeli w porównaniu z grupą kontrolną. (213) Zdolność wirusów oddechowych, w tym rynowirusów do powodowania przewlekłego zakażenia u chorych na POChP potwierdzają Seemungal i współpracownicy. Stwierdzili oni obecność wirusów oddechowych w popłuczynach nosa u 35% osób w stabilnej fazie choroby. Zaobserwowali także, że w czasie zaostrzeń nie wzrasta liczba wykrywanych wirusów. Autorzy opisali także związek pomiędzy obecnością wirusów a ciężkością choroby. (19)

Duży odsetek HRV-dodatnich wyników może być następstwem większej podatności tej grupy na zakażenia. Osoby z POChP włączone do badania były znamienne starsze w porównaniu do astmatyków i grupy kontrolnej (średnia wieku w tej grupie 66 ± 9 lat), częściej paliły papierosy. Nikotynizm jest głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, jednocześnie wydaje się zwiększać ryzyko zakażeń HRV. Wpływ wieku, jak i palenia papierosów na zakażenia opisano powyżej. W grupie chorych na POChP byli wyłącznie mężczyźni, stwierdzono także znamienne niższe wartości FEV₁ i FVC w porównaniu do grupy kontrolnej. Może to wpływać na uzyskane wyniki.

U osób z POChP, podobnie jak u astmatyków stwierdzono zależność eozynofilii bezwzględnej od nasilenia zakażenia HRV (Tau Kendall, $\tau=1$, $p=0,0415$). Uznaje się, że zapalenie eozynofilowe jest bardziej charakterystyczne dla astmy oskrzelowej, natomiast w POChP przeważa zapalenie neutrofilowe. Wykazana zależność eozynofilii od obecności HRV w POChP może wskazywać, że zmiany eozynofilów w czasie zakażenia rynowirusem (lub ich nieprawidłowa funkcja) nie odnoszą się wyłącznie chorych na astmę.

W tej grupie chorych nie stwierdzono, aby zakażenie HRV powodowało zmiany wartości spirometrycznych, co jest zgodne z definicją tej choroby jako przewlekłej, nieodwracalnej

obturacy dróg oddechowych. Niemniej zbadano wyłącznie 7 osób i uzyskany brak znamienności statystycznej może wynikać z niewielkiej siły testu.

VI. Podsumowanie

1. Metodą RT-PCR *in situ* stwierdzono obecność rynowirusa w oskrzelach u dużego odsetka osób z astmą oskrzelową (73%), pomimo braku objawów klinicznych zakażenia i w stabilnym okresie choroby.
2. Częstość wykrywania HRV metodą RT-PCR *in situ* jest znamienne większa w grupie osób chorych na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej (73% vs 22%, $p < 0,001$)
3. Wyniki uzyskane dwiema metodami RT-PCR *in situ* i IHC są zgodne, niemniej mała liczba osób przebadanych drugą metodą nie pozwala na uzyskanie znamienności statystycznych.
4. Wykazano znamienny statystycznie związek pomiędzy obecnością rynowirusów w oskrzelach a:
 - a. niższymi wartościami spirometrycznymi, wskazującymi na obturację dróg oddechowych,
 - b. obrazem odsetkowym krwi obwodowej (wyższa leukocytoza, więcej granulocytów, mniej limfocytów, wyższa eozynofilia bezwzględna),
 - c. naciekami eozynofilowymi w błonie śluzowej oskrzeli,
 - d. częstszym stosowaniem GKS wziewnych i doustnych.
5. Zakażenie HRV obserwowano najczęściej w komórkach nabłonka oskrzeli, lecz także w komórkach warstwy podnabłonkowej błony śluzowej, strukturach przypominających gruczoły zewnątrzwydzielnicze, a także w nielicznych przypadkach w komórkach krwi.
6. Na podstawie mikroskopowego obrazu zakażenia HRV wyróżniono postać „ogniskową” i „rozlaną” zakażenia, w drugiej stwierdzono wyższą eozynofilię i limfocytozę krwi obwodowej, jak również obecność eozynofilów w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych.

VII. Streszczenie

Uzasadnienie tematu badawczego. Rynowirusy (HRV), powodujące typowe przeziębienia, są najczęstszą przyczyną zaostrzeń astmy oskrzelowej u osób dorosłych. Ich udział w patogenezie astmy przewlekłej nie został dotychczas wyjaśniony.

Cele. Naszym celem było zbadanie, czy astmatycy w okresie choroby wolnym od objawów zakażenia dróg oddechowych, mogą mieć rynowirusy w oskrzelach, a także porównanie częstości wykrywania HRV w grupie astmatyków i w grupie kontrolnej. Interesowało nas również, czy obecność HRV w dolnych drogach oddechowych ma związek z wybranymi parametrami klinicznymi, charakteryzującymi tę chorobę.

Metody. Do badania włączono 60 osób, w tym 30 astmatyków i 30 osób z grupy kontrolnej. Wycinki błony śluzowej oskrzeli pobierano podczas bronchoskopii od wszystkich astmatyków, a także ośmiu osób nie chorujących na astmę. Dwadzieścia dwie osoby z grupy kontrolnej poddane były operacji torakochirurgicznej. Zastosowano dwie metody wykrywania HRV w wycinkach oskrzeli: pośrednią RT-PCR *in situ* i pośrednią immunohistochemię (IHC). Komórki zakażone rynowirusem wykrywano za metodą IHC przy użyciu przeciwciała monoklonalnego RV16-7. Odwrotną transkrypcję *in situ* (RT) przeprowadzono z zastosowaniem startera wybranego z bazy VirOligo i zmodyfikowanego tak, aby wzmocnić jego homologię do sekwencji serotypów HRV2 i HRV16. Produkt reakcji zwielokrotniono przy pomocy PCR *in situ* z użyciem dwóch starterów, wybranych z bazy VirOligo. Następnie przeprowadzono hybrydyzację *in situ* z sondą genetyczną znakowaną digoksygeniną, zdenaturowaną w wysokiej temperaturze. Związaną sondę w wycinkach wykrywano metodą immunohistochemiczną z użyciem fragmentów Fab przeciwciał przeciwko digoksygeninie, koniugowanych z fosfatazą alkaliczną. Zakażenie HRV oceniano za pomocą skali punktowej 0-4.

Wyniki. Rynowirusy wykryto metodą IHC w 9 spośród 14 biopsji oskrzeli pobranych od astmatyków (64%) i 2 z 6 biopsji w grupie kontrolnej (33%), $p > 0,05$. Pośrednia RT-PCR *in situ* pozwoliła na wykrycie HRV w oskrzelach u 73% astmatyków i 22% osób z grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Osoby HRV-pozytywne miały niższe wyniki w testach spirometrycznych, więcej eozynofiliów, leukocytów, granulocytów we krwi obwodowej i eozynofiliów w błonie śluzowej oskrzeli. Wszystkie biopsje pobrane od astmatyków z nadwrażliwością na aspirynę były HRV RNA-pozytywne ($p = 0,08$ vs astmatycy tolerujący aspirynę). Komórki HRV-dodatnie uwidoczniło w nabłonku dróg oddechowych, w

niezidentyfikowanych komórkach położonych podnabłonkowo, lecz także w obrębie struktur morfologicznie przypominających gruczoły podnabłonkowe. Silnie pozytywne wyniki dały również komórki przypominające limfocyty. Wyróżniono dwa obrazy zakażenia HRV w obrębie błony śluzowej oskrzeli. Pierwszy odpowiadał dobrze odgraniczonym obszarom gromadzenia barwnika i został nazwany zakażeniem ogniskowym. Drugi nazwano rozlanym, ponieważ barwnik widoczny był w całym wycinku, bez widocznych granic. Dwie grupy badanych, wyselekcjonowane na podstawie tych obrazów histologicznych różniły się liczbą eozynofików i limfocytów we krwi obwodowej oraz liczbą eozynofików w popłuczynach BAL.

Wnioski: Astmatycy mogą mieć rynowirusy w dolnych drogach oddechowych pomimo braku objawów klinicznych zakażenia. Obecność HRV w oskrzelach jest znamienne częstsza u chorych na astmę niż w grupie kontrolnej. Wykrycie rynowirusów wiązało się z objawami klinicznymi odpowiadającymi cięższymi postaciami astmy.

VIII. Summary

Rationale. Human rhinovirus (HRV), the common cold virus is the most frequent cause of asthma exacerbations in adults. A possible contribution of HRV to the pathogenesis of chronic, persistent asthma has not been defined.

Objectives. Our objectives were to determine if stable asthmatic patients, who are free of clinical symptoms of a respiratory infection, can harbor HRV in their bronchi, and to compare the frequency of HRV detection between asthmatic and non-asthmatic subjects. We also were concerned whether clinical features of asthma are associated with the presence of HRV.

Methods. 60 patients were enrolled: 30 asthmatic patients and 30 controls. Mucosal biopsies were obtained by fiberoptic bronchoscopy in all asthmatic subjects and eight control subjects. Twenty two non-asthmatic controls underwent pulmonary surgery. Two methods of HRV detection in bronchial mucosa were used: indirect RT-PCR *in situ* method and indirect immunohistochemistry (IHC). HRV infected cells were identified by indirect IHC using monoclonal antibody RV16-7. Reverse transcription *in situ* (RT) was performed using universal reverse primer, selected from VirOligo database and modified to strengthen primer homology to HRV 2 and HRV 16 sequence. The product of reverse transcription reaction was then amplified using *in situ* PCR methods and primers selected from VirOligo database. The heat-denatured digoxigenin-labelled probe was hybridized *in situ*. The attached probe was detected by immunohistochemistry using anti-DIG Fab fragments conjugated with alkaline phosphatase. Rhinovirus detection was scored using 0 to 4 point scale.

Results. HRV was found by IHC in 9 of 14 bronchial biopsies from asthmatic subjects (64%) and 2 of 6 non-asthmatic controls (33%), $p > 0.05$. Indirect RT-PCR *in situ* method detected HRV in the mucosal biopsies of 73% of asthmatic patients and 22% non-asthmatic controls ($p < 0.001$). Subjects positive for HRV had lower pulmonary function tests, higher numbers of blood eosinophils, leukocytes, granulocytes, and eosinophilic infiltration in bronchial mucosa. All biopsies from asthmatic patients with aspirin hypersensitivity had HRV RNA-positive staining ($p = 0.08$ vs. aspirin tolerant asthmatic subjects). HRV-positive cells were found in bronchial epithelium, in unidentified cells of subepithelial layer, but also in structures similar to subepithelial glands. Morphologically non-identified cells, similar to lymphocytes gave strong positive results. Two different patterns of staining within bronchial mucosa were found. One was limited to well-delineated mucosal areas therefore was named localized. The second pattern of staining was diffuse, because the staining was seen

throughout the section without any confined areas. These two different patterns differed in numbers of blood eosinophils and lymphocytes and numbers of eosinophils in BAL fluid.

Conclusions. Asthmatic patients, who are free of clinical symptoms can harbor HRV in the lower airways. The presence of HRV in bronchial tissue is significantly more common in asthmatic than in non-asthmatic subjects. Presence of HRV was associated with clinical features of more severe disease.

IX. Piśmiennictwo

1. Mäkela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomquist S, Hyypiä T, Arstila P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 539-542
2. Arruda E, Pitkäranta A, Witek TJ, Doyle CA, Hayden FG. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2864-2868
3. Hayden FG. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol* 2004; 14: 17-31
4. Johnston SL. Overview of virus-induced airway disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 150-156
5. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PAB, Bartlett NW, Keadze T, Patrick Mallia, Stanciu LA, Parker HL, Slater L, Lewis-Antes A, Kon OM, Holgate ST, Davies DE, Kotenko SV, Papi A, Johnston SL. Role of deficient type III interferon- λ production in asthma exacerbations. *Nature Medicine* 2006; 12: 1023-1026
6. Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 201: 937-947
7. Johnston SL. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jul;4 (3): 267-270
8. Holgate TH. Rhinoviruses in the pathogenesis of asthma: the bronchial epithelium as a major disease target. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 587-590
9. Gern JE, Brooks D, Meyer P, Chang A, Shen K, Evans MD, Tisler C, DaSilva D, Roberg KA, Mikus LD, Rosenthal LA, Kirk CJ, Shult PA, Bhattacharya A, Li Z, Gangnon R, Lemanske RF. Bidirectional interactions between viral respiratory illnesses and cytokine responses in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 72-78
10. Kirchberger S, Majdic O, Stockl J. Modulation of the immune system by human rhinoviruses. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 142: 1-10
11. Papadopoulos NG, Xepapadaki P, Mallia P, Brusselle G, Watelet JB, Xatzipsalti M, Foteinos G, van Druhen CM, Fokkens WJ, D'Ambrosio C, Bonini S, Bossios A, Lotvall J, van Cauwenberge P, Holgate ST, Canonica GW, Szczeklik A, Rohde G, Kimpen J, Pitkaranta A, Makela M, Chanez P, Ring J, Johnston SL. Mechanisms of virus-induced asthma exacerbations: state-of-the-art. A GA2LEN and InterAirways document. *Allergy* 2007; 62: 457-470
12. Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 879-886
13. Walter MJ, Morton JD, Kajiwara N, Agapov E, Holtzman MJ. Viral induction of a chronic asthma phenotype and genetic segregation from the acute response. *J Clin Invest* 2002; 110: 165-175
14. Holtzman MJ, Tyner JW, Kim EY, Lo MS, Patel AC, Shornick LP, Agapov E, Zhang Y. Acute and chronic airway responses to viral infection implications for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 132-140
15. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE.

- Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 571-577
16. Kling S, Donniger H, Williams Z, Vermeulen J, Weinberg E, Latiff K, Ghildyal R, Bardin P. Persistence of rhinovirus RNA after asthma exacerbation in children. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 672-678
 17. Tan WC, Xiang X, Qiu D, Ng TP, Lam SF, Hegele RG. Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease. *J Med* 2003; 115: 272-277
 18. Marin J, Jeler-Kaacar D, Levstek V, Maacek V. Persistence of viruses in upper respiratory tract of children with asthma. *J Infect* 2000; 41: 69-72
 19. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, MacCallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1618-1623
 20. Pitkaranta A, Roivainen M, Blomgren K, Peltola J, Kaijalainen T, Raty R, Ziegler T, Ronkko E, Hatakka K, Korpela R, Poussa T, Leinonen M, Hovi T. Presence of viral and bacterial pathogens in the nasopharynx of otitis-prone children. A prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 647-654
 21. Szczeklik A. Aspirin-induced asthma as a viral disease. *Clin Allergy* 1988; 18: 15-20
 22. Loens K, Goossens H, de Laat C, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, Sillekens P, Ieven M. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 166-171
 23. Szczeklik A, Nizankowska E. Clinical features and diagnosis of aspirin induced asthma. *Thorax* 2000; 55: 42-44
 24. Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2006
 25. Global strategy for asthma management and prevention. National Heart, Lung and Blood Institute. NIH Publication No. 02-3659, 2004. www.ginaasthma.com
 26. Robbins, SL.; Cotran, RS. Pathologic basis of disease. Saunders, Filadelfia, 1994
 27. Holtzman MJ, Morton JD, Shornick LP, Tyner JW, O'Sullivan MP, Antao A, Lo M, Castro M, Walter MJ. Immunity, inflammation, and remodeling in the airway epithelial barrier: epithelial-viral-allergic paradigm. *Physiol Rev* 2002; 82: 19-46
 28. Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FE. Middleton's allergy: principles and practice. Mosby, Filadelfia, 2003
 29. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 913-921
 30. Kasper L, Sladek K, Duplaga M, Bochenek G, Liebhart J, Gladysz U, Malolepszy J, Szczeklik A. Prevalence of asthma with aspirin hypersensitivity in the adult population of Poland. *Allergy* 2003; 58: 1064-1066
 31. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J* 2000; 16: 432-436
 32. Nizankowska E, Bestynska-Krypel A, Cmiel A, Szczeklik A. Oral and bronchial provocation tests with aspirin for diagnosis of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J* 2000;15: 863-869

33. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgetics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *Br Med J* 1975; 1: 67-69
34. Qin N, Zhang S-P, Reitz TL, Mei JM, Flores CM. Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1298-1305
35. Yoshida S, Sakamoto H, Yamawaki Y, Shoji T, Akahori K, Onuma K, Nakagawa H, Hasegawa H, Amayasu H. Effect of acyclovir on bronchoconstriction and urinary leukotriene E4 excretion in aspirin-induced asthma. *J Allerg Clin Immunol* 1998; 102: 909-914
36. Sladek K, Dworski R, Soja J, Sheller JR, Nizankowska E, Oates JA, Szczeklik A. Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 940-946
37. Szczeklik A, Sladek K, Dworski R, Nizankowska E, Soja J, Sheller J, Oates J. Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1608-1614
38. Cowburn AS, Sladek K, Soja J, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, Lam BK, Penrose JF, Austen FK, Holgate ST, Sampson AP. Overexpression of Leukotriene C4 Synthase in Bronchial Biopsies from Patients with Aspirin-intolerant Asthma. *J Clin Invest* 1998; 101: 834-846
39. Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Black C, Markendorf A, Schmitz-Schumann M, Lee TH. Urinary leukotriene E4 after lysine-aspirin inhalation in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1531-1534
40. Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin induced asthma. *Lancet* 1997; 350: 1599-1600
41. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C 4 synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 290-296
42. Arruda E, Boyle TR, Winther B, Pevear DC, Gwaltney JM Jr, Hayden FG. Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization. *J Infect Dis* 1995; 171: 1329-1333
43. Pitkaranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Hayden FG. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1998; 102: 291-295
44. Pitkäranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1791-1793
45. Pitkaranta A, Puhakka T, Makela MJ, Ruuskanen O, Carpen O, Vaheri A. Detection of rhinovirus RNA in middle turbinate of patients with common colds by in situ hybridization. *J Med Virol* 2003; 70: 319-323
46. Pitkaranta A, Roivainen M, Blomgren K, Peltola J, Kaijalainen T, Raty R, Ziegler T, Ronkko E, Hatakka K, Korpela R, Poussa T, Leinonen M, Hovi T. Presence of viral and bacterial pathogens in the nasopharynx of otitis-prone children. A prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 647-654
47. Mosser AG, Vrtis R, Burchell L, Lee W-M, Dick CR, Weisshaar E, Bock D, Swenson CA, Cornwell RD, Meyer KC, Jarjour NN, Busse WW, Gern JE. Quantitative and qualitative analysis of rhinovirus infection in bronchial tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(6): 645-651

48. Rihkanen H, Carpen O, Roivainen M, Vaheri A, Pitkaranta A. Rhinovirus in adenoid tissue. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004; 68: 903-908
49. Suvilehto J, Roivainen M, Seppänen M, Meri S, Hovi T, Carpen O, Pitkaranta A. Rhinovirus/enterovirus RNA in tonsillar tissue of children with tonsillar disease. *Journal of Clinical Virology* 2006; 35: 292-297
50. Xatzipsalti M; Kyra S; Tsoia M; Psarras S, Bossios A, Laza-Stanca V, Johnston SL, Papadopoulos NG. Rhinovirus viremia in children with respiratory infections. *Am J Resp Crit Care Med* 2005; 172: 1037-1040
51. Papadopoulos NG, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *J Med Virol* 1999; 58: 100-104- abstrakt
52. Papadopoulos NG, Papi A, Psarras S, Johnston SL. Mechanisms of rhinovirus-induced asthma. *Paediatr Resp Rev* 2004; 5: 255-260
53. Mosser AG, Brockman-Schneider R, Amineva S, Burchell L, Sedgwick JB, Busse WW, Gern JE. Similar frequency of rhinovirus-infectible cells in upper and lower airway epithelium. *J Infect Dis* 2002; 185: 734-743
54. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 2000; 181: 1875-1884
55. Gwaltney JM. Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections. *Am J Med.* 2002; 112: 13-18
56. Dolin R, Wright PF. *Viral infections of the respiratory tract.* Marcel Dekker, Nowy Jork, 1999
57. Gwaltney JM. Rhinovirus infection of the normal human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 36-39
58. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-986
59. Greenberg Sb, Allen M, Wilson J, Atmar RL. Respiratory Viral Infections in Adults With and Without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 167-173
60. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsoia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, Gourgiotis D, Kafetzis D. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Resp Crit Care Med* 2002; 165: 1285-1289
61. Sung BS, Chonmaitree T, Broemeling LD, Owen MJ, Patel JA, Hedgpeth DC, Howie VM. Association of rhinovirus infection with poor bacteriologic outcome of bacterial-viral otitis media. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 38-42
62. Gwaltney JM, Phillips CD, Miller RD, Riker DK. Computed tomographic study of the common cold. *N Engl J Med* 1994; 330: 25-30
63. Pitkaranta A, Starck M, Savolainen S, Poyry T, Suomalainen I, Hyypia T, Carpen O, Vaheri A. Rhinovirus RNA in the maxillary sinus epithelium of adult patients with acute sinusitis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 909-911
64. Collinson J, Nicholson KG, Cancio E, Ashman J, Ireland DC, Hammersley V, Kent J, O'Callaghan C. Effects of upper respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1996; 51: 1115-1122
65. Ghosh S, Champlin R, Couch R, Englund J, Raad I, Malik S, Luna M, Whimbey E. Rhinovirus infections in myelosuppressed adult blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 528-532
66. Van Elden LJR, van Kraaij MGJ, Nijhuis M, Hendriksen KAW, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, van Loon AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 177-183

67. Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. *J Infect Dis* 2002; 185: 1338-1341
68. Greenberg SB. Respiratory consequences of rhinovirus infection. *Arch Int Med*. 2003; 163: 278-284
69. Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, Cancio E. Risk factors for lower respiratory complications of rhinovirus infections in elderly people living in the community: prospective cohort study. *BMJ* 1996; 313: 1119-1123
70. Wald TG, Shult P, Krause P, Miller BA, Drinka P, Gravenstein S. A rhinovirus outbreak among residents of a long-term care facility. *Ann Int Med* 1995; 123: 588-593
71. Gern JE, Calhoun W, Swenson C, Shen G, Busse WW. Rhinovirus infection preferentially increases lower airway responsiveness in allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1872-1876
72. Lemanske RF Jr, Dick EC, Swenson CA, Vrtis RF, Busse WW. Rhinovirus upper respiratory infection increases airway hyperreactivity and late asthmatic reactions. *J Clin Invest* 1989; 83: 1-10
73. Calhoun WJ, Dick EC, Schwartz LB, Busse WW. A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J Clin Invest* 1994; 94: 2200-2208
74. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, Platts-Mills TA, Heymann PW. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 785-790
75. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161: 1501-1507
76. Bossios A, Papadopoulos NG. Viruses and asthma exacerbations. *Breathe* 2006; 3: 51-58
77. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002; 359: 831-834
78. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* 2002; 57: 328-332
79. Whiteman SC, Bianco A, Knight RA, Spiteri MA. Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity. *J Biol Chem* 2003; 278: 11954-11961
80. Bossios A, Psarras S, Gourgiotis D, Skevaki CL, Constantopoulos AG, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG. Rhinovirus infection induces cytotoxicity and delays wound healing in bronchial epithelial cells. *Respir Res* 2005; 6: 114
81. Inoue D, Yamaya M, Kubo H, Sasaki T, Hosoda M, Numasaki M, Tomioka Y, Yasuda H, Sekizawa K, Nishimura H, Sasaki H. Mechanisms of mucin production by rhinovirus infection in cultured human airway epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 154: 484-499
82. Johnston SL, Sanderson G, Pattemore PK, Smith S, Bardin PG, Bruce CB, Lambden PR, Tyrrell DAJ, Holgate ST. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 111-117
83. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DAJ, Holgate ST. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-1228

84. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med. Virol* 2004; 72: 695-699
85. Lee WM, Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T, Jakiela B, Lemanske RF, Shult PA, Gern JE. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS ONE* 2007 2: 966
86. Cooney MK, Fox JP, Kenny GE. Antigenic Groupings of 90 Rhinovirus Serotypes. *Infection and Immunity* 1982; 37: 642-647
87. Andries K, Dewindt B, Snoeks J, Wouters L, Moereels H, Lewi PJ, Janssen PA. Two groups of rhinoviruses revealed by a panel of antiviral compounds present sequence divergence and differential pathogenicity. *J Virol.* 1990; 64: 1117-1123
88. Vlasak M, Roivainen M, Reithmayer M, Goesler I, Laine P, Snyers L, Hovi T, Blaas D. The minor receptor group of human rhinovirus (HRV) includes HRV23 and HRV25, but the presence of a lysine in the VP1 HI loop is not sufficient for receptor binding. *J Virol* 2005; 79: 7389-7395
89. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol* 2002; 83: 333-340
90. Piekarowicz A. Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004
91. Brian BWJ, Kangro HO. Virology methods manual. Academic Press, 1996
92. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. Krótkie wykłady. Genetyka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003
93. Bates PJ, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. A comparison of RT-PCR, in-situ hybridisation and in-situ RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections. *J Virol Met* 1997; 67: 153-160
94. Nuovo, G J. The foundation of successful RT in situ PCR. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1: 4-15
95. Morel G, Berger M, Ronsin B, Recher S, Ricard-Blum S, Mertani HC, Lobie PE. In situ reverse transcription-polymerase chain reaction. Applications for light and electron microscopy. *Biol Cell* 1998; 90: 137-154
96. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard MZ, Oppenheim JJ. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528
97. Gołęb J, Jakóbisiak M, Lasek W. Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002
98. Laza-Stanca V, Stanciu LA, Message SD, Edwards MR, Gern JE, Johnston SL. Rhinovirus replication in human macrophages induces NF-kappaB-dependent tumor necrosis factor alpha production. *J Virol* 2006; 80: 8248-8258
99. van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 2005; 201: 1281-1292
100. Phipps S, Lam CE, Mahalingam S, Newhouse M, Ramirez R, Rosenberg HF, Foster PS, Matthaei KI. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood* 2007; 110: 1578-1586

101. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of toll-like receptors in eosinophils: Activation by toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003; 171: 3977-3982
102. Curtis JL. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 412-416
103. www.lerner.ccf.org/labs/williams
104. Deszcz L, Gaudernak E, Kuechler E, Seipelt J. Apoptotic events induced by human rhinovirus infection. *J Gen Virol* 2005; 86: 1379-1389
105. Martin JG, Siddiqui S, Hassan M. Immune responses to viral infections: relevance for asthma. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7: 125-127
106. Diebold SS, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531
107. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fouquerolles A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11: 263-270
108. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529
109. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005; 79: 12273-12279
110. Handzel ZT, Busse WW, Sedgwick JB, Vrtis R, Lee WM, Kelly EA, Gern JE. Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cell. *J Immunol* 1998; 160: 1279-1284
111. Harizi H, Gualde N. Pivotal role of pge2 and il-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 271-277
112. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007; 3: 277-284
113. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 841-855
114. Seymour ML, Gilby N, Bardin PG, Fraenkel DJ, Sanderson G, Penrose JF, Holgate ST, Johnston SL, Sampson AP. Rhinovirus infection increases 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in bronchial biopsy specimens from nonatopic subjects. *J Infect Dis* 2002; 185: 540-544
115. Gentile DA, Fireman F, Skoner DP. Elevations of local leukotriene C4 levels during viral upper respiratory tract infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91: 270-274
116. Grunberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC, Hiemstra PS, Sterk PJ. Experimental rhinovirus 16 infection effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 609-616
117. Schroth MK, Grimm E, Frindt P, Galagan DM, Konno SI, Love R, Gern JE. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 1220-1228
118. Gern JE. Rhinovirus respiratory infections and asthma. *Am J Med* 2002; 112: 19-27
119. Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 267-273

- 120.Hall DJ, Bates ME, Guar L, Cronan M, Korpi N, Bertics PJ. The role of p38 MAPK in rhinovirus-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by monocytic-lineage cells. *J Immunol* 2005; 174: 8056–8063
- 121.Gern JE, French DA, Grindle KA, Brockman-Schneider RA, Konno S, Busse WW. Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 731-737
- 122.Sanders SP, Proud D, Permutt S, Siekierski ES, Yachechko R, Liu MC. Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 697-702
- 123.Jarjour NN, Gern JE, Kelly EA, Swenson CA, Dick CR, Busse WW. The effect of an experimental rhinovirus 16 infection on bronchial lavage neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1169-1177
- 124.Meusel TR, Imani F. Viral induction of inflammatory cytokines in human epithelial cells follows a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent but NF- B-independent pathway. *J Immunol* 2003, 171: 3768-3774
- 125.Bowerfind WM, Fryer AD, Jacoby DB. Double-stranded RNA causes airway hyperreactivity and neuronal M2 muscarinic receptor dysfunction. *J Appl Physiol* 2002; 92: 1417-1422
- 126.Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 9-18
- 127.Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* 2000; 68: 6511-6518
- 128.Turner RB, Wecker MT, Pohl G, Witek TJ, McNally E, St. George R, Winther B, Hayden FG. Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection. A randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 281: 1797-1804
- 129.Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H, Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H. Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1113-1118
- 130.Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555
- 131.British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee, a Subcommittee of the Standards of Care Committee of the British Thoracic Society. *Thorax* 2001; 56: 1-21
- 132.<http://virologo.okstate.edu>
- 133.Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkaranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002; 66: 417-420
- 134.Harju TH, Leinonen M, Nokso-Koivisto J, Korhonen T, Raty R, He Q, Hovi T, Mertsola J, Bloigu A, Ryttila P, Saikku P. Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* 2006; 61: 579–584
- 135.Teichtahl H, Buckmaster N, Pertnikovs E. The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. *Chest* 1997; 112: 591-96
- 136.Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003; 187: 1314-1318

- 137.Jang YJ, Kwon HJ, Park HW, Lee BJ. Detection of rhinovirus in turbinate epithelial cells of chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 2006; 20: 634-636
- 138.Kaiser L, Aubert JD, Pache JC, Deffernez C, Rochat T, Garbino J, Wunderli W, Meylan P, Yerly S, Perrin L, Letovanec I, Nicod L, Tapparel C, Soccacal PM. Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1392-1399
- 139.Lopez-Souza N, Dolganov G, Dubin R, Sachs LA, Sassina L, Sporer H, Yagi S, Schnurr D, Boushey HA, Widdicombe JH. Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 373-381
- 140.Manolitsas ND, Trigg CJ, McAulay AE, Wang JH, Jordan SE, D'Ardenne AJ, Davies RJ. The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the β 1-integrins in asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 1439-1444
- 141.Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased nf-kb-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; 274: 9707-9720
- 142.Brooks GD, Buchta KA, Swenson CA, Gern JE, Busse WW. Rhinovirus-induced interferon and airway responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1091-1094
- 143.Gern JE, Vrtis R, Grindle KA, Swenson C, Busse WW. Relationship of upper and lower airway cytokines to outcome of experimental rhinovirus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2226-2231
- 144.Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 796-802
- 145.Hiscott J. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 1028-1030
- 146.Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8459-8464
- 147.Thompson AJV, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol* 2007 ;85: 435-445
- 148.Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825
- 149.Shi HZ, Qin XJ. CD4CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy* 2005; 60: 986-995
- 150.de Kluijver J, Grunberg K, Pons D, de Klerk EPA, Dick CR, Sterk PJ, Hiemstra PS. Interleukin-1b and interleukin-1ra levels in nasal lavages during experimental rhinovirus infection in asthmatic and non-asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1415-1418
- 151.Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, Whitehead BF, Gibson PG. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 433-439
- 152.Ishizuka S, Yamada M, Suzuki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis* 2003; 188: 1928-1939
- 153.Passariello C, Schippa S, Conti C, Russo P, Poggiali F, Garaci E, Palamara AT. Rhinoviruses promote internalisation of *Staphylococcus aureus* into non-fully permissive cultured pneumocytes. *Microbes Infect* 2006; 8: 758-766
- 154.Broide DH, Humber D, Sullivan S, Sriramarao P. Inhibition of eosinophil rolling and recruitment in P-selectin- and intracellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Blood* 1998; 91: 2847-2856

155. Broide DH, Sullivan S, Gifford T, Sriramarao P. Inhibition of pulmonary eosinophilia in P-selectin- and ICAM-1-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 218-225
156. Grunberg K, Sharon RF, Hiltermann TJ, Brahim JJ, Dick EC, Sterk PJ, Van Krieken JH. Experimental rhinovirus 16 infection increases intercellular adhesion molecule-1 expression in bronchial epithelium of asthmatics regardless of inhaled steroid treatment. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1015-1023
157. Yamada M, Sezikawa K, Suzuki T, Yamada N, Furukawa M, Ishizuka S, Nakayama K, Terajima M, Numazaki Y, Sasaki H. Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am J Physiol* 1999; 277: 362-371
158. Piela-Smith TH, Aneiro L, Korn JH. Binding of human rhinovirus and T cells to intercellular adhesion molecule-1 on human fibroblasts. Discordance between effects of IL-1 and IFN-gamma. *J Immunol* 1991; 147: 1831-1836
159. Gern JE, Joseph B, Galagan DM, Borchering WR, Dick EC. Rhinovirus inhibits antigen-specific T cell proliferation through an intercellular adhesion molecule-1-dependent mechanism. *J Infect Dis.* 1996; 174: 1143-1150
160. Peng T, Kotla S, Bumgarner RE, Gustin KE. Human rhinovirus attenuates the type I interferon response by disrupting activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 2006; 80: 5021-5031
161. Stockl J, Vetr H, Majdic O, Zlabinger G, Kuechler E, Knapp W. Human major group rhinoviruses downmodulate the accessory function of monocytes by inducing IL-10. *J Clin Invest* 1999; 104: 957-965
162. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsacker F, Thimme R. T cells with a cd4+cd25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific cd8⁺ t cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7867
163. Koga T, Sardina E, Tidwell RM, Pelletier M, Look DC, Holtzman MJ. Virus-inducible expression of a host chemokine gene relies on replication-linked mRNA stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96, 5680-5685
164. Busse W, Jack Elias J, Dean Sheppard D, And Susan Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1035-1042
165. Sampath D, Castro M, Look DC, Holtzman MJ. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J Clin Invest* 1999; 103: 1353-1361
166. Dakhama A, Park J, Taube C, Chayama K, Balhorn A, Joetham A, Wei X, Fan R, Swasey C, Miyahara N, Kodama T, Alvarez A, Takeda K, Gelfand EW. The role of virus-specific immunoglobulin E in airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 952-959
167. Welliver RC, Sun M, Hildreth SW, Arumugham R, Ogra PL. Respiratory syncytial virus-specific antibody responses in immunoglobulin a and e isotypes to the f and g proteins and to intact virus after natural infection. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 295-299
168. Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J Suppl* 2003; 44: 24-29
169. Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of STAT2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 2005; 79: 9315-9319
170. Wedzicha JA. Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 115-120

- 171.Falsey AR, Treanor JJ, Betts RF, Walsh EE. Viral respiratory infections in the institutionalized elderly: clinical and epidemiologic findings. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40: 115-119- abstrakt
- 172.Louie JK, Yagi S, Nelson FA, Kiang D, Glaser CA, Rosenberg J, Cahill CK, Schnurr DP. Rhinovirus outbreak in a long term care facility for elderly persons associated with unusually high mortality. *Clin Infect Dis*. 2005 ;41: 262-265
- 173.Blomqvist S, Skytta A, Roivainen M, Hovi T. Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2813-2816
- 174.Hyypia T, Puhakka T, Ruuskanen O, Makela M, Arola A, Arstila P. Molecular diagnosis of human rhinovirus infections: comparison with virus isolation. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2081-2083
- 175.Bardin PG, Johnston SL, Sanderson G, Robinson BS, Pickett MA, Fraenkel DJ, Holgate ST. Detection of rhinovirus infection of the nasal mucosa by oligonucleotide in situ hybridization. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1994; 10: 207-213
- 176.Atmar RL, Guy E, Guntupalli KK, Zimmerman JL, Bandi VD, Baxter BD, Greenberg SB. Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults. *Arch Intern Med* 1998; 158: 2453-2459
- 177.Pitkaranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1791-1793
- 178.Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Human rhinoviruses. *Paediatr Respir Rev* 2003; 4: 91-98
- 179.Patterson LJ, Hamparian VV. Hyper-Antigenic Variation Occurs with Human Rhinovirus Type 17. *J Virol* 1997; 71: 1370-1374
- 180.Cooney MK, Kenny GE, Tam R, Fox JP. Cross relationships among 37 rhinoviruses demonstrated by virus neutralization with potent monotypic rabbit antisera. *Infection and Immunity* 1973; 7: 335-340
- 181.Mogabgab WJ, Holmes BJ, Pollock B. Antigenic relationships of common rhinovirus types from disabling upper respiratory illnesses. *Dev Biol Stand* 1975; 28: 400-411- abstrakt
- 182.Oehling AG, Akdis CA, Schapowal A, Blaser K, Schmitz M, Simon HU. Suppression of the immune system by oral glucocorticoid therapy in bronchial asthma. *Allergy* 1997; 52: 144-154
- 183.Gustafson LM, Proud D, Hendley JO, Hayden FG, Gwaltney JM. Oral prednisone therapy in experimental rhinovirus infections. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1009-1014
- 184.Grunberg K, Sharon RF, Sont JK, In 't Veen JC, Van Schadewijk WA, De Klerk EP, Dick CR, Van Krieken JH, Sterk PJ. Rhinovirus-induced airway inflammation in asthma: effect of treatment with inhaled corticosteroids before and during experimental infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1816-1822
- 185.Venarske DL, Busse WW, Griffin MR, Gebretsadik T, Shintani AK, Minton PA, Peebles RS, Hamilton R, Weisshaar E, Vrtis R, Higgins SB, Hartert TV. The relationship of rhinovirus-associated asthma hospitalizations with inhaled corticosteroids and smoking. *J Infect Dis* 2006; 193: 1536-1543- abstrakt
- 186.Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 713-719- abstrakt
- 187.Szczeklik A. Origin of aspirin-induced asthma. *Agents Actions* 1989; 28: 27-39
- 188.Steer SA, Moran JM, Christmann BS, Maggi LB, Corbett JA. Role of MAPK in the regulation of double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus-induced cyclooxygenase-2 expression by macrophages. *J Immunol* 2006, 177: 3413-3420

189. Stanley ED, Jackson GG, Panusarn C, Rubenis M, Dirda V. Increased virus shedding with aspirin treatment of rhinovirus infection. *JAMA* 1975, 231; 1248-1251
190. Duff AL., Pomeranz ES, Gelber LE, Price GW, Farris H, Hayden FG, Platts-Mills TA, Heymann PW. Risk factors for acute wheezing in infants and children: viruses, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics* 1993; 92: 535-540
191. Avila PC, Abisheganaden JA, Wong H, Liu J, Yagi S, Schnurr D, Kishiyama JL, Boushey HA. Effects of allergic inflammation of the nasal mucosa on the severity of rhinovirus 16 cold. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 923-932
192. Grunberg K, Timmers MC, de Klerk EP, Dick EC, Sterk PJ. Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1375-1380
193. de Kluijver J, Grunberg K, Sont JK, Hoogeveen M, van Schadewijk WAAM, de Klerk EPA, Dick CR, van Krieken JHJM, Sterk PJ. Rhinovirus infection in nonasthmatic subjects: effects on intrapulmonary airways. *Eur Respir J* 2002; 20: 274-279
194. Skoner DP, Doyle WJ, Seroky J, Van Deusen MA, Fireman P. Lower airway responses to rhinovirus 39 in healthy allergic and nonallergic subjects. *Eur Respir J*, 1996, 9, 1402-1406
195. Vianna EO, Westcott J, Martin RJ. The effects of upper respiratory infection on T-cell proliferation and steroid sensitivity of asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 592-597
196. Volonaki E, Psarras S, Xepapadaki P, Psomali D, Gourgiotis D, Papadopoulos NG. Synergistic effects of fluticasone propionate and salmeterol on inhibiting rhinovirus-induced epithelial production of remodelling-associated growth factors. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1268-1273
197. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 737-743
198. Wark PA, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J* 2002; 19: 68-75
199. Message SD, Johnston SL. The immunology of virus infection in asthma. *Eur Respir J* 2001; 18: 1013-1025
200. Niimi K, Asano K, Shiraishi Y, Nakajima T, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Suzuki Y, Fukunaga K, Shiomi T, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Natori Y, Matsumoto M, Seya T, Yamaya M, Ishizaka A. TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol* 2007; 178: 489-495
201. Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Kolarova L, Nicod LP, Rochat T, Kaiser L. Respiratory viruses and severe lower respiratory tract complications in hospitalized patients - clinical investigations in critical care. *Chest* 2004; 125: 1033-1039
202. Psarras S, Volonaki E, Skevaki CL, Xatzipsalti M, Bossios A, Pratsinis H, Tsigkos S, Gourgiotis D, Constantopoulos AG, Papapetropoulos A, Saxoni-Papageorgiu P, Papadopoulos NG. Vascular endothelial growth-factor-mediated induction of angiogenesis by human rhinoviruses. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 291-297
203. Turner BW, Cail WS, Hendley JO, Hayden FG, Doyle WJ, Sorrentino JV, Gwaltney JM. Physiologic abnormalities in the paranasal sinuses during experimental rhinovirus cold. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 474-478

204. Puchelle E, Peault B. Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration. *Respir Res* 2000; 1: 125-128
205. Gern JE, Dick EC, Lee WM, Murray S, Meyer K, Handzel ZT, Busse WW. Rhinovirus enters but does not replicate inside monocytes and airway macrophages. *J Immunol* 1996; 156: 621-627
206. Gern JE, Vrtis R, Kelly EA, Dick EC, Busse WW. Rhinovirus produces nonspecific activation of lymphocytes through a monocyte-dependent mechanism. *J Immunol* 1996, 157: 1605-1612
207. Johnston SL, Papi A, Monick MM, Hunninghake GW. Rhinoviruses induce interleukin-8 mRNA and protein production in human monocytes. *J Infect Dis* 1997, 175: 323-329
208. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. Rhinovirus-induced alterations on peripheral blood mononuclear cell phenotype and costimulatory molecule expression in normal and atopic asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 537-542
209. Welsh RM, Selin LK, Szomolanyi-Tsuda E. Immunological memory to infections. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 711-743
210. Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 1996; 183: 2259-2269
211. Oliver BGG, Johnston SL, Baraket M, Burgess JK, Nicholas J. C. King NJC, Roth M, Lim S, Black JL. Increased proinflammatory responses from asthmatic human airway smooth muscle cells in response to rhinovirus infection. *Respir Res* 2006; 7: 71
212. Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 71-75
213. Matsuse T, Hayashi S, Kuwano K, Keunecke H, Jefferies WA, Hogg JC. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 177-184

X. Załączniki

Lista tabel, rysunków, wykresów

Rycina 1. Budowa otoczki ludzkich rynowirusów. Z lewej rekonstrukcja budowy kapsydu wirusa (HRV 16) w oparciu o badania krystalograficzne, kolorami zaznaczono poszczególne podjednostki; po prawej rekonstrukcja rynowirusa 14 z wyraźnie przedstawionymi „kanionami” oraz zaznaczonymi miejscami antygenowymi. http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNNApicorna.html	15
Rycina 2. Schemat budowy RNA rynowirusa z zaznaczeniem miejsc kodujących kolejne białka rynowirusa.	16
Rycina 3. Kolejne etapy wykrywania RNA rynowirusa: odwrotna transkrypcja oraz reakcja PCR.	19
Rycina 4. Kolejne etapy reakcji pośredniej RT-PCR <i>in situ</i>	21
Rycina 5. Zależności pomiędzy patogenem i gospodarzem. Za: (127).....	32
Rycina 6. Fragmenty sekwencji wybranych serotypów rynowirusów (HRV2 oraz HRV16) z zaznaczeniem miejsc przyłączenia starterów.	41
Rycina 7. Elektroforeza na żelu agarozowym produktu reakcji PCR. Amplifikowany fragment odpowiada odcinkowi cDNA o długości 537 par zasad (linia środkowa). Po lewej wzorec wielkości DNA (pBR322/AluI), po prawej próbka bez matrycy – kontrola ujemna.....	43
Rycina 8. Fragment plazmidowego DNA z wbudowanym produktem reakcji PCR. Na rycinie zaznaczono miejsca przyłączenia starterów M13, jak i miejsce przecinane przez enzym EcoR I (rycina z materiałów udostępnionych przez producenta, Invitrogen).	50
Rycina 9. Sekwencja sondy hybrydizacyjnej stosowanej do wykrycia RNA rynowirusów w metodzie RT-PCR <i>in situ</i>	52
Rycina 10. Porównanie średnich wartości wybranych parametrów spirometrycznych w grupie chorych z dodatnim oraz z ujemnym wynikiem RT-PCR <i>in situ</i> ; chorzy na astmę łącznie z grupą kontrolną.	60
Rycina 11. Obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzela, uzyskane za pomocą pośredniej RT-PCR <i>in situ</i> . Kolor purpurowy odpowiada miejscom z dodatnim wynikiem reakcji (strzałki). A,C,D- nabłonek oskrzeli, wynik dodatni, B-nabłonek oskrzeli, kontrola negatywna, E- okrągłe struktury widoczne podnabłonkowo, morfologicznie odpowiadające gruczołom, wynik pozytywny, F- limfocytopodobne komórki w okolicy wycinka błony śluzowej oskrzela, wynik silnie dodatni.	72
Rycina 12. Przykładowe obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzela, uzyskane za pomocą pośredniej RT-PCR <i>in situ</i> . A - obraz zakażenia opisywany jako „rozlany”, B – typ „ogniskowy”.....	74
Rycina 13. Przykładowe obrazy mikroskopowe wycinków błony śluzowej oskrzeli, uzyskane za pomocą pośredniej immunohistochemii. A, B - pojedyncze komórki, w których stwierdza się obecność antygeny rynowirusa (kolor brązowy); C - kontrola pozytywna; zakażone HRV 16 komórki linii Hela, D - kontrola negatywna; komórki Hela niezakażone.	76
Tabela 1. Funkcje wybranych mediatorów procesu zapalnego.....	23
Tabela 2. Charakterystyka grup włączonych do badania.	54
Tabela 3. Liczba dodatnich wyników badania na obecność HRV w oskrzelach, ocenianych metodami: pośredniej RT-PCR <i>in situ</i> oraz pośredniej immunohistochemii.....	55
Tabela 4. Porównanie średnich wartości spirometrycznych w grupach z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR <i>in situ</i>	58

Tabela 5. Wyniki korelacji nieparametrycznych pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem w dolnych drogach oddechowych, ocenianym w skali 6-stopniowej na podstawie RT-PCR <i>in situ</i> , a wartościami wskaźników spirometrycznych.	59
Tabela 6. Porównanie średniej liczby leukocytów i ich subpopulacji w grupach z dodatnim i ujemnym wynikiem RT-PCR <i>in situ</i>	61
Tabela 7. Wyniki korelacji nieparametrycznych pomiędzy nasileniem zakażenia rynowirusem w dolnych drogach oddechowych, a obrazem leukocytów krwi obwodowej.	63
Tabela 8. Porównanie obrazu cytologicznego popłuczyn BAL astmatyków z dodatnim i ujemnym wynikiem badania w kierunku HRV (RT-PCR <i>in situ</i> lub IHC).	66
Tabela 9. Wyniki przeszukiwania bazy BLAST, odnalezione sekwencje wykazujące podobieństwo do zastosowanej w metodzie RT-PCR <i>in situ</i> sondy genetycznej.	78

Wykres 1. Ilorazy szans obecności rynowirusa w oskrzelach chorych na astmę oskrzelową w porównaniu z grupą kontrolną, wyniki dla pośredniej RT-PCR <i>in situ</i> i IHC.	56
Wykres 2. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV (RT-PCR <i>in situ</i>) i eozynofilii krwi obwodowej (skala logarytmiczna), zależność jest znamienna statystycznie ($p < 0,05$).	65
Wykres 3. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV i liczby eozynofilów w tkance; RT-PCR <i>in situ</i> , zależność jest znamienna statystycznie ($p < 0,05$).	69
Wykres 4. Wykres zależności nasilenia zakażenia HRV i liczby eozynofilów w tkance, metoda immunohistochemiczna, zależność jest znamienna statystycznie ($p < 0,05$).	70

Indeks skrótów

AIA	astma z nadwrażliwością na aspirynę (<i>ASA-induced asthma, ASA-intolerant asthma, ASA-induced asthma</i>)
APC	Komórki prezentujące antygen (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ASA	Aspiryna
ATA	Astma bez nadwrażliwości na aspirynę (<i>Aspirin Tolerant Asthma</i>)
BAL	Popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe (<i>Bronchoalveolar lavage</i>)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan, substrat barwnej reakcji
bp	Pary zasad
CD	Cząsteczki CD (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	Komplementarny DNA (<i>complementary DNA</i>)
COX	Cyklooksygenaza
CT	Tomografia komputerowa (<i>Computed tomography</i>)
CXCL-5	Chemokina wiążąca ligand CXC 5 (<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5 Protein, Epithelial-Cell-Derived Neutrophil Attractant-78</i>)
DAB	Chromogen, 3,3'-diaminobenzodyna
DC	Komórki dendrytyczne (<i>Dendritic cell</i>)

dsRNA	Dwuniciowa cząsteczka RNA (<i>Double-stranded RNA</i>)
EcoR I	Enzym restrykcyjny ze szczepu RY13 E.coli
ECP	Eozynofilowe białko kationowe (<i>Eosinophil cationic protein</i>)
EGF	Czynnik wzrostu nabłonka (<i>Epidermal growth factor</i>)
eIF-2	Czynnik inicjujący syntezę białka (<i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i>)
ELISA	Test immunoenzymatyczny (<i>Enzyme-linked immunoassay</i>)
FADD	Związane z Fas białko adaptorowe z domeną śmierci (<i>Fas associated protein with death domain</i>)
Fas	Receptor błonowy regulujący apoptozę (CD95, Apo-1)
FasL	Ligand dla receptora Fas na wyzwalający apoptozę (CD178, CD95 ligand, Fas ligand)
FcγRI, FcγRII, FcγRIII	Receptory dla IgG o wysokim i niskim powinowactwie
FcεRI	Receptor dla IgE o wysokim powinowactwie (<i>High affinity IgE Fc receptor</i>)
FcεRII	Receptor dla IgE o niskim powinowactwie (<i>Low affinity IgE Fc receptor</i>)
FEF	Natężony przepływ wydechowy (<i>Forced expiratory flow</i>)
FEV1	Natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa (<i>Forced expiratory volume in 1 second</i>)
FGF	Czynnik wzrostu fibroblastów
G-CSF	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GINA	Światowa Strategia Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Astmy (<i>Global Initiative for Astma, Global Strategy For Asthma Management And Prevention</i>)
GKS	Glikokortykosteroidy
GM-CSF	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GOLD	Światowa Strategia Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Przewlekłej Obturacyjnej Choroby Płuc (<i>The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>)
HRV	Rynowirus (<i>Human Rhinovirus</i>)
ICAM-1	Cząsteczka adhezji międzykomórkowej (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)

IFN	Interferony
Ig (IgA, IgE)	Immunoglobuliny: klasy A, E
IHC	Metoda immunohistochemiczna
IKK	Kinazy czynnika I κ B (<i>IκB kinases</i>)
IL	Interleukiny
IP-10	Chemokina indukowana interferonem (<i>Interferon-inducible protein</i>)
IPS-1	Stymulator promotora IFN- β (<i>IFN-β-promoter stimulator 1</i>)
IRES	Wewnętrzne miejsce inicjacji transkrypcji
IRF	Czynniki regulujące produkcję interferonu (<i>IFN-regulatory factors</i>)
I κ β	Inhibitor kappa B
LAK	Limfocyty LAK (<i>Lymphokine-activated killer cells</i>)
LDLR	Receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (<i>Low density lipoprotein receptor</i>)
LFA-1	Antygen związany z czynnością limfocytów-1 (<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i>)
5-LO	5-lipoksygenaza (<i>5-lipoxygenase</i>)
LT	Limfocyt T
LTB	Leukotrien B
LTC ₄ S	Syntaza leukotrienu C ₄ (<i>Leukotriene C₄ synthase</i>)
LTE	Leukotrien E
LTh	Limfocyty pomocnicze
Mac-1	Antygen makrofagów 1 (<i>Macrophage-1 antigen</i>)
MAPK	Aktywowana mitogenem kinaza białkowa (<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>)
MCP-1	Białko chemotaktyczne dla monocytów (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDA-5	Helikaza RNA, białko związane z różnicowaniem komórek czerniaka 5 (<i>Melanoma differentiation associated protein-5</i>)
MHC	Główny układ zgodności tkankowej (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MHC I	Główny układ zgodności tkankowej klasy I
MHC II	Główny układ zgodności tkankowej klasy II
mRNA	Matrycowe RNA
MyD88	Cząsteczka adaptorowa dla domeny TIR receptorów TLR, Białko

	różnicowania szpiku 88 (<i>Myeloid differentiation factor 88</i>)
NANC	Układ nie-adrenergiczny, nie-cholinergiczny (<i>Non-adrenergic non-cholinergic</i>)
NFκB	Czynnik transkrypcyjny (<i>Nuclear factor-kappa B</i>)
NK	Komórka naturalny zabójca (<i>Natural Killer</i>)
NLPZ, NSAID	Niesteroidowe leki przeciwzapalne (<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
NTR	Region nie podlegający translacji (<i>Nontranslated region</i>)
OPN	Osteopontyna
PAF	Czynnik aktywujący płytki (<i>Platelet-activating factor</i>)
PBS	Izotoniczny roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Płytkowy czynnik wzrostu (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PEF	Szczytowy przepływ wydechowy (<i>Peak expiratory flow</i>)
PGE	Prostaglandyna E
PKR	Kinaza białkowa R (<i>Protein kinase RNA-activated</i>)
POChP	Przewlekła obturacyjna choroba płuc
PRR	Receptory rozpoznające wzorzec (<i>Pattern-recognition Receptors</i>)
RANTES	Chemokiny uwalniane między innymi przez limfocyty T, nabłonek (<i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted, CCL5</i>)
RAST	Test radioalergosorpcji (<i>Radio-allergosorbent test</i>)
RIG-I	Helikaza RNA, (<i>Retinoid-inducible gene protein 1</i>)
RNA	Kwas rybonukleinowy
RPM	Obroty na minutę
RSV	Wirus syncytium nabłonka oddechowego (<i>Respiratory syncytial virus</i>)
RT	Reakcja odwrotnej transkrypcji (<i>Reverse Transcription</i>)
RT-PCR	Odwrotna transkrypcja i reakcja łańcuchowej polimerazy
SARM	Cząsteczka adaptorowa dla domeny TIR receptorów TLR (<i>Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein</i>)
SSC	Roztwór cytrynianu sodu w soli fizjologicznej
STAT	Czynniki transkrypcyjne, przekaźniki sygnału i aktywacji transkrypcji (<i>Signal transducers and activators of transcription</i>)
TBK1	Kinaza TBK-1 (NFκB-activating kinase protein, <i>TANK-binding kinase 1</i>)

	<i>protein)</i>
TBS	Roztwór płuczający, stosowany w immunohistochemii (<i>Tris buffered saline</i>)
TCR	Receptor komórek T (<i>T-cell receptor</i>)
TGF	Czynnik wzrostu nowotworów (<i>Tumor Growth Factor</i>)
Th ₁	Limfocyty pomocnicze typu 1, odpowiedź immunologiczna podlegająca kontroli przez te limfocyty
Th ₂	Limfocyty pomocnicze typu 2, odpowiedź immunologiczna podlegająca kontroli przez te limfocyty
Th ₃	Subpopulacja komórek T o właściwościach regulatorowych, wydzielająca TGF-β
TIRAP	Cząsteczka adaptorowa dla domeny TIR receptora TLR (<i>MyD88 adaptor-like, TIR-associated protein</i>)
TLR	Receptory Toll-podobne (<i>Toll-like Receptors</i>)
TNF	Czynnik martwicy nowotworów (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAF	Czynnik związany z receptorem dla TNF (<i>TNF receptor associated factor</i>)
TRIF	Cząsteczka adaptorowa dla domeny TIR receptorów TLR (<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta protein, TICAM-1</i>)
TRAM	Cząsteczka adaptorowa dla domeny TIR receptorów TLR (<i>TRIF-related adapter molecule, Toll receptor associated molecule</i>)
Treg	Komórki T regulatorowe
VC	Pojemność życiowa (<i>Vital capacity</i>)
VCAM-1	Śródbłonkowy czynnik adhezji komórek 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	Bardzo późny antygen 4, cząsteczka adhezyjna (<i>Very Late Activation Antigen-4</i>)
VLDLR	Receptor dla lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (<i>Very low density lipoprotein receptor</i>)
VP1- 4	Białka kapsydu rynowirusa VP1, VP2, VP3, VP4
VPg	Białko związane z końcem 5'RNA wirusów (<i>Viral protein genome-linked</i>)

Odczynniki

1. Izolacja RNA

0,9% roztwór NaCl

chloroform (Sigma-Aldrich)

alkohol izopropylowy (Sigma-Aldrich)

alkohol etylowy 75%

woda destylowana

odczynnik Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen)

2. Odwrotna transkrypcja (RT)

bufor reakcyjny 5x (AMV Reverse Transcriptase Buffer 5x, Amresco)

odwrotna polimeraza (AMV Reverse Transcriptase, Amresco)

starter R (TIB Molbiol)

dNTPs 10 mM (MBI Fermentas)

inhibitor RNAz (RNase inhibitor, Amresco)

3. Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)

bufor reakcyjny 10x (Finnzymes):

startery: R oraz F (TIB Molbiol, Poznań)

dNTPs 10 mM (MBI Fermentas)

polimeraza DNA 2 U/mikroL (Finnzymes)

4. Elektroforeza

żel agarozowy:

0,8% roztwór agarozy (Sigma-Aldrich) w buforze TAE

bufor TAE 50x :

242 g Tris

57,1 ml kwas octowy (0,04 M Tris-acetate)

37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O (0,002 M EDTA)

pH 8,5

bromek etydyny 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich)

pBR 322 DNA/ AluI 0,4 mg/ml (MBI Fermentas)

6x Loading Dye (MBI Fermentas)

5. Znakowanie sondy

dNTP znakowane digoksygeniną (PCR DIG labeling mix, Boehringer Ingelheim)

6. Izolacja i oczyszczanie produktów reakcji PCR

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

7. Pośrednia RT-PCR *in situ*

DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma-Aldrich)

Ksylen (POC)

Etanol 95%; Etanol 75%; Etanol 50%

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)

PBS:

NaCl 8,7 g

KH₂PO₄ 0,272 g

Na₂HPO₄ 1,136 g

pH- 7,4

na litr wody DEPC

proteinaza K (Finnzymes)

bufor dla proteiny K:

0,5 ml 1 M Tris-HCL pH- 7,5

93 mg EDTA

2,5 ml 10% SDS

na 50 ml wody DEPC

trietanoloamina (TEA, POC)

bezwodnik octowy (POC)

20x SSC:

NaCl- 17,55 g;

8,823 g cytrynianu sodu na 100 ml wody destylowanej

RT, PCR

reakcje wykonywano za pomocą wcześniej opisanych odczynników

bufor hybrydyzacyjny:

50% formamid (Sigma-Aldrich)

cytrynian sodu (2xSSC)

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; pH-7

1 mM EDTA (Sigma-Aldrich)

bufor maleinowy:

0,1 M kwas maleinowy (POC)

0,15 M NaCl

pH- 7,5

roztwór płuczący:

0,3% Tween 20 (Sigma) w buforze maleinowym

roztwór blokujący:

1% Bloking Reagent (Boehringer Ingelheim)

0,1 M kwas maleinowy

zestaw do wykrywania znakowanych DIG kwasów nukleinowych:

DIG Nucleid Acid Detection Kit (Boehringer Ingelheim)

roztwór wykrywający:

0,1 M Tris-HcL 1 ml 1M

0,1 M NaCl 0,2 ml 5M

0,05M MgCl₂ 0,5 ml 1M do 10 ml wody destylowanej

roztwór BCIP:

BCIP (Boehringer Ingelheim)

rozcieńczone 1:50 w roztworze wykrywającym

8. Metody immunohistochemiczne

TBS:

0.05M Tris Base

0,9% NaCl

pH 7,6

roztwór blokujący peroksydazę (Peroxidized 1, Medical Biocare)

roztwór blokujący (Terminator, Medical Biocare)

rozpuszczalnik pierwotnych przeciwciał (Van Gogh Yellow,
Medical Biocare)

przeciwciało RV16-7 – Laboratorium Alergii i Immunologii Uniwersytetu Wisconsin w
Madison

przeciwciało EG2 (Pharmacia Diagnostics AB)

biotynylowane kozie przeciwciało przeciw-mysie IgG (Biotinylated goat anti-mouse IgG,
Medical Biocare)

kompleks streptawidyna-HRP (Streptavidin-HRP 250, Medical Biocare)

tetrachlorowodorek 3,3-diaminobenzyny (DAB, Medical Biocare)

zieleń metylowa (Methyl green counterstain, Medical Biocare)

9. Klonowanie

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

roztwór LB:

2 tabletki LB broth (Sigma-Aldrich)

woda destylowana do 100 ml

50 ug/ml kanamycyny (Invitrogen)

podłoże do hodowli bakterii:

4 tabletki LB-agar (Sigma-Aldrich)

200 ml wody

50 ug/ml kanamycyny (Invitrogen)

X-gal (Invitrogen)

IPTG (Invitrogen)

Plazmid Miniprep (A&A Biotechnology)

ECORI (Invitrogen)

10. Sekwencjonowanie

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Żel poliakrylamidowy:

4 ml 40% akrylamidu ACRYL/BIS 29:1 (Amresco),

14,4 g mocznika,

5 ml buforu TBE 10x,

20 µl TEMED (Amersham Pharmacia-Biotech),

200 µl 10% APS (Invitrogen)

woda destylowana do 40 ml

Bufor TBE 10x:

121,1 g Tris

51,32 g boric acid

3,72 g EDTA