

# Zakażenie wirusem paragrypy typu 3 (PIV-3) pierwotnych komórek nabłonka oskrzeli hodowanych *in vitro* jako model doświadczalny zaostrzenia astmy oskrzelowej

Parainfluenza type 3 (PIV-3) infection of primary bronchial epithelial cells grown *in vitro* as an experimental model of bronchial asthma exacerbations

SYLWIA MOSKWA<sup>1,2</sup>, WOJCIECH PIOTROWSKI<sup>3</sup>, JERZY MARCZAK<sup>3</sup>, ANNA LEWANDOWSKA-POLAK<sup>1</sup>, MARZANNA JARZĘBSKA<sup>1</sup>, MAŁGORZATA BRAUNCAJS<sup>2</sup>, ANNA GŁOBIŃSKA<sup>1</sup>, ALEKSANDRA PIECHOTA-POLAŃCZYK<sup>1</sup>, PAWEŁ GÓRSKI<sup>3</sup>, MAREK L. KOWALSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup> Klinika Pulmonologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Maestro Grant, No 2011/02/A/NZ5/00341 oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi z zadania badawczego nr 502-03/1-137-01/502-14-146.

## Streszczenie

**Wprowadzenie.** Hodowle komórek nabłonka oskrzeli są stosowane w badaniach roli infekcji wirusowych u chorych na astmę oskrzelową.

**Cel.** Celem pracy była ocena efektywności hodowli komórek nabłonka oskrzeli oraz wpływu wirusa PIV-3 na morfologię komórek.

**Materiał i metody.** Komórki do hodowli nabłonka pobrano metodą szczoteczki podczas bronchoskopii od 31 osób: 12 osób zdrowych i 19 chorych na astmę oskrzelową. Komórki hodowano w medium hodowlanym BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium) i zakażono wirusem PIV-3 0,1 MOI.

**Wyniki.** Z powodzeniem ukończono 61,3% hodowli komórek nabłonka oskrzeli. Główną przyczyną niepowodzenia hodowlanego było zakażenie grzybicze. Nie stwierdzano cytopatycznego działania wirusa PIV3 na komórki nabłonka w ciągu 48 godzin po zakażeniu.

**Wnioski.** Opisana metodologia umożliwia prowadzenie efektywnych hodowli komórek nabłonka oskrzeli i ich skuteczne zakażenie wirusem paragrypy typu 3.

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

## Summary

**Introduction.** Model of primary bronchial epithelial cells culture has been used to study the innate response to viral infections in patients with bronchial asthma.

**Aim.** The aim of the study was to evaluate the effectiveness of bronchial epithelial cell culture and the influence of parainfluenza virus type 3 (PIV-3) on cell morphology.

**Materials and methods.** Human Bronchial Epithelial cells (HBECs) were obtained during bronchoscopy from 31 subjects: 12 healthy subjects and 19 patients with bronchial asthma. The cells were grown in BEGM culture medium (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium) and were infected with PIV-3 0.1 MOI.

**Results.** Successful cultures were obtained for 61.3% of HBECs. Fungal infection was the main reason for the failure to grow HBECs. No cytopathic effect of PIV3 on epithelial cells was observed for up to 48 hours after infection.

**Conclusions.** The described methodology enables successful culture of primary bronchial epithelial cells and their infection with PIV3.

**Keywords:** asthma exacerbations, viral infections, epithelial cells

© Alergia Astma Immunologia 2015, 20 (4): 264-268

www.alergia-astma-immunologia.eu

Przyjęto do druku: 24.11.2015

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Sylwia Moskwa

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii,

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

tel. 042 675 73 09

e-mail: sylwia.moskwa@umed.lodz.pl

## WSTĘP

Najczęstszą przyczyną zaostrzeń astmy oskrzelowej są infekcje dróg oddechowych wywołane wirusami. Zakażenia wirusami oddechowymi są związane z około 80% epizodów zaostrzeń astmy, zarówno u dorosłych jak i dzieci [1-5]. Zaostrzenia astmy najczęściej wywołują wirusy oddechowe tj. rinowirus, wirus paragrypy, syncyjalny wirus oddechowy (RSV), ludzki metapneumowirus (hMPV), a także adenowirusy i enterowirusy. Obecność rinowirusa wykrywa się u około 60% pacjentów z zaostrzoną astmą [1]. Chorzy na astmę oskrzelową są bardziej podatni na zakażenie wirusami oddechowymi [6]. Niektóre badania pokazują, że u chorych na astmę komórki nabłonka oskrzelowego mają zaburzoną odpowiedź przeciwwirusową, co przejawia się obniżoną generacją interferonów typu I i III na zakażenie rinowirusem [7-11]. Natomiast inne badania nie potwierdzają, że komórki nabłonka oskrzeli pacjentów z astmą wykazują obniżoną syntezę i uwalnianie interferonów w odpowiedzi na zakażenie tym wirusem [12-14]. Odpowiedź komórek nabłonka oskrzeli chorych na astmę na wirusa paragrypy typu 3 (PIV-3) nie była badana. PIV-3 to wirus średniej wielkości o pleomorficznym kształcie, posiadający otoczkę oraz pojedynczą nicię RNA o ujemnej polarności.

Modele doświadczalne astmy pomagają w zrozumieniu patofizjologii procesu zapalnego i alergicznego w astmie, wpływu czynników środowiskowych, zakażeń drobnoustrojami, oraz zaostrzeń i remodelingu astmy. Model *in vitro* astmy oskrzelowej powinien naśladować warunki panujące w oskrzelach *in vivo*. W modelu astmy można wykorzystać komórki dróg oddechowych tj. komórki nabłonkowe oskrzeli pobierane z wymazów szczoteczkowych lub biopsji oskrzeli, fibroblasty, komórki mięśni gładkich pobierane z biopsji oskrzeli oraz komórki zapalne (makrofagi), miofibroblasty z płuc oskrzelowo-pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage*, BAL). W ostatnich badaniach większość modeli astmy stanowią hodowane *in vitro* komórki nabłonka oskrzeli (ang. *human bronchial epithelial cells*, HBEC). Hodowle komórek nabłonka oskrzeli są stosowane w badaniach wpływu zakażenia wirusami u chorych na astmę oskrzelową [7-14].

Celem pracy był opis metodologii hodowli i zakażenia wirusem PIV-3 komórek nabłonka oskrzeli oraz analiza przyczyn niepowodzeń hodowli i wpływu zakażenia wirusem PIV-3 na morfologię komórek nabłonka.

## MATERIAŁ I METODY

Hodowlę komórek nabłonka oskrzeli założono u 31 osób (12 osób zdrowych, 19 chorych na astmę oskrzelową), z czego udało się wyhodować komórki od 19 osób (61,29%): 10 chorych na astmę i 9 osób zdrowych. U wszystkich chorych na astmę oskrzelową wykonano testy skórne, wynik ujemny stwierdzono u czterech pacjentów. Atopię zdefiniowano jako obecność dodatnich testów skórnych przynajmniej na jeden alergen. Dwóch chorych na astmę podawało nadwrażliwość na aspirynę oraz jeden na pyralginę. Wszyscy badani chorzy na astmę przyjmowali wziewne glikokortykosteroidy. Grupę odniesienia stanowiło 9 osób zdrowych, które były nieatopowe, miały negatywne testy skórne, nie miały historii przewlekłych chorób dróg oddechowych i nadreaktywności oskrzeli. Badanie zostało zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr zgody RNN/158/11/KE z 12 lipca 2011 roku). Wszystkie osoby, które wzięły udział w badaniu wyraziły na nie pisemną zgodę.

## Hodowle komórek nabłonka oskrzeli

Komórki do hodowli nabłonka uzyskano metodą szczoteczkania („brushing”) podczas bronchoskopii przeprowadzonej przez lekarza pulmonologa. Po wykonaniu znieczulenia miejscowego (10% lignokaina), materiał pobrano z oskrzela prawego, przyśrodkowego przy użyciu szczoteczki cytologicznej o wymiarach 2,3 mm/230 cm (Endo-Flex). Po pobraniu materiału szczoteczki cytologicznej umieszczono w 25 ml podłoża transportowego, w skład którego wchodziło medium BEGM (*Bronchial Epithelial Cell Growth Medium*) z czynnikami wzrostu i suplementami (Clonetics, Lonza). Szczoteczkanie powtórzono 4-6 razy.

Ze względu na ryzyko zakażenia drobnoustrojami do podłoża transportowego dodano dodatkowe antybiotyki (penicylina, streptomycyna, amfoterycyna B). Materiał zwirowano w temperaturze pokojowej, przy 1150 rpm, przez 6 min. Osad komórkowy rozpuszczono w 2 ml podłoża BEGM z dodatkiem antybiotyków. Po odwirowaniu policzono komórki w komorze zliczeniowej Neubauera przy użyciu mikroskopu świetlnego (przy powiększeniu 100x). Do określenia żywotności komórek nabłonka oskrzeli użyto błękitu trypanu. Do identyfikacji komórek w rozmazie wykonano preparaty cytopspinowe. Zawiesinę komórek uzupełniono do 5 ml podłoża BEGM z dodatkiem antybiotyków i przeniesiono do butelki hodowlanej uprzednio pokrytej kolagenem. Następnie butelkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze CO<sub>2</sub> (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Podłoże hodowlane wymieniano co 48 godzin hodowli na 5 ml świeżego podłoża BEGM bez dodatku antybiotyków. Dla szybszego wzrostu komórek nabłonka do trzech pierwszych zmian medium hodowlanego dodano substytut surowicy Ultrosor G (0,5 mL Ultrosor G na 50 mL podłoża BEGM) (Pall Corporation). Komórki nabłonka oskrzeli po uzyskaniu zlewności oddzielano od podłoża 0,25% roztworem trypsyny-EDTA (Sigma-Aldrich), a następnie przeniesiono do dwóch butelek hodowlanych. Po pasażu zawiesinę komórkową z czterech butelek o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> zlewano, a następnie komórki przenoszono na płytki 24-dółkowe liczbie 1\*10<sup>5</sup>/ml na dółek.

Po uzyskaniu 70-80% zlewności komórki są gotowe do zakażenia wirusem. Czystość komórek nabłonka potwierdzono wykonując oznaczenie cytometryczne poziomu cytokeratyny 19 – białka specyficznego dla komórek nabłonkowych [15]. Przeciwciała przeciwko cytokeratynie 19 znakowane były fluorochromem fikoerytryną (PE) (sc-53003; Santa Cruz). Pomiar wykonany był na cytometrze przepływowym LSR II Fortessa firmy Becton Dickinson.

## Zakażenie wirusem PIV-3

Wirusa PIV-3 (3,02\*10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) otrzymano dzięki uprzejmości Pani dr Edyty Paradowskiej z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Komórki nabłonka oskrzeli zakażono wirusem PIV-3 0,1 MOI w ilości 100μl w medium BEGM na dółek i umieszczano na kołysce przez 1 godz. w temp. pokojowej. Następnie zlewano nadśącz, płukano 3-krotnie BEGM i wymieniano podłoże na 0,5 ml świeżego medium BEGM. Po 8, 24 i 48 godzinach zbierano i zabezpieczano supernatant oraz komórki nabłonka oskrzeli zawieszano w 350 μl buforu RLT (Qiagen).

## WYNIKI

### Ocena niepowodzeń hodowli komórek nabłonka

Nie uzyskano wystarczającej ilości komórek nabłonka oskrzeli do przeprowadzenia eksperymentu od 12 osób (co stanowi 38,71% wszystkich założonych hodowli): 3 osób

Tabela I. Nieudane pierwotne hodowle komórek nabłonkowych oskrzeli

Liczba hodowli	Odsetek nieudanych hodowli (%)	Powód przedwczesnego zakończenia hodowli
3	25,00	brak wzrostu po założeniu hodowli
2	16,67	brak wzrostu po pasażu
5	41,67	zakażenie grzybicze
2	16,67	zakażenie bakteryjne

zdrowych i 9 chorych na astmę. Najczęstsze przyczyny przedwczesnego zakończenia hodowli komórek nabłonka oskrzeli to zakażenie grzybicze, brak wzrostu komórek i zakażenie bakteryjne (tab. I).

Chorzy na astmę, od których nie udało się utrzymać hodowli nabłonka oskrzeli z powodu braku wzrostu komórek byli istotnie starsi od chorych na astmę od których z powodzeniem zakończono hodowlę ( $57,50 \pm 9,81$  lat vs.  $33,50 \pm 9,62$  lat;  $p < 0,01$ ). Chorzy na astmę, od których udało się wyhodować komórki nie różnili się od chorych na astmę, od których nie udało się hodowle HBEC w parametrach spirometrycznych i teście kontroli astmy (ACT).

### Ocena liczby komórek nabłonka oskrzeli bezpośrednio pobranych z wymazów szczoteczkowych w zależności od sukcesu hodowli

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w średniej liczbie i żywotności komórek nabłonka pobranych bezpośrednio podczas bronchoskopii pomiędzy udanymi hodowlami od chorych na astmę ( $2.382.000$ ;  $92,80\%$ ) i osób z grupy kontrolnej ( $2.773.333$ ;  $93,00\%$ ,  $p > 0,05$ ). Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic w średniej liczbie i żywotności komórek nabłonka oskrzeli pomiędzy nieudanymi hodowlami od chorych na astmę ( $2.415.556$ ;  $90,17\%$ ) i osób zdrowych ( $1.833.333$ ;  $91,17\%$ ,  $p > 0,05$ ). Brak było również istotnych różnic w liczbie leukocytów i erytrocytów pomiędzy osobami zdrowymi i pacjentami z astmą.

Natomiast stwierdzono istotnie wyższą ilość komórek nabłonkowych urzęsionych (komórek migawkowych) w wymazach szczoteczkowych od ochotników (osób zdrowych i chorych na astmę), z których nie udało się założyć hodowli komórek nabłonka oskrzeli ( $1.311.667,67 \pm 661.978,21$ ) w porównaniu do wymazów szczoteczkowych, z których założono udane

hodowle HBEC ( $788.421,05 \pm 269.346,19$ ;  $p < 0,001$ ) (ryc. 1). Natomiast wymazy szczoteczkowe, z których z sukcesem założono hodowle nabłonka oskrzeli zawierały istotnie wyższą ilość komórek nabłonkowych innych (m.in. komórki przypodstawne, komórki kubkowe) ( $1.778.947,37 \pm 1.170.289,11$ ) niż wymazy szczoteczkowe, z których nie udało się założyć hodowli ( $958.333,33 \pm 481.396,33$ ;  $p < 0,01$ ).

### Ocena preparatów cytopinowych

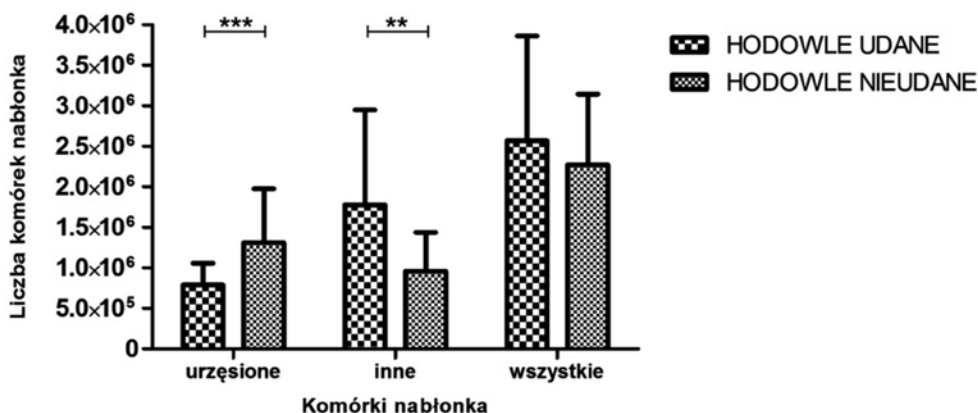
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ilości komórek nabłonkowych oskrzeli oraz komórek zapalnych takich jak neutrofile, eozynofile i limfocyty pomiędzy chorymi na astmę a osobami zdrowymi. Natomiast odsetek makrofagów u chorych na astmę był istotnie niższy ( $1,75 \pm 1,55$ ) niż u osób zdrowych ( $4,00 \pm 2,38$ ;  $p < 0,05$ ). Nie wykazano istotnych różnic w odsetku komórek w preparatach cytopinowych pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi w wymazach szczoteczkowych, z których nie udało się założyć hodowli HBEC. Nie zaobserwowano również różnic w odsetku komórek w preparatach cytopinowych pomiędzy hodowlami udanymi i nieudanymi.

### Potwierdzenie nabłonkowego charakteru wyhodowanych komórek

Z hodowli od dwóch osób zdrowych i dwóch chorych na astmę zaobserwowano średnio  $98\%$  komórek nabłonka oskrzeli, z czego  $97,8\%$  wykazywało ekspresję dla cytokeratyny 19.

### Effekt cytopatyczny wirusa PIV-3 w komórkach nabłonka oskrzeli u osób zdrowych i chorych na astmę oskrzelową

Nie zaobserwowano efektu cytopatycznego w postaci wielojądrazastych zespólni (syncytiów) w hodowlach komó-



Ryc. 1. Liczba komórek w wymazach szczoteczkowych od osób zdrowych i chorych na astmę, z których założono hodowle HBEC (hodowle udane,  $n=19$ ) i, z których nie udało się założyć hodowli (hodowle nieudane,  $n=12$ )

rek nabłonka oskrzeli w żadnym punkcie czasowym po zakażeniu wirusem PIV-3 ani u osób zdrowych, ani u chorych na astmę oskrzelową. Natomiast zakażenie hodowli komórek nabłonka wirusem paragrypy typu 3 powodowało częściowe odklejanie się komórek od podłoża butelki hodowlanej w 48 godzinie po infekcji PIV-3 zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na astmę.

## DYSKUSJA

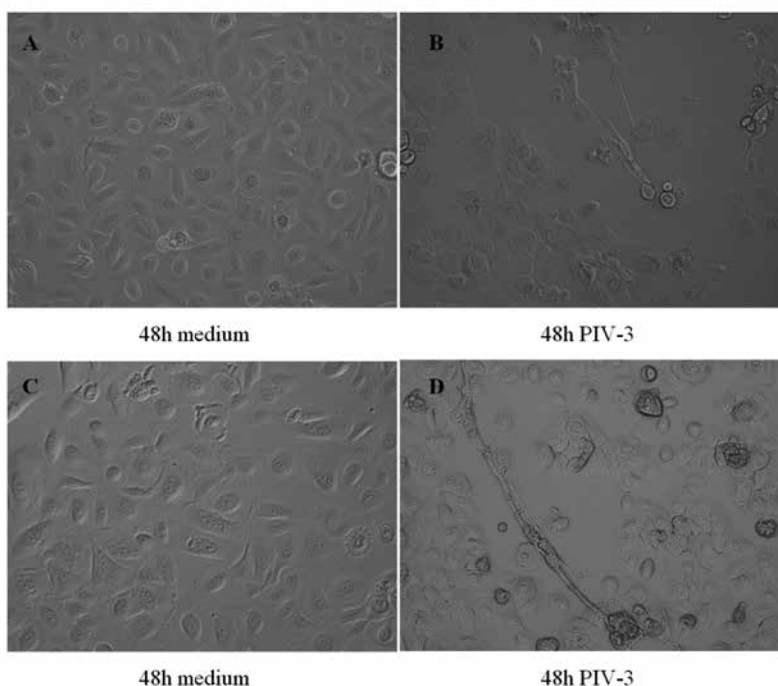
Z powodzeniem wyhodowałam komórki nabłonka oskrzeli spośród 31 założonych hodowli od 19 osób (co stanowi 61,29% hodowli): 10 chorych na astmę oskrzelową i 9 osób zdrowych. Nie uzyskałam wystarczającej ilości komórek do przeprowadzenia eksperymentu u 12 osób (38,71%): 3 osób zdrowych i 9 chorych na astmę. Główną przyczyną niepowodzeń w hodowli komórek nabłonka oskrzeli były zakażenia grzybicze i bakteryjne (58,33%). Brak wzrostu komórek stanowił przyczynę 41,67% niepowodzeń hodowlanych. Natomiast Baraldo i wsp. pobrali wymazy szczoteczkowe i wycinki błony śluzowej z oskrzeli do hodowli nabłonka oskrzeli od 47 dzieci w wieku 5 lat, z czego nie uzyskali odpowiedniego wzrostu od 13 dzieci (od 4/12 dzieci chorych na astmę atopową, 3/12 chorych na astmę nieatopową, 3/11 dzieci atopowych bez astmy, 3/12 dzieci zdrowych – bez astmy i atopii) [10]. Sykes i wsp. w swojej ostatniej pracy również wykazała problemy w hodowli komórek nabłonka oskrzeli [14]. W przypadku 10 hodowli komórki nabłonka oskrzeli po pobraniu nie adherowały do podłoża butelki hodowlanej i w ciągu 48h umierały. U badaczy dochodziło również do zakażenia komórek różnymi gatunkami bakterii i grzybów, zarówno w ciągu pierwszej doby po założeniu hodowli (potencjalnie z powodu kontaminacji dróg oddechowych pacjenta), jak i w trakcie hodowli (7 hodowli HBEC). We wcześniejszej pracy ta sama grupa badaczy badała odpowiedź przeciwwirusową komórek z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) na zakażenie wirusem RV-16 i RV-1B [16]. W obu pracach badano te same grupy pacjentów, od chorych

na astmę, od których udało się wyhodować komórki BALu, nie udało się wyhodować HBECs w około 50% przypadków [14,16]. Inni badacze prowadzący badania na komórkach nabłonka oskrzeli nie zgłaszali problemów hodowlanych [7-9,11-13]. Wymazy szczoteczkowe, z których z sukcesem założono hodowle nabłonka oskrzeli zawierały istotnie wyższą ilość komórek przypodstawnych niż wymazy szczoteczkowe, z których nie udało się założyć hodowli HBEC. W hodowli jednowarstwowej rosną jedynie komórki przypodstawne (bazalne). Wyższa liczba komórek przypodstawnych może tłumaczyć wyższy wskaźnik sukcesu hodowlanego. Jednak Wark i wsp. nie wykazali różnic w ilości komórek bazalnych i migawkowych [7].

Chorzy na astmę, od których nie udało się założyć hodowli nabłonka oskrzeli z powodu braku wzrostu komórek różnili się istotnie jedynie wiekiem od chorych na astmę, od których z powodzeniem zakończono hodowlę. Chorzy na astmę, od których udało się wyhodować komórki nie różnili się od chorych na astmę, od których nie udało się hodowle HBEC w parametrach funkcji płuc i testie kontroli astmy (ACT).

Próbki otrzymane po świeżym szczoteczkowaniu oskrzeli mogą zawierać mieszaninę różnych typów komórek (komórek nabłonka oskrzeli, komórek zapalnych, komórek krwi), które są następnie hodowane w wyspecjalizowanym medium dla komórek nabłonka oskrzeli przez dwa pasaże (około 30 dni), co pozwala wyselekcjonować komórki nabłonka oskrzeli. Czystość pierwotnych hodowli nabłonka oskrzeli potwierdzono wykonując pomiar cytometryczny poziomu cytokeratyny 19 – białka specyficznego dla komórek nabłonkowych [15].

Badania pierwotnych hodowli komórek nabłonka oskrzeli od chorych na astmę pomagają w zrozumieniu patofizjologii procesu zapalnego i alergicznego w astmie, wpływu czynników środowiskowych, zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Hodowle komórek nabłonka można również wykorzystać jako model badań zaostżeń wirusowych astmy oskrzelowej.



Ryc. 2. Zdjęcie hodowli HBEC u osoby zdrowej w 48h hodowli – komórki niezakażone (A) i zakażone wirusem PIV-3 (B), u chorego na astmę – komórki niezakażone (medium) (C) i zakażone PIV-3 (D) (pow.400)

## Piśmiennictwo

1. 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.
2. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-6.
3. Sokhandan M, McFadden ER Jr, Huang YT, Mazanec MB. The contribution of respiratory viruses to severe exacerbations of asthma in adults. *Chest* 1995; 107: 1570-4.
4. Heymann PW, Carper HT, Murphy DD i wsp. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 239-47.
5. Wos M, Sanak M, Soja J i wsp. The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1082-9.
6. 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.
7. 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.
8. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V i wsp. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nature Med* 2006; 12: 1023-6.
9. 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.
10. Baraldo S, Contoli M, Bazzan E i wsp. Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 1307-14.
11. Edwards MR, Regamey N, Vareille M i wsp. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunology* 2013; 6: 797-806.
12. 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.
13. Bochkov YA, Hanson KM, Keles S i wsp. Rhinovirus-induced modulation of gene expression in bronchial epithelial cells from subjects with asthma. *Mucosal Immunology* 2010; 3: 69-80.
14. Sykes A, Macintyre J, Edwards MR i wsp. Rhinovirus-induced interferon production is not deficient in well controlled asthma. *Thorax* 2014; 69: 240-6.
15. Pendleton N, Dixon GR, Green JA, Myskow MW. Expression of markers of differentiation in normal bronchial epithelium and bronchial dysplasia. *J Pathol* 1996; 178: 146-50.
16. Sykes A, Edwards MR, Macintyre J, et al. Rhinovirus 16-induced IFN-alpha and IFN-beta are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1506-14.