

JANUSZ PATKOWSKI¹, KRZYSZTOF WYTRYCHOWSKI¹, ANNA JONKISZ², GRAŻYNA NADOBNA¹,
TADEUSZ DOBOSZ²

Ekspresja mRNA receptorów histaminowych typu H₁ i H₂ w limfocytach krwi obwodowej w astmie wrażliwej i odpornej na glikokortykosteroidy

Expression of Histamine H₁ and H₂ Receptor mRNA on Peripheral Blood Lymphocytes Glucocorticosteroid Sensitive and Resistant Asthma

¹ Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM we Wrocławiu

² Katedra Medycyny Sądowej, Zakład Technik Molekularnych AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Patomechanizm astmy kortykosteroidoodpornej (kso) jest wieloczynnikowy. Decydujące znaczenie ma zwiększona aktywność komórek, licznych cytokin i czynników transkrypcyjnych biorących udział w późnej reakcji astmatycznej, utrzymująca się, mimo stosowania dużych dawek kortykosteroidów. Wpływ histaminy i jej receptorów na patogenezę astmy kso nie jest bliżej poznany.

Cel pracy. Porównanie ekspresji mRNA dla receptora histaminowego typu 1 (H₁R) i 2 (H₂R) na limfocytach chorych na astmę kortykosteroidowrażliwą (ksw), astmę kortykosteroidoodporną oraz u zdrowych osób.

Materiał i metody. Badanie przeprowadzono u 35 osób: 12 pacjentów chorych na astmę ksw, 12 na astmę kso i 11 zdrowych osób. Diagnostykę astmy kso oparto na doustnym teście z prednizolonem według Carmichaela oraz teście wazokonstrykcji skórnej według McKenzie i Staughtona. Izolację limfocytów z krwi obwodowej przeprowadzono metodą Zemana. Ocenę ilościową ekspresji mRNA dla H₁R i H₂R na limfocytach przeprowadzono techniką RT-PCR z użyciem zestawu Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer, Mannheim, Niemcy). Zastosowano znakowane barwnikami fluorescencyjnymi startery, a wynik wyrażano w jednostkach RFU.

Wyniki. Wykazano statystycznie istotne ($p < 0,05$) zwiększenie ekspresji mRNA H₁R i H₂R w grupie chorych na astmę ksw i kso w porównaniu do ekspresji obserwowanej u zdrowych osób. Ekspresja mRNA H₂R była o 35% niższa w grupie kso w stosunku do chorych na astmę ksw. Stosunek H₁R/H₂R był największy w grupie pacjentów chorych na astmę kso.

Wnioski. Przeprowadzone badania wskazują na istotny udział histaminy przez H₁R we wczesnej reakcji astmatycznej u pacjentów z ciężką kortykosteroidozależną astmą (ksw i kso). Zmniejszenie ekspresji mRNA receptorów H₂ u chorych na astmę kso i duży stosunek H₁R/H₂R sugeruje, że osłabienie działania supresyjnego histaminy odgrywa rolę w patogenezie astmy kso (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 4, 703–709).

Słowa kluczowe: ekspresja mRNA receptorów histaminowych H₁ i H₂, astma kortykosteroidoodporna.

Abstract

Background. Mechanisms of corticosteroid-resistant (CR) asthma are multiple. The characteristic feature of CR asthma is an increased activity of cells, cytokines and transcription factors involved in the late asthmatic reaction despite high doses of glucocorticosteroids. Influence of histamine and its receptors on early asthmatic reaction in CR asthma is not understood.

Objectives. The aim of the study was to compare expression of histamine receptors 1 (H₁R) and histamine receptors 2 (H₂R) mRNA in lymphocytes from patients with corticosteroid-sensitive (CS) and corticosteroid-resistant (CR) asthma and healthy subjects.

Material and Methods. The study was performed in a group of 35 subjects: 12 patients with CS asthma, 12 patients with CR asthma and 11 healthy volunteers. CR asthma was diagnosed using oral prednisolone test according to Carmichael and vasoconstrictor assay according to McKenzie and Staughton. Lymphocytes were isolated from periphe-

ral blood according to Zeman method. Quantitative expression of H₁R and H₂R mRNA in lymphocytes was performed using RT-PCR reaction (TitanTM One Tube RT-PCR System, Boehringer, Mannheim, Germany). Primers labeled by fluorescent dyes were used and intensity of fluorescence was expressed as RFU (relative fluorescent units).

Results. Expression of H₁R and H₂R mRNA in CS and CR asthmatics was significantly higher ($p < 0.05$) compared to the control group. Expression of H₂R mRNA in CR asthmatics was 35% lower than in control group. H₁R/H₂R ratio was highest in patients with CR asthma.

Conclusions. We concluded that histamine through H₁ receptors plays important role in early asthmatic reaction in patients with severe corticosteroid-dependent asthma (CS and CR). Diminished expression of H₂R mRNA in CR group and high H₁R/H₂R ratio suggests that impaired suppressive effect of histamine plays a role in pathogenesis of CR asthma (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 703–709).

Key words: histamine receptors 1 and 2 mRNA expression, corticosteroid-resistant asthma.

Astma oskrzelowa jest chorobą o złożonym patomechanizmie, z dominującym udziałem procesu przewlekłego zapalenia alergicznego, o zróżnicowanym przebiegu klinicznym i skłonnością do zaostrzeń. Około 5–10% chorych stanowią przypadki astmy ciężkiej wymagające stałego leczenia systemowymi glikokortykosteroidami (gks) – astma kortykosteroidozależna [1, 2]. W tej grupie chorych w około 10% występują przypadki oporności na kortykosteroidy – tzw. astma kortykosteroidooporna – astma kso [3]. Astma kso jest nadal trudnym problemem diagnostycznym i terapeutycznym. Zdecydowana większość chorych jest obciążona powikłaniami wynikającymi z przewlekłej terapii gks, których skutki uboczne przewyższają niekiedy objawy samej astmy i znamienne obniżają jakość życia [4].

Patomechanizm astmy kso jest związany przede wszystkim z niezwykle wzmożoną aktywnością komórek zapalnych biorących udział głównie w późnej reakcji astmatycznej, powodujących duże stężenie mediatorów, prozapalnych cytokin i czynników transkrypcyjnych. W badaniach *in vitro* [5] wykazano, że do zahamowania aktywności cytokin (IL-2, INF- γ) wyzwalanych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na astmę kso, konieczne jest zastosowanie 100–1000-krotnie większych stężeń gks w stosunku do komórek pochodzących od chorych na astmę kortykosteroidowrażliwą (ksw).

Badania nad patomechanizmem astmy kso są trudne i podlegają różnym modyfikacjom w miarę postępu wiedzy. Od około 10 lat podkreśla się znaczenie czynników transkrypcyjnych (głównie białka aktywatorowego AP-1 i białka NF- κ B) w indukowaniu zjawiska oporności na gks [6, 7]. Białka te wykazują niezwykle silne działanie prozapalne. W astmie kso w wyniku zahamowania białka inhibitorowego dla AP-1 i NF- κ B, dochodzi do dużego stężenia tych czynników w komórkach. Jednocześnie zdecydowana większość receptorów dla gks (GR), wiążąc się z czynnikami transkrypcyjnymi, nie może połączyć się ze swoistymi czynnikami odpowiedzi glikokortykosteroidowej – GRE

(*glucocorticosteroid response element*) i kontrolować proces zapalenia [8].

W świetle najnowszych doniesień według Leunga i Blooma [9] wyróżnia się istnienie dwóch typów astmy kso. Typ pierwszy jest zaburzeniem nabytym i może go wyzwać wieloletnia niekontrolowana steroidoterapia, czynniki infekcyjne lub przedawkowanie β_2 -agonistów; dotyczy aż 95% chorych na astmę kso. Obejmuje także wszystkie przypadki tzw. wtórnej kortykosteroidooporności. Obserwacje Andersona [10] nad mechanizmem typu *down regulation* wykazały, że długotrwałe stosowanie dużych dawek gks prowadzi do istotnego zmniejszenia syntezy mRNA dla GR. Typ drugi, dotyczący około 5% chorych na kso, ma charakter uogólniony i jest związany z mutacją genu dla GR lub genów modulujących funkcje GR [10]. Można więc przyjąć, że patomechanizm astmy kso jest wieloczynnikowy, co znajduje potwierdzenie w obrazie klinicznym. Zdecydowana większość badań nad patomechanizmem astmy kso dotyczy oceny aktywnego procesu zapalenia alergicznego z udziałem komórek docelowych (limfocytów T, monocytów i eozynofiliów) wytwarzających prozapalne cytokiny i leukotrieny, głównie w późnej reakcji astmatycznej. Nie jest natomiast bliżej poznany wpływ histaminy – głównego mediatora wczesnej reakcji astmatycznej – w patogenezie astmy kso.

Histamina zależnie od stężenia i typu stymulowanego receptora, wywiera wpływ prozapalny za pośrednictwem receptora typu H₁ [11]. Supresyjne natomiast wpływa na odpowiedź immunologiczną (działanie immunomodulujące i przeciwzapalne) przez receptor H₂ [11, 12]. Niektóre wcześniejsze dane eksperymentalne zakładały, że w drogach oddechowych u osób zdrowych istnieje stan wzajemnej równowagi między reaktywnością receptorów H₁ i H₂, co miało zapewniać prawidłową funkcję i stan drożności drzewa oskrzelowego. W późniejszych badaniach eksperymentalnych wykazano, że w astmie atopowej wzrastała ekspresja receptorów H₁, co mogło się przyczyniać do nasilenia stanu zapalnego i nadreaktywności oskrzeli [13].

Aktywacja komórek zapalnych (swoista lub nieswoista) przejawia się wzrostem ekspresji receptorów histaminowych. Zjawisko to obserwowano zarówno na limfocytach, neutrofilach, jak i mastocytach [12, 14].

W astmie kso zagadnienia te nie były przedmiotem szerszych badań. We wcześniejszych wstępnych badaniach własnych nad ekspresją receptorów histaminowych na limfocytach i neutrofilach u chorych na astmę kso i ksw wykazano znacznie niższą ekspresję tylko na neutrofilach – w porównaniu z osobami zdrowymi. Wyniki tych badań wobec zastosowanej wtedy nieswoistej metodyki były niejednoznaczne [15, 16].

Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz korzystając z rozszerzenia technik badawczych o zjawiska molekularne (w 1991 r. ludzkie receptory histaminowe zostały sklonowane), stało się możliwe zastosowanie techniki RT-PCR w badaniach funkcji histaminy przez wszystkie znane 4 typy receptorów.

Celem podjętych badań jest analiza ekspresji receptorów histaminowych typu H₁ i H₂ w limfocytach krwi obwodowej w grupie chorych na astmę ksw i kso. Kortykosteroidy z uwagi na silne działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne pozostają nadal najskuteczniejszymi lekami w leczeniu ciężkich postaci astmy oskrzelowej. Oporność na tę grupę leków powoduje znaczne trudności w leczeniu astmy kso. Autorzy zakładają również, że ocena ekspresji mRNA receptorów typu H₁ i H₂ pozwoli na uzyskanie optymalnej odpowiedzi odnośnie do znaczenia histaminy w patogeniezie astmy kso. Badania te są pionierskimi obserwacjami w astmie odpornej na steroidy.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w grupie 11 osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną (z ujemnym wywiadem osobniczym i rodzinnym w kie-

runku alergii) oraz 24 chorych na astmę z umiarkowaną i ciężką postacią astmy kortykosteroidozależnej (ksz), z których 12 osób to chorzy na astmę wrażliwą na gks (ksw) oraz 12 chorych na astmę oporną na gks (kso). Łącznie badaniom poddano 35 osób. Wszyscy zakwalifikowani do badań chorzy, zgodnie z aktualnymi kryteriami konsensusu Międzynarodowej Grupy Ekspertów, byli zaliczani do grupy chorych na astmę umiarkowaną i ciężką. Przez ponad 10 lat byli poddawani ciągłej systemowej terapii gks, a czas trwania choroby wynosił ponad 15 lat. Ogólną charakterystykę badanych osób przedstawiono w tabeli 1.

Poza rutynowym badaniem fizykalnym u wszystkich chorych prowadzono systematyczne badania spirometryczne – FEV₁ (aparatem Jaeger-Flowscreen) oraz pomiary porannego przepływu wydechowego (PEF). Kryterium diagnostyczne odnośnie do weryfikacji chorych na astmę wrażliwych i opornych na terapię gks przeprowadzono na podstawie dwutygodniowego testu z doustnym prednizonem według Carmichaela w modyfikacji Browna [17, 18] oraz dodatkowo testu kurczliwości naczyń skórnych według McKenzie i Staughtona [19], którego przydatność potwierdzono w badaniach własnych [20]. Porównując wiek chorych, czas trwania choroby oraz średnią dawkę gks w przeliczeniu na prednizon, nie stwierdzono statystycznej istotności różnic w stosunku do chorych na astmę ksw i kso (tab. 1).

Izolację limfocytów z krwi obwodowej (komórki o kluczowym znaczeniu w reakcjach alergicznych) przeprowadzono powszechnie stosowaną metodą Zemana [21]. Krew pobierano z żyły łokciowej do probówki zawierającej heparynę (10 j./ml), izolując komórki na gradiencie Gradi-solu G. Z frakcji komórek jednojądrzastych usuwano monocyty, posługując się metodą płytkową. Po ukończeniu izolacji sprawdzano żywotność ko-

Tabela 1. Charakterystyka badanych pacjentów

Table 1. Characteristic of studied patients

Grupa badana (Studied group)	K/M F/M	Wiek – lata (Age – years)		Czas trwania astmy – lata (Asthma duration – years)		Czas trwania steroidoterapii – lata (Duration of cortico- steroid therapy – years)		Średnia dzienna dawka prednizonu (Mean daily prednisone dose) mg	
		x	±SD	x	±SD	x	±SD	x	±SD
Astma ksw (CS asthma)	7/5	45,4	17,7	19,4	11,4	11,4	5,6	13,75	2,3
Astma kso (CR asthma)	8/4	43,3	10,8	17,2	7,2	12,4	5,2	17,1	7,5
Kontrola (Control)	6/5	43,8	16,2						

mórek błękitem trypanu, która była bardzo duża i wynosiła około 98%.

Bezpośrednio po etapie izolacji przystępowano do wieloetapowej oceny ekspresji mRNA dla receptorów H_1 i H_2 na wyizolowanych limfocytach. Dokonywano izolacji całkowitego RNA każdorazowo z 5×10^6 komórek, metodą trizolową (Tri Reagent™ LS, Sigma), posługując się firmowym protokołem postępowania. Reakcję odwrotnej transkrypcji z RNA na komplementarny DNS (cDNA) i polimerazową reakcję łańcuchową RT-PCR przeprowadzono używając zestawu Titan™ One Tube RT-PCR System (Boehringer, Mannheim, Niemcy), stosując się ściśle do instrukcji producenta. Znakowane barwnikami fluorescencyjnymi startery (jeden z pary – sens) zamówiono w firmie Bionovo, BioResearch Equipment and Biochemical (Legnica) dla receptora histaminowego typu H_1 : sens 5'-JOE (6-karboksy-4',5'-dichloro-2'7'-dimetoksyfluoresceiny), a dla receptora typu H_2 : sens 5'-6-FAM (6-karboksyfluoresceiny). U każdej badanej osoby wykonywano jednocześnie oznaczenie ekspresji mRNA dla receptorów histaminowych (HR): H_1R , H_2R . Amplifikację cDNA przeprowadzono w termocyklerze (Termoreaktor DTC – 15, Hiperon s.c., Sieradz) przez 35 cykli reakcji powielania (30 s 94°C, 30 s 53°C, 30 s 68°C).

Analizę instrumentalną przeprowadzono za pomocą analizatora genetycznego ABI Prism 310. Wykorzystywano oprogramowanie GeneScan wersja 3.1:

a) 1,5 µl produktu reakcji RT-PCR łączono z 20 µl formamidu, następnie poddawano termicznej denaturacji przez 3 min w temperaturze 95°C,

b) po termicznej denaturacji rozdzielano produkty w płynnym polimerze akrylamidowym. POP4 z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej na analizatorze ABI Prism 310,

c) wielkość oznaczonego wskaźnika powierzchni pod krzywą (*peak area*) – dla barwnika fluorescencyjnego, który znakuje odpowiedni starter, automatycznie wyznaczaną liczbowo w jedno-

stkach RFU (*relative fluorescence units*) traktowano jako miarę aktywności badanego genu.

Projekt uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, obliczając średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe. Istotność różnic między średnimi arytmetycznymi określano, posługując się testem t-Studenta, przyjmując poziom istotności dla $p < 0,05$.

Wyniki

Zestawienie porównawcze wartości średnich ekspresji mRNA receptorów histaminowych typu H_1 i H_2 u osób zdrowych oraz w grupie chorych na astmę ksw i astmę kso przedstawiono w tabeli 2 i na rycinie 1. W grupie osób zdrowych średnia ekspresja mRNA H_1R wynosiła $32,6 \pm 19,9$ RFU $\times 10^3$ (tab. 2), dla receptorów H_2 natomiast wartość ta była wyższa o około 14,5% i wynosiła $48,2 \pm 15,1$ RFU $\times 10^3$. We wszystkich grupach badanych obliczano stosunek ekspresji mRNA H_1R /mRNA H_2R , który jest liczbą niemianowaną. W grupie kontrolnej wynosił $0,68 \pm 0,41$. W grupie osób zdrowych u trzech z badanych nie stwierdzono ekspresji mRNA H_1R , a ekspresji H_2R u jednej. Osób tych nie brano pod uwagę w porównaniach z chorymi na astmę.

U chorych na astmę ksw średnie wartości ekspresji mRNA H_1R wynosiły $81,3 \pm 14,0$ RFU $\times 10^3$, a dla mRNA H_2R – $103,1 \pm 30,4$ RFU $\times 10^3$ i były statystycznie znamienne wyższe w stosunku do podobnych wartości obserwowanych w grupie kontrolnej; $p < 0,05$. Stosunek H_1R/H_2R wynosił 0,79 i był zbliżony do wartości stwierdzanych u osób zdrowych (tab. 2).

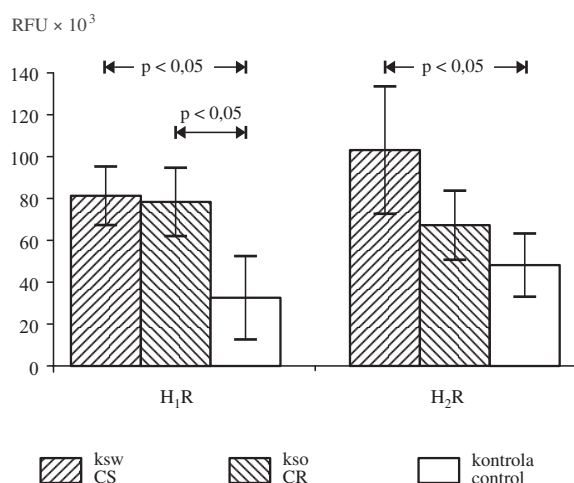
Grupa chorych na astmę kso natomiast wykazywała średnie wartości ekspresji mRNA H_1R wynoszące $78,4 \pm 16,3$ RFU $\times 10^3$, a wartości mRNA H_2R – $67,2 \pm 16,5$ RFU $\times 10^3$. Podobnie jak w grupie chorych na astmę ksw ekspresja H_1R była sta-

Tabela 2. Ekspresja mRNA receptorów histaminowych typu 1 i 2 w limfocytach badanych pacjentów

Table 2. The expression of histamine receptors type 1 and 2 in lymphocytes from studied patients

Grupa badana (Studied groups)	H_1R (RFU $\times 10^3$)		H_2R (RFU $\times 10^3$)		H_1R/H_2R	
	x	±SD	x	±SD	x	±SD
Astma ksw (CS asthma)	81,3*	14,0	103,1*	30,4	0,87	0,35
Astma kso (CR asthma)	78,4*	16,3	67,2	16,5	1,23	0,34
Kontrola (Control)	32,6	19,9	48,2	15,1	1,09	0,56

* $p < 0,05$.



Ryc. 1. Ekspresja mRNA receptorów histaminowych typu 1 i 2 w limfocytach badanych pacjentów

Fig. 1. The expression of histamine receptors type 1 and 2 in lymphocytes from studied patients

tystycznie istotnie wyższa w stosunku do ekspresji w grupie kontrolnej; $p < 0,05$. Stosunek ekspresji H₁R/H₂R był wyższy (statystycznie nieznamien-ny) niż stwierdzany zarówno w grupie chorych na astmę ksw, jak i u osób zdrowych. Zwraca przede wszystkim uwagę obniżona ekspresja mRNA receptorów H₂ u chorych na astmę kso. Była niższa zarówno w porównaniu do ekspresji receptorów H₁, jak i od ekspresji receptorów H₂R stwierdzanej w grupie chorych na astmę ksw – mniejsza około 35% (ryc. 1).

Omówienie

Jak już wspomniano, patomechanizm astmy kortykosteroidopornej (kso) jest związany ze wzmożoną aktywnością komórek efektorowych i wytwarzanych przez nie mediatorów, cytokin i cząstek adhezyjnych oraz czynników transkrypcyjnych indukujących proces zapalenia alergicznego głównie w późnej fazie reakcji astmatycznej [3–5]. Dotychczas nie został natomiast zdefiniowany proces powstawania kortykosteroidooporności w astmie oskrzelowej w kontekście roli receptorów histaminowych H₁ i H₂. We wcześniejszych badaniach własnych będących próbą uzyskania odpowiedzi nad udziałem histaminy w patomechanizmie astmy kso, nie uzyskano jednoznacznych wyników [15, 16]. Z tego względu podjęto badania z zastosowaniem nowoczesnej selektywnej techniki molekularnej – RT-PCR, pozwalającej ocenić stopień ekspresji mRNA limfocytarnych receptorów H₁ i H₂. Liczne obserwacje prowadzone w ostatnich latach pozwoliły na potwierdzenie skuteczności tej techniki. Udokumentowano mię-

dzy innymi znamienne większe stężenie mRNA dla IL-4, IL-5 i INF- α w limfocytach T i w komórkach nabłonka chorych na atopowe zapalenie skóry [22] oraz w komórkach nabłonka oskrzeli u chorych na astmę [23], a także wzrost ekspresji mRNA dla LTC₄ w mastocytach w przypadkach astmy aspirynowej [24].

Przeprowadzone badania wykazały statystycznie istotną ($p < 0,05$) zwiększoną ekspresję mRNA H₁R w grupie chorych na astmę ksw i kso w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych w tym samym wieku. Dane te przemawiają za zwiększonym potencjałem działania prozapalnego histaminy przez receptor H₁ w obu badanych grupach chorych. Zasadnicza różnica występuje jednak w ocenie ekspresji mRNA receptorów H₂. Wprowadzie zarówno w grupie chorych na astmę ksw, jak i kso średnie wartości były zwiększone (w grupie ksw nawet statystycznie istotne; $p < 0,05$) w odniesieniu do kontroli, to w przypadku chorych na astmę kso stwierdzono średnie zmniejszenie ekspresji mRNA H₂R w odniesieniu do chorych na astmę ksw o około 35%. Obserwacje te są istotne, ponieważ przemawiają za osłabieniem modulującego i supresyjnego działania histaminy przez receptor H₂, przede wszystkim u chorych na astmę oporną na steroidy. Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze badania własne autorów z zastosowaniem techniki RT-PCR, w których wykazano również znamienne obniżenie ekspresji mRNA H₂R u chorych na astmę oporną na steroidy w stosunku do chorych na astmę wrażliwych na terapię gks [25]. Stosunek ekspresji receptorów H₁/H₂ był, zgodnie z oczekiwaniami, najwyższy w grupie chorych na astmę kso. Dane te sugerują, że w patomechanizmie astmy kortykosteroidopornej odgrywają rolę nie tylko mechanizmy związane z komórkami, mediatorami i cytokinami późnej reakcji astmatycznej, ale proces zapalenia alergicznego jest również indukowany działaniem histaminy przez receptor H₁. Jednocześnie chorzy na astmę kso wykazują zmniejszoną ekspresję receptora H₂, co ogranicza supresyjne i przeciwzapalne działanie histaminy. Wiadomo, że histamina za pomocą receptorów H₂ hamuje wydzielanie IL-12, która z kolei zmniejsza syntezę cytokin biorących udział w odpowiedzi Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) i bierze udział w zapewnieniu wzajemnej kontroli aktywności limfocytów Th1 i Th2 [26, 27].

Istotne znaczenie mają badania wskazujące na zmienność ekspresji HR na błonach komórkowych limfocytów w zależności od działania różnych czynników. Stymulacja swoistym alergenem u osobników atopowych powodowała znamienne wzrost ekspresji HR na limfocytach [28], a pod wpływem klinicznie efektywnej immunoterapii stwierdzono istotny spadek [29]. Podobny wpływ

u chorych na pyłkowicę powodowało stosowanie loratadyny [30]. Badania z zastosowaniem techniki RT-PCR na ekspresję mRNA receptorów histaminowych z zastosowaniem innego leku blokującego receptory H_1 drugiej generacji – ebastyny, wykazały znaczny wzrost ekspresji mRNA dla H_2R .

Oporność na gks w astmie oskrzelowej nie upoważnia do całkowitego wycofania się w terapii z tej grupy leków, ponieważ wiadomo, że nie wszystkie receptory GR wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi (dochodzi więc do znacznie upośledzonej, ale nie do braku odpowiedzi na gks). Z tego względu we wszystkich publikacjach zaleca się stosowanie dawki rzędu 10–15 mg Entocortonu dziennie [1]. Leczeniem z wyboru powinna być natomiast terapia inhalacyjnymi gks, które wykazują wielokrotnie większe powinowactwo do receptora GR i są obarczone mniejszymi działaniami ubocznymi, co wykazano we wcześniejszych badaniach własnych [30].

Przeprowadzone badania mają także aspekt praktyczny. Wskazują na konieczność uzupełnienia nie w pełni efektywnej terapii steroidowej w astmie kso lekami przeciwhistaminowymi drugiej generacji. Leki te, poza selektywnym blokowaniem receptora H_1 (o znacznie wzmożonej eks-

presji), wykazują działanie przeciwzapalne między innymi w wyniku stymulacji upośledzonej ekspresji receptora H_2 .

Nie można również pominąć istotnego znaczenia wysokiej aktywności leukotrienów cysteinylowych w limfocytach krwi obwodowej, którą obserwuje się u chorych na astmę kso w porównaniu do astmy ksw [31]. Dalszym więc uzupełnieniem leczenia astmy kso powinno być zastosowanie leków antyleukotrienowych, co stwierdzono w badaniach z zastosowaniem zafirlukastu [32].

Podsumowując, należy podkreślić, że przeprowadzone badania wskazują na udział histaminy w złożonym patomechanizmie kortykosteroidooporności. Przemawia za tym zwiększona ekspresja mRNA H_1R i H_2R zarówno w astmie ksw, jak i astmie kso w odniesieniu do grupy kontrolnej. Na uwagę zasługuje istotne zmniejszenie ekspresji mRNA H_2R u chorych na astmę kso (przy dużym stosunku H_1R/H_2R wynoszącym $1,23 \pm 0,34$) w porównaniu do chorych na astmę ksw, co może uzasadniać szczególnie nasilony proces zapalenia alergicznego, spowodowany brakiem efektywnej supresji histaminy na odpowiedź immunologiczną realizowaną przez receptor H_2 . Powyższe wyniki badań są pionierskimi obserwacjami w astmie ksw.

Piśmiennictwo

- [1] Chan MT, Leung D Y, Szeffler SJ, Spahn JD: Difficult-to-control asthma: clinical characteristic of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101, 594–601.
- [2] Chazan R: Astma ciężka – rozpoznanie i ocena ciężkości. *Alergia Astma Immunologia* 2001, 6, Supl. 1, 6–10.
- [3] Barnes PJ: Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996, 97, 159–168.
- [4] Patkowski J, Wytrychowski K: Oporność na kortykosteroidy w leczeniu astmy. *Alergia, Astma, Immunologia* 2000, 5, Supl. 2, 208–212.
- [5] Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC: Glucocorticoid resistance in chronic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991, 144, 1026–1032.
- [6] Barnes PJ, Karin M: NF- κ B a pivotal role in chronic inflammation. *N Engl J Med* 1997, 336, 1066–1071.
- [7] Adcock I M, Shirasaki H, Gelder C M: AP-1 glucocorticoid receptor DNA binding in peripheral blood mononuclear cells from steroid sensitive and resistant patients. *J Exp Med* 1995, 182, 1951–1958.
- [8] Barnes PJ: Effect of β -agonists on inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 104, 10–17.
- [9] Leung DY, Bloom JW: Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111, 3–22.
- [10] Anderson D, Cassel TN, Gronberg R, Bronnengard M: *In vivo* modulation of glucocorticosteroid receptor m-RNA by inhaled fluticasone propionate in bronchial mucosa and blood lymphocytes in subjects with mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 103, 595–598.
- [11] Falus A, Laszlo V, Darvas Z: Histamine and early messenger in the immune system and inflammation. *Centr Eur J Immunol* 1996, 21, 52–54.
- [12] Sachs B, Mertl M, Merck HR: Histamine receptors on lymphocytes: distribution and functional significance. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000, 13, 313–322.
- [13] Patkowski J: Fenotyp acetylacji i reaktywność immunologiczna u chorych na astmę oskrzelową i w alergii na leki. Rozprawa habilitacyjna, Wrocław 1989.
- [14] Małolepszy J, Żak-Nejmark T, Jutel M, Nowak IA, Nadobna G: IL-3, TNF- α and TGF β influence histamine binding by human mast cells. *Allergy* 2001, 56, Suppl. 68, 130.
- [15] Wytrychowski K, Patkowski J, Żak-Nejmark T, Nadobna G: Ekspresja receptorów histaminowych w astmie wrażliwej odpornej na kortykosteroidy. *Pneumonol Alergol Pol* 1999, 67, Supl. 1, 149.
- [16] Żak-Nejmark T, Wytrychowski K, Patkowski J, Małolepszy J: Ekspresja receptorów histaminowych na limfocytach u chorych na astmę wrażliwą i oporną na glikokortykosteroidy. *Pol Arch Med Wewn* 2002, CVII, 547–553.
- [17] Brown PH, Teelucksingh S, Matusiewicz SP: Cutaneous vasoconstrictor response to glucocorticoids in asthma. *Lancet* 1991, 337, 576–580.
- [18] Carmichael J, Paterson IC, Diaz P: Corticosteroid resistance in chronic asthma. *Br Med J* 1981, 282, 1419–1423.

- [19] **Staughton RB:** Bioassay system of formulation of topically applied glucocorticosteroids. *Arch Dermatol* 1972, 106, 825–827.
- [20] **Wytrychowski K, Patkowski J:** Test kurczliwości naczyń skórnych w ocenie kortykosteroidoopornej astmy oskrzelowej. *Post Med Klin Dośw* 1995, 4, 21–27.
- [21] **Zeman K, Tchórzewski M, Majewska E, Pokora L, Pińkowski R:** Prosta i szybka metoda równoczesnej izolacji z krwi obwodowej wysoce oczyszczonych limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych. *Immunol Pol* 1988, 23, 217–221.
- [22] **Taha RA, Leung DY, Ghaffar O, Boguniewicz M, Hamid Q:** *In vivo* expression of cytokine receptor mRNA in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 102, 245–250.
- [23] **Thomas PS, Heywood G:** Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 2002, 57, 774–778.
- [24] **Cai Y, Bjerner R, Halstensen TS:** Bronchial mast cells are dominating LTC₄s-expressing cells in aspirin-tolerant asthma. *Am J Resp Cell Mollecular Biol* 2003, 29, 683–693.
- [25] **Żak-Nejmark T, Wytrychowski K, Kraus-Filarska M, Patkowski J, Małolepszy M, Jonkisz A, Nadobna G:** Different expression of histamine receptors H₂ mRNA in peripheral blood lymphocytes in glucocorticosteroid sensitive and resistant astma patients. *Allergy* 2003, 67, XXIII Congress of EAACI, Abstract Book, 7–11 June 2003, Paris.
- [26] **Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA:** Histamine potently suppress human IL-12 and stimulates IL-10 production via H₂ receptors. *J Immunol* 1998, 161, 2586–2593.
- [27] **Busse WW, Rosenwasser LJ:** Mechanism of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111, Suppl. 3, 799–804.
- [28] **Żak-Nejmark T, Nowak IA, Małolepszy J:** Diurnal variation of lymphocyte histamine receptor expression in atopic asthmatics and healthy subjects. *Allergy* 1999, 53, 128.
- [29] **Żak-Nejmark T, Małolepszy J, Jutel M:** Histamine receptor expression on peripheral blood lymphocytes is influenced by allergen specific immunotherapy. *Allergy* 1999, 54, 104.
- [30] **Wytrychowski K, Patkowski J:** Zastosowanie budezonidu w nebulizacji w ciężkiej kortykosteroidozależnej astmie oskrzelowej – ocena stanu klinicznego. *Adv Exp Clin Med* 2004, 13, 993–1002.
- [31] **Wytrychowski K, Patkowski J, Mędrała W, Małolepszy J:** Application of CAST-ELISA test in corticosteroid resistant chronic asthma. *Allergy* 1997, 52, poster 602.
- [32] **Wytrychowski K, Patkowski J, Kuźniar T, Małolepszy J:** Zafirlucast w leczeniu astmy wrażliwej i odpornej na kortykosteroidy – ocena stanu klinicznego i jakości życia. *Adv Clin Exp Med* 2001, 10, 337–347.

Adres do korespondencji:

Janusz Patkowski
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM
ul. Traugutta 57/59
50-417 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 21.12.2004 r.

Po recenzji: 21.01.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 21.01.2005 r.

Received: 21.12.2004

Revised: 21.01.2005

Accepted: 21.01.2005