

Bogdan Jakieła

**Wpływ deksametazonu na reaktywność limfocytów
krwi obwodowej u chorych na ciężką i trudną
astmę oskrzelową**

Praca doktorska

Promotor pracy:
Dr hab. Marek Sanak

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

Kraków, 2007

Podziękowania

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Markowi Sanakowi, Kierownikowi Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej Collegium Medicum UJ, za cenne rady podczas projektowania badania i olbrzymią pomoc w trakcie wykonywania części eksperymentalnej. Dziękuję za wyrozumiałość i opiekę na każdym etapie powstawania tej pracy.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikiowi, Kierownikowi II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ za wszechstronną pomoc w trakcie całego badania.

Dziękuję Pani Doktor Grażynie Bochenek i pracownikom Ambulatorium II KChW, którzy pomogli mi w rekrutacji chorych i analizie klinicznej. Bez ich ogromnego zaangażowania wykonanie tej pracy nie byłoby możliwe.

Dziękuję również całemu Zespołowi Laboratorium II Katedry Chorób Wewnętrznych za pomoc podczas przeprowadzenia części doświadczeń, inspirujące dyskusje i fantastyczną atmosferę.

Dziękuję moim Rodzicom za cierpliwość i wsparcie.

Bogdan Jakięła

Spis treści

1	Wykaz skrótów	5
2	Wprowadzenie.....	8
2.1	Zapalenie i remodeling w astmie oskrzelowej.....	8
2.2	Klasyfikacja kliniczna i fenotypy astmy	9
2.3	Astma ciężka i trudna	10
2.4	Fenotypy astmy ciężkiej	11
2.5	Mechanizmy molekularne działania glikokortykosteroidów	13
2.6	Działanie przeciwzapalne GCS	18
2.7	Wpływ GCS na różnicowanie i funkcje limfocytów regulatorowych.....	19
2.8	Względna i prawdziwa steroidooporność w astmie oskrzelowej.....	21
2.9	Kontrowersyjna rola izoformy GR β w powstawaniu steroidooporności	23
3	Hipoteza badawcza	27
4	Cele pracy	27
5	Materiał i metody	28
5.1	Kryteria włączenia do badania i charakterystyka grup	28
5.2	Pobranie materiału i plan badania	30
5.3	Immunofenotypowanie limfocytów krwi obwodowej	32
5.3.1	Markery i przeciwciała.....	32
5.4	Izolacja limfocytów krwi obwodowej i stymulacja <i>ex vivo</i>	33
5.4.1	Izolacja komórek PBL metodą separacji w gradiencie gęstości.....	34
5.4.2	Ocena ekspresji antygenów aktywacyjnych limfocytów T	34
5.4.3	Wpływ deksametazonu na aktywację limfocytów	36
5.4.4	Ocena tempa proliferacji.....	36
5.5	Ocena wpływu deksametazonu na apoptozę limfocytów	39
5.6	Ocena ekspresji izoform receptora glikokortykosteroidowego	40
5.6.1	Izolacja całkowitego RNA i pomiar stężenia	40
5.6.2	Projektowanie starterów reakcji PCR.....	41
5.6.3	Reakcja odwrotnej transkrypcji	42
5.6.4	Optymalizacja reakcji PCR.	43
5.6.5	Przygotowanie standardów DNA izoformy GR α	44
5.6.6	PCR w czasie rzeczywistym.....	44
5.6.7	Ocena ekspresji mRNA GR α	45
5.6.8	Ilościowa ocena produktów konwencjonalnej reakcji PCR GR β	49
5.6.9	Przygotowanie standardu GR β	51
5.6.10	Sposób analizy danych dla oceny ekspresji GR β	52
5.7	Analiza statystyczna	54

6	Wyniki	56
6.1	Charakterystyka kliniczna pacjentów biorących udział w badaniu	56
6.1.1	Fenotypy astmy	57
6.1.2	Stopień nasilenia astmy i objawy choroby	60
6.1.3	Wyniki badań spirometrycznych	62
6.1.3	Porównanie badanych grup	64
6.2	Immunofenotyp limfocytów krwi obwodowej	67
6.3	Limfocyty aktywowane CD3/CD69+	67
6.4	Limfocyty CD4/CD25+	68
6.5	Aktywacja limfocytów <i>in vitro</i>	71
6.5.1	Prolifерacja limfocytów <i>in vitro</i>	72
6.5.2	Aktywacja limfocytów	73
6.6	Apoptoza limfocytów w hodowlach <i>in vitro</i>	77
6.7	Ekspresja izoform receptora GR	79
7	Dyskusja	84
7.1	Kryteria kwalifikacji do badania	84
7.2	Steroidozależność w ciężkiej astmie	87
7.3	Wpływ GCS na aktywację limfocytów	88
7.3.1	GCS hamują proliferację limfocytów u chorych z astmą steroidozależną	89
7.3.2	Wpływ GCS na ekspresję IL-2RA u chorych z ciężką astmą	90
7.3.3	Wpływ GCS na ekspresję CD69 i MHCII	91
7.3.4	GCS silnie hamują ekspresję CD40L	94
7.4	Duża wrażliwość na apoptozę limfocytów chorych z astmą steroidozależną	95
7.5	Ekspresja izoformy GR β nie zwiększa się w PBMC chorych z astmą steroidozależną	97
7.6	GCS indukują limfocyty Treg produkujące IL-10 oraz Treg CD4/CD25+	104
7.7	Indukcja limfocytów CD4/CD25+ u chorych z astmą steroidozależną	105
7.8	Wysoki poziom ekspresji GR α jednym z warunków indukcji Treg	106
7.9	Czy względna steroidooporność w astmie wynika z zaburzeń różnicowania limfocytów aTreg? Fakty i hipotezy	107
7.10	Podsumowanie	108
8	Wnioski	110
9	Streszczenie	111
10	Dodatki	117
10.1	Kwestionariusz ACD	117
11	Piśmiennictwo	118

1 Wykaz skrótów

7-AAD	<i>7-aminoaktynomycyn-D</i>	7-aminoaktynomycyna-D
ACD	<i>asthma control diary</i>	kwestionariusz objawowy ACD
AF-1	<i>transactivation domain AF-1</i>	domena transaktywacyjna AF-1
AF-2	<i>transactivation domain AF-2</i>	domena transaktywacyjna AF-2
AIA	<i>aspirin intolerant asthma</i>	astma przebiegająca z nadwrażliwością na aspirynę
AMV RT	<i>avian myeloblastosis virus reverse transcriptase</i>	odwrotna transkryptaza wirusa ptasiej mieloblastozy
AP-1	<i>activator protein-1</i>	białko aktywatorowe-1
ASA	<i>acetylsalicylic acid</i>	kwask acetylosalicylowy
ATA	<i>aspirin tolerant asthma</i>	astma bez współistniejącej nietolerancji aspiryny
aTreg	<i>adaptive regulatory T-cell</i>	limfocyty-T regulatorowe indukowalne
ATS	<i>American Thoracic Society</i>	Amerykańskie Towarzystwo Chorób Klatki Piersiowej
BAL	<i>broncho-alveolar lavage</i>	popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
b.d.		brak danych
bp	<i>DNA base pair</i>	par zasad DNA
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	białko wiążące CREB
CD40L	<i>CD40 ligand</i>	ligand CD40
cDNA	<i>complementary DNA</i>	komplementarne DNA
CI	<i>confidence interval 95%</i>	przedział ufności 95%
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>	cyklooksygenaza-2
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
CT	<i>threshold cycle</i>	cykl progowy
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i>	antygen cytotoksycznych limfocytów-T -4
DBD	<i>DNA-binding domain</i>	domena wiążąca DNA
DC	<i>dendritic cell</i>	komórka dendrytyczna
ddH₂O	<i>double-distilled H₂O</i>	woda redestylowana
DEX	<i>dexamethasone</i>	deksametazon
EC₅₀	<i>effective concentration 50%</i>	stężenie wywołujące 50% obserwowanego efektu
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>	białko kationowe eozynofilów
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	nabłonkowy czynnik wzrostu
FCS	<i>fetal calf serum</i>	płodowa surowica cielęca
FEV₁	<i>1-second forced expiratory volume</i>	nasiloną objętość wydechowa 1-sekundowa
FITC	<i>fluorescein-5-isothiocyanate</i>	izotiocyanian-5-fluoresceiny
FLS	<i>FACS lysing solution</i>	roztwór lizujący/utrwalający FLS
FOXP3	<i>forkhead-winged helix transcription factor-3</i>	czynnik transkrypcyjny FOXP3
FSC	<i>forward scatter</i>	detektor wielkości obiektów w cytometrze
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>	białko wiążące GATA -3
GCS	<i>glucocorticoids</i>	glikokortykosteroidy
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>	Światowa Inicjatywa Zwalczania Astmy
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>	czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów i makrofagów
GR	<i>glucocorticoid receptor</i>	receptor glikokortykosteroidowy

GRE	<i>glucocorticoid response element</i>	element odpowiedzi na glikokortykosteroidy
GRIP1	<i>glucocorticoid receptor interacting protein -1</i>	białko oddziałujące z receptorem glikokortykosteroidowym -1
GRα	<i>α-isoform of glucocorticoid receptor</i>	izoforma- α receptora glikokortykosteroidowego
GRβ	<i>β-isoform of glucocorticoid receptor</i>	izoforma- β receptora glikokortykosteroidowego
HAT	<i>histone acetyltransferase</i>	acetylotransferaza histonowa
HDAC	<i>histone deacetylase</i>	deacetylaza histonowa
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>	antygeny ludzkich leukocytów
Hsp	<i>heat-shock protein</i>	białko szoku termicznego
ICAM-1	<i>intercellular cell adhesion molecule-1</i>	cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1
IE+		indeks ekspresji frakcji komórek dodatnich
IFNγ	<i>interferone γ</i>	interferon γ
IgE	<i>immunoglobulin E</i>	immunoglobulina E
IL-1	<i>interleukin-1</i>	interleukina-1
IL-10	<i>interleukin-10</i>	interleukina-10
IL-11	<i>interleukin-11</i>	interleukina-11
IL-12	<i>interleukin-12</i>	interleukina-12
IL-13	<i>interleukin-13</i>	interleukina-13
IL-1R2	<i>interleukin-1 receptor type 2</i>	receptor interleukiny-1 typu 2
IL-2	<i>interleukin-2</i>	interleukina-2
IL-2R	<i>interleukin-2 receptor</i>	receptor interleukiny-2
IL-3	<i>interleukin-3</i>	interleukina-3
IL-4	<i>interleukin-4</i>	interleukina-4
IL-5	<i>interleukin-5</i>	interleukina-5
IL-6	<i>interleukin-6</i>	interleukina-6
IL-8	<i>interleukin-8</i>	interleukina-8
iNKT	<i>invariant natural killer T cell</i>	komórka NKT typu invariant
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>	indukowalna syntaza tlenu azotu
I-κB	<i>NF-κB inhibitor protein</i>	białko hamujące czynnik NF- κ B
LBD	<i>ligand binding domain</i>	domena wiążąca ligand
LTC₄	<i>leukotriene C₄</i>	leukotrien C ₄
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>	kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny
MBP	<i>major basic protein</i>	główne białko zasadowe
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>	białko chemotaktyczne monocytów-1
MHCII	<i>major histocompatibility complex class II</i>	główny układ zgodności tkankowej klasy II
MIP-1α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>	białko zapalne makrofagów-1 α
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase-9</i>	metaloproteinaza macierzy-9
MnFL	<i>mean fluorescence</i>	średnia fluorescencja
mRNA	<i>messenger RNA</i>	matrycowy RNA
MT	<i>MitoTracker Dye</i>	barwnik MitoTracker
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>	czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów-T
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>	czynnik jądrowy- κ B
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>	Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>	sygnał lokalizacji jądrowej
NO	<i>nitric oxide</i>	tlenek azotu
NR3C1	<i>nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>	gen receptora GR
NS	<i>non-significant</i>	brak istotności statystycznej

nTreg	<i>naturally occuring regulatory T-cell</i>	limfocyty-T regulatorowe naturalnie występujące
OR	<i>odds ratio</i>	iloraz szans
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i>	limfocyty krwi obwodowej
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej
PCD	<i>programmed cell death</i>	zaprogramowana śmierć komórki
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	reakcja łańcuchowa polimerazy
PE	<i>phycoerythrin</i>	fikoerytryna
PEF	<i>peak expiratory flow</i>	szczytowy przepływ wydechowy
PerCP	<i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i>	białkowy kompleks perydynina-chlorofil
PHA	<i>phytohaemagglutinin</i>	fitohemaglutynina
POChP		przewlekła obturacyjna choroba płuc
RANTES	<i>regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>	chemokina RANTES
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>	względna jednostka fluorescencji
RNA	<i>rybonucleic acid</i>	kwas rybonukleinowy
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	płyn hodowlany RPMI
RT	<i>reverse transcription</i>	odwrotna transkrypcja
SCA		skala ciężkości astmy
SD	<i>standard deviation</i>	odchylenie standardowe
SEM	<i>standard error of mean</i>	standardowy błąd średniej
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator-1</i>	koaktywator receptorów steroidowych-1
SSC	<i>side scatter</i>	detektor ziarnistości obiektów w cytometrze
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>	białko SUMO
TBE	<i>TRIS/borate/EDTA</i>	bufor TBE
Tbet	<i>T-box expressed in T cells protein</i>	czynn timeranskrypcyjny Tbet
TBP	<i>TATA-binding protein</i>	białko wiążące sekwencję TATA
TCR	<i>T-cell receptor</i>	receptor limfocyty-T
TGFβ	<i>transforming growth factor-β</i>	transformujący czynnik wzrostu-β
Th	<i>T helper cell</i>	limfocyt-T pomocniczy
TLR	<i>Toll like receptor</i>	receptor typu Toll
T_m	<i>melting temperature</i>	temperatura topnienia
TNFα	<i>tumor necrosis factor-α</i>	czynnik martwicy nowotworów-α
Treg	<i>regulatory T-cell</i>	limfocyt-T regulatorowy
TRIS	<i>trishydroxymethylaminomethane</i>	trójhdroksymetyloaminometan
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>	cząsteczka adhezji międzykomórkowej naczyń-1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
WB	<i>Western blotting</i>	technika western blotu
WHO	<i>World Health Organisation</i>	Światowa Organizacja Zdrowia

2 Wprowadzenie

Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną oskrzeli, w której bierze udział wiele rodzajów komórek oraz produkowanych przez nie mediatorów. Stan zapalny błony śluzowej dróg oddechowych jest przyczyną nadreaktywności i odwracalnej obturacji, które prowadzą do nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ściskania w klatce piersiowej i kaszlu. Powyższa definicja, zawarta w raporcie NHLBI/WHO dotyczącym strategii rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy (Raport GINA – *Global Initiative for Asthma*)¹ podkreśla złożone mechanizmy immunologiczne leżące u podłoża astmy oskrzelowej oraz napadowy charakter dolegliwości, które pojawiają się po ekspozycji na różnego rodzaju czynniki wyzwalające (alergeny, infekcje). W badaniach czynnościowych płuc u chorych na astmę stwierdza się niewydolność wentylacyjną typu obturacyjnego, która zmniejsza się po zastosowaniu krótko działającego wziewnego β_2 -mimetyku i/lub po leczeniu zwiększonymi dawkami glikokortykosteroidów (GCS).

2.1 Zapalenie i remodeling w astmie oskrzelowej

Przyczyną objawów astmy oskrzelowej jest charakterystyczny stan zapalny oskrzeli, w którym główną rolę odgrywają aktywowane limfocyty pomocnicze typu Th2 (*T-helper cell*), pobudzone eozynofile i mastocyty oraz komórki iNKT (*invariant natural killer*).² Warto nadmienić, że charakter zapalenia dróg oddechowych jest bardzo podobny we wszystkich typach klinicznych astmy. Aktywowane limfocyty Th2 produkują cytokiny (IL-4, IL-5, IL-13 i IL-10) odpowiadające za napływ i aktywację eozynofiliów, powstanie typowego zapalenia w oskrzelach i inne procesy zachodzące podczas reakcji alergicznych.^{3,4} IL-4 jest niewątpliwie najważniejszą z nich, gdyż ułatwia różnicowanie limfocytów Th2 i dalszą polaryzację odpowiedzi immunologicznej, a także zmianę izotypu i produkcję IgE, immunoglobuliny kluczowej dla reakcji alergicznych.⁵

Produkowane w nadmiarze mediatory zapalne powodują: skurcz mięśni gładkich, pobudzenie zakończeń nerwów układu autonomicznego, zwiększenie przepuszczalności kapilar, oraz aktywację nabłonka oddechowego i komórek strukturalnych ściany oskrzeli. Wiele z nich, jak na przykład białka kationowe eozynofiliów i reaktywne formy tlenu,

uszkadzają komórki nabłonka oskrzelowego, natomiast enzymy proteolityczne pochodzenia neutrofilowego uczestniczą w degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Pod wpływem urazu nabłonka dochodzi do zwiększonego uwalniania mediatorów aktywujących fibroblasty, pobudzających ich proliferację i wydzielanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej.^{6,7}

Konsekwencją przewlekłego stanu zapalnego jest więc przebudowa ściany oskrzeli (ang. *remodeling*), związana z odkładaniem białek macierzy zewnątrzkomórkowej (pogrubienie błony podstawnej) i proliferacją fibroblastów, która prowadzi do pogorszenia niewydolności wentylacyjnej i utrwalenia obturacji. Dochodzi również do przerostu mięśniówki gładkiej, rozplemu naczyń włosowatych, gruczołów błony podśluzowej oraz włókien nerwowych.⁸ Zmiany strukturalne w drogach oddechowych są szczególnie nasilone u chorych z długotrwałą astmą przewlekłą ciężką, chociaż mogą się pojawiać już we wczesnych etapach choroby, nawet u dzieci.⁹

2.2 Klasyfikacja kliniczna i fenotypy astmy

W klasyfikacji klinicznej uwzględnia się stopień nasilenia objawów astmy, parametry czynnościowe funkcji płuc oraz dzienne zużycie krótko działającego β_2 -mimetyku. Ciężkość astmy ocenia się na podstawie obrazu klinicznego przed rozpoczęciem terapii, lub po uwzględnieniu aktualnego schematu leczenia. Klasyfikacja tego typu jest nadal wykorzystywana do oceny ciężkości astmy w badaniach naukowych, nie jest jednak zalecana do podejmowania decyzji terapeutycznych i monitorowania leczenia. W praktyce klinicznej postępowanie w astmie opiera się przede wszystkim na ocenie kontroli objawów.¹

Celem przewlekłego leczenia astmy oskrzelowej jest uzyskanie i utrzymanie dobrej kontroli choroby, definiowanej jako: minimalne objawy dzienne i nocne, rzadkie zaostrzenia, brak doraźnych interwencji lekarskich, niewielkie zapotrzebowanie na leki doraźne, brak ograniczenia aktywności życiowej i prawidłowe wyniki badań czynnościowych płuc. Jeżeli pomimo leczenia nie udaje się uzyskać dobrej kontroli choroby mówimy o astmie częściowo kontrolowanej, lub niekontrolowanej. Należy pamiętać, że astma oskrzelowa jest chorobą która przebiega w sposób dynamiczny, a objawy obturacji oskrzeli nasilają się np. w okresach zwiększonej ekspozycji na alergen lub podczas infekcji.

Pacjenci, którzy w okresach zaostrzeń wymagają zwykle krótkotrwałego stosowania małych lub średnich dawek systemowych GCS, w okresach między zaostrzeniami mogą skutecznie kontrolować objawy stosując jedynie leki wziewne.

Dlatego też schemat terapii dobiera się na podstawie aktualnych objawów klinicznych (kontrola objawów), oraz dotychczasowego leczenia (terapia stopniowana). Dobrą kontrolę choroby uzyskuje się w większości przypadków stosując średnie lub wysokie dawki GCS wziewnych w połączeniu z długo działającym lekiem rozszerzającym oskrzela. W przypadkach astmy przewlekłej ciężkiej do opanowania objawów wymagane jest zastosowanie trzech leków (zwykle GCS wziewny, długo działający β_2 -mimetyk wziewny i doustny preparat teofiliny lub lek antyleukotrienowy), a w niektórych przypadkach konieczne jest przewlekłe leczenie małymi dawkami GCS doustnych.

Istnieje jednak szczególna grupa chorych u których utrzymują się objawy astmy, częste zaostrzenia i obturacja oskrzeli pomimo zoptymalizowanego leczenia zgodnego z przyjętymi wytycznymi. Ta niewielka grupa chorych z tzw. astmą trudną, stanowi niespełna 10% wszystkich przypadków choroby, stwarza olbrzymie problemy terapeutyczne i wymaga szczególnej uwagi klinicystów.^{10,11}

2.3 Astma ciężka i trudna

Według wytycznych ATS (ATS – *American Thoracic Society*) z 2000 roku¹² podstawą do rozpoznania astmy trudnej jest brak optymalnej kontroli objawów pomimo zastosowania wysokich dawek GCS wziewnych. Zaproponowana definicja astmy trudnej obejmuje duże i małe kryteria pozwalające na identyfikację chorych z ciężkimi postaciami astmy (objawy, częstość zaostrzeń, leczenie, stopień obturacji) (Tabela 1). Rozpoznanie powinno być jednak poprzedzone co najmniej sześciomiesięcznym okresem obserwacji klinicznej.

Do rozpoznania astmy trudnej wymagane jest spełnienie jednego lub obu kryteriów dużych, a więc (1) konieczność stosowania wysokich dawek GCS wziewnych i/lub (2) długotrwałe stosowanie GCS doustnych, oraz przynajmniej dwóch kryteriów mniejszych.

Tabela 1. Kryteria rozpoznania astmy ciężkiej/trudnej* wg konsensusu ATS (2000).¹²**Duże kryteria**

1. Zapotrzebowanie na doustne glikokortykosteroidy $\geq 50\%$ dni w roku
2. Zapotrzebowanie na wysokie dawki glikokortykosteroidów wziewnych

Małe kryteria

1. Konieczność dodatkowego stosowania leku kontrolującego objawy (długo działającego β_2 -mimetyku, pochodnej teofiliny, leku antyleukotrienowego)
2. Codzienne lub prawie codzienne stosowanie krótko działającego β_2 -mimetyku wziewnego
3. Utrwalona obturacja oskrzeli ($FEV_1 < 80\%$ wartości należnej, dobowy zmienność PEF $> 20\%$)
4. Co najmniej jedna wizyta w roku z powodu astmy oskrzelowej w szpitalu lub gabinecie pomocy doraźnej
5. Co najmniej trzy cykle leczenia glikokortykosteroidami doustnymi w roku
6. Natychmiastowe pogarszanie objawów przy próbie redukcji dawki glikokortykosteroidów wziewnych lub doustnych o $\leq 25\%$
7. Epizod astmy zagrażającej życiu w przeszłości

Do rozpoznania astmy trudnej wymagane 1 lub 2 duże i co najmniej 2 małe kryteria.

* pod warunkiem, że wykluczono inne przyczyny objawów, opanowano czynniki wyzwalające zaostrzenia, a chory stosuje się do zaleceń lekarskich.

2.4 Fenotypy astmy ciężkiej

Astma ciężka i trudna obejmuje wiele postaci klinicznych. Zaproponowany ostatnio podział na fenotypy opiera się na danych klinicznych (wiek rozpoznania, dynamika zaostrzeń, atopia, nadwrażliwość na aspirynę, reaktywność na GCS), spirometrycznych (utrwalenie obturacji oskrzeli), a nawet cytologicznych (typ zapalenia).

Biorąc pod uwagę wiek w jakim pojawiły się pierwsze objawy wyróżnia się chorych z rozpoznaniem astmy ciężkiej w dzieciństwie (ang. *early-onset*), jak i w wieku późniejszym (ang. *late-onset*). Większość przypadków astmy trudnej rozwija się jednak dopiero w wieku dorosłym.¹³ Chorzy na astmę oskrzelową różnią się także pod względem częstości i dynamiki zaostrzeń. Jednym z typów astmy ciężkiej jest tzw. astma chwiejna (ang. *brittle-asthma*), której cechą charakterystyczną są gwałtowne zaostrzenia, pojawiające się w okresach bardzo dobrej kontroli choroby. W innych przypadkach astma chwiejna objawia się wyjątkowo dużą zmiennością dobową maksymalnych przepływów wydechowych (PEF).

U niektórych pacjentów z wieloletnim wywiadem ciężkiej astmy dochodzi do trwałego pogorszenia wydolności wentylacyjnej, wynikającego z zaawansowanej przebudowy

oskrzeli.¹⁴ Jeżeli pomimo optymalnego leczenia nasilona 1-sekundowa objętość wydechowa (FEV₁) wynosi mniej niż 75% wartości należnej mówimy o przewlekłej utrwalonej obturacji oskrzeli. Wykazano, że przebudowa oskrzeli u chorych z późnym rozpoznaniem postępuje szybciej prowadząc do zmian strukturalnych o podobnym nasileniu jak w wieloletniej astmie rozpoczynającej się w młodym wieku.^{15,16,17}

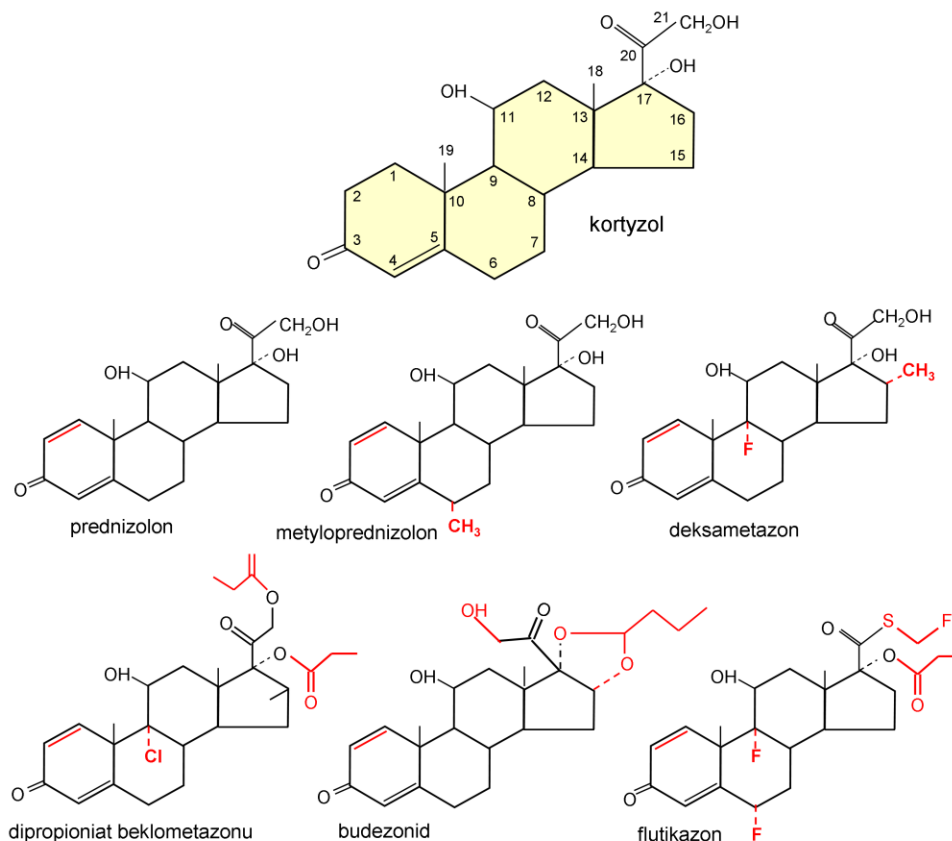
Pomimo leczenia wysokimi dawkami wziewnych lub doustnych GCS u około 50% chorych na astmę ciężką utrzymuje się zapalenie eozynofilowe dróg oddechowych.¹⁸ Astma ciężka z dominującą eozynofilią występuje częściej przy rozpoznaniu *late-onset*, przede wszystkim u chorych ze słabszą reakcją na GCS i gorszymi parametrami czynnościowymi płuc.¹⁷ W błonie śluzowej oskrzeli u chorych na astmę ciężką stwierdza się dość często zapalenie typu neutrofilowego.^{19,20} Ponieważ GCS skutecznie zmniejszają zapalenie eozynofilowe, a z drugiej strony hamują apoptozę neutrofilów^{21,22} to typ nacieku zapalnego stwierdzanego w drogach oddechowych odzwierciedla w pewnym stopniu skuteczność przewlekłej steroidoterapii.

Biorąc pod uwagę wiek pacjenta w którym rozpoznano chorobę oraz rodzaj nacieku zapalnego oskrzeli, chorych na astmę ciężką można podzielić na cztery główne fenotypy kliniczne (Wenzel i wsp.¹⁶). Astma rozpoczynająca się w dzieciństwie z obecnym naciekiem eozynofilowym wskazuje na typowe zapalenie alergiczne Th2, z upośledzoną wrażliwością na GCS. Jeżeli w ciężkiej astmie typu *early-onset* nie stwierdza się eozynofilów może to świadczyć o dobrej odpowiedzi zapalenia na GCS, ale przy współistniejącej znacznej przebudowie oskrzeli i nadreaktywności. Fenotyp astmy ciężkiej o późnym początku z zapaleniem eozynofilowym łączy cechy upośledzonej reaktywności na GCS i szybko postępującej przebudowy oskrzeli. Wreszcie ostatni, najrzadszy typ ciężkiej astmy typu *late-onset*, ale bez eozynofilów nie jest związany z zapaleniem alergicznym typu Th2 i może stanowić zupełnie odrębną chorobę (grupę chorób).²³

Niezależnie od rodzaju klasyfikacji i stopnia zróżnicowania fenotypowego astmy ciężkiej i trudnej, o nasileniu objawów choroby i wydolności wentylacyjnej płuc decydują dwa podstawowe czynniki: (1) przebudowa oskrzeli, zależna od wieku rozpoznania i czasu trwania choroby oraz (2) reakcja na glikokortykosteroidy, zależna od typu zapalenia w drogach oddechowych i wrażliwości poszczególnych komórek na GCS.

2.5 Mechanizmy molekularne działania glikokortykosteroidów

Syntetyczne GCS są najskuteczniejszymi lekami przeciwzapalnymi kontrolującymi objawy astmy oskrzelowej. Prekursorem wszystkich leków tej grupy jest kortyzol, naturalny steroid pochodzenia nadnerczowego. Wszystkie GCS syntetyczne, różniące się znacznie cechami biologicznymi i farmakologicznymi, powstają w wyniku modyfikacji cząsteczki kortyzonu i wprowadzenia dodatkowych grup funkcyjnych (Rysunek 1).²⁴



Rysunek 1. Wzory chemiczne kortyzolu i syntetycznych GCS stosowanych w leczeniu astmy (za wyjątkiem deksametazonu). Podstawowym elementem budowy wszystkich GCS jest szkielet pregnanowy zbudowany z 21 atomów węgla. O aktywności glikokortykosteroidowej decyduje grupa OH w pozycji C-17 i C-21, oraz grupa ketonowa C-3. Zaznaczono charakterystyczne cechy budowy poszczególnych związków. Na podstawie pozycji piśmiennictwa 24 i 25, zmodyfikowano.

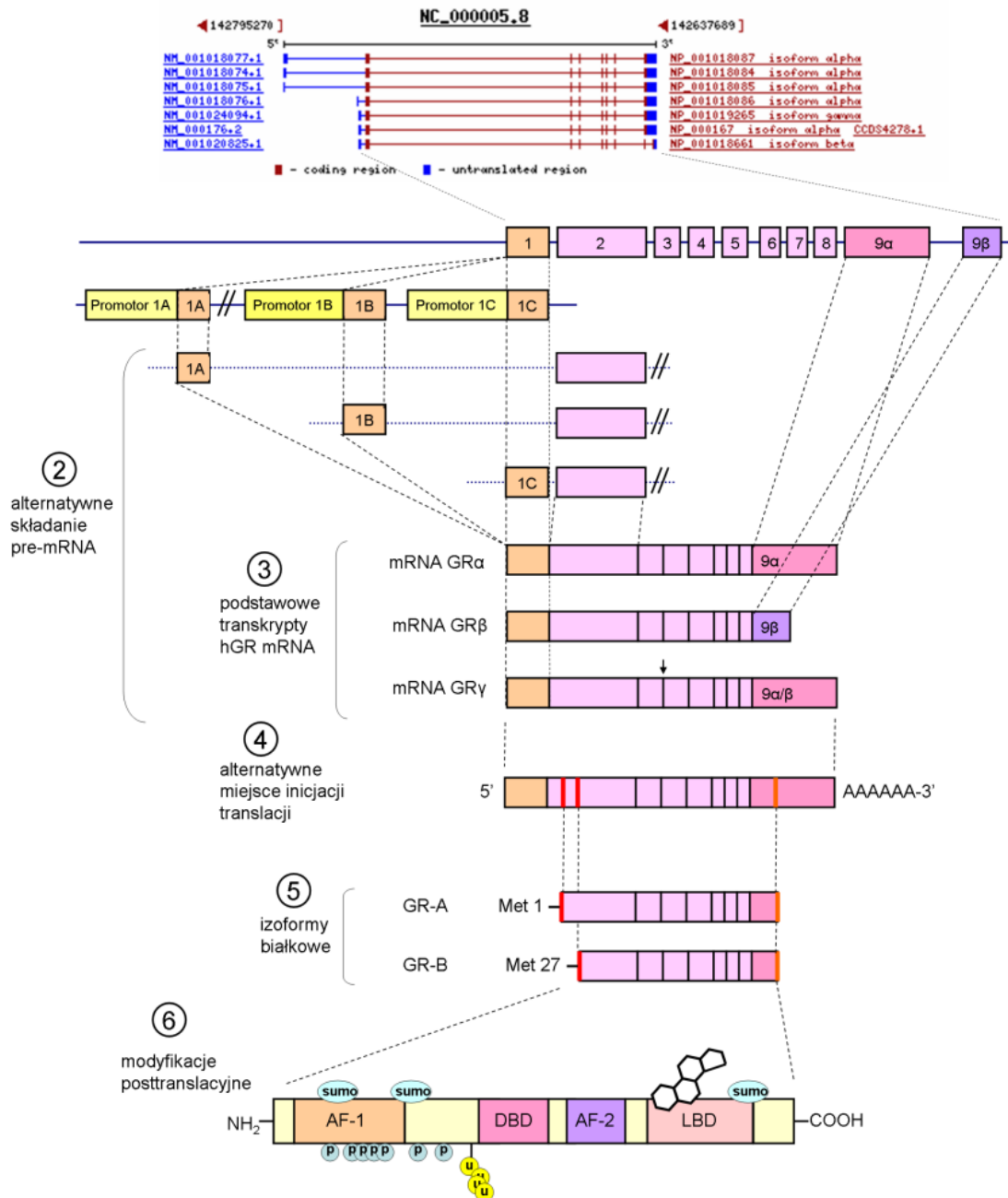
W astmie oskrzelowej stosowane są dwie grupy GCS: wziewne i podawane ogólnoustrojowo (doustnie lub dożylnie). Glikokortykosteroidy wziewne są lekami pierwszego wyboru u wszystkich chorych na astmę przewlekłą, bez względu na stopień ciężkości.¹ Stosowane w odpowiednich dawkach zmniejszają stan zapalny i nadreaktywność oskrzeli, co w większości przypadków pozwala na dobrą kontrolę objawów. Najczęściej stosowanymi lekami z tej grupy są dipropionian beklometazonu, budezonid i flutikazon oraz

niedawno wprowadzony cyklezonid.²⁵ Silnie działające GCS systemowe, prednizon i metyloprednizolon, stosowane są w zaostrzeniach astmy oraz w leczeniu przewlekłym astmy ciężkiej w razie trudności z uzyskaniem poprawy klinicznej po zastosowaniu maksymalnych dawek leków wziewnych.

Glikokortykosteroidy działają przeciwzapalnie i immunosupresyjnie poprzez mechanizmy genomowe, które wynikają z indukcji lub hamowania ekspresji genów związanych z regulacją odpowiedzi immunologicznej,²⁶ oraz mniej poznane mechanizmy pozagenomowe, niezależne od transkrypcji. GCS wiążą się z jednym rodzajem receptora GR (GR – *glucocorticoid receptor*), zaliczanym do receptorów jądrowych aktywowanych ligandem i występującym we wszystkich tkankach organizmu. Gen receptora GR (*NR3C1 – nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*) znajduje się na chromosomie 5 (5q31.3) i jest zbudowany z 9 eksonów. W procesie alternatywnego składania mRNA GR powstaje funkcjonalna izoforma GR α (egzon 9 α) i izoforma GR β (egzon 9 β),²⁷ oraz kilka innych mniej istotnych wariantów transkrypcyjnych (Rysunek 2). Odkryto również wiele izoform białkowych różniących się strukturą odcinka N-końcowego, aktywnością i dystrybucją tkankową.^{28,29}

Aktywna transkrypcyjnie izoforma GR α , posiada złożoną, wielodomenową strukturę (Rysunek 2). W odcinku N-końcowym cząsteczki znajduje się domena transaktywacji AF-1 niezbędna do regulacji ekspresji genów. W dalszej kolejności znajduje się domena wiążąca DNA (DBD - *DNA-binding domain*), która odpowiada za rozpoznawanie i przyłączanie sekwencji GRE (GRE - *glucocorticoid response element*) w promotorach genów. Koniec C cząsteczki zawiera kilka częściowo pokrywających się regionów: domenę wiążącą ligand (LBD - *ligand-binding domain*),³⁰ miejsca wiązania białek szoku cieplnego, sekwencje sygnału translokacji jądrowej,³¹ oraz drugą domenę transaktywacji AF-2. Rozmieszczenie domen w cząsteczce GR ma kluczowe znaczenie dla funkcji różnych izoform receptora. Dla przykładu, niektóre warianty translacyjne pozbawione regionu AF-1 mają inny profil transaktywacji, a izoforma GR β nie ma w ogóle funkcjonalnej domeny LBD.³²

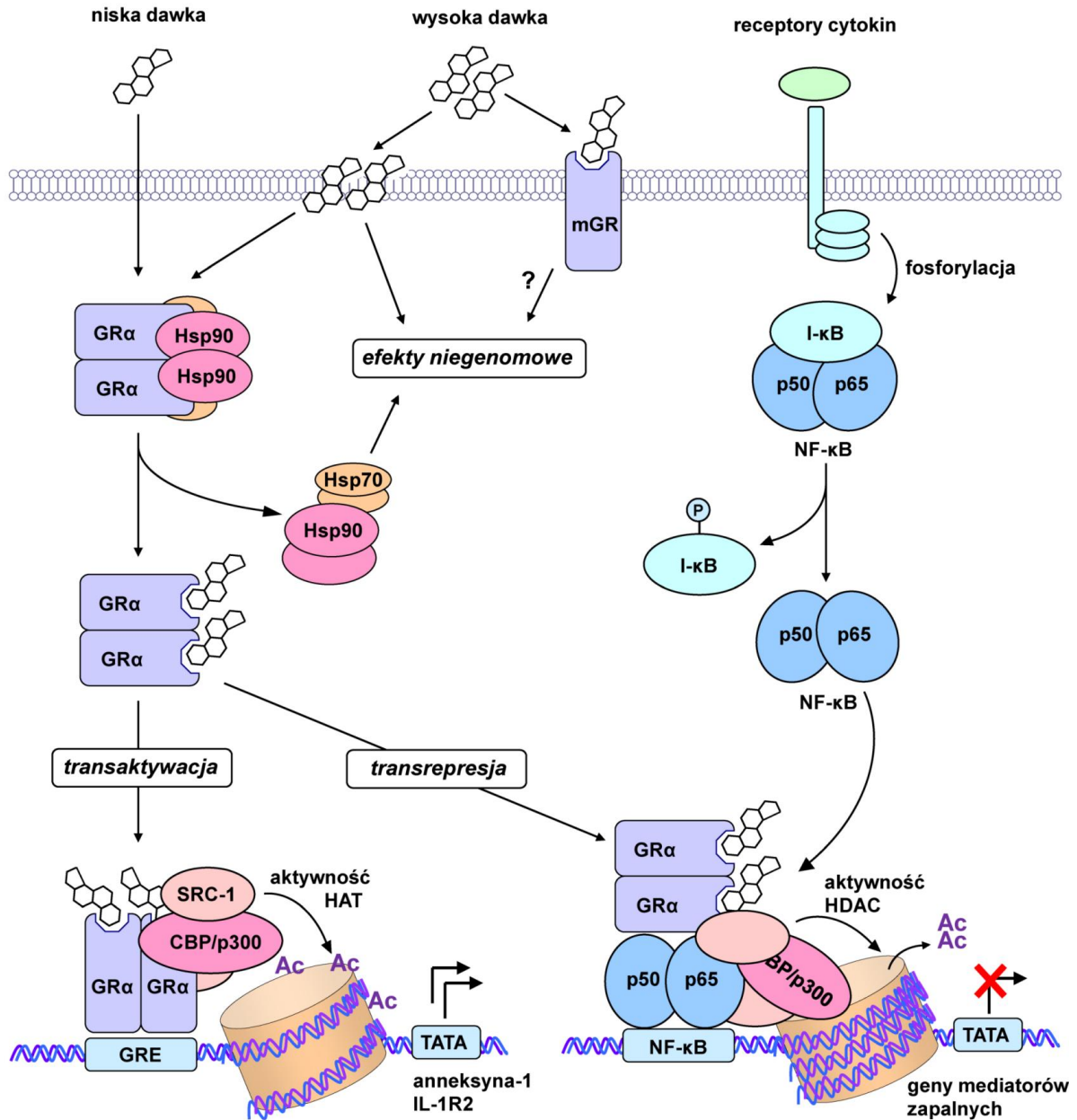
① Struktura genu receptora glikokortykosteroidowego (NR3C1)



Rysunek 2. Struktura genu i uproszczona budowa cząsteczki receptora glikokortykosteroidowego. Gen receptora GR (NR3C1) znajduje się na chromosomie 5 i jest zbudowany z 9 eksonów (1). Z powodu zmiennego miejsca startu transkrypcji (2) oraz alternatywnego składania pierwotnego powstaje kilka rodzajów mRNA (3), w tym izoformy GRα i GRβ. Powstająca również w niewielkiej ilości izoforma GRγ różni się obecnością trzech dodatkowych zasad między eksonami 3 i 4. Na skutek alternatywnego startu translacji (4) powstaje główna izoforma GR-A oraz rzadki wariant GR-B (5). Receptor glikokortykosteroidowy podlega licznym posttranslacyjnym modyfikacjom, w tym fosforylacji, ubikwitynacji i SUMO-ilacji (6).

Receptor GR w warunkach spoczynkowych tworzy w cytoplazmie kompleks z białkami szoku cieplnego Hsp70 i Hsp90 (Hsp - *heat shock proteins*).^{33,34} Kiedy lipofilne GCS przenikną przez błonę komórkową i połączą się z cząsteczkami GR α dochodzi do zmiany konformacyjnej, w wyniku której dysocjują białka Hsp, kompleks receptor-ligand przedostaje się do jądra komórkowego i jako homodimer GR α /GR α łączy się z sekwencjami GRE.^{35,36} W dalszej kolejności przyłączają się inne czynniki transkrypcyjne oraz polimeraza II RNA. Z rejonami AF-1 i AF-2 receptora GR wchodzi w interakcję różne koaktywatory, np. SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), których zadanie polega na wzmocnieniu transkrypcji i może tłumaczyć zmienne efekty działania GCS w różnych typach komórek.³⁷ Niektóre białka powstałego kompleksu mają zdolność acetylacji histonów, co prowadzi do rozluźnienia struktury nukleosomu i umożliwia rozpoczęcie transkrypcji.^{38,39} W wyniku opisanego wyżej procesu *transaktywacji* receptor GR aktywuje ekspresję tylko kilku genów o właściwościach przeciwzapalnych, takich jak anneksyna-1 (inhibitor fosfolipazy A2) oraz receptor IL-1 typu II (blokuje działanie IL-1).

Podstawową funkcją receptora GR jest hamowanie syntezy różnorodnych białek prozapalnych w mechanizmie tzw. *transrepresji*. Glikokortykosteroidy zmniejszają w ten sposób ekspresję wielu cytokin (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, TNF α), chemokin (RANTES, IL-8, MIP-1 α , MCP-1, eotaksyny), cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) i metaloproteinaz macierzy (MMP-9). Mechanizm transrepresji polega na interakcji receptora GR z czynnikami transkrypcyjnymi (AP-1, NF- κ B, NFAT i niektóre z grupy STAT).^{36,40} Ten sam mechanizm, obejmujący w przypadku kompleksu receptora GR z innymi czynnikami transkrypcyjnymi również przyłączenie białka p300/CBP i deacetylację histonów, powoduje zmniejszenie ekspresji cyklooksygenazy-2 (COX-2)⁴¹ i indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS).^{42,43}



Rysunek 3. Genomowe i nienomowe mechanizmy działania glikokortykosteroidów. Efekty genomowe zależą od pobudzenia receptora GR. Po wnikięciu do komórki GCS wiąże się z receptorem GR α co zmienia jego konformację i powoduje odłączenie białek Hsp. Aktywny kompleks GCS/GR przedostaje się do jądra komórkowego i w procesach transaktywacji indukuje ekspresję genów zawierających sekwencje odpowiedzi na steroidy GRE. Białka kompleksu receptora GR α mają zdolność acetylacji histonów (HAT – *histone acetyltransferase*) co ułatwia rozpoczęcie transkrypcji. Mechanizmy transrepresji polegają na indukcji aktywności HDAC (*histone deacetylase*) w obrębie kompleksów transkrypcyjnych i blokowaniu funkcji czynników transkrypcyjnych takich jak NF- κ B (jak na rycinie) lub AP-1. Po związaniu prozapalnej cytokiny z receptorem dochodzi do fosforylacji blokującego białka I- κ B, które odłącza się od aktywnego dimeru NF- κ B. Receptor GR wiąże czynnik NF- κ B hamując tym samym ekspresję wielu genów związanych z odpowiedzią zapalną. Efekty nienomowe wynikają ze zmian funkcji błon komórkowych oraz pobudzenia błonowego receptora mGR i są wyzwalane przez wysokie dawki glikokortykosteroidów.

2.6 Działanie przeciwzapalne GCS

GCS oddziałują na wiele etapów odpowiedzi immunologicznej, począwszy od nieswoistych mechanizmów obronnych mediowanych przez makrofagi i neutrofile, poprzez aktywację komórek dendrytycznych (DC – *dendritic cells*) i prezentację antygenów, a skończywszy na pobudzeniu efektorowych limfocytów T.^{36,44,45}

Przyczyną migracji granulocytów i limfocytów do tkanek zmienionych zapalnie jest zwiększona produkcja chemokin (IL-8, MCP-1), oraz podwyższona ekspresja receptorów adhezyjnych (np. selektyny-E, ICAM-1). GCS hamują ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna⁴⁶ i zmniejszają syntezę większości cytokin, w związku z tym blokują zarówno aktywację jak i napływ leukocytów.⁴⁷

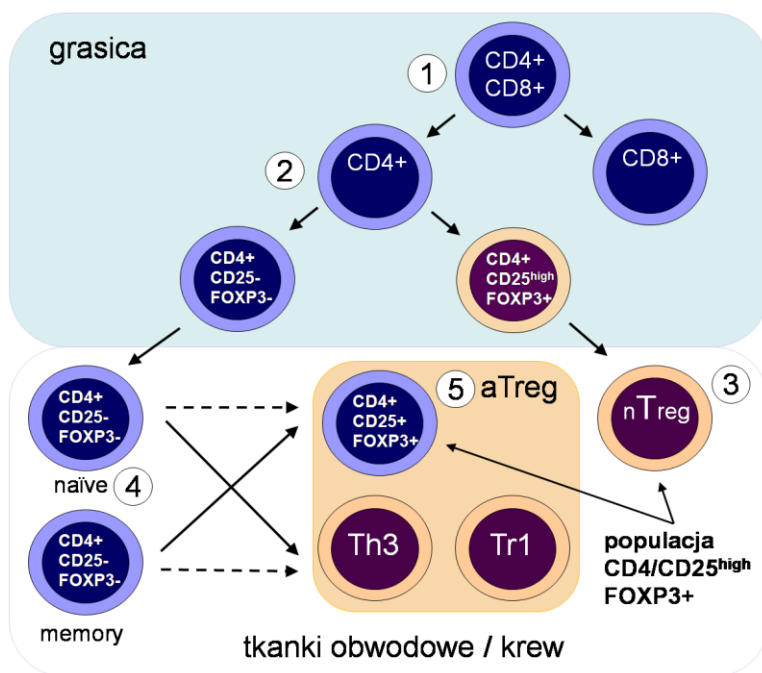
Skutkiem działania GCS jest również zahamowanie funkcji fosfolipazy A2 i ekspresji COX-2, a więc obniżenie produkcji metabolitów kwasu arachidonowego. GCS hamują także poziom ekspresji zarówno konstytutywnej jak i indukowanej NOS, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia perfuzji i obrzęku zmienionej zapalnie tkanki.⁴⁸

Glikokortykosteroidy wpływają również na procesy związane z indukcją swoistej odpowiedzi immunologicznej. GCS hamują różnicowanie i migrację komórek DC,⁴⁵ a podczas prezentacji antygenów zmniejszają wydzielanie IL-12, co doprowadza do polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2.⁴⁹ Działanie immunomodulujące tego typu występuje przy fizjologicznych stężeniach GCS, zastosowanie dawek farmakologicznych wywołuje natomiast silny efekt immunosupresyjny związany między innymi z hamowaniem proliferacji i indukcją apoptozy aktywowanych limfocytów T.⁵⁰ GCS zmniejszają syntezę IL-2, głównego czynnika wzrostu limfocytów oraz wielu innych cytokin, zarówno typu Th1 (IFN γ) jak i Th2 (IL-4).

W przypadku zapalenia typu Th2 działanie przeciwzapalne GCS polega na zahamowaniu aktywacji i proliferacji pobudzonych limfocytów T, oraz obniżeniu produkcji cytokin pozapalnych (w tym IL-4, IL-5). GCS zmniejszają również ekspresję cząsteczek adhezyjnych i naciek eozynofilowy.

2.7 Wpływ GCS na różnicowanie i funkcje limfocytów regulatorowych

Limfocyty Treg (Treg – *regulatory T-cells*) stanowią ważną populację limfocytów o funkcjach immunoregulacyjnych. Dzieli się je na dwie podgrupy: limfocyty regulatorowe naturalnie występujące nTreg (nTreg – *naturally occurring Treg*) oraz limfocyty regulatorowe indukowane na obwodzie (aTreg – *adaptive Treg*). nTreg powstają w grasicy, a ich cechą charakterystyczną jest wysoka ekspresja czynnika transkrypcyjnego FOXP3 (*forkhead-winged helix transcription factor-3*) oraz łańcucha α receptora IL-2R (CD25).⁵¹ nTreg rozpoznają przede wszystkim autoantygeny, a ich głównym zadaniem jest hamowanie limfocytów autoreaktywnych poprzez bezpośredni kontakt receptorowy oraz wydzielane cytokin IL-10 i TGF β .



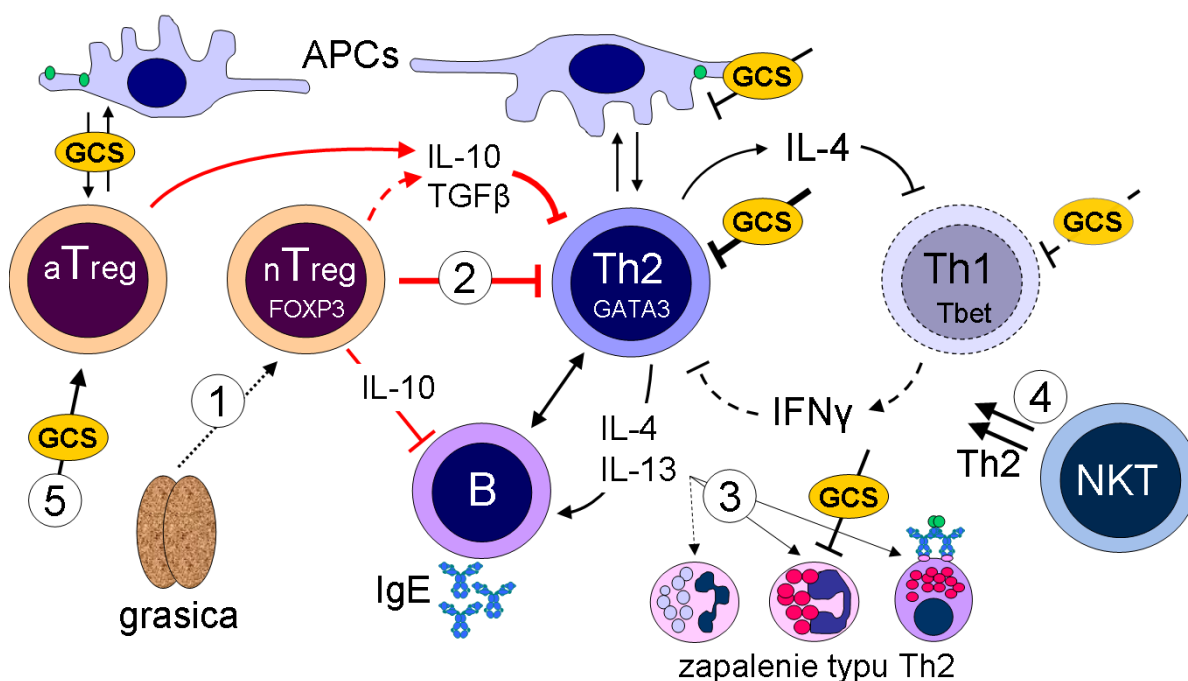
Rysunek 4. Klasyfikacja limfocytów Treg. **(1)** Limfocyty nTreg różnicują w grasicy obok dwóch głównych linii limfocytów T (Th CD4⁺ i Tc CD8⁺) z wspólnego prekursora CD4⁺CD8⁺. **(2)** Limfocyty o fenotypie CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ opuszczają grasicę jako limfocyty pomocnicze naiwne. **(3)** Naturalnie występujące limfocyty CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ współtworzą pulę krążących limfocytów Treg. **(4)** W tkankach obwodowych i po stymulacji antygenowej limfocyty T naiwne różnicują do komórek efektorowych, pamięci i aTreg. **(5)** Indukowalne Treg stanowią heterogenną grupę limfocytów o różnych fenotypach i profilu produkowanych cytokin.

W przeciwieństwie do nTreg, różnicowanie i ekspansja limfocytów aTreg odbywa się tylko w tkankach obwodowych, zależy od stymulacji antygenowej oraz działania cytokin, np. IL-2 i TGF β .^{52,53} aTreg różnicują z limfocytów T-naïwnych podczas prezentacji antygenów przez tolerogenne komórki dendrytyczne, równolegle do typowej odpowiedzi typu Th1 lub Th2 zależnej od immunogennych DCs. Limfocyty aTreg rozpoznają różne antygeny, a ich cechą charakterystyczną jest produkcja dużych ilości immunosupresyjnych cytokin IL-10 (tzw. limfocyty Tr1) i TGF β (limfocyty Th3). aTreg stanowią niejednorodną grupę pod

względem markerów powierzchniowych i funkcji, dodatkowo podczas różnicowania część z nich uzyskuje typowy dla nTreg fenotyp CD4/CD25+FOXP3+.^{54,55}

Populacja CD4/CD25+ krwi obwodowej zawiera więc zarówno limfocyty nTreg FOXP3+ produkowane w grasicy, jak i znaczną ilość komórek aTreg CD4/CD25^{high} różnicujących w tkankach obwodowych z limfocytów naiwnych lub pamięci (Rysunek 4).⁵⁶

Glikokortykosteroidy przyspieszają różnicowanie aTreg i zwiększają ich działanie supresyjne. Barrat i wsp.⁵⁷ udowodnili, że deksametazon zastosowany w połączeniu z witaminą D3 w hodowlach limfocytów T ułatwia różnicowanie komórek regulatorowych produkujących duże ilości IL-10.⁵⁷ Podobne wyniki uzyskano po zastosowaniu GCS z długo działającymi β_2 -mimetykami.⁵⁸ GCS zwiększają ponadto odsetek komórek CD4/CD25+ i ekspresję czynnika FOXP3 w limfocytach T-naïwnych.^{59,185} GCS uczestniczą więc prawdopodobnie w procesach obwodowej indukcji limfocytów regulatorowych o charakterystycznym fenotypie CD4/CD25+FOXP3+.



Rysunek 5. Regulacja odpowiedzi immunologicznej typu Th2 u chorych na astmę oskrzelową leczonych glikokortykosteroidami. **(1)** limfocyty regulatorowe naturalnie występujące (nTreg) i heterogenna grupa Treg indukowalnych (aTreg; *IL-10-secreting*, *TGFβ-secreting*, *CD4/CD25^{high}FOXP3+*) działają supresyjnie wobec alergenowo/antygenowo swoistych komórek Th2 na drodze bezpośredniego kontaktu **(2)** i poprzez wydzielane cytokiny. **(3)** Produkcja cytokin prozapalnych typu Th2 hamowana jest przez GCS, których supresyjne działanie dotyczy również innych komórek nacieku zapalnego. **(4)** Limfocyty NKT promują rozwój odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2, wpływ GCS na funkcje komórek NKT nie jest znany. **(5)** GCS zastosowane *in vitro* i *in vivo* indukują powstawanie limfocytów aTreg, również o fenotypie CD4/CD25^{high}FOXP3+. ⊥-hamowanie, ↓-stymulacja.

Uważa się, że GCS wpływają tylko na różnicowanie limfocytów aTreg (CD4/CD25+). Leczenie GCS nie prowadzi bowiem do zwiększenia odsetka limfocytów CD4/CD25+ w grasicy i nie wpływa na uwalnianie naturalnych nTreg z tego narządu.⁶⁰

Coraz więcej danych wskazuje, że glikokortykosteroidy i limfocyty Treg odgrywają kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej typu Th2. Korzystny wpływ GCS na indukcję i funkcję Treg pozwala na odtworzenia stanu równowagi dynamicznej pomiędzy aktywowanymi limfocytami T i komórkami regulatorowymi, co jest niezbędne do opanowania zapalenia astmatycznego i uzyskania kontroli objawów astmy (Rysunek 5).

2.8 Względna i prawdziwa steroidoporność w astmie oskrzelowej

Glikokortykosteroidy wziewne i systemowe stosowane zgodnie z przyjętymi zaleceniami zmniejszają stan zapalny dróg oddechowych i pozwalają na opanowanie objawów u większości chorych na astmę oskrzelową. Jednak chorzy na astmę ciężką i trudną charakteryzują się zmniejszoną wrażliwością na GCS i do uzyskania zadowalającej kontroli wymagają często, oprócz maksymalnych dawek steroidów wziewnych, również przewlekłego stosowania GCS doustnych. Różnice w reaktywności na GCS u chorych z astmą przewlekłą ciężką wynikają z dużej zmienności fenotypowej, stopnia trwałej obturacji oskrzeli oraz wrażliwości samych komórek stanu zapalnego na GCS.

U znacznej części chorych na astmę ciężką udaje się opanować objawy astmy po zastosowaniu małych dawek GCS ($\leq 7,5$ mg/d prednizonu).^a Jeżeli do uzyskania zadowalającej kontroli choroby potrzeba większych dawek GCS, mówimy o *astmie steroidozależnej*. W wytycznych leczenia astmy i większości badań klinicznych warunkiem rozpoznania ciężkiej astmy steroidozależnej jest spełnienie czterech kryteriów: (1) utrzymujące się przewlekłe objawy astmy (o różnym nasileniu) i/lub częste zaostrzenia, które mogą ograniczać aktywność chorego pomimo (2) leczenia maksymalnymi dawkami GCS wziewnych i (3) zażywania GCS w doustnych >6 miesięcy w roku w dawce >5 mg/d (zwykle w przedziale 5-30 mg) w przeliczeniu na prednizon, (4) a próba redukcji dawek GCS w tej grupie chorych powoduje nasilenie objawów i pogorszenie wydolności wentylacyjnej prowadzące do zaostrzenia astmy.^{22,61,62,63,64,65,66,67}

^a Zastosowana w pracy nomenklatura dotycząca dawek GCS podawanych ogólnie w przeliczeniu na prednizon (tj niskie $\leq 7,5$ mg w ciągu doby, umiarkowane 7.5-30mg/d, wysokie 30-100mg/d, bardzo wysokie >100 mg/d) wg. raportu EULAR. Ann Rheum Dis. 2002;61;718-722

Poważnym problemem terapeutycznym w astmie oskrzelowej jest bardzo rzadko występująca (<0,1% wszystkich chorych na astmę) tzw. prawdziwa *astma steroidooporna*. Ten typ astmy rozpoznawany jest gdy (1) u chorego z potwierdzoną diagnozą astmy oskrzelowej stwierdza się (2) przewlekłe ograniczenie sprawności wentylacyjnej z porannym FEV_1 <70% wartości należnej i poprawą o przynajmniej 15% po zastosowaniu krótko działającego β_2 -mimetyku oraz (3) brak poprawy porannego FEV_1 o co najmniej 15% po tygodniu (niektórzy autorzy zalecają 2 tygodnie) stosowania doustnego GCS w dawce równoważnej 40 mg/d prednizonu.⁶⁸ Z astmą steroidooporną mamy do czynienia, jeżeli nie udaje się uzyskać zadowalającej kontroli choroby i poprawy w badaniach czynnościowych, mimo wielu tygodni stosowania wysokich dawek GCS doustnych.⁶⁹ Pacjentów tych charakteryzuje ciężki przebieg astmy i trudne do opanowania objawy, nagłe i często zagrażające życiu napady duszności oraz znacznie upośledzona jakość życia.

U chorych na astmę oskrzelową stwierdza się więc pewne spektrum reaktywności na glikokortykosteroidy, od bardzo dobrej odpowiedzi na GCS w astmie przewlekłej umiarkowanej, przez zmniejszoną wrażliwość w astmie steroidozależnej, po nasiloną oporność w astmie steroidoopornej. Dodatkowo, reaktywność na GCS może się zmieniać w czasie choroby, a w niektórych przypadkach poprawia się po zastosowaniu wyższych dawek GCS.⁷⁰ Przewlekłe stosowanie wysokich dawek GCS nie jest jednak możliwe ze względu na duże ryzyko poważnych działań niepożądanych (osteoporoza, cukrzyca wtórna, miopatia posteroidea, zaćma i wiele innych).

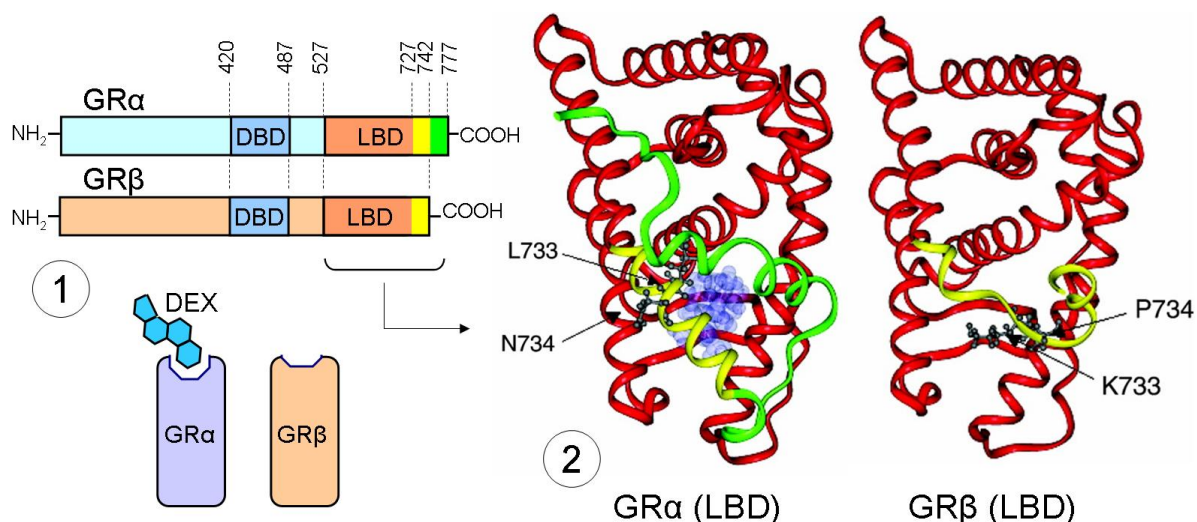
Mechanizmy powstawania steroidooporności w astmy ciężkiej mogą być bardzo różne, a ciężkość objawów i manifestacja kliniczna zależy najpewniej od wielu innych czynników (np. typu zapalenia i fenotypu astmy). Sama przyczyna upośledzonej odpowiedzi na GCS w astmie steroidozależnej jest w dalszym ciągu nieznana. Jak do tej pory wykazano, że upośledzona odpowiedź na GCS nie zależy od pierwotnych zmian struktury receptora GR ani zaburzeń farmakokinetyki leków steroidowych, ale jest konsekwencją obniżonej reaktywności niektórych komórek zapalnych w oskrzelach. U chorych na astmę ciężką steroidooporną wykazano zwiększoną ilość aktywowanych limfocytów zarówno w drogach oddechowych, jak i we krwi obwodowej.⁷¹ Jest to pośredni dowód na utrzymujący się (oporny na GCS) stan zapalny w oskrzelach. W tej grupie pacjentów GCS słabiej hamują

różne etapy aktywacji limfocytów *in vitro*.^{72,73,74,75} Wykazano ponadto zmiany na poziomie molekularnym: zmniejszony transport jądrowy i obniżone wiązanie receptorów GR do docelowych sekwencji w DNA,⁷⁶ upośledzoną acetylację histonów⁷⁷ oraz wyższą aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych.^{78,79} Przyczyną wielu wymienionych nieprawidłowości może być obniżona aktywność receptora GR wynikająca ze zwiększonej ekspresji hamującej izoformy β .

2.9 Kontrowersyjna rola izoformy GR β w powstawaniu steroidooporności

Dwie najważniejsze izoformy GR to (1) grupa aktywnej transkrypcyjnie izoformy GR α oraz (2) grupa nieaktywnej/hamującej izoformy GR β ,^{80,81} które różnią się długością łańcucha aminokwasowego oraz strukturą C-końcowej domeny LBD. W izoformie GR α (wariant A: 777 aminokwasów) ekson 9 α koduje helisy H11 i H12 domeny wiążącej ligand, która może przyłączać GCS i działa transaktywacyjnie (AF-2).³⁰ W izoformie GR β (wariant A: 742 aminokwasów) końcowy ekson 9 β koduje tylko 15 aminokwasów. Skrócona domena LBD traci zdolność wiązania GCS,^{27,32,82} ale uzyskuje za to unikalne właściwości blokujące (*dominant-negative activity*) w stosunku do GR α (Rysunek 6).

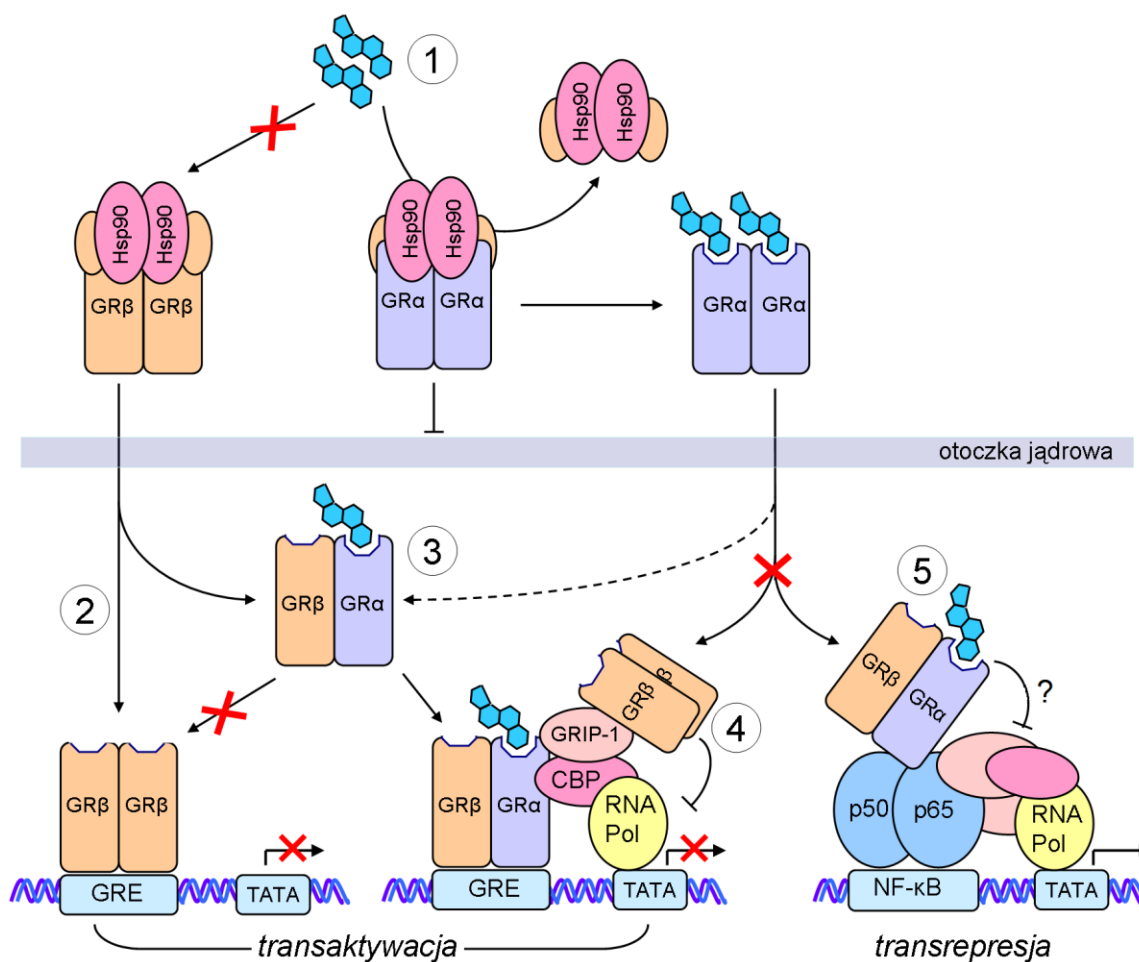
Zmiana struktury w rejonie C-terminalnym powoduje, że wariant β nie przyłącza GCS ale może przedostawać się do jądra komórkowego.^{32,83} GR β przyłącza się do sekwencji GRE w genach regulowanych przez GCS, jednak nie indukuje ich transkrypcji. Tego typu blokowanie na poziomie DNA nie hamuje funkcji aktywnego kompleksu GR α /GR α , który ma znacznie większe powinowactwo do GRE.^{84,85} GR β może tworzyć heterodimery z funkcjonalną formą GR α , co hamuje transport jądrowy aktywowanego przez GCS receptora GR.^{82,86,85} Powstające w ten sposób kompleksy GR α /GR β mają inną budowę i słabsze działanie transaktywacyjne.^{87,88} Dodatkowo, GR β może przyłączać niektóre koaktywatory, co zmniejsza aktywność kompleksów transkrypcyjnych GRE (Rysunek 7).⁸⁹ Zwiększona ekspresja GR β może więc zahamować działanie transaktywacyjne GCS.



Rysunek 6. Struktura domeny LBD izoform α i β receptora GR. **(1)** schemat liniowy budowy cząsteczek GR, **(2)** modele przestrzenne domen LBD receptora GR α w połączeniu z deksametazonem i izoformy GR β (oznaczono pozycje aminokwasów 733 i 734). Kolorem czerwonym oznaczono część łańcucha aminokwasowego wspólnego dla α i β (525-727), kolorem żółtym rejon niehomologiczny (728-742, helisa H11 w przypadku izoformy GR α), kolorem zielonym helisę H12 obecną jedynie w izoformie GR α (743-777). Rysunek na podstawie pozycji piśmiennictwa 82, zmodyfikowano. DEX – deksametazon.

Blokowanie efektów transaktywacyjnych GR pozostaje w relacji do bezwzględnej ilości izoformy β i stosunku GR α /GR β .⁸⁴ Nadmiar GR β skutecznie hamuje funkcje właściwego receptora GR α w wielu modelach *in vitro*. Jednak wyniki badań laboratoryjnych należy interpretować w kontekście zastosowanego układu eksperymentalnego i metody oceny ekspresji.⁹⁰ W niektórych badaniach wykorzystujących transfekcję linii komórkowych, zwiększenie ilości GR β nie blokowało procesów transaktywacji.^{91,92,98}

Zasadnicze działanie przeciwzapalne GCS polega jednak na transrepresji, czyli hamowaniu funkcji różnych czynników transkrypcyjnych, w mniejszym zaś stopniu zależy od transaktywacji. W badaniach oceniających transrepresję genów związanych z zapaleniem wykazano, że zwiększenie ilości GR β nie hamuje transrepresji czynników AP-1 i NF- κ B^{90,93} nie wpływa również na aktywność promotora genu *IL-2* oraz wydzielanie tej cytokiny przez aktywowane limfocyty (Rysunek 7).⁹¹



Rysunek 7. Mechanizm działania izoformy GRβ. **(1)** Glikokortykosteroidy wiążą się jedynie z homodimerami GRα/GRα. Izoforma GRβ może migrować na teren jądra komórkowego w postaci kompleksów z Hsp. **(2)** GRβ blokuje sekwencje GRE w genach docelowych, tworzy również heterodimery z GRα. **(3)** Kompleksy GRα/GRβ mają słabsze działanie transaktywacyjne. **(4)** GRβ sekwestruje niektóre składniki kompleksu transkrypcyjnego (np. GRIP-1). **(5)** Dane na temat mechanizmów transrepresyjnych są niejednoznaczne. Większość badań *in vitro* wyklucza jakiegokolwiek wpływ GRβ na aktywność NF-κB (na rycinie) lub AP-1.

Izoforma GRα ulega ekspresji we wszystkich komórkach organizmu, a ilość funkcjonalnego GR zależy od typu tkanki, jest ponadto regulowana przez same GCS i niektóre cytokiny.⁹⁴ Chociaż mRNA GRβ stwierdzono we wszystkich badanych tkankach, to ilość bezwzględna kopii mRNA tej izoformy jest zawsze znacznie mniejsza w porównaniu do GRα.^{32,84,95} Również białko GRβ wykrywano w małej ilości tylko w komórkach nabłonkowych,⁹⁶ neutrofilach i limfocytach,⁹⁷ podczas gdy izoformę GRα stwierdza się w znacznych ilościach we wszystkich komórkach.⁹⁸

U chorych z rozpoznaniem ciężkiej astmy steroidopornej stwierdzono zwiększoną ekspresję izoformy GRβ w niektórych komórkach stanu zapalnego dróg oddechowych.^{99,100}

Ponadto, ekspresja GR β zwiększa się pod wpływem działania cytokin pozapalnych IL-2 i IL-4.¹⁰¹ Nadmiar hamującej izoformy GR β w stosunku do funkcjonalnej izoformy GR α może obniżyć reaktywność limfocytów na GCS i doprowadzić do powstania steroidooporności.

Nie wiadomo jak do tej pory, czy jakiekolwiek zmiany ekspresji GR występują u chorych z astmą steroidozależną. Zmniejszenie ilości izoformy GR α , lub indukcja izoformy GR β w komórkach krwi obwodowej mogłyby tłumaczyć zarówno konieczność stosowania wysokich dawek GCS (przełamanie oporności) jak i zaburzoną odpowiedź limfocytów w testach czynnościowych *in vitro*. Wydaje się, że przeprowadzenie badań porównujących poziom ekspresji izoform GR u chorych różniących się ciężkością astmy jak również w astmie steroidozależnej mogłoby wyjaśnić ten proponowany mechanizm zmniejszonej wrażliwości na GCS. Dodatkowo w ostatnich latach pojawiły się doniesienia kwestionujące znaczenie GR β w rozwoju oporności na GCS.^{102,103} Nie wiadomo również, czy u chorych na astmę steroidozależną dochodzi do zmniejszenia reaktywności limfocytów na GCS (podobnie jak w ciężkiej astmie steroidoopornej). Ostatecznie, jak do tej pory nie zbadano czy istnieje jakakolwiek zależność między reaktywnością na GCS (również ekspresją izoform GR), a frakcją komórek regulatorowych w warunkach *in vivo*.

Głównym celem tego badania jest ustalenie czy u chorych na astmę ciężką steroidozależną dochodzi do obniżenia wrażliwości limfocytów na GCS, a jeżeli tak, to czy wynika to ze zmian w ekspresji izoform GR. Drugim celem pracy jest zbadanie, czy stosowanie systemowych GCS w tej grupie chorych wpływa na ilość limfocytów regulatorowych CD4/CD25^{high}.

3 Hipoteza badawcza

Względna steroidooporność w astmie ciężkiej steroidozależnej wynika ze zwiększonej ekspresji izoformy β receptora GR w limfocytach, co prowadzi do zmniejszenia reaktywności limfocytów T na GCS *in vitro* oraz zahamowania indukcji limfocytów regulatorowych Treg.

4 Cele pracy

1. Ocena fenotypowa i charakterystyka kliniczna pacjentów z astmą ciężką i trudną leczonych przewlekłe systemowymi GCS.
2. Ocena odsetka aktywowanych limfocytów T oraz limfocytów regulatorowych CD4/CD25+ krwi obwodowej u chorych na astmę różniących się stopniem nasilenia choroby i reaktywnością na GCS.
3. Zbadanie zależności między badanymi markerami aktywacji krążących limfocytów, a parametrami spirometrycznymi oraz stopniem nasilenia objawów astmy.
4. Zbadanie tempa spontanicznej i indukowanej przez deksametazon apoptozy limfocytów krwi obwodowej w hodowli *in vitro*.
5. Zbadanie poziomu ekspresji antygenów aktywacyjnych (CD69, CD25, HLA-DR, CD40L) oraz tempa proliferacji limfocytów krwi obwodowej stymulowanych mitogenem (PHA), a także wpływu deksametazonu na procesy aktywacji limfocytów izolowanych od chorych różniących się wrażliwością na GCS.
6. Zbadanie poziomu ekspresji mRNA izoform GR α i GR β receptora glikokortykosteroidowego w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u chorych na astmę różniących się ciężkością choroby i wrażliwością na GCS.

5 Materiał i metody

5.1 Kryteria włączenia do badania i charakterystyka grup

Do badania włączono 15 chorych na astmą przewlekłą umiarkowaną oraz 25 chorych na astmą przewlekłą ciężką i/lub trudną w wieku od 18 do 65 lat, którzy pozostawali w opiece ambulatoryjnej II Katedry Chorób Wewnętrznych. Grupę kontrolną stanowiło 11 zdrowych ochotników (pracownicy II Katedry Chorób Wewnętrznych) w podobnym wieku jak chorzy na astmę. Do badania kwalifikowano chorych z rozpoznaniem astmy oskrzelowej według kryteriów GINA, tzn. z typowymi objawami klinicznymi i udokumentowaną w badaniu spirometrycznym (w okresie poprzedzającego roku) obturacją dróg oddechowych z odwracalnością $\geq 12\%$ FEV₁, z optymalną kontrolą choroby, oraz co najmniej 2-3 miesiące bez zaostrzenia astmy (kryteria w tabeli, Tabela 2). Chorych z astmą ciężką i trudną kwalifikowano na podstawie kryteriów GINA oraz ATS.¹² Warunkiem włączenia do badania było przede wszystkim uzyskanie dobrej (optymalnej) kontroli choroby przy stosowaniu możliwie najniższych dawek systemowych GCS. W kilku przypadkach, po konsultacji z prowadzącym chorego alergologiem, zmodyfikowano leczenie w celu poprawy kontroli objawów (najczęściej zwiększano dawkę GCS lub wprowadzano długo działający lek rozszerzający oskrzela). Pacjentów, którym zmieniono dawkowanie leków włączano do badania po miesiącu dodatkowej obserwacji klinicznej. W przypadku chorych z częstymi zaostrzeniami astmy, do badania kwalifikowano nie wcześniej niż 2 miesiące od zaostrzenia choroby, po zastosowaniu typowego schematu redukcji dawki doustnych GCS i leczonych przynajmniej 2 tygodnie metyloprednizolonem w optymalnej dawce dobowej. Ważnym kryterium było również niepalenie papierosów (przynajmniej od 6 miesięcy, oraz mniej niż 10 paczko/lat w wywiadzie).

Tabela 2. Kryteria włączenia do badania**Astma przewlekła ciężka lub astma trudna**

1. chorzy z potwierdzonym rozpoznaniem astmy przewlekłej ciężkiej i/lub astmy trudnej
2. w okresie optymalnego leczenia i dobrą kontrolą choroby tzn.: minimalnymi objawami nocnymi, bez zaostrzenia i doraźnej interwencji lekarskiej w ciągu ostatnich 2 miesięcy, oraz niewielkim zapotrzebowaniem na β_2 -mimetyk stosowany doraźnie
3. z wykluczoną inną chorobą płuc, oraz świeżą lub przebytą w okresie poprzedzających 30 dni infekcją układu oddechowego
4. niepalący (>6 miesięcy) lub mniej niż 10 paczko/lat w wywiadzie
5. nie będący w trakcie odczulania (ewentualnie ostatnia dawka szczepionki przed 2 miesiącami)
6. leczonych glikokortykosteroidem wziewnym w średniej dawce dobowej 1000-2000 dipropioniatu beklometazonu lub równoważną dawką innego steroidu wziewnego (flutikazon 500-1000 ug/d; budesonid 800-1600 ug/d)
7. leczonych aktualnie (co najmniej od 3 miesięcy) oraz przez >6 miesięcy w poprzedzającym roku glikokortykosteroidem doustnym w dobowej dawce ≥ 4 mg metyloprednizolonu (≥ 5 mg prednizonu)

Astma przewlekła umiarkowana

1. chorzy z potwierdzonym rozpoznaniem astmy przewlekłej lekkiej lub umiarkowanej
2. w okresie optymalnego leczenia i bardzo dobrą kontrolą choroby tzn.: minimalnymi objawami dziennymi i nocnymi, bez zaostrzenia choroby i doraźnej interwencji lekarskiej w ciągu ostatnich 3 miesięcy, z niewielkim zapotrzebowaniem na β_2 -mimetyk stosowany doraźnie (najlepiej bez konieczności stosowania, ewentualnie < 2 razy na dobę)
3. prawidłowymi parametrami spirometrycznymi (FEV_1 i PEF po leku rozkurczowym >80% należnej; dobową zmienność PEF <20%) w okresach między napadami duszności
4. z wykluczoną inną chorobą płuc, oraz świeżą lub przebytą w okresie poprzedzających 30 dni infekcją układu oddechowego
5. niepalący (>6 miesięcy) lub mniej niż 10 paczko/lat w wywiadzie
6. nie będący w trakcie odczulania (ewentualnie ostatnia dawka szczepionki przed 2 miesiącami)
7. leczonych glikokortykosteroidem wziewnym w średniej dawce dobowej 500-2000 dipropioniatu beklometazonu lub równoważną dawką innego steroidu wziewnego (flutikazon 250-1000 ug/d; budesonid 400-1600 ug/d)

Zdrowi ochotnicy

1. z wykluczoną świeżą lub przebytą w okresie poprzedzających 30 dni infekcją układu oddechowego
2. niepalący (>6 miesięcy) lub mniej niż 10 paczko/lat w wywiadzie
3. nie zażywający leków o działaniu przeciwzapalnym (w okresie poprzedzających 2 tygodni) i nie będący w trakcie szczepienia (ewentualnie ostatnia dawka szczepionki przed 2 miesiącami)

Astmę atopową rozpoznawano jeżeli spełniono następujące dwa kryteria: (1) przynajmniej jeden wynik dodatni w punktowym teście skórnym i/lub obecność specyficznych IgE w badaniu Phadiatop oraz (2) objawy alergiczne i/lub napad duszności po ekspozycji na alergen w wywiadzie. Nadwrażliwość na aspirynę rozpoznawano na podstawie dodatniego testu prowokacyjnego z doustnie podawaną aspiryną (n=12) lub danych z wywiadu (n=2, bardzo silna duszność po aspirynie, chorzy odmówili wykonania próby prowokacyjnej). Pozostali pacjenci nie zgłaszali jakichkolwiek objawów po zastosowaniu aspiryny lub niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

5.2 Pobranie materiału i plan badania

Pacjentów informowano o rodzaju badania i jego znaczeniu klinicznym, a następnie podczas jednorazowej wizyty przeprowadzono pełne badanie lekarskie ze szczególnym uwzględnieniem wywiadu dotyczącego historii i objawów astmy. Pacjenci zakwalifikowani do badania uzupełnili (z pomocą lekarza) szczegółową ankietę dotyczącą przebiegu choroby oraz przygotowany na potrzeby badania kwestionariusz nasilenia ciężkiej astmy (SCA). W opracowanej czteropunktowej skali SCA oceniano objawy choroby, częstość zaostrzeń i hospitalizacji, parametry spirometryczne i leczenie GCS (Tabela 3). Chorym na astmę wykonano badanie spirometryczne podstawowe i po inhalacji krótko działającego β_2 -mimetyku (2 wdechy po 100 μ g fenoterolu z inhalatora ciśnieniowego). W dniu badania chorzy na astmę nie stosowali dawki porannej długo działającego β_2 -mimetyku nie zmieniali natomiast dawkowania pozostałych leków. Krew do badań laboratoryjnych pobierano w związku z tym ok. 2-3 godziny po porannej dawce GCS. Osobom włączonym do badania pobrano jednorazowo 30 mL krwi żyłnej na antykoagulant EDTA do badań podstawowych oraz izolacji limfocytów, jak również 6 mL krwi pobranej na skrzep w celu oznaczenia całkowitego stężenia IgE w surowicy (metoda immunonefelometryczna, Dade Boehringer) oraz poziomu swoistych IgE (Phadiatop, Pharmacia).

Tabela 3. Skala Ciężkości Astmy (SCA).**Wynik: średnia punktacja = 0 – 3****1. Objawy astmy takie jak kaszel i/lub duszność i/lub epizody świszczącego oddechu występowały w ostatnim miesiącu**

- (0) rzadziej niż raz w tygodniu
- (1) częściej niż raz w tygodniu, ale nie codziennie
- (2) codziennie
- (3) codziennie bardzo nasilone (lub stale uczucie duszności)

2. Jak często w ostatnim miesiącu występowały objawy nocne astmy oskrzelowej

- (0) rzadziej niż 2x w miesiącu
- (1) częściej niż 2x w miesiącu ale nie więcej niż 1x w tygodniu
- (2) częściej niż raz w tygodniu
- (3) objawy nocne bardzo częste, zaburzają sen

3. Jak często w ostatnim miesiącu stosowano doraźnie krótko działający β_2 -mimetyk wziewny

- (0) rzadziej niż 2x dziennie
- (1) 3-4x na dobę
- (2) 5-8x na dobę
- (3) częściej niż 8x na dobę

4. Częstość zaostrzeń choroby w ostatnim roku

- (0) rzadkie, maksymalnie 2x w poprzedzającym roku
- (1) częste, 3-5x w roku
- (2) częste, $\geq 6x$ w roku
- (3) bardzo częste i znacznie ograniczające aktywność lub rzadkie, ale o ciężkim przebiegu i słabą reakcją na leki

5. Hospitalizacje z powodu zaostrzeń astmy w poprzedzającym roku

- (0) nie było
- (1) był jeden pobyt w szpitalu
- (2) były 2-4 hospitalizacje
- (3) 5 lub więcej, lub przynajmniej 1x w oddziale OIT

6. W aktualnej podstawowej spirometrii stwierdza się

- (0) wynik prawidłowy, $FEV_1 > 80\%$ należnej
- (1) cechy obturacji lekkiego stopnia (FEV_1 60-80%)
- (2) cechy obturacji umiarkowanego stopnia (FEV_1 50-60%)
- (3) cechy obturacji ciężkiego stopnia ($FEV_1 < 50\%$)

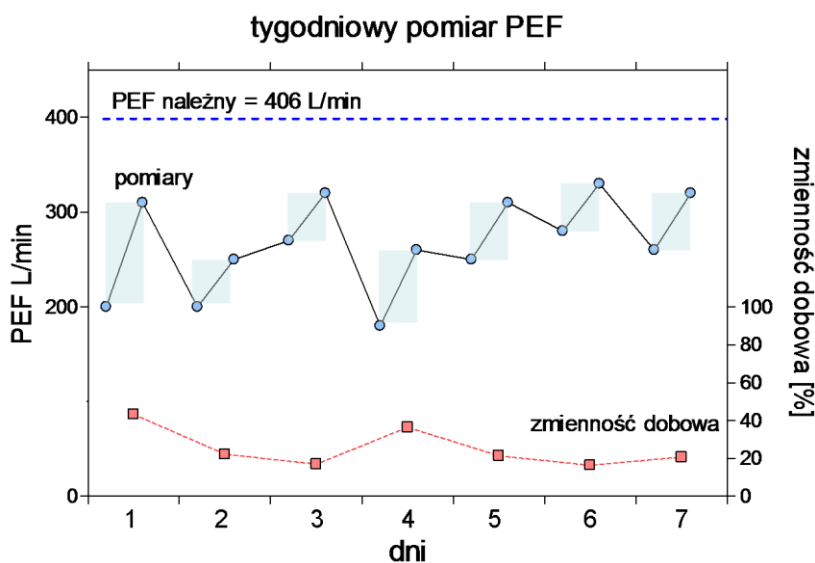
7. W trakcie monitorowania PEF (ostatni miesiąc optymalnego leczenia)

- (0) średni PEF $> 80\%$ należnej i zmienność dobową $< 30\%$ lub chory nie monitorował PEF
- (1) średni PEF $< 80\%$ należnej, zmienność $< 30\%$
- (2) średni PEF $< 80\%$ należnej, zmienność $> 30\%$
- (3) średni PEF $< 60\%$ należnej, zmienność $> 30\%$

8. Aktualne leczenie (glikokortykosteroidy)

- (0) bez glikokortykosteroidu doustnego
- (1) glikokortykosteroid doustny w dawce $\leq 4\text{mg/d}$ metyloprednizolonu
- (2) glikokortykosteroid doustny w dawce 4-16mg
- (3) glikokortykosteroid doustny w dawce $> 16\text{mg/d}$

Chorzy na astmę wypełniali przez kolejny tydzień kwestionariusz nasilenia objawów astmy Juniper (ACD – *Asthma Control Diary*) oceniający w skali sześciopunktowej stopień nasilenia głównych objawów astmy oraz zapotrzebowanie na doraźnie stosowane leki rozszerzające oskrzela (patrz dodatek 1, Rozdział 10).¹⁰⁴ Jako wynik ankiety objawowej ACD podano średnią punktację z 7 dni monitorowania. Niektórzy pacjenci z ciężką astmą (n=13, 52%) mierzyli dodatkowo w tym okresie szczytowe przepływy wydechowe (PEF). Chorzy wykonywali trzy pomiary rano, przed zażyciem leków oraz trzy pomiary wieczorem o godzinie 20.00, do analizy wykorzystano najwyższe wartości z obu serii pomiarów (Rysunek 8). Wyniki pomiarów PEF przedstawiono w postaci średnich z tygodnia: (1) % wartości należnej (na podstawie najlepszego pomiaru w ciągu doby) oraz (2) zmienności dobowej PEF ($PEF_{\text{zmienność}} = [PEF_{\text{wieczór}} - PEF_{\text{rano}}] / [PEF_{\text{średni.dobowy}}] \times 100\%$). Wyniki ACD i pomiary zmienności PEF analizowano podczas kolejnej wizyty (po ok. 2 tyg.).



Rysunek 8. Przykładowe zapisy pomiarów PEF u jednej z pacjentek. Na górnym wykresie najlepsze wyniki pomiarów porannych i wieczornych (wartość należna dla wieku i wzrostu pacjentki zaznaczona linią przerywaną). Dolny wykres przedstawia zmienność dobową PEF przedstawioną jako % zmiany w odniesieniu do średniego pomiaru PEF w odpowiednim dniu.

5.3 Immunofenotypowanie limfocytów krwi obwodowej

5.3.1 Markery i przeciwciała

Wartości odsetkowe limfocytów T (CD3+), limfocytów pomocniczych (CD3/CD4+), limfocytów T regulatorowych (CD4/CD25+) oraz aktywowanych (CD3/CD69+) krwi obwodowej zostały oznaczone z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i przeciwciał monoklonalnych wykrywających odpowiednie receptory na powierzchni limfocytów (Becton Dickinson, USA). Przeciwciało anty-CD3 (klon:UCHT1) wykrywa łańcuch- ϵ receptora TCR

(TCR – *T-cell receptor*) występujący na wszystkich limfocytach T. Przeciwciało anti-CD4 (klon:SK3) wykrywa receptor CD4 limfocytów Th. Przeciwciało anti-CD25 (klon:M-A251) reaguje z łańcuchem- α receptora IL-2R (IL-2R – *interleukin-2 receptor*). Przeciwciało anti-CD69 (klon:L78) wykrywa lektynę ulegającą ekspresji na wszystkich aktywowanych leukocytach. W celu zróżnicowania odpowiednich populacji limfocytów stosowano konjugaty przeciwciał z barwnikami fluorescencyjnymi: FITC (izotiocyanian-fluoresceiny), PE (fikoerytryna), PerCP (białkowy kompleks perydynina-chlorofil). W badaniu wykorzystano typowy protokół bezpośredniego barwienia krwi pełnej. 50 μ L krwi żyłnej pobranej na EDTA inkubowano przez 30 min z przeciwciałami (wysycające stężenia rekomendowane przez producenta) w układach podwójnych barwień: (1) FITC-CD3/PE-CD4, (2) PerCP-CD4/PE-CD25, (3) FITC-CD3/PE-CD69. Po zabarwieniu materiał utrwalono 10 minut w odczynniku FACS-Lysing Solution (FLS, Becton Dickinson, USA), a następnie przepłukano (300g/8min/Tpok) w roztworze PBS i zanalizowano w cytometrze przepływowym Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, USA) w czasie nie przekraczającym 24 godziny od barwienia.

Jako wynik analizy cytometrycznej podano: (1) %+ czyli odsetek komórek CD3 lub CD4 wykazujących ekspresję badanego antygenu w porównaniu z kontrolą izotypową (na poziomie 1%), (2) IE+ (indeks ekspresji) czyli średni zintegrowany poziom fluorescencji danego antygenu w całej populacji badanych komórek obliczony ze wzoru: $IE+ = [f+] \times [MnFL+]$ gdzie f+ oznacza frakcję komórek %, a MnFL+ oznacza średnią fluorescencję danego markera w populacji komórek dodatnich.

5.4 Izolacja limfocytów krwi obwodowej i stymulacja *ex vivo*

We wstępnych eksperymentach z wykorzystaniem krwi pobranej od zdrowych dawców opracowano metodę izolacji i hodowli limfocytów krwi, analizowano również poziom ekspresji antygenów aktywacyjnych stymulowanych limfocytów, oraz zmiany w czasie hodowli. Komórki frakcji PBMC (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) izolowano z krwi żyłnej (antykoagulacja EDTA) w przeciągu godziny od pobrania. W celu uzyskania frakcji limfocytów krwi obwodowej (PBL – *peripheral blood lymphocytes*) przeprowadzono w pierwszym etapie separację krwi pełnej metodą wirowania w gradiencie gęstości, a następnie komórki PBMC inkubowano w płaskodennych naczyniach hodowlanych w 37°C

przez 40 min w celu adherencji monocytów. Nieadherujące limfocyty stymulowano następnie mitogenem i hodowano w różnych stężeniach GCS.

5.4.1 Izolacja komórek PBL metodą separacji w gradiencie gęstości

30 mL krwi pobranej na antykoagulant EDTA (Vacuteiner) rozcieńczono buforem PBS w stosunku 2:1. Rozcieńczoną krew ostrożnie nawarstwiono na przygotowany w probówkach polipropylenowych (objętość 50 mL) odczynnik histopaque-1077 (Sigma, USA) w stosunku 1:1. Gradienty krwi zwirowano następnie 400g, przez 30min w temperaturze pokojowej (400g/30min/Tpok) bez gwałtownych przyspieszeń. Po zwirowaniu erytrocyty i granulocyty opadają na dno probówki, natomiast frakcja PBMC (z domieszką płytek) lokalizuje się na granicy pomiędzy osoczem i gradientem. Zebrane komórki PBMC przepłukano trzykrotnie buforem PBS zawierającym cytrynian sodu (PBS/Citrate) stosując niewielkie prędkości wirowania (150g/10min/Tpok). Procedura taka pozwala na odpłukanie płytek krwi. Pelletę komórek PBMC delikatnie pipetowano w 4 mL pożywki RPMI zawierającej 12,5% FCS (FCS – *fetal calf serum*), a następnie rozcieńczono do końcowej gęstości 2×10^6 w 1 mL. W optymalnych warunkach z 30 mL krwi uzyskiwano ok. 25-30 mln czystej frakcji komórek PBMC (domieszka płytek nie przekraczała 1-2 płytek w przeliczeniu na 1 limfocyta) co oznacza wydajność ok. 60%.

Z części komórek PBMC wyizolowano całkowite RNA w celu oznaczenia poziomu izoform mRNA receptorów GR, resztę komórek przeniesiono do dołków płytki 6-cio dołkowej i inkubowano przez 40 min w cieplarni (37°C , 5% CO_2). Podczas krótkiej hodowli monocyty przylegają do powierzchni dna naczynia hodowlanego, natomiast limfocyty pozostają w zawiesinie. Po odpłukaniu zawiesiny uzyskano frakcję komórek, która zawierała ponad 90% limfocytów (średnio $96,4 \pm 2,2\%$, $n=25$) oraz niewielką domieszkę monocytów (2%) i granulocytów (1,6%). Komórki PBL doprowadzono do gęstości 2×10^6 w 1 mL, rozporcjowano do dołków płytki 96-dołkowej i poddano stymulacji *in vitro*.

5.4.2 Ocena ekspresji antygenów aktywacyjnych limfocytów T

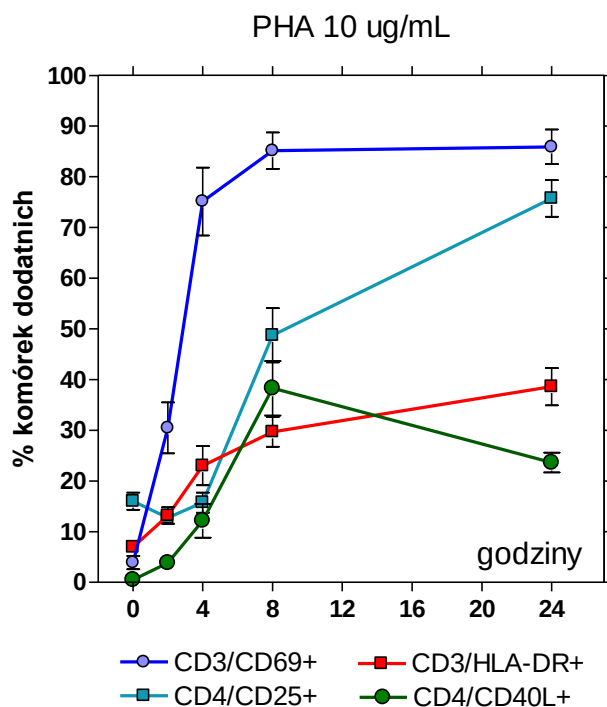
W tym badaniu do stymulacji hodowli PBL zastosowano fitohemaglutyninę-L (PHA – *phytohaemagglutinin*), białko pochodzenia roślinnego wykazujące powinowactwo do oligosacharydów (zawierających galaktozę i N-acetylogalaktozaminę), w tym różnego

rodzaju reszt cukrowych białek błonowych.^{105,106} PHA aktywuje limfocyty T po związaniu z glikoproteinami wchodzącymi w skład kompleksu TCR.

W celu oceny optymalnych warunków modelu hodowli limfocytów wykonano kilka wstępnych eksperymentów wykorzystując komórki PBL izolowane od zdrowych dawców. Ustalono optymalne stężenie PHA (10 ug/mL) które wykorzystano do stymulacji limfocytów w pozostałych eksperymentach. Analizowano również dynamikę zmian poziomu ekspresji wybranych markerów aktywacyjnych (CD69, CD25, HLA-DR i CD40L) pobudzonych limfocytów T w czasie trwania hodowli.

Zawiesinę komórek PBL w RPMI-10%FCS o gęstości 2×10^6 kom. w 1 mL rozporcjowano do dołków płytki 96-dołkowej (po 400 tys. komórek na dołek), a następnie dodano PHA w końcowym stężeniu 10 ug/mL. Komórki hodowano następnie przez 24 godziny w cieplarni 37°C/5%CO₂. Wyjściowo, oraz po 2, 4, 8 i 24 godzinach od dodania mitogenu z dołka płytki pobierano całą zawiesinę komórek, którą następnie przepłukano 1 raz w buforze PBS (200g/8min/Tpok) i rozporcjowano do probówek polistyrenowych (4,5mL) zawierających przeciwciała monoklonalne w układach: (1) CD4/CD25, (2) CD4/CD40L, (3) CD3/CD69, (4) CD3/HLA-DR (klon:L243). Równocześnie przygotowano próbki zawierające kontrolne izotypowe przeciwciała FITC-IgG1 i PE-IgG1. Komórki barwiono 30 min w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalono 10 min w odczynniku FLS, przepłukano 1 raz w buforze PBS/azide (300g/8min/Tpok) i zanalizowano w cytometrze. Zmierzono następnie odsetek limfocytów CD3+ wykazujących ekspresję antygenów CD69 lub HLA-DR oraz limfocytów pomocniczych CD4+ wykazujących ekspresję CD40L lub CD25. Wyniki 6 niezależnych eksperymentów przedstawiono na rycinie (Rysunek 9).

Stymulacja limfocytów T prowadzi do szybkiego wzrostu ekspresji CD69. Po około 8 godzinach od dodania PHA zwiększa się ekspresja HLA-DR oraz łańcucha α receptora dla IL-2. CD40L osiąga maksimum ekspresji błonowej po 8-12 godzinach i utrzymuje się na wysokim poziomie w pierwszej dobie. W drugiej dobie stwierdza się w dalszym ciągu podwyższony poziom antygenów CD69 i CD25, natomiast spada odsetek komórek CD40L+. W związku z tym iż maksymalną ekspresję większości markerów uzyskano w drugiej dobie, jak również dla uproszczenia protokołu, w dalszych badaniach ekspresję markerów oceniano po 24 godzinach od dodania PHA.



Rysunek 9. Zmiany w ekspresji głównych antygenów aktywacyjnych na limfocytach T CD3+ (CD69, HLA-DR) i pomocniczych CD4+ (CD25, CD40L) w stymulowanym mitogenem hodowlach PBL. Na wykresie przedstawiono wartości odsetkowe komórek wykazujących ekspresję danego markera (w porównaniu z izotypową kontrolą) i ich zmiany w czasie. n=6-7 niezależnych eksperymentów.

5.4.3 Wpływ deksametazonu na aktywację limfocytów

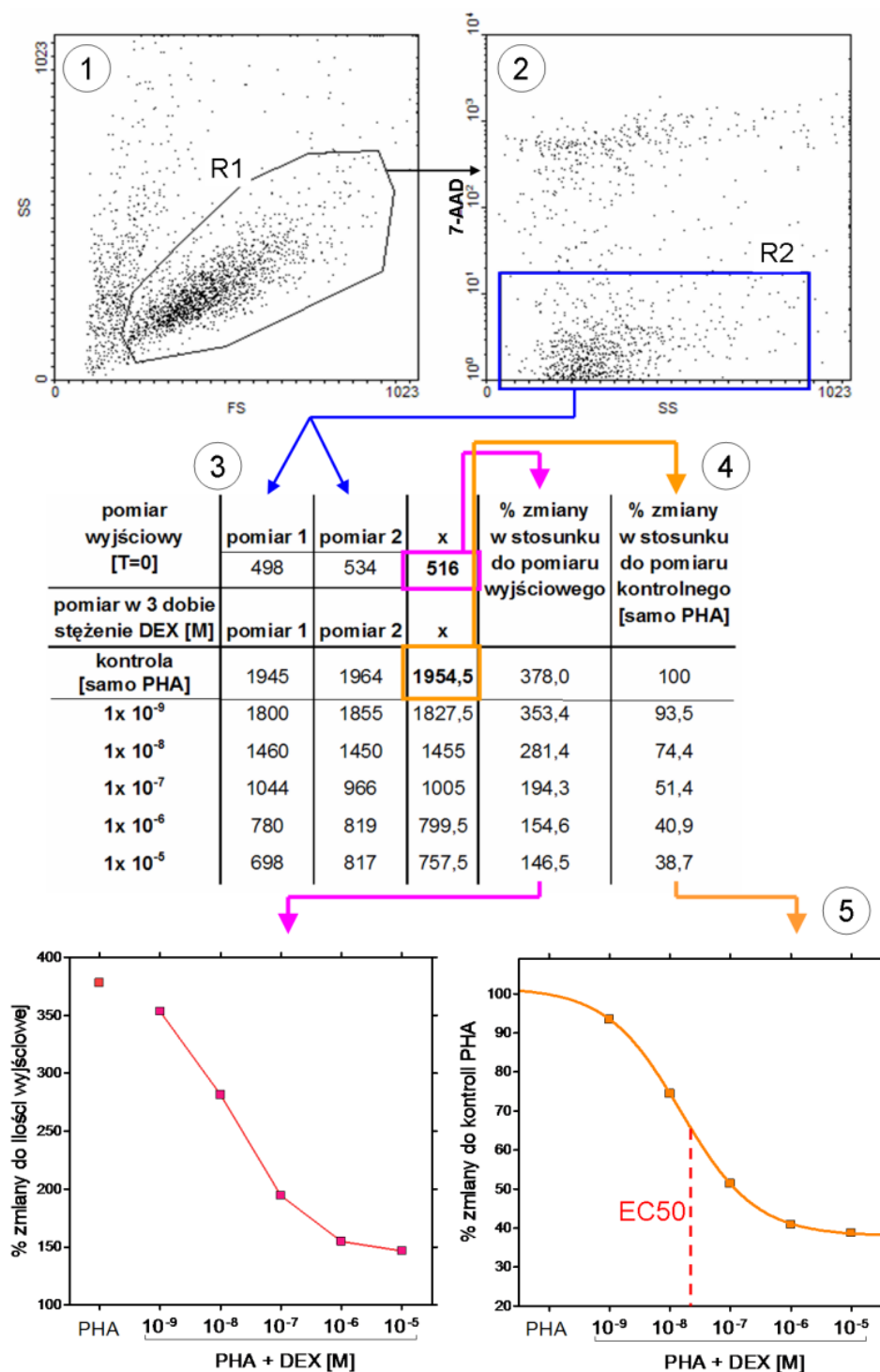
W celu oceny wpływu GCS aktywację limfocytów T do części stymulowanych hodowli dodawano deksametazon (Sigma) w końcowych stężeniach 0,1 uM oraz 10 uM. W związku z wykorzystaniem odczynnika rozpuszczonego w metanolu, do kontroli dodano roztwór metanolu w stężeniu identycznym jak w hodowli z najwyższym stężeniem GCS (0,1%). Wyniki przedstawiono w postaci: (1) %+ czyli odsetka limfocytów CD3+ lub CD4+ wykazujących ekspresję danego markera, (2) indeksu ekspresji IE+ proporcjonalnego do ilości markera na powierzchni komórek (+), (3) % zmiany do hodowli stymulowanej PHA.

5.4.4 Ocena tempa proliferacji

Najczęściej wykorzystywanymi sposobami oceny proliferacji są pomiar ilości znakowanych nukleotydów (np. radioaktywnej ^3H -tymidyny) inkorporowanych do DNA w trakcie fazy S cyklu komórkowego lub pomiary kolorymetryczne z wykorzystaniem związków redukowanych w komórkach do barwnych pochodnych. Ponieważ w hodowlach stymulowanych mitogenem obok podziałów komórkowych dochodzi również do indukcji apoptozy (zależnej od aktywacji lub działania lektyn) to prosty pomiar ilości żywych komórek dobrze odzwierciedla stan wynikający z współistnienia obu procesów. Metoda ta

została wykorzystana w tym badaniu. W tym celu do płytki 96-dołkowej dodano po $0,4 \times 10^6$ PBL (końcowa objętość 200 μL) w medium RPMI-1640 z FCS (10%), w dalszej kolejności do części dołków dodano po 25 μL roztworu PHA (końcowe stężenie 10 $\mu\text{g/mL}$), a do dwóch kontrolnych samo medium hodowlane. Następnie dodano deksametazon we wzrastających 10x stężeniach (końcowe od 1×10^{-9} do 1×10^{-5} M). Ponieważ deksametazon był wstępnie rozpuszczony w metanolu do dołków kontrolnych dodawano medium hodowlane zawierające metanol w stężeniu takim samym jak w dołku zawierającym deksametazon w najwyższym stężeniu (0,01% vol.). W ten sposób uzyskano hodowle stymulowanych limfocytów w seriach rozcieńczeń deksametazonu (ocena działania hamującego) oraz odpowiednie kontrole zawierające samą PHA (maksymalna stymulacja). Komórki inkubowano następnie 3 lub 5 dni w $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$.

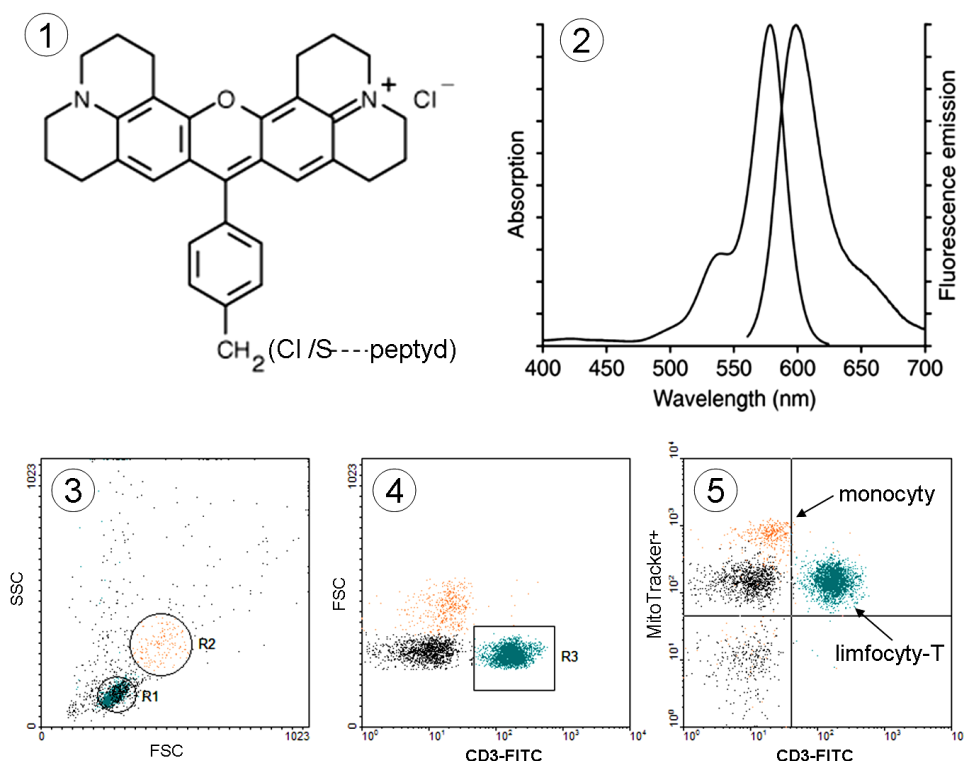
W celu oznaczenia ilości żywych limfocytów komórki z odpowiednich dołków (100 μL) przenoszono do probówki 4,5 mL zawierającej 400 μL buforu PBS i 7-aminoaktynomycynę D (7-AAD) w końcowym stężeniu 2 $\mu\text{g/mL}$. 7-AAD jest barwnikiem DNA z maksimum emisji 655 nm, który gromadzi się w martwych lub apoptotycznych komórkach.¹⁰⁷ Komórki barwiono 10 minut w 4°C w ciemności i zanalizowano w cytometrze. Próbkę analizowano w protokole, który umożliwiał zbiórkę danych z ustalonej, identycznej dla wszystkich próbek objętości zawiesiny komórek. Rejestrowano zdarzenia 7-AAD-ujemne (żywe komórki) w bramce FSC/SSC odpowiadającej limfocytom i limfoblastom. Dane przedstawiono jako (1) % zmiany w odniesieniu do wyjściowej liczby komórek, (2) % zmiany pod wpływem deksametazonu w porównaniu do próbki kontrolnej stymulowanej PHA, (3) EC_{50} czyli stężenie deksametazonu przy którym uzyskano 50% efekt hamowania proliferacji. Szczegółowy opis analizy danych proliferacji przedstawiono na rysunku (Rysunek 10)



Rysunek 10. Sposób analizy danych proliferacji limfocytów stymulowanych *in vitro* (seria danych jednego eksperymentu). (1) Dane z cytometru na wykresie punktowym FSC/SSC, zdarzenia z bramki R1 odpowiadające limfocytom/limfoblastom zostały przedstawione na (2) wykresie fluorescencji 7-AAD (oś Y), bramka R2 zawiera tylko żywe komórki (7-AAD ujemne). (3) liczba żywych komórek uzyskana przy akwizycji z zachowaniem takich samych objętości analizowanej próbki. Tabela zawiera dwie serie danych i średnią x. (4) dane przedstawione jako % w stosunku do wartości wyjściowych zmierzonych w dniu zakładania hodowli, oraz w stosunku do próbki stymulowanej PHA (bez DEX). (5) dane przedstawione na wykresach % zmiany względem stężenia DEX, EC_{50} oznacza takie stężenie deksametazonu przy którym uzyskuje się połowę efektu hamowania.

5.5 Ocena wpływu deksametazonu na apoptozę limfocytów

W celu oznaczenia odsetka apoptotycznych limfocytów mierzono zmiany potencjału mitochondrialnego komórek z wykorzystaniem barwnika MitoTracker Red CMX-Ros (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Barwnik MitoTracker jest związkiem z grupy X-rozamin, który z łatwością przenika przez błony komórkowe i gromadzi się w mitochondriach żywych komórek, gdzie ulega utlenieniu do fluoryzującej pochodnej (Rysunek 11).



Rysunek 11. Detekcja komórek apoptotycznych z zastosowaniem odczynnika MitoTracker Red CMX-Ros. (1) Struktura cząsteczki barwnika, zaznaczono miejsce wiązania z resztami tiolowymi białek. (2) Widmo absorpcji/emisji. (3) Komórki PBL na wykresie danych cytometru przepływowego FSC/SSC (wielkość/ziarnistość), region R1- limfocyty, region R2-monocyty. (4) Frakcja limfocytów T CD3+ na wykresie fluorescencja-FITC/FSC. (5) Mapa potencjału mitochondrialnego komórek PBL znakowanych 2 godziny po izolacji z krwi, w górnych kwadrantach żywe komórki z prawidłowym potencjałem mitochondrialnym (w tym limfocyty T), w dolnych kwadrantach komórki apoptotyczne/nekrotyczne (w tym ok. 1% limfocytów T).

W celu oznaczenia odsetka apoptotycznych limfocytów T zawieszę komórek PBL w medium RPMI-1040 z FCS (końcowe stężenie 10%) rozporcjowano do dołków płytki 96-dołkowej (po 300 tys. komórek). Do odpowiednich dołków płytki dodano następnie deksametazon w trzech stężeniach (1 nM, 100 nM i 10 uM) lub medium hodowlane (kontrola, metanol 0,01% vol). GCS dodano w dniu izolacji komórek lub po 24 godzinach

hodowli. Po 1, 3 lub 5 dniach inkubacji ze steroidami 100 uL zawiesiny komórek z odpowiednich dołków płytki przepłukano w 1 mL buforu PBS (zwirowano 250g/7min/T-pok) i zawieszono w 200 uL roztworu MT (100 nM) w medium hodowlanym RPMI-1040 (37°C). Zawiesinę komórek inkubowano w cieplarni przez 30 min, a następnie przepłukano 1x w PBS (37°C). Pelletę komórek zworteksowano w 50 uL PBS, a następnie dodano 10 uL przeciwciała monoklonalnego FITC-anti-CD3. Komórki barwiono 15 min w T-pokoju, inkubowano 10 min, a następnie przepłukano w 1 mL 0,5%-paraformaldehydu-PBS i zanalizowano w cytometrze przepływowym. Oznaczono odsetek komórek apoptotycznych, MT ujemnych w bramce limfocytów (FSC/SSC) i limfocytów T (CD3+). (Rysunek 11)

5.6 Ocena ekspresji izoform receptora glikokortykosteroidowego

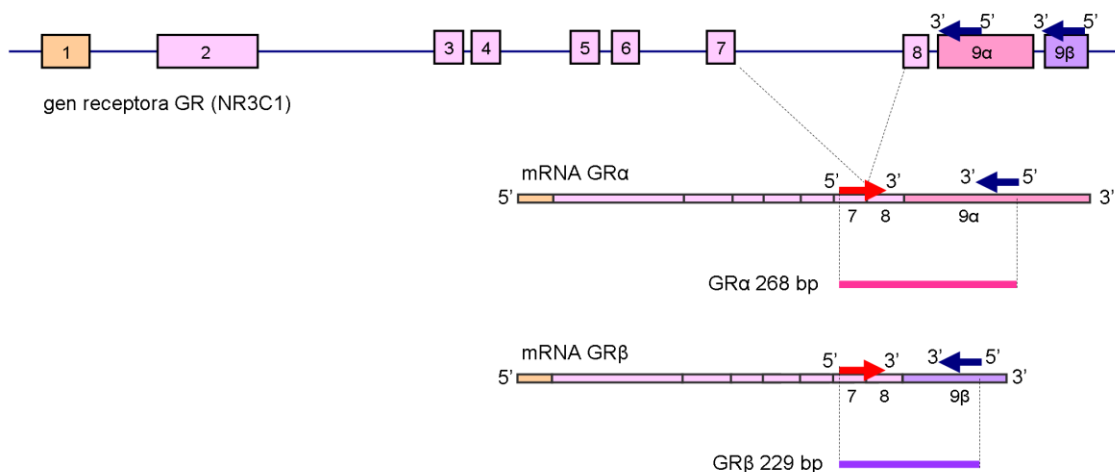
5.6.1 Izolacja całkowitego RNA i pomiar stężenia

Całkowite komórkowe RNA izolowano z pelety 6×10^6 komórek PBMC z wykorzystaniem zmodyfikowanej jednoetapowej metody wg. Chomczyńskiego i Sacchi.^{108,109} W badaniu wykorzystano odczynnik TRI Reagent (Sigma, Saint Louis, USA) będący mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny. Pelletę komórek zawieszano w 1 mL odczynnika TRI Reagent, a następnie pozostawiono przez 5 minut w temperaturze pokojowej w celu pełnej lizy. Po dodaniu 0,2 mL chloroformu i energicznym wymieszaniu lizat komórkowy rozdziela się na trzy warstwy. Górną fazę wodną zawierającą RNA (około 400 uL) odwirowano 12.000g/15min/4°C i dodano 0,5 mL alkoholu izopropylowego w celu precypitacji RNA (10 minut w T pokojowej). Próbkę odwirowano następnie 12.000g/10min/4°C uzyskując osad precypitatu RNA, który przepłukano dwukrotnie w 1 mL 75% alkoholu etylowego, a następnie zamrożono w -80°C (w 75% etanolu) aż do ostatecznej analizy (3-6 miesięcy). Bezpośrednio przed odwrotną transkrypcją próbki odwirowano, a RNA rozpuszczono w 20 uL ddH₂O (ddH₂O - *double-distilled H₂O* – woda redestylowana) w celu zmierzenia ilości RNA. Pomiaru spektrofotometrycznego stężenia RNA w próbkach dokonano przy użyciu spektrofotometru (DNA Quant, Pharmacia). Stosunek absorbancji światła UV przy długości fali 260 (A_{260} – maksimum absorbancji dla kwasów nukleinowych) do absorbancji przy długości 280 (A_{280} – maksimum absorbancji dla aminokwasów aromatycznych) pozwala na

oszacowanie czystości próbek.^b Po zanalizowaniu wszystkich dostępnych próbek RNA średni stosunek A_{260}/A_{280} wyniósł $1,68 \pm 0,15$ ($n=48$). 6 próbek nie włączono do analizy z uwagi na bardzo małą ilość wyizolowanego RNA lub niską wartość A_{260}/A_{280} ($<1,4$). W badanym materiale znalazły się próbki z wynikiem w przedziale 1,45-1,7 ale z uwagi na równomierny rozdział w poszczególnych grupach zostały one ostatecznie uwzględnione w analizie. Średnie stężenie RNA w analizowanych próbkach wyniosło $0,24 \pm 0,1$ ug/uL ($n=42$).

5.6.2 Projektowanie starterów reakcji PCR.

W celu oceny ekspresji obu izoform mRNA w pierwszym etapie w oparciu o sekwencję genu NR3C1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) oraz sekwencji mRNA GR α (X03225) i GR β (X03348) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) zaprojektowano startery do reakcji PCR (program Oligo 5.0). Zasady którymi kierowano się wybierając sekwencje starterów przedstawiono na rycinie poniżej (Rysunek 12).



Rysunek 12. Projektowanie starterów reakcji PCR. W oparciu o opublikowaną sekwencję mRNA obu izoform zaprojektowano wspólny starter sensowny GR5 (czerwona strzałka) komplementarny do sekwencji cDNA w miejscu połączenia eksonów 7 i 8. Startery antysensowne (niebieskie strzałki), komplementarne do sekwencji mRNA w eksonach 9 α (GR3A) lub 9 β (GR3B) zostały wykorzystane w reakcji RT. W reakcji PCR z parami odpowiednich starterów powstają produkty o wielkości 268 bp (GR α) lub 229 bp (GR β). Genomowe DNA nie ulega amplifikacji z uwagi na dobór startera GR5 (miejsce składania eksonów) i długość ponad 3 kb (intron między eksonami 8 i 9).

Ostatecznie zaprojektowano i zsyntetyzowano (TIB MOLBIOL, Poznań) wspólny dla obu izoform starter sensowny GR5 5'-CTT CTC TCT TCA GTT CCT AAG GAC-3' (eksony 7/8

^b Stosunek $A_{260}/A_{280} \sim 2.0$ oznacza czyste RNA, $A_{260}/A_{280} \sim 0,6$ oznacza czyste białko. Wynik w przedziale 1,7 – 2,0 oznacza dobrej jakości materiał z niewielką ilością zanieczyszczeń (najczęściej fenol lub białka).

nukleotydy: 2143-2166) i swoiste startery antysensowne GR3A 5'-GAT TGG TGA TGA TTT CAG CTA ACA-3' (ekson 9 α CDS nukleotydy: 2387-2410) i GR3B 5'-GGG ATG AAA ATC AGA TTA ATG TG-3' (ekson 9 β CDS/UTR nukleotydy: 2349-2371). Końcowe produkty PCR miały długość 268 par zasad (GR α) i 229 par zasad (GR β). Do oceny poziomu ekspresji genu referencyjnego, β -aktyny użyto komercyjnie dostępne startery HBACTIN.A 5'-GGG TAC ATG GTG GTG CCG-3' i HBACTIN.S 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3' (Integrated DNA Technologies, USA) a końcowy produkt amplifikacji miał wielkość 307 bp.

5.6.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji

W reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR – *reverse transcription PCR*) enzym odwrotna transkryptaza syntetyzuje DNA wykorzystując matrycę mRNA. Powstające komplementarne DNA (cDNA – *complementary DNA*) może zostać wykorzystane w amplifikacji PCR.

Tabela 4. Przygotowanie reakcji RT-PCR.

końcowa objętość	15 uL	20 uL
starter antysensowny	GRα, β-aktyna	GRβ
bufor AMV 5x	3 uL	4 uL
AMV (10 U/uL)	0,75 uL	1 uL
RNAse inhibitor (10 U/uL)	0,375 uL	0,5 uL
dNTP (20 uM)	0,75 uL	1 uL
starter GR3A (20 uM)	0,75 uL	-
starter GR3B (20 uM)	-	1 uL
starter HBACTIN.A (20 uM)	0,75 uL	-
RNA (ug)	0,75 ug	1 ug
RNA + ddH ₂ O (vol.)	8,625 uL	12,5 uL

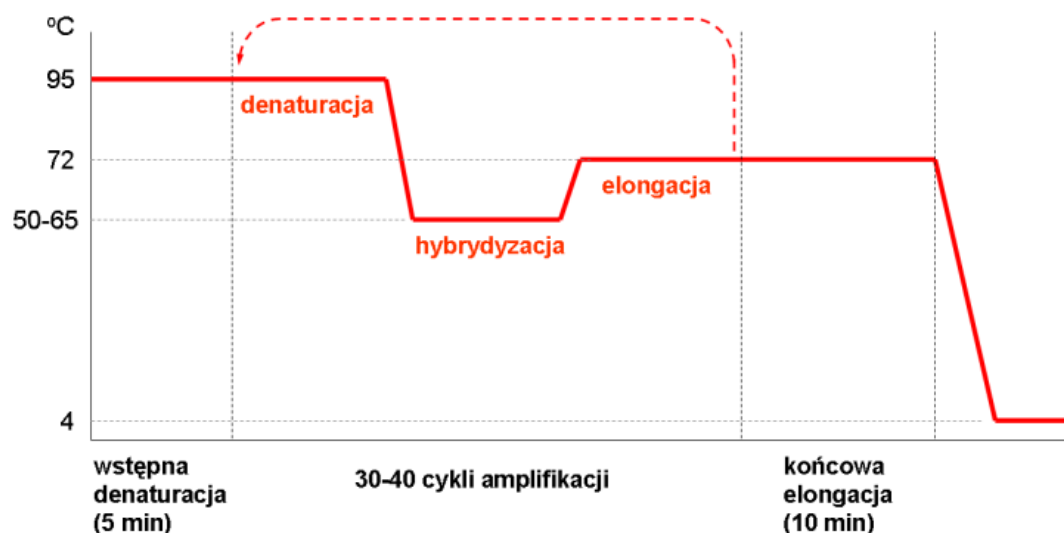
W celu zwiększenia swoistości reakcję RT przeprowadzono ze starterami antysensownymi w równoległych seriach próbek. Reakcję RT z starterami GR3A (dla GR α) i HBACTIN.A (dla β -aktyny) wykonano w końcowej objętości 15 uL z 0,75 ug RNA, a RT z starterem GR3B (dla GR β) w objętości 20 uL z 1 ug RNA, w związku z tym stężenie końcowe substratów reakcji było w obu przypadkach identyczne (Tabela 4).

W celu zmniejszenia błędów związanych z porcjowaniem odczynników i RNA, reakcje RT-PCR były wykonywane w równocześnie dla GR α i GR β , w czterech seriach próbek rozdzielonych losowo pomiędzy badanymi grupami. Do reakcji RT-PCR użyto enzym odwrotną transkryptazę AMV (AMV RT – *avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*, Amresco, USA) z optimum działania w temperaturze 37°C. W celu zablokowania aktywności RNAzy do mieszaniny reakcyjnej

do dodano inhibitor rybonukleaz (ribonuclease inhibitor, Amresco, USA). Reakcję RT przeprowadzono w termocyklerze (T3 thermocycler, Biometra). W pierwszym etapie próbki inkubowano 1 godzinę w 37°C (RT), a następnie 30 min w 70°C (denaturacja RNA). cDNA przechowywano zamrożone w -80°C.

5.6.4 Optymalizacja reakcji PCR.

Reakcja PCR jest metodą enzymatyczną służącą do amplifikacji krótkich fragmentów DNA *in vitro*. Schemat i opis etapów reakcji PCR przedstawiono na rycinie (Rysunek 13). We wstępnych eksperymentach wykonano reakcje PCR z różnymi buforami i stężeniem jonów Mg^{+2} , jak również wzrastającymi temperaturami hybrydyzacji (55 do 70 °C). Produkty amplifikacji oceniano po rozdzieleniu w 2% żelu agarozowym (SFR, Amresco) z dodatkiem bromku etydy (0,5 mg/mL, Sigma) w buforze TBE (TRIS: 12,1 g/L, kwas borowy: 5,13 g/L, EDTA 0,37 g/L) przy użyciu aparatu (VDS Pharmacia). Prążki DNA wykrywano w świetle lampy UV transiluminatora sprzężonego z kamerą fotograficzną i komputerem. Ostatecznie ustalono optymalne parametry PCR, które zestawiono w tabeli (Tabela 5).



Rysunek 13. Schemat reakcji PCR. Pierwszym etapem jest wstępna denaturacja (rozdzielenie podwójnej nici DNA) w temperaturze ok. 95°C. Podczas hybrydyzacji (*annealing*) startery wiążą się w odpowiednio dobranej temperaturze do komplementarnych miejsc w DNA na przeciwnych końcach matrycy. W trakcie elongacji termostabilna polimeraza DNA syntetyzuje w optymalnej dla jej działania temperaturze 72°C komplementarną nić DNA. Po około 30-40 cyklach, w których ilość kopii przyrasta w tempie geometrycznym uzyskuje się miliony kopii amplifikowanego fragmentu DNA. Po ostatnim etapie końcowej elongacji reakcja zostaje przerwana przez obniżenie temperatury do 4°C. oś Y – temperatura, oś X – czas, etapy.

Tabela 5. Zoptymalizowane parametry reakcji PCR.

parametry amplifikacji	GR α	GR β	β -aktyna
liczba cykli	35	40	25
denaturacja czas/temp.	30 sek. / 95°C	30 sek. / 95°C	30 sek. / 95°C
annealing czas/temp.	30 sek. / 66°C	30 sek. / 63°C	30 sek. / 55°C
elongacja czas/temp.	30 sek. / 72°C	30 sek. / 72°C	30 sek. / 72°C
bufor	Taq	Taq	Taq
ilość uL starterów w 50 uL reakcji	2x 1 uL	2x 1 uL	2x 0,5 uL

5.6.5 Przygotowanie standardów DNA izoformy GR α

W celu przygotowania standardów GR α do reakcji real-time PCR produkt amplifikacji GR α rozdzielono w 2% żelu agarozowym o niskim punkcie topnienia z dodatkiem bromku etydy. Prążek na wysokości 270 bp odpowiadający zamplifikowanemu fragmentowi cDNA GR α został wycięty z żelu, a zawarte DNA zostało oczyszczone z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA (Qiaex II gel extraction Kit, Qiagen, USA). Oczyszczony produkt PCR wklonowano do wektora pcDNA-2.1 (Invitrogen), którym w dalszej kolejności stransformowano kompetentne bakterie *Escherichia coli* F10. Po selekcji, izolacji i namnożeniu stransformowanych bakterii (wektorem z insertem) plazmidowe DNA wyizolowano z wykorzystaniem zestawu Qiagen Maxi Prep (Qiagen, USA). Oczyszczony plazmid rozcieńczono w 30 uL ddH₂O uzyskując końcowe stężenie 0,03 ug/uL (zmierzone za pomocą spektrometru). Ponieważ pcDNA-2.1 (3908 bp) wraz z insertem (268 bp) ma łączną długość 4178 bp, a 1 mol dwuniciowego DNA o długości 1000 bp waży $6,5 \times 10^5$ g to uzyskano $6,67 \times 10^8$ kopii plazmidu w 1 uL. W dalszej kolejności przygotowano rozcieńczenia plazmidu w ddH₂O od 1×10^7 do 1×10^3 w 1 uL, które zostały wykorzystane jako wewnętrzne standardy w reakcji real-time PCR.

5.6.6 PCR w czasie rzeczywistym

PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) jest jedną z metod ilościowego oszacowania liczby kopii mRNA (cDNA) lub DNA w badanej próbce. Do reakcji real-time PCR wykorzystano amplifikator iCycler (Bio Rad) wyposażony w lampę halogenową i zestaw filtrów optycznych. W badaniu wykorzystano metodę z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR-Green który fluoryzuje po związaniu z dwuniciowym DNA. Podczas

kolejnych cyklów amplifikacji system optyczny amplifikatora fotografuje dołki płytki reakcyjnej i mierzy intensywność fluorescencji, która jest wprost proporcjonalna do ilości produktu reakcji. Oprogramowanie pozwala na eliminację tła rejestrowanego podczas pierwszych kilkunastu cykli reakcji oraz obliczenie progu (*threshold*), czyli takiej wartości fluorescencji (a więc ilości produktu) przy której wykres rozpoczyna fazę eksponentyjnego wzrostu. Cykl reakcji w którym to przejście następuje to tzw. CT (*threshold cycle*). Po zakończeniu reakcji przeprowadzonej równocześnie ze standardami o znanej ilości matrycy, na podstawie uzyskanych wartości CT można bardzo dokładnie określić wyjściową ilość produktu (np. mRNA) w badanej próbce. Uzyskane dane normalizowano po uwzględnieniu wyników amplifikacji genu referencyjnego β -aktyny. Dokładny opis metodologii real-time PCR w którym opisano warunki reakcji, barwnik SYBR-Green, sposób analizy danych i metody standaryzacji znajduje się w pozycjach piśmiennictwa nr 110 i 111.

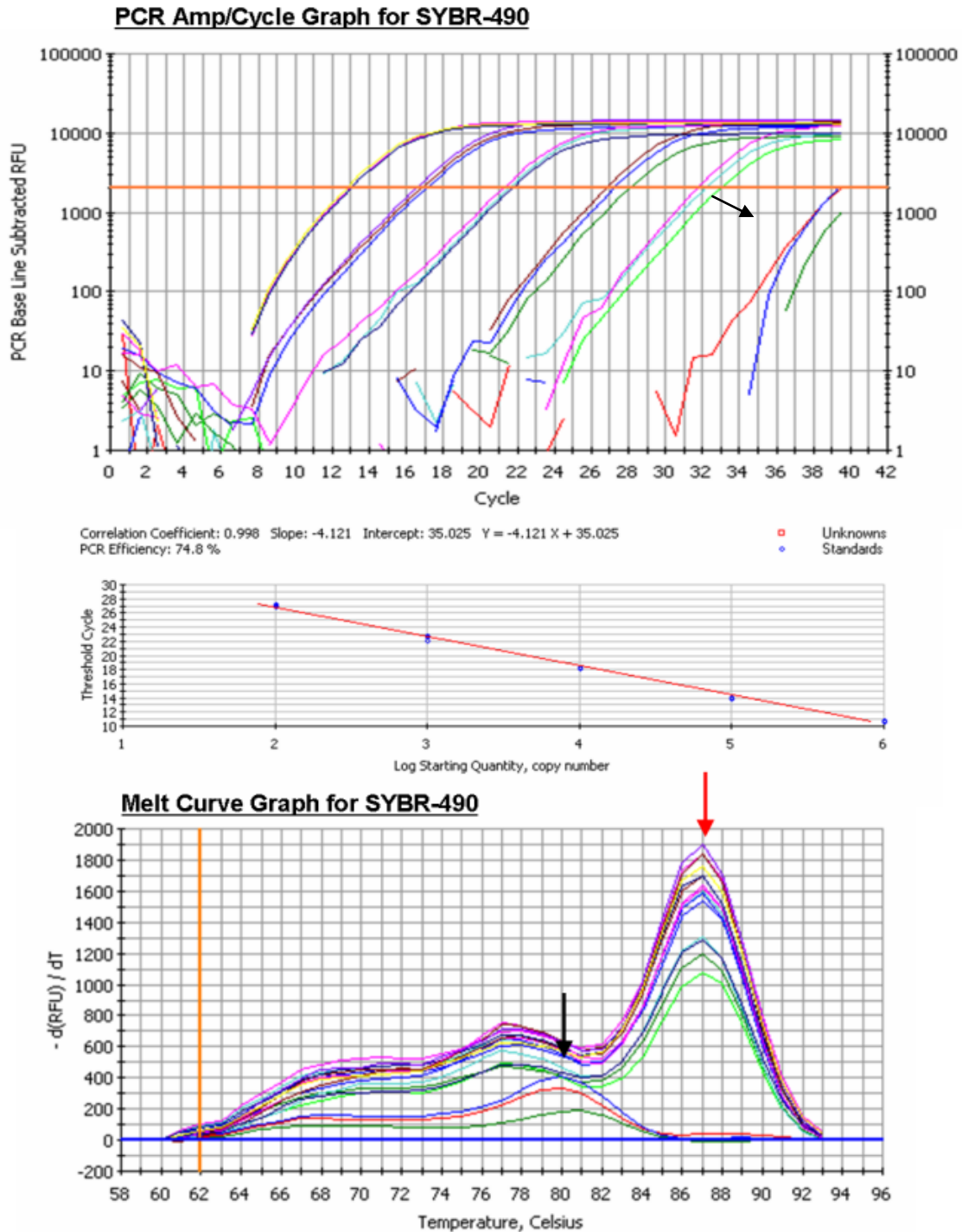
5.6.7 Ocena ekspresji mRNA GR α

Tabela 6. Składniki reakcji real-time PCR i reakcji PCR GR β .

końcowa objętość	50 uL	50 uL	25 uL
wykrywany produkt	GRα	β-aktyna	GRβ
bufor Taq 10x	5 uL	5 uL	2,5 uL
Taq polimeraza	1 uL	1 uL	0,5 uL
dNTP (20 uM)	0,5 uL	0,5 uL	0,25 uL
Primer GR3A (20 uM)	1 uL	-	-
starter GR3B (20 uM)	-	-	0,5 uL
starter GR5 (20 uM)	1 uL	-	0,5 uL
HBACTIN.A (20 uM)	-	0,5 uL	-
HBACTIN.S (20 uM)	-	0,5 uL	-
cDNA po RT (vol.)	4 uL	2 uL	3,5 uL
roztwór SYBR (5x)	10 uL	10 uL	-
ddH ₂ O (vol.)	27,5 uL	30,5 uL	17,25 uL

Reakcję real-time PCR dla GR α przeprowadzono w duplikatach (dwie serie amplifikacji ze standardami). Real-time PCR β -aktyny wykonano w trzech seriach amplifikacji. Do reakcji PCR wykorzystano próbki cDNA po reakcji odwrotnej transkrypcji z primerami swoistymi GR3A i HBACTIN.A (końcowa objętość 15 uL, z czego 8 uL wykorzystano do amplifikacji GR α a 4 uL do amplifikacji β -aktyny). W tabeli

(Tabela 6) zestawiono skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej w real-time PCR z uwzględnieniem stężeń i objętości poszczególnych odczynników.



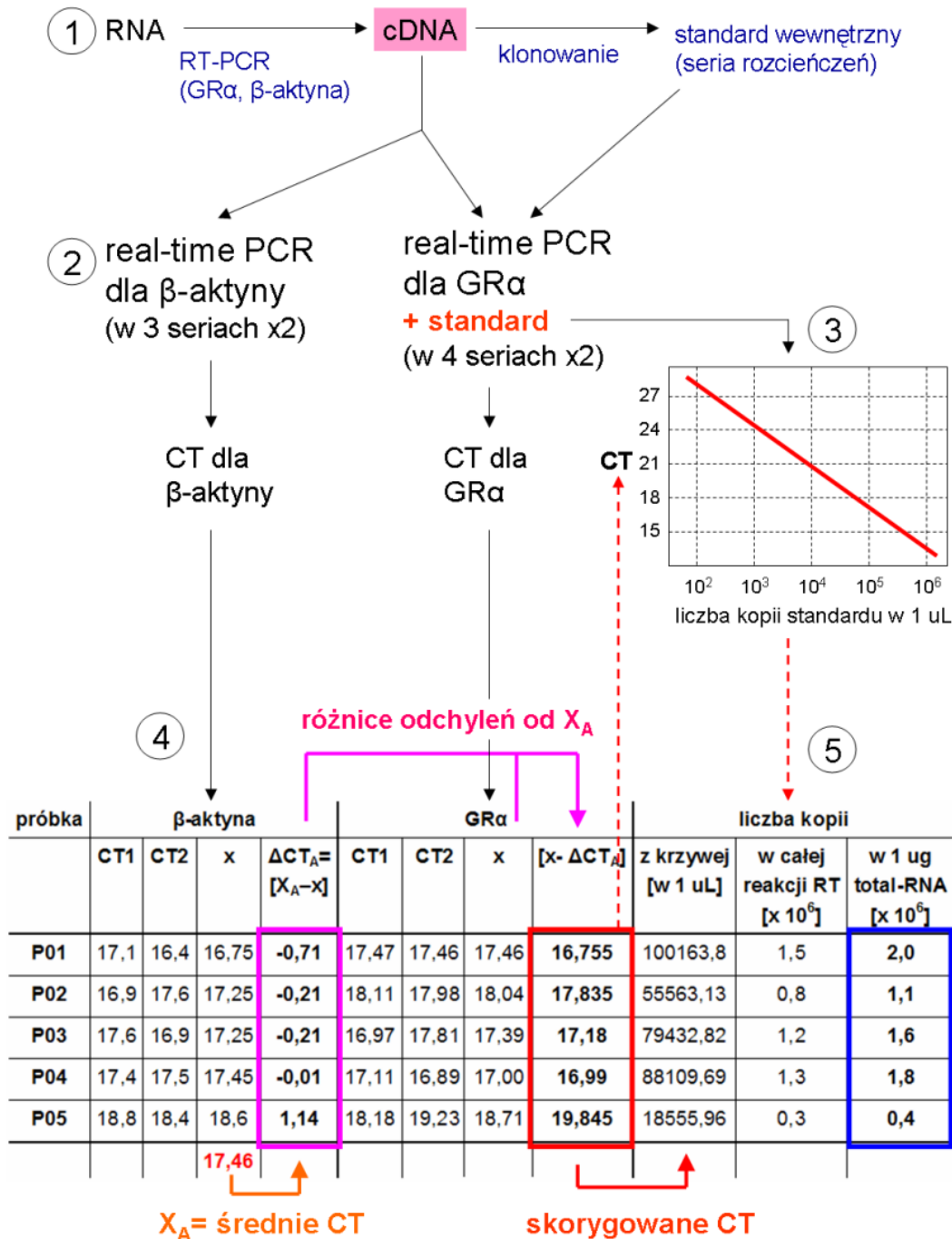
Rysunek 14. Krzywa standardowa reakcji real-time PCR do oceny ekspresji GR α . **(góra)** Oryginalny wykres programu iCycler IQ przedstawiający zmiany fluorescencji (RFU, oś Y w skali log) w kolejnych cyklach PCR. Amplifikowano standard w pięciu rozcieńczeniach oraz próbkę ślepą (strzałka), próg do oznaczenia CT oznaczony pomarańczową linią. **(środkowy rysunek)** Krzywa standardowa, oś Y kolejne cykle PCR, oś X log dziesiętny ilości kopii w 1 uL dodanego standardu. **(dół)** Krzywa topnienia, produkt GR α o T_m 87°C (czerwona strzałka), dimery starterów <82°C (czarna strzałka).

Do dołków 96-cio dołkowej płytki reakcyjnej dodawano 46 uL (GR α) lub 48 uL (β -aktyna) mieszaniny reakcyjnej, a następnie 4 lub 2 uL cDNA jako matrycę do reakcji PCR.

Protokół reakcji real-time PCR GR α składał się z czterech części: (1) etapu wstępnej denaturacji z pomiarem fluorescencji tła, (2) etapu amplifikacji i rejestracji danych powtórzonego 40 razy, (3) etapu krzywej topnienia (55-95°C) ze skokowymi przyrostami temperatury o 1°C i 30 sekundowym etapem pomiaru, (4) etapu końcowej elongacji i chłodzenia. Specyficzność reakcji real-time PCR potwierdzono analizując wykres krzywej topnienia i po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji.

Na wykresie temperatura topnienia (T_m – *melting temperature*) dla fragmentu GR α wynosiła 87°C natomiast dla dimerów starterów z próbki kontrolnej około 80°C. We wszystkich analizowanych próbkach uzyskano po amplifikacji wyraźny produkt z T_m 87°C oraz bardzo niewielką ilość produktu z T_m <82°C (Rysunek 14). Po rozdziale elektroforetycznym we wszystkich amplifikowanych próbkach uzyskano jeden prążek na wysokości około 270 bp (GR α – 268 bp).

Do krzywej standardowej użyto tryplikaty rozcieńczeń plazmidu od 1×10^2 do 1×10^6 kopii w 1 uL (dodawano 4 uL na jedną reakcję). We wszystkich reakcjach uzyskiwano bardzo dobry współczynnik liniowej regresji dla krzywej średnich CT rozcieńczeń standardu ($r \geq 0,99$, $p < 0,0001$). Wariacja w obrębie tej samej reakcji (*intraassay variation*) obliczona z wzoru $[SD/x] \cdot 100\%$, gdzie SD – odchylenie standardowe, x – średnia dla danego rozcieńczenia ($n=3$) nie przekraczała 2%. Wariacja pomiędzy różnymi reakcjami (*interassay variation*) wyniosła przykładowo 2,8% dla rozcieńczenia 1×10^5 kopii/uL i 5,7% dla rozcieńczenia 1×10^2 kopii/uL ($n=4$). Wydajność reakcji PCR (E – *real-time PCR efficiency*) dla standardu GR α obliczona z nachylenia krzywej wyniosła 1,8 (73%). Pomimo wprowadzenia zmian w końcowym stężeniu primerów i SYBR Green nie udało się zwiększyć wydajności reakcji (optymalna $\geq 80\%$), jednak z uwagi na bardzo dobrą korelację i małą wariację zdecydowano o kontynuacji badania próbek cDNA przy zachowaniu wcześniej zestawionych parametrów reakcji (Tabela 5, Tabela 6).



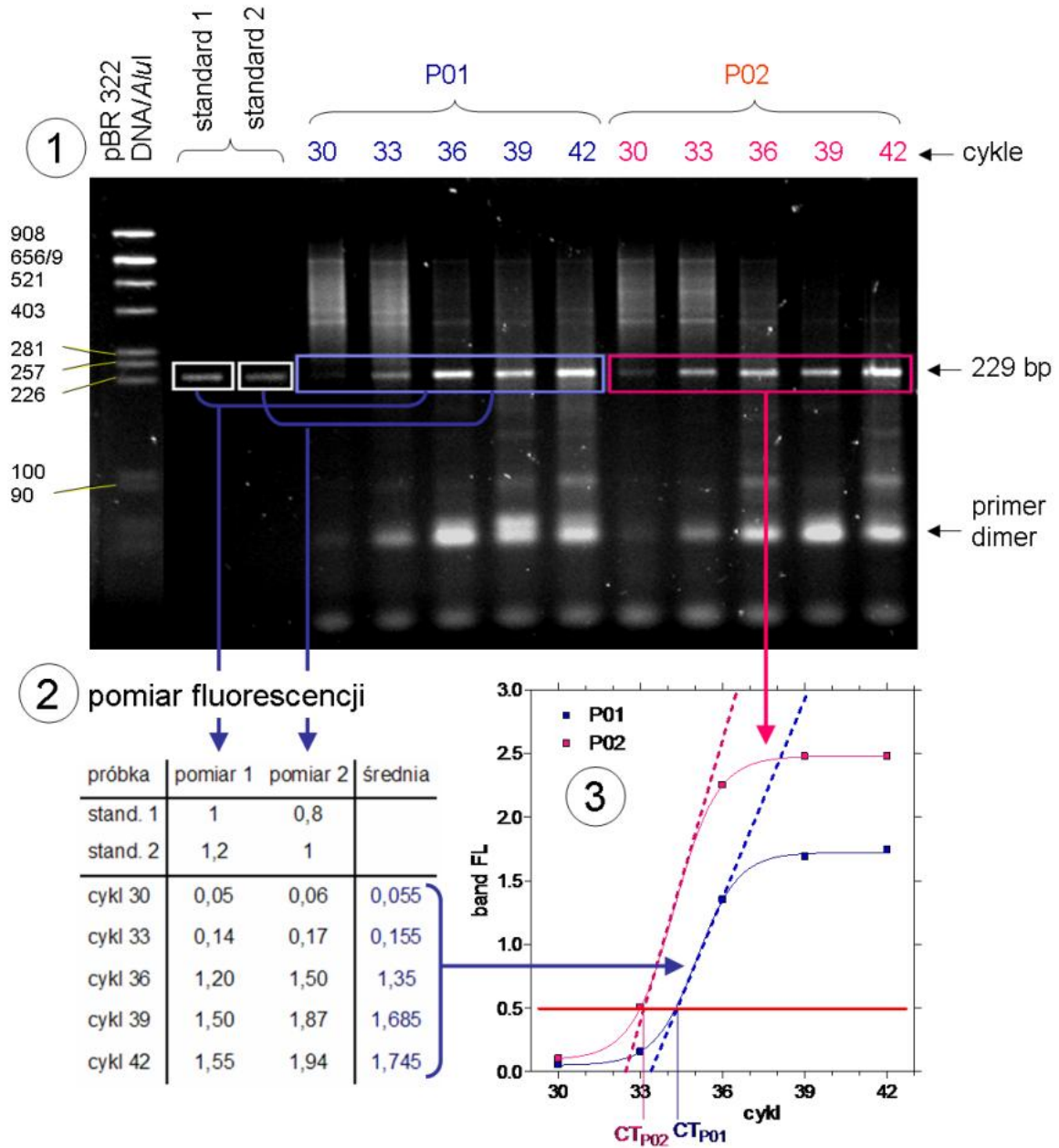
Rysunek 15. Model analizy danych real-time PCR dla oceny ekspresji GRα. (1) Całkowite RNA komórkowe w reakcji RT ze swoistymi starterami dla GRα i β-aktyny zostało przepisane do cDNA. Fragment cDNA GRα sklonowano w celu przygotowania zewnętrznego standardu. (2) Reakcję real-time PCR przeprowadzono w kilku seriach oddzielnie dla obu genów. (3) W trakcie reakcji PCR GRα wykonywano krzywe standardowe dla wzrastających rozcieńczeń plazmidu. (4) Tabela przedstawia przykład analizy oryginalnych danych pięciu losowo wybranych próbek. Początkowo obliczono średnie CT dla aktyny i GRα (x – w tabeli), oraz różnicę odchylen od średniej (ΔCT_A) dla wyników CT aktyny. (5) Średnie wyniki CT dla GRα normalizowano wykorzystując ΔCT_A aktyny. Liczbę kopii mRNA w wyjściowej próbce obliczono z równania krzywej standardowej po podstawieniu skorygowanego CT dla GRα i przeliczeniu dodawanych objętości po reakcji RT.

Dla potrzeb badania opracowano model analizy danych uwzględniający standaryzację wewnętrzną i zewnętrzną, którego szczegółowy opis wraz z przykładem przedstawiono na rycinie (Rysunek 15). W pierwszej kolejności obliczono odchylenia od średniej wartości CT dla wszystkich próbek β -aktyny (ΔCT_A). Średnie wyniki GR α normalizowano odejmując ΔCT_A . Skorygowane wyniki CT GR α wprowadzono do równania krzywej standardowej (dla każdej serii próbek oddzielnie) i uzyskano ilość kopii GR α w 1 uL dodanego cDNA. Ostatecznie obliczono ilość kopii mRNA GR α w 1 μ g całkowitego RNA.

5.6.8 Ilościowa ocena produktów konwencjonalnej reakcji PCR GR β

Z uwagi na bardzo małą liczbę kopii mRNA GR β w badanym materiale, podczas amplifikacji próbek kontrolnych nie udało się w pełni zoptymalizować warunków reakcji PCR. Po rozdiale elektroforetycznym próbek amplifikacji po 40 cyklach PCR obserwowano jedynie niewielki prążek odpowiadający produktowi GR β , oraz znaczną ilość dimerów starterów. Obecność dimerów ograniczyła możliwości wykorzystania SYBR Green w reakcji real-time PCR. W celu wiarygodnej oceny liczby kopii mRNA dla GR β opracowano metodę ilościowej oceny produktów konwencjonalnej reakcji PCR, która przypomina metodę real-time PCR, z tym że produkty reakcji oceniane są za pomocą programu do analizy obrazu.

W tym celu z każdej próbki cDNA GR β (końcowa objętość 20 uL po reakcji RT) wykonano 5 identycznych reakcji PCR o końcowej objętości 25 uL (Tabela 6). Reakcje amplifikacji prowadzono wg protokołu opisanego w tabeli (Tabela 5) i zatrzymywano po 30, 33, 36, 39 i 42 cyklach PCR. Produkty amplifikacji rozdzielono w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze TBE przy stałych parametrach elektroforezy (60 min, 100 V). Prążki produktu GR β (229 bp) uwidoczniono w świetle UV transluminatora, a następnie sfotografowano. Cyfrowe zdjęcia analizowano wykorzystując oprogramowanie do wizualizacji i dokumentacji elektroforezy na żelach agarozowych (ImageMaster, VDS-Pharmacia Biotech). Do standaryzacji wykorzystano wyizolowany i oczyszczony fragment amplifikacji GR β , który dodawano w stałej objętości do dwóch studzienek żelu. Średnie wyniki współczynników fluorescencji w kolejnych cyklach PCR przedstawiono na wykresie w programie GraphPad Prism. Próg w którym mierzono CT został wyznaczony arbitralnie na wysokości fazy wzrostu eksponentialnego (współczynnik fluorescencji 0,5) po zanalizowaniu wszystkich danych (Rysunek 16).

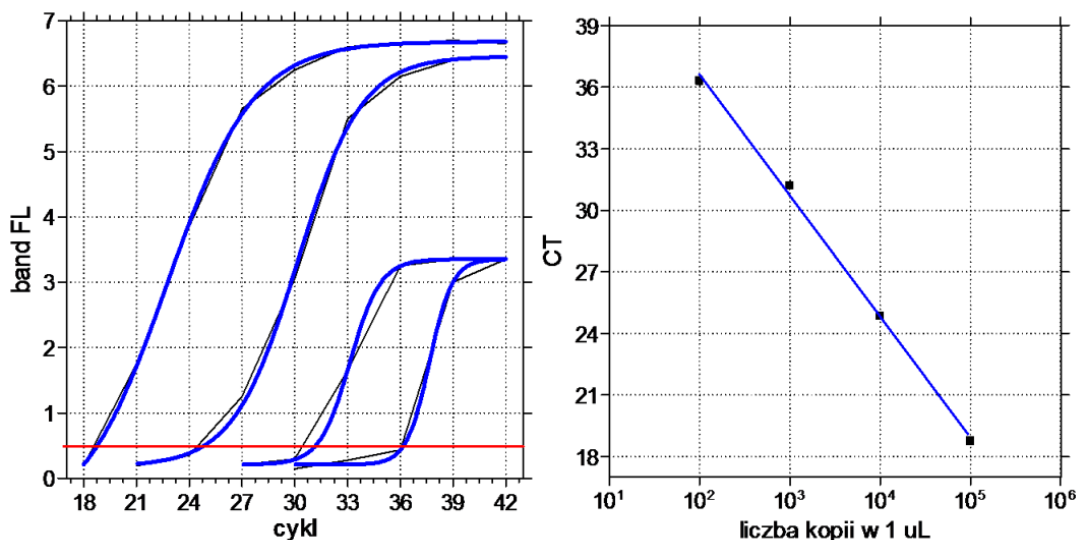


Rysunek 16. Analiza danych GR β (część pierwsza). (1) Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji GR β (reakcję PCR zatrzymywano co trzy cykle). W pierwszej linii marker wielkości produktu. W dwóch kolejnych standard GR β . Pozostałe: dwie przykładowe serie próbek. (2) Fluorescencję prążków mierzono dwukrotnie, a następnie normalizowano wykorzystując wewnętrzny standard. (3) Średnie wyniki współczynnika fluorescencji przedstawiono na wykresie z którego odczytano wartości względne CT. W tym przypadku CT_{P01} (34,4) i CT_{P02} (33,1) różnią się o $\Delta CT=1,3$, czyli wyjściowa próbka P02 zawiera około 2,5 razy więcej cDNA GR β .

5.6.9 Przygotowanie standardu GR β

Do przygotowania standardu wykorzystano produkt amplifikacji GR β (kilka prążków 230 bp) wyizolowany z żelu agarozowego po rozdiale elektroforetycznym (podobnie jak w przypadku standardu GR α , patrz rozdział 5.6.5). Uzyskane DNA w dalszej kolejności oczyszczono metodą separacji w fenolu/chloroformie i precypitacji w octanie amonu. W tym celu DNA rozpuszczone w 100 μ L ddH₂O dokładnie wymieszano z fenolem (200 μ L). Po odwirowaniu 1 min przy maksymalnej szybkości górna wodna faza została przeniesiona do próbówki zawierającej 100 μ L chloroformu. Po energicznym wymieszaniu próbkę ponownie odwirowano, a fazę wodną przeniesiono do 300 μ L 96% etanolu zawierającego 10 μ L 3M octanu amonu. Po 10 minutach precypitacji w -20°C próbkę odwirowano 15.000xg/10min//4°C, nadsącz dokładnie odpipetowano a peletę DNA pozostawiono 1 godzinę do wyschnięcia. DNA przepłukano następnie w 300 μ L 75% etanolu, osuszono 30 min w temperaturze pokojowej i rozpuszczono w 30 μ L ddH₂O. Uzyskany, oczyszczony fragment DNA GR β ponownie amplifikowano (30 cykli PCR), wyizolowano z żelu, oczyszczono metodą separacji w fenolu/chloroformie i rozpuszczono ponownie w 30 μ L ddH₂O. W pomiarze spektrofotometrycznym uzyskano stężenie DNA 0,06 μ g/ μ L. Analogicznie do GR α obliczono liczbę kopii w 1 μ L ($2,43 \times 10^{11}$) i przygotowano rozcieńczenia od 1×10^5 do 1×10^2 kopii w 1 μ L. Pozostały materiał rozcieńczono 12x uzyskując ok. 200 μ L roztworu o końcowym stężeniu 5 ng/ μ L, który dodawano do żelu (po 5 μ L czyli ok. 1×10^{11} kopii) i wykorzystywano jako wewnętrzny standard przy pomiarze intensywności świecenia prążków.

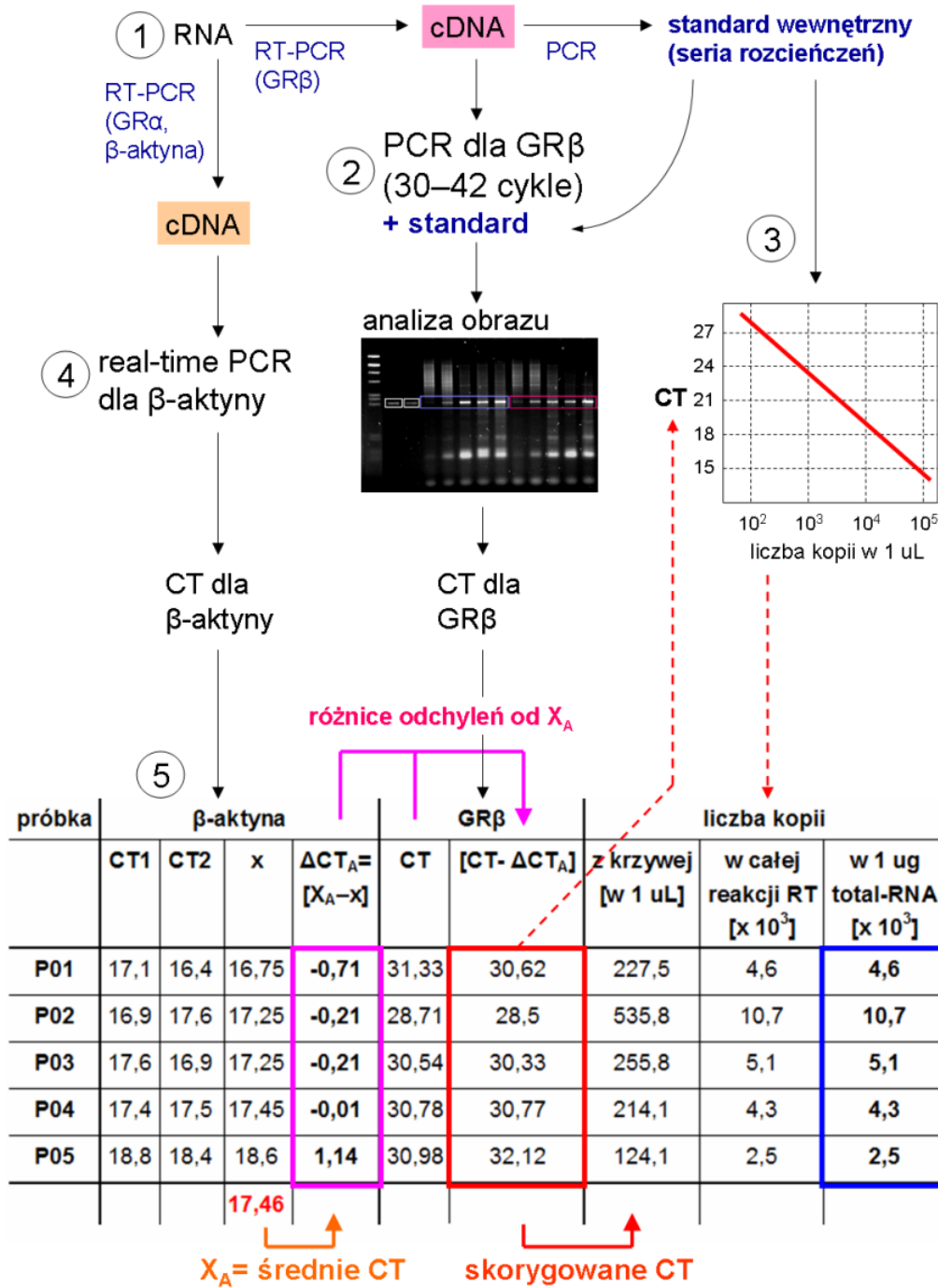
Rozcieńczenia standardu amplifikowano w dubletach wykorzystując te same parametry reakcji jak w przypadku pozostałych próbek GR β (Tabela 5, Tabela 6). Dla każdego rozcieńczenia przygotowano 9 reakcji PCR, które przerywano co 3 cykle (od 18 do 42). Produkty reakcji analizowano w identyczny sposób jak pozostałe próbki GR β (szczegółowo opisano w rozdziale 5.6.8 i na rycinie Rysunek 16). Po odczytaniu wartości CT sporządzono krzywą standardową ($r=0,99$; $p=0,001$) wykorzystaną do obliczenia liczby kopii mRNA w analizowanych próbkach (Rysunek 17).



Rysunek 17. Krzywa standardowa GR β . (po lewej) Oczyszczony fragment DNA GR β amplifikowano w dubletach w czterech rozcieńczeniach (od 1×10^2 do 1×10^5 kopii 1 uL) przerywając PCR co 3 cykle (od 18 do 42). Względę ilość produktu zmierzono po sfotografowaniu prążków żelu i normalizacji przez wewnętrzny standard (wartość 1 na osi Y). Próg do odczytu CT ustalono arbitralnie w fazie ekspotencjalnego przyrostu ilości produktów PCR. (po prawej) Wartości CT amplifikacji standardów oraz wyjściowe ilości kopii matrycy zestawione na wykresie.

5.6.10 Sposób analizy danych dla oceny ekspresji GR β

Po obliczeniu CT dla próbek GR β dane normalizowano wykorzystując odchylenia od średniej CT dla β -aktyny (ΔCT_A). Skorygowane CT GR β przeliczano na liczbę kopii matrycy cDNA w amplifikowanych próbkach podstawiając do równania krzywej standardu. Schemat analizy danych dla GR β przedstawiono na rycinie (Rysunek 18). Dane końcowe przedstawiono jako (1) znormalizowane CT obu izoform w różnych grupach klinicznych, (2) liczba kopii mRNA GR α lub GR β w 1 μ g całkowitego RNA, (3) stosunek ilości GR α /GR β .

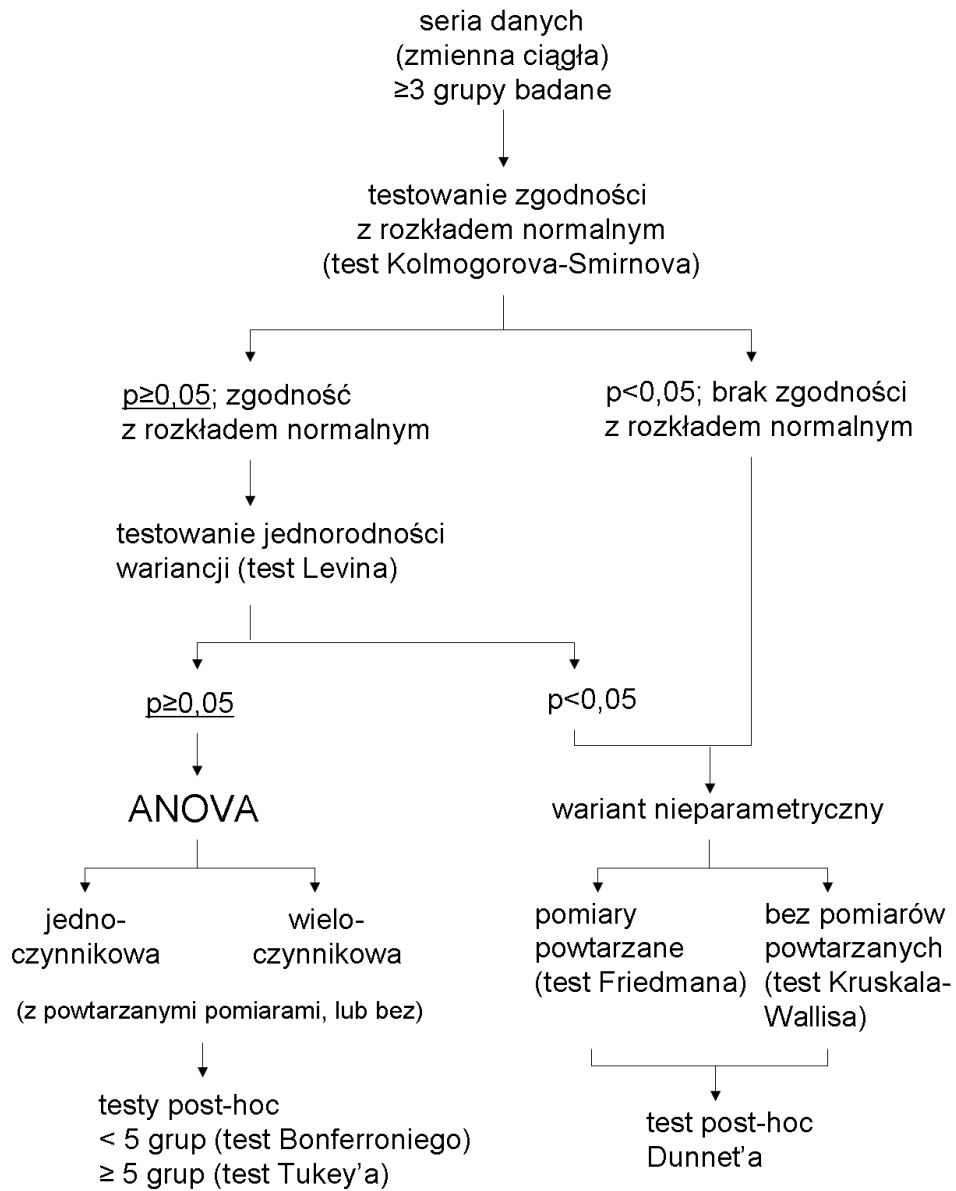


Rysunek 18. Model analizy ekspresji GRβ (część druga). (1) Całkowite RNA zostało przepisane do cDNA w równoległych reakcjach z primerami dla GRβ i β-aktyny. (2) cDNA GRβ każdej próbki amplifikowano w reakcjach PCR przerywanych w różnych cyklach (od 30 do 42), produkty PCR sfotografowano, a z wykresów fluorescencji obliczono CT dla każdej próbki. (3) Produkt amplifikacji GRβ powielono w kolejnej reakcji PCR i oczyszczono przygotowując standard (krzywa, analiza obrazu). (4) CT β-aktyny wykorzystane do normalizacji danych uzyskano w typowej reakcji real-time. (5) Tabela przedstawia przykładowe dane i sposób analizy. Wyniki CT dla GRβ normalizowano wykorzystując ΔCT_A aktyny. Liczbę kopii mRNA obliczono z równania krzywej standardowej.

5.7 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). W charakterystyce wyjściowej grup zastosowano test χ^2 (zmienne kategoryczne) lub analizę ANOVA (zmienne ciągłe). Do oceny różnic między badanymi grupami ($n=4$) opracowano model analizy statystycznej przedstawiony na rysunku (Rysunek 19). Jeżeli ilość uzyskanych wyników w jakiegokolwiek z grup była $n \leq 9$ stosowano testy Kruskal-Wallisa lub Friedmana. W pozostałych przypadkach pierwszej fazie testowano dane pod względem zgodności z rozkładem normalnym (test Kolmogorova-Smirnova), a następnie oceniono jednorodność wariancji (testem Levina). Serie danych spełniające kryterium rozkładu normalnego i równych wariancji analizowano w modelu ANOVA. W przypadku wyników uzyskanych dla różnych punktów czasowych lub przy różnych stężeniach deksametazonu stosowano wariant z powtarzanymi pomiarami. Wyniki ANOVA przedstawiono na wykresach jako: (1) efekt grupy badanej, (2) efekt punktu czasowego lub stężenia deksametazonu, (3) interakcję między grupą badaną i drugim ocenianym czynnikiem która pozwala zbadać czy oceniany parametr zmienia się w kolejnych punktach czasowych lub stężeniach deksametazonu inaczej (gdy $p < 0,05$) przynajmniej w jednej z badanych grup. W analizie post-hoc (która pozwala na ocenę różnic dla każdej grupy w każdym punkcie końcowym) zastosowano testy Bonferroniego i Tukey'a. Dane o rozkładzie normalnym przedstawiono w tekście i tabelach jako średnie $\pm$ SD (odchylenie standardowe), a na wykresach kolumnowych lub punktowych jako średnie $\pm$ SEM (błąd standardowy) lub 95%CI (przedział ufności). Serie danych z rozkładem różnym od normalnego analizowano testami nieparametrycznymi Kruskal-Wallisa i Friedmana. W tekście, tabelach i na wykresach (punktowych lub blokowych) wyniki takie przedstawiono jako mediana i przedział międzykwartylowy [25-75% w nawiasie kwadratowym].

EC₅₀ czyli takie stężenie agonisty (deksametazonu) które prowadzi do uzyskania 50% efektu czynnościowego obliczono przy zastosowaniu modelu regresji nieliniowej po dopasowaniu wariantu krzywej sigmoidalnej ze zmiennym nachyleniem (*variable-slope sigmoidal dose response curve*). Do oceny stopnia korelacji zmiennych o rozkładzie normalnym i $n \geq 30$ zastosowano model regresji liniowej. W pozostałych przypadkach zastosowano wariant nieparametryczny (korelacja rang Spermana).

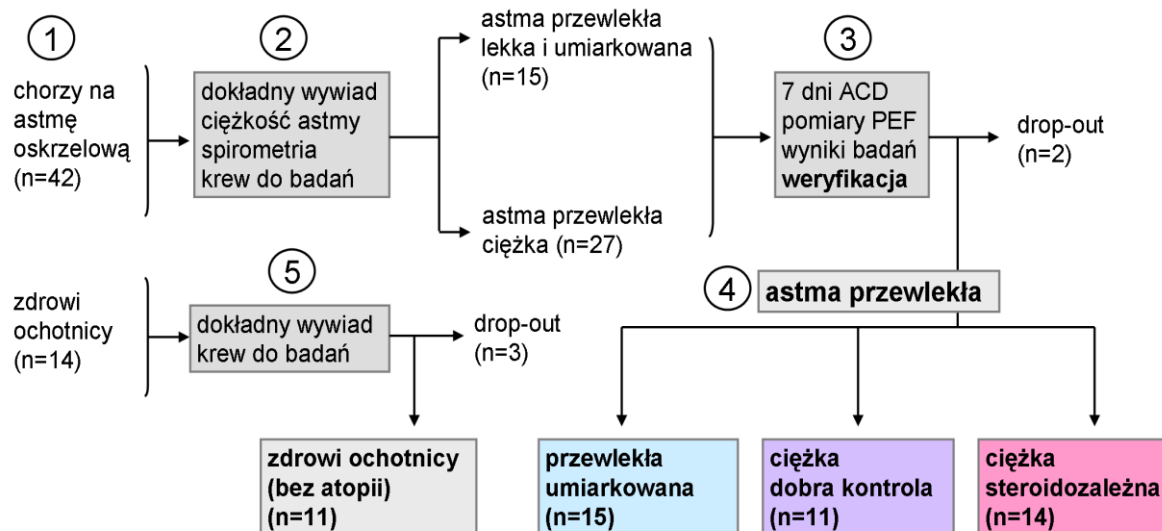


Rysunek 19. Model analizy statystycznej zastosowany do oceny różnic pomiędzy badanymi grupami ($n \geq 3$ grupy) przy liczebności w grupie $n \geq 10$.

6 Wyniki

6.1 Charakterystyka kliniczna pacjentów biorących udział w badaniu

Do badania zakwalifikowano 42 chorych z potwierdzonym rozpoznaniem astmy spełniających kryteria opisane w części dotyczącej metod badawczych. Po zebraniu dokładnego wywiadu, badaniu przedmiotowym i wykonaniu badania spirometrycznego chorym pobrano krew do badań laboratoryjnych. Wszyscy chorzy na astmę wypełniali następnie przez tydzień kwestionariusz nasilenia objawów astmy (ACD), a część z nich wykonywała dodatkowo codziennie pomiary PEF. Podczas kolejnej wizyty ponownie zbadano chorych i zanalizowano wyniki ACD. Z uwagi na pogorszenie objawów u dwóch pacjentów (u jednej chorej częste napady duszności i wysoka punktacja ACD - 4,33; drugą pacjentkę hospitalizowano z powodu zaostrzenia astmy po zażyciu niesteroidowego leku przeciwzapalnego) zostali oni wykluczeni z analizy. Plan badania i liczebności poszczególnych grup przedstawiono na rycinie (Rysunek 20).



Rysunek 20. Projekt badania i liczebności grup. (1) Do badania zakwalifikowano 42 chorych na astmę oskrzelową. (2) Po zebraniu dokładnego wywiadu i wykonaniu badania spirometrycznego chorym pobrano krew do badań laboratoryjnych. (3) Wszyscy chorzy na astmę uzupełniali kwestionariusze objawowe, część z nich wykonywała pomiary PEF. (4) Po tygodniu chorych ponownie zbadano i przeanalizowano dane z kwestionariuszy, dwaj pacjenci zostali wykluczeni z badania, pozostali zostali na podstawie danych klinicznych podzieleni na trzy grupy. (5) Spośród 14 zdrowych ochotników u 3 stwierdzono dodatni wynik swoistych-IgE (Phadiatop) i zostali wykluczeni z badania, pozostali stanowili grupę kontrolną.

6.1.1 Fenotypy astmy

W grupie z astmą ciężką chorobę rozpoznawano częściej w wieku dorosłym (n=17, 68%). Średni wiek rozpoznania astmy wynosił $13,9 \pm 4,1$ lat w grupie *early-onset* i $30,7 \pm 7,9$ lat w grupie *late-onset*. Porównywane grupy nie różniły się czasem trwania choroby, zapewne ze względu na starszy wiek chorych w grupie *late-onset* (45,5 vs. 27,1 lat; $p < 0,001$). Nie stwierdzono różnic w pozostałych parametrach klinicznych (Tabela 7). Podobne częstości *early-* i *late-onset* stwierdzono w grupie chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną (*early-onset* n=5, 33%).

Tabela 7. Charakterystyka kliniczna chorych (astma ciężka) z chorobą rozpoznaną w dzieciństwie (≤ 18 rok życia) i w wieku dorosłym. ** $p < 0,001$.

badane grupy	<i>early-onset</i> (≤ 18 lat)	<i>late-onset</i> (> 18 lat)
liczebność	8 [32]	17 [68]
wiek, lata	27,1 [5,8]	45,5 [9,4]**
płeć, kobiety n[%]	4 [50]	11 [66]
wiek rozpoznania, lata	13,9 [4,1]	30,7 [7,9]**
czas trwania astmy, lata	13,2 [6,0]	14,8 [7,9]
astma atopowa, n[%]	4 [50]	8 [47]
nadwrażliwość na ASA, n[%]	4 [50]	8 [47]
astma steroidozależna, n[%]	3 [38]	11 [65]
skala ciężkości astmy (SCA)	0,83 [0,52]	0,9 [0,46]
ankieta objawowa (ACD)	1,14 [1,3]	1,5 [1,0]
FEV1 (% wartości należnej)	78,9 [18,4]	80,2 [18,1]
utrwalona obturacja, n[%]	3 [38%]	5 [29%]
PEF (% wartości należnej)	83,5 [14,3]	88,5 [26,7]
GCS systemowe, mg/d	9,5 [6,0]	12 [6,2]
GCS systemowe od lat, lata	4,2 [3,9]	7,5 [5,2]

GCS – glikokortykosteroidy, ASA – aspiryna, GCS systemowe w przeliczeniu na metyloprednizolon.

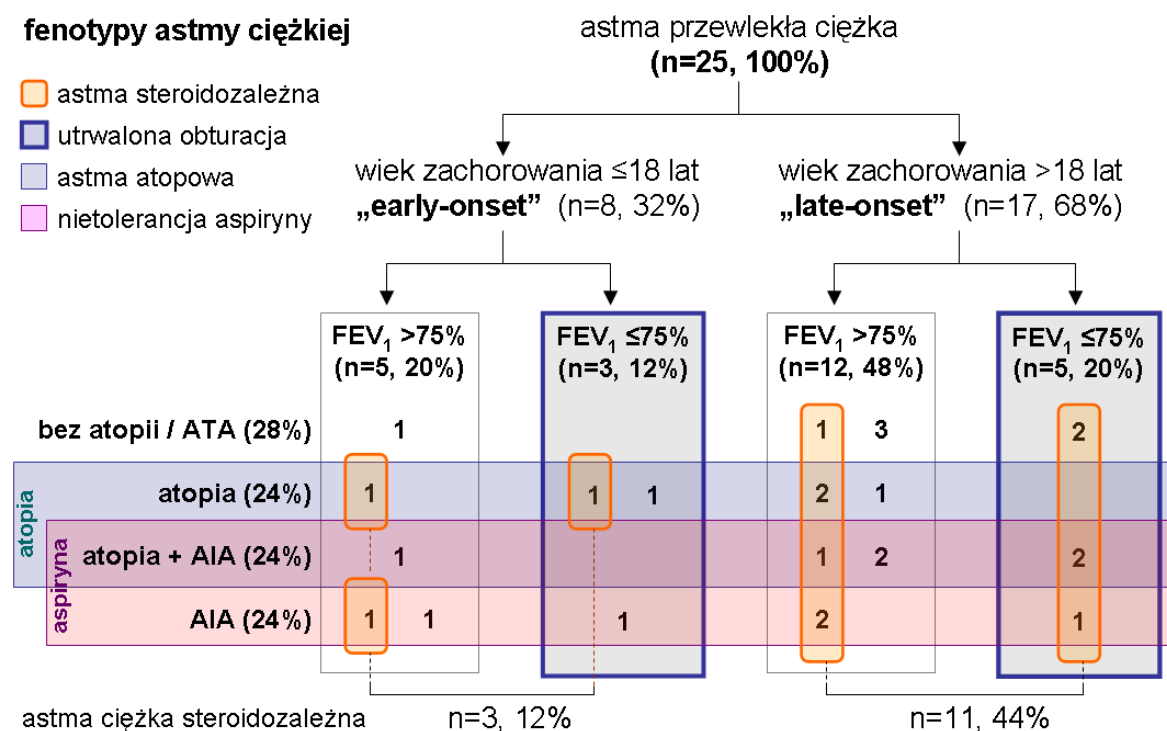
Przewlekłą utrwaloną obturację oskrzeli definiowaną jako FEV_1 (po zastosowaniu leku rozkurczowego) $\leq 75\%$ wartości należnej stwierdzono u 8 (32%) chorych z astmą ciężką. Chorzy ci dłużej chorowali na astmę w porównaniu z grupą bez cech obturacji (19,8 vs. 11,7 lat, $p < 0,01$), nie różnili się natomiast pod względem wieku zachorowania, ciężkości choroby i czasu trwania steroidoterapii (Tabela 8). Utrwalona obturacja występowała częściej wśród mężczyzn ($n=6$, 60%) niż u kobiet ($n=2$, 13%), jednak z uwagi na niewielkie liczebności grup różnica ta nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p=0,1$). U żadnego pacjenta z astmą przewlekłą umiarkowaną nie stwierdzono obniżenia $FEV_1 < 75\%$.

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna chorych z ciężką astmą różniących się stopniem nasilenia obturacji oskrzeli. ** $p < 0,01$; (a) $p = 0,1$.

badane grupy	$FEV_1 \leq 75\%$ (utrwalona obturacja)	$FEV_1 > 75\%$
liczebność	8 [32]	17 [68]
wiek, lata	43,3 [12,0]	37,9 [12,1]
płeć, kobiety n[%]	2 [25]	13 [76] (a)
wiek rozpoznania, lata	23,5 [13,1]	26,2 [9,4]
czas trwania astmy, lata	19,8 [7,9]	11,7 [5,5]**
astma atopowa, n[%]	4 [50]	8 [47]
nadwrażliwość na ASA, n[%]	4 [50]	8 [47]
astma steroidozależna, n[%]	6 [75]	8 [47]
skala ciężkości astmy (SCA)	0,97 [0,36]	0,82 [0,52]
ankieta objawowa (ACD)	1,58 [1,0]	1,33 [1,1]
FEV1 (% wartości należnej)	68,8 [6,9]	93,5 [14,0]**
PEF (% wartości należnej)	67,2 [16,4]	96,1 [20,0]**
astma od dzieciństwa, n[%]	3 [38]	5 [29]
GCS systemowe, mg/d	11,5 [6,6]	11,1 [6,1]
GCS systemowe od lat, lata	8,1 [4,8]	5,6 [5,0]

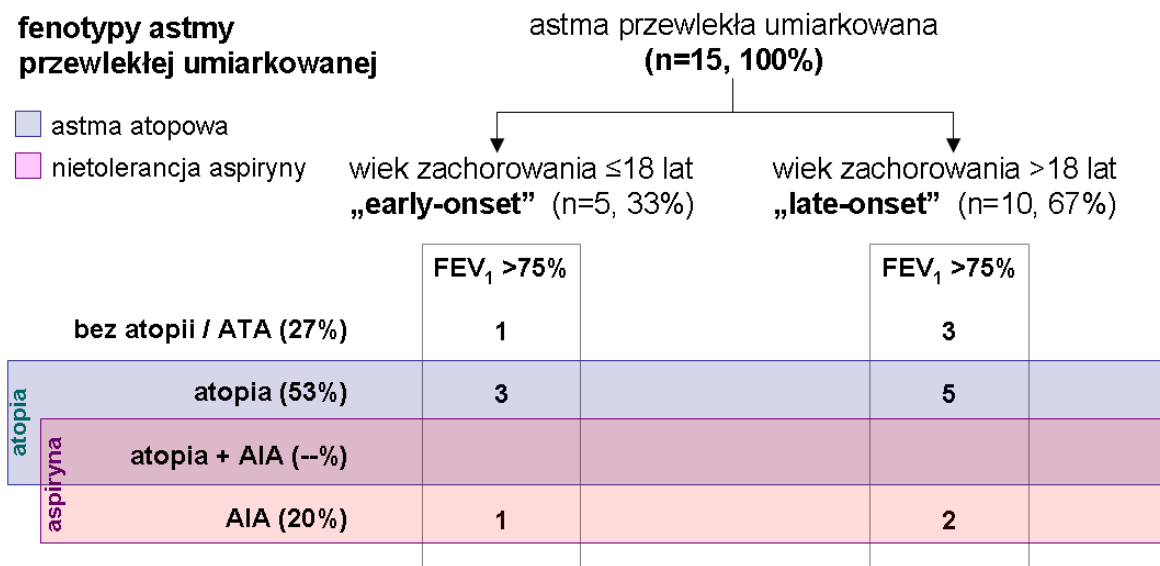
GCS – glikokortykosteroidy, ASA – aspiryna, GCS systemowe w przeliczeniu na metyloprednizolon.

Na podstawie charakterystycznych objawów zgłaszanych w wywiadzie i dodatknych testów skórnych (i/lub wyniku badania Phadiatop) atopię rozpoznano u 48% (n=12) chorych na astmę przewlekłą ciężką i 53% (n=5) chorych na astmę przewlekłą umiarkowaną. Nadwrażliwość na aspirynę występowała u 48% (n=12) chorych na astmę ciężką i 20% (n=3) na astmę przewlekłą umiarkowaną. Na rycinie (Rysunek 21) przedstawiono dokładną charakterystykę fenotypową chorych z astmą ciężką. Zwraca uwagę znaczny odsetek pacjentów z współistniejącą atopią i nadwrażliwością na aspirynę (n=6, 24%) jak również częstsze występowanie astmy steroidozależnej wśród chorych z rozpoznaniem astmy w wieku dorosłym (n=11, 65% chorych w tej grupie).



Rysunek 21. Fenotypy kliniczne astmy przewlekłej ciężkiej u chorych objętych badaniem. Na schemacie liczebności poszczególnych grup. Dokładny opis w tekście. AIA – *aspirin intolerant asthma*, ATA – *aspirin tolerant asthma*.

Na rycinie (Rysunek 22) zestawiono fenotypy kliniczne chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną. W przeciwieństwie do chorych z astmą ciężką w tej grupie nie stwierdzono przypadków współwystępowania alergii i nadwrażliwości na aspirynę.

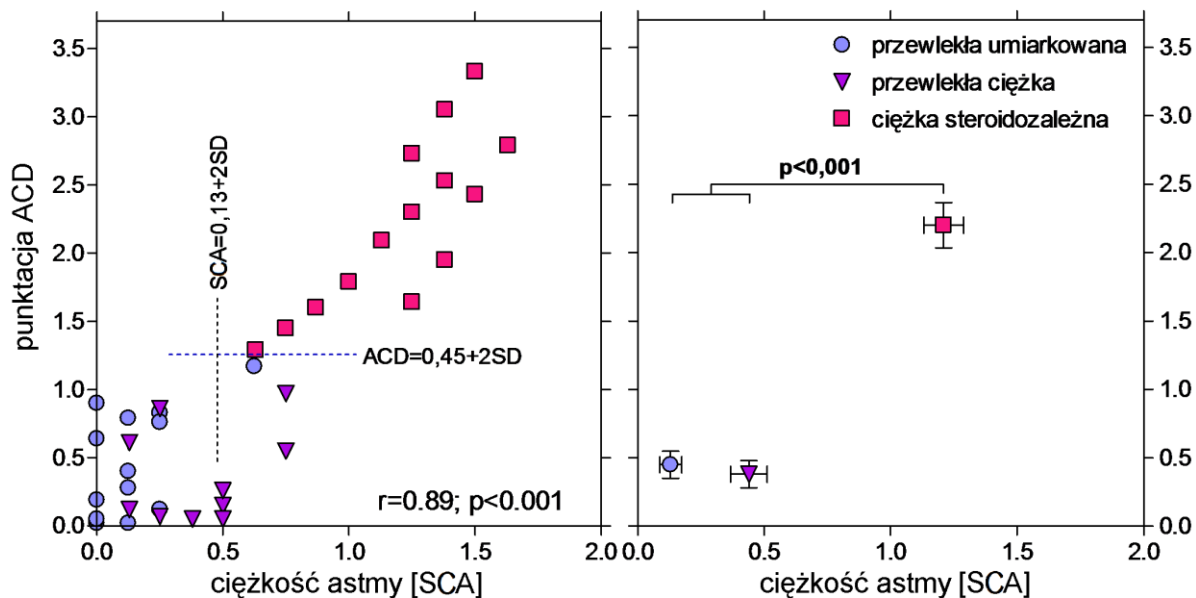


Rysunek 22. Fenotypy kliniczne astmy przewlekłej umiarkowanej. Na schemacie liczebności grup.

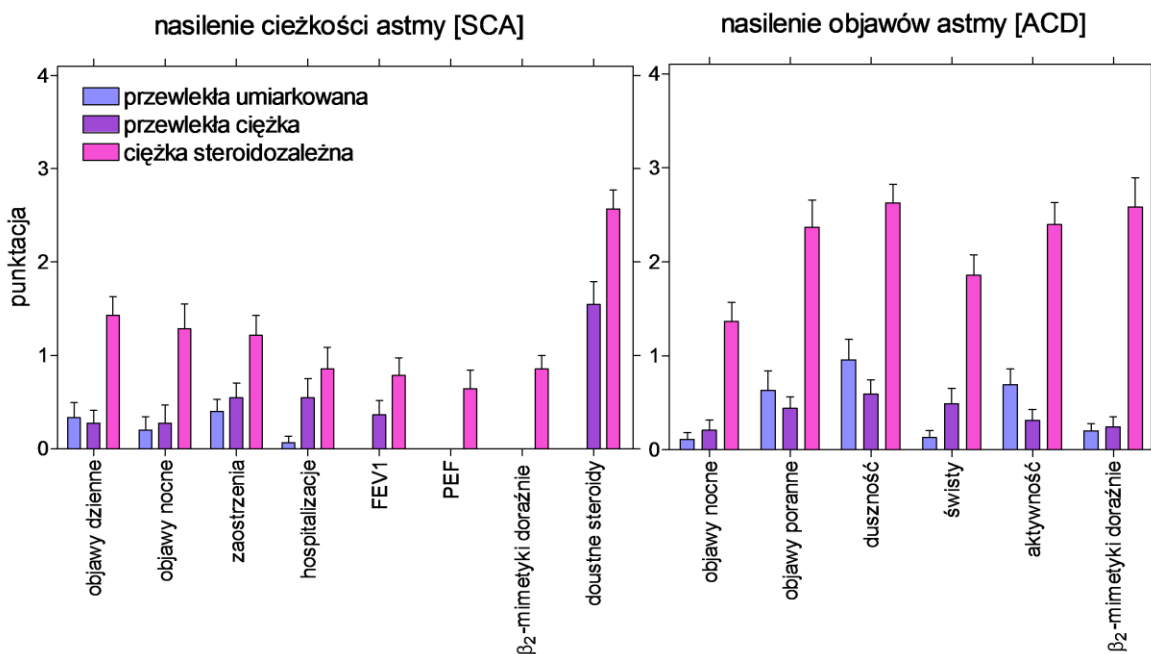
6.1.2 Stopień nasilenia astmy i objawy choroby

Chorzy z rozpoznaniem astmy przewlekłej umiarkowanej, z bardzo dobrą kontrolą choroby, charakteryzowali się niską punktacją w skali nasilenia astmy SCA ($0,46 \pm 0,38$ punktów w skali od 0 do 3), zgłaszali ponadto jedynie niewielkie objawy (głównie sporadyczne napady duszności o niewielkim nasileniu w godzinach porannych) albo zupełny brak dolegliwości podczas tygodnia obserwacji klinicznej. Stopień nasilenia objawów mierzony kwestionariuszem ACD wynosił średnio $0,13 \pm 0,17$ punktów w skali od 0 do 6.

Chorzy na astmę oskrzelową ciężką leczeni GCS doustnymi różnili się znacznie zarówno pod względem stopnia ciężkości choroby, jak i nasilenia objawów podczas tygodnia obserwacji (Rysunek 23). Zestawienie wyników skali ciężkości choroby i kwestionariusza objawów pozwoliło na wyodrębnienie grupy pacjentów z ciężką postacią astmy i utrzymującymi się umiarkowanymi objawami choroby. Wartości odcięcia dla punktacji SCA (1,22 punktu) i ACD (0,47 punktu) wyznaczono na podstawie średnich +2SD uzyskanych w grupie chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną.

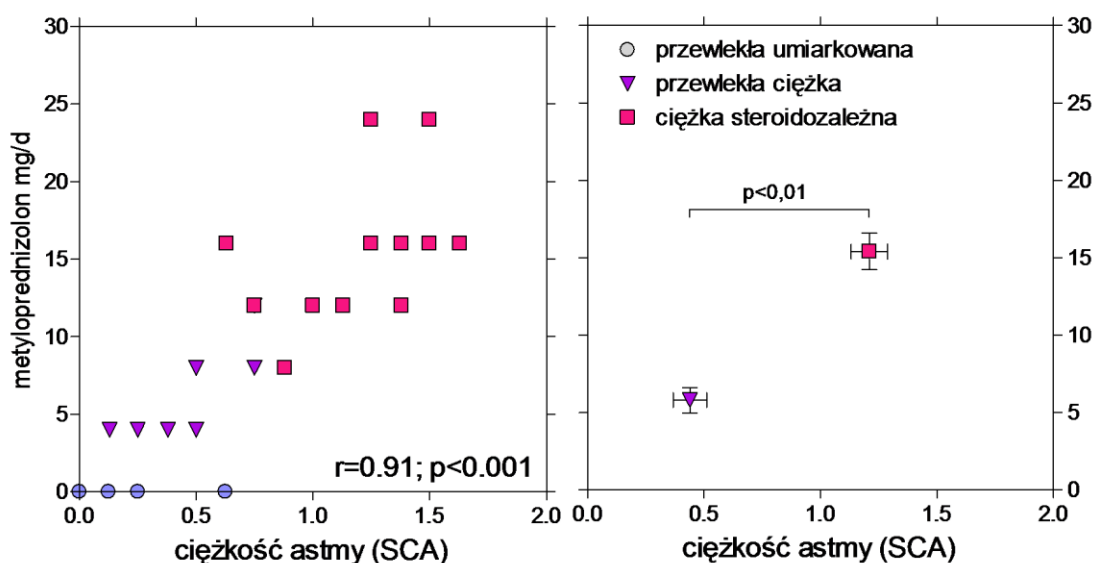


Rysunek 23. Charakterystyka kliniczna. Zestawienie stopnia ciężkości astmy mierzonego w skali SCA (0-3) z wynikami kwestionariusza objawowego ACD (0-6). Po stronie lewej wykres punktowy na którym liniami przerywanymi zaznaczono wartości ACD i SCA równe średnim $\pm 2SD$ dla grupy chorych z astmą przewlekłą lekką (bardzo dobra kontrola choroby). Wartość ta pozwala wyróżnić pacjentów (czerwone kwadraty) z najcięższą astmą i utrzymującymi się umiarkowanymi objawami choroby pomimo zoptymalizowanego leczenia. Wykres po stronie prawej przedstawia średnie $\pm SEM$ dla wyodrębnionych w ten sposób trzech grup chorych.



Rysunek 24. Charakterystyka kliniczna chorych. Na pierwszym wykresie zestawiono wyniki punktacji każdej z kategorii kwestionariusza nasilenia ciężkości astmy (SCA). Drugi wykres przedstawia stopień nasilenia objawów astmy na podstawie tygodniowego kwestionariusza ACD. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SEM$ w każdej z analizowanych grup chorych.

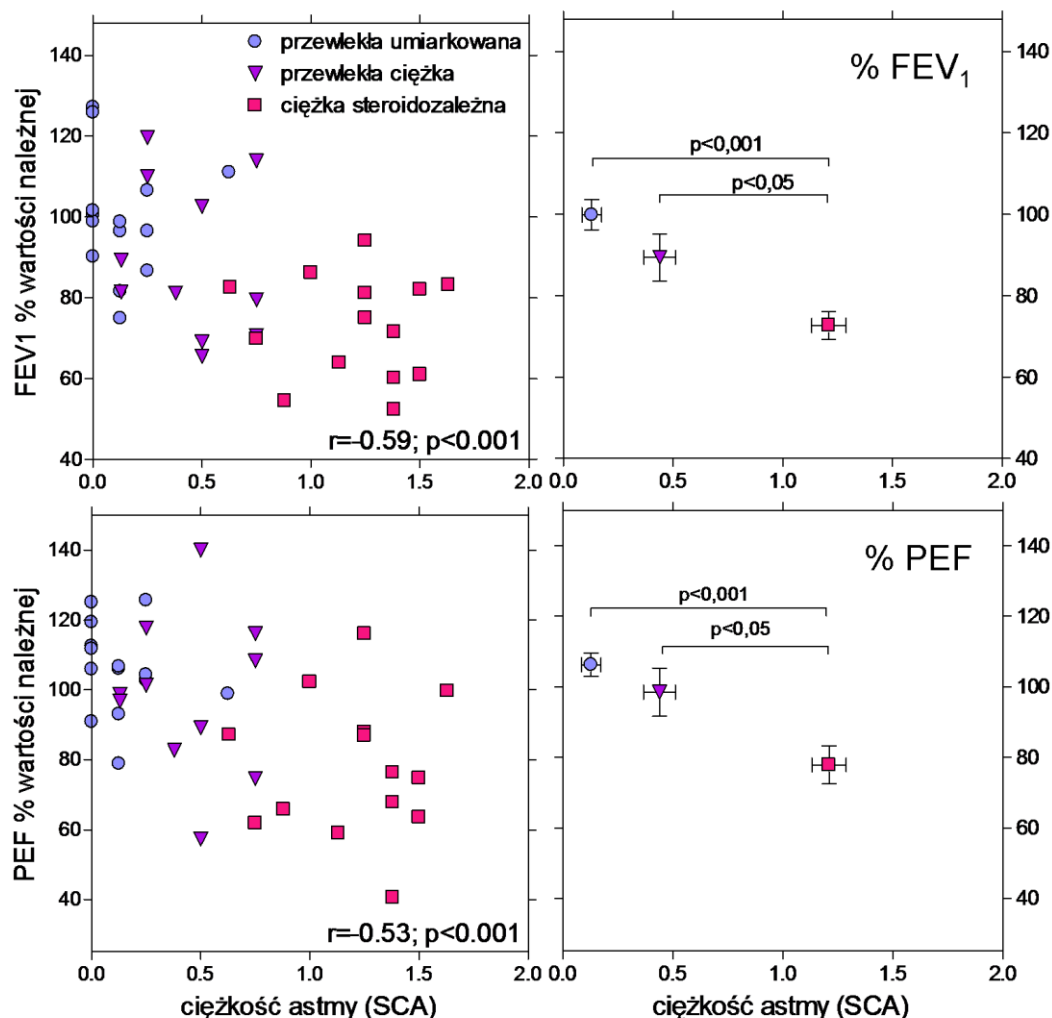
Chorzy na astmę ciężką z bardzo dobrą kontrolą objawów zażywali przewlekłe niższe dawki doustnych GCS (metyloprednizolon $5,8 \pm 2,7$ mg/d) w porównaniu z pacjentami u których utrzymywały się niewielkie bądź umiarkowane objawy choroby ($15,4 \pm 4,4$ mg/d). Stwierdzono ponadto znamienne dodatnią korelację ($r=0,91$) pomiędzy skalą objawów astmy, a dawką dobową doustnych GCS (Rysunek 25). Obie podgrupy chorych z astmą ciężką nie różniły się pod względem dawki GCS wziewnego ani częstością stosowania innych leków przeciwastmatycznych (Tabela 9).



Rysunek 25. Dawki steroidów doustnych (w przeliczeniu na metyloprednizolon) u chorych na astmę oskrzelową włączonych do badania. Wykres po stronie prawej przedstawia średnie $\pm$ SEM dawki dobowe metyloprednizolonu i wyniki skali SCA z podziałem na dwie grupy chorych, różniące się ciężkością choroby i objawami.

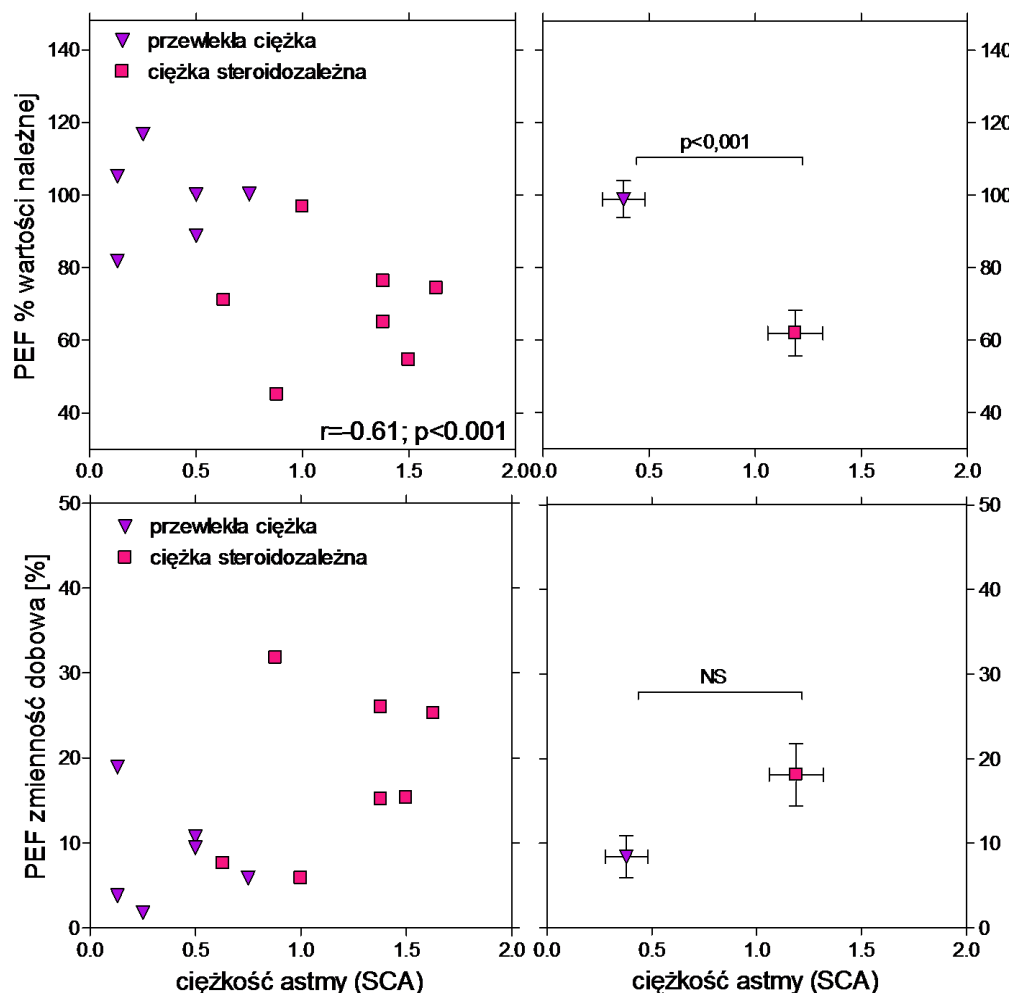
6.1.3 Wyniki badań spirometrycznych

Chorzy z ciężką astmą steroidozależną mieli znamienne obniżone % wartości należnej FEV_1 i PEF w porównaniu z grupą chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną ($p < 0,001$), jak i astmą ciężką z dobrą kontrolą choroby ($p < 0,05$). Wyniki badań czynnościowych płuc przedstawiono na rysunku (Rysunek 26).



Rysunek 26. Parametry spirometryczne u chorych z astmą oskrzelową analizowanych w badaniu. Górne wykresy przedstawiają zależność % wartości należnej FEV₁ od nasilenia astmy, na dolnych wykresach zestawiono wyniki dla % wartości należnej PEF. Chorzy zostali podzieleni na grupy różniące się nasileniem objawów astmy. Na wykresach dane poszczególnych chorych oraz średnie $\pm$ SEM. Podano jedynie znamienne statystycznie różnice w %FEV₁ i %PEF przy porównaniu poszczególnych grup chorych.

W badaniach spirometrycznych stwierdzono dodatkowo znamiennej ujemną korelację pomiędzy % wartości należnych FEV₁ ($r=-0,59$) i PEF ($r=-0,53$), a skalą ciężkości astmy. Podobne wyniki uzyskano oceniając pomiary PEF wykonywane przez niektórych pacjentów ($n=13$) w domu. Wyniki pomiarów domowych PEF wyrażone jako % wartości należnej były znacznie niższe w grupie chorych z astmą ciężką steroidozależną i korelowały z wynikami skali SCA. Nie stwierdzono natomiast różnic w dobowej zmienności PEF (Rysunek 27). Wykazano ponadto bardzo dobrą korelację wyników pomiarów PEF w warunkach domowych i % wartości należnej PEF z badania spirometrycznego wykonanego w dniu włączenia do badania ($r=0.71, p<0,001$).

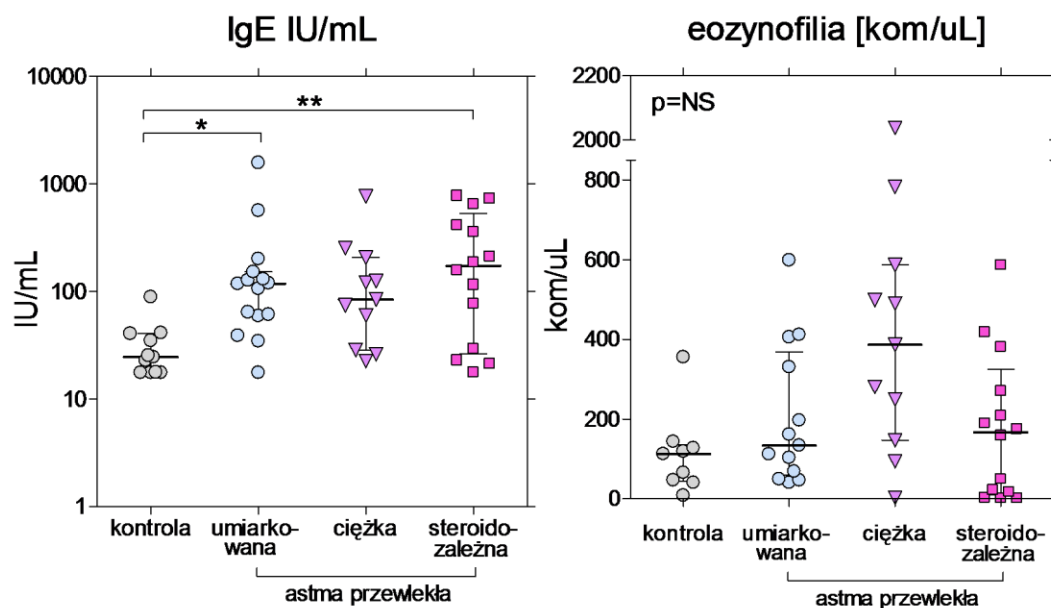


Rysunek 27. Wyniki monitorowania PEF w warunkach domowych (n=13). Górne wykresy przedstawiają wyniki PEF (% wartości należnej) w odniesieniu do skali ciężkości astmy. Dolne wykresy przedstawiają dobową zmienność PEF (średnia tygodniowa) w odniesieniu do SCA. Na wykresach wyniki poszczególnych chorych oraz średnie $\pm$ SEM.

6.1.3 Porównanie badanych grup

W tabeli (Tabela 9) zestawiono liczebności grup analizowanych w badaniu jak również podstawowe dane kliniczne pacjentów z astmą. Chorzy na astmę oskrzelową i zdrowi ochotnicy nie różnili się pod względem wieku i płci. W grupach chorych na astmę stwierdzono podobną częstość występowania atopii i nadwrażliwości na aspirynę. Grupy nie różniły się pod względem czasu trwania astmy, który wynosił średnio $12,5 \pm 8,8$ lat. U większości pacjentów z ciężką astmą rozpoznawano chorobę w wieku dorosłym (*late-onset*, >18 roku życia, n=17, 68%), a tylko u dwóch chorych w wieku szkolnym (<15 lat, 8%). Średni wiek w momencie rozpoznania wynosił $24,7 \pm 12,0$ lat w grupie z astmą ciężką dobrze kontrolowaną, $25,9 \pm 9,6$ lat w grupie chorych z astmą steroidozależną i $26,5 \pm 11,4$ lat w

grupie chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną. Wszyscy pacjenci stosowali GCS wziewne w dawce 500-1000 ug/d w przeliczeniu na flutikazon oraz długodziałający β_2 -mimetyk wziewny (za wyjątkiem jednej osoby z astmą przewlekłą umiarkowaną). Jak wcześniej wspomniano zarówno ciężkość astmy jak i dawki steroidów systemowych były znamienne ($p<0,05$) wyższe u chorych z astmą ciężką steroidozależną. Nie wykazano natomiast różnicy w czasie trwania leczenia systemowymi GCS (średnio $4,8\pm4$ lata w przypadku astmy ciężkiej z dobrą kontrolą objawów i $7,9\pm5,6$ roku w przypadku astmy ciężkiej steroidozależnej). Czas trwania choroby od rozpoznania do momentu rozpoczęcia przewlekłej steroidoterapii (pierwszy rok leczenia z koniecznością stosowania > 6 miesięcy) wynosił średnio $7,8\pm6,6$ lat i nie różnił się w badanych grupach. Chorzy na astmę oskrzelową mieli wyższe całkowite stężenie IgE w surowicy w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami (Rysunek 28). Stwierdzono również wyższe ($p<0,01$) stężenie IgE w surowicy u pacjentów z astmą atopową ($177[110-489]$ IU/mL) w porównaniu z nieatopową ($63[30-124]$). Nie wykazano różnic w ilości bezwzględnej eozynofilów krwi obwodowej.



Rysunek 28. Poziom IgE (po lewej) i eozynofilia bezwzględna (po prawej) krwi obwodowej u osób włączonych do badania. Na wykresach danych punktowych mediany [25-75%] oraz wyniki analizy statystycznej. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Tabela 9. Charakterystyka grup biorących udział w badaniu. Wyniki przedstawiono jako średnią [SD] lub liczebność n[%], dla IgE i eozynofilii jako medianę [25-75%]. *p<0,05 w porównaniu z astmą przewlekłą umiarkowaną, [†]p<0,05 w porównaniu z astmą przewlekłą ciężką (z dobrą kontrolą objawów), ^{##}p<0,01 i [#]p<0,05 w porównaniu z kontrolą.

badane grupy	zdrowi ochotnicy	astma przewlekła umiarkowana	astma przewlekła ciężka	astma ciężka steroido-zależna
liczebność	11	15	11	14
wiek, lata	38 [9,6]	36 [11]	36,5 [12,8]	42 [11,4]
płeć, kobiety n[%]	6 [55%]	9 [60%]	6 [55%]	9 [64%]
czas trwania astmy, lata	-	8,8 [8,0]	10,5 [5,3]	16,6 [8,3]
astma atopowa, n[%]	-	8 [53%]	5 [46%]	7 [50%]
nadwrażliwość na ASA, n[%]	-	3 [20%]	5 [46%]	7 [50%]
skala ciężkości astmy (SCA)	-	0,13 [0,17]	0,44 [0,24] *	1,21 [0,29] * [†]
ankieta objawowa (ACD)	-	0,45 [0,38]	0,38 [0,33]	2,2 [0,62] * [†]
FEV1 (% wartości należnej)	-	99,9 [14,3]	89,4 [19,2]	72,7 [12,8] * [†]
PEF (% wartości należnej)	-	106,2 [12,6]	98,4 [22,6]	77,8 [20,1] * [†]
GCS wziewne, ug/d	-	567 [334]	909 [202]	964 [134]
GCS systemowe, mg/d	-	0	5,8 [2,7]	15,4 [4,4] *
GCS systemowe ≥16mg/d,%	-	0	0	9 [64%]
GCS systemowe od lat	-	0	4,8 [4]	7,9 [5,6]
GCS systemowe ≥5 lat, n[%]	-	0	4 [36%]	10 [71%]
inne leki, n[%]				
β ₂ -mimetyk długodziałający	-	14 [93%]	11 [100%]	14 [100%]
po pochodna aminofiliny	-	4 [27%]	7 [64%]	9 [65%]
lek antyhistaminowy	-	7 [47%]	4 [36%]	4 [29%]
lek antyleukotrienowy	-	1 [7%]	1 [9%]	0
eozynofilia bezwzględna, /ul	113 [44-136]	134 [59-368]	387 [147-587]	167 [10-326]
IgE całkowite, IU/mL	24 [18-41]	118 [59-152] [#]	84 [29-207]	173 [26-532] ^{##}

GCS – glikokortykosteroidy, ASA – aspiryna, GCS wziewne w przeliczeniu na dipropionian flutikazonu, GCS systemowe w przeliczeniu na metyloprednizolon.

6.2 Immunofenotyp limfocytów krwi obwodowej

Badane grupy nie różniły się pod względem większości parametrów ocenianych w badaniu morfologii krwi. Znamienne podwyższona leukocytoza w grupie chorych z astmą ciężką steroidozależną wynikała ze zwiększonego odsetka i bezwzględnej ilości neutrofilów. Nie stwierdzono różnic w odsetkach ani ilościach bezwzględnych limfocytów T (CD3+) i Th (CD4+). Podstawowe wyniki badań zestawiono w tabeli (Tabela 10).

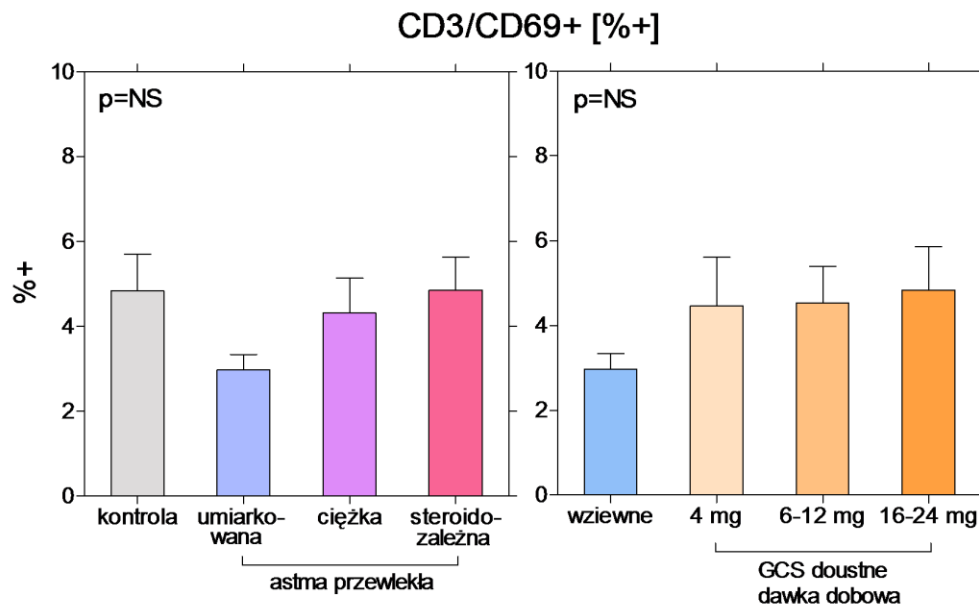
Tabela 10. Leukocyty i limfocyty T krwi. Wyniki przedstawiono jako średnią [SD] *p<0,01 w porównaniu z kontrolą, [†]p<0,01 w porównaniu z astmą przewlekłą umiarkowaną.

badane grupy	zdrowi ochotnicy	astma przewlekła umiarkowana	astma przewlekła ciężka	astma ciężka steroido-zależna
liczebność	11	15	11	14
leukocyty, 1×10^3 kom/uL	5,7 [1,4]	5,8 [1,4]	7,4 [1,4]	8,6 [2,6]* [†]
neutrofile, % leukocytów	59,9 [6,9]	60,7 [10,3]	62,2 [12,0]	70,1 [15,1]
neutrofile, 1×10^3 kom/uL	3,4 [0,9]	3,5 [1,0]	4,6 [1,1]	6,0 [2,5] * [†]
limfocyty, % leukocytów	31,5 [7,0]	28,8 [5,9]	25,0 [9,1]	22,7 [11,9]
limfocyty, 1×10^3 kom/uL	1,74 [0,31]	1,64 [0,46]	1,83 [0,63]	1,86 [0,85]
limfocyty T (CD3+), % LYM	70,2 [6,9]	72,2 [6,1]	72,5 [6,9]	70,0 [8,9]
limfocyty T (CD3+), kom/uL	1223 [251]	1175 [296]	1322 [446]	1361 [747]
limfocyty Th (CD4+), % LYM	46,1 [5,4]	43,1 [6,5]	41,7 [6,8]	38,3 [8,9]
limfocyty Th (CD4+), kom/uL	799 [147]	701 [188]	764 [283]	758 [437]

LYM-limfocyty, Th-limfocyty pomocnicze

6.3 Limfocyty aktywowane CD3/CD69+

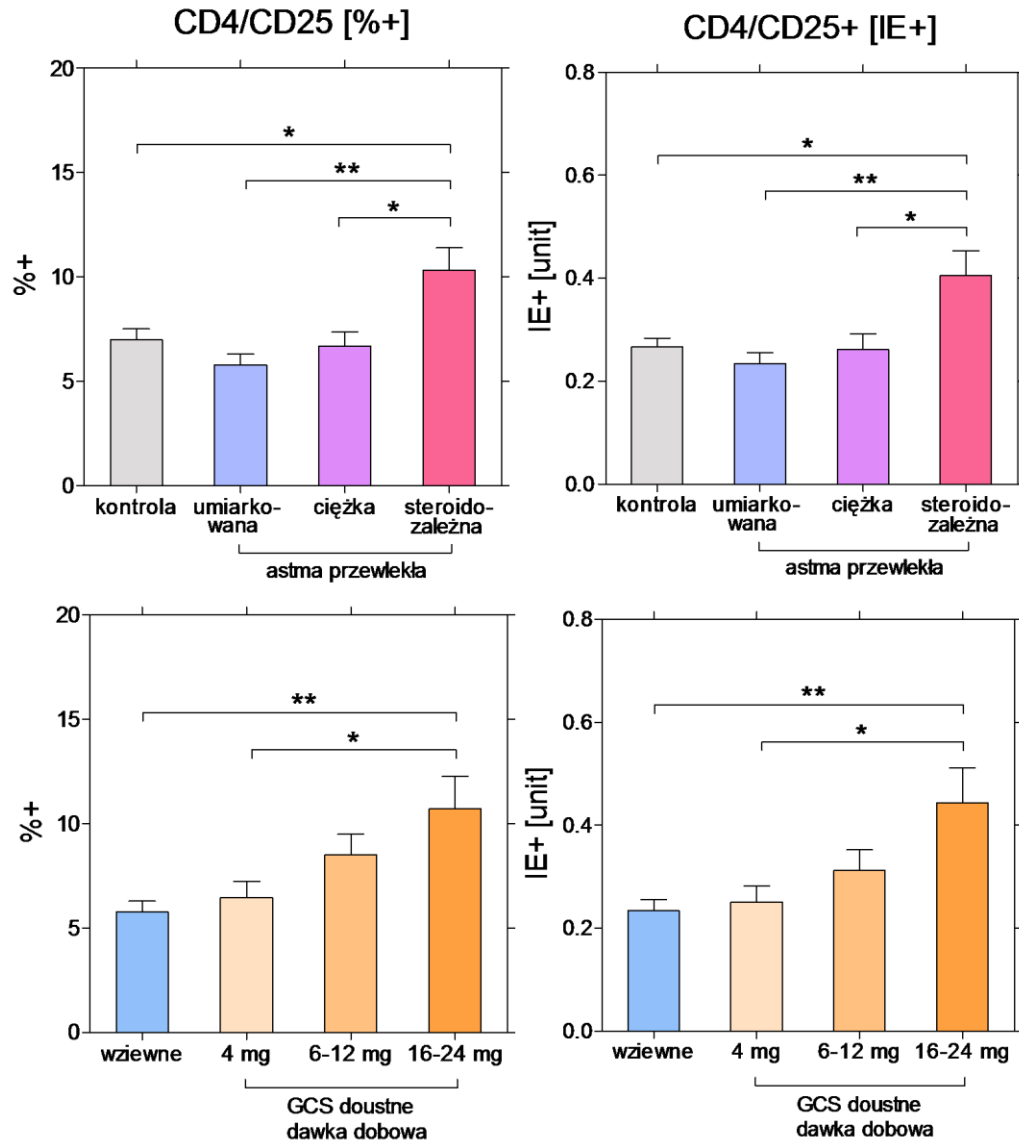
Nie wykazano różnic między badanymi grupami w odsetkach krążących aktywowanych limfocytów T o fenotypie CD3/CD69+. Wartości procentowe komórek CD3/CD69+ nie korelowały ze stopniem nasilenia choroby ani dawką stosowanych GCS (Rysunek 29).



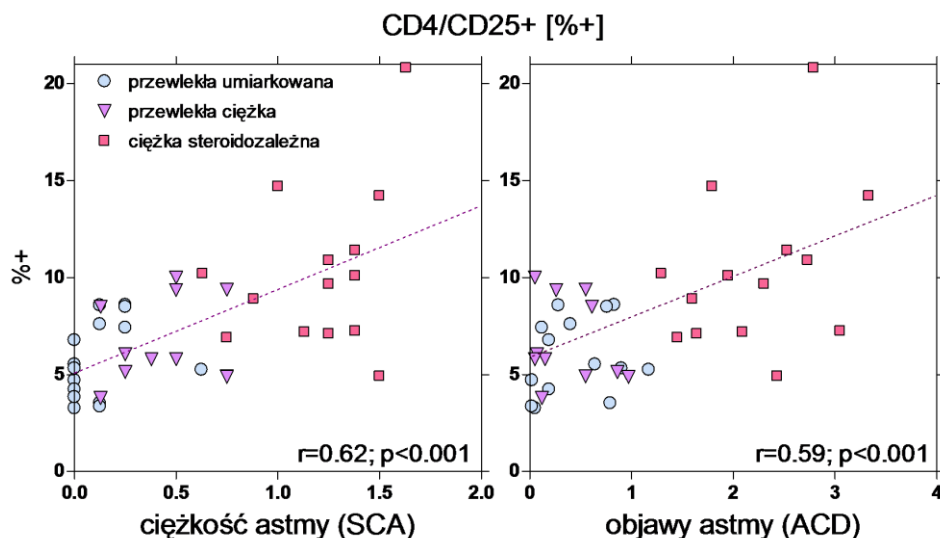
Rysunek 29. Limfocyty CD3/CD69+ (aktywowane limfocyty T) krwi obwodowej. Nie stwierdzono różnic w odsetku komórek CD69+ w zależności od ciężkości astmy jak również dawki doustnych GCS. Na wykresach średnie $\pm$ SEM.

6.4 Limfocyty CD4/CD25+

Pacjenci z astmą ciężką steroidozależną charakteryzowali się podwyższonym odsetkiem komórek frakcji CD4/CD25+ w porównaniu z innymi badanymi grupami. Odsetek komórek CD4/CD25+ wynosił: $10,3 \pm 4,1\%$ u chorych z astmą steroidozależną, $6,7 \pm 2,1\%$ u chorych z astmą ciężką dobrze kontrolowaną, $5,8 \pm 2,0\%$ u chorych z astmą przewlekłą umiarkowaną i $7,0 \pm 1,7\%$ w grupie kontrolnej. Wykazano zależność pomiędzy odsetkiem komórek CD4/CD25+ (również poziomem ekspresji receptora CD25), a dawką zażywanych doustnych GCS (Rysunek 30). Odsetek komórek CD4/CD25+ dodatnie korelował z wynikami skali nasilenia astmy ($r=0,62$) oraz objawami choroby ($r=0,59$) (Rysunek 31). Stwierdzono również słabą ($r=-0,4$) ale znamioną statystycznie korelację między % CD4/CD25+, a % wartości należnej FEV₁. Frakcja komórek CD4/CD25+ jako jedyna z analizowanych populacji limfocytów T korelowała ze stopniem nasilenia choroby, dawką systemowych GCS jak i stopniem obturacji oskrzeli.

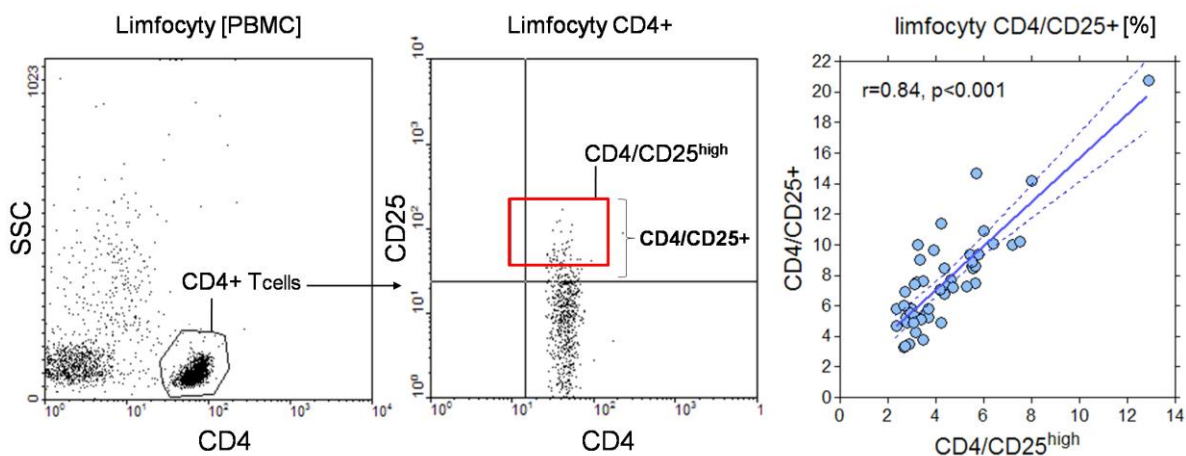


Rysunek 30. Populacja limfocytów CD4/CD25+ krwi obwodowej. Górne wykresy przedstawiają odsetek komórek frakcji CD4/CD25+ [%+] i względną intensywność fluorescencji CD25 (IE+) w zależności od stopnia ciężkości astmy. Dolne wykresy przedstawiają CD4/CD25+ w zależności od dawki zażywanych GCS. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$.

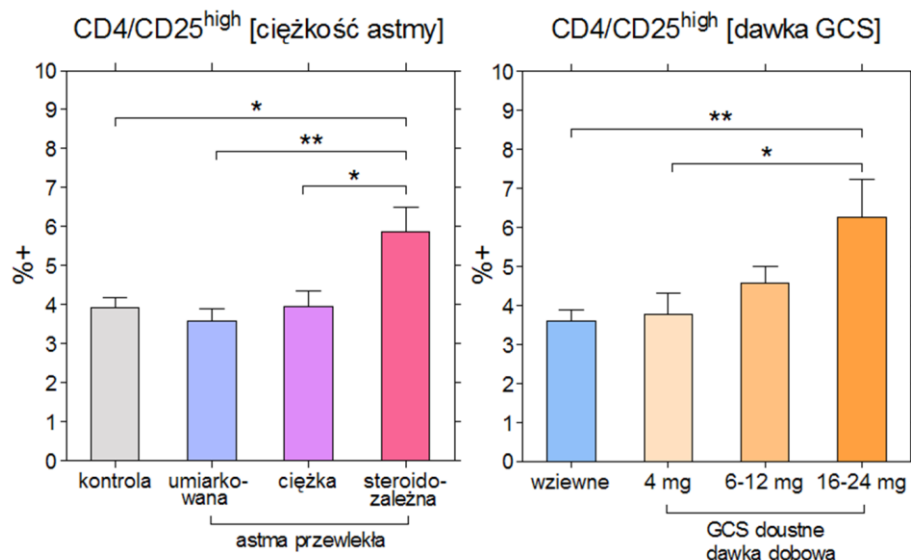


Rysunek 31. Korelacja odsetka limfocytów CD4/CD25+ z wynikami skali ciężkości astmy (po lewej) i stopniem nasilenia objawów astmy (po prawej).

Populacja CD4/CD25+ krwi obwodowej zawiera oprócz komórek Treg pewną ilość limfocytów aktywowanych. Ponieważ we frakcji PBL komórki Treg mają najwyższą ekspresję CD25 jedną z metod ich analizy jest bramkowanie populacji CD4/CD25^{high} (Rysunek 32). Średni odsetek komórek CD4/CD25^{high} był znacząco wyższy u chorych z astmą ciężką steroidozależną. Również w tym przypadku wykazano korelację w zależności od dawki stosowanych GCS ($p<0,05$), objawów astmy ($p<0,05$) i wyników badań czynnościowych płuc ($p<0,05$) (Rysunek 33).



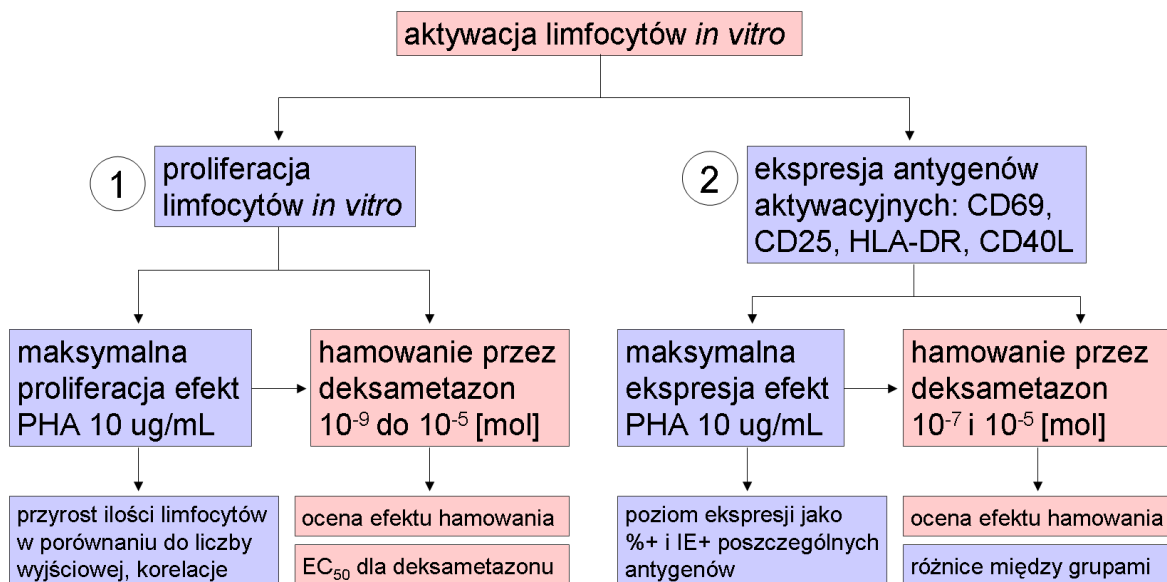
Rysunek 32. Strategia bramkowania populacji komórek CD4/CD25^{high}. Limfocyty barwiono przeciwciałami PerCP-CD4+ i PE-CD25 CD4+. **Po lewej**, na wykresie SSC/CD4 bramkowana populacja komórek CD4+. **Po środku**, ekspresja CD25 w populacji komórek CD4+. Populacja CD4/CD25^{high} jest zazwyczaj łatwa do odróżnienia od frakcji komórek CD25^{dim} (na podstawie kształtu i rozmieszczenia na wykresie). Populacja CD4/CD25+ oznaczona na podstawie kontroli izotopowej PE-IgG1. **Po prawej**, korelacja CD25+ i CD25^{high}.



Rysunek 33. Populacja limfocytów CD4/CD25^{high} krwi obwodowej. Wykresy przedstawiają odsetek komórek frakcji CD4/CD25^{high} [%+] w zależności od stopnia ciężkości astmy i dawki zażywanych GCS. *p<0,05; **<0,01

6.5 Aktywacja limfocytów *in vitro*

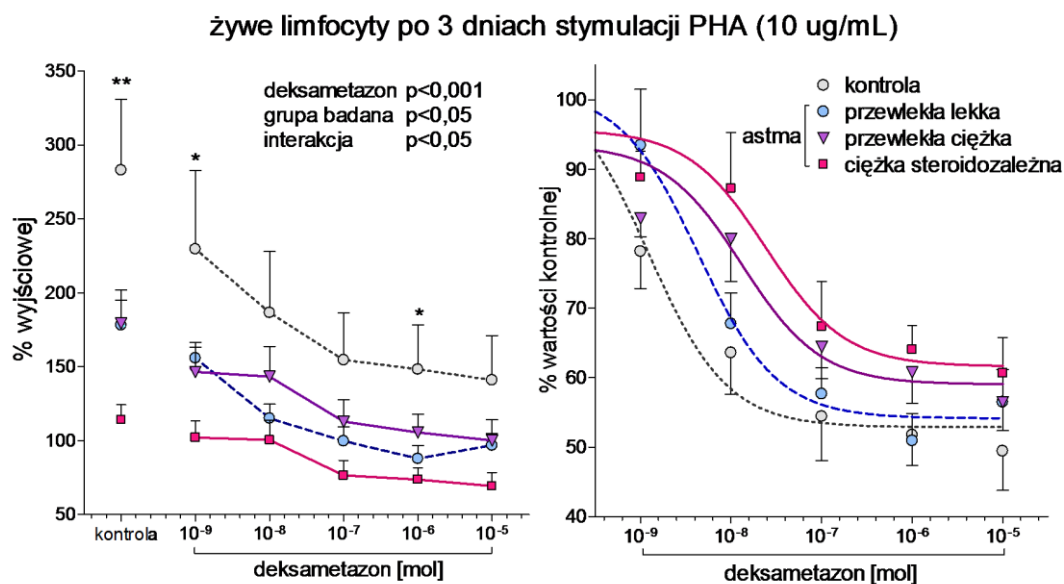
W modelu *in vitro* zbadano maksymalną aktywację limfocytów po stymulacji PHA i oceniono różnice między grupami chorych i zdrowymi ochotnikami. W dalszej kolejności oceniano wpływ deksametazonu na aktywację i proliferację limfocytów (schemat eksperymentów na rycinie Rysunek 34).



Rysunek 34. Parametry oceniane w eksperymentach dotyczących wpływu deksametazonu na tempo proliferacji (1) i wczesne etapy aktywacji (2) limfocytów stymulowanych mitogenem *in vitro*.

6.5.1 Proliferacja limfocytów *in vitro*

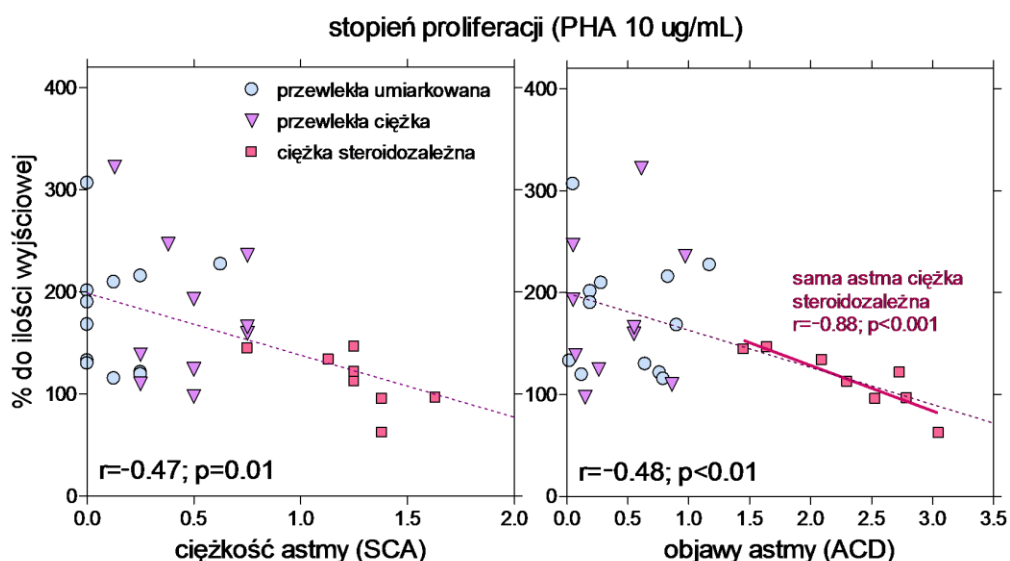
Po 3 dniach stymulacji PHA (10 ug/mL) ilość żywych limfocytów, odzwierciedlająca stopień proliferacji, była największa w hodowlach PBL zdrowych dawców. Stwierdzono około trzykrotne zwiększenie liczby komórek w porównaniu ze stanem wyjściowym (Rysunek 35, kontrola). Ilość żywych komórek nie zmieniła się natomiast w grupie chorych z astmą ciężką steroidozależną, różnica w porównaniu do zdrowych dawców była istotna statystycznie ($p < 0,01$). Deksametazon zmniejszył tempo proliferacji limfocytów w hodowlach ($p < 0,001$ zarówno po 3 jak i 5 dniach).



Rysunek 35. Wpływ deksametazonu na proliferację limfocytów po 3 dniach hodowli *in vitro*. Ilość żywych limfocytów w hodowlach stymulowanych 10 ug/mL PHA (kontrola) lub inkubowanych dodatkowo z deksametazonem we wzrastających stężeniach wyrażona jako % w odniesieniu do ilości wyjściowej (po lewej) lub do kontroli PHA (po prawej). Stężenia deksametazonu w mol/L. Na wykresach wartości średnie $\pm$ SEM oraz wyniki analizy statystycznej. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Efekt deksametazonu był najsilniejszy w hodowlach limfocytów zdrowych dawców (Rysunek 35, efekt grupy $p < 0,05$; po 3 dniach różnica znamionna statystycznie w porównaniu z astmą ciężką steroidozależną). Stężenia deksametazonu odpowiadające za 50% efektu hamowania proliferacji (EC_{50}) wynosiły: $1,23 \pm 5,3$ nM w grupie zdrowych dawców, $4,35 \pm 6,2$ nM w grupie z astmą przewłkłą umiarkowaną, $13,2 \pm 6,6$ nM w grupie z astmą przewłkłą ciężką i $24,3 \pm 9,9$ nM w grupie z astmą ciężką steroidozależną. Efekt deksametazonu w był ponad dziesięciokrotnie mniejszy w grupie z astmą ciężką steroidozależną w porównaniu do zdrowych dawców, różnica ta była istotna statystycznie

($p < 0,05$). Stwierdzono ponadto dodatnią korelację pomiędzy stopniem proliferacji limfocytów, a skalą ciężkości i objawami astmy (Rysunek 36). Zależność między ACD, a proliferacją limfocytów *in vitro* była szczególnie wyraźna w grupie chorych na astmę ciężką steroidozależną. Nie wykazano różnic pomiędzy stopniem proliferacji limfocytów, a dawką zażywanych GCS.

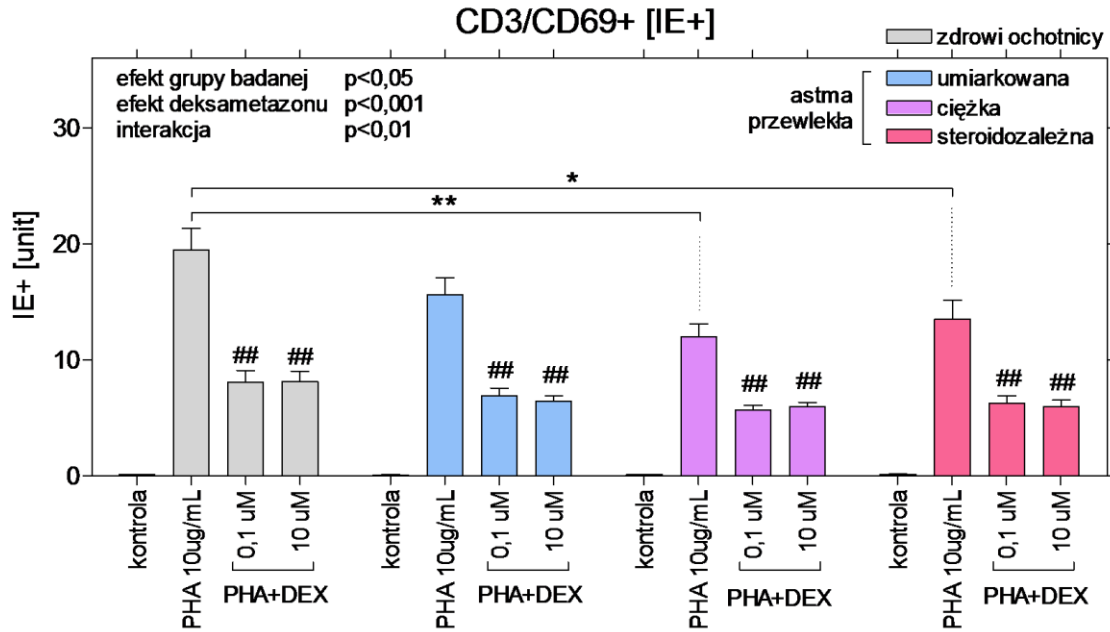


Rysunek 36. Korelacja stopnia proliferacji limfocytów krwi obwodowej po 3 dniach hodowli *in vitro* ze stopniem ciężkości astmy (po lewej) i objawami (po prawej). Oddzielnie przedstawiono korelację z wynikami ACD w grupie chorych z astmą ciężką steroidozależną.

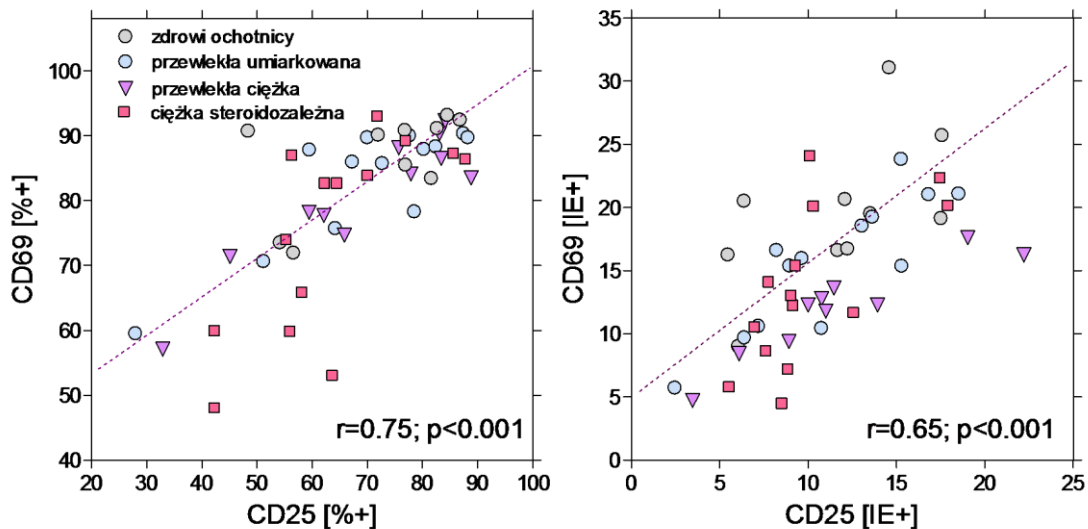
6.5.2 Aktywacja limfocytów

Po 24 godzinach stymulacji PHA $80,8 \pm 11,6\%$ limfocytów T wykazywało ekspresję wczesnego markera aktywacji leukocytów lektyny CD69. Poziom ekspresji CD69 (IE+) był znacząco wyższy w hodowlach limfocytów zdrowych dawców w porównaniu z chorymi na astmę przewlekłą ciężką ($P < 0,01$) i steroidozależną ($p < 0,05$) (Rysunek 37).

Po 24 godzinach stymulacji mitogenem obserwowano również bardzo wysoką ekspresję łańcucha α receptora IL-2R (CD25). Odsetek komórek CD4+ wykazujących ekspresję CD25 wynosił średnio $68,3 \pm 15,0\%$ i nie różnił się w badanych grupach chorych. Nie wykazano również znaczących różnic w maksymalnym poziomie ekspresji HLA-DR ($40,1 \pm 10,6\%$ komórek CD3+) i CD40L ($24,2 \pm 9,8\%$ komórek CD4+). Stwierdzono znaczącą statystycznie korelację ($r = 0,65$) pomiędzy maksymalnym poziomem ekspresji CD25 i CD69 (Rysunek 38). Obserwowano również dodatnią korelację ($r = 0,53$) pomiędzy ekspresją CD25 i CD40L.



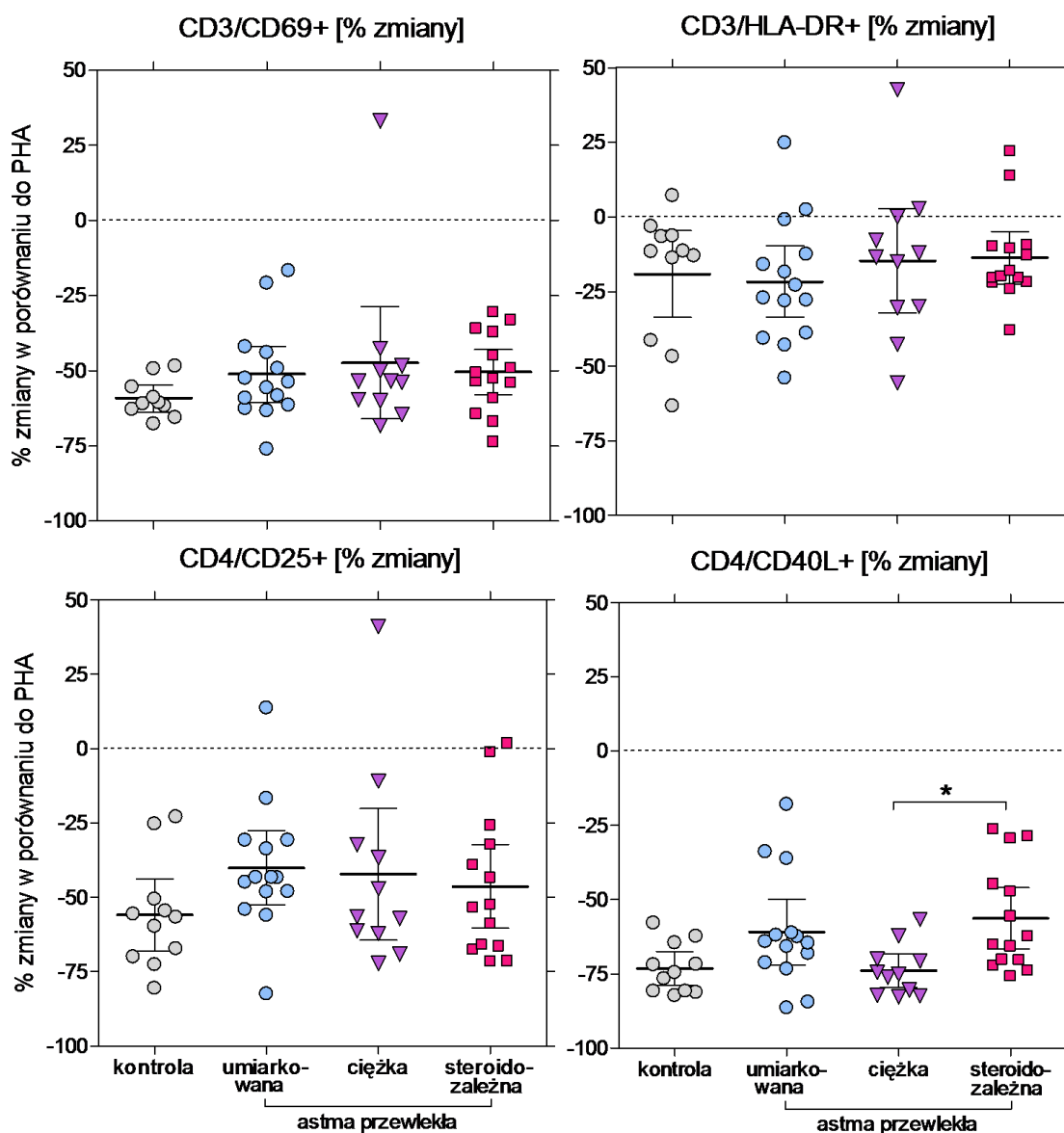
Rysunek 37. Wpływ deksametazonu na ekspresję antygenu CD69 w stymulowanych PHA limfocytach T. Wykres przedstawia średnie ($\pm$ SEM) wartości IE+ komórek CD69+. Na wykresach podano znamienne wyniki analiz statystycznych: ## $p < 0,01$ w porównaniu do efektu samej PHA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w porównaniach między badanymi grupami.



Rysunek 38. Korelacja poziomu maksymalnej ekspresji IL-2R α i CD69. Wykres po lewej stronie przedstawia wyniki %. Po prawej stronie wartości indeksu ekspresji IE+.

Dodanie deksametazonu do hodowli limfocytów stymulowanych PHA prowadziło do wyraźnego zmniejszenia poziomu ekspresji wszystkich badanych antygenów związanych z aktywacją limfocytów za wyjątkiem HLA-DR. Deksametazon zastosowany w stężeniu 0,1 μ M znacznie obniżył ekspresję CD25 (średnio o $46 \pm 24\%$) i CD69 (średnio o $52 \pm 17\%$). Efekt hamujący był najwyższy przy ocenie zmian ekspresji CD40L i wynosił średnio $66 \pm 12\%$ w

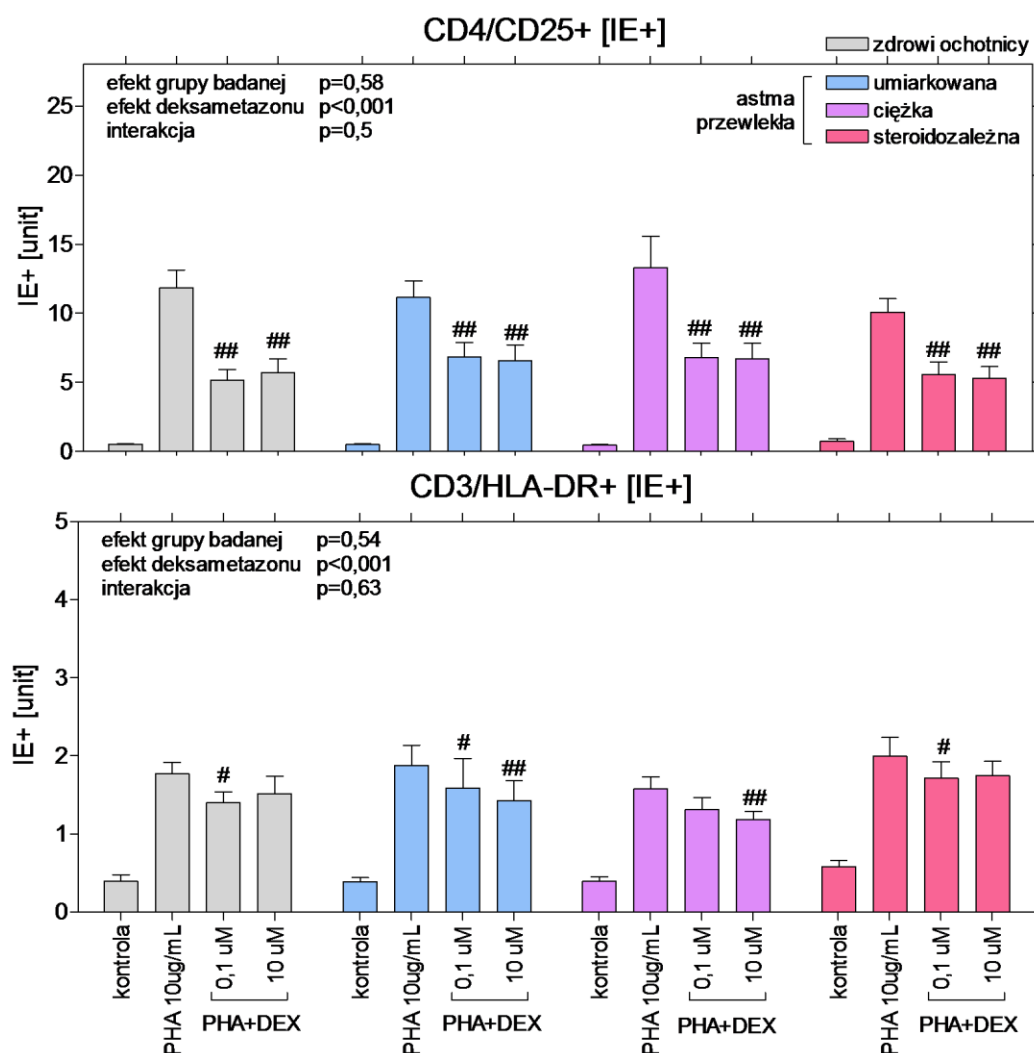
porównaniu z kontrolą PHA. Deksametazon nieznacznie wpłynął na poziom ekspresji HLA-DR, efekt był znamieny statystycznie w niektórych badanych grupach, jednak średnia zmiana ekspresji w porównaniu z PHA wynosiła tylko $17 \pm 20\%$ (Rysunek 39). Nie stwierdzono istotnych różnic w hamowaniu przez deksametazon ekspresji CD25, HLA-DR (Rysunek 40) oraz CD69 (Rysunek 37) w zależności od ciężkości astmy lub dawki GCS.



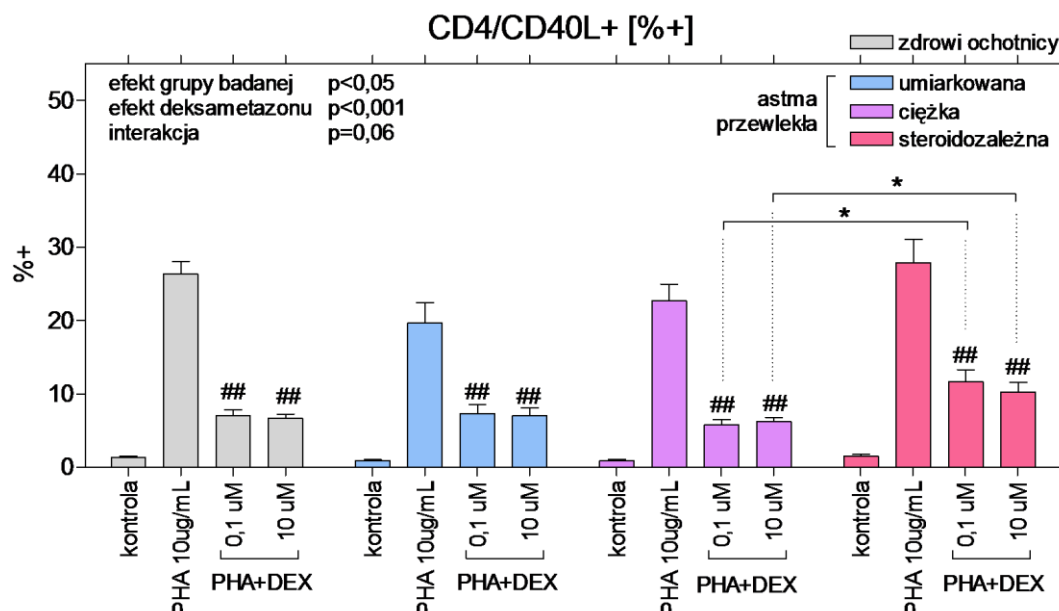
Rysunek 39. Wpływ deksametazonu na ekspresję antygenów związanych z aktywacją limfocytów T. Wyniki przedstawiono jako % zmiany w porównaniu z maksymalną ekspresją (wyrażoną jako IE+) po stymulacji 10 $\mu\text{g/mL}$ PHA. Na wykresach punktowych zaznaczono średnie $\pm 95\%$ CI. * $p < 0,05$.

Wykazano natomiast, że deksametazon słabiej hamował ekspresję CD40L limfocytów T CD4+ w grupie chorych z astmą ciężką steroidozależną. Różnica w działaniu deksametazonu była istotna statystycznie w porównaniu z astmą przewlekłą ciężką (z dobrą kontrolą choroby) i była widoczna zarówno przy ocenie odsetka (lub IE+) komórek CD40L+ po dodaniu deksametazonu (Rysunek 41) jak również po obliczeniu % zmiany w porównaniu do maksymalnej stymulacji PHA (Rysunek 39).

Nie stwierdzono istotnej różnicy w ekspresji badanych antygenów jak również w działaniu hamującym deksametazonu przy porównaniu chorych różniących się wrażliwością na aspirynę.



Rysunek 40. Wpływ deksametazonu na ekspresję IL-2R α (CD25) i HLA-DR limfocytów stymulowanych mitogenem. Wykresy przedstawiają średnie ($\pm$ SEM) wartości IE+. # $p<0,05$; ## $<0,01$ w porównaniu do efektu samej PHA.

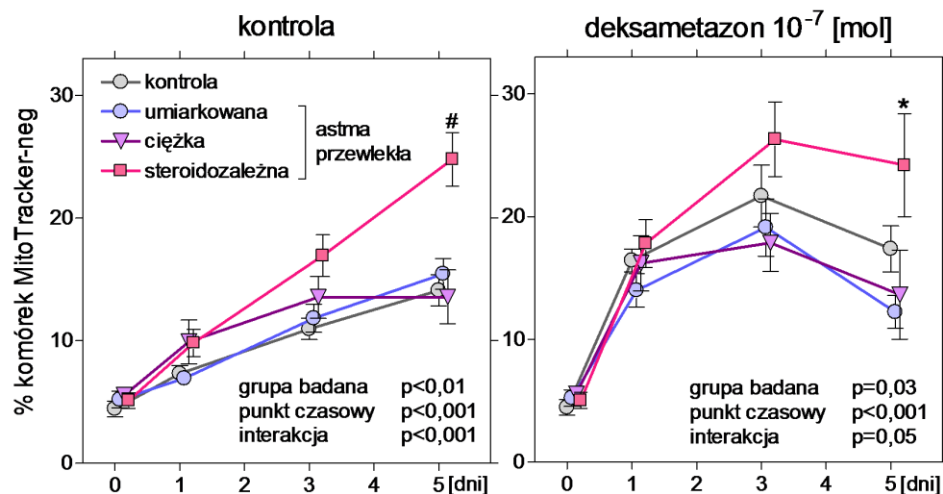


Rysunek 41. Wpływ deksametazonu na ekspresję ligandu CD40 w stymulowanych mitogenem limfocytach T. Wykresy przedstawiają średnie ($\pm$ SEM) odsetki komórek CD4/CD40L+. Na wykresach podano znamienne wyniki analiz statystycznych: ^{##} $p < 0,01$ w porównaniu do efektu samej PHA, * $p < 0,05$ w porównaniach między badanymi grupami.

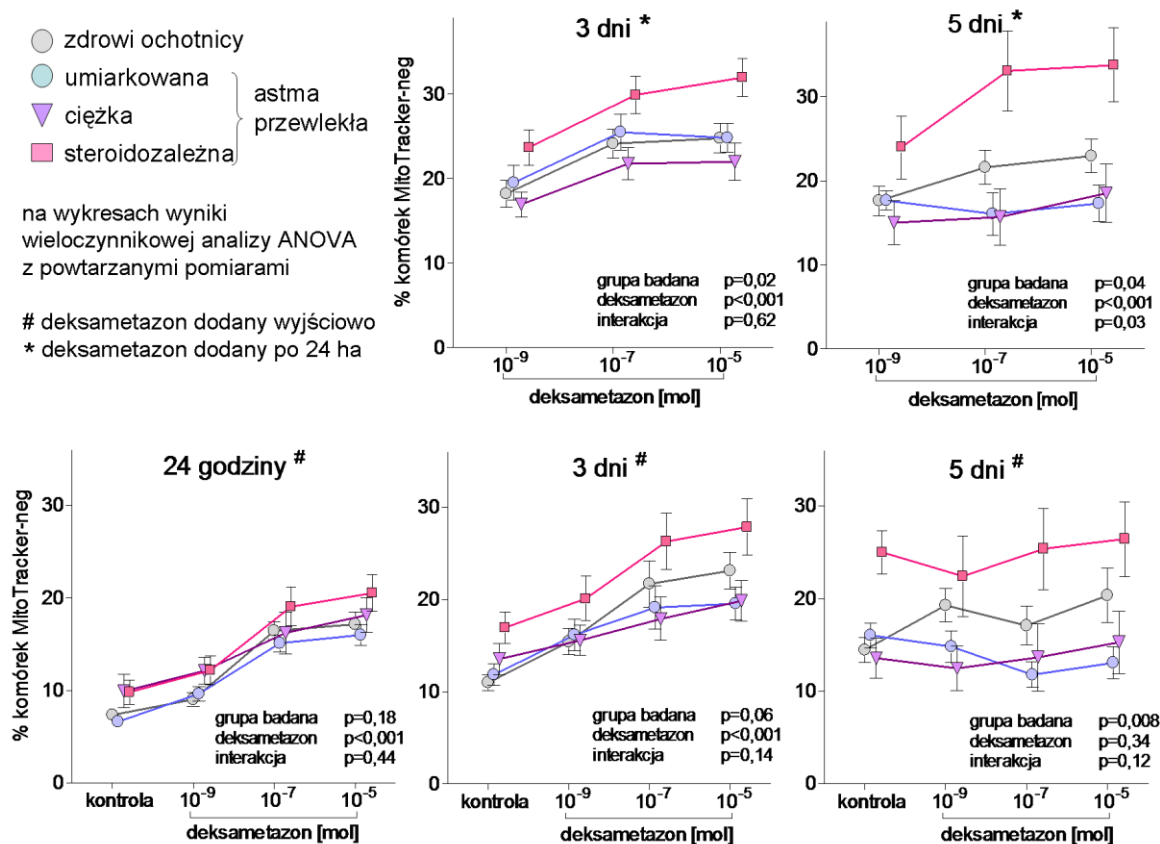
Nie stwierdzono różnic w maksymalnej ekspresji CD25, CD69 i HLA-DR u chorych z astmą atopową. Poziom ekspresji CD40L limfocytów stymulowanych PHA był najwyższy u chorych z atopową astmą steroidozależną (ANOVA, efekt atopii $p < 0,05$).

6.6 Apoptoza limfocytów w hodowlach *in vitro*

Odsetek limfocytów apoptotycznych zwiększał się w kolejnych dniach hodowli (ok. 5-10% w pierwszej dobie, do około 15-25% w piątej dobie; $p < 0,001$) i w każdym z ocenianych punktów końcowych był najwyższy w hodowlach limfocytów chorych na astmę ciężką steroidozależną (Rysunek 42). Deksametazon indukował apoptozę limfocytów w *in vitro*. Efekt działania deksametazonu był zależny od dawki ($p < 0,001$) i w większości ocenianych punktów końcowych był największy w grupie astmy steroidozależnej ($p < 0,05$) (Rysunek 43).



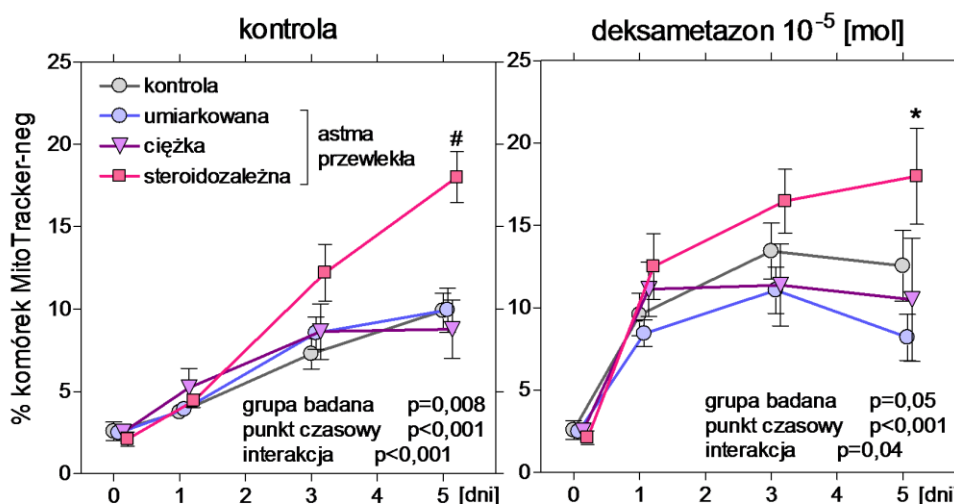
Rysunek 42. Apoptoza limfocytów w hodowlach *in vitro*. Po stronie lewej wartości odsetkowe limfocytów z obniżonym potencjałem mitochondrialnym w kolejnych dniach hodowli (spontaniczna apoptoza). Po stronie prawej apoptoza indukowana deksametazonem w stężeniu 0,1 μM . Na wykresach średnie $\pm$ SEM oraz wyniki analizy ANOVA. W testach post-hoc # oznacza $p<0,01$ w porównaniu astmy steroidozależnej do astmy ciężkiej dobrze kontrolowanej, przewlekłej umiarkowanej lub zdrowych ochotników. * oznacza $p<0,01$ w porównaniu astmy steroidozależnej i przewlekłej umiarkowanej.



Rysunek 43. Indukcja apoptozy limfocytów w hodowli *in vitro*. Deksametazon w trzech wzrastających log stężeniach dodawano wyjściowo (#, dolne wykresy) lub po 1 dniu wstępnej hodowli (*, górne wykresy). Odsetek komórek apoptotycznych oceniano po 24 godzinach, 3 i 5 dniach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SEM, na wykresach wyniki analizy ANOVA.

Podobne wyniki uzyskano w badaniach apoptozy limfocytów CD3⁺ (Rysunek 44). Zarówno ilość komórek apoptotycznych w hodowlach kontrolnych jak i efekt GCS były najwyższe w grupie chorych na astmę steroidozależną. Stwierdzono ponadto korelację ($p < 0,01$) pomiędzy odsetkiem komórek apoptotycznych i wyjściowym poziomem ekspresji CD69 ($r = 0,74$ w grupie chorych leczonych steroidami). Nie wykazano podobnej zależności w odniesieniu do odsetka komórek CD4/CD25⁺ ani poziomu ekspresji receptorów GR.

Podsumowując, indukcja apoptozy limfocytów *in vitro* nie jest zaburzona u chorych na astmę ciężką steroidozależną i zależy przede wszystkim od ilości krążących aktywowanych komórek CD3⁺.



Rysunek 44. Apoptoza limfocytów T (CD3⁺) w hodowlach *in vitro*. Opis jak na rycinie (Rysunek 42). W testach post-hoc # oznacza $p < 0,001$ w porównaniu astmy ciężkiej i steroidozależnej oraz $p < 0,01$ w porównaniu astmy steroidozależnej z przewlekłą umiarkowaną lub kontrolą. * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu astmy steroidozależnej i przewlekłej umiarkowanej.

6.7 Ekspresja izoform receptora GR

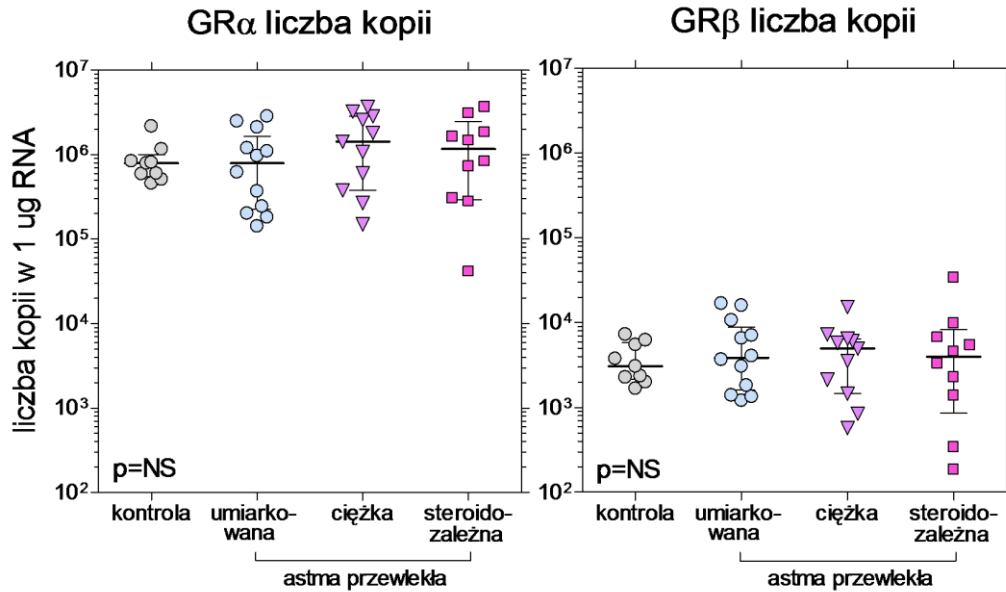
Poziom ekspresji mRNA izoform receptora GR oznaczono u 9 osób grupy kontrolnej (82%), 12 chorych na astmą przewlekłą umiarkowaną (80%), 11 chorych na astmą przewlekłą ciężką z dobrą kontrolą choroby (100%) i 10 chorych na astmę ciężką steroidozależną (71%). Skorygowane wartości CT reakcji real-time PCR dla GR α i GR β nie różniły się w badanych grupach. Po uwzględnieniu danych z krzywych standardowych obliczono ilość kopii izoform GR w całkowitym RNA wyizolowanym z PBMC. Mediana ilości kopii mRNA GR α we wszystkich zanalizowanych próbkach wyniosła $0,82 \times 10^6$ [25-75%: 0,37–1,84] w przeliczeniu na 1 μ g całkowitego RNA. Mediana ilości kopii GR β wyniosła 3,75

$\times 10^3$ [1,82-6,57]. Stosunek ilości $GR\alpha/GR\beta$ wyniósł 245 [136-455] co oznacza, że w PBMC krwi obwodowej na jedną cząsteczkę mRNA $GR\beta$ przypada ok. 250 cząsteczek izoformy $GR\alpha$. Szczegółowe dane na temat ekspresji mRNA GR przedstawiono w tabeli (Tabela 11).

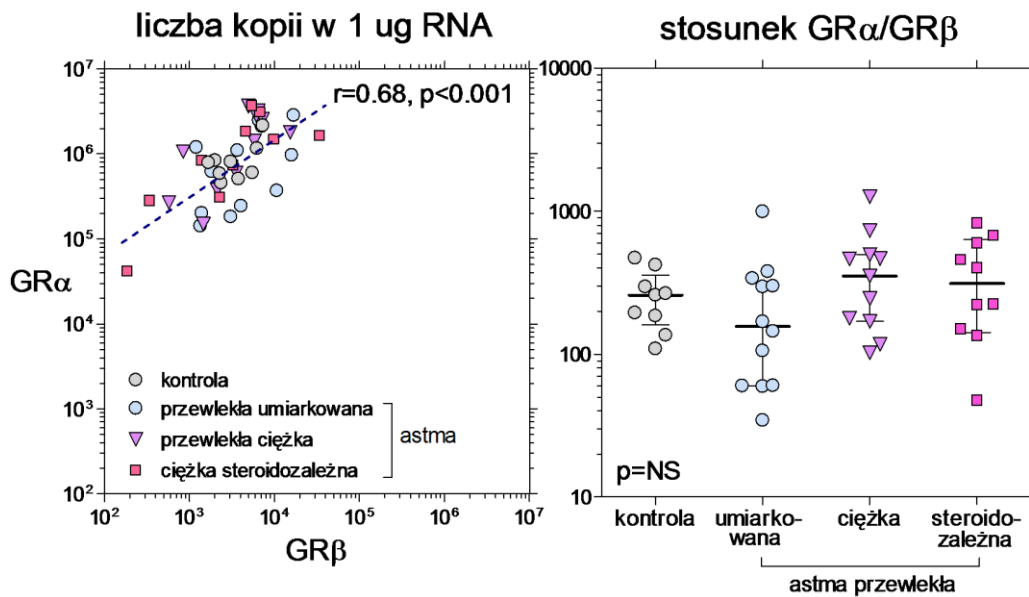
Tabela 11. Poziom ekspresji izoform receptora glikokortykosteroidowego. Dane przedstawione jako mediana [25-75% przedział]. Brak różnic między badanymi grupami.

badane grupy	zdrowi ochotnicy	astma przewlekła umiarkowana	astma przewlekła ciężka	astma ciężka steroidozależna
n=	9	12	11	10
$GR\alpha$				
CT, [cykl]	18,5 [18,1-19,1]	18,5 [17,2-20,8]	17,4 [16,1-19,8]	18,4 [16,9-20,4]
ilość kopii mRNA, $1 \times 10^6 / 1\mu\text{g RNA}$	0,79 [0,55-1,0]	0,79 [0,22-1,65]	1,43 [0,38-2,84]	1,16 [0,29-2,46]
$GR\beta$				
CT, [cykl]	31,6 [30,0-32,5]	31,0 [29,0-33,2]	30,4 [29,7-33,4]	31,0 [29,2-35,3]
ilość kopii mRNA, $1 \times 10^3 / 1\mu\text{g RNA}$	3,06 [2,14-5,87]	3,87 [1,61-8,90]	4,97 [1,46-6,49]	4,0 [0,87-8,33]
$GR\alpha/GR\beta$	259 [161-358]	156 [60-319]	352 [169-499]	311 [142-634]

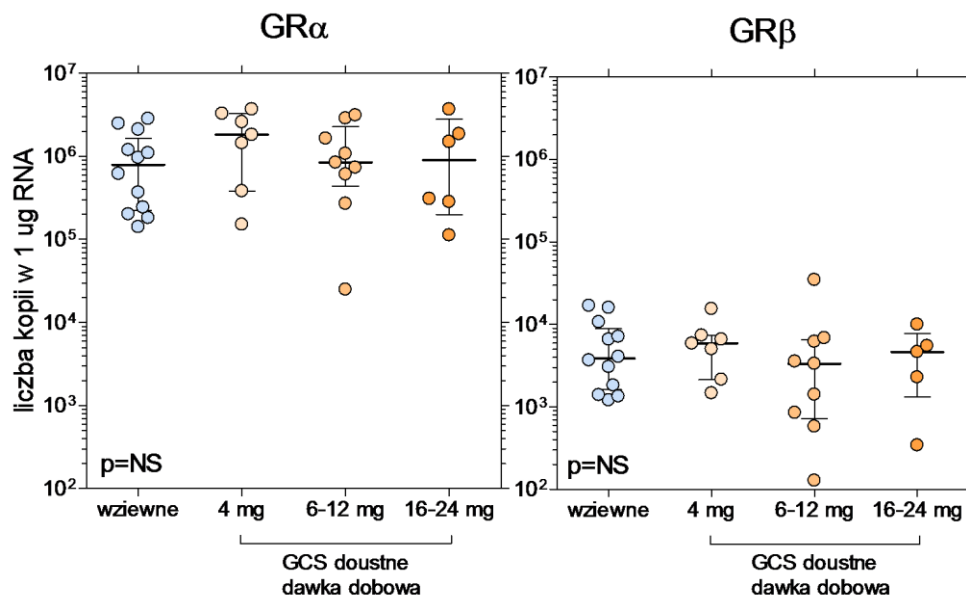
Nie wykazano różnic między badanymi grupami w ilości kopii mRNA $GR\alpha$, mRNA $GR\beta$, jak również współczynnika ekspresji $GR\alpha/GR\beta$ (Rysunek 45). Uzyskano ponadto bardzo dobrą korelację wyników poziomu mRNA $GR\alpha$ i $GR\beta$ ($r=0,68$) co może wskazywać na brak dodatkowej regulacji procesów alternatywnego składania, a ilość izoformy $GR\beta$ jest uzależniona jedynie od całkowitego poziomu transkrypcji GR (Rysunek 46). Ilość izoform GR nie różniła się ponadto w grupach chorych leczonych wysokimi dawkami GCS (Rysunek 47). Nie stwierdzono również istotnych korelacji pomiędzy ekspresją GR (lub stosunkiem $GR\alpha/GR\beta$), a wskaźnikami aktywacji lub proliferacją limfocytów *in vitro*.



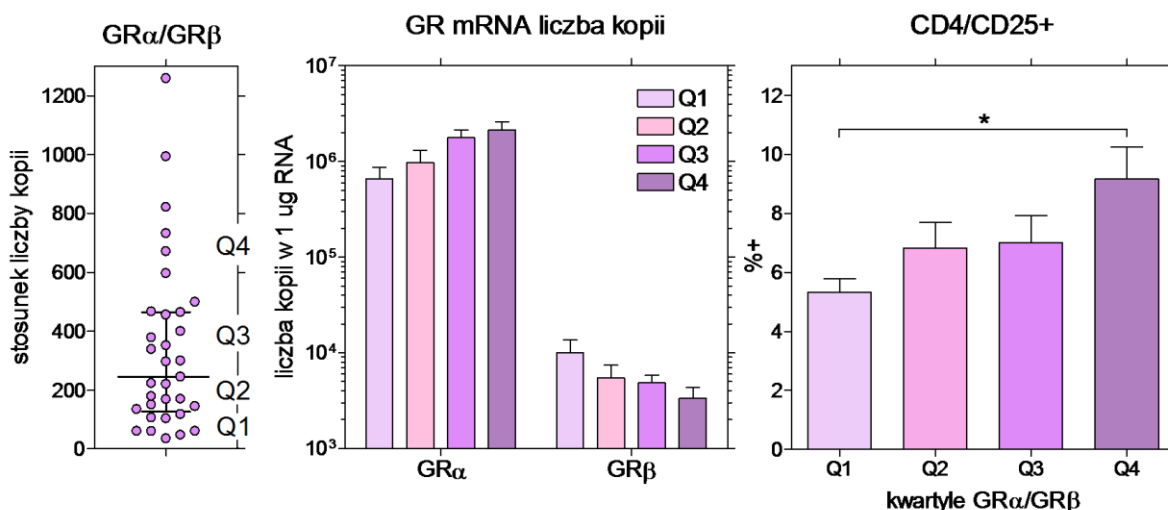
Rysunek 45. Poziom ekspresji izoform GRα (wykres po stronie prawej) i GRβ (wykres po stronie lewej) w komórkach PBMC. Wyniki przedstawiono jako ilość kopii mRNA w 1 µg całkowitego RNA. Na wykresach dane punktowe wraz z medianami i przedziałami międzykwartylowymi.



Rysunek 46. Poziom ekspresji izoform receptora GR. Wykres po stronie lewej przedstawia w skali logarytmicznej korelację poziomu ekspresji obu izoform (liczba kopii mRNA w 1 µg całkowitego RNA). Po stronie prawej stosunek ilości GRα/GRβ w badanych grupach na wykresie punktowym z uwzględnieniem median i przedziałów międzykwartylowych.



Rysunek 47. Poziom ekspresji izoform receptora GR w zależności od dawki stosowanych przewlekle GCS. Na wykresach punktowych mediany i przedziały międzykwartylowe. Brak różnic między badanymi grupami.



Rysunek 48. Zależność między ekspresją izoform receptora GR i frakcją komórek CD4/CD25+ limfocytów krwi obwodowej. Na pierwszym wykresie przedstawiono stosunek liczby kopii GRα/GRβ u pacjentów z astmą oskrzelową (mediana i przedziały międzykwartylowe od Q1 do Q4). Środkowy wykres przedstawia bezwzględną liczbę kopii GRα i GRβ w kolejnych kwartyłach (Q1-Q4). Na ostatnim wykresie podano wartości odsetkowe komórek CD4/CD25+ w zależności od ilości izoform receptora. * $p < 0,05$.

Z uwagi na znaczną zmienność wskaźnika ekspresji mRNA GRα/GRβ w PBMC chorych na astmę oskrzelową (245 [126-465], Rysunek 48) w dalszej analizie badano fenotyp i parametry aktywacji limfocytów w grupach różniących się stosunkiem GRα/GRβ (przedziały międzykwartylowe). Chorzy z największą ekspresją izoformy GRβ (stosunek GRα/GRβ w przedziale od: 35-126) mieli najniższe odsetki limfocytów CD4/CD25+ krwi obwodowej.

Różnica osiągnęła znamienność statystyczną ($p < 0,05$) w porównaniu z pacjentami z najwyższą względną ekspresją GR α (stosunek GR α /GR β w przedziale od: 465-1258), (Rysunek 48). Nie stwierdzono natomiast podobnej zależności w żadnym z innych badanych parametrów klinicznych i immunologicznych.

7 Dyskusja

7.1 Kryteria kwalifikacji do badania

Duże znaczenie w badaniach ciężkiej astmy ma odpowiedni dobór pacjentów, dokładna charakterystyka kliniczna i zastosowanie właściwych kryteriów słabej odpowiedzi na GCS. Powodem braku dostatecznej reakcji na leczenie może być nieprawidłowe rozpoznanie (np. POChP), współistnienie innej choroby, nie przestrzeganie zaleceń przez chorego lub utrzymująca się ekspozycja na czynniki wywołujące zaostrzenia.^{112,113} Szczegółowa diagnostyka różnicowa pozwala na wykluczenie rozpoznania astmy lub wykrycie innej przyczyny niepowodzenia leczenia nawet u 15% chorych z ciężką astmą.¹¹⁴

W kryteriach kwalifikacji do badania uwzględniono więc przede wszystkim: (1) pewne rozpoznanie astmy oskrzelowej u chorych bez dodatkowych czynników pogarszających kontrolę choroby, (2) wieloletnią obserwację w ośrodku klinicznym, (3) uzyskanie optymalnej kontroli choroby przy zastosowaniu leczenia zgodnego z kryteriami GINA, często po dodatkowym okresie 1-2 miesięcznej obserwacji. Ponieważ w grupie chorych na astmę ciężką/trudną dawki GCS dobiera się w zależności od przebiegu choroby, zaostrzeń i reakcji na leczenie warunkiem włączenia do badania było stosowanie GCS doustnych w dawce ≥ 4 mg/d przez ponad 6 miesięcy w roku (w tym aktualne leczenie).

Ostatecznie badanie objęło 25 chorych z ciężką/trudną astmą wg kryteriów ATS.¹² W tej grupie chorych dominowały przypadki astmy rozpoznawanej w wieku dorosłym (*late-onset*, 68%) co zgadza się z wynikami ten Brinke i wsp.¹⁷ oraz ENFUMOSA.¹¹⁵ Również średni wiek chorych był podobny do wyników uzyskanych w dużych europejskich badaniach populacyjnych oraz kohorcie badania Jenkins i wsp.¹⁵ Podstawowe charakterystyki kliniczne grup chorych cytowanych badań oraz wyniki tej pracy zestawiono w tabeli (Tabela 12).

Podobnie jak w badaniach ten Brinke i wsp. oraz ENFUMOSA, wśród chorych z najcięższą postacią astmy oskrzelowej przeważają kobiety (60-80%). Przewlekłą utrwaloną obturację oskrzeli rozpoznano w 32% przypadków, jednak średnia wartość FEV₁ wynosiła 80% wartości należnej i była znacznie wyższa niż w cytowanych badaniach.

Tabela 12. Charakterystyka kliniczna pacjentów z ciężką astmą. Zestawiono wyniki dużych badań populacyjnych porównanych do wyników tego badania. W tabeli średnie [SD] za wyjątkiem oznaczonym *.

parametr	ten Brinke (2001)	ENFUMOSA (2003)	Jenkins (2003)	badanie własne (2007)
liczebność	136	163	150	25
wiek, lata	45,4 [14,4]	42,4 [12,1]	34,4 [12,2]	39,6 [12,8]
płeć, kobiety [%]	70%	81%	68%	60%
czas trwania astmy, lata	26,5* 15,0**	20,8 [2,5]	22,3 [14,0]	13,9 [7,7]
late-onset, [%]	b.d.†	b.d.	42%	68%
FEV₁, % wartości należnej	66,3 [25,1]	71,8 [23,1]	70,3 [18,5]	80,0 [14,7]
utrwalona obturacja, [%]	49%	b.d.	b.d.	32%
atopia, [%]	58,2%	58%	88%	48%
doustne GCS, [%]	33%	35%	80%	100%

Referencje: ten Brinke 2001,¹⁷ ENFUMOSA,¹¹⁵ Jenkins 2003.¹⁵

*-mediana w grupie z utrwaloną obturacją, **-mediana w grupie bez utrwalonej obturacji, †-late-onset czynnikiem ryzyka trwałej obturacji, średni wiek przy rozpoznania astmy ok. 25-30 lat, b.d. – brak danych.

Różnicę można wytłumaczyć innymi kryteriami kwalifikacji do badań, przede wszystkim znacznie większym odsetkiem chorych z bardzo ciężką, nieodwracalną obturacją w badaniach ten Brinke i ENFUMOSA.^c Podobnie jak w badaniu ten Brinke i wsp. utrwaloną obturację stwierdzano głównie u mężczyzn (OR=4,9 [CI:0,9-26,4]). Wykazano ponadto porównywalną częstość utrwalonej obturacji w grupach *early*- i *late-onset* (Tabela 8). Dane te wskazują na szybszą przebudowę oskrzeli u chorych z późnym rozpoznaniem astmy i potwierdzają wyniki wcześniej publikowanych prac.^{15,16,17,116}

Atopię stwierdzono u 48% chorych na astmą ciężką i 53% na astmą przewlekłą umiarkowaną (OR=0,81 [CI:0,22-2,9]). Podobną częstość występowania atopii stwierdzono w grupach różniących się wiekiem rozpoznania i stopniem obturacji oskrzeli. Brak korelacji pomiędzy atopią, a fenotypem ciężkiej astmy w populacji dorosłych nie jest wynikiem zaskakującym. W badaniu ENFUMOSA wykazano nawet odwrotną zależność pomiędzy

^c Przykładowo, do badania ten Brinke i wsp. kwalifikowano także chorych >65 roku życia i z nasilonymi objawami, i ciężką obturacją. Mimo tak znacznej niewydolności wentylacyjnej u większości chorych nie uzyskano odwracalności >12% co może wskazywać na komponentę POChP lub współistnienie innych chorób układu oddechowego.

stopniem ciężkości astmy, a atopią, diagnozowaną na podstawie dodatnich testów skórnych. Atopia nie jest również czynnikiem ryzyka przetrwałej obturacji oskrzeli, co może wynikać z częstszego fenotypu *late-onset* (rzadsze występowanie atopii) w grupie chorych z utrwaloną obturacją.¹⁷

W przeciwieństwie do atopii, nietolerancja aspiryny jest uznawana za ważny czynnik ryzyka zarówno ciężkiej astmy, jak i przetrwałej obturacji oskrzeli.¹¹⁷ W tej pracy stwierdzono częstsze występowania nadwrażliwości na aspirynę wśród chorych na astmę ciężką; różnica w porównaniu z astmą umiarkowaną nie była jednak istotna statystycznie (48% vs. 20%; OR=3,69 [CI:0,83-16,4]). Nietolerancję aspiryny zdiagnozowano u 30% chorych na astmę atopową, co odpowiada wartościom uzyskanym w populacji europejskiej.¹¹⁸ Współwystępowanie atopii i nadwrażliwości na aspirynę stwierdzono tylko w grupie chorych z astmą ciężką (24% chorych). Tego typu fenotyp astmy nie jest więc rzadkością i wiąże się z gorszym rokowaniem. Podobne wyniki uzyskano w badaniu Kupczyk i wsp.¹¹⁹ gdzie nietolerancja aspiryny była najważniejszym czynnikiem ryzyka ciężkiej astmy, ale tylko w grupie chorych z atopią.^d

Dokładna analiza fenotypowa, którą przedstawiono na rycinie (Rysunek 21) pozwala na wyodrębnienie kilkunastu fenotypów klinicznych ciężkiej astmy. Musimy jednak pamiętać, że klasyfikacja ta nie uwzględnia typu zapalenia dróg oddechowych (eozynofilowe lub nie-eozynofilowe), które ocenia się na podstawie badania BAL, biopsji bronchoskopowej, ewentualnie cytologii indukowanej plwociny.¹²⁰

Jednak nawet uproszczona analiza fenotypowa, którą zastosowano w tej pracy pokazuje, jak bardzo zróżnicowana jest grupa pacjentów z ciężką astmą. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że tego typu charakterystyka może znacznie ułatwić opis chorych w praktyce klinicznej i badaniach naukowych. Dokładniejszy podział fenotypowy (uwzględniający rodzaj zapalenia) został zaproponowany przez zespół Wenzel i wsp. z National Jewish Medical and Research Center w Denver i jest już stosowany w badaniach opisowych dotyczących astmy ciężkiej i trudnej.¹²⁰

^d Nadwrażliwość na aspirynę zwiększa 5,5-cio krotnie (niezależnie od czasu trwania choroby związanego z OR=3,7) ryzyko ciężkiej astmy u chorych z atopią.

7.2 Steroidozależność w ciężkiej astmie

Do badań nad *astmą steroidooporną* kwalifikuje się chorych spełniających zdefiniowane kryteria kliniczne,^e czyli brak jest poprawy FEV₁ o 15% po 2 tygodniach leczenia prednizonem w dawce 40 mg/d. W tej grupie pacjentów stosowanie przewlekłe wysokich dawek systemowych GCS nie jest zalecane, gdyż nie przynosi poprawy klinicznej. Z zupełnie inną sytuacją mamy do czynienia w astmie steroidozależnej, gdzie umiarkowane lub wysokie dawki GCS systemowych stosuje zwykle z zadowalającym efektem klinicznym.

W rozpoznaniu *astmy steroidozależnej* uwzględnia się kilka kryteriów klinicznych: (1) utrzymujące się objawy i/lub częste zaostrzenia astmy pomimo (2) leczenia maksymalnymi dawkami GCS wziewnych i (3) niskimi/umiarkowanymi dawkami GCS doustnych >6 miesięcy w roku przy (4) zaostrzeniu dolegliwości podczas próby redukcji dawek GCS. Podstawą rozpoznania astmy steroidozależnej są więc wyłącznie obserwacje kliniczne, ale ich zastosowanie w praktyce nie jest wcale proste. Przede wszystkim nie wiadomo dokładnie jak przeprowadzić granicę między dobrą i upośledzoną wrażliwością na GCS. Opracowanie ścisłych kryteriów, które pozwoliłyby na wyodrębnienie tych grup nie jest łatwe z uwagi na wiele fenotypów klinicznych, dynamiczny przebieg choroby oraz różne nasilenie objawów subiektywnych (trudnych w weryfikacji) i utrzymujących się pomimo zoptymalizowanego leczenia.

Dla potrzeb badania opracowano kwestionariusz ciężkiej astmy (SCA), który pozwolił na obiektywną ocenę ciężkości choroby i wyodrębnienie przypadków astmy steroidozależnej. Uwzględniono w nim dane zawarte w kryteriach rozpoznania i wytycznych postępowania w ciężkiej astmie, a mianowicie: objawy podmiotowe, częstość zaostrzeń i hospitalizacji, parametry spirometryczne i dawkę stosowanych GCS (patrz, Tabela 3). Do oceny stopnia nasilenia objawów subiektywnych wykorzystano sześciopunktową ankietę objawową ACD i domowe pomiary PEF. Wyniki kwestionariuszy oraz dane dotyczące steroidoterapii pozwoliły na wyodrębnienie (1) grupy pacjentów z bardzo dobrą kontrolą astmy, którzy stosowali niskie dawki GCS i (2) chorych z astmą ciężką steroidozależną, u których nie udało się w pełni opanować objawów choroby, pomimo przewlekłego stosowania średnich (7,5–

^e metody diagnostyczne pozwalające na ocenę odpowiedzi na GCS *in vitro* (ocena funkcji limfocytów, wiązanie GCS) nie są do tego celu wykorzystywane

30 mg/d) dawek metyloprednizolonu. Taki podział wykorzystano w późniejszych analizach wyników badań i doświadczeń *in vitro*.

Stosując powyższe kryteria astmę steroidozależną rozpoznano u 56% (n=14) chorych z astmą przewlekłą ciężką. Wynik ten może być jednak zaniżony z uwagi na kwalifikowanie do badania tylko chorych niepalących i z zadowalającą kontrolą astmy. W grupie tej dominowali chorzy z rozpoznaniem *late-onset* (n=11, 79%) jednak różnica w porównaniu z astmą ciężką dobrze kontrolowaną (*late-onset*, 55%) nie osiągnęła znamienności statystycznej (OR=3,05 [CI:0,5-17,4]). Utrwalona obturacja oskrzeli występowała u 43% chorych na astmę steroidozależną, głównie u pacjentów z późnym rozpoznaniem (Rysunek 21). Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic między badanymi grupami w częstotliwości występowania atopii i nadwrażliwości na aspirynę.

Długotrwałe stosowanie GCS wymaga dobrania takiej dawki, która pozwoli na uzyskanie optymalnego efektu leczenia (niewielkie nasilenie objawów, małe zapotrzebowanie na leki rozkurczowe, dobra jakość życia) przy zminimalizowanych objawach niepożądanych terapii. Większość chorych z astmą steroidozależną (n=9, 64%) do opanowania objawów wymagała stosowania ≥ 16 mg metyloprednizolonu przez wiele lat (71% chorych przez 5 lub więcej lat), a próby zmniejszenia dawki wiązały się z zaostrzeniem dolegliwości.

7.3 Wpływ GCS na aktywację limfocytów

Puła dojrzałych limfocytów złożona jest z kilkunastu rodzajów komórek. Każdy limfocyt T posiada unikalnie zrearanżowany i wybrany losowo spośród milionów możliwych kombinacji receptor wykrywający antygen. Utrudnia to możliwość oceny funkcji limfocytów w przypadku stymulacji pojedynczym antygenem, ponieważ pobudzeniu ulegnie znikomy odsetek swoistych antygenowo komórek. Wiedza jaką posiadamy na temat procesów związanych z aktywacją limfocytów pochodzi przede wszystkim z badań w których wykorzystywano metodę aktywacji poliklonalnej, która polega na stymulacji znacznego odsetka limfocytów niezależnie od ich swoistości antygenowej. Modele *in vitro* w których ocenia się stopień hamowania proliferacji PBMC, PBL lub limfocytów T wykorzystuje się powszechnie do oceny wrażliwości na cytostatyki lub leki immunosupresyjne.¹²¹ Tego typu testy czynnościowe stosowano również wielokrotnie w badaniach nad steroidoopornością

w astmie oskrzelowej. Wyniki badań dotyczących tzw. prawdziwej astmy steroidoopornej wskazują na dobrą korelację pomiędzy odpowiedzią kliniczną (czyli reaktywnością na GCS *in vivo*), a wynikami testów stymulacji limfocytów *in vitro*.⁷³ W tej grupie chorych GCS znacznie słabiej hamowały proliferację limfocytów aktywowanych za pomocą PHA lub aCD3.^{74,75,122} Wrażliwość limfocytów krwi obwodowej na GCS w testach *in vitro* nie była jak do tej pory oceniana u chorych z astmą steroidozależną.

7.3.1 GCS hamują proliferację limfocytów u chorych z astmą steroidozależną

W celu zbadania wpływu GCS na aktywację limfocytów oceniono: (1) proliferację PBL stymulowanych mitogenem, jest to innymi słowy próba oceny *ex vivo* wpływu *leczenia glikokortykosteroidami* na funkcję limfocytów, (2) zahamowanie proliferacji PBL po dodaniu deksametazonu, odzwierciedlające stopień reaktywności na GCS i pełen efekt supresyjny możliwy do osiągnięcia *in vitro*, (3) ekspresję receptorów związanych z aktywacją.

Największą proliferację PBL stwierdzono w hodowlach komórek izolowanych od zdrowych dawców, gdzie uzyskano 2- do 5-krotny przyrost liczby limfocytów po trzech dniach hodowli. W grupie astmy ciężkiej steroidozależnej wykazano jedynie niewielką proliferację pod wpływem PHA i tylko nieznaczne zwiększenie liczby limfocytów (o $14,2 \pm 10\%$) w porównaniu do ilości wyjściowej ($p < 0,01$ w porównaniu ze zdrowymi dawcami). Wynik ten wskazuje, że zastosowanie umiarkowanych/wysokich dawek GCS u chorych z astmą steroidozależną prowadzi do znacznego zahamowania reaktywności na mitogeny i zmniejszenia tempa proliferacji limfocytów w testach czynnościowych *in vitro*.

Cechą charakterystyczną astmy steroidozależnej jest zachowana wrażliwość na zmiany dawek GCS, gdyż w przeciwieństwie do prawdziwej astmy steroidoopornej chorzy dobrze reagują na zwiększone dawki GCS w okresach zaostrzeń i odwrotnie, redukcja dawki stosowanej przewlekłe może wywołać pogorszenie objawów. Aby odtworzyć taką zależność w warunkach *in vitro*, do hodowli PBL stymulowanych mitogenem dodawano deksametazon w ilościach, które odpowiadały stężeniom osoczym osiąganym podczas zażywania niskich, umiarkowanych i wysokich dawek GCS (od 1×10^{-9} do 1×10^{-5} M).^f

^f zamiast pochodnych prednizolonu w testach *in vitro* zastosowano deksametazon ponieważ: (1) jest to najczęściej stosowany GCS w badaniach funkcji limfocytów, (2) ma najsilniejsze działanie hamujące, (3) w badaniach klinicznych nad prawdziwą steroidoopornością uzyskiwano takie same wyniki przy wszystkich badanych GCS, (4) chorzy stosowali

Dodanie deksametazonu do hodowli limfocytów prowadziło do dalszego zahamowania proliferacji. W celu uzyskania pełnego efektu antyproliferacyjnego u chorych z astmą steroidozależną konieczne było stosowanie GCS w 10-cio krotnie wyższym stężeniu (EC_{50}) niż w hodowlach PBL grupy kontrolnej.

Podsumowując, w tej części badania wykazano, że (1) u chorych z ciężką astmą steroidozależną GCS systemowe skutecznie hamują proliferację PBL, (2) deksametazon zastosowany w stężeniach 1×10^{-7} do 1×10^{-5} M ma dodatkowe działanie hamujące proliferację, (3) w celu uzyskania podobnego efektu u chorych z ciężką astmą steroidozależną należy stosować wyższe stężenia GCS (EC_{50}), co wynika najpewniej z częściowego wysycenia receptorów GR u chorych zażywających steroidy, a więc już wyjściowo zahamowanej stymulacji i proliferacji PBL.

7.3.2 Wpływ GCS na ekspresję IL-2RA u chorych z ciężką astmą

Gen podjednostki α receptora dla interleukiny-2 (*IL-2RA*, CD25) jest jednym z najważniejszych genów indukowanych podczas aktywacji limfocytów T.^{123,124} W warunkach spoczynkowych (np. limfocyty naiwne) receptor IL-2R składa się tylko z podjednostki IL-2R β oraz łańcucha γ i ma niskie powinowactwo do IL-2.¹²⁵ Indukcja ekspresji łańcucha α zależy od działania czynników transkrypcyjnych NFAT, NF- κ B, AP-1 oraz STAT5 i pozwala na wytworzenie kompletnego receptora, o ponad stukrotnie większym powinowactwie do IL-2. W przypadku limfocytów T aktywowanych mitogenem GCS silnie hamują ekspresję powierzchniową CD25.^{126,127} Mechanizm działania GCS polega w tym na blokowaniu produkcji IL-2 i sygnalizacji przez receptor IL-2R (niskiego i wysokiego powinowactwa),¹²⁸ zależy również od hamowania czynników transkrypcyjnych powstających po aktywacji kompleksu TCR.⁴⁰

Poziom ekspresji CD25 oceniono na powierzchni limfocytów T za pomocą cytometrii przepływowej. Po 24 godzinach stymulacji PHA ekspresja łańcucha α IL-2R zwiększyła się ponad dwudziestokrotnie w porównaniu z kontrolą. Znaczną indukcję CD25 obserwowano również w grupie chorych na astmę leczonych wysokimi dawkami GCS. W identycznym układzie eksperymentalnym wykazano jednak bardzo wyraźne zahamowanie proliferacji

przewlekłe prednizon lub metyloprednizolon, dlatego docelowo byłoby konieczne zbadanie przynajmniej 4 różnych GCS, co w tym badaniu nie było możliwe ze względów technicznych.

limfocytów (opisane w poprzednim rozdziale), a efekt był największy w grupie leczonej wysokimi dawkami GCS. Wyniki te wskazują, że GCS zastosowane *in vivo* w dawkach 8-30 mg/d nie hamują ekspresji *IL-2RA* w aktywowanych limfocytach.

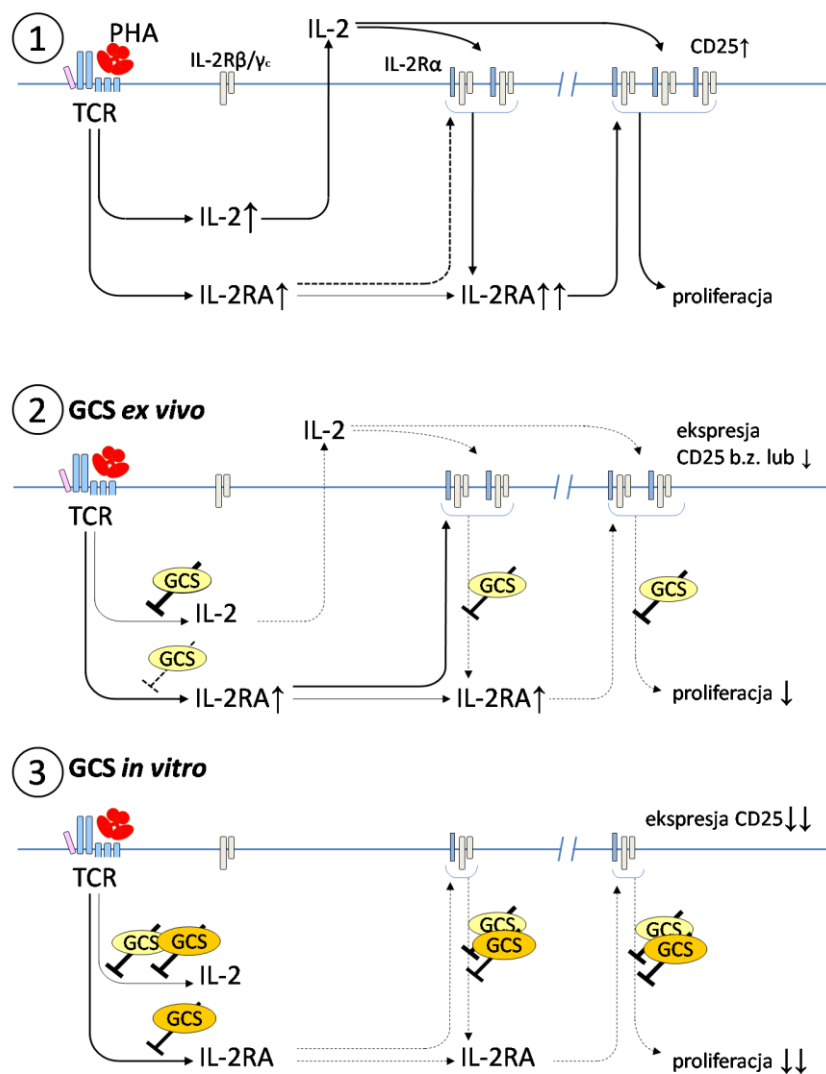
Jak wcześniej wspomniano chorzy z astmą steroidozależną zwykle prawidłowo reagują na zwiększenie dawek GCS. W związku z tym w dalszej części pracy sprawdzono, czy podobne wyniki można uzyskać *in vitro*. W tym celu do hodowli stymulowanych limfocytów dodawano deksametazon w dwóch stężeniach (1) 1×10^{-7} M, które jest zbliżone do maksymalnego stężenia osoczkowego metyloprednizolonu w 2 godziny po podaniu dawki 24 mg oraz (2) stężenie 1×10^{-5} M, przy którym osiąga się pełen efekt blokujący.

Okazało się, że deksametazon skutecznie zahamował ekspresję łańcucha α IL-2R we wszystkich grupach, również u chorych z astmą steroidozależną. Średnia ekspresja CD25 zmniejszyła się po dodaniu deksametazonu o $46 \pm 24\%$ ($n=50$) w porównaniu z maksymalnym poziomem w komórkach stymulowanych PHA. Efekt deksametazonu był największy w grupie kontrolnej (spadek ekspresji o 56%), jednak różnica w porównaniu z chorymi na astmę steroidozależną (46%) nie osiągnęła istotności statystycznej. Względna steroidooporność u chorych z ciężką astmą nie wynika więc najpewniej z zaburzeń sygnalizacji IL-2/IL-2R ani defektu w transrepresji $GR\alpha/IL-2$ lub $GR\alpha/IL-2RA$ (Rysunek 49).

7.3.3 Wpływ GCS na ekspresję CD69 i MHCII

Bardzo czułym, wczesnym markerem aktywacji leukocytów jest cząsteczka CD69, zaliczana do receptorów lektynowych. CD69 nie występuje na powierzchni spoczynkowych leukocytów, ale jego ekspresja zwiększa się gwałtownie po aktywacji komórki. W przypadku stymulacji antygenowej limfocytów T indukcja genu CD69 zachodzi już w kilkanaście minut od pobudzenia, zależy od wczesnej sygnalizacji TCR i działania czynników transkrypcyjnych NF- κ B, ATF/CREB, Egr oraz AP-1.^{129,130} GCS blokują NF- κ B oraz AP-1, w związku z tym mogą hamować transkrypcję CD69. W limfocytach T mechanizmy transrepresyjne GR nie obejmują prawdopodobnie czynników CREB,⁸ w związku z tym hamowanie ekspresji CD69 w aktywowanych limfocytach jest tylko częściowe.¹³¹

⁸ brak danych w literaturze. GR może sekwestrować białko wiążące CREB (CBP) i zmniejszać aktywność kompleksów podstawowych, ale rola takiego mechanizmu w przypadku promotorów z wieloma miejscami enhancerowymi jest nieznaną.



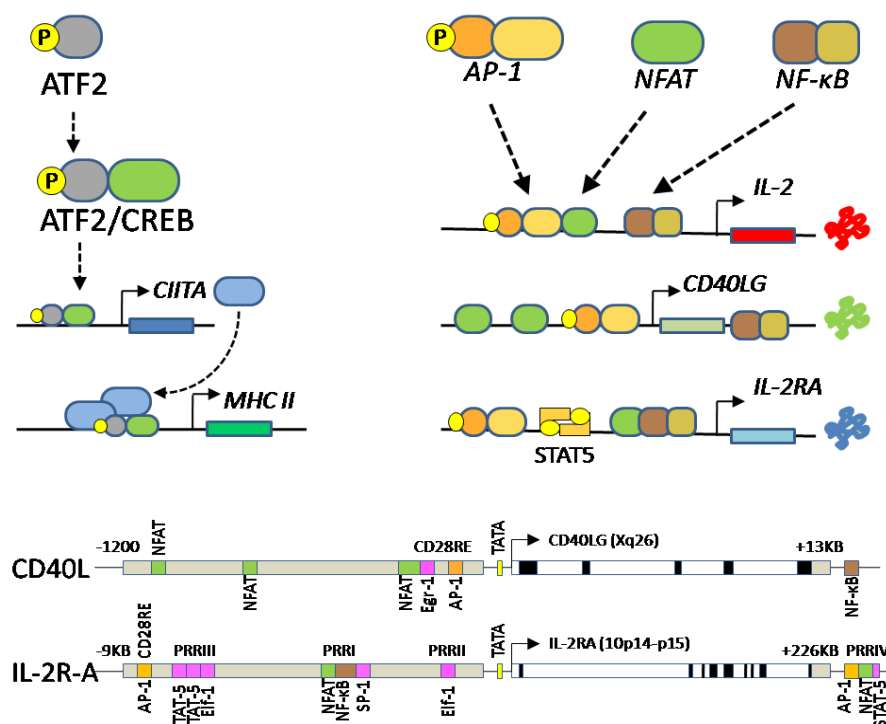
Rysunek 49. Regulacja ekspresji IL-2RA (CD25) w limfocytach T. (1) W przypadku zdrowych kontroli i chorych nie zażywających GCS systemowych PHA silnie aktywuje ekspresję IL-2, CD25 i proliferację limfocytów. (2) U chorych, którzy zażywają GCS w dawkach niskich lub umiarkowanych nie stwierdza się zmian w ekspresji CD25 po stymulacji PHA, działanie antyproliferacyjne GCS wynika z zahamowania syntezy IL-2 i sygnalizacji IL-2R. (3) po dodaniu GCS do hodowli limfocytów stymulowanych PHA uzyskuje się pełen efekt supresyjny gdyż zmniejsza się ekspresja łańcucha IL-2RA i dochodzi do pełnego zablokowania sygnalizacji TCR i IL-2R.

W modelu stymulacji PHA, jaki zastosowano w tej pracy, deksametazon zmniejszył ekspresję powierzchniową CD69 o około 50% w porównaniu z samą PHA, a stopień hamowania ekspresji był podobny we wszystkich badanych grupach. Wynik ten wskazuje, że GCS hamują częściowo wczesne etapy aktywacji limfocytów T, a ich działanie nie różni się w grupie chorych z ciężką astmą steroidozależną.

Aby wykazać ewentualne nieprawidłowości szlaku sygnalizacji ATF/CREB u chorych na astmę oceniono ekspresję powierzchniową cząsteczek MHCII. Białka układu zgodności

tkankowej MHCII (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) nie występują na powierzchni spoczynkowych limfocytów T, ale ich ekspresja zwiększa się w kilkanaście godzin od aktywacji i utrzymuje się przez wiele dni. Geny układu MHCII są regulowane przez czynnik transkrypcyjny CIITA (*Class II Transactivator*), którego ekspresja w aktywowanych limfocytach T zależy niemal wyłącznie od ATF2/CREB (Rysunek 50).¹³²

W celu zbadania indukcji układu MHCII oznaczono poziom ekspresji błonowej antygenu HLA-DR. Po 24 godzinach od dodania PHA około 40% limfocytów T wykazywało ekspresję HLA-DR, ale ilość antygenu na powierzchni komórek nie różniła się między badanymi grupami. Dodanie deksametazonu doprowadziło do niewielkiego zmniejszenia ekspresji HLA-DR (średnio o 17%, n=50). Wynik ten potwierdza, że GCS mają niewielkie znaczenie w sygnalizacji ATF/CREB i regulacji ekspresji MHCII w aktywowanych limfocytach. Częściowe zahamowanie ekspresji HLA-DR pod wpływem GCS może wynikać z sekwestracji CBP (*CREB binding protein*) lub zmniejszenia stabilizacji mRNA.^{133,134} Nie wykazano nieprawidłowości w stopniu hamowania ekspresji HLA-DR u chorych z astmą ciężką steroidozależną.



Rysunek 50. Regulacja ekspresji genów związanych z aktywacją limfocytu T. (**góra**) Czynniki transkrypcyjne ATF2/CREB inicjują ekspresję CIITA, który aktywuje transkrypcję MHCII (np. HLA-DR). Czynniki AP-1, NFAT i NF-κB aktywują ekspresję wielu różnych białek w tym IL-2, IL-2RA (dodatkowo STAT-5) i CD40L. (**dół**) Mapy rejonów promotorowych i genów *CD40LG* i receptora *IL-2RA*, zaznaczono rejony enhancerowe promotora i dystalnego odcinka 3' (różna skala odległości w bp).

7.3.4 GCS silnie hamują ekspresję CD40L

Interakcja receptora CD40 (występującego na komórkach APC) z ligandem CD40L na powierzchni aktywowanych limfocytów T jest ważnym elementem humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. CD40L nie występuje na powierzchni spoczynkowych limfocytów Th naiwnych i pamięci, ale jego ilość zwiększa się bardzo szybko pod wpływem stymulacji antygenowej, osiągając maksimum po około 10 godzinach.¹³⁵ Spadek ekspresji CD40L zachodzący już w kilkanaście godzin od stymulacji, wynika przede wszystkim z szybkiej degradacji mRNA (Rysunek 9).^{136,137} Promotor genu *CD40LG* zawiera trzy miejsca wiążące NFAT oraz silny wzmacniacz transkrypcji zależny od AP-1.^{138,139} W odcinku dystalnym 3' genu znajduje się wzmacniacz zależny od NF- κ B (Rysunek 50).¹⁴⁰ Pełna aktywacja *CD40LG* wymaga współdziałania wszystkich trzech wymienionych czynników transkrypcyjnych.

GCS stosowane w małych stężeniach (10^{-6} M) mogą nieznacznie zwiększyć ekspresję CD40L w spoczynkowych limfocytach T.¹⁴¹ Dokładny mechanizm indukcji CD40L nie jest jeszcze znany,^h może się przyczyniać do znanego skądinąd wpływu GCS na zmianę klasy przeciwciał i zwiększenie produkcji IgE w odpowiedzi na IL-4.¹⁴² Z odwrotnym działaniem GCS mamy do czynienia w przypadku limfocytów aktywowanych. Wykazano, że deksametazon hamuje transkrypcję *CD40LG* w limfocytach stymulowanych aktywatorami kinazy C lub jonoforami wapnia.¹⁴³ Stwierdzono również silne (>90%) blokowanie ekspresji CD40L przez metyloprednizolon w limfocytach Th stymulowanych przeciwciałem aCD3.¹⁴⁴

W tym badaniu wykazano, że deksametazon bardzo silnie zahamował ekspresję CD40L na powierzchni limfocytów Th aktywowanych mitogenem PHA. Deksametazon zmniejszył ekspresję receptora CD40L średnio o 65%, najsilniej w porównaniu do innych badanych receptorów. Efekt hamujący GCS zależał od grupy badanej i był najsłabszy w hodowlach limfocytów od chorych z astmą steroidozależną (średnio 54% w porównaniu do 74% w astmie ciężkiej, dobrze kontrolowanej, $p < 0,05$). Ta różnica w działaniu GCS wskazuje na interesujący, nie znany do tej pory mechanizm gorszej reaktywności na steroidy.

^h promotor *CD40LG* zawiera trzy potencjalne rejony GRE w dystalnym odcinku 3' jednak ich funkcja ani regulacja nie były do tej pory badane

Na podstawie wyników uzyskanych w tej pracy i danych literaturowych wiemy, że GCS skutecznie hamują transkrypcję kontrolowaną przez NF-AT (IL-2RA), NF-κB (CD69, IL-2RA) lub STAT5 (IL-2RA), a efekt nie zależy od rozpoznania lub ciężkości choroby. Słabsze blokowanie ekspresji CD40L przez GCS w astmie steroidozależnej może wskazywać na większą aktywność sygnalizacji niezależnej od NF-κB i NFAT. Mogą być to drogi aktywacji kinaz MAP i czynnika AP-1, inicjowane przez kompleks TCR lub receptor IL-2R. Hipoteza ta znajduje poparcie w kilku badaniach *in vitro* dotyczących indukcji steroidooporności w izolowanych limfocytach T. Po pierwsze, już sama aktywacja kinaz MAP osłabia wyraźnie działanie receptora GR.¹⁴⁵ Tsitoura i wsp.¹⁴⁶ oraz Li i wsp.¹⁴⁷ wykazali ponadto, że stymulacja CD28 lub IL-2R zwiększa aktywację kinaz MAP i czynnika transkrypcyjnego AP-1 w co prowadzi do obniżenia wrażliwości limfocytów T na GCS.

Aktywność czynnika AP-1 nie była jak do tej pory oceniana u chorych z astmą steroidozależną. Wyniki uzyskane w badaniach nad astmą steroidooporną wskazują na wyższy poziom ekspresji składowych AP-1 (fos/Jun), najpewniej wtórny do aktywacji szlaków MAPK.⁷⁹ Stwierdzono między innymi wyższą ekspresję czynnika transkrypcyjnego c-fos w limfocytach T,¹⁴⁸ oraz zwiększoną fosforylację c-jun i kinazy JNK (*Jun N-terminal kinase*).¹⁴⁹ Powodem zahamowania funkcji transrepresyjnych może być zmniejszenie puli wolnego receptora z uwagi na wiązanie z pozostającym w nadmiarze AP-1, hamowanie funkcji GR przez AP-1, lub nadmierna aktywacja genów regulowanych przez AP-1.

Brak pełnego zahamowania ekspresji CD40L przez GCS może częściowo tłumaczyć wyższą aktywację limfocytów i mniejszą reaktywność na GCS u chorych z ciężką astmą steroidozależną.

7.4 Duża wrażliwość na apoptozę limfocytów chorych z astmą steroidozależną

Indukcja apoptozy limfocytów jest jednym z najważniejszych mechanizmów działania leków steroidowych.¹⁵⁰ Dzięki właściwościom proapoptotycznym GCS znalazły zastosowanie między innymi w leczeniu chłoniaków i białaczek typu limfoblastycznego oraz zespołów hipereozynofilowych. Mimo wielu lat badań w dalszym ciągu nie wiadomo jak GCS indukują apoptozę komórek pochodzenia limfoidalnego i dlaczego w niektórych sytuacjach mają zupełnie odwrotne działanie.^{50,151} Cechą charakterystyczną apoptozy mediowanej przez GCS jest ściśle uzależnienie od procesów transaktywacji receptora GR i

samej transkrypcji.¹⁵² Jednak pośród kilkunastu genów, których ekspresja zwiększa się pod wpływem GCS poprzedzając indukcję apoptozy są białka o bardzo różnych właściwościach, nawet antyapoptotycznych.¹⁵³ Bardzo wrażliwe na apoptozę wywoływaną przez GCS są tymocyty, w których dochodzi do obniżenia potencjału mitochondrialnego i sekwencyjnej aktywacji kaspaz.¹⁵⁴ W przypadku limfocytów krwi i linii komórek białaczkowych mechanizm inicjacji apoptozy pod wpływem GCS nadal pozostaje zagadką. Jedynym procesem wspólnym dla tymocytów, limfocytów obwodowych i linii T-komórkowych wrażliwych na CGS jest wczesna dysfunkcja mitochondriów, która może wynikać z translokacji aktywowanego receptora GR.¹⁵⁵ Do zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej często nazywanego „punktem bez powrotu” dochodzi w bardzo wielu szlakach PCD. Pomiar zmiany potencjału mitochondrialnego jest więc bardzo czułym markerem apoptozy i jest szczególnie przydatny w analizie spoczynkowych limfocytów T.

Ponieważ większość limfocytów krwi obwodowej stanowią komórki spoczynkowe (nieaktywowane), to w trakcie długotrwałej hodowli *in vitro* jedynie niewielka ich pula umiera apoptotycznie, zarówno spontanicznie jak i pod wpływem GCS.¹⁵⁶ Glikokortykosteroidy znacznie łatwiej indukują PCD w limfocytach aktywowanych.¹⁵⁷ Podatność limfocytów na apoptozę *in vitro* zależy więc przede wszystkim od czynników, które wpływają na procesy aktywacji, czyli (1) obecności komórek prezentujących antygen, (2) ilości limfocytów regulatorowych, (3) czasu trwania hodowli, (4) leczenia immunosupresyjnego i wreszcie (5) obecności aktywowanych efektorowych limfocytów T.

W dotychczas opublikowanych badaniach w których oceniano wrażliwość limfocytów krwi obwodowej na apoptozę nie stwierdzono różnic między zdrowymi osobami, a chorymi na astmę przewlekłą lekką i umiarkowaną.^{158,159} Wykazano również synergistyczne działanie flutikazonu i β_2 -mimetyków w indukcji apoptozy limfocytów T.¹⁶⁰

W tej pracy po raz pierwszy oceniono wrażliwość limfocytów na apoptozę u chorych z astmą przewlekłą ciężką. Podobnie jak w badaniach Ho i wsp.¹⁵⁸ oraz Pace i wsp.¹⁶⁰ w kilkudniowych hodowlach PBL izolowanych od zdrowych ochotników i chorych z bardzo dobrą kontrolą astmy jedynie 5-10% komórek wchodziło spontanicznie w apoptozę. Deksametazon zastosowany w przedziale stężeń 1×10^{-9} do 1×10^{-5} M zwiększył 2- do 3-krotnie ilość komórek apoptotycznych, a efekt był zależny od dawki (Rysunek 43).

Największą wrażliwość na apoptozę, zarówno spontaniczną, jak i indukowaną przez GCS stwierdzono w hodowlach PBL od chorych na astmę ciężką steroidozależną (efekt grupy badanej $p < 0,001$ do $0,05$ w zależności od układu eksperymentalnego).

Wynik ten świadczy o prawidłowej indukcji apoptozy w limfocytach krwi obwodowej pacjentów z astmą przewlekłą ciężką. Działanie proapoptotyczne GCS może być w tym przypadku jednym z najważniejszych czynników regulujących ilość limfocytów nacieku zapalnego. Wniosek ten powinien być jednak poparty dokładniejszymi badaniami: (1) ekspresji białek układu CD95-CD95L na powierzchni limfocytów krwi i BAL, (2) odsetka limfocytów apoptotycznych w BAL, oraz przede wszystkim (3) wrażliwości na apoptozę limfocytów BAL izolowanych od chorych na astmę ciężką.

7.5 Ekspresja izoformy GR β nie zwiększa się w PBMC chorych z astmą steroidozależną

Poziom ekspresji receptora GR, jak i współczynnik GR α /GR β zależą od wielu czynników, również od działania samych GCS. Stosowanie GCS prowadzi do zmniejszenia ekspresji obu izoform GR (down-regulacja zależna od ligandu)^{161,162,163} jednak z uwagi na znacznie krótszy czas półtrwania mRNA GR α , prowadzi to do zmiany profilu ekspresji na korzyść wariantu β .^{32,99} W badaniach *in vitro* wykazano ponadto, że synteza GR β zwiększa się pod wpływem działania niektórych cytokin (między innymi TNF α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-8).^{97,101,164} W związku z tym w tkankach objętych procesem zapalnym zwiększa się udział izoformy GR β w całkowitej puli GR, a zmiana współczynnika GR α /GR β może prowadzić do zmniejszenia wrażliwości komórek nacieku oraz komórek rezydualnych dróg oddechowych na działanie GCS. Czy znajduje to jednak odzwierciedlenie w badaniach *in vivo*?

U chorych na astmę steroidooporną wykazano wysoki poziom ekspresji białka GR β w limfocytach krwi obwodowej,^{100,101} oraz limfocytach i makrofagach popłuczyn oskrzelikowo-pęcherzykowych (BAL – *bronchoalveolar lavage*).^{100,86} Bergerom i wsp.¹⁶⁶ wykazali ponadto zwiększoną ilość izoformy β w nabłonku oddechowym i komórkach zapalnych błony śluzowej (w biopsjach bronchoskopowych) u chorych z astmą przewlekłą ciężką. Wysoką ekspresję GR β obserwowano ponadto w komórkach nacieku zapalnego oskrzeli u chorych, którzy zmarli z powodu ciężkiego stanu astmatycznego (*fatal asthma*).¹⁶⁵ Wiadomo również, że steroidooporność w ciężkiej astmie nie wynika ze zmniejszenia

ekspresji funkcjonalnego receptora GR, gdyż prawidłowe ilości izoformy GR α obserwowano zarówno w nabłonku oskrzelowym jak i komórkach BAL.^{86,166}

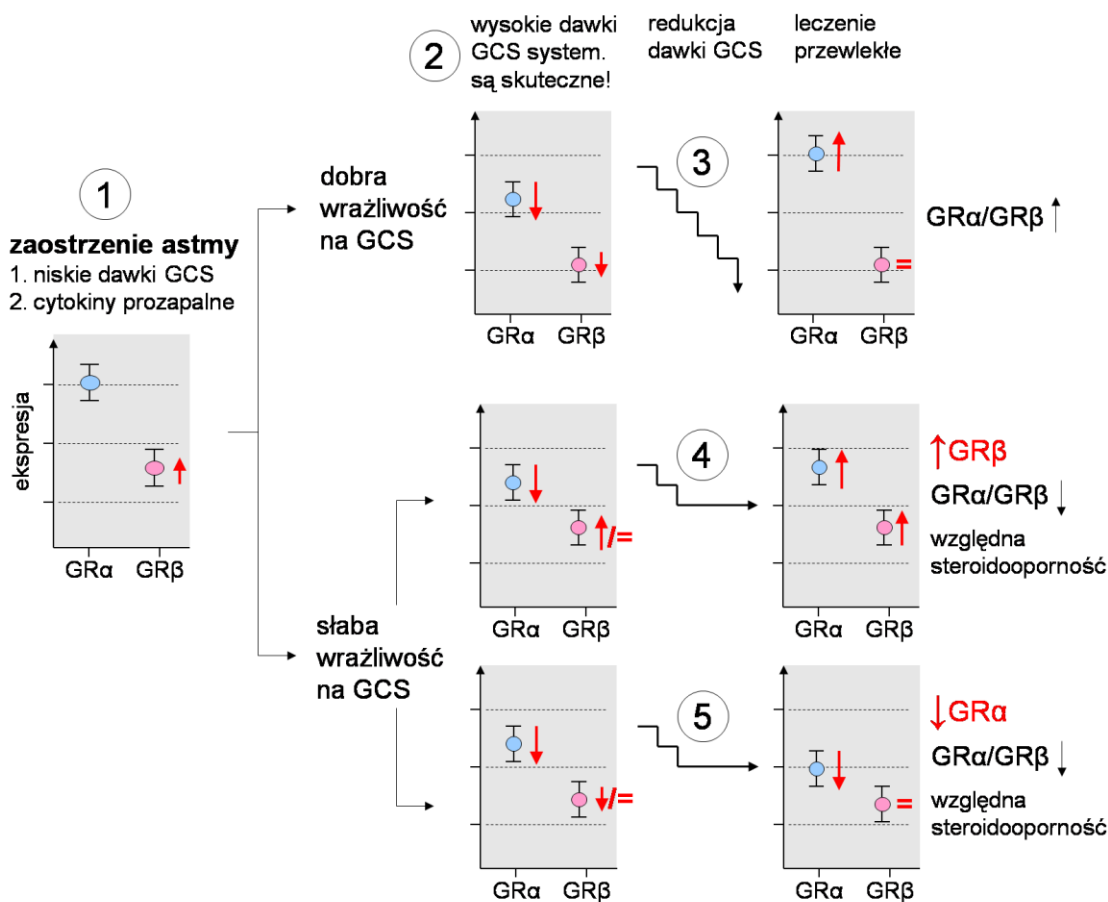
Cechą typową dla astmy steroidoodpornej jest więc zwiększenie ilości GR β w komórkach nacieku zapalnego oskrzeli. Nie można jednak stwierdzić czy jest to przyczyną, czy konsekwencją upośledzonej reaktywności na GCS. Niewielkie różnice w ekspresji GR β nie tłumaczą również, dlaczego oporność na GCS może mieć różne nasilenie (zakres wrażliwości), i dlaczego rozwija się tylko u niektórych chorych na astmę. Przyczyną zmniejszenia współczynnika GR α /GR β nie musi być wzrost ilości GR β , ale obniżenie ekspresji GR α , związane np. z długotrwałym stosowaniem wysokich dawek GCS.

Wpływ GCS na poziom ekspresji izoform GR w astmie oskrzelowej *in vivo* był tematem zaledwie kilku badań. Wiadomo, że zastosowanie wziewnych GCS powoduje wyraźne zmniejszenie ekspresji GR w błonie śluzowej oskrzeli i PBMC.¹⁶⁷ Gagliardo i wsp.¹⁰² wykazali ponadto, że ilość izoformy GR α w komórkach PBMC może się zmniejszyć po kilkunastodniowej terapii wysokimi dawkami prednizonu.

Krótkotrwałe leczenie wysokimi dawkami GCS w okresie zaostrzeń choroby jest skuteczne u większości chorych z ciężką astmą i prowadzi prawdopodobnie tylko do przejściowego zmniejszenia puli receptorów GR (Rysunek 51). Długotrwałe leczenie systemowymi GCS może jednak doprowadzić do utrwalenia niekorzystnego profilu ekspresji GR α /GR β zarówno w komórkach nacieku zapalnego jak i PBMC. Przyczyną względnej steroidoodporności w astmie może być zmiana poziomu ekspresji izoform GR nie tylko w nacieku zapalnym, ale także w limfocytach krwi obwodowej, zanim przedostaną się do tkanek limfatycznych i miejsc objętych zapaleniem.

Głównym celem tej pracy było w związku z tym zbadanie, czy PBMC chorych z ciężką astmą steroidozależną różnią się podstawowym poziomem ekspresji izoform GR. Ponieważ obniżenie współczynnika GR α /GR β może wynikać ze (1) zwiększenia ilości GR β , (2) zmniejszenia ilości GR α lub (3) kombinacji powyższych, oznaczono bezwzględną liczbę kopii mRNA wykorzystując metody ilościowego PCR. Pomiar ilości mRNA wybrano z uwagi na: (1) znaczną ilość izoform translacyjnych GR, (2) mniej wiarygodne metody ilościowego oznaczenia ilości białka za pomocą WB (*western blot*), (3) negatywne wyniki pomiaru ilości

GR β za pomocą WB w niektórych publikacjach^{102,90} oraz (4) brak możliwości oznaczenia stosunku GR α /GR β przy zastosowaniu swoistych przeciwciał.



Rysunek 51. Hipoteza badawcza. (1) w każdym typie astmy i niezależnie od stopnia nasilenia choroby w komórkach PBMC dominuje ekspresja GR α . W przypadku nasilonego stanu zapalnego wzrasta również ilość izoformy GR β . (2) Po zastosowaniu wysokich dawek GCS zmniejsza się przejściowo ekspresja obu izoform, efekt hamujący może być słabszy w komórkach z wyższą ekspresją GR β . (3) u większości pacjentów możliwe jest zredukowanie dawek i zupełne odstawienie systemowych GCS, ekspresja GR wraca do normy. (4) U niektórych pacjentów konieczne jest przewlekłe stosowanie umiarkowanych dawek GCS, w limfocytach utrzymuje się wysoki poziom ekspresji GR β , stają się mniej wrażliwe na GCS. (5) długotrwałe stosowanie GCS prowadzi do zmniejszenia ilości GR α , współczynnik GR α /GR β zmniejsza się.

Zastosowana w tym badaniu technika real-time PCR z wykorzystaniem starterów wykrywających sekwencje połączeń egzonów jest metodą polecaną do oznaczania wariantów splicingowych różniących się znacznie bezwzględną ilością.¹⁶⁸

W celu oznaczenia ilości kopii GR α w komórkach PBMC wykonano szereg reakcji real-time PCR. Z uwagi na śladową ilość kopii GR β , w celu oznaczenia ilości tej izoformy wykorzystano metodę ilościowej oceny produktów reakcji PCR. Dla potrzeb badania

opracowano również modele matematyczne uwzględniające standaryzację wewnętrzną i zewnętrzną reakcji PCR.

Uzyskane w tym badaniu współczynniki $GR\alpha/GR\beta$ mieściły się w przedziale 150-450 i nie różniły się między badanymi grupami. Oznacza to, że w komórkach krwi obwodowej na jedną cząsteczkę mRNA $GR\beta$ przypada co najmniej kilkaset kopii $GR\alpha$. Nie stwierdzono również zmniejszonej ekspresji izoformy $GR\alpha$ u chorych leczonych GCS doustnymi, a ilość izoform GR i współczynnik ekspresji nie zależały od dawki dobowej GCS ani czasu trwania leczenia. Wyniki te świadczą o braku (lub tylko niewielkim) hamowania ekspresji GR w limfocytach krwi obwodowej u chorych leczonych przewlekle GCS i wykluczają jakiegokolwiek wpływ systemowych GCS na procesy składania pre-mRNA prowadzące do powstania izoformy β . W kilku wcześniej opublikowanych badaniach stwierdzano podobną dysproporcję w ilości izoform $GR\alpha$ i $GR\beta$. mRNA izoform GR oznaczano w limfocytach krwi obwodowej, PBMC i/lub liniach komórek pochodzenia limfoidalnego w wielu jednostkach klinicznych i za pomocą różnych metod. Wyniki badań w których podano dane ilościowe pozwalające na obliczenie $GR\alpha/GR\beta$ zestawiono w tabeli (Tabela 13).

Tabela 13. Poziom ekspresji mRNA izoform receptora GR prawidłowych leukocytach zdrowych ochotników i/lub chorych na astmę opisywany w dostępnych publikacjach (w porównaniu do tej pracy, Jakiela 2007). Zestawiono także wyniki badań oceniających ekspresję izoform GR za pomocą ilościowego RT-PCR w komórkach białaczkowych (ALL).

badanie	materiał	GR α	GR β	GR α/β	n=
Jakiela (badanie własne), 2007 *	PBMC (kontrola)	895 $\pm$ 525	3,8 $\pm$ 2,1	245	9
	PBMC (astma umiarkowana)	1040 $\pm$ 955	6,2 $\pm$ 5,5	319	12
	PBMC (astma ciężka)	1633 $\pm$ 1266	4,9 $\pm$ 4,2	432	11
	PBMC (steroidozależna)	1390 $\pm$ 1214	6,9 $\pm$ 10	436	10
Pujols, 2002 * (kontrola)	PBMC	740 $\pm$ 130	1,36 $\pm$ 0,44	544,1	4
	eozynofile	830 $\pm$ 250	1,55 $\pm$ 0,58	535,5	3
	neutrofile	530 $\pm$ 100	0,39 $\pm$ 0,11	1358,9	6
Torrego, 2004 *	PBMC (kontrola)	1350 $\pm$ 250	2,25 $\pm$ 2,2	600	11
	PBMC (astma stabilni)	1460 $\pm$ 350	2,5 $\pm$ 3,0	584	14
	PBMC (astma objawy)	1950 $\pm$ 400	3,2 $\pm$ 4,7	609	13
Li, 2006 **	monocyty	67 $\pm$ 7	0,05 $\pm$ 0,02	1340	5
	limfocyty T	74 $\pm$ 13	0,008 $\pm$ 0,004	9250	5
Goleva, 2006 *** (astma)	monocyty (wrażliwi na GCS)	1,0 $\pm$ 0,3	0,001 $\pm$ 0,003	909	3
	monocyty (steroidooporność)	0,5 $\pm$ 0,1	0,002 $\pm$ 0,003	333	3
Boullu, 2003***	PBMC (kontrola)	4,49 $\pm$ 0,79	0,14 $\pm$ 0,07	32	65
Towers, 2005 #	PBMC (kontrola)	81,1 $\pm$ 21	0,621 $\pm$ 0,1	130,6	17
DeRijk, 2003 ##	Leukocyty (kontrola)	b.d.	b.d.	8287	3
Pedersen, 2003 ###	CEM-C7 (T-cell ALL)	34,0	0,021	1619	?
	IM-9 (B-cell ALL)	163,0	0,088	1852	?
Haarman, 2004 †	PBMC (initial ALL)	6	0,037	154	42
	PBMC (relapsed ALL)	23	0,13	207	10
Tissing, 2005 ††	ALL (szpik, steroidowrażliwi)	ok. 29	ok. 0,04	ok. 800	29
	ALL (szpik, steroidooporni)	ok. 13	ok. 0,02	ok. 500	25
Tissing, 2006 †††	T-cell lub B-cell ALL (PBMC)	b.d.	b.d.	ok. 3300	?

Referencje: Pujols 2002,⁹⁵ Torrego 2004,¹⁰³ Li 2006,¹⁶⁹ Goleva 2006,⁸⁶ Boullu-Ciocca 2003,¹⁷⁰ Towers 2005,¹⁷¹ DeRijk 2003,¹⁷² Pedersen 2003,¹⁷³ Haarman 2004,¹⁷⁴ Tissing 2005,¹⁷⁵ Tissing 2006.¹⁷⁶

* - dane przedstawione jako ilość kopii mRNA GR w 1 μ g całkowitego RNA, $\times 10^3$

** - dane przedstawione jako ilość kopii mRNA GR w fg/mL (?), *** - dane przedstawione jako fg/ng 18S RNA

- dane przedstawione jako ilość kopii mRNA w przeliczeniu na liczbę kopii hPBGD (*human porphobilinogen deaminase*) $\times 10^{-3}$

- autorzy nie podali jednostki w jakiej przeliczyli liczbę kopii mRNA

- wyniki przedstawione jako ilość kopii transkryptu w 1 komórce.

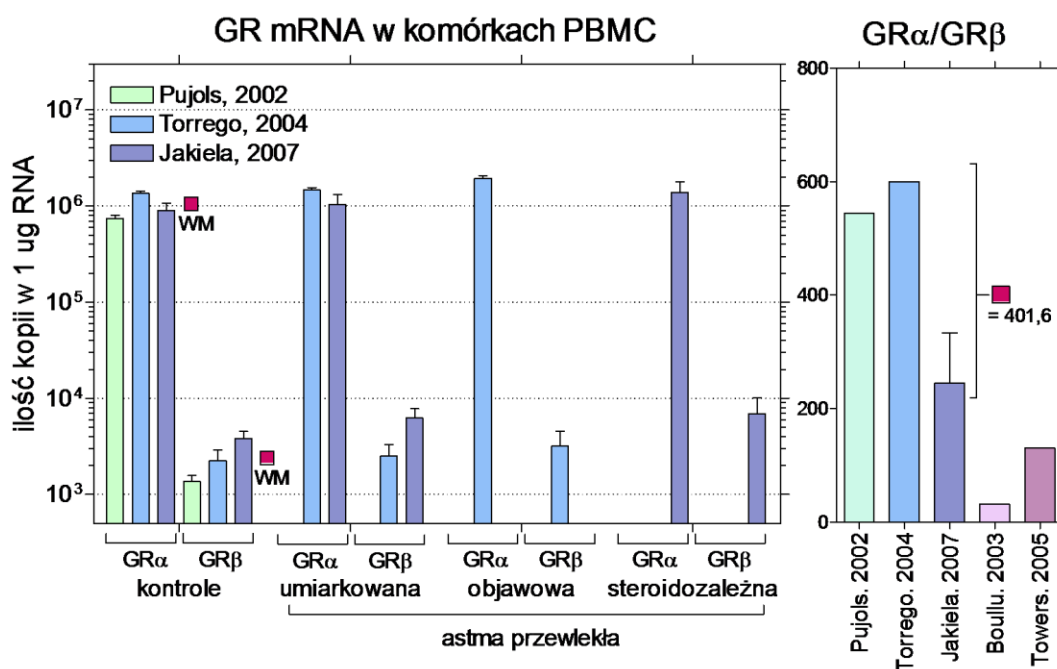
† - wyniki kompetywnego PCR przedstawione jako ilość kopii mRNA (mediany) w porównaniu z β -aktyną

†† - wyniki real-time PCR przedstawione jako ilość kopii mRNA (mediany) w porównaniu z GAPDH

††† - wyniki real-time PCR dla izoform przedstawione tylko na wykresach (niemożliwe do porównania).

Zwracają uwagę znaczne różnice uzyskanych wartości współczynnika $GR\alpha/GR\beta$. Przykładowo, we frakcji PBMC współczynnik ekspresji mieścił się w przedziale od 32 do 609, a w izolowanych limfocytach T oraz niektórych liniach białaczkowych wariant $GR\alpha$ nawet kilka tysięcy razy przeważał nad izoformą β . Na rycinie (Rysunek 52) zestawiono wyniki badań w których oceniano poziom ekspresji izoform GR w komórkach PBMC u chorych na astmę oskrzelową (wyniki przeliczone na 1 ug całkowitego RNA).

Poziom ekspresji izoform GR u chorych z astmą steroidozależną oceniano dotychczas tylko w jednym badaniu. Gagliardo i wsp.¹⁰² nie wykazali różnic w ilości izoform GR w komórkach PBMC w porównaniu z kontrolami lub astma lekką. Zastosowane w tym badaniu metody nie pozwalają jednak na pomiar współczynnika $GR\alpha/GR\beta$, w związku z tym nie jest możliwe obiektywne porównanie z wynikami prac w których stosowano techniki qPCR (*quantitative PCR* – PCR ilościowy) lub real-time PCR.



Rysunek 52. Zestawienie wyników badań ocenających poziom ekspresji izoform receptora GR w astmie oskrzelowej. Po stronie lewej wykres przedstawiający ilość kopii $GR\alpha$ i $GR\beta$ PBMC w przeliczeniu na 1 ug całkowitego RNA. MW – średnia ważona (*weighted mean*) dla grupy kontrolnej obliczona na podstawie wyników wszystkich badań. Po stronie prawej współczynnik $GR\alpha/GR\beta$ w komórkach PBMC kontroli. Zestawienie dostępnych wyników badań oraz średnia ważona dla trzech badań w których stosowano podobną metodę obliczeń (liczba kopii na 1 ug RNA).

Wyniki tego badania wskazują, że u chorych z astmą steroidozależną nie zwiększa się bezwzględna ilość GR β w limfocytach, a długotrwałe leczenie GCS nie prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji izoformy GR α i nie zmienia współczynnika GR α /GR β . Nie wykazano zależności między ekspresją izoform GR, a dawką systemowych GCS. Dlaczego więc długotrwałe stosowanie wysokich dawek metyloprednizolonu nie powoduje down-regulacji mRNA receptora GR *in vivo*?

Choć mechanizm molekularny, jaki odpowiada za utrzymanie wysokiego poziomu ekspresji GR w komórkach PBMC jest nadal nieznany, ważnych informacji na ten temat dostarcza analiza farmakokinetyki doustnych leków steroidowych. Po zażyciu 8-24 mg/d metyloprednizolonu maksymalne stężenie osoczowe osiągane jest po 2 godzinach i wynosi około $0,4-1,0 \times 10^{-7}$ M.¹⁷⁷ Przy stężeniu jakie GCS osiągają w tkankach kilka godzin od podania wszystkie cząsteczki GR α są połączone z ligandem (K_d dla deksametazonu wynosi np. około $0,7-1 \times 10^{-8}$ M).¹⁷⁸ Ale już po kilkunastu godzinach od zażycia leku poziom frakcji wolnej spada ok. 100 krotnie w związku z dystrybucją tkankową (doskonała rozpuszczalność w tłuszczach), metabolizmem wewnątrzkomórkowym i eliminacją nerkową. Wtedy tylko bardzo mała część puli GR związana jest z ligandem.

Z badań *in vitro* wynika, iż zmniejszenie transkrypcji i degradacja białka GR rozpoczynają się już w kilkadziesiąt minut od dodania GCS,^{163,179} ale ilość receptora bardzo szybko wraca do normy (już po 12-24 godzinach) po usunięciu GCS z medium hodowlanego.¹⁸⁰ W sytuacji *in vivo*, przy efektywniejszej eliminacji ligandu, odnowa puli receptora może przebiegać jeszcze szybciej. Prawidłowy transport jądrowy GR i efektywna regulacja ekspresji powodują, że ilość funkcjonalnej izoformy GR α dostosowana jest stężenia ligandu i potrzeb komórki.

Hipoteza ta tłumaczy zarówno wyniki niektórych badań *ex vivo* jak i obserwacje kliniczne. Wiadomo na przykład, że u chorych z astmą steroidozależną powinowactwo GCS do receptorów (K_d) nie jest zmniejszone, nie stwierdza się również zahamowania funkcji GR w testach czynnościowych.¹⁸¹ Chorzy leczeni umiarkowanymi dawkami doustnych GCS zachowują więc prawidłowy poziom receptorów GR, są w związku z tym wrażliwi na zmiany dawek. W tej grupie pacjentów redukcja i/lub odstawienie GCS systemowych powoduje zaostrzenie objawów astmy.

Skoro chorzy z astmą steroidozależną mają prawidłowe ilości i regulację ekspresji izoform GR, to dlaczego muszą stosować przewlekłe wysokie dawki GCS do opanowania objawów choroby. Czy GCS mają jakieś szczególne działanie, niezbędne dla zapewnienia kontroli objawów w ciężkiej astmie?

Wiadomo, że działanie supresyjne GCS polega nie tylko na hamowaniu produkcji cytokin zależnych od NF- κ B, ale również na zwiększeniu wydzielania IL-10. *In vitro* GCS działają w ten sposób jedynie w niskich, fizjologicznych stężeniach.^{182,183} Ponieważ promotor genu IL-10 zawiera zarówno sekwencję aktywującą typu GRE jak i miejsce wiązania AP-1,¹⁸⁴ w badaniach *in vitro* wyższe stężenia GCS hamują ekspresję tej cytokiny.¹⁸² Tymczasem zażywanie GCS w postaci wziewnej jak i wysokich dawek systemowych prowadzi do zwiększenia poziomu IL-10 we krwi.^{185,186} Ta różnica w wynikach badań *in vitro* i *in vivo* wyjaśniona została dopiero niedawno. Okazało się bowiem, że oprócz znanego do tej pory działania immunosupresyjnego GCS ułatwiają różnicowanie limfocytów regulatorowych aTreg. Limfocyty Treg są natomiast jednym z najważniejszych źródeł IL-10.

W dalszej części pracy zbadano w związku z tym jak GCS wpływają na ilość krążących we krwi limfocytów CD4/CD25+, jednej z najważniejszych frakcji limfocytów regulatorowych. Zwiększenie puli Treg u chorych z astmą steroidozależną mogłoby stanowić ważny mechanizm zapewniający utrzymanie optymalnej kontroli choroby. Jednym z celów tego badania było wykazanie czy z takim działaniem GCS mamy do czynienia podczas długotrwałej steroidoterapii w warunkach *in vivo*.

7.6 GCS indukują limfocyty Treg produkujące IL-10 oraz Treg CD4/CD25+

Wpływ GCS na limfocyty Treg, a w szczególności indukcja limfocytów CD4/CD25+ w przewlekłych chorobach zapalnych, nie są dokładnie zbadane. Suárez i wsp.¹⁸⁷ wykazali, że stosowanie doustnych GCS w niskich lub umiarkowanych dawkach prowadzi do prawie dwukrotnego zwiększenia odsetka komórek CD4/CD25^{high} we krwi obwodowej u chorych na układowy toczeń trzewny (SLE - *systemic lupus erythematosus*).

Wpływ GCS na populację limfocytów regulatorowych we krwi oceniano również u chorych na astmę oskrzelową. Karagiannidis i wsp.¹⁸⁵ stwierdzili wysoki poziom ekspresji mRNA czynnika transkrypcyjnego FOXP3 oraz IL-10 w limfocytach T u chorych na astmę oskrzelową leczonych wziewnymi lub doustnymi GCS. Wykazano ponadto, że ilość FOXP3

oraz odsetek komórek CD4/CD25+ zwiększały się w kilka godzin po podaniu dawki systemowych GCS. Indukcję FOXP3+ obserwowano jednak po zastosowaniu relatywnie wysokich dawek GCS (do 150 mg/d) u chorych z nasilonymi objawami astmy (średnie FEV₁ ok. 40%).

7.7 Indukcja limfocytów CD4/CD25+ u chorych z astmą steroidozależną

W przewlekłych chorobach zapalnych (takich jak astma) frakcja komórek CD4/CD25+ może zawierać krążące aktywowane limfocyty efektorowe, poziom FOXP3 zwiększa się również przejściowo we wszystkich aktywowanych limfocytach Th,¹⁸⁸ ponadto konwersja obwodowa limfocytów naiwnych CD25- do aTreg CD25+ zwiększa się pod wpływem stymulacji antygenowej i cytokin typu Th2.¹⁸⁹ W związku z tym podstawowym kryterium jakim kierowano się przy kwalifikacji chorych do tego badania było uzyskanie najlepszej kontroli astmy (stanu zapalnego) przy optymalnych dawkach GCS. Wśród chorych włączonych do badania nie było więc osób ze znaczną obturacjąⁱ, ani zażywających GCS w dawce wyższej niż 24 mg/d metylprednizolonu.

Średni odsetek komórek CD4/CD25^{high} we krwi obwodowej u chorych z ciężką astmą steroidozależną wynosił 5,9±2,4% i był znamienne wyższy w porównaniu z astmą przebiegającą umiarkowaną (3,6±1,2%, p<0,01), astmą ciężką dobrze kontrolowaną niskimi dawkami GCS (3,9±1,3%, p<0,05) i zdrowymi ochotnikami (3,9±0,8%, p<0,05). Uzyskane wyniki są podobne do opisywanych w literaturze (5-10% CD25+, 2-6% CD25^{high}).^{56,190} Wartości procentowe CD4/CD25+ korelowały z objawami astmy i parametrami spirometrycznymi (p<0,05). Wykazano ponadto zależność pomiędzy ilością komórek CD4/CD25^{high}, a dawką stosowanych GCS (p<0,05). Wyniki te wskazują, że u chorych z astmą ciężką steroidozależną dochodzi do zwiększenia obwodowej puli komórek Treg CD4/CD25^{high} (najpewniej różnicujących w zmienionych zapalnie oskrzelach) i przedostawania się części z nich do krwi obwodowej. Indukcja aTreg w astmie zależy prawdopodobnie od (1) nasilenia zapalenia, czyli stymulacji antygenowej w oskrzelach i poziomu lokalnie wytwarzanych cytokin typu Th2 oraz (2) działania miejscowych i ogólnie stosowanych GCS. Wydaje się, że oba mechanizmy mają podobne znaczenie w procesie obwodowego różnicowania aTreg w

ⁱ <50% wartości należytnej FEV₁, przy zachowanej odwracalności

astmie i wzajemnie się uzupełniają. Przemawiają za tym dane jakie uzyskano w tej pracy i wyniki dostępne w literaturze.

Po pierwsze, w tej pracy wykazano, że wartości procentowe limfocytów CD4/CD25+ korelują z parametrami spirometrycznymi i objawami astmy (mierzonymi za pomocą dokładnego kwestionariusza ACD). Podwyższony odsetek komórek CD4/CD25+ obserwowano w innych badaniach oceniających fenotyp limfocytów krwi obwodowej w astmie. Shi i wsp.¹⁹¹ wykazali zwiększony odsetek limfocytów CD4/CD25+ u chorych z zaostrzeniami astmy, które w badaniach czynnościowych *in vitro* miały cechy typowe dla komórek regulatorowych. Podwyższone odsetki limfocytów CD4/CD25+ stwierdzano także u chorych z ciężką astmą steroidooporną.⁷³ Dodatkowo u chorych z astmą ciężką (objawową) obserwowano wysoką ekspresję FOXP3 w limfocytach krwi obwodowej.¹⁸⁵

Po drugie, najwyższe odsetki CD4/CD25+ wykazano u chorych zażywających 16-24 mg/d metyloprednizolonu. Stwierdzono również zależność pomiędzy dawką doustnych GCS, a odsetkiem komórek CD4/CD25+. Podobne wyniki uzyskali również Suarez i wsp.¹⁸⁷ u chorych z układowym toczeniem trzewnym. Indukcję frakcji komórek CD4/CD25+ pod wpływem glikokortykosteroidów, jak również zwiększenie ekspresji czynnika FOXP3 obserwowano zarówno *in vitro*^{55,59} jak i w badaniach *in vivo*.¹⁸⁵

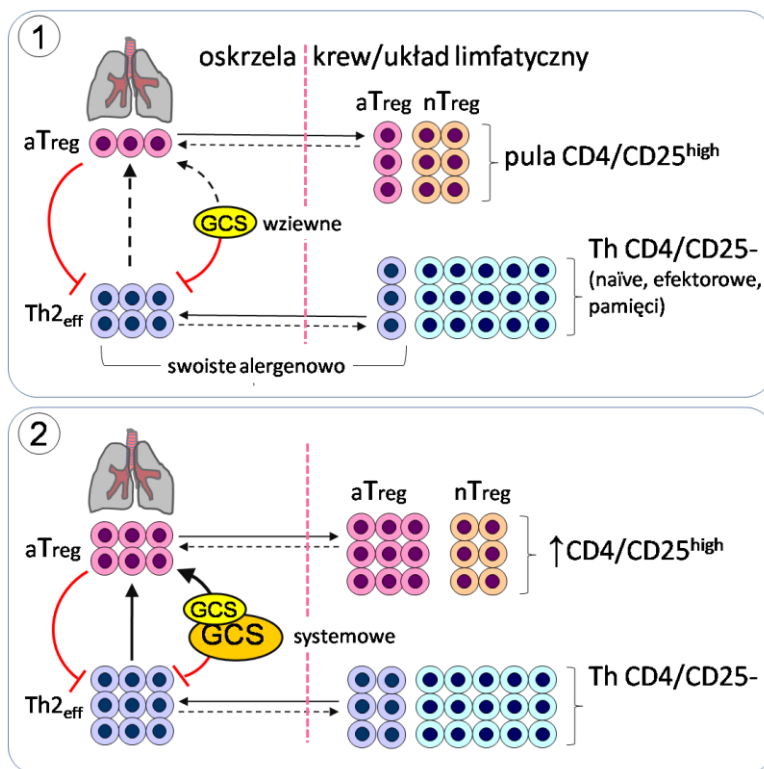
7.8 Wysoki poziom ekspresji GR α jednym z warunków indukcji Treg

Pośrednich dowodów na znaczenie GCS w indukcji Treg dostarczają wyniki pomiaru poziomu ekspresji izoform GR w limfocytach krwi. Dokładna analiza podgrup wyodrębnionych na podstawie wartości współczynnika GR α /GR β wykazała znamienne statystycznie związki ($p=0,02$) GR α /GR β z ilością limfocytów Treg. Najwyższy odsetek limfocytów CD4/CD25+ (średnio $9,2\pm 3,0\%$) oznaczono u chorych z dominującą ekspresją GR α (współczynnik GR α /GR β > 460), natomiast w grupie chorych z najwyższym poziomem ekspresji GR β (współczynnik < 125) frakcja Treg CD4/CD25+ nie przekraczała 5%. Niski poziom ekspresji izoformy GR β w limfocytach może być jednym z warunków indukcji komórek aTreg pod wpływem GCS. Wyniki te wskazują na ważną rolę GR α /GR β dla różnicowania komórek CD25+. Jest to pierwsze tego typu doniesienie, które wymaga potwierdzenia w badaniach różnych izolowanych subpopulacji limfocytów T CD4+ jak również weryfikacji w badaniach czynnościowych *in vitro*.

7.9 Czy względna steroidooporność w astmie wynika z zaburzeń różnicowania limfocytów aTreg? Fakty i hipotezy

U chorych z astmą steroidooporną obserwowano zwiększoną ekspresję GR β , między innymi w limfocytach nacieku zapalnego. Nie wiadomo jeszcze w jaki sposób wpływa to na lokalną indukcję Treg w błonie śluzowej oskrzeli. Z badań *in vitro* wiadomo jednak, że w tym typie astmy różnicowanie aTreg może być zaburzone. Hawrylowicz i wsp.¹⁹² obserwowali w astmie steroidoopornej znacznie mniejszą produkcję IL-10 w hodowlach limfocytów stymulowanych deksametazonem i słabsze różnicowanie aTreg pod wpływem GCS w modelu *in vitro*. Funkcje supresyjne deksametazonu udało się przywrócić dopiero po dodaniu IL-10 co doprowadziło w pierwszej kolejności do zwiększenia poziomu ekspresji receptora GR α !¹⁹³ Fenotyp astmy steroidoopornej wynika więc przynajmniej częściowo z nieprawidłowego różnicowania komórek regulatorowych.

Mechanizm upośledzonej wrażliwości na GCS wydaje się być różny dla astmy steroidozależnej i steroidoopornej. Przyczyną utrzymującego się stanu zapalnego oskrzeli może być w obu przypadkach ten sam mechanizm, prawdopodobnie związany ze zwiększoną produkcją i oddziaływaniem cytokin (IL-2, IL-4) lub nadmierną sygnalizacją w układzie CD40-CD40L, na co wskazują wyniki tej pracy. W warunkach typowych (np. astma z dobrą reaktywnością na GCS) zapalenie kontrolowane jest przez limfocyty regulatorowe, których część powstaje miejscowo pod wpływem GCS (Rysunek 53). W astmie steroidozależnej indukcja aTreg pod wpływem GCS nie jest zaburzona i stanowi ważny mechanizm kontroli stanu zapalnego i objawów astmy. Powodem obniżonej reaktywności (właściwie braku reaktywności) na GCS u chorych z astmą steroidooporną jest prawdopodobnie zmniejszona indukcja i nieprawidłowa funkcja komórek Treg. W tym typie astmy obserwowano zwiększoną ekspresję GR β w limfocytach krwi i niektórych komórkach nacieku zapalnego, co może zmniejszać reaktywności na GCS i hamować różnicowanie Treg. W astmie steroidozależnej ekspresja izoform GR limfocytów krwi nie jest zmieniona.



Rysunek 53. Indukcja i funkcje limfocytów CD4/CD25^{high} w astmie. Hipoteza sformułowana w oparciu o wyniki badania. **(1)** Astma umiarkowana/ciężka z dobrą kontrolą objawów. Przyczyną astmy jest zapalenie alergiczne wywołane przez swoiste alergeny limfocyty efektorowe Th2. Nasilenie stanu zapalnego kontrolują GCS i powstające lokalnie limfocyty regulatorowe aTreg. **(2)** W astmie ciężkiej steroidozależnej skuteczną kontrolę stanu zapalnego i objawów choroby można uzyskać jedynie przy stosowaniu wysokich dawek GCS. Jednym z najważniejszych efektów działania przeciwzapalnego GCS jest ułatwienie lokalnego różnicowania aTreg, co prowadzi również do zwiększenia odsetka limfocytów CD4/CD25⁺ we krwi obwodowej.

7.10 Podsumowanie

Hipoteza jaka sformułowano przed rozpoczęciem badania zakładała, że przyczyną słabej reaktywności na GCS u chorych na ciężką astmą steroidozależną jest wysoka ekspresja GR β , co może prowadzić do słabszego hamowania aktywacji i proliferacji limfocytów. Uzyskane wyniki wskazują, że możliwe jest inne wyjaśnienie tego zjawiska.

W pierwszej części pracy wykazano że GCS hamują wiele etapów aktywacji limfocytów chorych z ciężką steroidozależną astmą oskrzelową. W badaniach ekspresji receptorów pojawiających się sekwencyjnie na powierzchni aktywowanego limfocyta nie wykazano zaburzeń w hamowaniu wczesnej sygnalizacji TCR, ekspresji podjednostki α receptora IL-2R (NFAT, NF- κ B) i ekspresji receptorów zależnych od sygnalizacji ATF/CREB (MHCII). U chorych z ciężką astmą steroidozależną stwierdzono niepełne blokowanie ekspresji receptora kostymulującego CD40L, co wskazuje na pewną dysocjację działania transrepresyjnego GR (postulowana nadmierna aktywacja szlaku AP-1). W dalszych eksperymentach wykazano w tej grupie chorych znaczne zahamowanie proliferacji i dużą wrażliwość na apoptozę limfocytów krwi obwodowej. Na oba procesy dodatkowo wpływają GCS zastosowane w

wysokich dawkach *in vitro*. U chorych na astmę steroidozależną GCS skutecznie hamują aktywację limfocytów i indukują ich apoptozę.

Równocześnie zbadano ekspresję izoform GR α i GR β w komórkach PBMC krwi obwodowej. U chorych na ciężką astmę steroidozależną nie stwierdzono zaburzeń ekspresji izoform receptora GR, co wskazuje na brak istotnego wpływu GCS na podstawową ekspresję GR w warunkach *in vivo*. Dokładna analiza podgrup wyodrębnionych na podstawie współczynnika ekspresji GR α /GR β wykazała korelację między ilością funkcjonalnej izoformy α a odsetkiem komórek regulatorowych CD4/CD25^{high}. Istotnie, u chorych na astmę steroidozależną stwierdzono najwyższe ilości limfocytów CD4/CD25^{high} we krwi obwodowej.

Wyniki te wskazują, że u chorych z tym typem astmy dochodzi do zwiększenia obwodowej puli Treg, co może stanowić jeden z najważniejszych mechanizmów prowadzących do zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego i tym samym uzyskania dobrej kontroli astmy.

8 Wnioski

1. **W grupach chorych różniących się ciężkością astmy nie stwierdzono różnic w ekspresji mRNA izoform receptora GR w komórkach PBMC**, co wskazuje między innymi na brak wpływu GCS na procesy składania mRNA prowadzące do powstawania GR β .
2. **U chorych na astmę steroidozależną nie wykazano zwiększonej aktywacji i proliferacji limfocytów w testach czynnościowych *in vitro***. Przeciwnie, stosowanie przewlekłe GCS w wyższych dawkach prowadzi do znacznego zmniejszenia reaktywności na mitogeny i zahamowania proliferacji limfocytów również u chorych z astmą steroidozależną.
3. **GCS skutecznie hamują wiele etapów aktywacji limfocytów T, również u chorych na ciężką astmę steroidozależną**. Względna steroidooporność w astmie oskrzelowej nie wynika z różnic we wczesnych etapach sygnalizacji TCR, ani zaburzeń sygnalizacji IL-2/IL-2R.
4. **GCS słabiej hamują ekspresję CD40L w aktywowanych limfocytach u chorych na astmę steroidozależną**. Wynik ten może wskazywać na dysocjację w działaniu transrepresyjnym GR w tej grupie chorych i wymaga potwierdzenia metodami biologii molekularnej.
5. **GCS silnie aktywują apoptozę limfocytów T u chorych na astmę steroidozależną**. Działanie proapoptotyczne GCS wykazane w tym badaniu *in vitro* może mieć ważne znaczenie w regulacji ilości limfocytów nacieku zapalnego oskrzeli.
6. **U chorych na astmę steroidozależną dochodzi do indukcji frakcji komórek CD4/CD25^{high}**. W astmie steroidozależnej indukcja Treg nie jest zaburzona i może stanowić jeden z ważniejszych mechanizmów kontroli stanu zapalnego i objawów choroby. Uzyskanie zadowalającej kontroli objawów w astmie ciężkiej steroidozależnej wynika z synergistycznego działania wysokich dawek GCS i zwiększonej liczby limfocytów regulatorowych.

9 Streszczenie

Streszczenie

Wprowadzenie:

Objawy astmy oskrzelowej można opanować u większości chorych po zastosowaniu glikokortykosteroidów (GCS) wziewnych w połączeniu z lekami rozszerzającymi oskrzela. W przypadkach astmy ciężkiej steroidozależnej konieczne jest długotrwałe stosowanie umiarkowanych lub wysokich dawek GCS doustnych, jednak tego typu leczenie nie zawsze pozwala na uzyskanie pełnej kontroli objawów. Przyczyna zmniejszonej wrażliwości na GCS w tym typie astmy nie jest znana i może wynikać z zaburzeń reaktywności limfocytów T, nieprawidłowej regulacji odpowiedzi immunologicznej lub zmienionej ekspresji, ewentualnie funkcji receptora glikokortykosteroidowego (GR). Celem pracy było zbadanie, czy u chorych na astmę steroidozależną dochodzi do obniżenia wrażliwości limfocytów krwi na GCS i/lub zmian w ilości izoform mRNA α i β receptora GR. Oceniono również ilości krążących limfocytów regulatorowych CD4/CD25^{high}.

Metody:

Do badania włączono 25 chorych z rozpoznaniem astmy oskrzelowej ciężkiej i/lub trudnej (z najlepszą możliwą do uzyskania kontrolą choroby), 15 chorych na astmę przewlekłą umiarkowaną i 11 zdrowych ochotników. Biorąc pod uwagę nasilenie objawów klinicznych, wyniki badań spirometrycznych i rodzaj/dawki stosowanych GCS wśród chorych na astmę ciężką wyodrębniono grupę pacjentów z urzymującymi się objawami, pomimo stosowania umiarkowanych dawek GCS doustnych (astma steroidozależna, n=14). Wykorzystując techniki krótkotrwałej hodowli limfocytów izolowanych z krwi i stymulowanych mitogenem (PHA) oceniono: (1) wczesne i późne etapy aktywacji limfocytów T, oraz wpływ deksametazonu na ekspresję antygenów aktywacyjnych *in vitro* (cytometria przepływową), (2) wpływ daksametazonu na proliferację limfocytów, (3) spontaniczną i indukowaną przez GCS apoptozę limfocytów T. Poziom ekspresji izoform α i β receptora GR oznaczono we frakcji komórek jednojądrzastych krwi (PBMC) z wykorzystaniem technik qPCR. Subpopulacje limfocytów krwi, w tym CD4/CD25^{high} oznaczono za pomocą cytometrii przepływowej.

Wyniki:

W grupie chorych na astmę ciężką dominowały przypadki astmy rozpoznawanej w wieku dorosłym (*late-onset*, 68%). Częstość utrwalonej obturacji wynosiła 32% i była podobna w grupach *early-* i *late-onset*. Wśród chorych z ciężką astmą przeważały kobiety (60%). Tylko w tym typie astmy stwierdzono współwystępowanie atopii i nadwrażliwości na aspirynę. Parametry kliniczne chorych na astmę ciężką nie różniły się istotnie od wyników dużych europejskich badań populacyjnych. Stosując przyjęte kryteria (ciężkość choroby, kontrola objawów, leczenie) astmę steroidozależną rozpoznano u 56% chorych z astmą ciężką włączonych do badania.

W grupach chorych różniących się ciężkością astmy nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji izoform receptora GR w komórkach PBMC. Współczynnik GR α /GR β był bardzo wysoki (około 150-400) co wskazuje na marginalny udział izoformy β w całkowitej puli GR. Ekspresja GR β w PBMC nie zwiększa się u chorych na astmę steroidozależną.

W tej grupie nie wykazano również zwiększonej aktywacji lub proliferacji limfocytów w testach czynnościowych *in vitro*. Deksametazon wyraźnie zablokował ekspresję receptorów aktywowanych limfocytów T, aczkolwiek siła hamowania przez GCS zależała od typu ocenianego markera (silnie CD69, IL-2R i CD40L, słabiej HLA-DR). Względna steroidoporność w astmie nie wynika najpewniej z różnic we wczesnych etapach sygnalizacji TCR, ani zaburzeń sygnalizacji IL-2/IL-2R. U chorych na astmę steroidozależną stwierdzono tylko częściowe hamowanie ekspresji receptora CD40L na powierzchni limfocytów ($p < 0,05$). Wynik ten wskazuje na pewien rodzaj dysocjacji w działaniu transrepresyjnym GCS i może częściowo tłumaczyć gorszą reaktywność na GCS obserwowaną *in vivo*.

U chorych na astmę steroidozależną stwierdzono wyższy odsetek apoptotycznych limfocytów T w kilkudniowych hodowlach (apoptoza spontaniczna). Dodatkowo, właśnie w tej grupie chorych GCS najsilniej aktywowały apoptozę limfocytów T ($p < 0,05$).

U chorych na astmę steroidozależną stwierdzono najwyższe odsetki komórek CD4/CD25^{high} we krwi obwodowej (pula limfocytów Treg), w porównaniu z pozostałymi badanymi grupami ($p < 0,01$). Stwierdzono wyraźną korelację wartości procentowych CD4/CD25^{high} z ciężkością astmy, objawami subiektywnymi i wynikami badań czynnościowych płuc.

Wnioski:

Upośledzona wrażliwość na GCS w astmie steroidozależnej nie wynika z zaburzeń ekspresji izoform receptora GR, ani z nieprawidłowej reaktywności limfocytów T. Prawidłowa ilość mRNA izoform GR oraz współczynnik $GR\alpha/GR\beta$ świadczą o niezmienionej ekspresji GR u chorych leczonych przewlekłe glikokortykosteroidami i wskazują na brak wpływu GCS na procesy alternatywnego składania mRNA $GR\beta$.

Przyczyną utrzymującego się stanu zapalnego oskrzeli w astmie steroidozależnej może być podwyższona ekspresja CD40L, bądź zaburzona regulacja ekspresji tego receptora, wymaga to jednak potwierdzenia metodami biologii molekularnej.

Stwierdzono ponadto znaczne zahamowanie proliferacji i dużą wrażliwość na apoptozę limfocytów T u chorych na astmę steroidozależną. Działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne GCS wykazane w tym badaniu *in vitro* mogą mieć ważne znaczenie w regulacji ilości limfocytów nacieku zapalnego oskrzeli. Chorzy na astmę steroidozależną zachowują wrażliwość na zmiany dawek GCS, co w tym badaniu potwierdzono w wielu testach czynnościowych *in vitro*.

Zwiększony odsetek komórek $CD4/CD25^{high}$ w astmie steroidozależnej wynika najpewniej z obwodowego różnicowania zależnego od stymulacji antygenowej w miejscu stanu zapalnego (pośrednio wskazuje na to korelacja z objawami i wynikami spirometrii) oraz działania systemowych GCS (pośrednio wskazuje na to wysoki odsetek Treg w grupie leczonej najwyższymi dawkami metyloprednizolonu i w grupie z najwyższym współczynnikiem ekspresji $GR\alpha/GR\beta$). Indukcja obwodowej puli Treg w astmie ciężkiej steroidozależnej nie jest zaburzona i może stanowić jeden z najważniejszych mechanizmów prowadzących do uzyskania zadowalającej kontroli choroby.

Można stwierdzić, że opanowanie stanu zapalnego i objawów w astmie steroidozależnej wynika z synergistycznego działania wysokich dawek GCS i zwiększonej liczby limfocytów regulatorowych.

Summary

Introduction:

The symptoms of bronchial asthma can be managed in the majority of patients with inhaled glucocorticoids (GCS) and bronchodilatory drugs. In case of severe steroid dependent asthma long-term treatment with moderate or higher doses of systemic steroids is usually necessary. However, in some cases such treatment is not sufficient enough to fully control asthmatic symptoms. The cause of decreased steroid responsiveness in severe asthma is still not known. It may be the consequence of disturbed T-cell responsiveness, impaired immune regulation or altered expression/function of glucocorticoid receptor (GR). The aim of this study was to determine, whether severe steroid dependent asthma associates with decreased sensitivity of peripheral blood lymphocytes to GCS and altered amount of GR α and β mRNA isoforms. The numbers of circulating CD4/CD25^{high} regulatory T-cells were also studied.

Methods:

The studied groups included: 25 patients with confirmed diagnosis of severe and/or difficult asthma (achieving of the best possible disease control was here necessary), 15 patients with moderate chronic asthma and 11 healthy subjects. Considering the severity of clinical symptoms, lung function tests, and type/daily dose of glucocorticoids, the group of severe asthmatics was further divided into patients with sustained asthmatic symptoms despite treatment with moderate doses of oral GCS (steroid dependent asthma, n=14) and patients with very good control on low-dose oral GCS (well controlled severe asthma, n=11). The model of short-term mitogen (PHA) stimulation of peripheral blood lymphocytes in culture was used to determine: (1) early and late events of lymphocyte activation, as well as the influence of dexamethasone on the expression of activation-dependent antigens *in vitro* (flow cytometry), (2) influence of dexamethasone on lymphocyte proliferation, (3) spontaneous and GCS-induced apoptosis of T-cells. Expression levels of GR α and β isoforms were studied in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using qPCR techniques. Subpopulations of blood lymphocytes, including CD4/CD25^{high} were counted with flow cytometry.

Results:

In the severe asthma group the majority of patients were diagnosed in adult age (late-onset, 68%). Persistent airflow limitation was observed in 32% patients and the frequency was similar in early- and late-onset group. Females dominated in the severe asthma group (60%). Coexistence of atopy and aspirin-intolerance was observed only in severe asthma group. Using defined criteria (disease severity, control of symptoms, treatment) steroid dependency was diagnosed in 56% of severe asthmatics studied.

No significant difference in expression of GR isoforms was observed in groups with various asthma severity. The GR α /GR β ratio was quite high (range of 150-400), thus indicating that the contribution of β isoform in the total GR pool is only marginal. The expression of GR β in PBMC is not increased in severe steroid dependent asthma.

In this group there was no increased activation nor greater lymphocyte proliferation in *in vitro* functional tests. Dexamethasone markedly blocked the expression of T-cell activation receptors, though this inhibitory effect depended on the particular marker tested (strong in case of CD69, IL-2R, CD40L, weak in case of HLA-DR). The relative steroid unresponsiveness in asthma is not a consequence of abnormalities in early TCR signaling nor further IL-2/IL-2R signaling. In steroid dependent asthma only partial inhibition of CD40L expression was observed when incubated with dexamethasone ($p < 0,05$). This result points to possible dissociation in GCS transrepressing actions and may partially explain the weaker reactivity observed *in vivo*.

In steroid dependent patients an increased percentage of apoptotic T-cells was found in short-term lymphocyte cultures (spontaneous apoptosis). Additionally, just in this group the proapoptotic action of GCS was most potent ($p < 0,05$).

The highest percentage of peripheral blood CD4/CD25^{high} cells was observed in steroid dependent asthmatics, as compared to other studied groups ($p < 0,01$). Moreover, clear correlation between percentage of CD4/CD25^{high} and asthma severity, subjective symptoms or lung function tests was found.

Conclusions:

The decreased reactivity to GCS in steroid dependent asthma is not the consequence of impaired expression of GR isoforms, and does not result from abnormal T-cell reactivity. The proper amount of GR mRNA and GR α /GR β ratio in this type of asthma is the evidence of stable expression of GR in asthmatics treated with steroids for a long time and indicates that GCS do not influence the processes of alternative splicing of GR β .

The sustained bronchi inflammation in steroid dependent asthmatics may result from increased expression of CD40L, or from disturbed regulation of this molecule. This has to be confirmed with methods of molecular biology.

Considerable inhibition of proliferation together with high susceptibility to apoptosis were found only in steroid dependent asthma group. The proapoptotic and antiproliferative actions of GCS shown in this *in vitro* study can be of great importance in regulation of lymphocyte infiltration in diseased bronchi. Patients with steroid dependent asthma are still sensitive to the changes of glucocorticoid dose, here, such observation was also confirmed in functional *in vitro* assays.

Increased percentage of CD4/CD25^{high} cells in steroid dependent asthma is likely due to peripheral differentiation dependent on antigenic stimulation in inflamed tissue (confirmed indirectly by correlations with symptoms and spirometric results) and action of systemic glucocorticoids (that is indicated by high percentages of Treg in group with highest doses of methylprednisolon and with highest GR α /GR β ratio). The induction of peripheral Treg pool in severe asthma is not disturbed, and probably constitutes one of the most efficient mechanisms that is necessary to achieve proper asthma control.

It can be concluded that achieving of satisfactory control of inflammation together with symptom reduction in steroid dependent asthma results from synergistic action of higher doses of systemic GCS and increased numbers of regulatory lymphocytes.

.

10 Dodatki

10.1 Kwestionariusz ACD

Kwestionariusz nasilenia objawów astmy (ACD – *astma control diary*). Średnia punktacja = 0 – 6

1. Jak często ostatniej nocy budził(a) się Pan(i) z powodu objawów astmy?
 - (0) nie budziłem(am) się z powodu objawów astmy
 - (1) zbudziłem(am) się jeden raz
 - (2) zbudziłem(am) się dwa razy
 - (3) zbudziłem(am) się kilka razy
 - (4) budziłem(am) się wiele razy
 - (5) spałem(am) bardzo krótko z powodu nasilonych objawów
 - (6) nie spałem(am) z powodu ciągłych objawów
2. Jak ciężkie były objawy astmy dzisiaj rano, po wstaniu z łóżka?
 - (0) bez objawów
 - (1) bardzo łagodne
 - (2) łagodne – niewielka duszność lub kaszel
 - (3) umiarkowane (konieczne zastosowanie leku wziewnego)
 - (4) nasilone (konieczne zastosowanie leku wziewnego)
 - (5) bardzo nasilone z poprawą po lekach wziewnych
 - (6) bardzo nasilone z niewielką poprawą po lekach wziewnych
3. Jak często w ciągu dzisiejszego dnia występowały: duszność, krótki oddech lub kaszel?
 - (0) w ogóle nie było takich objawów
 - (1) bardzo rzadko i niewielkie nasilenie wymienionych objawów
 - (2) rzadko i niewielkie nasilenie
 - (3) często ale niewielkie nasilenie
 - (4) często i nasilone objawy (częste inhalacje leków rozszerzających oskrzela)
 - (5) przez większość czasu: duszność i trudności z oddychaniem
 - (6) przez większość czasu: bardzo silna duszność i trudności z oddychaniem
4. Jak często w ciągu dzisiejszego dnia odczuwał(a) Pan(i) świsty w klatce piersiowej?
 - (0) w ogóle nie było świstów
 - (1) sporadycznie, pojedyncze świsty
 - (2) rzadko i niewielkie nasilenie
 - (3) często
 - (4) bardzo często
 - (5) przez większość czasu
 - (6) przez cały czas świsty w klatce piersiowej
5. W jakim stopniu objawy astmy zaburzały w dniu dzisiejszym Pana(i) aktywność (praca, codzienne czynności) w porównaniu z bezobjawowymi okresami najlepszej kontroli choroby?
 - (0) codzienna aktywność zupełnie bez zmian
 - (1) jedynie nieznacznie ograniczona
 - (2) w niewielkim stopniu ograniczona
 - (3) umiarkowanie ograniczona
 - (4) znacznie ograniczona
 - (5) bardzo poważnie ograniczona
 - (6) skrajnie ograniczona
6. Ile razy w ciągu dnia musiał(a) Pan(i) stosować doraźnie lek wziewny rozszerzający oskrzela (inhalacje Berotec, Ventolin, Berodual ewentualnie konieczność nebulizacji Salamol, Berodual)?
 - (0) nie stosowano
 - (1) łącznie 1-2 wdechy w ciągu dnia
 - (2) łącznie 3-4 wdechy w ciągu dnia
 - (3) łącznie 5-8 wdechów w ciągu dnia
 - (4) łącznie 9-12 wdechów w ciągu dnia
 - (5) łącznie 13-16 wdechów w ciągu dnia
 - (6) ponad 16 wdechów lub nebulizacje

11 Piśmiennictwo

- ¹ Global strategy for asthma management and prevention. Revised 2006. Global Initiative for Asthma. <http://www.ginasthma.org>
- ² Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344:350-62
- ³ Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest*. 1999;104:985-93
- ⁴ Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J*. 2001;18 Suppl 34:24s-33s
- ⁵ Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105:S547-58
- ⁶ Holgate T.S., Davies D.E., Lackie P.M., Wilson S.J., Puddicombe S.M., Lordan J.L. Epithelial mesenchymal interaction in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin Immunol*. 2000;105:193-204
- ⁷ Zhang S, Smart H, Holgate ST, Roche WR. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest*. 1999;79:395-405
- ⁸ Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther*. 2006;112:474-88
- ⁹ Baldwin L, Roche W.R. Does remodelling of the airway wall precede asthma? *Paed Res Rev*. 2002;3:315-320
- ¹⁰ Moore WC, Peters SP. Severe asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:487-94
- ¹¹ Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*. 2006;368:780-93
- ¹² Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:2341-51
- ¹³ Barnes N. Most difficult asthma originates primarily in adult life. *Pediatric Resp Rev*. 2006;7:141-4
- ¹⁴ Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. 1998;339:1194-200
- ¹⁵ Jenkins HA, Cherniack R, Szeffler SJ, Covar R, Gelfand EW, Spahn JD. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest*. 2003;124:1318-24
- ¹⁶ Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:101-8
- ¹⁷ ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:744-8
- ¹⁸ Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1001-8

-
- ¹⁹ Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1532-9
- ²⁰ 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;156:737-43
- ²¹ Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*. 1996;156:4422-8
- ²² Mann BS, Chung KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res*. 2006;7:59-69
- ²³ Wenzel S. Severe asthma in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:149-160
- ²⁴ Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th Edition. Freeman WH & Co. 2002
- ²⁵ Gupta R, Jindal DP, Kumar G. Corticosteroids: the mainstay in asthma therapy. *Bioorg Med Chem*. 2004;12:6331-42
- ²⁶ Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*. 2002;16:61-71
- ²⁷ Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 1985;318:635-41
- ²⁸ Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell*. 2005;18:331-42
- ²⁹ Yudit MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*. 2002;16:1719-26
- ³⁰ Necela BM, Cidlowski JA. Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:58-61
- ³¹ Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Hache RJ, Lefebvre YA. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1025-37
- ³² Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*. 1996;271:9550-9
- ³³ Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:111-33
- ³⁴ Cheung J, Smith DF. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol*. 2000;14:939-46
- ³⁵ Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000;55:603-13
- ³⁶ Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94:557-72

-
- ³⁷ Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:51-62
- ³⁸ Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 1997;389:194-8
- ³⁹ Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 1998;12:599-606
- ⁴⁰ De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* 2003;24:488-522
- ⁴¹ Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem.* 1998;273:32312-21
- ⁴² Korhonen R, Lahti A, Hamalainen M, Kankaanranta H, Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol.* 2002;62:698-704
- ⁴³ Yang YH, Hutchinson P, Santos LL, Morand EF. Glucocorticoid inhibition of adjuvant arthritis synovial macrophage nitric oxide production: role of lipocortin 1. *Clin Exp Immunol.* 1998;111:117-22
- ⁴⁴ Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1024:124-37
- ⁴⁵ Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2005;42:71-104
- ⁴⁶ Aziz KE, Wakefield D. Modulation of endothelial cell expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by β -estradiol, progesterone, and dexamethasone. *Cell Immunol.* 1996;167:79-85
- ⁴⁷ Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:108-18
- ⁴⁸ Yang S, Zhang L. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr Vascular Pharm.* 2004;2:1-12
- ⁴⁹ Almawi WY, Melemedjian OK, Rieder MJ. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant.* 1999;13:365-74
- ⁵⁰ Distelhorst CW. Recent insights into mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis. *Cell Death Diff.* 2002;9:6-19
- ⁵¹ Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004;16:1643-56
- ⁵² Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198:1875-86
- ⁵³ Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol.* 2007;178:2018-27

-
- ⁵⁴ Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003;112:1437-43
- ⁵⁵ Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: Multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 2007 Feb 20; w druku
- ⁵⁶ Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116:2423-33
- ⁵⁷ Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195:603-16
- ⁵⁸ Peek EJ, Richards DF, Faith A, Lavender P, Lee TH, Corrigan CJ, Hawrylowicz CM. Interleukin-10-secreting "regulatory" T cells induced by glucocorticoids and beta2-agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:105-11
- ⁵⁹ Chung IY, Dong HF, Zhang X, Hassanein NM, Howard OM, Oppenheim JJ, Chen X. Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells. *Cell Immunol.* 2004;232:57-63
- ⁶⁰ Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Ciaraffa F, Scambia G, Evoli A. Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology.* 2005;116:134-41
- ⁶¹ Bateman E, Karpel J, Casale T, Wenzel S, Banerji D. Ciclesonide reduces the need for oral steroid use in adult patients with severe, persistent asthma. *Chest.* 2006;129:1176-87
- ⁶² Corrigan CJ, Shiner R, Shakur BH, Ind PW. Methotrexate therapy in asthma increases T cell susceptibility to corticosteroid inhibition. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1090-6
- ⁶³ Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:649-57
- ⁶⁴ Wenzel SE, Morgan K, Griffin R, Stanford R, Edwards L, Wamboldt FS, Rogenes P. Improvement in health care utilization and pulmonary function with fluticasone propionate in patients with steroid-dependent asthma at a National Asthma Referral Center. *J Asthma.* 2001;38:405-12
- ⁶⁵ Jayaram L, Duong M, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kamada D, Efthimiadis A, Hargreave FE. Failure of montelukast to reduce sputum eosinophilia in high-dose corticosteroid-dependent asthma. *Eur Respir J.* 2005;25:41-6
- ⁶⁶ Westbroek J, Saarelainen S, Laher M, O'Brien J, Barnacle H, Efthimiou J. Oral steroid-sparing effect of two doses of nebulized fluticasone propionate and placebo in patients with severe chronic asthma. *Respir Med.* 1999;93:689-99
- ⁶⁷ Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Pavord I, Dolovich J, Hargreave FE. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J.* 1999;13:15-21
- ⁶⁸ Szefer SJ, Leung DYM. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J.* 1997;10:1640-7

-
- ⁶⁹ Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:522-43
- ⁷⁰ Demoly P, Jaffuel D, Mathieu M, Sahla H, Godard P, Michel F-B, Bousquet J. Glucocorticoid insensitive asthma: a one year clinical follow up pilot study. *Thorax*. 1998;53:1063-1065
- ⁷¹ Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1026-32
- ⁷² Alvarez J, Surs W, Leung DY, Ikke D, Gelfand EW, Szefer SJ. Steroid-resistant asthma: immunologic and pharmacologic features. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;89:714-21
- ⁷³ Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Szefer SJ, Tsai J-J, Frew AJ, Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T cell proliferation by glucocorticoids in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1016-25
- ⁷⁴ Haczku A, Alexander A, Brown P, Assoufi B, Li B, Kay AB, Corrigan C. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: Comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93:510-19
- ⁷⁵ Spahn JD, Landwehr LP, Nimmagadda S, Surs W, Leung DYM, Szefer SJ. Effects of glucocorticoids on lymphocyte activation in patients with steroid-sensitive and steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:1073-9
- ⁷⁶ Adcock IA, Lane SJ, Brown CR, Peters MJ, Lee TH, Barnes PJ. Differences in binding of glucocorticoid receptor to DNA in steroid-resistant asthma. *J Immunol*. 1995;154:3500-5
- ⁷⁷ Matthews JG, Ito K, Barnes PJ, Adcock IA. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:1100-8
- ⁷⁸ Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Lee TH, Barnes PJ. Abnormal glucocorticoid receptor-activator protein 1 interaction in steroid-resistant asthma. *J Exp Med*. 1995;182:1951-8
- ⁷⁹ Loke TK, Mallett KH, Ratoff J, O'Connor BJ, Ying S, Meng Q, Soh C, Lee TH, Corrigan CJ. Systemic glucocorticoid reduces bronchial mucosal activation of activator protein 1 components in glucocorticoid-sensitive but not glucocorticoid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:368-75
- ⁸⁰ Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005;70:407-17
- ⁸¹ Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*. 2006;16:301-7
- ⁸² Yudit MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4319-30
- ⁸³ Zhang X, Clark AF, Yorio T. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 ;47:700-8
- ⁸⁴ Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest*. 1995;95:2435-41

-
- ⁸⁵ Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem*. 1999;274:27857-66
- ⁸⁶ Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:607-16
- ⁸⁷ Fruchter O, Kino T, Zoumakis E, Alesci S, De Martino M, Chrousos G, Hochberg Z. The human glucocorticoid receptor (GR) isoform {beta} differentially suppresses GR{alpha}-induced transactivation stimulated by synthetic glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3505-9
- ⁸⁸ de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, Chrousos GP. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med*. 1996;2:597-607
- ⁸⁹ Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, Kino T. The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol*. 2005;19:52-64
- ⁹⁰ Gougat C, Jaffuel D, Gagliardo R, Henriquet C, Bousquet J, Demoly P, Mathieu M. Overexpression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms inhibits AP-1 and NF-kappaB activities hormone independently. *J Mol Med*. 2002;80:309-18
- ⁹¹ Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM. Regulation of the human interleukin-2 gene by the alpha and beta isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;136:23-8
- ⁹² de Lange P, Koper JW, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW. Natural variants of the beta isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;153:163-8
- ⁹³ Brogan IJ, Murray IA, Cerillo G, Needham M, White A, Davis JR. Interaction of glucocorticoid receptor isoforms with transcription factors AP-1 and NF-kappaB: lack of effect of glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;157:95-104
- ⁹⁴ Burnstein KL, Jewell CM, Sar M, Cidlowski JA. Intragenic sequences of the human glucocorticoid receptor complementary DNA mediate hormone-inducible receptor messenger RNA down-regulation through multiple mechanisms. *Mol Endocrinol*. 1994;8:1764-73
- ⁹⁵ Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, Picado C. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C1324-31
- ⁹⁶ Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR Jr, Cidlowski JA. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 1997;138:5028-38
- ⁹⁷ Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DY. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med*. 2001;193:585-93
- ⁹⁸ Hecht K, Carlstedt-Duke J, Stierna P, Gustafsson J, Bronnegard M, Wikstrom AC. Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *J Biol Chem*. 1997;272:26659-64.

-
- ⁹⁹ Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor β -isoform. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:943-950
- ¹⁰⁰ Hamid AQ, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A, Wallaert B, Lafitte J-J, Chrousos GP, Szefer SJ, Leung DYM. Increased glucocorticoid receptor β in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am Resp Crit Care Med.* 1999;159:1600-1604
- ¹⁰¹ Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szefer SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP, Klemm DJ. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med.* 1997;186:1567-74
- ¹⁰² Gagliardo R, Chanez P, Vignola AM, Bousquet J, Vachier I, Godard P, Bonsignore G, Demoly P, Mathieu M. Glucocorticoid receptor α and β in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Resp Crit Care Med.* 2000;162:7-13
- ¹⁰³ Torrego A, Pujols L, Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Picado C. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:420-425
- ¹⁰⁴ Juniper EF, O'Byrne PM, Ferrie PJ, King DR, Roberts JN. Measuring asthma control. Clinic questionnaire or daily diary? *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1330-4
- ¹⁰⁵ Sharon N, Lis H. Lectins. Encyclopedia of Life Sciences. 2006, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. www.els.net
- ¹⁰⁶ Hamelryck TW, Dao-Thi MH, Poortmans F, Chrispeels MJ, Wyns L, Loris R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem.* 1996;271:20479-85
- ¹⁰⁷ Schmid I, Ferbas J, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability. *Cytometry.* 1999;35:64-74
- ¹⁰⁸ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9
- ¹⁰⁹ Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15:532-4
- ¹¹⁰ Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25:169-93
- ¹¹¹ Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002;30:503-12
- ¹¹² ten Brinke A, Sterk PJ, Masclee AA, Spinhoven P, Schmidt JT, Zwinderman AH, Rabe KF, Bel EH. Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J.* 2005;26:812-8
- ¹¹³ Heaney LG, Robinson DS. Severe asthma treatment: need for characterising patients. *Lancet.* 2005;365:974-6
- ¹¹⁴ Robinson DS, Campbell DA, Durham SR, Pfeffer J, Barnes PJ, Chung KF; Asthma and Allergy Research Group of the National Heart and Lung Institute. Systematic assessment of difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J.* 2003;22:478-83

-
- ¹¹⁵ The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J.* 2003;22:470-7
- ¹¹⁶ Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, Chung KF. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J.* 2004;24:122-8
- ¹¹⁷ Mascia K, Haselkorn T, Deniz YM, Miller DP, Bleecker ER, Borish L; TENOR Study Group. Aspirin sensitivity and severity of asthma: evidence for irreversible airway obstruction in patients with severe or difficult-to-treat asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:970-5
- ¹¹⁸ Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J.* 2000;16:432-6
- ¹¹⁹ Kupczyk M, Kuprys I, Gorski P, Kuna P. Aspirin intolerance and allergy to house dust mites: important factors associated with development of severe asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92:453-8
- ¹²⁰ Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet.* 2006;368:804-13
- ¹²¹ Hirano T. Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:3-22
- ¹²² Corrigan CJ, Bungre JK, Assoufi B, Cooper AE, Seddon H, Kay AB. Glucocorticoid resistant asthma: T-lymphocyte steroid metabolism and sensitivity to glucocorticoids and immunosuppressive agents. *Eur Respir J.* 1996;9:2077-86
- ¹²³ Leonard WJ, Kronke M, Peffer NJ, Depper JM, Greene WC. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:6281-5
- ¹²⁴ Hughes-Fulford M, Sugano E, Schopper T, Li CF, Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A. Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal.* 2005;17:1111-24
- ¹²⁵ Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin-2 receptor. *Cytokine.* 2001;14:63-77
- ¹²⁶ Brunetti M, Mascetra N, Martelli N, Ranelletti FO, Musiani P, Aiello FB. Synergistic inhibitory activities of interleukin-10 and dexamethasone on human CD4+ T cells. *Transplantation.* 2002;74:1152-8
- ¹²⁷ Batuman OA, Ferrero AP, Diaz A, Berger B, Pomerantz RJ. Glucocorticoid-mediated inhibition of interleukin-2 receptor alpha and -beta subunit expression by human T cells. *Immunopharmacology.* 1994;27:43-55
- ¹²⁸ Bianchi M, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9573-8
- ¹²⁹ Castellanos MC, Munoz C, Montoya MC, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, de Landazuri MO. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *J Immunol.* 1997;159:5463-73
- ¹³⁰ Castellanos Mdel C, Lopez-Giral S, Lopez-Cabrera M, de Landazuri MO. Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *Eur J Immunol.* 2002;32:3108-17
- ¹³¹ Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporine A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol.* 2002;169:3555-64

-
- ¹³² Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol*. 2004;65:282-90
- ¹³³ Fontes JD, Kanazawa S, Jean D, Peterlin BM. Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol*. 1999;19:941-7
- ¹³⁴ Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF, Ono SJ. Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol*. 1995;165:12-9
- ¹³⁵ van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukocyte Biol*. 2000;67:2-17
- ¹³⁶ Castle BE, Kishimoto K, Stearns C, Brown ML, Kehry MR. Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol*. 1993;151:1777-88
- ¹³⁷ Ford GS, Barnhart B, Shone S, Covey LR. Regulation of CD154 (CD40 ligand) mRNA stability during T cell activation. *J Immunol*. 1999;162:4037-44
- ¹³⁸ Lobo FM, Xu S, Lee C, Fuleihan RL. Transcriptional activity of the distal CD40 ligand promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:245-50
- ¹³⁹ Parra E, Mustelin T, Dohlsten M, Mercola D. Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter. *J Immunol*. 2001;166:2437-43
- ¹⁴⁰ Schubert LA, Cron RQ, Cleary AM, Brunner M, Song A, Lu LS, Jullien P, Krensky AM, Lewis DB. A T cell-specific enhancer of the human CD40 ligand gene. *J Biol Chem*. 2002;277:7386-95
- ¹⁴¹ Jabara HH, Brodeur SR, Geha RS. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. *J Clin Invest*. 2001;107:371-8
- ¹⁴² Jabara HH, Ahern DJ, Vercelli D, Geha RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol*. 1991;147:1557-60
- ¹⁴³ Bischof F, Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. *Cell Immunol*. 1998;187:38-44
- ¹⁴⁴ Smiley ST, Csizmadia V, Gao W, Turka LA, Hancock WW. Differential effects of cyclosporine A, methylprednisolone, mycophenolate, and rapamycin on CD154 induction and requirement for NFkappaB: implications for tolerance induction. *Transplantation*. 2000;70:415-9
- ¹⁴⁵ Szatmary Z, Garabedian MJ, Vilcek J. Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem*. 2004;279:43708-15
- ¹⁴⁶ Tsitoura DC, Rothman PB. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells. *J Clin Invest*. 2004;113:619-27
- ¹⁴⁷ Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1059-69
- ¹⁴⁸ Lane SJ, Adcock IM, Richards D, Hawrylowicz C, Barnes PJ, Lee TH. Corticosteroid-resistant bronchial asthma is associated with increased c-fos expression in monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1998;102:2156-64

-
- ¹⁴⁹ Sousa AR, Lane SJ, Soh C, Lee TH. In vivo resistance to corticosteroids in bronchial asthma is associated with enhanced phosphorylation of JUN N-terminal kinase and failure of prednisolone to inhibit JUN N-terminal kinase phosphorylation. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:565-74
- ¹⁵⁰ Thompson EB. Mechanisms of T-cell apoptosis induced by glucocorticoids. *Trends Endocrin Metabol.* 1999;10:353-8
- ¹⁵¹ Baumann S, Dostert A, Novac N, Bauer A, Schmid W, Fas SC, Krueger A, Heinzel T, Kirchhoff S, Schutz G, Krammer PH. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood.* 2005;106:617-25
- ¹⁵² Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S45-55
- ¹⁵³ Riccardi C, Cifone MG, Migliorati G. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GTR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. *Cell Death Differ.* 1999;6:1182-9
- ¹⁵⁴ Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol.* 2006;176:1695-702
- ¹⁵⁵ Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med.* 2006;203:189-201
- ¹⁵⁶ Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P, Aiello FB. Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood.* 1995;86:4199-205
- ¹⁵⁷ Lanza L, Scudeletti M, Puppo F, Bosco O, Peirano L, Filaci G, Fecarotta E, Vidali G, Indiveri F. Prednisone increases apoptosis in in vitro activated human peripheral blood T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1996;103:482-90
- ¹⁵⁸ Ho CY, Wong CK, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, Lam CW. Apoptosis and B-cell lymphoma-2 of peripheral blood T lymphocytes and soluble fas in patients with allergic asthma. *Chest.* 2002;122:1751-8
- ¹⁵⁹ Melis M, Siena L, Pace E, Gjomarkaj M, Profita M, Pirazzoli A, Todaro M, Stassi G, Bonsignore G, Vignola AM. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects. *Eur Respir J.* 2002;19:257-66
- ¹⁶⁰ Pace E, Gagliardo R, Melis M, La Grutta S, Ferraro M, Siena L, Bonsignore G, Gjomarkaj M, Bousquet J, Vignola AM. Synergistic effects of fluticasone propionate and salmeterol on in vitro T-cell activation and apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:1216-23
- ¹⁶¹ Burnstein KL, Bellingham DL, Jewell CM, Powell-Oliver FE, Cidlowski JA. Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids.* 1991;56:52-8
- ¹⁶² Pujols L, Mullol J, Perez M, Roca-Ferrer J, Juan M, Xaubet A, Cidlowski JA, Picado C. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:49-57
- ¹⁶³ Schaf MJM, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;83:37-48

-
- ¹⁶⁴ Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6865-70
- ¹⁶⁵ Christodoulouopoulos P, Leung DY, Elliott MW, Hogg JC, Muro S, Toda M, Laberge S, Hamid QA. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:479-84
- ¹⁶⁶ Bergeron C, Fukakusa M, Olivenstein R, Lemiere C, Shannon J, Ernst P, Martin JG, Hamid Q. Increased glucocorticoid receptor-beta expression, but not decreased histone deacetylase 2, in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:703-5
- ¹⁶⁷ Andersson O, Cassel TN, Gronneberg R, Bronnegard M, Stierna P, Nord M. In vivo modulation of glucocorticoid receptor mRNA by inhaled fluticasone propionate in bronchial mucosa and blood lymphocytes in subjects with mild asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:595-600
- ¹⁶⁸ Vandenbroucke II, Vandesompele J, Paepe AD, Messiaen L. Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:E68-8
- ¹⁶⁹ Li LB, Leung DY, Hall CF, Goleva E. Divergent expression and function of glucocorticoid receptor beta in human monocytes and T cells. *J Leukoc Biol*. 2006;79:818-27
- ¹⁷⁰ Boullu-Ciocca S, Paulmyer-Lacroix O, Fina F, Ouafik L, Alessi MC, Oliver C, Grino M. Expression of the mRNAs coding for the glucocorticoid receptor isoforms in obesity. *Obes Res*. 2003;11:925-9
- ¹⁷¹ Towers R, Naftali T, Gabay G, Carlebach M, Klein A, Novis B. High levels of glucocorticoid receptors in patients with active Crohn's disease may predict steroid resistance. *Clin Exp Immunol*. 2005;141:357-62
- ¹⁷² DeRijk RH, Schaaf M, Stam FJ, de Jong IE, Swaab DF, Ravid R, Vreugdenhil E, Cidlowski JA, de Kloet ER, Lucassen PJ. Very low levels of the glucocorticoid receptor beta isoform in the human hippocampus as shown by Taqman RT-PCR and immunocytochemistry. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;116:17-26
- ¹⁷³ Pedersen KB, Vedeckis WV. Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. *Biochemistry*. 2003 Sep 23;42(37):10978-90.
- ¹⁷⁴ Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia*. 2004;18:530-7
- ¹⁷⁵ Tissing WJ, Lauten M, Meijerink JP, den Boer ML, Koper JW, Sonneveld P, Pieters R. Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2005;90:1279-81
- ¹⁷⁶ Tissing WJ, Meijerink JP, Brinkhof B, Broekhuis MJ, Menezes RX, den Boer ML, Pieters R. Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. *Blood*. 2006;108:1045-9
- ¹⁷⁷ Rohatagi S, Barth J, Mollmann H, Hochhaus G, Soldner A, Mollmann C, Derendorf H. Pharmacokinetics of methylprednisolone and prednisolone after single and multiple oral administration. *J Clin Pharmacol*. 1997;37:916-25
- ¹⁷⁸ Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44:61-98
- ¹⁷⁹ Alarit ET. Lives and times of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*. 2006;20:1972-81

-
- ¹⁸⁰ Hoeck W, Rusconi S, Groner B. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment. *J Biol Chem*. 1989;264:14396-402
- ¹⁸¹ Bonnans C, Chanez P, Meziane H, Godard P, Bousquet J, Vachier I. Glucocorticoid receptor-binding characteristics in severe asthma. *Eur Respir J*. 2003;21:985-8
- ¹⁸² Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, Brunt T, de Kloet ER, Nagelkerken L. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood*. 1998;91:4255-64
- ¹⁸³ Mozo L, Suarez A, Gutierrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:406-12
- ¹⁸⁴ Wang ZY, Sato H, Kusam S, Sehra S, Toney LM, Dent AL. Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins. *J Immunol*. 2005;174:2098-105
- ¹⁸⁵ Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1425-33
- ¹⁸⁶ Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:264-9
- ¹⁸⁷ Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1512-7
- ¹⁸⁸ Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007 Feb 27; w druku
- ¹⁸⁹ Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol*. 2005;175:6107-16
- ¹⁹⁰ Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001;193:1285-94
- ¹⁹¹ Shi HZ, Li S, Xie ZF, Qin XJ, Qin X, Zhong XN. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol*. 2004;113:172-8
- ¹⁹² Hawrylowicz C, Richards D, Loke TK, Corrigan C, Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:369-70
- ¹⁹³ Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, Adikibi T, Pridgeon C, Dallman M, Loke TK, Robinson DS, Barrat FJ, O'Garra A, Lavender P, Lee TH, Corrigan C, Hawrylowicz CM. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest*. 2006;116:146-55