

# Odpowiedź przeciwwirusowa w nabłonkach dróg oddechowych – rola w patogenezie zaostrzeń astmy oskrzelowej

## Antiviral response in the respiratory epithelium tissues – its role in the pathogenesis of bronchial asthma exacerbations

SYLWIA MOSKWA, MAREK L. KOWALSKI

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

### Streszczenie

Komórki nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych pełnią ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusami oddechowymi. Biorą one czynny udział w powstawaniu i modulowaniu stanu zapalnego poprzez wydzielanie wielu cytokin, chemokin i czynników wzrostu, które przyciągają komórki napływowe. Wirusowe infekcje dróg oddechowych są istotnymi czynnikami zaostrzającymi astmę oskrzelową, zarówno u dorosłych jak i dzieci. Najczęściej wykrywanym w trakcie zaostrzeń astmy wirusem jest rinowirus. Ostatnio wykazano, że nabłonek dróg oddechowych chorych z astmą oskrzelową wykazuje upośledzoną odpowiedź obronną na infekcję tym wirusem. Zrozumienie mechanizmów zwiększonej podatności chorych z astmą na infekcje wirusowe może przyczynić się do bardziej skutecznej prewencji i leczenia zaostrzeń tej choroby.

**Słowa kluczowe:** infekcje wirusowe, zaostrzenia astmy, komórki nabłonka

### Summary

The upper and lower airway epithelial cells play a pivotal role in the immune response to infection with respiratory viruses. They take an active part in the development and modulation of inflammation by secreting several cytokines, chemokines and growth factors that attract immune inflammatory cells. Viral respiratory infections are major aggravating factors for asthma in both adults and children. Among the respiratory viruses, it is rhinovirus that is most frequently detected during asthma exacerbations. Recently it has been demonstrated that the defense response of the respiratory epithelium to infection with this virus in patients with asthma is impaired. Understanding the mechanisms of increased susceptibility of patients with asthma to viral infections may contribute to more effective prevention and treatment of asthma exacerbations.

**Keywords:** *Viral infections, Asthma exacerbations, Epithelial cells*

© *Alergia Astma Immunologia* 2012, 17 (3): 127-135

[www.alergia-astma-immunologia.eu](http://www.alergia-astma-immunologia.eu)

Przyjęto do druku:

**Adres do korespondencji / Address for correspondence**

Prof. dr hab. med. Marek L. Kowalski

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii,  
Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii UM w Łodzi  
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź  
tel. +4842 675 73 09, fax +4842 678 22 92  
e-mail: Marek.Kowalski@csk.umed.lodz.pl

Komórki nabłonka oddechowego stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami wnikającymi do układu oddechowego. Wirusy zakażające błony śluzowe dróg oddechowych np. rinowirus (*human rhinovirus*, HRV), wirus paragrypy (*parainfluenza virus*, PIV), syncytialny wirus oddechowy (*respiratory syncytial virus*, RSV) czy ludzki metapneumowirus (*human metapneumovirus*, hMPV), wnikając do komórek nabłonka powodują aktywację mechanizmów obronnych (początkowo nieswoistych a następnie swoistych), do których należy produkcja czynników o działaniu prozapalnym m.in. cytokin i chemokin. Czynniki te ograniczając postępujące zakażenie wirusem, indukują jednocześnie objawy chorobowe: u osób zdrowych będzie to wystąpienie objawów banalnego przeziębienia, ale w niektórych przypadkach (szczególnie u dzieci) mogą pojawić się objawy zapalenia dolnych dróg oddechowych (zapale-

nia oskrzeli lub oskrzelików), często połączone ze świstami. Nawracające infekcje wirusowe dróg oddechowych, mają też odległe konsekwencje – mogą być przyczyną wystąpienia astmy oskrzelowej [1,2]. U chorych z przewlekłymi chorobami dróg oddechowych (astma lub POCHP) zakażenia wirusowe należą do najczęstszych przyczyn zaostrzeń tych chorób, stanowią zatem istotny element chorobowości [3]. Jednakże dopiero w ostatnich latach poznajemy immunologiczne i molekularne mechanizmy interakcji wirusów z komórkami nabłonka dróg oddechowych i znaczenie tych interakcji dla rozwoju objawów chorobowych.

### Nabłonek jako bariera fizyczna

Tradycyjnie nabłonek dróg oddechowych uważano za barierę chroniącą przed wpływami środowiska zewnętrznego. Obecnie powszechnie akceptowany jest pogląd, że

nabłonek pełni zasadniczą rolę w utrzymaniu homeostazy dróg oddechowych. Nabłonek migawkowy chroni drogi oddechowe, zapewnia aktywność rzęsek i komunikację z komórkami układu immunologicznego. Komórki nabłonka dróg oddechowych, znajdujące się w miejscu zetknięcia organizmu i środowiska zewnętrznego, są szczególnie narażone na działanie czynników środowiskowych: mikroorganizmów, alergenów oraz pyłów organicznych i nieorganicznych. Nabłonek dróg oddechowych pełni funkcję bariery pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wnętrzem organizmu, a jego spistość zapewniona jest dzięki istniejącym połączeniom ścisłym (ang. *tight junctions*, TJs), zlokalizowanych w szczytowej części komórek walcowatych oraz połączeniom pomiędzy komórkami a błoną podstawną. Połączenia ścisłe zbudowane są z białek: ZO 1-3, okludyny, kładyny 1-5 oraz białek transbłonowych ( $\beta$ -katenina, E-kadheryna, JAM), które umożliwiają komunikację pomiędzy sąsiadującymi komórkami i regulują transport wewnątrzkomórkowy. Integralność nabłonka zapewniają także połączenia komórka-komórka i komórka-macierz pozakomórkowa, w skład których wchodzi: połączenia przylegające (*adherens junctions*), desmosomy i hemidesmosomy. Połączenia te zapobiegają wnikaniu czynników środowiskowych pomiędzy komórki i zakażaniu leżących poniżej błony śluzowej tkanek. Przerwanie ciągłości nabłonka pozwala czynnikom środowiskowym, w tym mikroorganizmom oraz pyłom organicznym i nieorganicznym na penetrację ściany dróg oddechowych co wywołuje reakcje toksyczne, immunologiczne i zapalne prowadzące do uszkodzenia tkanki.

Powierzchnia nabłonka dróg oddechowych jest pokryta śluzem, który stanowi barierę dla większości mikroorganizmów. Śluz wytwarzany jest przez komórki kubkowe nabłonka oraz gruczoły śluzowe błony podśluzowej. Składa się z wody, mucyn oraz soli mineralnych, białek, lipidów i kwasów nukleinowych pochodzących z komórek. W skład śluzu wchodzi także substancje, które biorą udział w odpowiedzi przeciwzakaźnej np. immunoglobulina A (IgA), kolektyny czy defensyny. Głównym składnikiem śluzu są mucyny, glikoproteiny o wysokiej masie cząsteczkowej, które nadają śluzowi ich lepką, żelowatą konsystencję. Mucyny mogą brać udział w odpowiedzi nieswoistej ze względu na właściwości przeciwzakaźne i przeciwzapalne. W drogach oddechowych człowieka wykryto ekspresję 12 genów mucyn (MUC1, -2, -4, -5AC, -5B, -7, -8, -11, -13, -15, -19, -20), z czego komórki kubkowe nabłonka wykazują głównie ekspresję genu MUC5AC a gruczoły śluzowe głównie MUC5B i MUC8 [4]. Ekspresja genów dla mucyn jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B i/lub Sp1. Transport śluzowo-cząsteczkowy jest ważnym elementem odpowiedzi nieswoistej na wnikające do dróg oddechowych bakterie i wirusy – np. rinowirus może zwiększać produkcję śluzu przez komórki nabłonka [5]. Nadmierne wytwarzanie śluzu może z kolei być składnikiem obturacji dróg oddechowych i zaostrzeń chorób układu oddechowego.

## Rozpoznawanie zakażeń wirusowych przez komórki nabłonka dróg oddechowych

Komórki nabłonka oddechowego rozpoznają mikroorganizmy poprzez stanowiące istotny element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej receptory rozpoznające wzorce (*pattern recognition receptors*, PRRs) tj. receptory Toll-podobne (*Toll-like receptors*, TLRs), receptory RIG-podobne (*RIG-I-like receptors*, RLRs) i receptory NOD-podobne (*NOD-like receptors*, NODs, NLRs). Powyższe receptory rozpoznają elementy budowy patogenów określane jako wzorce molekularne związane z mikroorganizmami (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs).

### Receptory toll-podobne

Spośród przezbłonowych receptorów TLR wykrytych u człowieka, komórki nabłonka układu oddechowego wykazują ekspresję 10 spośród nich (TLR 1-10) [6]. Po rozpoznaniu PAMP receptory TLR prowadzą do aktywacji kinaz aktywowanych mitogenami (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) oraz czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), białka AP-1 (*activating protein-1*) i IRFs (*interferon regulatory factors*), które to czynniki przedostając się do jądra komórkowego aktywują geny odpowiedzialne za syntezę interferonów typu I, cytokin zapalnych i chemokin. Wirusy po wniknięciu do komórki nabłonka dróg oddechowych są rozpoznawane przez receptory TLR3, -7, -8 i -9, które znajdują się w cytoplazmie komórek na błonach endosomów – każdy wirus w zależności od swojej struktury (w tym rodzaju kwasu nukleinowego wirusa) rozpoznawany jest przez inny receptor. Receptory te wykazują powinowactwo do kwasów nukleinowych wirusów: TLR3 do dwuniciowego RNA (dsRNA), TLR7 i TLR8 do jednoniciowego RNA (ssRNA) a TLR9 do CpG DNA. Receptor TLR3 rozpoznaje RNA wirusów oddechowych takich jak HRV [7] i hRSV [8]. Swoistym ligandem dla TLR3 jest także syntetyczny analog dsRNA, kwas poliryboinozylo:polirybocytydylowy (*polyinosinic-polycytidylic acid*, *poly(I:C)*). Pod wpływem dsRNA sygnał z TLR3 jest przesyłany za pośrednictwem białka adaptorowego TRIF (na drodze niezależnej od ścieżki sygnałowej związanej z białkiem adaptorowym MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), co prowadzi do aktywacji czynnika TRAF3 i ekspresji genów IFN typu I oraz do aktywacji czynników transkrypcyjnych TRAF6 i RIP1, powodując z kolei aktywację NF- $\kappa$ B i ekspresję genów zarówno cytokin zapalnych jak i IFN typu I. Wirus grypy rozpoznawany jest przez receptor TLR3 [9] i TLR7 [10]. Po związaniu wirusowego RNA lub DNA przez TLR7, -8 i -9, sygnał jest przesyłany poprzez białko adaptorowe MyD88, które aktywuje NF- $\kappa$ B, AP-1 oraz IRF-7, co prowadzi do syntezy cytokin prozapalnych oraz IFN- $\alpha$  i - $\beta$ . Receptory TLR7 i TLR8 mogą także być stymulowane przez syntetyczne związki imidazolochinolonowe (Imiquimod, R848), stosowane w terapii przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej. Nie tylko cytoplazmatyczne receptory TLR mogą rozpoznawać wirusy, okazuje się, że receptory TLR-2, -4 i -6 obecne na zewnętrznej powierzchni błony komórek

nabłonka, także mogą brać udział w rozpoznawaniu wirusów. Receptor TLR-2 i TLR-4, które zwykle łączą się z PAMPs bakterii, mogą także wiązać wirus RSV i indukować odpowiedź nieswoistą [11,12].

### Receptory RIG-I-podobne

Wirusowe RNA jest rozpoznawane także przez znajdujące się w cytoplazmie receptory należące do rodziny receptorów RIG-I-podobnych, w skład której wchodzi RIG-I (*retinoic acid inducible gene-1*) i MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene*) oraz LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). W zakażonych komórkach nabłonka układu oddechowego receptory RIG-I i MDA5 wiążą wirusowe RNA obecne w cytoplazmie oraz przesyłają sygnał indukujący syntezę IFN typu I. RIG-I rozpoznaje 5'-trifosforan ssRNA i krótkie fragmenty dsRNA, natomiast MDA5 wiąże regiony poly(I: C) w dsRNA i długie fragmenty dsRNA. Spośród wirusów zakażających układ oddechowy, RIG-I rozpoznaje paramyksowirusy [13] i wirusy grypy A i B [14], natomiast MDA5 pikornawirusy [15], w tym rinowirusy. Wirus RSV wiążąc się z RIG-I w komórkach nabłonka indukuje syntezę IFN- $\beta$  [16]. RIG-I i MDA5 są zbudowane z domeny DexD/H o charakterze helikazy, która odpowiada za rozpoznawanie wirusowego dsRNA oraz domeny aktywacji i rekrutacji kaspaz (*caspase activation and recruitment domain*, CARD), odpowiedzialnej za przesyłanie sygnałów wewnątrzkomórkowych. Jednak LGP2 zawiera domenę o budowie helikazy wiążącej dsRNA, ale nie zawiera domeny CARD. Ostatnie badania pokazują, że LGP2 może brać udział w regulacji rozpoznawania pikornawirusów przez RIG-I i MDA5 [17]. Natomiast rinowirus jest najpierw rozpoznawany przez TLR3/TRIF, a później przez RIG-I and MDA5 w komórkach nabłonka oskrzeli [7]. Po rozpoznaniu wirusowego RNA przez domenę helikalną RIG-I i MDA5, do domeny CARD przyłączają się białka adaptorowe IPS-1 (*IFN- $\beta$  promotor stimulator*), MAVS (*mitochondrial anti-viral signaling protein*), VISA (*virus-induced signaling adaptor*) i Cardif (*CARD adapter inducing IFN- $\beta$* ), do których dołączane jest białko TRAF3 (*TNF-receptor-associated factor 3*). Na skutek aktywacji białka adaptorowego TRADD (*tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*), na drodze zależnej od białka TRAF3, dochodzi do aktywacji genów odpowiedzialnych za syntezę IFN typu I, a na drodze zależnej od białka FADD (*Fas-associated protein with death domain*) dochodzi do aktywacji NF- $\kappa$ B i rozpoczęcia transkrypcji genów cytokin prozapalnych.

### Receptory NOD-podobne (NLR)

Te receptory znajdują się także w cytoplazmie komórek nabłonka oddechowego i mogą brać udział w odpowiedzi przeciwzakaźnej na wirusy oddechowe. Ligandami receptorów NOD-podobnych tj. NOD-1 i NOD-2 (*nucleotide-binding oligomerization proteins*) są m.in. bakteryjny peptydoglikan, flagelina i bakteryjne RNA. Spośród receptorów NOD-podobnych, NLRP3 (*NLR family, pyrin domain containing 3*) bierze udział w rozpoznaniu wirusa grypy [18]. NLRP3 może tworzyć kompleksy białkowe (inflammasomy), które aktywują kaspazę-1, co prowadzi do syntezy i uwolnienia IL-1 $\beta$ , IL-18 and IL-33 [19].

### Substancje przeciwwirusowe produkowane przez nabłonki

Pod wpływem wirusów i poprzez aktywację opisanych powyżej receptorów i dróg sygnałowych komórki nabłonka dróg oddechowych, uwalniają wiele różnych substancji, które biorą udział w nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej. Najważniejszymi substancjami produkowanymi przez komórki nabłonkowe, zaliczanymi do pierwotnej odpowiedzi na wirusy są interferony, defensyny i tlenek azotu.

### Interferony

Interferony to białka sekrecyjne o charakterze cytokin, które sklasyfikowano do trzech typów (IFN I-III). Komórki nabłonka dróg oddechowych wykazują ekspresję IFN typu I i III. Spośród interferonów typu I silne działanie przeciwwirusowe wykazują IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . Interferony typu I wiążą receptor IFNAR, który jest zbudowany z dwóch podjednostek: IFNAR1 i IFNAR 2, co aktywuje szlak sygnalizacji Jak-STAT i transkrypcję genów odpowiedzi na interferony (*interferon-stimulated genes*, ISG). Produkty genów ISG hamują replikację wirusów, ekspresję białek wirusowych oraz transport cząsteczek wirusa poza komórkę. Interferony nie tylko chronią komórki przed zakażeniem, ale także indukują produkcję cytokin i chemokin, aktywację komórek NK, dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz zmianę izotypu przeciwciał. IFN  $\alpha/\beta$  pełnią także funkcję immunomodulatoryjną, ponieważ prowadzą do wzrostu ekspresji antygenów zgodności tkankowej MHC klasy I i II na powierzchni zakażonych komórek. Najpóźniej odkrytą rodziną interferonów są IFN typu III, do której należą: IFN- $\lambda$ 1/IL-29, IFN- $\lambda$ 2/IL-28A i IFN- $\lambda$ 3/IL-28B. Interferony typu III mają podobne właściwości przeciwwirusowe do IFN $\alpha/\beta$ , ale wykazują ekspresję głównie na komórkach nabłonkowych [20]. Ostatnie badania pokazują, że pod wpływem rinowirusa IFN- $\lambda$  są głównymi interferonami syntetyzowanymi przez komórki nabłonka dróg oddechowych [21]. Ponadto stwierdzono, że IFN- $\lambda$  wykazuje większą skuteczność hamowania replikacji wirusów w komórkach nabłonkowych, w porównaniu do IFN- $\alpha$  [22]. IFN- $\lambda$  łączy się z receptorem IFN- $\lambda$ R (IL28R), który zbudowany jest z dwóch białek receptorowych: IFN-IR $\alpha$  (IL-28R $\alpha$ ) oraz IL-10R $\beta$ . Interferony typu I i III po związaniu się ze swoistymi receptorami przesyłają sygnał do jądra komórkowego poprzez szlak sygnalizacji Jak-STAT. Indukcja stymulowanych interferonem genów (ISGs) powoduje produkcję wielu przeciwwirusowych białek m.in. kinazy białkowej R, (*protein kinase R*, PKR), 2',5' syntetazy oligoadenyloowanej (*2',5'oligoadenylate synthetase*, 2',5'-OAS) i białka związanego z opornością na myxowirusy (*Myxovirus resistance*, Mx protein) [23]. Interferony wykazują także działanie proapoptyczne, co pomaga w usunięciu zakażonych komórek. Wczesna apoptoza zapobiega replikacji wirusa i przyspiesza fagocytozę zainfekowanych komórek. Indukcja apoptozy zachodzi dzięki PKR i OAS, a także przy udziale białka p53.

Wirusy wykształciły jednak szereg mechanizmów unikania odpowiedzi układu immunologicznego. Może się to odbywać m.in. poprzez zmniejszenie komórkowej transkrypcji i syntezy interferonów. Niestrukuralne białka wirusa RSV, NS1 i NS2 hamują syntezę INF-alfa i IFN-beta poprzez zmniejszenie działania czynników transkrypcyjnych IRF-3, NF-kappaB oraz STAT-2 [24].

## Defensyny

Defensyny to białka kationowe, które biorą udział w odporności przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej. Komórki nabłonkowe błon śluzowych oraz leukocyty to główne komórki wydzielające  $\alpha$ - i  $\beta$ -defensyny u człowieka (głównie  $\beta$ -defensyny 1-4 (HBD1-4): HBD1 podlega stałej ekspresji, a HBD2 i -3 są indukowane przez wirusy, bakterie i prozapalne cytokiny (TNF czy IL- $\beta$ )). Pod wpływem stymulacji rinowirusem komórki nabłonka dróg oddechowych wykazują wzmożoną ekspresję  $\beta$ -defensyn 2 i 3 [25]. Działanie przeciwwirusowe defensyn polega na zakłócaniu ścieżek sygnałowych warunkujących replikację wirusa. Defensyny łączą się z błoną zakażonej wirusem komórki i indukują jej apoptozę. Defensyny mają także właściwości chemo-taktyczne dla limfocytów T, monocytów i niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz mogą indukować syntezę i uwalnianie cytokin przez komórki nabłonkowe.

## Tlenek azotu

Nabłonkowe komórki dróg oddechowych są źródłem tlenu azotu, który powstaje w procesie utleniania L-argininy, katalizowanym przez syntazę tlenu azotu (NOS). Komórki nabłonka wykazują ekspresję trzech syntaz tlenu azotu: konstytutywną NOS-1 i NOS-3 oraz indukowaną NOS-2 (iNOS). W trakcie infekcji wirusowej w komórkach nabłonka dróg oddechowych wzrasta ekspresja iNOS. Wyniki wielu badań pokazują, że pod wpływem wirusa RSV [26], rinowirusa [27] i wirusa grypy [28] na skutek aktywacji NOS-2 wzrasta synteza NO. Tlenek azotu pełni wiele funkcji m.in. bierze udział w regulacji ciśnienia i przepuszczalności naczyń oraz uczestniczy w odpowiedzi przeciwzakaźnej organizmu. Tlenek azotu hamuje replikację HRV-16 oraz zmniejsza wytwarzanie cytokin przez komórki nabłonka wywołane zakażeniem rinowirusowym [29,30]. W trakcie zakażenia rinowirusem zwiększa się poziom tlenu azotu w powietrzu wydychanym oraz zmniejsza nadreaktywność oskrzeli u pacjentów z astmą oskrzelową [31]. Wyniki tego badania sugerują ochronną rolę tlenu azotu w trakcie infekcji wirusowej u pacjentów z zaostrzeniami astmy.

## Mediatory zapalenia

Podczas infekcji wirusowej komórki nabłonka dróg oddechowych wydzielają także cytokiny i chemokiny, które uczestniczą nie tylko w pierwotnej, ale także i wtórnej odpowiedzi immunologicznej. W zakażonych wirusami oddechowymi komórkach nabłonka dochodzi do ekspresji genów cytokin i chemokin poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych tj. NF- $\kappa$ B, AP-1 i STAT1/2. Indukowane przez wirusy cytokiny i chemokiny, prowadzą do napływu do miejsca reakcji komórek zapalnych takich jak neutrofile, eozynofile, komórki NK i makrofagi [32]. Komórki nabłonka oskrzeli wydzielają chemokiny CXCL8 (IL-8), CXCL1 (Gro- $\alpha$ ) i CXCL5 (ENA-78), które promują napływ leukocytów do miejsca zapalenia. Natomiast eozynofile są rekrutowane pod wpływem GM-CSF, IL-5, eotaksyny-1 (CXCL11), eotaksyny-2 (CCL24) i RANTES (CCL5). Napływ komórek NK zachodzi pod wpływem m.in. IFN- $\alpha/\beta$  i CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). Komórki NK uwalniają IFN- $\gamma$ , który aktywuje komórki zapalne,

w tym makrofagi. Rekrutacja makrofagów zachodzi dzięki udziałowi cytokin i chemokin tj. IL-1 $\beta$ , CCL2 (MCP-1) i TNF- $\alpha$ . Komórki nabłonka dróg oddechowych biorą także udział w swoistej odpowiedzi immunologicznej promując migrację komórek dendrytycznych, limfocytów T i B.

## Zmiany w drogach oddechowych wywołane infekcją wirusową

### Uszkodzenie nabłonka dróg oddechowych

Komórki nabłonkowe dróg oddechowych są pierwotnym celem zakażenia przez wirusy oddechowe tj. HRV, RSV i hMPV. Podczas replikacji wirusa nabłonek dróg oddechowych może ulec uszkodzeniu. Wirus RSV powoduje efekt cytopatyczny w hodowli komórek nabłonka w postaci syncytiów. Efekt cytopatyczny RSV rozwija się później w komórkach nabłonkowych oskrzeli, niż w komórkach nabłonkowych nosa [33]. Zakażenie rinowirusem hodowli komórek nabłonkowych nosa nie powoduje wyraźnych uszkodzeń komórek [34]. Natomiast cytotoksyczność RSV zaobserwowano przy zakażeniu hodowli komórek nabłonka oskrzeli [35]. Wirusy nie tylko wywołują zmiany morfologiczne w komórkach, lecz także zaburzają homeostazę układu oddechowego, na skutek obniżonego uwalniania NO przez komórki nabłonka [36]. Wirusy oddechowe np. wirus grypy, mogą powodować apoptozę komórek nabłonka oskrzeli [37]. Wirusy mogą także przerywać ciągłość nabłonka dróg oddechowych. W zakażonych rinowirusem komórkach nabłonka oskrzeli wykazano utratę białka ZO-1 z połączeń ścisłych (Tjs) [38]. Rinowirus może także zaburzać i opóźniać odbudowę nabłonka dróg oddechowych [35].

### Rozwój zapalenia

Infekcja wirusowa wyzwala proces zapalny w drogach oddechowych poprzez uwalnianie cytokin, chemokin i czynniki wzrostu. Infekcja wirusem RV prowadzi do syntezy i uwalniania cytokin: IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, IL-11 i TSLP [39-42], oraz chemokin: IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), RANTES (CCL5) [40,43,44]. Wzrost syntezy wyżej wymienionych cytokin i chemokin zachodzi pod wpływem swoistej aktywacji szlaku NF- $\kappa$ B i kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK) przez RSV i RV. Zdolność do indukowania prozapalnych cytokin przez komórki nabłonka dróg oddechowych posiadają także inne wykrywane w materiale biologicznym wirusy. Wirus paragrypy indukuje syntezę IL-6, IL-8 i RANTES przez komórki nabłonka oskrzeli [45]. Pod wpływem infekcji wirusem RSV komórki nabłonka wykazują wzmożoną ekspresję CC chemokin (Exodus-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$  i -1 $\beta$ ) oraz CXC chemokin (I-TAC, GRO, IL-8) [46]. Wzrost syntezy i uwalniania mediatorów zapalnych przez komórki nabłonka oskrzeli prowadzi do zapalenia i napływu limfocytów a proces ten może uczestniczyć w mechanizmie zaostrzeń astmy.

Synteza i uwalnianie IL-6, IL-8 i RANTES przez komórki nabłonkowe linii BEAS-2B zakażone wirusem RV jest istotnie niższe, a produkcja TGF- $\beta$ 1 jest wyższa po stymulacji komórek przez supernatanty (uzyskane po zakażeniu rinowirusem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej) pobrane od osób chorych z astmą atopową w porównaniu do supernatantów od osób zdrowych. Ekspozycja na ato-

powe środowisko zwiększyła cytotoksyczność wirusa [47]. Komórki nabłonkowe oskrzeli linii komórkowej 16HBE14o-jednocześnie narażone na działanie TNF- $\alpha$  i RV-39, powodują wspólnie wzrost produkcji IL-8 [48].

### Infekcje wirusowe w zaostrzeniach astmy

Od wielu lat infekcje wirusowe dróg oddechowych związane są z występowaniem zaostrzeń astmy, jednak tradycyjne serologiczne metody detekcji wirusów ze względu na niską czułość utrudniały dokumentację związku wirusów z zaostrzeniami. Dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej, zwłaszcza łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) obecnie można stosunkowo łatwo i szybko wykryć obecność wirusa oddechowego w materiale biologicznym z dróg oddechowych pobranych w czasie zaostrzenia, a także ustalić jego profil molekularny. Badania metodą PCR wskazują, że infekcje wirusowe są związane z blisko 80% zaostrzeń astmy u dzieci i dorosłych [49,50].

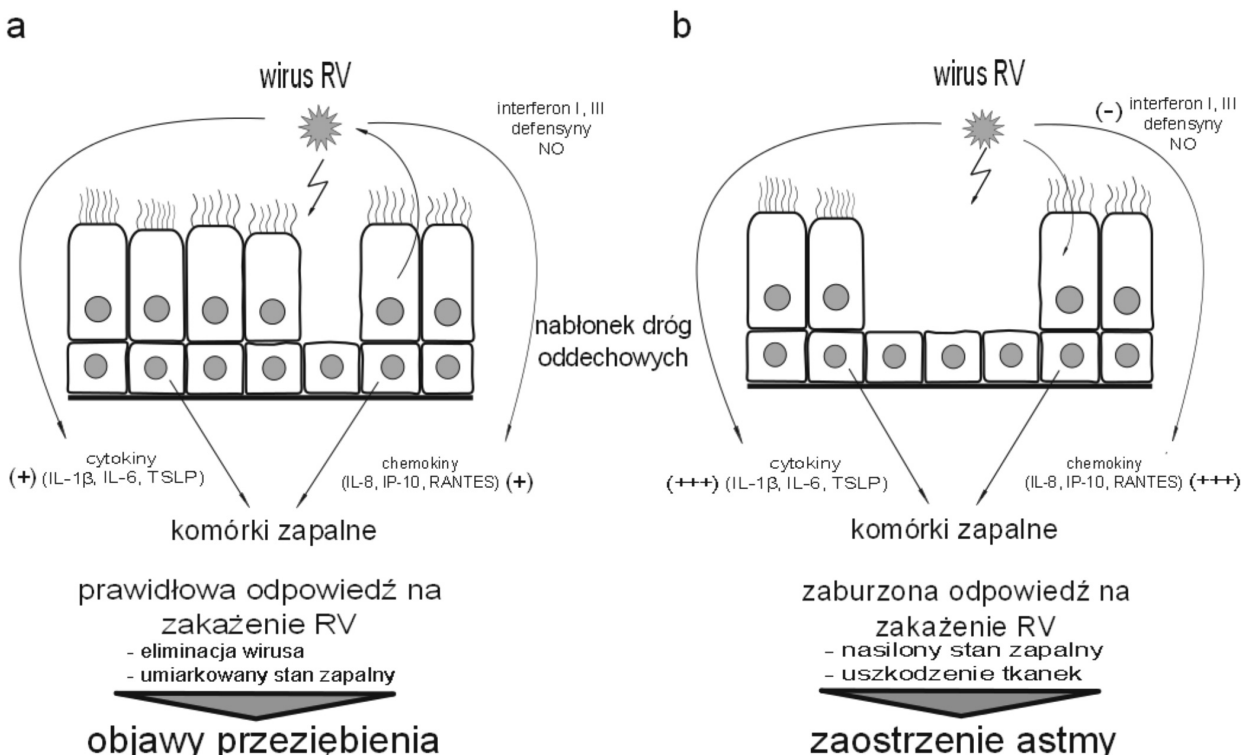
### Rinowirus

Rinowirusy to bezotoczkowe wirusy, zawierające pojedynczy łańcuch RNA o dodatniej polarności, należące do rodzaju Enterovirus rodziny pikornawirusów (*Picornaviridae*). Ponad 100 serotypów HRV zaliczono do dwóch grup, HRV-A i HRV-B, ze względu na sekwencje nukleotydów VP1 i VP4/VP2. Rinowirusy wiążą się z dwoma receptorami komórkowymi: ICAM-1 (ponad 90% serotypów) i receptor lipoproteiny niskiej gęstości (LDLR). Dzięki zastosowaniu techniki sekwencjonowania wyodrębniono trzecią grupę, HRV-C, którą Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) zatwierdził w 2009 roku.

Jak do tej pory komórki nabłonka są jedynym typem komórek, w których wykryto rinowirusa in vivo. W pierwotnych komórkach nabłonka nosa uzyskiwanych za pomocą wymazu, aspiratów nosowo-gardłowych [51] lub biopsji małżowin nosowych [52] i polipów nosa [53] wykryto HRV metodami biologii molekularnej. Badania metodą hybrydyzacji in situ potwierdziły rozprzestrzenienie się infekcji rinowirusowej na komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych [54]. Zakażenie rinowirusem wykrywa się u około 60% pacjentów z zaostrzeniami astmy [49]. Infekcja wirusem HRV we wczesnym dzieciństwie jest związana z występowaniem świszczącego oddechu (wheezing) i późniejszym rozwojem astmy oskrzelowej [55]. Wirusa HRV wykryto u 30% dzieci z infekcją dolnych dróg oddechowych [56]. Zaostrzenia astmy podczas infekcji rinowirusowej obserwuje się nie tylko u dzieci, a także u dorosłych. Grünberg i wsp. wykazali, że u dorosłych z umiarkowaną astmą atopową po podaniu donosowym RV-16 w ciągu dwóch dni po zakażeniu wystąpiła odwracalna obturacja dróg oddechowych wyrażająca się spadkiem FEV1 [57]. Inne badania tego zespołu z eksperymentalną infekcją RV-16 wykazały, że pacjenci z astmą mają podwyższone stężenie interleukiny-8 (IL-8) w laważach nosowych [58] oraz podwyższone stężenie ICAM-1 w biopatach błony śluzowej oskrzeli [59].

### Syncytialny wirus oddechowy (hRSV)

HRSV jest wirusem osłonkowym, zawierającym jednoniciowe RNA o ujemnej polarności i należy do rodziny paramyksowirusów (*Paramyxoviridae*) i rodzaju Pneumovirus. Komórkami docelowymi dla wirusa hRSV są komórki nabłonka układu oddechowego człowieka. Wirus hRSV jest



Ryc. 1. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie wirusem RV u osób zdrowych (a) i chorych na astmę oskrzelową (b)

najczęstszą przyczyną chorób dolnych dróg oddechowych we wczesnym dzieciństwie [60]. Zakażenie wirusem hRSV zwykle objawia się infekcją górnych dróg oddechowych, jednak od 30 do 70% niemowląt hRSV powoduje zapalenie oskrzeli, oskrzelików lub płuc. Ostre zapalenie oskrzelików wywołane infekcją hRSV powoduje wystąpienie świszczącego oddechu u niemowląt i dzieci, objawami przypominającymi ostrą astmę oskrzelową [61]. Przebieg zapalenia oskrzelików o etiologii hRSV zwiększa 4-krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia świszczącego oddechu i astmy oskrzelowej później w dzieciństwie [2].

### Ludzki metapneumowirus (hMPV)

Jest to nowo odkryty paramyksowirus związany z infekcjami górnych i dolnych dróg oddechowych u dzieci, osób starszych i pacjentów z niedoborem odporności. HMPV należy do rodziny *Paramyxoviridae*, podrodziny *Pneumovirinae* i rodzaju *Metapneumovirus*. Ludzki metapneumowirus został odkryty w 2001 roku u dzieci i obecnie jest drugim, po RSV, czynnikiem etiologicznym wykrywanym w infekcjach dolnych dróg oddechowych u niemowląt i dzieci [62,63]. Zakażenie wirusem hMPV jest również związane z występowaniem zaostrzeń astmy u dzieci

i osób dorosłych [62,64]. U dzieci poniżej 5 roku życia zaobserwowano związek pomiędzy infekcją hMPV a występowaniem świszczącego oddechu [62,64,65], natomiast u dzieci powyżej 5 roku życia takiej zależności nie wykryto [65]. Zaobserwowano związek pomiędzy występowaniem podwójnej infekcji wirusem hMPV i hRSV a ostrym zapaleniem oskrzelików u niemowląt [66]. Natomiast u dzieci z koinfekcją hMPV/hRSV rozwija się częściej zapalenie płuc, w porównaniu do dzieci z pojedynczą infekcją hMPV [63].

### Zaburzenia odpowiedzi immunologicznej na wirusy w astmie oskrzelowej

Jak wspomniano, u chorych na astmę oskrzelową zakażenia wirusowe często są przyczyną zaostrzeń objawów choroby, choć mechanizmy wiążące infekcję z rozwojem zaostrzenia nie zostały w pełni poznane. Chorzy na astmę również są bardziej podatni na zakażenie rinowirusem niż ludzie zdrowi, infekcja wywołuje u nich bardziej nasilone i dłużej trwające objawy ze strony dolnych dróg oddechowych, oraz rozwój zapalenia i obturację oskrzeli [67,68]. Przyczyny tej zwiększonej podatności na infekcję wirusową chorych na astmę oskrzelową dopiero zaczynamy poznawać.

Tabela I. Odpowiedź przeciwwirusowa w pierwotnych hodowlach komórek nabłonka oskrzeli i w komórkach popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych u chorych na astmę

Czynnik zakaźny	Badane komórki	Obserwacje	Piśmiennictwo
RV-16	Pierwotne komórki nabłonka oskrzeli ( <i>primary bronchial epithelial cells</i> , PBEC)	Obniżone (>2-krotnie) uwalnianie IFN- $\beta$ przez komórki pacjentów z astmą, w porównaniu do osób zdrowych.  Podobny wzrost uwalniania RANTES i IL-6 po infekcji komórek wirusem u pacjentów z astmą i u osób zdrowych. Większa ekspresja ICAM-1 u osób zdrowych, w porównaniu do chorych z astmą, u chorych z astmą zaburzona apoptoza komórek nabłonka oskrzeli.	Wark i wsp. [69]
RV	PBEC  makrofagi pęcherzykowe	Zaburzona indukcja IFN- $\lambda$ przez rinowirus w komórkach nabłonka oskrzeli i w makrofagach pęcherzykowych u pacjentów z astmą.	Contoli i wsp. [71]
Wirusy izolowane od chorych, rinowirusy: <i>major group</i> (RV-43, RV-48), <i>minor group</i> (RV-47) i enterowirus (EV-68)	PBEC	Komórki od pacjentów z astmą zakażone RV-1B uwolniły istotnie mniej IFN- $\beta$ , w porównaniu do osób zdrowych.	Wark i wsp. [70]
Laboratoryjne rinowirusy: <i>major group</i> (RV-16, RV-14) i <i>minor group</i> (RV-1B)		Wykazano odwrotną korelację pomiędzy uwalnianiem IFN- $\beta$ a żywotnością zakażonych komórek i replikacją wirusów 24 h po infekcji. Niższa apoptoza komórek zakażonych <i>major group</i> RV, w porównaniu do <i>minor group</i> RV.	

Wirusy RV: RV-1B i RV-16	PBEC; Linia komórkowa BEAS-2B	Porównywalny wzrost ekspresji IFN- $\lambda$ 1 mRNA i IFN- $\lambda$ 2/3 mRNA w komórkach zakażonych zarówno RV-16, jak i RV-1B.	Khaitov i wsp. [21]
Wirus grypy A Victoria 75/3		Istotny wzrost ekspresji IFN- $\alpha$ 2 mRNA pierwotnych komórek nabłonka zakażonych RV-1B i RV-16. Indukcja RANTES (CCL5) przez komórki PBEC zakażone RV-16 i RV-1B.	
HRV-16	Komórki nabłonka oskrzeli (HBE), komórki nabłonka nosa (HNE)	Większy wzrost ekspresji IFN- $\beta$ 1 mRNA w zainfekowanych komórkach nabłonka u pacjentów z astmą niż u osób zdrowych.	Lopez-Souza i wsp. [75]
RV-1A	PBEC	Brak różnic w ekspresji mRNA IFN- $\beta$ 1 i IL-28 pomiędzy osobami zdrowymi i pacjentami z astmą po infekcji.	Bochkov i wsp. [76]
dsRNA (10 $\mu$ g/ml)	BEC	Po stymulacji niższa ekspresja IFN- $\beta$ mRNA a wyższa ekspresja TSLP mRNA u pacjentów z astmą, w porównaniu do osób zdrowych. Większa synteza i uwalnianie TSLP i mniejsze IFN- $\beta$ przez komórki nabłonka oskrzeli, u pacjentów z astmą.	Uller i wsp. [74]
RV-14	Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> , PBMC)	Obniżona generacja INF- $\alpha$ oraz IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 u dzieci i dorosłych z astmą.	Likura i wsp. [72]
RV-16	Komórki popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych ( <i>bronchoalveolar lavage</i> , BAL)	Obniżona generacja IFN- $\gamma$ .	Message i wsp. [68]
RV-16	Komórki popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych ( <i>bronchoalveolar lavage</i> , BAL)	Obniżona synteza i uwalnianie IFN- $\alpha$ u pacjentów z astmą.	Sykes i wsp. [73]

W roku 2005 Wark i wsp. po raz pierwszy wykazali, że u pacjentów z astmą komórki nabłonka oskrzelowego mają zaburzoną odpowiedź antywirusową, co przejawia się obniżoną generacją interferonu  $\beta$  na zakażenie wirusem RV-16 i RV-1B oraz zaburzoną apoptozą zakażonych wirusem RV-16 komórek nabłonkowych [69]. Stwierdzono, że infekcja wirusem RV-16 komórek pierwotnej hodowli nabłonka oskrzeli (PBECs) powoduje wzrost ekspresji mRNA interferonu- $\beta$  u osób zdrowych w porównaniu do pacjentów z astmą oskrzelową. Badacze Ci zaobserwowali istotny wzrost wczesnej apoptozy komórek nabłonka w odpowiedzi na infekcję RV-16 u osób zdrowych oraz potwierdzili, że indukcja apoptozy jest bezpośrednio związana z replikacją wirusa. Infekcja komórek nabłonka od pacjentów z astmą także spowodowała zwiększenie liczby komórek apoptycznych, jednak wzrost apoptozy był zdecydowanie mniejszy w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. W kolejnych badaniach potwierdzono zaburzoną indukcję IFN- $\beta$  w komórkach nabłonka [70] oraz obniżoną produkcję IFN- $\lambda$  pod wpływem rinowirusa w komórkach nabłonka oskrzeli i w makrofagach pęcherzykowych u pacjentów z astmą [68,71]. Z kolei Likura i wsp. [72] wykazali obniżoną generację interferonu alfa w odpowiedzi na infekcję wirusem RV w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej, a Syker

i wsp. [73] w komórkach popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), u pacjentów z astmą. Natomiast Uller i wsp. [74] zaobserwowali mniejszą produkcję IFN- $\beta$  przez komórki nabłonka oskrzeli, u pacjentów z astmą, w porównaniu do osób zdrowych po stymulacji dsRNA. Inne badania nie potwierdzają jednak obniżonej syntezy i uwalniania interferonów w odpowiedzi na infekcję wirusową [75,76]. Lopez-Souza i wsp. zaobserwowali, że zakażone wirusem RV-16 komórki nabłonka oskrzeli pacjentów z astmą mają istotnie podwyższoną ekspresję mRNA IFN- $\beta$ 1 i STAT1A w porównaniu do osób zdrowych [75]. Natomiast Bochkov i wsp., choć wykazali przy zastosowaniu metody qPCR podwyższoną ekspresję IFN- $\beta$ 1 po zakażeniu wirusem RV-A1 zarówno u osób zdrowych i chorych z astmą, to nie potwierdzili różnic w ekspresji interferonu pomiędzy grupami [76].

Te rozbieżności wskazują na potrzebę dalszych badań odpowiedzi immunologicznej na infekcję wirusową u chorych z astmą, z uwzględnieniem wieku, obecności atopii, ale także stosowanego leczenia. Otwartymi pozostają też pytania, jak wirusy wpływają na inne składniki naturalnej odpowiedzi immunologicznej w nabłonkach chorych z astmą oraz czy odpowiedź na inne wirusy oddechowe jest również w astmie zaburzona.

## Piśmiennictwo

1. Kowalski ML. Viral respiratory tract infections and the development of asthma. *Pol Arch Med Wewn.* 1981; 65: 391-7.
2. Peebles RS Jr. Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship? *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113: S15-8.
3. Papadopoulos NG, Christodoulou I, Rohde G i wsp. Viruses and bacteria in acute asthma exacerbations - a GA<sup>2</sup> LEN-DARE systematic review. *Allergy.* 2011; 66: 458-68.
4. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 245-78.
5. Zhu L, Lee PK, Lee WM i wsp. Rhinovirus-induced major airway mucin production involves a novel TLR3-EGFR-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40: 610-9.
6. Muir A, Soong G, Sokol S i wsp. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30: 777-83.
7. Slater L, Bartlett NW, Haas JJ i wsp. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001178.
8. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS i wsp. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 1733-40.
9. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S i wsp. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005; 280: 5571-80.
10. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A i wsp. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5598-603.
11. Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM i wsp. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol* 2009; 83: 1492-500.
12. Haeberle HA, Takizawa R, Casola A i wsp. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis* 2002; 186: 1199-206.
13. Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L i wsp. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 2005; 79: 12944-51.
14. Loo YM, Fornek J, Crochet N i wsp. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 2008; 82: 335-45.
15. Kato H, Takeuchi O, Sato S i wsp. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-5.
16. Sasai M, Shingai M, Funami K i wsp. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol* 2006; 177: 8676-83.
17. Satoh T, Kato H, Kumagai Y i wsp. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 1512-7.
18. Allen IC, Scull MA, Moore CB i wsp. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009; 30: 556-65.
19. Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol* 2009; 21: 194-8.
20. Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 2009; 35: 82-7.
21. Khaitov MR, Laza-Stanca V, Edwards MR i wsp. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *Allergy* 2009; 64: 375-86.
22. Ank N, West H, Bartholdy C i wsp. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* 2006; 80: 4501-9.
23. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008; 89: 1-47.
24. Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol* 2005; 79: 5353-62.
25. Duits LA, Nibbering PH, van Strijen E i wsp. Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 59-64.
26. Kao YJ, Piedra PA, Larsen GL i wsp. Induction and regulation of nitric oxide synthase in airway epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 532-9.
27. Sanders SP, Siekierski ES, Richards NM i wsp. Rhinovirus infection induces expression of type 2 nitric oxide synthase in human respiratory epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 235-43.
28. Murphy AW, Platts-Mills TA, Lobo M i wsp. Respiratory nitric oxide levels in experimental human influenza. *Chest* 1998; 114: 452-6.
29. Sanders SP, Siekierski ES, Porter JD i wsp. Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced cytokine production and viral replication in a human respiratory epithelial cell line. *J Virol* 1998; 72: 934-42.
30. Koetzler R, Zaheer RS, Newton R i wsp. Nitric oxide inhibits IFN regulatory factor 1 and nuclear factor-kappaB pathways in rhinovirus-infected epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 551-7.
31. de Gouw HW, Grünberg K, Schot R i wsp. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1998; 11: 126-32.
32. Message SD, Johnston SL. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 5-17.
33. Becker S, Soukup J, Yankaskas JR. Respiratory syncytial virus infection of human primary nasal and bronchial epithelial cell cultures and bronchoalveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 369-74.
34. Winther B, Gwaltney JM, Hendley JO. Respiratory virus infection of monolayer cultures of human nasal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 839-45.
35. Bossios A, Psarras S, Gourgoutis D i wsp. Rhinovirus infection induces cytotoxicity and delays wound healing in bronchial epithelial cells. *Respir Res* 2005; 6: 114.
36. Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP i wsp. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1708-20.
37. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K i wsp. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol* 1995; 76: 2869-73.
38. Sajjan U, Wang Q, Zhao Y i wsp. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1271-81.
39. Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K i wsp. Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1beta. *Am J Physiol* 1997; 273: L749-59.
40. Subauste MC, Jacoby DB, Richards SM i wsp. Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. Induction of



- cytokine release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. *J Clin Invest* 1995; 96: 549-57.
41. Einarsson O, Geba GP, Zhu Z i wsp. Interleukin-11: stimulation *in vivo* and *in vitro* by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1996; 97: 915-24.
42. Kato A, Favoreto S Jr, Avila PC i wsp. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007; 179: 1080-7.
43. Spurrell JC, Wiehler S, Zaheer RS i wsp. Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) *in vitro* and *in vivo* upon rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L85-95.
44. Schroth MK, Grimm E, Frindt P i wsp. Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 1220-8.
45. Matsukura S, Kokubu F, Noda H i wsp. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 1080-7.
46. Zhang Y, Luxon BA, Casola A i wsp. Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays. *J Virol* 2001; 75: 9044-58.
47. Xatzipsalti M, Psarros F, Konstantinou G i wsp. Modulation of the epithelial inflammatory response to rhinovirus in an atopic environment. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 466-72.
48. Newcomb DC, Sajjan US, Nagarkar DR i wsp. Cooperative effects of rhinovirus and TNF-alpha on airway epithelial cell chemokine expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1021-8.
49. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G i wsp. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-9.
50. Sokhandan M, McFadden ER Jr, Huang YT i wsp. The contribution of respiratory viruses to severe exacerbations of asthma in adults. *Chest* 1995; 107: 1570-4.
51. Dagher H, Donninger H, Hutchinson P i wsp. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods* 2004; 117: 113-21.
52. Pitkäranta A, Puhakka T, Mäkelä MJ i wsp. Detection of rhinovirus RNA in middle turbinate of patients with common colds by *in situ* hybridization. *J Med Virol* 2003; 70: 319-23.
53. Wang JH, Kwon HJ, Chung YS i wsp. Infection rate and virus-induced cytokine secretion in experimental rhinovirus infection in mucosal organ culture: comparison between specimens from patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and those from normal subjects. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 424-7.
54. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG i wsp. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 2000; 181: 1875-84.
55. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD i wsp. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 667-72.
56. Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG i wsp. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 680-6.
57. Grünberg K, Timmers MC, de Klerk EP i wsp. Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1375-80.
58. Grünberg K, Timmers MC, Smits HH i wsp. Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects *in vivo*. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 36-45.
59. Grünberg K, Sharon RF, Hiltermann TJ i wsp. Experimental rhinovirus 16 infection increases intercellular adhesion molecule-1 expression in bronchial epithelium of asthmatics regardless of inhaled steroid treatment. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1015-23.
60. Panitch HB. Bronchiolitis in infants. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 256-60.
61. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK i wsp. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009; 360: 588-98.
62. Foulongne V, Guyon G, Rodière M i wsp. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 354-9.
63. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D i wsp. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 406-12.
64. Williams JV, Crowe JE Jr, Enriquez R i wsp. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis* 2005; 192: 1149-53.
65. Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD i wsp. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 314-21.
66. Semple MG, Cowell A, Dove W i wsp. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005; 191: 382-6.
67. Corne JM, Marshall C, Smith S i wsp. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002; 359: 831-4.
68. Message SD, Laza-Stanca V, Mallia P i wsp. Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13562-7.
69. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F i wsp. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; 201: 937-47.
70. Wark PA, Grissell T, Davies B i wsp. Diversity in the bronchial epithelial cell response to infection with different rhinovirus strains. *Respirology* 2009; 14: 180-6.
71. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V i wsp. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 2006; 12: 1023-6.
72. Likura K, Katsunuma T, Saika S i wsp. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 27-33.
73. Sykes A, Edwards MR, Macintyre J i wsp. Rhinovirus 16-induced IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1506-1514.e6.
74. Uller L, Leino M, Bedke N i wsp. Double-stranded RNA induces disproportionate expression of thymic stromal lymphopoietin versus interferon-beta in bronchial epithelial cells from donors with asthma. *Thorax* 2010; 65: 626-32.
75. Lopez-Souza N, Favoreto S, Wong H i wsp. *In vitro* susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1384-90.
76. Bochkov YA, Hanson KM, Keles S i wsp. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 69-80.