

Czy molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów może wyjaśnić niektóre trudności w leczeniu astmy?

Molecular mechanism of glucocorticoids and difficult asthma

ALICJA GRZANKA, BARBARA ROGALA

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze

W prezentowanej pracy autorzy przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat molekularnego mechanizmu działania glikokortykosteroidów w tzw. trudnej astmie. Omawiają budowę i działanie receptora dla glikokortykosteroidów w ocenie efektów steroidoterapii. *Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(4), 247-252*

Słowa kluczowe: *astma oskrzelowa, glikokortykosteroidy, receptor, geny, cytokiny, leczenie*

The article is the review of the data from literature concerning the molecular mechanism of glucocorticoids in difficult asthma. The structure and function of the glucocorticoid receptor and the implications for therapy are discussed. *Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(4), 247-252*

Key words: *bronchial asthma, glucocorticoids, receptor, genes, cytokines, therapy*

Poznanie mechanizmów działania glikokortykosteroidów (GK) na poziomie komórkowym i molekularnym stworzyło podstawy dla bliższego poznania farmakologicznego działania GK. Czy wiadomości te mają również implikacje praktyczne? Czy molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów może wyjaśnić niektóre trudności w leczeniu astmy?

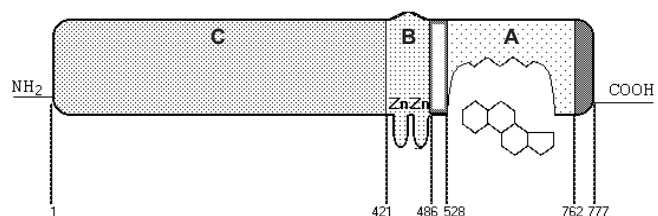
Budowa receptora dla glikokortykosteroidów

Z dotychczasowych badań wynika, że koniecznym, aktywnym pośrednikiem przenoszącym sygnał informacyjny zawarty w cząsteczce hormonu na gen podlegający regulacji przez GK jest cząsteczka receptorowa wykazująca powinowactwo do DNA po połączeniu z GK. Receptor dla GK (GKR) jest fizjologicznie znacznie istotniejszą molekułą niż sam GK, chociażby dlatego, że sztuczną aktywację GKR i pełną odpowiedź komórkową można uzyskać bez obecności GK, co udowodniono w doświadczeniach z użyciem hodowli komórkowej, na przykład zmieniając pH środowiska [1]. W tym świetle GK są raczej aktywatorami ważnej wewnątrzkomórkowej cząsteczki regulacyjnej, mniej lub bardziej przypadkowo noszącej miano receptora.

Receptor dla GK jest białkiem, zbudowanym z jednego łańcucha polipeptydowego, składającym się z 777 ami-

nokwasów. Pierwszorzędowa struktura białka receptora została poznana przez klonowanie właściwego cDNA [1,2,3,4].

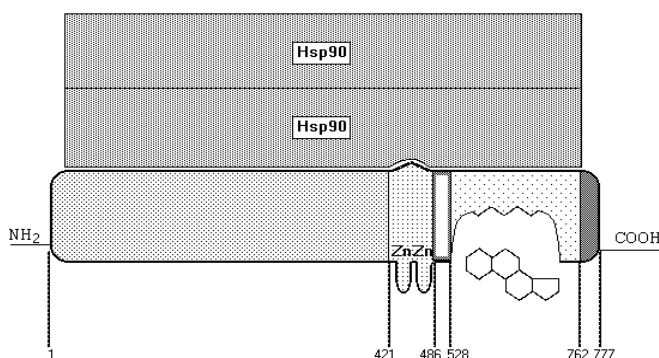
Badania porównawcze i analiza mutacji wykazały, że w obrębie receptora można wyróżnić trzy główne obszary – domeny, które schematycznie przedstawiono na ryc. 1. Obszar środkowej części receptora (domena B), pomiędzy aminokwasami 421 a 486, jest odpowiedzialny za wiązanie DNA. Reszty cysteinowe wchodzące w skład tego odcinka tworzą kompleksy z cynkiem (tzw. „palce cynkowe”) ułatwiające wiązanie z DNA i warunkujące jego charakterystyczną strukturę trzeciorzędową. W dalszej części cząsteczki GKR (pomiędzy aminokwasami 528 a 762) znajduje się odcinek odpowiedzialny za wiązanie receptora z cząsteczką hormonu - domena A. Obydwie domeny, wiążąca DNA i wiążąca GK, są rozdzielone przez



Ryc. 1. Model czynnościowych domen receptora glikokortykosteroidowego

odcinek, którego czynnościowe znaczenie jest słabo poznane. Być może odgrywa on rolę w przenoszeniu sygnału na DNA. Aminokwasy końcowe (763-777) nie są istotne dla wiązania GKR z GK. Z kolei początkowy odcinek białka receptorowego - domena C (aminokwasy 1-421), stanowiący ponad połowę wielkości cząsteczki receptora dla GK, jest nośnikiem immunogenności i niektórych innych cech biologicznych receptora. W obszarze tym jest zlokalizowane miejsce wiążące białko aktywatorowe AP1 (*activator protein-1*).

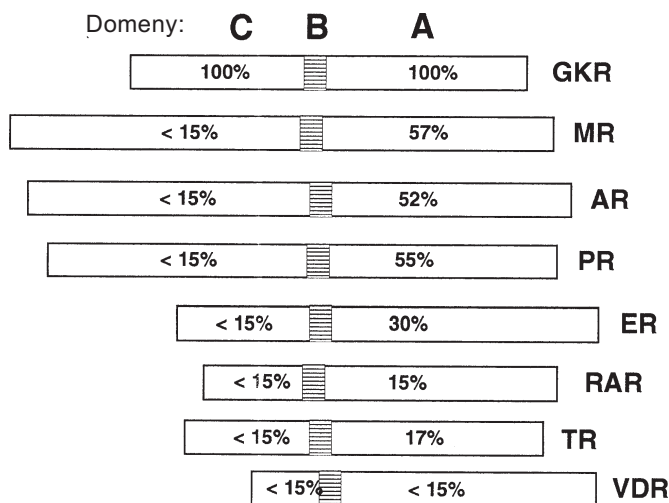
Nieaktywny GKR jest połączony w komórce z dwoma monomerami białka Hsp90 (białka szoku cieplnego, *heat shock protein*), które pokrywają miejsce wiążące DNA w domenie B (ryc. 2). Wykazano, że również domena A ma miejsce wiążące dla Hsp90. Białko szoku cieplnego umożliwia prawidłową konformację receptora, warunkującą powinowactwo receptora do GK oraz zapobiegając jego wiązaniu z DNA. W badaniach *in vitro* odłączenie Hsp90 od nieaktywnego GKR, nawet przy braku GK, sprawia, że białko receptorowe wiąże się z DNA [1,2,3].



Ryc. 2. Nieaktywny receptor glikokortykosteroidowy (połączony z dwoma cząsteczkami białka szoku cieplnego - Hsp 90).

Nadrodzina receptorów dla hormonów niepeptydowych

Ważne, bo mające praktyczne implikacje jest, wykazanie wyraźnego podobieństwa w ogólnym planie budowy i sekwencji aminokwasowej między receptorami dla poszczególnych hormonów steroidowych, jak również między GKR a receptorami dla innych hydrofobowych związków o budowie pierścieniowej jak witamina D, kwas retinowy czy hormony tarczycy (ryc. 3) [3]. Silna homologia budowy pierwszorzędowej, sięgająca nawet 90% aminokwasów, dotyczy przede wszystkim domeny B. Wykazano ją również w obrębie domeny A, jednak w mniejszym stopniu (do 57%), bo w tej części cząsteczki konieczne jest już rozpoznanie hormonu zdolnego do aktywacji czynnika regulującego transkrypcję genów, jakim w rzeczywistości jest receptor. Z kolei domena C charakteryzuje się największą zmiennością wśród tej grupy receptorów i homologia w obrębie tej domeny nie prze-



Ryc. 3. Homologia budowy pierwszorzędowej pomiędzy GKR a receptorami dla mineralokortykoidów (MR), androgenów (AR), progesteronu (PR), estrogenów (ER), kwasu retinowego (RAR), hormonów tarczycy (TR), witaminy D (VDR). W obrębie domeny B homologia dotyczy 50-90% aminokwasów.

kracza 15%. Można, więc mówić o jednej wielkiej „rodzinnie receptorów” dla hydrofobowych związków pierścieniowych. Wiąże się z tym możliwość zajmowania danego receptora steroidowego przez inny hormon steroidowy i agonistycznego lub antagonistycznego działania odpowiednich hormonów. I tak, podawanie deksametazonu zamiennie obniża liczbę receptorów dla progesteronu i *vice versa*. Progesteron może wiązać się z GKR, blokując go dla GK, a nawet może wypierać deksametazon związany już z receptorem [5]. Jest to ważne spostrzeżenie, gdyż u kobiet leczonych progesteronem korytkoterapia właśnie z tych powodów może być nieskuteczna. Poza tym w ostatnich latach pojawiły się kazuistyczne doniesienia o dramatycznych zaostrzeniach astmy po podaniu hormonów steroidowych jajnika [6]. Z kolei w badaniach eksperymentalnych wykazano, że po usunięciu jajników występuje wzrost liczby GKR, ustępujący po podaniu β -estradiolu i niereagujący na podanie kortyzolu [7]. Czy te zależności mogą również tłumaczyć przyczyny zaostrzeń astmy u kobiet przed miesiączką? Czy właśnie dlatego obserwujemy słaby efekt GK w leczeniu tego typu zaostrzeń? Mechanizmy tych obserwacji są niestety nieznane. Potwierdza to mnogość sugerowanych wyjaśnień, jak na przykład istniejące zmiany w stężeniu estradiolu z nagłym spadkiem po wydłużonym czasie trwania jego szczytowego poziomu [8], a być może wpływ wysokiego stężenia progesteronu w fazie lutealnej [9] lub jego zmniejszona aktywność pod koniec trwania tej fazy cyklu miesięcznego [10], czy nawet zmniejszenie liczby receptorów β 2-adrenergicznych [11] w limfocytach u tych chorych. Potwierdzają to również różne zalecenia. Niektórzy autorzy wykazują korzyści z podawania progesteronu w tygodniu poprzedzającym miesiączkę [10]. Zaobserwowany jest też korzystny wpływ preparatów antykoncepcyj-

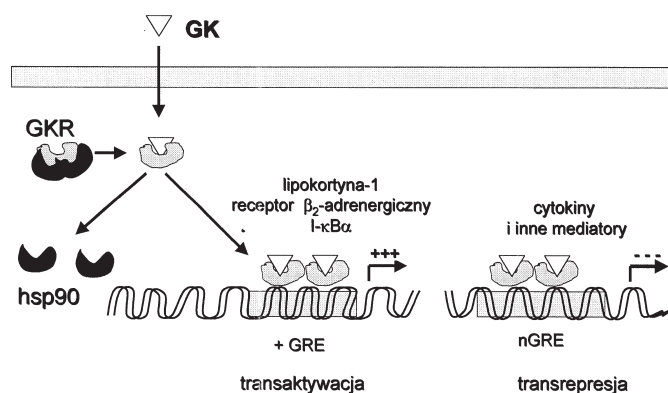
cyjnych [12], estradiolu [13] na złagodzenie astmy w okresie przedmiesiączkowym.

Należy więc uważać, że warto u tych chorych prześledzić współzawodnictwo hormonów steroidowych na poziomie molekularnym, a wskazania do modyfikacji terapii hormonalnej traktować indywidualnie.

Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów

Oporność na GK jest zagadnieniem niezwykle złożonym i prawdopodobnie ten sam efekt, czy też raczej brak efektu leczniczego, spowodowany jest różnymi przyczynami. Spośród wielu badań próbujących wyjaśnić to zjawisko u chorych na astmę tylko niektóre z nich, związane z molekularnym działaniem GK, znajdują odzwierciedlenie w spostrzeżeniach klinicznych.

Na rycinie 4 przedstawiono model molekularnego działania GK, który obrazuje wpływ kompleksu GK-GKR na transkrypcję poszczególnych genów [14].



Ryc. 4. Klasyczny model molekularnego działania glikokortykosteroidów (R. Newton 1998 [14])

Glikokortykosteroid po wnikięciu do komórki łączy się ze swoim receptorem. Związanie białka receptorowego z jego agonistą prowadzi do zmiany konformacji przestrzennej receptora - odłączenia Hsp90. Udowodniono też, że kompleks GK-GKR ulega fosforylacji, być może niezbędnej do jego pełnej aktywacji. Aktywowany kompleks hormon-receptor przyłącza się do sekwencji regulatorowych DNA, nazwanych elementami oddziaływującymi na glikokortykosteroidy – GRE (*glucocorticoid response elements*). Te sekwencje zawarte są w części regulatorowej genów kodujących białka syntetyzowane w odpowiedzi komórek na GK.

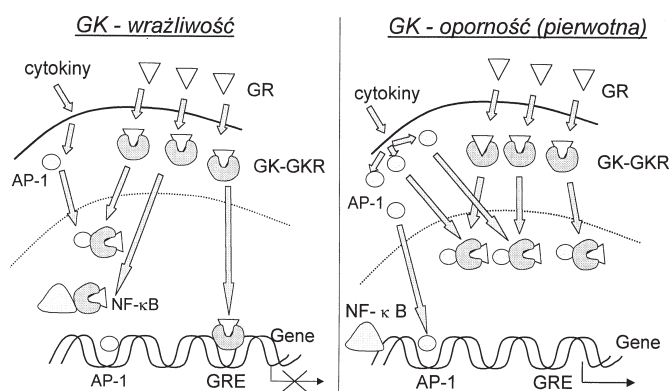
Istotą komórkowej odpowiedzi na GK jest aktywacja, albo represja, swoistych genów, określane jako transaktywacja i transrepresja. Jeśli wiązanie kompleksu prowadzi do aktywacji genu, określamy te sekwencje jako dodatnie (*positive GRE*). Z kolei hamujący efekt GK na syntezę białek jest pośredniczony przez „*negative GRE*”. Działanie GK w astmie związane jest z aktywacją genu lipokortyny-1, receptorów β -adrenergicznych, obojętnych

endopeptydaz, I- κ B α - inhibitora jądrowego czynnika kappa B (NF κ B), antyleukoproteazy (SLPI) – inhibitora elastazy [4,10].

GK hamują transkrypcję genów dla wielu białek. Szczególnie istotne jest hamowanie genów dla cytokin (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-13, czynnika martwicy nowotworów – TNF α , czynnika stymulującego granulocyty i makrofagi GM-CSF, RANTES, MIP-1 α , eotaksyny) i ich receptorów (np. receptora dla IL-2), a także enzymów i białek pośredniczących w reakcji zapalnej, jak indukowana syntaza tlenu azotu, indukowana postać cyklooksygenazy (COX 2), endotelina-1 czy receptor neurokininowy (NK $_1$) dla substancji P [4,10].

Aktualnie kluczowe znaczenie przypisuje się wpływowi GK na działanie cytokin odgrywających rolę w zapaleniu. GK hamują z jednej strony transkrypcję genów dla cytokin, a z drugiej strony syntezę innych białek aktywowanych w odpowiedzi na te cytokiny i aktywują syntezę białek (I- κ B α) wiążących czynniki transkrypcyjne uwalniane przez cytokiny - blokują więc ich efekt prozapalny. Warto również podkreślić, że większość objawów niepożądanych powstaje w wyniku transaktywacji swoistych genów. Transrepresja może jedynie powodować osteoporozę oraz supresję osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej (GK hamują ekspresję genu dla osteokalcyny i kortykotropiny) [15].

Bardziej szczegółowy mechanizm działania przeciwzapalnego GK obrazują wzajemne zależności między GK-GKR a czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak białko aktywatorowe AP1 czy jądrowy czynnik kappa B (NF κ B). Na podstawie dotychczasowych badań [10,14,15,16,17] wydaje się, że właśnie zaburzenia na tym etapie działania GK stanowią molekularną podstawę oporności na GK (ryc. 5). Białko aktywatorowe AP1 i NF κ B są regulatorami aktywności wielu genów odpowiedzialnych za rozwój zapalenia. Aktywowane AP1 i NF κ B, przez cytokiny i inne bodźce zapalne, wiążą się z sekwencjami DNA regulatorycznej części genu, ale tego samego



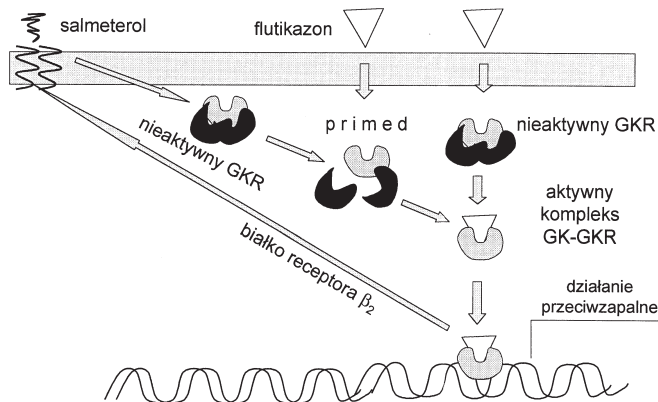
Ryc. 5. Zależność pomiędzy GKR a czynnikami transkrypcyjnymi (AP1 i NF κ B) u chorych GK-wrażliwych i z pierwotną opornością na GK (P. Barnes 1998 [10])

geny, w którym kompleks GK-GKR łączy się z GRE. Kompleks GK-GKR wywiera jednak przeciwny wpływ na transkrypcję w stosunku do AP1, NFκB i blokuje działanie cytokin. Obydwa białka regulatorowe, zwłaszcza przy ich wysokiej aktywności, mogą również bezpośrednio łączyć się z GK-GKR na terenie cytoplazmy lub jądra, znosząc wtedy jednak wzajemnie swoje efekty regulacyjne na ekspresję genów.

Podstawy molekularne niektórych trudności w leczeniu astmy

Adcock i wsp. [16] wykazali, że u chorych z pierwotną opornością na GK występuje upośledzone wiązanie kompleksu GK-GKR z GRE, które jest spowodowane wzrostem aktywności AP1 lub wzrostem powinowactwa AP1 do GKR i w konsekwencji nasileniem ich bezpośredniej interakcji (ryc. 5). W związku z tym kompleks GK-GKR nie tylko nie wiąże się z GRE, ale również z pozostałymi czynnikami transkrypcyjnymi (np. NFκB). Wyjaśnia to dlaczego w astmie oporność na GK manifestuje się tylko brakiem lub upośledzeniem ich funkcji przeciwzapalnej i ma charakter miejscowy (dotyczy tylko komórek, w których AP1 jest aktywowane) podczas, gdy inne wpływy są pozornie prawidłowe.

Mechanizmy wtórnej oporności są podobne [10,17]. Wśród przyczyn wymienia się nasilenie alergicznego procesu zapalnego, stosowanie wysokich dawek β₂-agonistów oraz zakażenia wirusowe. Im bardziej burzliwy rozwój reakcji zapalnej tym wyższa aktywność czynników transkrypcyjnych AP1 i NFκB oraz tym więcej „zneutralizowanych” kompleksów GK-GKR, w tym wypadku przez oba czynniki transkrypcyjne. Zastosowanie nieadekwatnej dawki GK w stosunku do nasilenia zapalenia może odpowiadać za względną oporność na GK. Przyczyną wzrostu aktywności czynników transkrypcyjnych i oporności na dotychczas stosowane dawki GK mogą być również zakażenia wirusowe. Może to być również jeden z mechanizmów, w którego wyniku infekcja wirusowa prowadzi do zaostrzenia astmy. Z kolei β₂-agoniści poprzez zwiększenie syntezy cAMP aktywują kinazę proteinową A, co prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego zależnego od cAMP (CREB - *cyclic AMP response element binding*). Istnieją dane wykazujące również wzajemną interakcję między CREB i kompleksem GK-GKR, co wyjaśniałoby niekorzystny efekt wysokich dawek leków o działaniu β₂-agonistycznym na przeciwzapalne działanie GK w astmie. Być może jest to powodem niejednoznacznych efektów ciągłej, podskórnej infuzji terbutaliny (CSIT - *continuous subcutaneous infusion of terbutaline*), metody będącej próbą leczenia „trudnej” astmy [18]. Uważa się, że częste (więcej niż dwa pojemniki na miesiąc) stosowanie β₂-mimetyku może być przyczyną oporności na GK [10]. Z tych względów ważny jest wybór odpowiedniej dawki GK w stanie astmatycznym, w ciężkim zaostrzeniu. Musimy uwzględnić nasilenie stanu zapalnego i fakt podawania dużych dawek β₂-agoni-

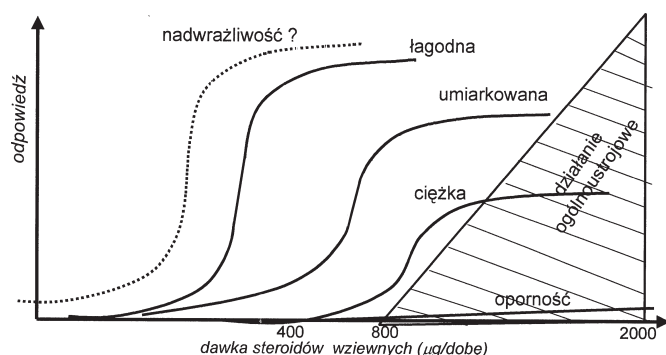


Ryc. 6. Hipotetyczny mechanizm działania Seretide

stów. Dlatego być może warto podjąć próbę analizy skuteczności leczenia ciężkiego napadu astmatycznego, wymaganych dawek β₂-agonistów i GK do osiągnięcia pożądanego efektu?

W świetle tych faktów szczególnie interesujące są wyniki badań [19,20] prezentowane przez M. Vignola na XIX Kongresie Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej w Lizbonie. Autor ten przedstawił molekularne podstawy działania Seretide (połączenie flutikazonu z salmeterolem) (ryc. 6). Salmeterol wiąże się długotrwale i wybiórczo z miejscem nieaktywnym receptora β₂ i pulsacyjnie stymuluje jego miejsce aktywne powodując zmianę konformacji receptora β, uwolnienie podjednostki α białka G związanego z tym receptorem. Białko G jest heterotrimerem czyli kompleksem trzech podjednostek. Podjednostka α pobudza cyklazę adenylową, prowadząc do powstania cAMP. Z kolei dwie pozostałe podjednostki białka G (β i γ) aktywują kinazy proteinowe, które przyczyniają się do zmiany konformacji GKR poprzez wpływ na jego fosforylację i dysocjację Hsp90. W tej sytuacji możemy mówić o zjawisku „*primingu*” czyli promowaniu działania GK przez salmeterol. Ten hipotetyczny model stwarza szeroką bazę dalszych prac badawczych, które należy śledzić, gdyż kolejne spostrzeżenia mogą uzasadnić stosowanie Seretide również w stanach, w których obserwujemy brak lub słabą reakcję na GK

Badania ostatnich lat wykazały, że nawet w normalnej populacji możemy obserwować różną odpowiedź na GK [21]. Wykazano, że 2,3% zdrowych osób wykazuje oporność na GK, zaś u 6,6% spotyka się „nadwrażliwość” na GK. Te badania mogą potwierdzić indywidualne obserwacje kliniczne. Są chorzy, u których dochodzi do szybkiego rozwoju objawów ubocznych, pomimo stosowania niskich dawek GK, podczas gdy u innych nie powstają nawet w czasie długotrwałej terapii z o wiele wyższymi dawkami. Może o tym świadczyć również szeroki zakres wymaganych dawek GK wziewnych niezbędnych do uzyskania kontroli astmy, konieczność stosowania w niektórych przypadkach ogólnych GK. Oporność na GK jest więc krańcową postacią wszystkich możliwych reakcji na GK (ryc. 7) [10].



Ryc. 7. Zakres wymaganych dawek GK-wziewnych niezbędnych do uzyskania kontroli astmy. (P. Barnes 1998 [10])

Z całkowitą opornością na GK spotykamy się niezmiernie rzadko. Częstość astmy nie reagującej na GK nie jest dokładnie znana, wydaje się dotyczyć mniej niż 1:1000 chorych na astmę [10,17]. Częściej spotykamy się z chorymi, którzy wymagają wysokich dawek wziewnych, dostarczanych GK do uzyskania poprawy klinicznej. Częściej oporność na GK ma charakter miejscowy związany z nasilonym rozwojem reakcji zapalnych, wysoką aktywnością cytokin w obrębie dróg oddechowych, zaś pozostałe komórki (te poza układem oddechowym) mają zachowaną wrażliwość na GK, niestety manifestującą się najczęściej występowaniem objawów ubocznych. I może z tych względów niektórzy autorzy uważają, że należy podjąć próbę leczenia (oczywiście przez określony czas) takich chorych maksymalnymi dawkami steroidów wziewnych [22] o silnych właściwościach przeciwzapalnych i dużym powinowactwie do receptora, zanim doda się steroid systemowy lub zwiększy się jego dawkę. Chung i wsp. [22] uważają, że takie postępowanie może okazać się skutecznym sposobem uniknięcia agresywnej steroidoterapii systemowej. Ostatnio obserwacje te zweryfikowano za pomocą technik biologii molekularnej wykazując, że flutikazon niezwykle silnie hamuje aktywność AP1 i NFκB w komórkach nabłonka dróg oddechowych w badaniach na linii komórkowej A549 [15]. Z kolei zasadą steroidoterapii systemowej powinno być przeniesienie głównej dawki GK na popołudnie. Szefler i wsp. [23] wskazują, że w tym czasie występuje maksymalna odpowiedź na GK. Takie postępowanie uwzględnia również zmienność dobową czynności płuc i ekspresji procesu zapalnego [24]. I rów-

nież w tym wypadku (oczywiście po wykluczeniu innej przyczyny braku poprawy po zastosowaniu typowego leczenia) zdarzają się pacjenci, którzy reagują na znacznie większe dawki systemowych steroidów. Należy podjąć próbę leczenia dużymi dawkami lub dawkami wzrastającymi do uzyskania korzystnego efektu. Uważa się, że nie ma podstaw, aby agresywną steroidoterapię wydłużyć powyżej dwóch tygodni [23]. Próby te należy jednak podejmować, ponieważ problemem w leczeniu astmy odpornej na steroidy jest nie tylko łagodzenie objawów choroby, ale zapobieganie powstaniu nieodwracalnych zmian w drogach oddechowych, co jak dotąd udaje się tylko GK.

W związku z tym, że nie dysponujemy metodami laboratoryjnymi pozwalającymi na określenie przyczyn braku reakcji na GK to znajomość molekularnych podstaw, przynajmniej niektórych sytuacji klinicznych, w jakich zmienia się odpowiedź na GK, może ułatwić postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne. Rozwiązaniem również byłaby możliwość monitorowania nasilenia procesu zapalnego w drogach oddechowych i dostosowanie sposobu leczenia do tego parametru niezależnie od oceny klinicznej i badań czynnościowych układu oddechowego, które nie do końca wyjaśniają skali poruszanego problemu. W badaniach *in vitro* jest możliwa ocena skuteczności danego GK poprzez pomiar jego siły transaktywacji i transrepresji [15]. Badania te pozwalają również przewidzieć stopień nasilenia objawów ubocznych. Przeniesienie jednak tej metody diagnostycznej do praktyki klinicznej wydaje się dalekie.

Pewne nadzieje mogą budzić badania kohortowe europejskiego zespołu (*the European Network For Understanding Mechanisms of Severe Asthma*) zaplanowane celem m.in. poszukiwania polimorfizmu genomu w tzw. „trudnej” astmie. Badania te może pozwolą na zdiagnozowanie tych chorych na wcześniejszych etapach rozwoju choroby.

Wyjaśnienie zagadnień związanych z trudnościami w leczeniu astmy, uwzględniające również molekularne aspekty działania GK, pozwoli nie tylko na lepszą diagnostykę, ale być może wyznaczy nowe kierunki poszukiwania coraz skuteczniejszych leków przeciwastmatycznych.

Autorzy składają podziękowania Pani Beacie Rusek za pomoc techniczną przy graficznym opracowaniu pracy.

Piśmiennictwo

1. Gustafsson J-A, Carlstedt-Duke J, Poellinger L i wsp. Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Rev* 1987; 8: 185-231.
2. Grzanka A, Jarzab J, Rogala B. Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów. *Pol Arch Med Wewn* 1996; 95: 375-382.
3. Miesfeld RL. Molecular genetics of corticosteroid action. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 11-17.
4. Barnes PJ. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 1997; 10: 3-19.
5. Van den Berg HW, Lynch M, Martin JH. The relationship between affinity of progestins and antiprogestins for the progesterone receptor in breast cancer cells (ZR-PR-LT) and ability to down-regulate the receptor: evidence for heterospecific receptor modulation via the glucocorticoid receptor. *Eur J Cancer* 1993; 29: 1771-1775.
6. Matsuo N, Shimoda T, Matsuse H, Kohno S. A case of menstruation-associated asthma: treatment with oral contraceptives. *Chest* 1999; 116: 252-253.

7. Ferrini M, Lima A, Nicola AF. Estradiol abolishes autologous down regulation of glucocorticoid receptors in brain. *Life Sciences* 1995; 57: 2403-2412.
8. Skobeloff EM, Spivey WH, Silverman R i wsp. The effect of the menstrual cycle on asthma presentations in the emergency department. *Arch Inter Med* 1996; 156: 1837-1840.
9. Tan KS, McFarlane LC, Lipworth BJ. Paradoxical down-regulation and desensitization of beta2-adrenoceptors by exogenous progesterone in female asthmatics. *Chest* 1997; 111: 847-851.
10. Barnes PJ. Glucocorticosteroids. W: *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. Wyd. Barnes PJ, Rodger IW, Thompson NC, San Diego: Academic Press 1998: 725-766.
11. Tan KS, McFarlane LC, Lipworth BJ. Loss of normal cyclic beta2 adrenoceptor regulation and increased premenstrual responsiveness to adenosine monophosphate in stable female asthmatic patients. *Thorax* 1997; 52: 608-611.
12. Tan KS, McFarlane LC, Lipworth BJ. Modulation of airway reactivity and peak flow variability in asthmatics receiving the oral contraceptive pill. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1273-1277.
13. Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA i wsp. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and beta 2-receptors. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 224-234.
14. Newton R, Barnes PJ, Adcock IM. Transcription Factors. W: *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. Wyd. Barnes PJ, Rodger IW, Thompson NC, San Diego: Academic Press 1998: 459-474.
15. Jaffuel D, Demoly P, Balaguer P i wsp. Transcriptional potencies of inhaled glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 57-63.
16. Adcock IM, Lane SJ, Brown CA i wsp. Abnormal glucocorticoid receptor/AP1 interaction in steroid resistant asthma. *J Exp Med* 1995; 182: 1951-1958.
17. Lane SJ, Lee TH. Mechanisms of corticosteroid resistance in asthmatic patients. *Int Arch Clin Immunol* 1997; 113: 193-195.
18. Packham S. Difficult asthma. *Eur Respir J* 2000; 15: 233.
19. Dowling RB, Johnson M, Cole PJ i wsp. Effect of fluticasone propionate and salmeterol in *Pseudomonas aeruginosa* infection of the respiratory mucosa in vitro. *Eur Respir J* 1999; 14: 363-366.
20. Anenden V, Egemba G, Kessel B i wsp. Salmeterol facilitation of fluticasone-induced apoptosis in eosinophils of asthmatics pre- and post- antigen challenge. *Eur Respir J* 1998; 12: 157.
21. Lamberts SW. The glucocorticoid insensitivity syndrome. *Hormone Research* 1996; 45: 2-4.
22. Chung KF, Godard P, Adelroth E i i wsp. Difficult/therapy – resistant asthma. *Eur Respir J* 1999; 13: 1198-1208.
23. Szeffler SJ, Leung DYM. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Resp J* 1997; 10: 1640-1647.
24. Kowalski J, Franczuk M. Zmienność okołodobowa czynności płuc w astmie oskrzelowej. *Pneumonol Alergol Pol* 1997; 65: 104-112.