

Kortikorezistentní astma – aktuální klasifikace, definice a molekulární mechanizmy glukokortikoidní rezistence na buněčné úrovni

Jan Potěšil¹, František Kopřiva¹, Marek Godava², Mariana Svetlíková¹

¹Dětská klinika, LF UP a FN Olomouc

²Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Olomouc

Průduškové astma (astma) je jedním z nejčastějších chronických zánětlivých onemocnění v české populaci. Obecně se řadí mezi onemocnění s nedostatečnou nebo neadekvátně regulovanou systémovou zánětlivou aktivitou, projevující se chronickými zánětlivými změnami v cestách dýchacího systému. V léčbě je užívána komplexní léčebná strategie, stupňovitě vedená, jejímž farmakologickým základem je aplikace imunomodulačních léčiv. Lékem volby, ale i nejčastěji aplikovaným imunomodulačním léčivem, jsou inhalační glukokortikoidy. Spíše ojediněle je u jedinců s astmatem prokázána glukokortikoidní rezistence, která je definována termínem kortikorezistentní astma. Jedinci s kortikorezistentním astmatem nejen že neprofitují z terapie glukokortikoidy, ale jsou navíc zatíženi častějšími nežádoucími účinky z důvodu užívání vyšších dávek glukokortikoidů. Klasifikace astmatu, od které se odvíjí stupňovité vedení komplexní léčebné strategie, není nadále jednotná a prochází neustálým vývojem. V následujícím přehledu bude kortikorezistentní astma definováno a zařazeno do aktuální doporučené české národní klasifikace astmatu. Budou uvedeny prokázané nebo předpokládané molekulární mechanizmy glukokortikoidní rezistence na buněčné úrovni u jedinců s kortikorezistentním astmatem.

Klíčová slova: průduškové astma, glukokortikoidy, glukokortikoidní rezistence, kortikorezistentní astma.

Steroid resistant asthma: classification, definition and molecular mechanisms of the glucocorticoid resistance on the cell level

Asthma is one of the most frequent chronic inflammatory disease amongst czech population. Generally asthma is caused by insufficient or inadequate regulation of systemic inflammatory activity manifested by chronic inflammatory changes in the airways of respiratory system. Complex treatment strategy, management approach based on treatment steps, is used in the treatment, with application of immunomodulatory drugs as a pharmacological base. Inhaled glucocorticoids are the drug of choice and concurrently the most often applied immunomodulatory drug amongst asthmatics. Glucocorticoid resistance amongst asthmatics – steroid (glucocorticosteroid) resistant asthma – is rather rarely. However, these steroid resistant asthmatics do not make a profit from the glucocorticoid therapy. Additionally, they suffer from more frequent side effects caused by taking higher doses of glucocorticoids. Steroid resistant asthma is exactly defined and classified. Classification of asthma, from which stepped management of complex treatment strategy is derived, is not yet unified and is still in the incessant process. In the following review steroid resistant asthma will be defined and classified according to actual czech national and international recommendations of asthma. Proven or expected molecular mechanisms of steroid resistant asthma on the cell level will be shown.

Key words: asthma, glucocorticoid, glucocorticoid resistance, steroid resistant asthma.

Klin Farmakol Farm 2014; 28 (1): 31–35

Průduškové astma

Průduškové astma (astma) je syndromem různě vyjádřených a vzájemně se překrývajících fenotypů projevujících se na podkladě systémové aktivity organismu (imunopatologické reaktivity), která vede k chronickým zánětlivým změnám v cestách dýchacího systému (1, 2, 3). V České republice je odhadována celopopulační prevalence na asi 8 % a prevalence u dětí do 19 let věku na 10–15 % (4).

Komplexní léčebná strategie, klasifikace

V léčbě astmatu je užívána komplexní léčebná strategie (farmakologická i nefarmakologická)

zohledňující nejen individualitu léčeného jedince (např. věk, aktivitu, spolupráci, preventivní opatření, těhotenství), ale také léčbu možných souběžných onemocnění, které mohou ovlivnit samotné astma nebo jeho komplexní terapii. Součástí této komplexní léčebné strategie je stupňovité vedení léčby, které se odvíjí od klasifikace astmatu.

Astma je nejčastěji klasifikováno podle tíže onemocnění a odpovídá na stávající léčebnou strategii (intermitentní, lehké perzistující, středně těžké perzistující, těžké perzistující), podle dosažené úrovně kontroly onemocnění stávající léčebnou strategií (pod kontrolou, pod částečnou kontrolou, pod nedostatečnou kontrolou) nebo podle fenotypu (alergické a nealergické;

alergické, vyvolané viry, ponámahové, nedořešené; eozinofilní alergické, eozinofilní nealergické, non-eozinofilní, neurčené) (5, 6, 7). V národních českých doporučeních je preferována klasifikace podle úrovně kontroly onemocnění, vycházející z dokumentu Global Initiative for Asthma (GINA 2012 a GINA 2009) (4, 7, 8, 9). Z praktického hlediska je doporučováno užívat současně u jedinců s astmatem klasifikaci jak podle tíže, tak podle kontroly onemocnění (např. těžké perzistující astma pod kontrolou) (4). Nebo používat tzv. multifunkční kombinovanou klasifikaci astmatu zohledňující i fenotyp astmatu (např. těžké perzistující astma pod kontrolou, eosinofilní alergické (7).

Schéma 1. Doporučené schéma stupňovitého vedení léčby na základě kontroly nad astmatem u dospělých jedinců. (Upraveno podle: Doporučený postup diagnostiky a léčby astmatu, 2013. Česká pneumologická a ftizeologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně (7))

Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	Stupeň 4	Stupeň 5
intermitentní astma	lehké perzistující astma	středně těžké perzistující astma aktuální stupeň léčby je-li pod kontrolou, krok směrem dolů není-li pod kontrolou, krok směrem nahoru	těžké perzistující astma	těžké refrakterní astma

Kauzální (příčinná) léčba astmatu neexistuje. Hlavním cílem komplexní léčebné strategie je dosažení a udržení kontroly onemocnění, která je dána nejen odstraněním klinických projevů, ale i eliminací reziduální aktivity onemocnění. Stupňovité vedení léčby významně zohledňuje takto ideálně chápanou úroveň dosažené kontroly. Jejím principem je úprava léčby postupně po jednotlivých stupních (jednotlivých krocích) tak, aby bylo dosaženo a udrženo kontroly onemocnění. V národním českém doporučení je u dospělých užívána 5stupňová léčba astmatu (1. až 5. stupeň) (schéma 1), u dětí je užívána 5stupňová léčba (nebo ve stejném významu užívaném termínu 5kroková léčba (1. až 5. krok)) vycházející z doporučení mezinárodních dokumentů (od 2 nebo od 5 let) (7, 9, 8).

Glukokortikoidy v terapii astmatu

Farmakologickým základem takto vedené léčby je aplikace léčiv modulujících zánětlivou aktivitu organismu (převážně protizánětlivé) a je pro ni obecně užíván termín kontrolující (preventivní) léčba. Glukokortikoidy (glucocorticoids, GC) patří mezi nejúčinnější známá imunomodulační léčiva. K optimalizaci léčby a minimalizaci neúčinných účinků byly do klinické praxe zavedeny inhalačně podávané GC (inhaled glucocorticoids, IGC), které jsou v současné době jako kontrolující léčiva užívána u převážné většiny jedinců s astmatem.

IGC v cestách dýchacího systému příznivě a významně modulují imunopatologickou (a patologickou) reaktivitu – snižují počet eozinofilů, mastocytů a dendritických buněk, zamezují ztluštění bazální membrány sliznice a rozvoji hyperplazie a hypertrofie hladké svaloviny. Již vzniklé strukturální změny dýchacího systému ale neovlivní (10). Významný imunomodulační vliv GC je dán inhibicí exprese (a většinou i inhibicí sekrece) prozánětlivých cytokinů T-lymfocyty, alveolárními makrofágy i epitelálními buňkami v cestách dýchacího systému a indukci exprese (a většinou i indukci sekrece) protizánětlivých cytokinů a receptorů blokujících aktivitu prozánětlivých cytokinů. GC komplexně a na několika úrovních modulují nejen expresní, ale např. i signální, transportní a degradační aktivitu buňky (indukci nebo inhibici této aktivity). Tato modulace je klasicky dělena na tzv.

negenomovou (tj. bez přímé vazby komplexu s GC s DNA) a genomovou (tj. s přímou vazbou komplexu s GC s DNA). Negenomová i genomová modulace, ať už přímo nebo nepřímo, velmi výrazně zasahuje do transkripčních, posttranskripčních, translačních a posttranslačních buněčných mechanismů. Obecně je komplexní proces GC modulace indukující cílovou aktivitu buňky označován jako transaktivace, a proces inhibované aktivity jako transreprese.

IGC aplikované v nízké dávce jsou lékem volby u dětí a dospělých na úrovni 2. stupně léčby a vždy jsou součástí léčby v nízké, střední nebo vysoké dávce od 3. stupně léčby (schéma 1) (6, 7, 8, 9). Systémová aplikace GC je jednou z možností terapie na úrovni 5. stupně léčby – tato aplikace by měla být užitá jen při terapii těžkého perzistujícího astmatu, které je pod nedostatečnou kontrolou, kdy ke kontrole onemocnění nevedly předchozí stupně (kroky) léčby v rámci komplexní léčebné strategie (7, 8).

Astma u jedinců, u kterých je nutné aplikovat v 5. stupni léčby systémové GC, je v národním českém doporučení označováno jako tzv. obtížné léčitelné astma (OLA) v širším slova smyslu (7, 11). U těchto jedinců může vést systémová terapie GC k dostatečné nebo částečné kontrole onemocnění (těžké perzistující astma pod kontrolou nebo těžké perzistující astma pod částečnou kontrolou), nebo nevede k žádné odezvě (těžké perzistující astma pod nedostatečnou kontrolou). Příčinou nedostatečné nebo žádné odezvy na systémovou terapii GC ještě nemusí být GC rezistence. Převážně z diferenciálně diagnostických důvodů jsou jedinci, zařazení do OLA v širším slova smyslu, děleni do dvou podskupin. Do podskupiny jedinců s OLA v užším slova smyslu, kdy příčinou obtížné nebo nedostatečné kontroly onemocnění jsou nepoznané nebo nesnadno

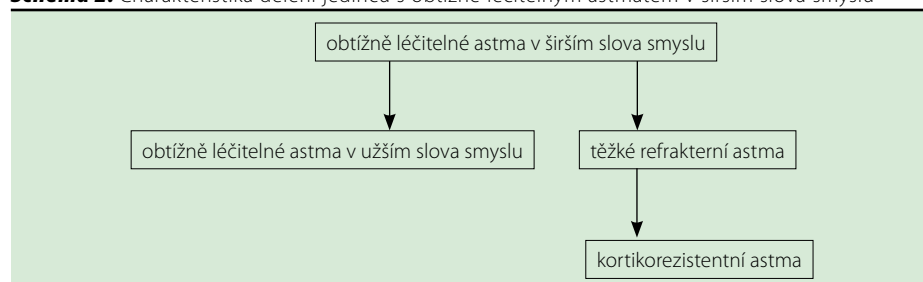
ovlivnitelné faktory (např. psychosociální a environmentální faktory, souběžná onemocnění), a do podskupiny těžkého refrakterního astmatu (severe refractory asthma, SRA), kdy je příčinou nedostatečné kontroly onemocnění skutečná tíže astmatu (1, 12, 13, 14). Do podskupiny jedinců s těžkým refrakterním astmatem patří i jedinci s GC rezistencí, tj. jedinci s tzv. kortikorezistentním astmatem (1), kteří v této podskupině tvoří další podskupinu (schéma 2).

Přibližně 5 % astmatiků může mít OLA v širším slova smyslu. Jak významně se GC rezistence podílí na OLA v jednotlivých věkových skupinách ještě není dostatečně známo. Například u adolescentních astmatiků s OLA byla GC rezistence prokázána až u 25 % jedinců (15).

Kortikorezistentní astma – definice

Pro klinické potřeby je doporučeno verifikovat kortikorezistentní astma funkčním plicním vyšetřením. Hodnoceným kritériem je změna hodnoty objemu vzduchu, který je možno usilovně vydechnout za jednu sekundu (forced expiratory volume in 1 second, FEV1) při systémové terapii GC. Astma je definováno jako kortikorezistentní, je-li naměřená hodnota FEV1 nižší než 75 % prediktivní hodnoty a ke zlepšení hodnoty FEV1 o 15 % nedojde během 14denní nebo po 14denní systémové terapii prednisonem (u adolescentů a dospělých v denní dávce 40 mg) (16), u dětí není denní dávka jednoznačně definována, ale je předpokládána v rozmezí 0,5–1 mg/kg tělesné hmotnosti do maximální denní dávky 40 mg). Nejpозději před tímto verifikováním musí být vyloučeny jiné faktory způsobující OLA v užším slova smyslu. Před zvažováním zahájení systémové terapie GC je doporučeno odeslat jedince na specializované pracoviště Národního centra pro těžké astma

Schéma 2. Charakteristika dělení jedinců s obtížně léčitelným astmatem v širším slova smyslu



(11). Jedinci s kortikorezistentním astmatem nejen že neprofitují z terapie GC, ale jsou navíc zatíženi častějšími nežádoucími účinky léčby z důvodu užívání vyšších dávek GC (včetně IGC).

Mnohé výzkumné práce objasňují nebo alespoň poodhalují možné molekulární mechanismy GC rezistence u jedinců s astmatem. Pro vývoj klasifikace astmatu v čase (s důrazem na kontrolu onemocnění), pro přetrvávající terminologickou nejednotnost klasifikace (zvláště u těžkých forem astmatu – např. těžké perzistující astma, těžké astma, problematické astma, OLA), stejně jako pro mnohdy nejednoznačně definovanou „nedostatečnou odezvu na GC terapii“, bude v následujícím textu v souvislosti s molekulárními mechanismy GC rezistence pro sjednocení pojmů užíván:

- obecný, blíže nedefinovaný termín s širším významem „astma s nedostatečnou odezvou na GC terapii“;
- přesně definovaný termín kortikorezistentní astma, pokud byl tento termín v citované studii uveden.

Pro úplnost budou uvedeny i práce, které se věnovaly molekulárním mechanismům GC rezistence také u jiných chronických onemocnění s nedostatečnou nebo neadekvátní regulací zánětlivé aktivity (tj. u onemocnění s autoimunitní nebo autoinflamatorní imunopatologickou reaktivitou), kdy u jedinců s astmatem můžeme předpokládat stejný mechanismus rezistence (který zatím nebyl studován, nebo prokázán).

Kortikorezistentní astma – molekulární mechanismy rezistence

Endogenní GC mají významnou úlohu v regulaci homeostázy makroorganismu danou komplexním působením na aktivitu několika systémů – ovlivňují jejich metabolickou aktivitu a především regulují aktivitu endokrinního a imunitního systému (17). Regulační vliv na většinu systémů makroorganismu mají i terapeuticky aplikované (exogenní) GC. Změna aktivity těchto systémů způsobená endogenními a (a nebo) exogenními GC nebo obecně environmentálními vlivy se také může podílet na GC rezistenci (18, 19). Následující přehled bude zaměřen na buněčnou (ne systémovou) úroveň působení GC, která je dávana do souvislosti s molekulárními mechanismy GC rezistence.

Exogenní GC se účastní stejných redukčních, oxidačních, hydroxylačních a konjugačních reakcí jako endogenní GC. Při kontaktu s cytoplazmatickou membránou buněk se mohou vázat

na glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor, GR) vázaný v cytoplazmatické membráně (membránový GR, membrane-bound GR), nebo pasivní difuzí prostupují přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy.

Membránový GR, efektorový protein se specifickým vazebným místem pro GC, je sdružen s dalšími proteiny v tzv. multiproteinovém komplexu (20). Po vazbě s GC (ligandem) prochází membránový GR komplex konformačními změnami vedoucími k signálové transdukcí. Mechanismy a regulační účinky této signálové transdukce jsou nadále studovány a současně ne zcela objasněny. Mimo jiné dochází k četným a velmi rychlým imunoregulačním reakcím (20, 21, 22). Úroveň exprese membránového GR se mezi buňkami liší a obecně vyšší expresi mají buňky imunitního systému. Při zvýšené aktivitě onemocnění (revmatoidní artritida) je exprese u buněk imunitního systému ještě zvyšována (23). Do jaké míry se může membránový GR podílet na GC rezistenci u jedinců s astmatem není známo. Jeho vliv na GC rezistenci se dá teoreticky předpokládat jen tehdy, pokud by zvýšená membránová exprese GR (zvýšená membránová receptorová denzita) při zvýšené zánětlivé aktivitě nevedla k zesílení signálové transdukce:

- vyčerpáním možností imunoregulačních reakcí;
- silentním chováním způsobeném absencí sdružení membránového GR v efektorovém multiproteinovém komplexu.

GC nevázané s membránovým GR pasivní difuzí prostupují do cytoplazmy. V cytoplasmě se GC mohou vázat na volně rozptýlený GR (24), nebo ještě nevázané na GR mohou být aktivně transportovány zpět z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu mimo buňku proteinem vícečetné lékové rezistence 1 (multi-drug resistance protein 1, MDR1) (25, 26). MDR1 je transmembránový transportér, který se podílí na buněčném primárním aktivním transportu. Je přítomen v buňkách tkání, které oddělují zevní a vnitřní prostředí (včetně buněk sliznice dýchacích cest), v buňkách bariér imunologicky privilegovaných tkání i v mnohých buňkách imunitního systému. Jeho zvýšená exprese nebo zvýšená transportní aktivita vede k výraznému snížení koncentrace volného GC v cytoplasmě (27). Expresi MDR1 zvyšuje např. interleukin-2 (IL-2) (27). A právě jedinci s kortikorezistentním astmatem mají zvýšenou buněčnou expresi IL-2 v cestách dýchacího systému (28). Tyto vzájemné interakce by mohly v některých případech vysvětlit rezistenci na IGC. Vysvětlením příči-

ny rezistence na systémově aplikované GC by mohla být zvýšená lymfocytární exprese nebo transportní aktivita MDR1, i když u jedinců s kortikorezistentním astmatem nebyla zvýšená exprese MDR1 u cirkulujících lymfocytů prokázána (29, 30, 31, 33).

GC, který nebyl aktivně transportován z cytoplazmy mimo buňku, se váže na GR (24). GR, efektorový protein, člen jaderné receptorové superrodiny transkripčních faktorů, je volně rozptýlen v cytoplasmě všech lidských buněk. V cestách dýchacího systému je GR zvýšeně exprimován v cytoplasmě buněk alveolů a endotelu (33). I když je GR kódován jen jedním genem (genem pro glukokortikoidní receptor, human glucocorticoid receptor gene, hGR gene), jeho struktura, určená alternativním sestřihem, má několik izoform (34). Obecně je za základní izoformy pokládáno pět izoform, označovaných jako – GR α , GR β , GR-P, GR γ a GR-A (35). Jen izoforma GR α váže GC. Základní izoforma GR α má ještě další izoformy (např. GR-A, GR-B, GR-C1, GR-C2, GR-C3, GR-D1, GR-D2 a GR-D3, vzniklých alternativním sestřihem a alternativní iniciací translace), které mohou výrazně ovlivnit buněčnou (a tkáňově) specifickou funkční aktivitu GR α a určit tak buněčně specifickou odpověď na GC (36, 37). Tím je obecně vysvětlována různá úroveň vnímavosti jedince na GC léčbu (v závislosti na zvoleném GC léčivu a aplikační formě GC léčiva). Např. izoforma se třemi nesynonymními jednonukleotidovými polymorfizmy (single-nucleotide polymorphisms, SNPs), GR NS-1 vykazuje výraznou funkční aktivitu pro GC, naopak izoforma s jednonukleotidovou delecí GR DL-1 má funkční aktivitu pro GC výrazně sníženou (38). Extrémně vzácná mutace genu pro GR (hGR genu), jejímž následkem je generalizovaná glukokortikoidní rezistence, nebyla u jedinců s kortikorezistentním astmatem prokázána.

V cytoplasmě je GR α , před vazbou s GC, součástí hetero-oligomerního multiproteinového komplexu (např. s chaperonovými proteiny – heat shock proteinem 90 (heat shock protein 90, HSP90), HSP70 a HSP50) (39). Po vazbě GC na GR α je zformován komplex glukokortikoid-glukokortikoidní receptor α (glucocorticoid-glucocorticoid receptor α complex, GC-GR α komplex), který prochází určitými konformačními změnami zajišťujícími signálovou transdukcí – především jsou od GR α uvolněny chaperonové proteiny, je odkryt tzv. jaderný lokalizační signál GR α a GR α je acetylován (40). Takto změněný a aktivovaný komplex je translokován do jádra (39, 41). Na mechanismu jaderné translokace se podílí importující proteiny jádra importin- α a importin-13 (42).

Příčinou GC rezistence na úrovni vazby GC na GR α může být zvýšená nitrosylace nebo fosforylace GR α mající za následek sníženou vazebnou afinitu pro GC. Nitrosylaci GR α (*in vitro*) způsobuje oxid dusnatý (NO) (43). Jedinci s nedostatečně nebo částečně kontrolovaným astmatem mají v buňkách cest dýchacího systému zvýšenou expresi indukibilní NO syntázy, která produkuje velké množství NO. Fosforylace GR α je zase způsobena vyšší aktivitou některých kináz. Např. jedinci s astmatem s nedostatečnou odezvou na GC terapii měli zvýšenou aktivitu mitogenem aktivované proteinkinázy p38 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) (44). Endogenním inhibitelem p38MAPK je MAPK fosfatáza 1 (MAPK phosphatase 1, MPK1). MPK1 nejen že snižuje aktivitu p38MAPK, ale je také důležitým negativním regulátorem indukce zánětlivé aktivity a jeho absence podstatně snižuje buněčnou odezvu na GC (*in vitro* studie na myších makrofázích) (45). V alveolárních makrofázích získaných od jedinců s astmatem s nedostatečnou odezvou na GC terapii, byla prokázána signifikantní redukce exprese MKP1 (44). GR α může být fosforylován několika kinázami (aktivovanými prozánětlivými, na imunopatologické reaktivitě astmatu podílejícími se cytokiny (46, 47, 48, 49)), které tak mohou ovlivnit nejen vazebnou afinitu GR α pro GC, ale i interakci GR α s chaperony, stabilitu GC-GR α komplexu i jeho translokaci do jádra (50).

Omezenou translokaci do jádra způsobuje fosforylace serinu v pozici 226 (Ser226) GR α , která má za následek nedostatečnou (neadekvátní) interakci GR α s importujícím proteinem (importin- α) (51, 52). V *in vitro* studiích omezuje translokaci GC-GR α komplexu cytokiny IL-13 (samostatně) a IL-2 a IL-4 (v kombinaci) (53, 54, 55). Příčinou je aktivace izoformy p38MAPK (p38MAPK α a p38MAPK γ) těmito cytokiny, a následná fosforylace Ser226 izoformami p38MAPK (46, 47). Jedinci s kortikorezistentním astmatem nejen že mají zvýšenou buněčnou expresi cytokinu IL-2 v cestách dýchacího systému, ale také cytokinu IL-4 (28). Navíc GC nezpůsobí u jedinců s kortikorezistentním astmatem inhibici exprese těchto cytokinů (účastníků se imunopatologické reaktivity (49)), stejně jako cytokinů IL-5 a interferonu- γ (IFN- γ) (28, 56). Inhibice exprese těchto cytokinů je jinak jednou z charakteristik imunomodulačního působení GC.

Jaderná translokace může být ovlivněna i dalšími mechanismy vedoucími ke GC rezistenci. Sníženou schopnost jaderné translokace GC-GR α komplexu může způsobit i GR β . Po eliminaci GR β z alveolárních makrofágů (získaných od jedinců s astmatem) se zvýšila jaderná lokalizace GR α

a odezva na GC (57). U většiny buněk je fyziologická exprese GR β výrazně nižší než GR α (ale např. neutrofily mají vyšší expresi GR β než GR α) (58). U jedinců s astmatem s nedostatečnou odezvou na GC terapii i u jedinců s kortikorezistentním astmatem byla prokázána zvýšená exprese GR β v buňkách cest dýchacího systému (59, 60), ale jiné studie tyto závěry nepotvrdily (58, 61). Expresi GR β zvyšují nejen některé prozánětlivé cytokiny podílející se na imunopatologické reaktivitě astmatu, ale i mikrobiální antigeny (62, 63, 64).

GC-GR α komplexy translokované do jádra se vážou (jako homodimerní komplexy) na specifické úseky DNA v promotorové oblasti genů cílových pro steroidní hormony (steroid-responsive genes), označované jako glucocorticoid response elements (GREs), kdy pravděpodobně nezbytnou podmínkou této vazby je předchozí acetylace GR α (40), a interakci s transkripčními koaktivačními faktory (kofaktory) indukují (případně inhibují) transkripci cílových genů (65, 66). Jedním z mechanismů GC rezistence na této úrovni je fosforylace GR α (Ser226), která také inhibuje vazbu GC-GR α komplexu s GREs (47). Další příčinou GC rezistence je zvýšená receptorová denzita GR β v jádře. Jak již bylo uvedeno, prozánětlivé cytokiny u astmatiků zvyšují expresi GR β . GR β může u jedinců s astmatem ve zvýšené míře kompetovat s GC-GR α komplexem ve vazbě na GREs, kdy GR β působí jako dominantně negativní inhibitor (62, 63).

GC-GR α komplex v jádře může, pravděpodobně jako monomer, inhibovat transkripci cílových genů nezávisle na vazbě s DNA – interakci s jinými transkripčními faktory a kofaktory, např. s aktivačním proteinem-1 (activator protein-1, AP-1), nukleárním faktorem- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) a dalšími aktivátory transkripce, stejně jako se signálními transduktory (67, 68, 69, 70). Pro interakci GC-GR α komplexu s NF- κ B je nezbytná deacetylase histonů (kolem kterých bude GR α ovinut) histonovou deacetylázou 2 (histone deacetylase 2, HDCA2) (71). Jedinci s astmatem s nedostatečnou odezvou na GC terapii měli v alveolárních makrofázích, ale i v cirkulujících (mononukleárních) leukocytech sníženou expresi HDCA2 (72). Prozánětlivý cytokin tumor nekrotizující faktor- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), který se také účastní imunopatologické reaktivity, zvyšuje expresi AP-1 i NF- κ B. Zvýšená exprese AP-1 i NF- κ B v jádře by mohla být u jedinců s astmatem jednou z teoretických příčin GC rezistence (73).

Teoreticky se na GC rezistenci může podílet i samotná GC indukovaná transkripce cílových genů (a následná exprese). GC zvyšují expresi makrofágového faktoru inhibice migrace (macro-

phage migration inhibitory factor, MIF), produktu MIF genu, který má výrazný anti-GC účinek. Mimo jiné inhibuje expresi MKP-1 (74, 75). U jedinců s astmatem byla prokázána zvýšená sekrece MIF cirkulujícími eozinofily (76). Obdobně GC zvyšují expresi proteinu MDR1, produktu ABCB1 genu, např. v lymfocytech (77). MDR1 aktivně transportuje GC (včetně IGC) z cytoplazmy mimo buňku (25, 26). I když nebyla u jedinců s astmatem zvýšená exprese MDR1 u cirkulujících lymfocytů prokázána (tj. u jedinců s astmatem léčených IGC (78) a u jedinců s kortikorezistentním astmatem (79)), je zvýšená lymfocytární exprese nebo transportní aktivita MDR1 jako příčina GC rezistence popsána u jiných chronických zánětlivých onemocnění (revmatická artritida (31, 80), systémový lupus erythematosus (81, 82, 83), nespecifický střevní zánět (29)). Navíc, expresi MDR1 může zvýšit levotočivý enantiomer cetirizin – R-enantiomer levocetirizin (*in vitro*, buněčná linie Caco-2 původem z lidského kolorektálního karcinomu užívaná jako model epitelálních buněk střeva) (84). Cetirizin dihydrochlorid a levocetirizin dihydrochlorid, piperazinová antihistaminika druhé generace, jsou často v systémové aplikační formě souběžně užívána u jedinců s alergickým astmatem léčených GC (IGC). Zatím nezodpovězenou otázkou je, zdali levocetirizin nezvyšuje expresi MDR1 také u epitelových buněk dýchacího systému, případně u lymfocytů.

Po indukci nebo inhibici transkripce cílových genů v jádře GC-GR α komplexem GR α z tohoto komplexu disociuje. Disociovaný GR α má velmi nízkou afinitu vazby k GREs a je transportován zpět do cytoplazmy, kde je znovu „recyklován“. Nebo může být (v jádře nebo v cytoplasmě) po předchozí ubiquitinaci degradován v proteasomu (85). Snížená receptorová denzita v cytoplasmě v důsledku zvýšené ubiquitinace GR α E3 ubiquitin ligázou by také mohla být jedním z teoretických mechanismů GR rezistence (86).

Literatura

1. Bel EH, Sousa A, Fleming L, et al. Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (U-BIOPRED) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). Thorax 2011; 66: 910–917.
2. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol 2008; 8: 183–192.
3. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest 2008; 118: 3546–3556.
4. Pohunek P. Průduškové astma v dětském věku. In: Petrů V, Čapková Š, Daňková E, et al. Dětská alergologie. Praha, CZ: Mladá fronta, 2012: 229–250.
5. Turžíková J, Pohunek P, Novotná B. Asthma bronchiale. In: Špičák V, Prazner P, et al. Alergologie. Praha, CZ: Galén, 2004: 189–231.

6. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, et al. European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008; 63: 5–34.
7. Česká pneumologická a ftizeologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Doporučený postup diagnostiky a léčby astmatu, 2013. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>.
8. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. The Global Initiative for Asthma, 2012. <http://www.gina-sthma.org/documents/4>.
9. Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 years and Younger. The Global Initiative for Asthma, 2009. <http://www.ginasthma.org/documents/6>.
10. Kopřiva F. Posttranskripční a negenomové účinky glukokortikoidů. *Remedia* 2010; 20: 60–63.
11. Sedláč V, Chlumský J, Teřl M, et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby obtížně léčitelného bronchiálního astmatu, 2011. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>.
12. Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1337–1348.
13. Chung KF, Godard P, Adelroth E, et al. Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. ERS Task Force on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. *European Respiratory Society*. *Eur Respir J* 1999; 13: 1198–1208.
14. Teřl M. Těžké astma. *Interní medicína pro praxi* 2006; 3: 123–127.
15. Chan MT, Leung DY, Szefer SJ, et al. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 594–601.
16. Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK. Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S125–140.
17. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000; 21: 55–89.
18. Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1261: 55–63.
19. Silverman MN, Sternberg EM. Neuroendocrine-immune interactions in rheumatoid arthritis: mechanisms of glucocorticoid resistance. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 19–28.
20. Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep* 2006; 7: 1023–1029.
21. Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, et al. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 2005; 106: 1703–1710.
22. Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, et al. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 2007; 13: 158–163.
23. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 2004; 18: 70–80.
24. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; 353: 1711–1723.
25. Yates CR, Chang C, Kearbey JD, et al. Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids. *Pharm Res* 2003; 20: 1794–1803.
26. Crowe A, Tan AM. Oral and inhaled corticosteroids: differences in P-glycoprotein (ABC1) mediated efflux. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 260: 294–302.
27. Tsujimura S, Saito K, Nakayama S, et al. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells* 2004; 9: 1265–1273.
28. Leung DY, Martin RJ, Szefer SJ, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med* 1995; 181: 33–40.
29. Farrell RJ, Murphy A, Long A, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 279–288.
30. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol* 2003; 178: 339–346.
31. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, et al. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 380–388.
32. Montano E, Schmitz M, Blaser K, et al. P-glycoprotein expression in circulating blood leukocytes of patients with steroid-resistant asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996; 6: 14–21.
33. Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, et al. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 771–782.
34. Yudit MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1719–1726.
35. Sánchez-Vega B, Krett N, Rosen ST, Gandhi V. Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3062–3070.
36. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 102–123.
37. Bender IK, Cao Y, Lu NZ. Determinants of the heightened activity of glucocorticoid receptor translational isoforms. *Mol Endocrinol* 2013; 27: 1577–1587.
38. Tung K, Baker AC, Amini A, et al. Novel hyperactive glucocorticoid receptor isoform identified within a human population. *Shock* 2011; 36: 339–344.
39. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 21455–21458.
40. Ito K, Yamamura S, Essliffe-Quaye S, et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med* 2006; 203: 7–13.
41. Terry LJ, Shows EB, Wente SR. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 2007; 318: 1412–1416.
42. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 505–514.
43. Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, Assreuy J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 317–323.
44. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, et al. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* 2008; 63: 784–790.
45. Abraham SM, Lawrence T, Kleiman A, et al. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* 2006; 203: 1883–1889.
46. Mercado N, To Y, Kobayashi Y, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-γ inhibition by long-acting β2 adrenergic agonists reversed steroid insensitivity in severe asthma. *Mol Pharmacol* 2011; 80: 1128–1135.
47. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 86–101.
48. Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, et al. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One* 2011; 6: e27627.
49. Kopřiva F. Imunopatologie alergie. In: Petrů V, Čapková Š, Daňková E et al. *Dětská alergologie*. Praha, CZ: Mladá fronta, 2012: 41–64.
50. Weigel NL, Moore NL. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2311–2319.
51. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649–657.
52. Savory JG, Hsu B, Laquian IR, et al. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1025–1037.
53. Spahn JD, Szefer SJ, Surs W, et al. A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J Immunol* 1996; 157: 2654–2659.
54. Sher ER, Leung DY, Surs W, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest* 1994; 93: 33–39.
55. Matthews JG, Ito K, Barnes PJ, et al. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1100–1108.
56. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1026–1032.
57. Goleva E, Li LB, Eves PT, et al. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 607–616.
58. Pujols L, Mullol J, Picado C. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7: 93–99.
59. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1600–1604.
60. Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, et al. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 943–950.
61. Gagliardo R, Chanez P, Vignola AM, et al. Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 7–13.
62. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, et al. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6865–6870.
63. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, et al. Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1312–1322.
64. Fakhri S, Tulic M, Christodoulou P, et al. Microbial superantigens induce glucocorticoid receptor beta and steroid resistance in a nasal explant model. *Laryngoscope* 2004; 114: 887–892.
65. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996; 17: 245–261.
66. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 37–48.
67. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; 62: 1189–1204.
68. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, et al. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943–953.
69. Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005; 2005: pe48.
70. Kino T, Chrousos GP. Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 609–613.
71. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1be-

ta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6891–6903.

72. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 134–141.

73. Szatmáry Z, Garabedian MJ, Vilcek J. Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 43708–43715.

74. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, et al. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1267–1280.

75. Roger T, Chanson AL, Knaup-Reymond M, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Eur J Immunol* 2005; 35: 3405–3413.

76. Rossi AG, Haslett C, Hirani N, et al. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* 1998; 101: 2869–2874.

77. Manceau S, Giraud C, Declèves X, et al. Expression and induction by dexamethasone of ABC transporters and nuclear receptors in a human T-lymphocyte cell line. *J Chemother* 2012; 24: 48–55.

78. Kopriva F, Dzubak P, Potesil J, et al. The anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids versus anti-leukotrienes on the lymphocyte P-glycoprotein (PGP) expression in asthmatic children. *J Asthma* 2009; 46: 366–370.

79. Montano E, Schmitz M, Blaser K, et al. P-glycoprotein expression in circulating blood leukocytes of patients with steroid-resistant asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1996; 6: 14–21.

80. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, et al. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2010; 20: 139–146.

81. Tsujimura S, Saito K, Tokunaga M, et al. Overcoming treatment unresponsiveness mediated by P-glycoprotein overexpression on lymphocytes in refractory active systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 2005; 15: 28–32.

82. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, et al. Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1676–1683.

83. Henmi K, Yoshida M, Yoshikawa N et al. P-glycoprotein functions in peripheral-blood CD4+ cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 873–878.

84. Shen S, He Y, Zeng S. Stereoselective regulation of MDR1 expression in Caco-2 cells by cetirizine enantiomers. *Chirality* 2007; 19: 485–490.

85. Liu J, DeFranco DB. Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 40–51.

86. Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 2001; 276: 42714–42721.

Článek přijat redakcí: 11. 10. 2013

Článek přijat k publikaci: 14. 11. 2013

MUDr. Jan Potěšil

Dětská klinika, LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 779 00 Olomouc

potesil.jan@seznam.cz
