

Nieozynofilowe mechanizmy zapalenia astmatycznego

Noneosinophilic mechanisms of asthmatic inflammation

MARTA ROSIEK-BIEGUS, ANDRZEJ MARIUSZ FAL

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii we Wrocławiu

Streszczenie

W artykule autorzy przedstawiają rolę zapalenia nieozynofilowego w patomechanizmie astmy oskrzelowej, skupiając się przede wszystkim na udziale neutrofilów w tym procesie. Na podstawie ostatnich doniesień zostały przedstawione mechanizmy prowadzące do zapalenia neutrofilowego w błonie śluzowej oskrzeli u pacjentów chorych na astmę (szczególnie z uwzględnieniem IL-8), sposoby oddziaływania granulocytów obojętnochłonnych na komórki błony śluzowej oskrzeli (głównie poprzez uwalnianie proteinaz neutrofilowych) oraz konsekwencje z tego wynikające. W pracy koncentrujemy się także na udziale dwóch najważniejszych grup leków stosowanych w astmie: glikokortykosteroidów i β_2 -mimetyków w zapaleniu nieozynofilowym i efektach immunologicznych tych procesów.

Słowa kluczowe: *astma, neutrofil, IL-8, Toll-like-receptor*

Summary

In the article we present the role of non-eosinophilic inflammation in the pathomechanism of asthma, concentrating on the neutrophil part in this process. We discuss mechanisms underlying neutrophilic inflammation of bronchial mucosa in patients suffering from asthma based on up-to-date literature. We review the pathophysiology of the influence of neutrophils on bronchial mucosa and consequences of the process. We focus on two of the most important groups of drugs in asthma: glucocorticosteroids and β_2 -mimetics in the pathomechanism of non-eosinophilic inflammation and immunological effects of this process as well.

Key words: *asthma, neutrophil, IL-8, Toll-like-receptor*

© Alergia Astma Immunologia 2008, 13(4): 202-207

www.alergia-astma-immunologia.eu

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Andrzej Mariusz Fal
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii
ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław
tel. (71) 733 24 14, fax (71) 733 24 09, e-mail: amfal@pro.onet.pl

Wykaz skrótów:

IL – interleukina
IgE – immunoglobulina E
INF γ – interferon γ
TNF – *tumor necrosis factor* (czynnik martwicy nowotworów)
TGF – *transforming growth factor* (transformujący czynnik wzrostu)
PAF – *platelet-activating factor* (czynnik aktywujący płytki)
LTB4 – leukotrien B4
TLR – *Toll-like-receptor* (receptor Toll-podobny)
LPS – lipopolisacharyd
IRAK – *IL-1R-associated kinase* (kinaza związana z receptorem TNF)
TRAF6 – *TNF receptor-associated factor* (czynnik związany z receptorem TNF)
TAK – *TGF β -activating kinase* (kinaza aktywująca TGF β)
NIK – *Nf- κ B-inducing kinase* (kinaza indukująca Nf- κ B)
Nf- κ B – *nuclear factor κ B* (czynnik jądrowy κ B)
ECSIT – *evolutionarily conserved signaling in Toll pathways* (ewolucyjnie konserwatywne białko przekaźnictwa pośredniczące w szlaku związanym z receptorem Toll)
IKK – *I κ B kinase* (kinaza I κ B)

CXCR – *chemokine (C-X-C motif) receptor* (receptor dla chemokin z motywem C-X-C)
STAT6 – *signal transducer and activator of transcription 6* (białko przetwarzające i aktywujące transkrypcję 6)
ECP – *eosinophil cationic protein* (kationowe białko eozynofiliów)
MPO – mieloperoksydaza

Astma oskrzelowa jest chorobą szeroko rozpowszechnioną w społeczeństwie, szczególnie w krajach wysoko rozwiniętych. Obecnie na definicję astmy składają się takie czynniki, jak: odwracalny skurcz oskrzeli, przewlekłe zapalenie dróg oddechowych, nadreaktywność drzewa oskrzelowego oraz jego przebudowa (remodeling). Przyczyny tych zjawisk pozostają nie do końca poznane. W astmie atopowej skurcz oskrzeli jest spowodowany ekspozycją na alergeny, degranulacją mastocytów związaną z przeciwciałami grupy IgE, pobudzeniem grupy Th2 limfocytów z następującym eozynofilowym naciekiem zapalnym związanym z takimi mediatorami jak IL-4, IL-5 czy eotaksyna. Tak rozwinięte zapalenie alergiczne stanowi podłoże rozwoju nadreaktywności oskrzeli oraz remodelingu. Wiadomo jednak obecnie, że tylko około 50% przypadków astmy ma podłoże atopowe [1,2].

Astma a atopia

Wiele standaryzowanych badań różnych populacji udowodniło niższą niż sądzono poprzednio zależność między występowaniem astmy a występowaniem atopii [1]. Przebadano pod kątem występowania atopii i astmy grupę dzieci od 9. do 11. roku życia w Albanii i Wielkiej Brytanii. Retrospektywnie udowodniono dużą różnicę w częstości występowania świszczącego oddechu (4,4%) u dzieci albańskich i (9,7%) u dzieci brytyjskich oraz reaktywności oskrzeli indukowanej wysiłkiem (odpowiednio 0,8% i 5,4%), podczas gdy dodatnie wyniki testów skórnych nie wykazały znaczących rozbieżności w obu populacjach (odpowiednio 15,0% i 17,8%). Ponadto eliminacja mechanizmów IgE-zależnych poprzez podawanie monoklonalnych, neutralizujących przeciwciał anti-IgE jest tylko częściowo skuteczne w kontekście hamowania objawów klinicznych w astmie [3,4,5,6,7]. Podobne wnioski nasuwają badania na zwierzętach [8,9,10,11], co zdaje się potwierdzać mniejszą rolę IgE w patogenezie astmy niż dotychczas przypuszczano.

Związek zapalenia neutrofilowego z astmą

W konsekwencji, w ostatnich latach badacze skupiają się na roli w astmie innych niż eozynofile komórek. Wiele analiz wskazuje na większy udział neutrofilów, limfocytów Th1, makrofagów, a także bazofilów w patomechanizmie astmy oraz, a właściwie, szczególnie w patogenezie jej zaostrzeń, jak wykazali Ordonez i wsp. [12]. Gibson i wsp. udowodnili, że w przewlekłej astmie występują dwa rodzaje procesów zapalnych: eozynofilowy i nieeozyfilowy; z których dominującym jest ten drugi, najczęściej związany z neutrofilami i ich aktywacją indukowaną przez IL-8.

W świetle tych doniesień przyjęto nazywać astmę, w której dominującymi komórkami nacieku zapalnego oskrzeli nie są eozynofile, astmą nieeozyfilową [13,14,15,16]. Nieeozyfilowe zapalenie dróg oddechowych występuje szczególnie u tych pacjentów, u których stwierdza się ciężką – zależną od kortykosteroidów – postać choroby [13,14], a także (często) w przypadkach zaostrzeń procesu [17,18]. Podłoże i mechanizmy zapalenia nieeozyfilowego w astmie nie są do końca poznane. Ponieważ właśnie neutrofile wydają się odgrywać znamienne rolę w zapaleniu nieeozyfilowym, na nich skupia się większość prac związanych z tym tematem. Większość doniesień nie potwierdza jednak udziału granulocytów obojętnochłonnych w procesie zapalnym w łagodnej, stabilnej astmie [19,20], natomiast są dowody na ich rolę w ciężkiej postaci tej choroby [13,14], w ciężkich zaostrzeniach [21,22,23,24], u pacjentów intubowanych z powodu stanu astmatycznego oraz w przypadkach śmiertelnych [22,23,25,26]. Są jednak także publikacje sugerujące [27] zwiększoną aktywność, ale nie liczbę, granulocytów obojętnochłonnych, w łagodnej, przewlekłej astmie. Wzrost liczebności populacji neutrofilów w przewlekłej,

umiarkowanej i ciężkiej astmie należy interpretować także w kontekście przewlekłego stosowania kortykosteroidów w tych postaciach choroby. Kortykosteroidy opóźniają bowiem apoptozę neutrofilów, powodując ich akumulację. Dotychczas brakuje jednak badań jednoznacznie interpretujących wkład tego czynnika.

Patofizjologia zapalenia neutrofilowego

Wpływ na rozwój zapalenia nieeozyfilowego w astmie mogą mieć różne czynniki. Endotoksyny bakterii Gram(-) [28,29], zanieczyszczenie środowiska [30], infekcje wirusowe [31,32] i ozon [33,34,35] indukują neutrofilowe zapalenie dróg oddechowych, skurcz oskrzeli i objawy astmy. Badania Michela [36,37] wykazały związek między endotoksyną zawartą w kurzu domowym, która jest znanym, silnym czynnikiem prozapalnym, pochodzącym ze ściany komórkowej bakterii Gram ujemnych, a częstością zaostrzeń astmy u dzieci. Antygeny ulegają fagocytozie przez komórki prezentujące antygeny (głównie komórki dendrytyczne, makrofagi), które prezentują je limfocytom Th. Zapoczątkowuje to różnicowanie się komórek Th0 w Th1 pod wpływem trzech niezależnych sygnałów (prezentacji epitopu, ekspresji CD80 vs CD86 oraz zwiększonego stężenia IL-12 i INF γ) [38]. Limfocyty Th1 z kolei produkują liczne cytokiny doprowadzające do migracji neutrofilów. Chemotaktycznie na neutrofile działają też: fragmenty C5a, C3a dopełniacza, niektóre peptydy uwalniane przez bakterie jak np.: N-formylometionylleucylofenyloalanina (FMLP), cytokiny uwalniane przez monocyty i makrofagi (IL-1, TNF- α , TGF- β i przede wszystkim IL-8), LTB4 i PAF, uwalniane m.in. przez neutrofile, makrofagi, monocyty i eozynofile [39].

Uwolnienie LTB4 prowadzi do chemotaksji neutrofilów i ich interakcji ze śródbłonkiem.[40] LTB4 jest uważany, podobnie jak PAF, za jeden z potencjalnych mediatorów zaangażowanych w sekwestrację granulocytów obojętnochłonnych w astmie i POChP [41]. Wiadomo, że PAF powoduje przejściową neutropenię w krwi krążącej w efekcie istotnej neutrofilii w tkance płucnej i drzewie oskrzelowym [42,43], a następnie aktywację neutrofilów w tkankach obwodowych [42]. Zwiększoną migrację neutrofilów na obwód PAF powoduje m.in. poprzez nasilenie adhezji granulocytów obojętnochłonnych do komórek śródbłonka w mechanizmie: P-selektyna-receptor CD11b/CD18 [44,45]. Aktywacja neutrofilów zachodzi przy udziale receptorów z grupy Toll-like-receptor (TLR) i CD14 (zlokalizowanych m.in. na leukocytach i komórkach endotelium). Są one wzbudzone przez dużą liczbę związków chemicznych (np. LPS bakteryjny, LTA), a w efekcie potęgują reakcję w oskrzelach przez zaangażowanie Nf- κ B w odpowiedzi na szereg niespecyficznych sygnałów. Najlepiej poznana jest droga aktywacji Nf- κ B po pobudzeniu receptorów TLR 2 i TLR 4. Udowodniono, że receptory te aktywują kinazę związaną z receptorem IL-1 (IRAK) poprzez białko adaptorowe MyD88

[46,47,48,49,50]. Aktywacja kinazy IRAK jest w pełni zależna od białka MyD88 w przypadku receptora TLR 2, natomiast receptor TLR 4 posiada także drogę aktywacji Nf- κ B niezależną od MyD88. [51] Następnie kinaza IRAK fosforyluje białko TRAF6 (*TNF receptor-associated factor*) [52]. Przy udziale tego białka dochodzi do pobudzenia kolejno kinaz TAK (*TGF β -activating kinase*) [53,54] i NIK (*Nf- κ B-inducing kinase*) w przypadku drogi związanej z pobudzeniem TLR 4 oraz odpowiednio białek ECSIT (*evolutionarily conserved signaling in Toll pathways*) i MEKK1 po interakcji z TLR 2, które aktywują kompleks IKK (*I κ B kinase*). Czynnikiem transkrypcyjnym Nf- κ B jest związany z białkiem inhibitorowym I κ B. Po fosforylacji białka inhibitorowego przez IKK czynnik Nf- κ B zostaje uwolniony, przenika do jądra komórkowego, gdzie zwiększa transkrypcję takich czynników, jak: TNF α , IL-6, IL-12 i NO.

Rola IL-8 w zapaleniu astmatycznym

Ważną rolę w zapaleniu nieeozyfilowym odgrywa produkowana, szczególnie podczas infekcji wirusowej, przez makrofagi i komórki epitelium IL-8 [55,56]. W badaniach wydzieliny oskrzelowej pacjentów intubowanych w przebiegu ciężkiej astmy, oprócz znacznie podwyższonej liczby neutrofilów, stwierdzono 19-krotnie wyższe stężenie IL-8 w porównaniu z pacjentami intubowanymi z powodów niepulmonologicznych [12]. IL-8 jest chemotraktantem, aktywatorem, czynnikiem aktywującym i degranulującym dla neutrofilów, działając poprzez receptory CXCR1 oraz CXCR2, jak i pobudzonych IL-5 eozynofiliów. Jest głównym czynnikiem chemotaktycznym neutrofilów w płucach [57]. Bardzo istotnej obserwacji dokonali Page i wsp. [58], którzy udowodnili, że także neutrofile pod wpływem głównego białka zasadowego (MBP) eozynofiliów mogą autokrynowo produkować IL-8, co doprowadza do autoamplifikacji procesu zapalenia neutrofilowego. Granulocyty obojętnochłonne produkują także TNF-alfa, prozapalną cytokinę, która pobudza komórki epitelialne oskrzeli do produkcji IL-8, powodując analogiczny efekt. Następnymi cytokinami odpowiedzialnymi za rekrutację i aktywację neutrofilów w drogach oddechowych są także, co wykazały badania *in vivo* na szczurach, IL-17 oraz IL-1 β mająca właściwości rekrutacji neutrofilów i potęgowania efektu IL-17 [59]. Obie te cytokiny najprawdopodobniej działają pośrednio, poprzez stymulację komórek nabłonka dróg oddechowych, do produkcji czynników mobilizujących neutrofile, jak IL-6 i IL-8 [60].

Oddziaływanie neutrofilów na drogi oddechowe

Niekorzystny wpływ neutrofilów na drogi oddechowe jest uwarunkowany przede wszystkim szkodliwym wpływem wydzielanych: elastazy neutrofilowej, katepsyny G [61] oraz proteiny-3 [62,63]. Opisano co najmniej trzy mechanizmy szkodliwego działania proteinaz neutrofilo-

wych w ciężkiej ostrej astmie. Po pierwsze elastaza neutrofilowa, poprzez degranulację komórek kubkowych oraz wpływ na inne komórki wydzielnicze dróg oddechowych, powoduje znaczny wzrost wydzielania śluzu [61,64] w oskrzelach, co wiąże się z mechanizmem zależnej od neutrofilów hipersekcji w zaostrzeniu astmy. Podanie selektywnego inhibitora elastazy i proteiny-3, jakim jest ICI 200,355 [65], zapobiega takiej degranulacji. Podobnie zahamowanie obserwowano w przypadku inhibitora elastazy i katepsyny G (SLPI) [66], co łącznie dowodzi, że elastaza jest głównym czynnikiem degranulacji komórek kubkowych. Drugim mechanizmem działania neutrofilów na drogi oddechowe, jest ich zdolność do aktywacji komórek nabłonka oskrzeli oraz zwiększenia przepuszczalności naczyń poprzez wydzielanie leukotrienów, wolnych rodników tlenowych lub elastazy [67,68]. Trzecim udowodnionym sposobem działania proteaz neutrofilowych jest aktywacja eozynofiliów [61]. Liu i wsp. oczyścili eozynofile pobrane od pacjentów z atopową astmą, a następnie inkubowali je z elastazą neutrofilową i katepsyną G. Po 2h oznaczane było uwalnianie kationowego białka eozynofiliów (ECP). Było ono najwyższe po inkubacji z elastazą neutrofilową. Mniejszy efekt osiągnięto w próbkach z katepsyną G i plwociną chorych na mukowiscydozę. Autorzy sugerują, że mechanizm degranulacji eozynofiliów pod wpływem elastazy jest zależny częściowo od Ca²⁺ i włókien aktynowych, co czyni go podobnym do mechanizmu degranulacji komórek wydzielniczych dróg oddechowych, także związanego z elastazą.

Związek zapalenia neutrofilowego z glikokortykosteroidoterapią

Nie jest do końca wiadome jaki rzeczywiście wpływ na neutrofilie w drogach oskrzelowych mają glikokortykosteroidy wziewne. Wenzel i wsp. wykazali, że liczba neutrofilów wzrasta w ciężkiej steroido-zależnej astmie [13]. W pracy tej przebadano 14 chorych na ciężką postać astmy pacjentów, zależnych od wysokich dawek doustnych glikokortykosteroidów. Przeanalizowano pobrane od nich podczas bronchoskopii popłuczyny oskrzelowe (BAL) oraz biopsje ściany oskrzeli. Następnie wyniki porównano ze zdrową grupą kontrolną i pacjentami z astmą umiarkowaną. Wykazano, że odsetek eozynofiliów w BAL był największa w astmie umiarkowanej, natomiast ciężką astmę charakteryzował dwukrotnie większy odsetek neutrofilów. Podobne rezultaty wykazano w biopsjach oskrzeli. W grupie najcięższej astmy znamienne wyższe były też stężenia LTB₄ i tromboksanu. Nie wiadomo jednak, czy neutrofilia rozwija się jako pierwotny, patologiczny proces czy też, jak już wspomniano, jest to wtórne zjawisko w efekcie stosowania dużych dawek wziewnych kortykosteroidów [69]. Są badania wskazujące, że pacjenci chorzy na ciężką astmę, leczeni przez rok doustnymi glikokortykosteroidami, mają znacznie

zwiększoną liczbę oraz odsetek neutrofilów w BAL oraz w biopłatach błony śluzowej oskrzela, podczas gdy eozynofile pozostają praktycznie wyeliminowane [70]. U tych pacjentów nie stwierdzono natomiast w trakcie terapii poprawy parametrów klinicznych kontroli astmy (np. FEV1) lecz ich pogorszenie. Wiadomo, że kortykosteroidy, które mają korzystny wpływ na stłumienie procesu zapalnego zależnego od limfocytów Th2 oraz eozynofili, nie redukują liczby neutrofilów w oskrzelach [71], a nawet ją zwiększają poprzez zahamowanie ich apoptozy [69]. Z badań Wenzel i wsp. wynika również, że kortykosteroidy mogą zwiększać aktywność neutrofilów poprzez zwiększenie stężenia LTB4. Kortykosteroidy są wiodącymi lekami w leczeniu astmy oskrzelowej, jednakże w niektórych sytuacjach zwiększają one produkcję białka aktywującego 5-lipoksygenazę i mogą również dodatnio wpływać na cyklooksygenazę w komórkach będących jednocześnie pod wpływem *stem cell factor-1* (SCF-1), jak i glikokortykosteroidów [72,73]. Wenzel i wsp. wykazali podwyższony poziom tromboksanu w popłuczynach z dróg oddechowych u pacjentów pozostających na dużych dawkach kortykosteroidów. Tromboksan jest produkowany przede wszystkim przez płytki, a także makrofagi oraz monocyty i jest uważany za jeden z najsilniejszych czynników odpowiedzialnych za powstawanie nieswoistej nadreaktywności oskrzeli [74].

W badaniach mikroskopowych z biopsji oskrzeli stwierdzono zwiększoną liczbę makrofagów w próbkach pobranych od pacjentów z umiarkowaną astmą, w porównaniu z astmą ciężką i grupą kontrolną. Rola makrofagów w astmie jest bardzo słabo poznana, ale istnieją doniesienia, że mają one negatywny wpływ na toczący się przewlekły proces zapalny [75,76].

Udział beta2-agonistów w stabilizacji astmy

Trwają obecnie badania nad udziałem drugiej, równie ważnej, grupy leków stosowanych w astmie: agonistów receptora β_2 adrenergicznego, w zapaleniu nieeozyfilowym. Doniesienia *in vitro* sugerują, że długo działający beta2-agoniści mają właściwości stabilizujące neutrofile

[77]. Reid i wsp. [78] zbadali efekt salmeterolu na stężenie IL-8, liczbę neutrofilów i stężenie mieloperoksydazy (MPO – marker aktywacji neutrofilów) w przewlekłej astmie. W tym celu przebadano 45 pacjentów z przewlekłą astmą zażywających wziewne kortykosteroidy. U części pacjentów włączono salmeterol, a części dodano wziewnie flutikazon. Przed modyfikacją terapii i po 12 tygodniach oznaczono wyżej wymienione czynniki w BAL. W grupie leczonej flutikazonem stwierdzono podwyższoną liczbę neutrofilów, a stężenia IL-8 i MPO pozostały bez zmian. Natomiast wprowadzenie salmeterolu znacznie zmniejszyło stężenia IL-8 i MPO, lecz nie wpłynęło na liczbę granulocytów obojętnochłonnych. Wyniki te sugerują, że włączenie długo działającego beta2-agonisty może mieć korzystny wpływ na stabilizację astmy, dzięki zmniejszeniu produkcji interleukiny 8 i uwalniania MPO. Spadek uwalniania MPO może świadczyć o zmniejszeniu aktywności neutrofilów uzyskanej przez włączenie salmeterolu.

Podsumowanie

Astma nieeozyfilowa stanowi istotny problem zarówno z punktu widzenia nauk podstawowych, jak i kliniki. Z jednej strony nie znamy wyjaśnienia, czy ten fenotyp jest odrębną jednostką patologiczną z grupy chorób obturacyjnych, czy powstaje w efekcie długotrwałego leczenia pacjentów preparatami glikokortykosteroidów. Z drugiej strony – niezależnie od genetyki tego typu zapalenia astmatycznego i tego typu astmy, pozostaje ona istotnym problemem terapeutycznym, gdyż (jak wspomniano w tym artykule) nie poddaje się typowemu leczeniu i ma tendencję do szczególnie ciężkiego przebiegu. Wydaje się, że połączenie badań zależności międzykomórkowych w zapaleniu alergicznym z obserwacjami klinicznymi i pobieraniem materiału badawczego w coraz wcześniejszych etapach historii naturalnej astmy u poszczególnych pacjentów, pozwoli na zdefiniowanie genetyki i przynależności tej postaci astmy. W konsekwencji wpłynie to prawdopodobnie na bardziej skuteczne jej leczenie.

Piśmiennictwo

1. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*, 1999; 54(3): 268-72.
2. Pearce N, Douwes J, Beasley R. Is allergen exposure the major primary cause of asthma? *Thorax*, 2000; 55: 424-431
3. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH i wsp. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early and late phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 1828-1834.
4. Boulet LP, Chapman KR, Cote J i wsp. Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 1835-1840.
5. Fahy JV, Cockcroft DW, Boulet LP i wsp. Effect of Aerosolized Anti-IgE (E25) on Airway Responses to Inhaled Allergen in Asthmatic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 160: 1023-1027.
6. Casale TB, Bernstein IL, Busse W i wsp. Use of an anti-IgE humanized monoclonal antibody in ragweed-induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100: 110-121.
7. Milgrom H, Fick RB, Su JQ i wsp. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. *N Engl J Med*, 1999; 34: 1966-73.
8. Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB i wsp. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 4: 1344-9.
9. Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J i wsp. Development of Eosinophilic Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness Requires Interleukin-5 but Not Immunoglobulin E or B Lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 21: 480-489.

10. Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J i wsp. Anti-Interleukin 5 but not Anti-Immunoglobulin E Treatment Prevents Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Allergic Sensitization. *Am J Crit Care Resp Med.*, 1999; 160: 934-941.
11. Tournoy KG, Kips JC, Schou C i wsp. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy*, 2000; 30:79
12. Ordóñez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA i wsp. Increased Neutrophil Numbers and IL-8 Levels in Airway Secretions in Acute Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1185-1190.
13. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DYM i wsp. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation despite high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156:737-743.
14. Wenzel S, Schwartz LB, Langmack EL i wsp. 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; 160:1001-1008.
15. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G i wsp. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. 1999; 26; 353(9171): 2213-4.
16. Turner MO, Hussack P, Sears MR i wsp. Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax*, 1995; 50: 1057-1061.
17. Fahy JV, Liu J, Wong H i współ. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*, 1993; 147: 1126-1131.
18. Fahy JV, Schuster A, Ueki I i wsp. Mucus hypersecretion in bronchiectasis: the role of neutrophil proteases. *Am Rev Respir Dis*, 1992; 146: 1430-1433.
19. Cai Y, Carty Y, Henry RL i współ. Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J*, 1998; 11: 848-853.
20. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R i wsp. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992; 47:25-9.
21. Norzila MZ, Fakes K, Henry RL i wsp. Interleukin-8 Secretion and Neutrophil Recruitment Accompanies Induced Sputum Eosinophil Activation in Children with Acute Asthma *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 769-774.
22. Sur S, Crotty TB, Kephart GM i wsp. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis*, 1993; 148: 713-719.
23. Fahy JV, Kim KW, Liu J i wsp. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*, 1995; 95: 843-852.
24. Twaddell SH, Gibson PG, Carty K i wsp. Assessment of airway inflammation in children with acute asthma using induced sputum. *Eur Respir J*, 1996; 9: 2104-2108.
25. Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR i wsp. Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1991; 143: 351-357.
26. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I i wsp. Bronchial Neutrophilia in Patients with Noninfectious Status Asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 157: 394-402.
27. Ward C, Kelly CA, Stenton SC i wsp. The relative contribution of bronchoalveolar macrophages and neutrophils to lucigenin- and luminol-amplified chemiluminescence. *Eur Respir J*, 1990; 3: 1008-1014.
28. Schenker MB, Christiani D, Cormier Y I wsp. Respiratory health hazards in agriculture. Schenker MB, editor. Vol. 158. American Thoracic Society; 1998; S1: S76.
29. Douwes J, Heederik D. Epidemiologic investigations of endotoxins. *Int J Occup Environ Health*, 1997; 3(suppl): S26-31.
30. Kennedy T, Ghio AJ, Reed W i wsp. Copper-dependent Inflammation and Nuclear Factor- κ B Activation by Particulate Air Pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998; 19: 366-378.
31. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*, 1993; 16; 307: 982-986.
32. Johnston SL. The role of viral and atypical bacterial pathogens in asthma pathogenesis. *Pediatr Pulm Supp*, 1999; 18:141-3.
33. Dockery DW, Speizer FE, Stram DO i wsp. Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am Rev Respir Dis*, 1989; 139: 587-594.
34. Greer JR, Abbey DE, Burchette RJ. Asthma related to occupational and ambient air pollutants in nonsmokers. *J of Occup and Environ Med*. 1993; 35: 909-915.
35. McDonnell WF, Abbey DE, Nishino N i wsp. Long-term ambient ozone concentration and the incidence of asthma in nonsmoking adults: the AHSMOG Study. *Environ Research*, 1999; 80: 110-121.
36. Michel O, Ginanni R, Duchateau J i wsp. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy*. 1991; Jul; 21: 441-8.
37. Michel O, Kips J, Duchateau J i wsp. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 1641-6.
38. Fal AM. Immunomodulacja w leczeniu astmy i alergii. *Stand Med*. 2004; 6(supl. 20): 20-23.
39. Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F i wsp. Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem J*. 1995; 15: 751-5.
40. Busse W. The Role and Contribution of Leukotrienes in Asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 1998; 81: 17-29.
41. Felez MA, Roca J, Barbera JA i wsp. Inhaled platelet-activating factor worsens gas exchange in mild asthma. *Am. J Respir Crit Care Med*, 1994; 150: 369-373.
42. Wardlaw AJ, Chung KF, Moqbel R i wsp. Effects of inhaled PAF in humans on circulating and bronchoalveolar lavage fluid neutrophils. Relationship to bronchoconstriction and changes in airway responsiveness. *Am Rev Respir Dis*, 1990; 141: 386-392.
43. Masclans JR, Barbera JA, Macnie W i wsp. Salbutamol reduces pulmonary neutrophil sequestration of platelet-activating factor in humans. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 154: 529-532.
44. Kilgore KS, Ward PA, Warren JS. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: The roles of P-selectin and platelet activating factor. *Inflammation*, 1998; 22: 583-598.
45. Rainger GE, Rowley AF, Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: Specificity of different chemotactic agents. *Blood*, 1998; 92: 4819-4827.
46. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T i wsp. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 1998; 188: 2091-7.
47. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W i wsp. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 1997; 7: 837-47.

48. Muzio M, Natoli G, Sacconi S i wsp. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, 1998; 187: 2097-101.
49. Muzio M, Ni J, Feng P i wsp. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, 1997; 278: 1612-5.
50. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E i wsp. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 1998; 2: 253-8.
51. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K I współ. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol*, 2000; 164: 554-7.
52. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M i wsp. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 1996; 383: 443-6.
53. Irie T, Muta T, Takeshige K. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett*, 2000; 467: 160-4.
54. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A i współ. The kinase TAK1 can activate the NIK-I k B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 1999; 398: 252-6.
55. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Efthimiadis A i wsp. Asthma and Natural Colds. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158: 1178-1184
56. Corne JM, Holgate ST. Mechanisms of virus induced exacerbations of asthma. *Thorax*, 1997; 52: 380-389.
57. Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K i wsp. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res*, 1991; 17: 17-23.
58. Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA i wsp. Stimulation of neutrophil IL-8 production by eosinophil granule major basic protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 21:230-237.
59. Hoshino H, Laan M, Sjöstrand M i wsp. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 105: 143-149.
60. Linden A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J*, 2000; 15: 973-977.
61. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB i wsp. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest*, 1990; 85: 682-689.
62. Rao NV, Marshall BC, Gray BH i wsp. Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with proteinase-3. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993; 8: 612-616.
63. Renesto P, Balloy V, Kamimura T i wsp. Inhibition by recombinant SLPI and half-SLPI (Asn55-Ala107) of elastase and cathepsin G activities: consequence for neutrophil-platelet cooperation. *Br J Pharmacol*, 1993; 108: 1100-1106.
64. Kim KC, Nassiri J, Brody JS. Mechanisms of airway goblet cell mucin release: studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1989; 1:137-143.
65. Sommerhoff CP, Krell RD, Williams JL i wsp. Inhibition of human neutrophil elastase by ICI 200,355. *Eur J Pharmacol*, 1991; 193: 153-158.
66. Sallenave JM, Si-Tahar M, Cox G i wsp. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 1997; 61: 695-702.
67. Amitani R, Wilson R, Rutman A i wsp. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991; 4: 26-32.
68. Persson CGA. Role of plasma exudation in asthmatic airways. *Lancet* 1986: 1126-1129.
69. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*, 1995; 154: 4719-4725
70. Chanez, P, Paradis L, Vignola AM i wsp. Changes in bronchial inflammation of steroid (GCs) dependent asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; 153: A212.
71. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM i wsp. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 542-548.
72. Pouliot M, McDonald PP, Borgeat P i wsp. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med*, 1994; 179: 1225-1232.
73. Samet JM, Fasano MB, Fonteh AN i wsp. Selective Induction of Prostaglandin G/H Synthase I by Stem Cell Factor and Dexamethasone in Mast Cells. *J Biol Chem*, 1995; 270: 8044-8049.
74. Fujimura M, Sakamoto S, Saito M i wsp. Effect of a thromboxane A2 receptor antagonist (AA-2414) on bronchial hyperresponsiveness to methacholine in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 87: 23-27.
75. Aubas P, Cosso B, Godard P i wsp. Decreased suppressor cell activity of alveolar macrophages in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1984; 130: 875-878.
76. Gosset P, Lassalle P, Tonnel AB i wsp. Production of an interleukin-1 inhibitory factor by human alveolar macrophages from normals and allergic asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138: 40-6.
77. Anderson R, Feldman C, Theron AJ I wsp. Anti-inflammatory membrane-stabilising interactions of salmeterol with human neutrophils in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 1996; 117: 1387-1394
78. Reid DW, Ward C, Wang, N i wsp. Possible anti-inflammatory effect of salmeterol against interleukin-8 and neutrophil activation in asthma in vivo, *European Respiratory Journal*, 2003; 21: 994-999.