

# Zmiany ekspresji CD16 na monocytach krwi obwodowej u osób z astmą poddanych immunoterapii

## CD16 expression on peripheral blood monocytes in asthma patients after allergen immunotherapy

KRZYSZTOF KOWAL<sup>1/</sup>, JOANNA OSADA<sup>2/</sup>, MILENA DĄBROWSKA<sup>2/</sup>, ANNA BODZENTA-ŁUKASZYK<sup>1/</sup>

<sup>1/</sup> Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok

<sup>2/</sup> Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok

**Wprowadzenie.** Opisana w ostatnich latach subpopulacja monocytów krwi obwodowej, która posiada na swojej powierzchni receptor CD16 (CD14/CD16), charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do prezentacji antygenów i zmniejszonym wytwarzaniem przeciwzapalnych mediatorów w tym interleukiny-10. We krwi obwodowej osób z astmą oskrzelową stwierdza się większy odsetek komórek CD14/CD16.

**Cel pracy.** Ocena zmian odsetka komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej osób z alergicznym nieżytem nosa i astmą oskrzelową w trakcie immunoterapii (IT) ekstraktami alergenów roztoczy kurzu domowego.

**Materiał i metody.** Badanie przeprowadzono u 23 osób z alergicznym nieżytem nosa i łagodną astmą oskrzelową. IT otrzymywało 17 osób, podczas gdy 6 osób leczonych było jedynie farmakologicznie. 10 zdrowych osób posłużyło jako grupa kontrolna. IT przeprowadzano stosując szczepionkę Novo Helisen Depot (Allergopharma, Niemcy). Krew do badań pobierano przed rozpoczęciem oraz 3 miesiące i 12 miesięcy po rozpoczęciu IT. Cytometria przepływową wykonywana była na preparatach krwi pełnej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko CD14 i CD16 znakowanych odpowiednio FITC i PE (Pharmingen, USA).

**Wyniki.** Obserwowano istotnie wyższe odsetki komórek CD14/CD16 w krwi obwodowej osób z alergicznym nieżytem nosa i astmą oskrzelową w porównaniu do osób zdrowych. U chorych otrzymujących IT istotne obniżenie odsetka komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej występowało już po 3 miesiącach IT i zmiany te utrzymywały się po 12 miesiącach IT. Nie stwierdzono istotnych zmian odsetka komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej chorych, którzy leczeni byli jedynie farmakologicznie.

**Wnioski.** Zmiany subpopulacji monocytów mogą reprezentować jeden z mechanizmów IT odpowiedzialnych za jej korzystne kliniczne efekty obserwowane u osób z alergicznym nieżytem nosa i astmą oskrzelową. *Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 33-38*

**Słowa kluczowe:** *astma, immunoterapia, CD16*

**Introduction.** Recently described subpopulation of peripheral blood monocytes, which express CD16 (CD14/CD16), is characterized by increased antigen presenting ability but decreased production of anti-inflammatory mediators including interleukin-10 (IL-10). Increased percentage of CD14/CD16 cells has been found in peripheral blood of bronchial asthma patients.

**Aim of study.** The aim of this study was to evaluate the changes in the prevalence of CD14/CD16 cells in the peripheral blood of patients with allergic rhinitis and asthma during the course of immunotherapy (IT) with house dust mite allergen extracts.

**Material and methods.** The study involved on 23 patients with allergic rhinitis and mild bronchial asthma. 17 patients were treated with IT, while 6 patients received only pharmacotherapy. 10 healthy subjects served as negative controls. IT was performed using Novo Helisen Depot (Allergopharma, Germany). Blood was collected before therapy, 3 months and 12 months after the initiation of IT. Flow cytometry analysis was performed on the whole blood samples using monoclonal antibodies against CD14 and CD16 labeled with FITC and PE respectively (Pharmingen, USA).

**Results.** Significantly higher percentage of CD14/CD16 cells was found in the peripheral blood of patients with allergic rhinitis and asthma in comparison to healthy controls. In patients treated with IT a decrease in the percentage of CD14/CD16 cells was observed already after 3 months and the changes persisted after 12 months of IT. No significant change in the percentage of CD14/CD16 cells was observed in allergic rhinitis and asthma patients not treated with IT.

**Conclusion.** Changes in monocyte subpopulations during IT may represent one of the mechanisms of beneficial clinical effect of IT observed in patients suffering from allergic rhinitis and bronchial asthma. *Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 33-38*

**Key words:** *asthma, immunotherapy, CD16*

Jednojądrzaste komórki fagocytyjające odgrywają istotną rolę w regulacji procesu zapalnego w płucach [1,2].

Selektywna eliminacja makrofagów z dróg oddechowych powoduje u zwierząt nasiloną miejscową reakcję zapalną w odpowiedzi na dooskrzelową prowokację swoistym antygenem [3,4]. Ponadto, u zwierząt tych pojawia się również reakcja systemowa, czego nie obserwuje się u zwierząt, u których funkcja makrofagów płucnych została zachowana [3,4].

W porównaniu do osób zdrowych, u osób z astmą oskrzelową, w błonie śluzowej oskrzeli znajduje się znacznie większa liczba makrofagów, a podczas prowokacji swoistym alergenem wzrost liczby tych komórek w wartościach bezwzględnych przewyższa wzrost liczby eozynofiliów czy neutrofilów [5]. Makrofagi płucne pochodzące od osób z astmą oskrzelową różnią się zarówno fenotypowo, jak i czynnościowo w porównaniu z makrofagami ludzi zdrowych. Manifestuje się to zwiększoną ekspresją białek powierzchniowych CD16, CD32, CD23, CD18, CD54, CD44, CD71, CD80 oraz cząsteczek HLA klasy I i II [6,7,8,9]. Również uwalnianie pro-zapalnych cytokin takich jak IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$  przez te komórki jest zwiększone u osób z astmą w porównaniu z osobami zdrowymi, podczas gdy IL-10 i IL-12 są uwalniane w mniejszych ilościach [10,11,12,13]. Powyższe zmiany czynnościowo przejawiają się zwiększoną zdolnością makrofagów płucnych pochodzących od osób z astmą oskrzelową do prezentacji antygenów oraz zwiększoną zdolnością wspomagania proliferacji komórek T w odpowiedzi na stymulację mitogenem lub antygenem [14,15,16]. Wiele z tych makrofagów wykazuje cechy fenotypowe monocytów krwi obwodowej, co sugeruje, iż napływ monocytów może być odpowiedzialny za zwiększoną liczbę fagocytów jednojądrzastych w błonie śluzowej oskrzeli [5]. Monocyty krwi obwodowej stanowią heterogenną populację różniącą się morfologicznie i czynnościowo [17,18]. U osób zdrowych niewielki odsetek monocytów krwi obwodowej stanowią komórki posiadające na swojej powierzchni zarówno receptor CD14, jak i CD16 (CD14/CD16) [19,20]. Komórki te charakteryzują się zwiększoną zdolnością uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 $\beta$  czy TNF- $\alpha$  w odpowiedzi na stymulację endotoksyną, podczas gdy praktycznie nie produkują przeciwzapalnej IL-10 [19,20]. Ponadto komórki te lepiej prezentują antygen oraz lepiej stymulują proliferację limfocytów T [21]. U osób z astmą oskrzelową obserwuje się większy odsetek komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej [22,23].

Immunoterapia alergenowa wykazuje korzystny efekt kliniczny u osób z łagodną astmą oskrzelową oraz alergicznym nieżytem nosa przejawiający się między innymi zmniejszeniem odpowiedzi oskrzeli na prowokację swoistym alergenem, jak również zmniejszeniem nieswoistej nadreaktywności oskrzeli [24,25,26].

Korzystne kliniczne działanie immunoterapii alergenowej wiąże się z licznymi zmianami immunologicznymi. W trakcie immunoterapii alergenowej obserwowano wzrost stężenia swoistych IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>4</sub> w surowicy, zahamowanie typowego wzrostu stężenia w surowicy swoistych IgE w trakcie sezonu pylenia, a nawet zmniejszenie stężenia swoistych IgE w trakcie długotrwałej immunoterapii [27,28]. Wykazano, iż immunoterapia alergenowa związana jest ze zmniejszoną produkcją IL-4 i czynnika uwalniającego histaminę, a także wzrostem produkcji IFN- przez komórki T w odpowiedzi na stymulację swoistym alergenem [29,30,31]. Immunoterapia w sposób istotny wpływa na funkcję komórek efektorowych, między innymi hamuje uwalnianie histaminy i innych mediatorów przez bazofile stymulowane swoistym alergenem, czy anti-IgE [32,33,34].

Ze względu na istotny wpływ monocytów na swoistą, jak i nieswoistą odpowiedź zapalną oraz szerokie spektrum uwalnianych biologicznie czynnych substancji, w tym związków wpływających na przebudowę tkanek, ocena funkcji tych komórek zasługuje na szczególną uwagę w przewlekłych chorobach, takich jak astma oskrzelowa [1]. Komórki CD14/CD16 stanowią subpopulację monocytów istotnie różniącą się czynnościowo oraz występującą w zwiększonym odsetku u osób z astmą oskrzelową. Dlatego też postanowiliśmy zbadać, czy w trakcie immunoterapii alergenowej dochodzi do zmian częstości występowania tych komórek w krwi obwodowej.

## PACJENCI I METODY

### Pacjenci

Do badań zakwalifikowano 23 osoby w wieku 18-35 lat (26,7 $\pm$ 7,6) ze zdiagnozowaną łagodną astmą oskrzelową oraz całorocznym nieżytem nosa. Chorych kwalifikowano do badań na podstawie charakterystycznego wywiadu, dodatnich testów skórnych z alergenami *Dermaphagoides pteronyssinus* (Dp) oraz podwyższonych wartości swoistych anti-Dp IgE w surowicy. Ponadto u wszystkich chorych dooskrzelowa próba prowokacyjna z ekstraktami Dp wypadła dodatnio, spoczynkowe wartości FEV<sub>1</sub> wynosiły powyżej 70% wartości należnej, a próba nieswoistej prowokacji z histaminą wykazywała istotną nadreaktywność oskrzeli – PC<sub>20</sub> < 4mg/ml. W okresie wykonywania badań diagnostycznych i co najmniej 30 dni przed kwalifikacją do immunoterapii alergenowej chorzy nie przyjmowali żadnych doustnych ani parenteralnych leków. Objawy ze strony nosa kontrolowane były miejscowo podawanymi lekami przeciwhistaminowymi, steroidami oraz sympatykomimetykami. Objawy ze strony oskrzeli kontrolowane były wziewnymi lekami z grupy krótko działających beta-agonistów przyjmowanych w razie duszności. Na 7 dni przed rozpoczęciem immunoterapii wszyscy chorzy rozpoczęli przyjmowanie doustnych

leków przeciwhistaminowych oraz małej dawki steroidów wziewnych ( $< 400 \mu\text{g}/24 \text{ godz.}$  w przeliczeniu na beklometazon).

Z 32 osób wstępnie zakwalifikowanych do immunoterapii 8 osób zrezygnowało z przyczyn pozazdrowotnych, a u 7 osób immunoterapia musiała być przerwana ze względu na brak współpracy ze strony chorych. Osoby, które wstępnie zrezygnowały z immunoterapii alergicznej, a które otrzymały leczenie farmakologiczne odpowiadające leczeniu osób poddanych immunoterapii posłużyły jako grupa odniesienia ( $n = 6$ ).

Dodatkowo 10 zdrowych osób z ujemnymi wynikami testów skórnych z podstawowymi alergenami wziewnymi stanowiły grupę kontrolną.

### Immunoterapia

Immunoterapia przeprowadzona była u 17 osób przy użyciu ekstraktu alergenów roztoczy kurzu domowego Novo Helisen Depot (Allergopharma, Niemcy). Dawka początkowa 5 jednostek terapeutycznych (*therapeutic units*, TU) podwajana była w odstępach tygodniowych aż do osiągnięcia dawki podtrzymującej 5000 TU. Następnie dawka podtrzymująca powtarzana była co 4 tygodnie.

### Badania cytometryczne

Krew żylną pobierano do próbek z wersenianem dwupotasowym ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) w proporcji 1,5 mg wersenianu na 1 ml krwi. Bezwzględna liczbę monocytów oceniano za pomocą analizatora hematologicznego Technicon H3. Badanie wykonywano przed rozpoczęciem swoistej immunoterapii, po osiągnięciu dawki podtrzymującej oraz po 12 miesiącach immunoterapii. W celu uniknięcia bezpośredniego wpływu iniekcji krew pobierano 7-10 dni po podaniu szczepionki.

Próbki krwi wersenianowej ( $100 \mu\text{l}$ ) inkubowano ze znakowanymi przeciwciałami monoklonalnymi anty CD14-PE oraz anty CD16-FITC (Pharmingen, USA) w ilości  $10 \mu\text{l}/\text{próbkę}$  przez 15 min. w temperaturze pokojowej, a następnie przed oznaczeniem dokonywano lizy erytrocytów za pomocą preparatu Immuno Prep Lysing Solution (Coulter). Jako kontrolę stosowano odpowiednie przeciwciała idiotypowe znakowane fikoerytryną (PE) lub izotiocjanianem fluoresceiny (FITC) (Pharmingen, USA). Oznaczenia przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego Coulter Epics XL.

### Analiza statystyczna

Obliczenia wykonano przy użyciu programu statystycznego Medcalc w oparciu o test ANOVA. Wartości przedstawiono jako wartość średnią  $\pm$  odchylenie standardowe ( $x \pm \text{SD}$ ).

### WYNIKI

Średnia bezwzględna liczba monocytów we krwi obwodowej u osób z astmą i alergicznym nieżytem nosa ( $n=32$ ) wynosiła  $357 \pm 109$  komórek/ $\mu\text{l}$  i nie różniła się istotnie od średniej liczby monocytów w grupie osób zdrowych ( $p=0,73$ ) (tab. I). Nie stwierdzono także istotnych różnic pomiędzy podgrupą osób z astmą oskrzelową poddanych immunoterapii ( $n = 17$ ) a podgrupą osób leczonych wyłącznie farmakologicznie (tab. I).

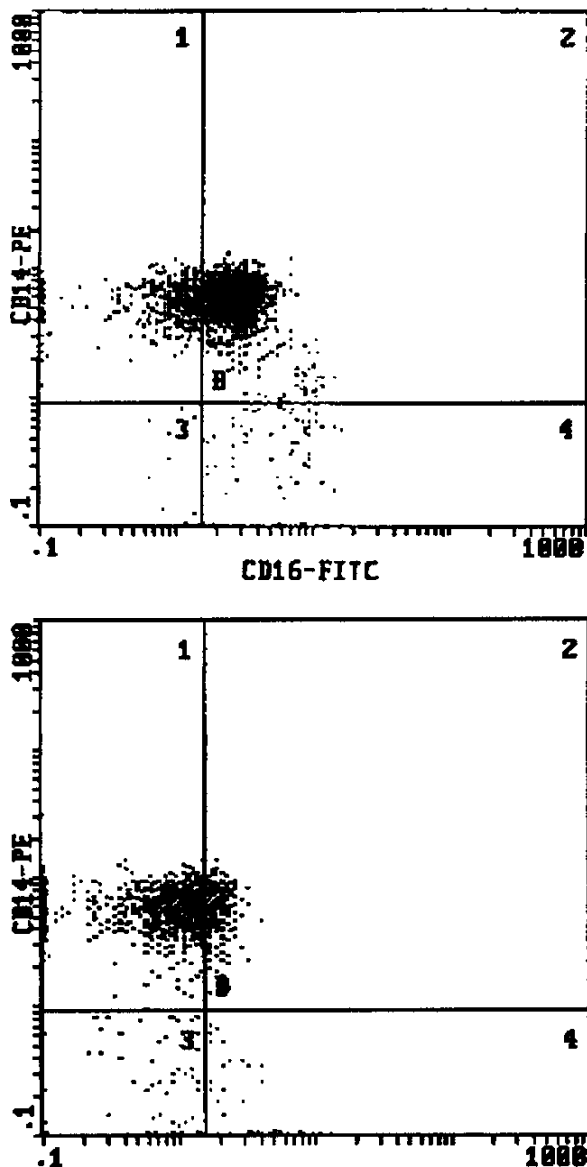
Tabela I. Liczba monocytów (bezwzględna wartość średnia  $\pm$  odchylenie standardowe) w badanych grupach

	Wartości wyjściowe (komórek/ $\mu\text{l}$ $\pm\text{SD}$ )	Po 3 mies. (komórek/ $\mu\text{l}$ $\pm\text{SD}$ )	Po 12 mies. (komórek/ $\mu\text{l}$ $\pm\text{SD}$ )
Zdrowi $n=10$	$339 \pm 71$		
Astma – wszyscy zakwalifikowani $n=23$	$357 \pm 109$		
Astma – leczeni IT $n=17$	$347 \pm 62$	$335 \pm 78$	$351 \pm 103$
Astma – nie leczeni IT $n=6$	$364 \pm 116$	$352 \pm 95$	$327 \pm 109$

Po 3 miesiącach leczenia, jak również po 12 miesiącach leczenia, nie stwierdzono istotnych różnic w bezwzględnej liczbie monocytów krwi obwodowej w poszczególnych grupach oraz istotnych różnic w tych wartościach pomiędzy poszczególnymi grupami (tab. I).

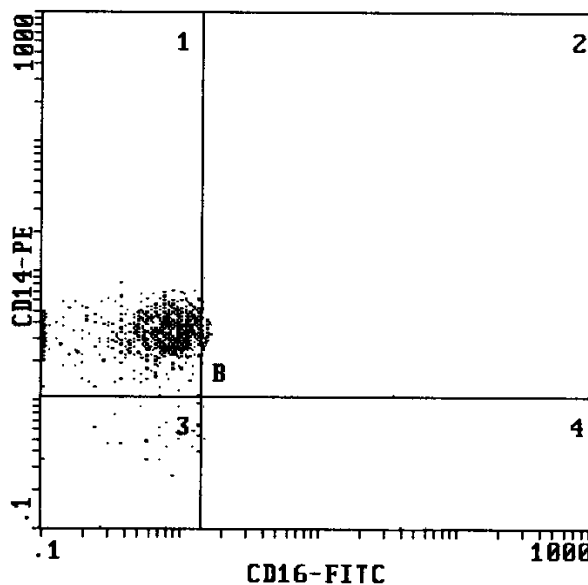
Monocyty w badaniach cytometrii przepływowej selekcjonowane były na podstawie charakterystycznych parametrów morfologicznych określających średnicę komórki (*Forward Scatter* – FS) oraz obecność ziarnistości (*Side Scatter* – SC). Ponadto rozpoznanie monocytów umożliwiło zastosowanie znakowanych przeciwciał przeciwko swoistemu markerowi błonowemu monocytów – CD14. Co najmniej 80% komórek we wszystkich grupach wyselekcjonowanych na podstawie parametrów morfologicznych wykazywało na swojej powierzchni receptor dla CD14 (ryc. 1).

W krwi obwodowej u osób zdrowych stwierdzono jedynie niewielki odsetek komórek posiadających na swojej powierzchni zarówno CD14, jak i CD16 (CD14/CD16) średnio  $7,5\% \pm 5,8\%$  (ryc. 1, 2). W całej grupie osób z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa ( $n=32$ ) obserwowano znamienne wyższy odsetek komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej, wynoszący średnio  $48,6\% \pm 13,2\%$  ( $p < 0,01$ ) (dane nie prezentowane). Powyższa wartość nie różniła się istotnie w poszczególnych podgrupach osób z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa (ryc. 2).

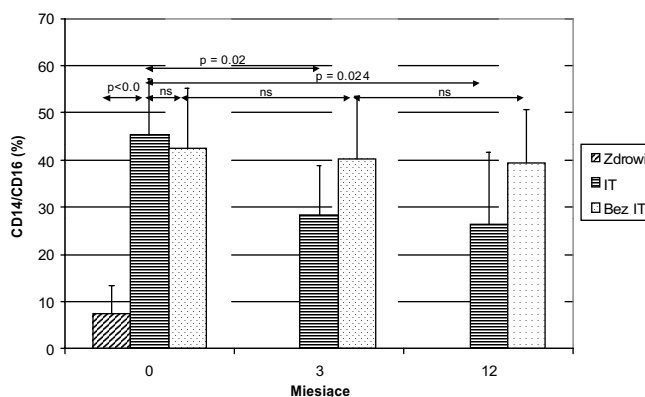


Ryc. 1a. Reprezentatywna charakterystyka cytometryczna populacji monocytów krwi obwodowej u pacjenta z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa. Rycina górna – przed immunoterapią. Rycina dolna – po 12 miesiącach immunoterapii

Po 3 miesiącach immunoterapii alergenowej tj. po okresie czasu, który w grupie osób odczulanych potrzebny był na osiągnięcie dawki podtrzymującej, zaobserwowano istotne zmniejszenie liczby komórek CD14/CD16 u osób poddanych immunoterapii alergenowej ( $n=17$ ), osiągając wartość średnią  $28,3\% \pm 10,6\%$  ( $p=0,02$ ) (ryc. 2). W grupie osób nie otrzymujących immunoterapii alergenowej nie obserwowano istotnych zmian liczby komórek CD14/CD16. Obniżona ekspresja receptora CD16 na monocytach krwi obwodowej utrzymywała się po 12 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii. Jednakże ani po 3 ani po 12 miesiącach immunoterapii odsetek komórek CD14/CD16 nie osiągnął wartości obserwowanych u osób zdrowych (ryc. 2).



Ryc. 1b. Reprezentatywna charakterystyka cytometryczna populacji monocytów krwi obwodowej u osoby zdrowej



Ryc. 2. Odsetek komórek CD14/CD16 we krwi obwodowej w badanych grupach

## DYSKUSJA

Monocyty i makrofagi odgrywają istotną rolę w regulacji przebiegu procesu zapalnego, w tym również w regulacji odpowiedzi zapalnej w drogach oddechowych [1,5,6,8]. Obserwowana zmniejszona zdolność do ograniczenia reakcji zapalnej u osób z astmą oskrzelową jest w dużej mierze związana z obecnością „nieodjrzałych” makrofagów w błonie śluzowej oskrzeli [1,5,6,14]. Prawdopodobnie spowodowane jest to zwiększonym napływem monocytów z krwi obwodowej. Ponadto same monocyty osób z astmą oskrzelową wykazują zwiększoną zdolność uwalniania prozapalnych mediatorów takich jak IL-1 $\beta$  czy TNF- $\alpha$  [10,11,17]. Jedną z subpopulacji monocytów krwi obwodowej, która wykazuje zwiększoną zdolność prezentacji antygeny oraz nie produkuje przeciwzapalnie działającej IL-10 są komórki posiadające na swojej powierzchni zarówno antygen CD14, jak i CD16 [19,20].

Niewiele dotychczas wiadomo na temat wpływu immunoterapii alergenowej na funkcje monocytów. Wstępne prace pokazują, iż ten rodzaj leczenia chorób o podłożu alergicznym wywiera istotny wpływ na fenotyp i funkcje fagocytów jednojądrzastych [35,36]. U osób uczulonych na jady owadów błonkoskrzydłych, immunoterapia swoista już po 15 dniach powodowała istotny wzrost sekrecji IL-12 i TNF- $\alpha$  przez izolowane monocyty. Powyższy efekt utrzymywał się w 45 dniu immunoterapii. [35]. U chorych z astmą oskrzelową 12-miesięczna terapia ekstraktami alergenów roztoczy kurzu domowego powodowała obniżenie produkcji IL-1 i TNF- $\alpha$  przez izolowane monocyty krwi obwodowej stymulowane *in vitro* ekstraktem *Dermatophagoides farinae* [36]. Ponadto immunoterapia ekstraktami alergenów traw u osób z sezonowym nieżytem nosa wiązała się ze zmniejszeniem ekspresji podjednostki alfa receptora IL-4 na monocytach krwi obwodowej [37]. Podobne zjawisko obserwowaliśmy u osób z alergicznym nieżytem nosa i astmą oskrzelową.

W innych chorobach o podłożu immunologicznym zmniejszenie liczby komórek CD14/CD16 związane było z osiągnięciem poprawy klinicznej w przebiegu terapii np. pod wpływem immunosupresji w wyniku działania dużych dawek kortykosteroidów. [38]

Obserwowane w naszych badaniach zmniejszenie liczby komórek CD14/CD16 sugeruje iż może być to jeden z mechanizmów działania immunoterapii alergenowej. Trudno jest jednak ocenić czy obserwowane zmiany stanowią bezpośredni wpływ immunoterapii na monocyty, czy też są wtórne do zmian obserwowanych w funkcji komórek T, B czy bazofilów. Utrzymująca się podwyższona w porównaniu z osobami zdrowymi liczba komórek CD14/CD16 po 12 miesiącach immunoterapii może również wskazywać na niepełny efekt, co z kolei zgadzałoby się z obserwowanym klinicznym efektem immunoterapii osiągającym maksimum zwykle po 3-5 latach leczenia.

## Piśmiennictwo

1. Bousquet J, Chanez P, Arnoux B i wsp. Monocytes and macrophages in asthma. w: Immunopharmacology of Allergic Diseases. Edts. Townley RG, Agrawal DK. Marcel Dekker, Inc. New York, 1996.
2. Toews GB, Vial WC, Dunn MM i wsp. The accessory cell function of human alveolar macrophage in specific T cell proliferation. J Immunol 1984; 132: 181-186.
3. Thepen T, van Rooijen N, Kraal G. Alveolar macrophage elimination *in vivo* is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. J Exp Med 1989; 170: 499.
4. Holt PG, Oliver J, Bilyk N i wsp. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. J Exp Med 1993; 177: 397-407.
5. Poston RN, Chanez P, Lacoste JY i wsp. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. Am Rev Respir Dis 1992; 145: 918-921.
6. Viksman MY, Liu MC, Bickel CA i wsp. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. Evidence for activation of alveolar macrophages, but not peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and asthma. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 858-863.
7. Chanez P, Vignola AM, Lacoste P i wsp. Increased expression of adhesion molecules (ICAM-1 and LFA-1) on alveolar macrophages from asthmatic patients. Allergy 1993; 48: 576-580.
8. Lensmar C, Prieto J, Dahlen B i wsp. Airway inflammation and altered alveolar macrophage phenotype pattern after repeated low-dose allergen exposure of atopic asthmatic subjects. Clin Exp Allergy 1999; 29: 1632-1640.
9. Williams J, Johnson S, Mascali JJ i wsp. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. J Immunol 1992; 149: 2823-2829.
10. Ackerman V, Marini M, Vittori E i wsp. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms and level of airway hyperresponsiveness. Chest 1994; 105: 687-696.
11. Borish L, Mascali JJ, Dishuck J i wsp. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1b in asthma. Inhibition with corticosteroids. J Immunol 1992; 149: 3078-3082.
12. John M, Lim S, Seybold J i wsp. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-g release from alveolar macrophages in asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 256-262.
13. Naseer T, Minshall EM, Leung DYM i wsp. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 845-851.
14. Aubas P, Cosso B, Godard Ph i wsp. Decreased suppressor cell activity of alveolar macrophages in bronchial asthma. Am Rev Respir Dis 1984; 130: 875-878.
15. Burastero SE, Magnani Z, Confetti C i wsp. Increased expression of CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous Th2 lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 1136-1142.
16. Tang C, Ward C, Reid D i wsp. Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to Th2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 863-870.
17. Ferro TJ, Kern JA, Elias JA i wsp. Alveolar macrophages, blood monocytes, and density-fractionated alveolar macrophages differ in their ability to promote lymphocyte proliferation to mitogen and antigen. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 682-687.
18. Zembala M, Uracz W, Ruggiero I, Mytar B i wsp. Isolation and functional characteristics of FcR+ and FcR-human monocyte subsets. J Immunol 1984; 133: 1293-1299.
19. Loms-Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M i wsp. The novel subset of CD14/CD16 blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. Eur J Immunol 1993; 23: 2053-2058.
20. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H i wsp. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: A polymerase chain reaction analysis. Blood 1996; 87: 373-377.

21. Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. CD14+/CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1872-1883.
22. Kowal K, Złotnik I, Osada J, Dąbrowska M, Bodzenta-Lukaszyk A. Ekspresja białek powierzchniowych na monocytach krwi obwodowej u osób z zaostrzeniem dychawicy oskrzelowej leczonych prednizonem. *Alergia Astma Immunologia* 2001; 6: 39-43.
23. Rivier A, Pene J, Rabesandratana H i wsp. Blood monocytes of untreated asthmatics exhibit some features of tissue macrophages. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 314-318.
24. Kohno Y, Minoguchi K, Oda N i wsp. Effect of rush immunotherapy on airway inflammation and airway hyperresponsiveness after bronchoprovocation with allergen in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 927-934.
25. Grembiale RD, Camprota L, Naty S i wsp. Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitic individuals with bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2048-2052.
26. Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: Clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 709-722.
27. Peng Z, Nacleiro RM, Norman PS i wsp. Quantitative IgE and IgG subclass responses during and after long term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 519-529.
28. Lichtenstein LM, Ishizaka K, Norman PS i wsp. IgE antibody measurement in ragweed hay fever: relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973; 52: 472-482.
29. Secrist H, Chelen CJ, Yan W i wsp. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178: 2123-2130.
30. Kuna P, Alam R, Kuzminska B i wsp. The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histamine-releasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma: Results of a double-blind placebo-controlled randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 816.
31. Varney VA, Hamid QA, Gaga M i wsp. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 1993; 92: 644-651.
32. Pruzansky JJ, Patterson R. Histamine release from leukocytes of hypersensitive individuals II. Reduced sensitivity of leukocytes after injection therapy. *J Allergy* 1967; 39: 44-50.
33. Chyrek-Borowska S, Kuczevska B, Rogalewska A i wsp. Immunologic histamine release from isolated human basophils during specific immunotherapy. *Agents Actions* 1986; 18: 176-177.
34. Brunet C, Bedard PM, Lavoie A i wsp. Allergic rhinitis to ragweed pollen. I. Reassessment of the effects of immunotherapy on cellular and humoral responses. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 76-86.
35. Magnan A, Marin V, Mely L i wsp. Venom immunotherapy induces monocyte activation. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1303-1309.
36. Wang JY, Ley HY, Hsieh KH. The effect of immunotherapy on interleukin-1 and tumor necrosis factor production of monocytes in asthmatic children. *J Asthma* 1992; 29: 193-201.
37. Grzela K, Grzela M, Lazarczyk D i wsp. CD124 on monocytes in grass pollen allergy. *Allergy* 2001; 57: 254-255.
38. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R i wsp. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 501-506.