

UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum, Wydział Lekarski
II Katedra Chorób Wewnętrznych

Stanisława Bazan-Socha

**Genetyczna ekspresja syntazy leukotrienu
C₄ w eozynofilach krwi obwodowej
u chorych na astmę oskrzelową**

Praca doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



Promotor pracy:
Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków, maj 2000

Podziękowania.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikowi, Kierownikowi II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, za wszechstronną pomoc i opiekę podczas powstawania tej pracy. Zdaję sobie sprawę, że bez Jego ogromnego zaangażowania w działalność naukowo-badawczą Katedry, realizacja tego projektu nie byłaby możliwa.

Jestem również bardzo wdzięczna Panu Doktorowi Markowi Sanakowi, Kierownikowi Pracowni Biologii Molekularnej II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ za inspirację oraz znaczącą pomoc, jaką udzielił mi przy przeprowadzaniu eksperymentów laboratoryjnych od samego początku powstawania pracy.

Dziękuję także całemu Zespołowi Pracowni Biologii Molekularnej za niepowtarzalną atmosferę, która mobilizowała do myślenia i pracy twórczej oraz za cenne dyskusje, które wpłynęły znacząco na punkt widzenia prezentowany w tej pracy.

Pragnę również wyrazić wdzięczność wszystkim Pracownikom II Katedry Chorób Wewnętrznych, którzy w różny sposób pomagali mi w realizacji zadań.

Dziękuję także mojemu Mężowi za pomoc, ale przede wszystkim za zrozumienie i cierpliwość.

Stanisława Bazan-Socha.

Spis treści

Spis rysunków.....	4
Spis tabel.....	6
Słownik skrótów	7
1. Astma oskrzelowa w kontekście wiedzy dawnej i współczesnej.	11
1.1 Rozwój badań nad patofizjologią, diagnostyką i leczeniem astmy oskrzelowej..	11
1.2 Rozpoznanie i diagnostyka astmy.....	14
1.3 Definicja astmy.	14
1.4 Klasyfikacja i etiologia astmy.....	15
1.5 Astma aspirynowa.....	16
1.6 Metabolizm kwasu arachidonowego.....	20
1.7 Rola leukotrienów i leków antyleukotrienowych w patomechanizmie i leczeniu astmy.	25
2. Budowa i funkcja eozynofilów.	27
2.1 Pochodzenie i różnicowanie eozynofilów.....	28
2.2 Morfologia komórki.....	28
2.3 Receptory błonowe i markery powierzchniowe eozynofila.....	32
3. Cel pracy.	34
4. Metody oraz charakterystyka układów eksperymentalnych.....	35
4.1 Opis negatywnej immunomagnetycznej separacji eozynofilów.....	35
4.2 Stymulacja eozynofilów.....	43
4.2.1 Charakterystyka substancji stosowanych do stymulacji eozynofilów.	43
4.2.2 Układ stymulacji.	45
4.3 Izolacja całkowitego komórkowego RNA.....	46
4.4 Ilościowa kompetycyjna reakcja RT-PCR.....	48
5. Grupy chorych.....	57
5.1 Chorzy pierwszej tury eksperymentów.....	57
5.2 Chorzy drugiej tury eksperymentów.....	59
6. Wyniki.....	61
6.1 Pierwsza tura eksperymentów.....	61
6.2 Druga tura eksperymentów.	71
7. Dyskusja.....	79

7.1 Domieszka innych typów komórek lub płytek krwi w badanym materiale izolacyjnym.	79
7.2 Ekspresja genetyczna mRNA LTC ₄ S oraz produkcja LTC ₄ przez eozynofile chorych na astmę oraz zdrową grupę kontrolną.....	80
7.3 Regulacja ekspresji genetycznej mRNA LTC ₄ S i produkcji LTC ₄ przez IL-5.....	82
7.4 Wpływ PMA na ekspresję mRNA LTC ₄ S i produkcję LTC ₄ przez eozynofile krwi obwodowej.	85
7.5 Rola aspiryny w regulacji transkrypcji LTC ₄ S i produkcji leukotrienu C ₄ przez eozynofile krwi obwodowej.....	85
7.6 Wpływ jonoforu wapnia na transkrypcję mRNA LTC ₄ S i produkcję leukotrienu C ₄ przez eozynofile krwi obwodowej.	87
7.7 Wpływ polimorfizmu regionu promotorowego LTC ₄ S na regulację ekspresji mRNA LTC ₄ S.	88
7.8 Podsumowanie dyskusji.....	89
8. Wnioski.	90
9. Streszczenie.....	91
10. Piśmiennictwo.....	94

Spis rysunków

Rysunek 1. Metabolizm eikozanoidów na szlaku cyklooksygenaz (za Med. Prakt., 1999, 97: 154).	22
Rysunek 2. Metabolizm kwasu arachidonowego na szlaku 5-lipoksygenazy (5-LO) (za Med. Prakt., 1999, 97: 155).	24
Rysunek 3. Wzrost liczby publikacji dotyczących eozynofilów w latach 1970-1999....	27
Rysunek 4. Eozynofil w rozmazie krwi obwodowej.	30
Rysunek 5. Eozynofil – obraz z mikroskopu elektronowego.	31
Rysunek 6. Eozynofil – schemat budowy.	31
Rysunek 7. Schemat receptorów i markerów błonowych eozynofila.....	33
Rysunek 8. Warstwy cieczy i rozkład komórek po wirowaniu krwi w gradientach gęstości.....	36
Rysunek 9. Zdjęcie preparatu rozmazu granulocytów.....	37
Rysunek 10. Powierzchnia komórki z dołączoną magnetyczną mikrogranulką.....	38
Rysunek 11. Uproszczony schemat immunomagnetycznej separacji komórek.	39
Rysunek 12. Urządzenia stosowane do immunomagnetycznej separacji komórek.....	40
Rysunek 13. Kolumna wykorzystywana do immunomagnetycznej negatywnej separacji.	40
Rysunek 14. Zdjęcie preparatu rozmazu eozynofilów po zakończeniu negatywnej immunomagnetycznej separacji tych komórek.....	41
Rysunek 15. Eozynofile wybarwione błękitem trypanu.....	42
Rysunek 16. Uproszczony schemat reakcji RT-PCR.....	48
Rysunek 17. Produkty amplifikacji PCR rozdzielone na żelu agarozowym.	52
Rysunek 18. Zapis fluorymetryczny z ALFexpress.....	54
Rysunek 19. Krzywa wzorcowa reakcji RT-PCR.....	55
Rysunek 20. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC ₄ S w grupie AIA, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne regionu promotorowego LTC ₄ S.	63
Rysunek 21. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC ₄ S w grupie ATA, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne LTC ₄ S.	64

Rysunek 22. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC ₄ S w grupie kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne regionu promotorowego LTC ₄ S.	66
Rysunek 23. Podstawowe ekspresje mRNA LTC ₄ S w grupach AIA, ATA i kontroli. ...	67
Rysunek 24. Rozkład podstawowych ekspresji mRNA LTC ₄ S u poszczególnych chorych, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne LTC ₄ S.	67
Rysunek 25. Graficzny obraz przedstawiający średnie poziomy LTC ₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów.	71
Rysunek 26. Zestawienie median genetycznej ekspresji mRNA LTC ₄ S w drugiej turze eksperymentów.	74
Rysunek 27. Zestawienie średnich wartości genetycznej ekspresji mRNA LTC ₄ S w drugiej turze eksperymentów.	74
Rysunek 28. Rozkład podstawowych ekspresji mRNA LTC ₄ S u poszczególnych chorych w grupach AIA i ATA, z uwzględnieniem podziału na warianty alleliczne regionu promotorowego LTC ₄ S.	75
Rysunek 29. Graficzny obraz przedstawiający średnie poziomy LTC ₄ w nadsączach eozynofilów.	78
Rysunek 30. Krzywe fluorescencji z cytometru przepływowego.	80

Spis tabel

Tabela 1. Typy receptorów prostanoidów, ich przekaźniki wewnątrzkomórkowe oraz wywierany efekt biologiczny (za Med. Prakt., 1999, 97: 153).....	21
Tabela 2. Klasyfikacja stopni nasilenia astmy oraz ogólne wskazania terapeutyczne. ..	58
Tabela 3. Charakterystyka kliniczna badanych grup	59
Tabela 4. Charakterystyka kliniczna badanych grup chorych.	60
Tabela 5. Wyniki genotypowania polimorfizmu regionu promotorowego C ₋₄₄₄ LTC ₄ S.	61
Tabela 6. Częstość występowania allelu C w poszczególnych badanych grupach.	61
Tabela 7. Średnia liczba kopii mRNA LTC ₄ S oraz mediany w grupie AIA.	62
Tabela 8. Średnia liczba kopii mRNA LTC ₄ S oraz mediany w grupie ATA.	64
Tabela 9. Średnia liczba kopii mRNA LTC ₄ S oraz mediany w grupie kontrolnej.....	65
Tabela 10. Statystyczne znamienności różnic w podstawowych ekspresjach mRNA LTC ₄ S z uwzględnieniem podziału na warianty alleliczne regionu promotorowego LTC ₄ S.	68
Tabela 11. Poziomy LTC ₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów.....	70
Tabela 12. Wyniki genotypowania polimorfizmu regionu promotorowego C ₋₄₄₄ LTC ₄ S.	72
Tabela 13. Częstość występowania allelu C w badanych grupach.....	72
Tabela 14. Zestawienie wyników genetycznej ekspresji mRNA LTC ₄ S w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA	73
Tabela 15. Poziomy leukotrienu C ₄ w nadsączach eozynofilów.	77

Słownik skrótów

AA	- kwas arachidonowy (ang. <i>arachidonic acid</i>),
ADP	- adenozynodwufosforan,
AIA	- chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę,
AP	- nazwa czynnika transkrypcyjnego (ang. <i>activator protein</i>),
ASA	- kwas acetylosalicylowy (ang. <i>acetylsalicylic acid</i>),
ATA	- chorzy na astmę bez nadwrażliwości na aspirynę,
ATP	- adenozynotrójfosforan,
A 23187	- jonofor wapnia,
BAL	- popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (ang. <i>bronchoalveolar lavage</i>),
bp	- para zasad (ang. <i>base pair</i>)
cAMP	- cykliczny adenozynomonofosforan,
Ca ⁺²	- wolne jony wapniowe,
CD	- marker różnicowania powierzchniowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>),
cDNA	- DNA komplementarne (ang. <i>complementary DNA</i>),
COX	- cyklooksygenaza (ang. <i>cyclooxygenase</i>),
CRE	- element (DNA) odpowiedzi na cAMP (ang. <i>cAMP responsive element</i>),
CYP450	- cytochrom P450,
C1q	- składowa dopełniacza 1q,
C3a	- składowa dopełniacza 3a,
C3b	- składowa dopełniacza 3b,
C5a	- składowa dopełniacza 5a,
DAG	- dwuacyloglicerol,
DMSO	- dwumetylosulfotlenek,
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy,
dNTP	- trójfosforany nukleotydów - mieszanina,
ECP	- eozynofilowe białko kationowe (ang. <i>eosinophil cationic protein</i>),
EDN	- neurotoksyny eozynofilowe (ang. <i>eosinophil-derived neurotoxin</i>),
EDTA	- kwas etylenodwuaminotetraoctowy,
EF-hand	- motyw dłoni,
EGF	- czynnik wzrostu naskórka (ang. <i>epidermal growth factor</i>),
ELISA	- test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>),

EPO	- peroksydaza eozynofilowa (ang. <i>eosinophil peroxidase</i>),
FEV ₁	- nasilona objętość wydechowa pierwszosekundowa (ang. <i>forced expiratory volume in one second</i>),
FLAP	- białko aktywujące 5-lipoksygenazę (ang. <i>five lipoxygenase activating protein</i>),
FCS	- płodowa surowica cielęca (ang. <i>fetal calf serum</i>),
FcR	- receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny,
f-MLP	- N-formyl-metionyl-leucyl-fenylalanina,
GATA	- nazwa czynnika transkrypcyjnego,
gDNA	- DNA genomowe
GINA	- Global Initiative for Asthma,
GM-CSF	- czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>),
GSH	- zredukowany glutation,
GTP	- guanozynotrójfosforan,
HLA	- antygen ludzkich leukocytów (ang. <i>human leukocyte antigen</i>),
ICAM	- cząsteczki adhezji komórek (ang. <i>intercellular adhesion molecule</i>),
IC50	- stężenie hamujące w połowie aktywność enzymu, (ang. <i>half maximal inhibitory concentration</i>),
IFN	- interferon,
Ig	- immunoglobulina,
IKK	- IκB kinaza,
IL	- interleukina,
IP ₃	- trójfosforan inozytolu,
JAK 2	- kinaza białkowa, (ang. <i>Janus kinase 2, just another kinase 2</i>),
K	- zdrowa kontrola,
kDa	- kilodalton
LT1 i LT2	- receptory leukotrienów cysteinylowych 1 i 2 typ,
LTA ₄	- leukotrien A ₄ ,
LTB ₄	- leukotrien B ₄ ,
LTC ₄	- leukotrien C ₄ ,
LTC ₄ S	- syntaza leukotrienu C ₄ ,
LTD ₄	- leukotrien D ₄ ,
LTE ₄	- leukotrien E ₄ ,

LTF ₄	- leukotrien F ₄ ,
LXA ₂	- lipoksyna A ₂ ,
MAPK	- kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny (ang. <i>mitogen activated protein kinase</i>),
MAPKK	- kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (ang. <i>mitogen activated protein kinase kinase</i>),
MBP	- główne białko zasadowe (ang. <i>major basic protein</i>),
M-MLV	- Moloney Murine Leukemia Virus,
mRNA	- matrycowe RNA (ang. <i>messenger RNA</i>),
Na ⁺²	- kation sodowy,
n.e.	- nasza era,
NFκB	-czynnik jądrowy (ang. <i>nuclear factor κB</i>),
NGF	- czynnik wzrostu nerwu (ang. <i>nerve growth factor</i>),
NLPZ	- niesterydowe leki przeciwzapalne,
NK	- komórki natural killer,
PAF	- czynnik aktywujący płytki krwi (ang. <i>platelet activating factor</i>),
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>),
PGD ₂	- prostaglandyna D ₂ ,
PGDH	- 15-OH-dehydrogenaza prostaglandyn,
PGE ₂	- prostaglandyna E ₂ ,
PGF _{1α}	- prostaglandyna F _{1α} ,
PGF _{2α}	- prostaglandyna F _{2α} ,
PGH ₂	- prostaglandyna H ₂ ,
PGHS	- syntaza prostaglandyny PGH ₂ ,
PGI ₂	- prostacyklina,
PKC	- kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>),
PLA ₂	- fosfolipaza A ₂ ,
PMA	- octan forbolu (ang. <i>phorbol myristate acetate</i>),
p.n.e.	- przed naszą erą,
PPAR	- receptory peroksysomalnego czynnika proliferacyjnego (ang. <i>peroxisome-proliferator activated receptors</i>),
RFLP	- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>),
RNA	- kwas rybonukleinowy,

RPMI 1640	- medium hodowlane (<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>),
RT	- odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i>),
SD	- odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>),
SE	- błąd standardowy (ang. <i>standard error</i>),
SRS-A	- wolno działająca substancja anafilaksji (ang. <i>slow reacting substance of anaphylaxis</i>),
STAT	- nazwa rodziny czynników transkrypcyjnych (ang. <i>signal transducers and activator of transcription</i>),
TFC	- nazwa czynnika transkrypcyjnego,
TGF	- transformujący czynnik wzrostu (ang. <i>transforming growth factor</i>),
Th	- limfocyty T pomocnicze (ang. <i>T helper lymphocytes</i>),
Tth	- <i>Thermus thermophilus</i> - nazwa bakterii z której uzyskuje się polimerazę Tth,
TXA ₂	- tromboksan A ₂ ,
TXB ₂	- tromboksan B ₂ ,
VCAM	- cząsteczki adhezji komórek (ang. <i>vascular cellular adhesion molecule</i>),
VLA4	- cząsteczki adhezji komórek (ang. <i>very late antigen 4</i>),
5-LO	- 5-lipoksygenaza,
5-HPETE	- kwas 5-hydroperoksyecosatetraenowy,

1. Astma oskrzelowa w kontekście wiedzy dawnej i współczesnej.

Astma oskrzelowa stanowi poważny problem epidemiologiczny w większości państw świata. W krajach europejskich dotkniętych jest nią około 10% dzieci i 2-5% dorosłych. Powoduje ona rocznie nawet do 5 zgonów na 100 000 osób, przy czym śmiertelność ta dotyczy głównie osób młodych. Wynika stąd potrzeba dalszych badań oraz poszukiwań nowych, bardziej skutecznych leków. To zaś nie będzie możliwe bez dogłębnego poznania przyczyny i patofizjologii choroby. W naszym społeczeństwie większość osób utożsamia astmę z alergią i atopią, jednak problem tego schorzenia nie jest tak prosty i jednoznaczny. Ponieważ „historia magistra vitae est”, zacznę tę pracę od krótkiego rysu rozwoju badań nad przyczyną i leczeniem astmy.

1.1 Rozwój badań nad patofizjologią, diagnostyką i leczeniem astmy oskrzelowej.

Termin „astma” spotykamy już w XV pieśni Iliady. Homer użył go dla określenia szybkiego oddychania związanego z uczuciem duszności.

Pierwsze historyczne wzmianki dotyczące tej choroby znajdujemy w egipskim papirusie Ebersa z 1500 roku p.n.e. Zawiera on opis urządzenia, przypominającego dzisiejsze inhalatory, przez który chory na astmę mógł wdychać wyciągi z ziół. Także stare księgi indyjskie Vagbhata z 350 roku p.n.e. wspominają o ciężkim oddychaniu i spionizowanej postawie ciała w napadzie duszności.

W rysie historycznym nie można oczywiście pominąć „ojca medycyny” Hipokratesa z wyspy Kos (460-377 rok p.n.e.), który w swoich „Aforyzmach” wielokrotnie opisywał klasyczny napad duszności związany z astmą.

Celsus (25 rok p.n.e.-25 n.e.) podzielił astmę na kilka stadiów, między innymi pisał o „dyspnoë”, czyli szybkim oddychaniu, następnie o chorobie bardziej nasilonej, którą nazwał „asthma”, a wreszcie o „ortopnoë”, czyli ostrym ataku duszności. Jego klasyfikacja obowiązywała aż do XVIII wieku.

Galen (131-201 rok n.e.) z kolei był autorem poglądu na patofizjologię tej choroby, który przetrwał do XVII wieku. Uważał on, że „śluz spływa z mózgu do tchawicy i płuc, gdzie krzepnie i powoduje dolegliwości”. Spojrzenie to zmienił dopiero van Helmont (1578 - 1644), który podkreślał skurczowy charakter choroby. On też po

raz pierwszy zwrócił uwagę na częstsze jej występowanie w niektórych rodzinach, skojarzenie ze zmianami skórными i zalecał leczenie w czystym górskim klimacie. W XVI wieku coraz częściej wspomniano o czynnikach uczulających, a więc pierzu, obecności kota i innych zwierząt w pomieszczeniach mieszkalnych, co nazywano później „antipathia humana”.

Wówczas też w leczeniu tej choroby zaczęto powszechnie stosować sprowadzoną z Indii bielun dziedzierzawę (*Datura stramonium*), oraz z Chin wyciągi z *Ephedra vulgaris*, z których później wyekstrahowano efedrynę. Atropinę wyizolował w 1831 roku aptekarz Mein. W późniejszych latach zdobyła ona szeroką popularność w postaci kropli. W terapii astmy nie brak było też pomysłów bardzo oryginalnych, np Floyer pod koniec XVII wieku oprócz leczenia klimatycznego i picia dużej ilości kawy, zalecał urynoterapię, a także wywołanie ropnia, który miał zmniejszyć skłonność do napadów astmatycznych. Z kolei Trousseau w XIX wieku w trakcie ataku duszności kazał palić cygaro oraz stosować arszenik i chloroform w dużych dawkach.

Nowoczesne spojrzenie na astmę przypada na drugą połowę XIX wieku. Londyński lekarz Salter w plwocinie zauważył elementy nazwane później kryształami Charcot-Leydena, a Blackley podał opis pyłkowicy. On też skonstruował aparat do zbierania pyłków z powietrza, opracował testy skórne i spojówkowe z pyłkami. Dalej należałoby wymienić Leydena, Charcota, Lefebra, Curschmanna i Finka. Ten ostatni w 1890 roku po raz pierwszy zwrócił uwagę na często towarzyszącą astmie oskrzelowej wysoką eozynofilię krwi obwodowej.

W historii odkryć związanych z astmą nie sposób pominąć badaczy alergii, immunologii i anafilaksji. Magendie i Flexner zauważyli, że powtórne wstrzyknięcie królikowi białka kurzego wywołuje u niego burzliwą reakcję kończącą się niejednokrotnie śmiercią. Nad zjawiskiem tym pracowali później między innymi Pasteur, Portier, Arthus, Henricourt, Smith, i laureat nagrody Nobla Richet. Richet eksperymentował z jadami trujących ukwiałów. Podawał psom najpierw małą, potem większą dawkę toksyny licząc na uodpornienie, czyli profilaksję psów. Jednak zauważył reakcję odwrotną – psy zdychały. Nazwał ją anafilaksją, czyli brakiem ochrony. W tym też czasie Koch opisał skórną próbę tuberkulinową, która jest niczym innym jak komórkową nadwrażliwością na prątki gruźlicy.

Pojęcie „atopii” zostało wprowadzone do medycyny w 1923 roku przez Coca i Cooka. Wiązało się ono z „reaginami” wykrytymi kilka lat wcześniej przez Prausnitza i Küstnera. Oba pojęcia natychmiast przyjęły się w opisie zjawisk klinicznych, a sama

„reagina” 40 lat później scharakteryzowana została jako nowa immunoglobulina klasy IgE. Dokonały tego dwa niezależne od siebie zespoły – Johansson i Bennich oraz małżeństwo Ishizaka. Badania nad atopią wiążą się oczywiście z odkryciem mastocytów, bazofilów i mediatorów reakcji nadwrażliwości. Pierwszym opisanym mediatorem była wykryta w 1907 r. histamina. Początek lat 70-tych przyniósł między innymi odkrycia czynnika chemotaktycznego dla eozynofilów i substancji PAF, czyli czynnika aktywującego płytki. Wykryta z końcem lat trzydziestych wolno działająca substancja anafilaksji (*slow reacting substance of anaphylaxis* – SRS-A) dopiero w roku 1979 okazała się być mieszaniną leukotrienów. Odkrycie to zostało uhonorowane nagrodą Nobla dla Samuelssona (84). Prace nad rolą prostaglandyn w astmie zapoczątkował Vane, z którym współpracowali Gryglewski i Szczeklik. Oni też byli twórcami teorii astmy aspirynowej związanej z blokadą cyklooksygenazy. Na bazie ich założeń funkcjonuje większość hipotez o patomechanizmie tego zagadkowego i wciąż niewyjaśnionego schorzenia (108).

Desensybilizację wprowadził do medycyny Noon, odczulając chorych na pyłkowicę wyciągami z pyłków traw (69). Leki rozszerzające oskrzela to adrenalina stosowana od 1900 roku obok znanej od 5000 lat efedryny. Uratowała ona życie między innymi Cooke’owi, który po podaniu końskiej surowicy przeciwbłoniczej wpadł we wstrząs anafilaktyczny. W następnych latach opracowywano kolejne leki z tej grupy, ale już o działaniu bardziej selektywnym w stosunku do receptorów β -adrenergicznych oskrzeli. Były to: izoprenalina, orcyprenalina, fenoterol, salbutamol i terbutalina. Na początku XX wieku po raz pierwszy zsyntetyzowano teofilinę oraz jej połączenie z etylenodiaminą nazwane aminofiliną. Jednak do farmakoterapii astmy leki te wprowadzono dopiero tuż przed II wojną światową. Syntetyczne hormony kory nadnerczy zaczęto stosować w leczeniu astmy na początku lat 50-tych. To wydarzenie należy uznać za jedno z najważniejszych w nowoczesnej terapii astmy. Najnowszą historię leków przeciwastmatycznych uzupełniają wprowadzone przez Altounyan’a w końcu lat 60-tych kromoglikany, a w latach następnych wziewne glikokortykosteroidy, długo działający agoniści receptorów β_2 -adrenergicznych i wreszcie leki antyleukotrienowe (31).

1.2 Rozpoznanie i diagnostyka astmy.

Rozpoznanie astmy opiera się zwykle na wywiadzie. Jej główne objawy, a więc świszczący oddech, duszność, kaszel i odkrztuszanie wydzieliny, nie są w pełni charakterystyczne. Jednak nawracające zaostrzenia i napady astmatyczne, często prowokowane przez alergenów, substancje drażniące, infekcje wirusowe, zimne powietrze i wysiłek fizyczny, ukierunkowują diagnostykę na właściwy tor. Ponieważ astma ma charakter napadowy, w okresach względnego zdrowia zarówno w badaniu fizykalnym jak i czynnościowym, czyli spirometrycznym, można nie stwierdzić żadnych odchyśleń od normy. Również wyniki testów skórnych, jak i wykazanie swoistych przeciwciał klasy IgE, mają ograniczoną wartość, ponieważ rozpoznanie atopii nie jest równoznaczne z rozpoznaniem astmy. Atopia występuje w ponad 30% populacji ogólnej i często może nie dawać żadnych objawów chorobowych (28). Jednak identyfikacja typu alergenu może pomóc w diagnostyce. W rozpoznaniu astmy pomocne może być również badanie płwociny i krwi żyłnej w kierunku obecności eozynofili oraz bronchofiberoskopia połączona z pobraniem materiału do badania za pomocą szczoteczki, płukaniem oskrzeli i biopsją śluzówki. Stałą składową obrazu klinicznego astmy jest nadreaktywność oskrzeli. Bada się ją wykorzystując niespecyficzne próby prowokacyjne, na przykład z histaminą i metacholiną (61, 136).

1.3 Definicja astmy.

Astma – zgodnie z definicją Międzynarodowej Grupy Ekspertów z 1992 roku, jest przewlekłą chorobą zapalną oskrzeli, charakteryzującą się napadami kaszlu, skurczu oskrzeli, świszczącego oddechu i duszności, które zwykle ustępują samoistnie, ale mogą też przebiegać bardzo ciężko, a nawet prowadzić do zgonu (28). Wydaje się, że za obraz choroby odpowiedzialne są przede wszystkim komórki nabłonka oskrzeli oraz komórki zapalne w drzewie i śluzówce oskrzeli. Należą do nich głównie mastocyty, eozynofile, bazofile, limfocyty, neutrofile oraz makrofagi. Nie wiadomo jednak dlaczego te

komórki w nadmiarze wędrują do płuc oraz jaki bodziec rozpoczyna samonapędzający się mechanizm zapalny prowadzący do ograniczenia czynności układu oddechowego.

1.4 Klasyfikacja i etiologia astmy.

Astmę można podzielić w oparciu o etiologię, przebieg choroby i stopień obturacji drzewa oskrzelowego. Klasyfikację astmy związaną ze stopniem nasilenia objawów zamieszczono w dalszej części pracy (Tabela 2). Natomiast w podziale etiologicznym wyróżnia się astmę zewnątrzpochodną i wewnątrzpochodną, nazywaną także kryptogenną. Głównym przedstawicielem grupy pierwszej jest astma atopowa. Atopię definiuje się jako genetycznie uwarunkowaną predyspozycję do nadprodukcji immunoglobuliny klasy E. Na powierzchni bazofilów i mastocytów znajdują się liczne receptory dla jej fragmentu Fc. Przeciwciała reakcji atopowej mogą być skierowane przeciwko niemal wszystkim występującym w naszym środowisku antygenom. Reakcja połączenia antygeny z odpowiednim, zakotwiczonym w błonie mastocytów i bazofilów przeciwciałem, powoduje degranulację komórek i uwolnienie mediatorów zapalnych.

Obecność cech atopii nie wystarcza do rozwoju astmy i wystąpienia objawów chorobowych. W rozwoju astmy, a zwłaszcza jej zaostrzeń dużą rolę przypisuje się nawracającym i przetrwałym infekcjom wirusowym dróg oddechowych. Wymienia się adenowirusy, rinowirusy, wirusy RSV, chlamydie i mykoplazmy. Powodują one między innymi nadprodukcję interferonów i cytokin, takich jak IL-3, IL-5 i GM-CSF, które przedłużają życie i aktywność eozynofików.

Przebycie niektórych zakaźnych chorób dziecięcych, takich jak odra czy ospa, a także ekspozycja na prątki gruźlicy we wczesnym dzieciństwie może pełnić funkcję ochronną przed rozwojem astmy. Ten paradoksalny efekt infekcji pierwszego roku życia jest prawdopodobnie związany z przestrojeniem układu odpornościowego na walkę z zakażeniem i nadprodukcją IL-12, IL-18, INF γ , a supresją limfocytów pomocniczych Th₂ i spadkiem produkcji IL-10. Taki układ mediatorów humoralnych chroni przed rozwojem nadwrażliwości i nadprodukcją IgE. Z drugiej strony wydaje się, że częsta antybiotykoterapia prowadzi do przestrojenia flory bakteryjnej jelit i nadprodukcji Th₂, co może sprzyjać zwiększonej podatności na wystąpienie atopii i astmy (44).

Znacznie trudniej jest wytłumaczyć etiologię i patomechanizm astmy wewnątrzpochodnej. Zarówno profil komórek zapalnych, jak i cytokin w płucach i skrawkach oskrzelowych jest identyczny z uzyskiwanym od chorych na astmę zewnątrzpochodną. Podobnie gęstość receptorów dla immunoglobuliny E na powierzchni komórek zapalnych jest podobna w obu typach astmy i wyższa niż u osób zdrowych. Do końca nie wiadomo, czy obraz opisywany jako astma jest patofizjologicznie spójny, czy też różne przyczyny warunkują zupełnie inne jednostki chorobowe, podobne jedynie w obrazie klinicznym.

Ponad połowa przypadków astmy ma podłoże dziedziczne i dodatni wywiad rodzinny. Badania nad genetyką astmy rozwijają się gwałtownie w ostatnich latach. Ich omówienie przekracza zakres tego wstępu. Znajdzie je Czytelnik w ostatniej pracy poglądowej S. Holgate'a (43).

Ostatnio coraz częściej etiologię astmy wiąże się z możliwością zahamowania klasycznej lub alternatywnej drogi apoptozy komórek zapalnych. W Instytucie Alergii i Astmy w Davos stwierdzono między innymi występowanie oporności receptora Fas na powierzchni eozynofików uzyskiwanych z zapalnych polipów nosa. Co ciekawe, cecha ta korelowała z wysokim poziomem tlenu azotu, a więc związku produkowanego w dużych ilościach w tkance zapalnej. Zmieniony receptor Fas warunkował zaburzenia jego kontaktu z Fas ligandem i prowadził do przedłużenia życia eozynofila (100).

1.5 Astma aspirynowa.

Szczególnym typem astmy jest astma z nadwrażliwością na aspirynę. U około 10% dorosłych astmatyków po zażyciu aspiryny dochodzi do nasilonego ataku duszności, któremu może towarzyszyć zaczerwienienie skóry, obrzęk twarzy, wodnisty katar, podrażnienie spojówek oczu, łzawienie, biegunka, a nawet wstrząs. Nadwrażliwość ta pojawia się około 35 roku życia i zwykle utrzymuje się do śmierci. Szacuje się, że u ok. 25% chorych na astmę wymagających mechanicznej wentylacji, ataki te mają związek z zażyciem aspiryny.

Pierwsza reakcja nietolerancji tego leku została opisana przez von Franke w Niemczech w 1903 roku (130). Miało to miejsce 4 lata po wprowadzeniu aspiryny na rynki farmaceutyczne przez firmę Bayer. Z kolei pierwsze przypadki nasilonych ataków

astmatycznych po jej zażyciu zostały opisane przez Barnetta 2 lata później (6). W następnych latach zauważono, że astmie z nadwrażliwością na aspirynę towarzyszą polipy w nosie, wodniste katary, a często zapalenie zatok (83). Mechanizm i przyczyna tego zjawiska pomimo intensywnych badań jest wciąż niewyjaśniona. Po odkryciu w ostatnich latach prostaglandyn i leukotrienów wydawało się, że wytłumaczenie tego fenomenu jest w zasięgu ręki. Jednak później przeprowadzane badania nie doprowadziły do jednoznacznej i spójnej teorii. Większość hipotez próbujących tłumaczyć to zagadnienie opiera się na cyklu przemian kwasu arachidonowego. W świetle tych hipotez najważniejszym elementem i punktem wyjścia tej nadwrażliwości jest zablokowanie cyklooksygenazy (COX) przez aspirynę. To zaś powoduje przestawienie metabolizmu kwasu arachidonowego na tor produkcji leukotrienów, istotnych mediatorów astmy (110). Poniżej przedstawiono fakty przemawiające za kluczową rolę blokowania COX w patomechanizmie nadwrażliwości na aspirynę (111, 115).

- Obturację oskrzeli u chorych na astmę aspirynową wywołuje nie tylko aspiryna, ale także inne niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ), które blokują aktywność cyklooksygenazy. Należą do nich między innymi: ibuprofen, indometacyna, diklofenak, naproksen, piroksykam, kwas fenamowy, ketoprofen, fenoprofen, kwas tiaprofenowy, noramidopiryna, sulfinpyrazon i fenylobutazon. Natomiast leki przeciwzapalne, które nie hamują COX, takie jak salicylan sodu, trójsalicylan cholinowo-magnezowy, dektropropoksyfen, azapropazon i benzydamid nie wywołują ataków astmy.
- Stopień nasilenia ataku astmatycznego w dużej mierze jest zależny od siły, z jaką lek blokuje COX. Paracetamol bardzo słabo blokuje ten enzym, w związku z tym jest dobrze tolerowany przez większość chorych na astmę aspirynową w dawce nie przekraczającej 1000 mg na dzień.
- Czasami w leczeniu astmy aspirynowej przeprowadza się odczulanie na aspirynę. Istnieją doniesienia, że takie leczenie może łagodzić przebieg choroby. Ważne jest jednak, że po skutecznie przeprowadzonej terapii odczulającej pacjent traci też nadwrażliwość na wszystkie inne NLPZ blokujące COX.

Osoby, u których przynajmniej raz stwierdzono nadwrażliwość na leki blokujące COX, nie powinny ich przyjmować do końca życia. COX występuje w formie dwóch izoenzymów. Forma konstytutywna, określana jako COX-1, jest obecna niemal we

wszystkich komórkach ustroju, natomiast forma COX-2 ulega aktywacji jedynie w komórkach zapalnych. Wydaje się, że nadwrażliwość na NLPZ wiąże się z blokowaniem tylko izoenzymu COX-1, a proces zapalny z aktywnością COX-2. W związku z tym leki, które blokują bardziej selektywnie COX-2 niż COX-1, takie jak meloxicam i nimesulid, a przede wszystkim celekoksib i rofekoksib powinny być lepiej tolerowane przez tych chorych. Rofekoksib (Vioxx, Merck & Co.) w dawce terapeutycznej zalecanej przez producenta, nie powodował duszności u żadnego z 12 chorych na astmę aspirynową, którym ten lek podawano w naszej Katedrze (112). Jednak aby rekomendować jego stosowanie u tych chorych należy znacznie powiększyć liczbę badanych osób. Oba izoenzymy mają w 50% identyczną budowę i nie jest wykluczone, że leki selektywnie blokujące COX-2 wykazują również słabą aktywność w stosunku do COX-1.

Unikanie niesterydowych leków przeciwzapalnych przez astmatyków aspirynowych jest niezbędne, ale nie gwarantuje pełnego zdrowia. Co więcej, z biegiem lat astma postępuje i z reguły ma bardzo ciężki przebieg. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się wysoką eozynofilię w krwi i drogach oddechowych, a większość chorych wymaga leczenia doustnymi preparatami glikokortykosteroidów.

Diagnozę astmy aspirynowej często można postawić w oparciu o wywiad. Jednak czasami nadwrażliwość na NLPZ, a głównie pyrazolony, wiąże się z bezpośrednią reakcją IgE-zależną. Aby więc postawione rozpoznanie nie budziło wątpliwości, w każdym przypadku należy wykonać testy prowokacyjne z kwasem acetylosalicylowym podawanym donosowo, wziewnie lub doustnie. Testy skórne z kwasem acetylosalicylowym wypadają zawsze ujemnie, niezależnie od obecności towarzyszącej atopii. Najpopularniejsze są testy z aspiryną doustną lub wziewne z aspiryną lizylową. Testy donosowe charakteryzują się niewielką czułością i wykonywane są rzadko.

Uważa się, że kluczowymi mediatorami astmy aspirynowej są leukotrieny cysteinylowe. Po prowokacji kwasem acetylosalicylowym u chorych na astmę aspirynową poziom leukotrienów w moczu, popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych i w wydzielinie nosa wzrasta od 2- do 15-razy; różnią się oni w tym względzie istotnie od astmatyków dobrze tolerujących aspirynę (15, 101, 102, 114). U chorych na astmę aspirynową czasami stwierdza się także podwyższenie podstawowego poziomu wydzielanych leukotrienów (70). Ma to niewątpliwie związek ze stopniem zaburzenia czynności płuc i świadczy o stałej nadprodukcji leukotrienów, nasilonej jedynie po ekspozycji na NLPZ. Kolejnym dowodem potwierdzającym istotną rolę tych

mediatorów w patomechanizmie ataku astmy aspirynowej jest fakt, że antagoniści receptorów leukotrienowych zapobiegają skurczowi oskrzeli indukowanemu aspiryną (24, 137).

Kluczowym enzymem w produkcji leukotrienów cysteinylowych jest syntaza leukotrienu C₄ (LTC₄S). Dokładniejsze prace nad jego funkcjonowaniem i ekspresją były możliwe po sklonowaniu do bibliotek linii THP-1 i opublikowaniu sekwencji przez Penrose'a i Lam'a w 1996 roku (72). Badania przeprowadzone w naszej Katedrze wykazały, że w biopsjach oskrzelowych u osób z nadwrażliwością na aspirynę występuje zwiększona ekspresja LTC₄S (22). Ponadto w naszej Katedrze znaleziono w regionie promotorowym LTC₄S (w pozycji -444) polimorfizm, polegający na transwersji nukleotydu A na C, który jest dwukrotnie częstszy w fenotypie astmy z nadwrażliwością na aspirynę (88). Ponieważ polimorfizm ten występuje w regionie promotorowym, który ulega wpływom różnych czynników regulacyjnych, wydaje się prawdopodobne, że transwersja ta może powodować wyższą ekspresję tego enzymu (113). Sklonowane cDNA LTC₄S koduje 675 par zasad, natomiast białko tego enzymu składa się ze 150 aminokwasów i ma masę 18 kDa. Struktura trzeciorzędowa tworzy 3 hydrofobowe domeny przezbłonowe i 2 hydrofilne pętle. W aminokwasowej sekwencji tego enzymu wykazano między innymi obecność dwóch miejsc fosforylacji kinazy białkowej C i jednego miejsca glikozylacji, co świadczy, że jego aktywność ulega wpływom regulacyjnym (73, 135).

Nie jest również wykluczone, że przyczyną nadprodukcji leukotrienów u astmatyków aspirynowych jest niewystarczająca aktywność COX, a nie zwiększona aktywność enzymów przemian leukotrienów (91). Istnieją doniesienia o obniżonej ekspresji mRNA COX-2 w hodowanych *in vitro* nabłonkach polipów nosa oraz w błonie śluzowej polipów nosa pobranych od astmatyków aspirynowych, w porównaniu z astmatykami dobrze tolerującymi aspirynę (55, 74). Ponadto wykazano wyższą ekspresję tego enzymu w skrawkach oskrzeli u chorych na astmę w porównaniu z osobami zdrowymi, ale była ona niższa u chorych z nadwrażliwością na aspirynę, niż u astmatyków dobrze tolerujących ten lek (106).

Za przypuszczalnym udziałem PGE₂ w patogenezie astmie aspirynowej przemawia także fakt, że podana w formie inhalacyjnej znosi ona nadprodukcję leukotrienów i zapobiega atakowi astmy po prowokacji aspirynowej (96, 109).

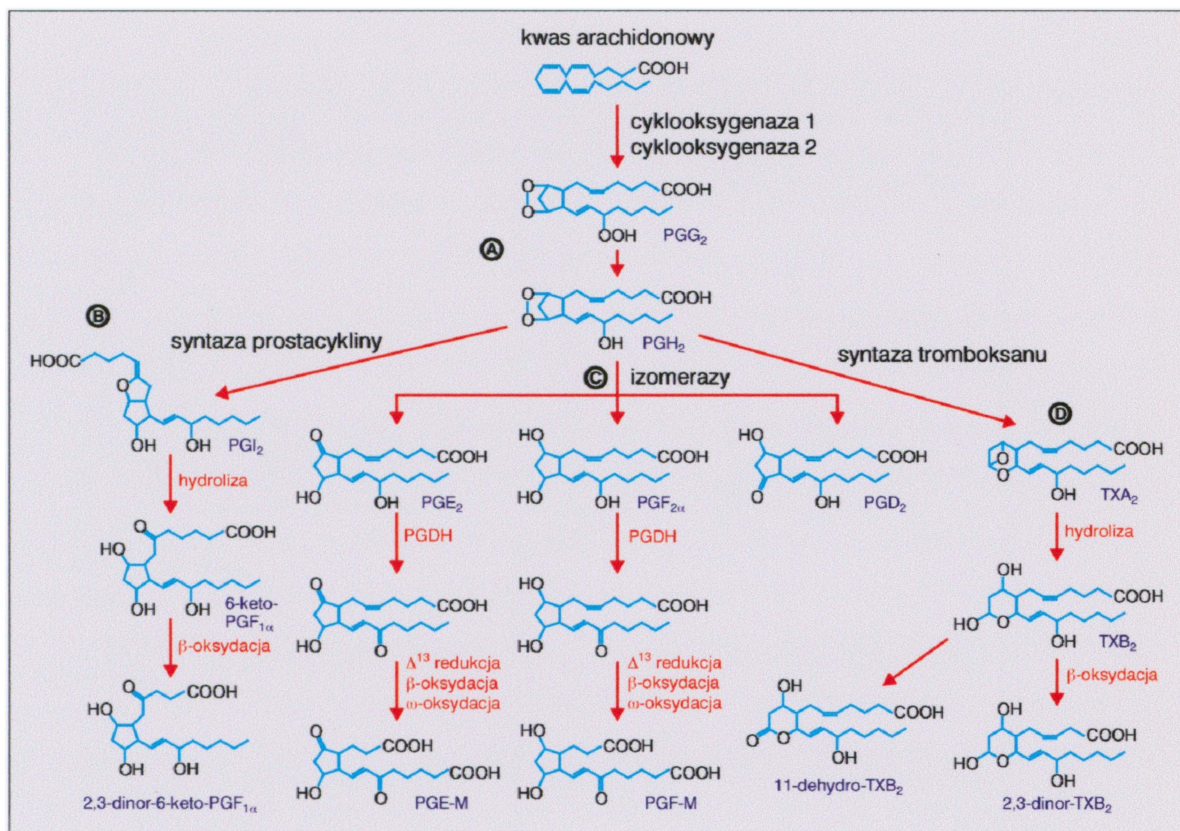
1.6 Metabolizm kwasu arachidonowego.

Wszystkie związki które powstają w wyniku przekształceń kwasu arachidonowego (AA) określa się jako eikozanoidy. Nazwa ta wywodzi się od greckiego liczebnika 20, ponieważ tyle atomów węgla ma cząsteczka kwasu arachidonowego. Pierwsze doniesienia o biologicznych efektach ich działania pochodzą z 1930 roku i dotyczą kurczliwości mięśniówki gładkiej. Wkrótce potem Euler wyekstrahował z nasienia substancję silnie kurczącą mięśniówkę gładką macicy i zaproponował dla niej nazwę „prostaglandyna”. Jednak na poznanie jej struktury chemicznej trzeba było czekać aż do lat 50-tych. Oprócz prostaglandyn do eikozanoidów zalicza się poznane w latach 70-tych tromboksany i prostacyklinę, a w latach 80-tych leukotrieny i lipoksyny.

Etapem wstępnym w produkcji eikozanoidów jest uwolnienie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych przez fosfolipazę A_2 . Następujące z kolei utlenianie kwasu arachidonowego może być katalizowane przez trzy różne grupy enzymów: cyklooksygenazy, lipoksygenazy i monooksygenazy zależne od cytochromu P450 (CYP450). Procesy te warunkują powstanie prostaglandyn, prostacykliny i tromboksanów (Rysunek 1). Te trzy grupy związków noszą wspólną nazwę prostanoidów. Do tej pory poznano dwie izoformy cyklooksygenaz – COX-1 i COX-2. Mają one dwa miejsca aktywne enzymatycznie. Jedno katalizuje cyklooksygenację kwasu arachidonowego i powstanie PGG_2 , a drugie ma aktywność peroksydazy i uczestniczy w przemianie PGG_2 do PGH_2 . Z tego też względu COX jest nazywana również syntazą prostaglandyny PGH_2 (PGHS). Obie prostaglandyny są niestabilne i natychmiast po powstaniu ulegają dalszym przemianom. COX-1 jest zlokalizowana w siateczce endoplazmatycznej i błonie jądrowej. Jej ekspresja jest stała, niezależna od stanu aktywności komórki; produkuje prostaglandyny przeznaczone do wydzielania. COX-2 jest enzymem ulokowanym głównie w otoczce jądrowej, a jej ekspresja indukuje się w warunkach nasilonej stymulacji. Obie izoformy są kodowane przez różne geny, które wykazują homologię w około 60%. Za biologiczny efekt działania prostanoidów, niejednokrotnie skrajnie zróżnicowany, odpowiedzialne są receptory błonowe sprzężone z rodziną białek G (Tabela 1). Drugą grupą receptorów prostanoidów są wewnątrzkomórkowe receptory peroksysomalnego czynnika proliferacyjnego (*PPAR* – *peroxisome-proliferator-activated receptor*), których aktywność wiąże się z regulacją transkrypcji genów (87).

Podtyp receptora	Wtórny przekaznik	Naturalny agonista	Odpowiedź komórek mięśni gładkich	Wpływ na agregację płytek krwi
DP	$\uparrow$ cAMP	PGD ₂	Brak	Hamuje
EP1	IP ₃ , DAG, Ca ⁺²	PGE ₂ , PGF _{2α}	Skurcz	Brak
EP2	$\uparrow$ cAMP	PGE ₂	Rozkurcz	Brak
EP3	$\uparrow\downarrow$ cAMP	PGE ₂	Skurcz	Nasila lub hamuje
EP4	$\uparrow$ cAMP	PGE ₂	Rozkurcz	Brak
FP	IP ₃ , DAG, Ca ⁺²	PGF _{2α}	Skurcz	Brak
IP	$\uparrow$ cAMP	PGI ₂ , PGE ₂	Rozkurcz	Hamuje
TP naczyniowy	IP ₃ , DAG, Ca ⁺²	TXA ₂ , PGH ₂ , (PGD ₂ , PGF _{2α})	Skurcz	Brak
TP płytkowy	IP ₃ , DAG, Ca ⁺²	TXA ₂ , PGH ₂	Brak	Nasila

Tabela 1. Typy receptorów prostanoidów, ich przekazniki wewnątrzkomórkowe oraz wywierany efekt biologiczny.



Rysunek 1. Metabolizm eikozanoidów na szlaku cyklooksygenaz.

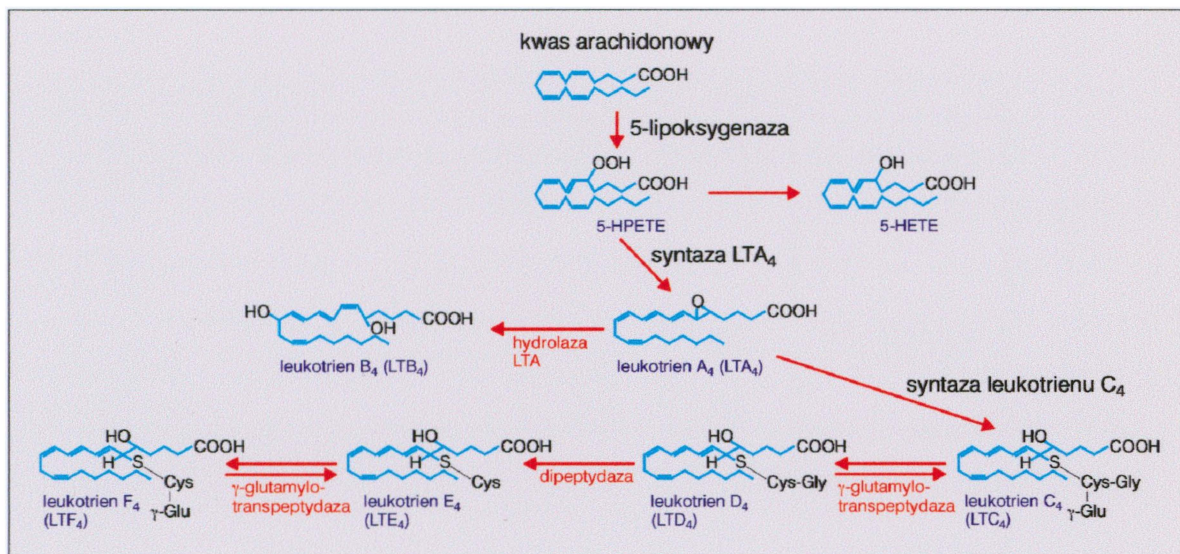
A. Kwas arachidonowy zostaje utleniony przez COX-1 lub COX-2 do niestabilnych produktów pośrednich, prostaglandyn – PGG_2 i PGH_2 . PGH_2 może być następnie włączona w trzy alternatywne torzy przemian – B, C lub D.

B. Syntaza prostacykliny produkuje prostacyklinę. Jej późniejsza szybka i samoistna inaktywacja zachodzi na drodze hydrolizy i β -oksydacji.

C. Izomeryzy przekształcają PGH_2 do trzech różnych prostaglandyn: E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ i D_2 . Te z kolei w wyniku działania 15-OH-dehydrogenaz prostaglandyn (PGDH) ulegają szybkiej inaktywacji z wytworzeniem ketonów. Dalszy katabolizm ketonów prostaglandyn polega na redukcji wiązania Δ^{13} i oksydacji ze skróceniem łańcucha węglowego cząsteczki.

D. Tromboksan A_2 (TXA_2) powstaje przy udziale syntazy tromboksanu i ulega samoistnej szybkiej hydrolizie do nieaktywnego TXB_2 , a następnie innych nieaktywnych produktów wolnej degradacji.

Lipoksygenazy utleniają nienasycone kwasy tłuszczowe bez ich cyklizacji. W efekcie tej katalizy powstają wodoronadtlenki lipidów. Różne komórki wykazują odrębną ekspresję izoenzymów lipoksygenazy. Płytki krwi mają 12-lipoksygenazę, neutrofile 5-lipoksygenazę, a eozynofile i bazofile aż dwie lipoksygenazy, to jest 5- i 15-lipoksygenazę. Niestabilne wodoronadtlenki ulegają dalszym przemianom do hydroksykwasów, epoksykwasów, lipoksyn i leukotrienów. Z punktu widzenia patofizjologii astmy najważniejszy jest szlak 5-lipoksygenazy (Rysunek 2). Enzym ten z pomocą białka kofaktorowego FLAP (*five lipoxygenase activated protein*) generuje poprzez 5-wodoronadtlenek niestabilny epoksyd kwasu arachidonowego nazywany leukotrienem A₄ (LTA₄). Swoista hydrolaza obecna w neutrofilach przekształca LTA₄ w leukotrien B₄. Jest to silny chemoatraktant przyciągający komórki do ogniska zapalnego. LTA₄ może być też sprzęgany ze zredukowanym glutationem, w wyniku czego powstaje peptydoleukotrien LTC₄. W niektórych komórkach syntaza leukotrienu C₄ (LTC₄S) obecna jest wraz z 5-LO i białkiem FLAP. Tak wyposażone enzymatycznie są między innymi eozynofile, mastocyty i bazofile. W innych komórkach, np. płytkach krwi i komórkach śródbłoka naczyń krwionośnych, LTC₄S występuje bez tych pierwszych białek i wówczas metabolizuje dostarczony jej z krwi LTA₄. Uważa się, że tak wyprodukowany LTC₄, jest głównym źródłem tego leukotrienu we krwi (81). Transcelularny mechanizm produkcji LTC₄ może również odgrywać pewną rolę w produkcji LTC₄ przez komórki nabłonka oskrzeli. W monocytach i makrofagach syntazie LTC₄ towarzyszy hydrolaza LTA₄, komórki te mogą więc produkować zarówno LTC₄ jak i LTB₄. Natomiast LTC₄S pozbawione są zupełnie komórki nabłonkowe, limfocyty i neutrofile. LTC₄ pod wpływem γ -glutamylotranspeptydazy ulega przemianie po odszczepieniu kwasu glutaminowego do LTD₄. Ten z kolei po odszczepieniu glicyny przekształca się w leukotrien E₄, który może już być eliminowany z ustroju. Uważa się, że poziom leukotrienu E₄ w moczu oddaje aktualny stan metabolizmu leukotrienów cysteinylowych w organizmie.



Rysunek 2. Metabolizm kwasu arachidonowego na szlaku 5-lipoksygenazy (5-LO).

Wolny kwas arachidonowy jest utleniany w pozycji 5 przez 5-LO. W wyniku tej reakcji powstaje niestabilny kwas 5-hydroperoksyeicosatetraenowy (5-HPETE). Ulega on następnie dehydratacji przez syntazę LTA₄ z wytworzeniem leukotrienu A₄ (LTA₄). Kolejny etap wiąże się z hydrolizą LTA₄ i powstaniem leukotrienu B₄ (LTB₄) lub koniugacją LTA₄ ze zredukowanym glutationem (GSH) i wytworzeniem leukotrienu C₄ (LTC₄). LTC₄ ulega przekształceniu przez γ-glutamylotranspeptydazę do leukotrienu D₄ (LTD₄) z uwolnieniem kwasu glutaminowego. Z LTD₄ po usunięciu reszty glicynowej przez dipeptydazę powstaje leukotrien E₄, metabolizowany dalej do leukotrienu F₄.

Przy omawianiu metabolizmu kwasu arachidonowego nie można pominąć lipoksyn. Są to stosunkowo najslabiej poznane eikozanoidy. Ich powstanie związane jest ze współdziałaniem różnych enzymów przemian kwasu arachidonowego i wielu komórek (np. neutrofilów i eozynofilów, neutrofilów i płytek krwi). Kluczową rolę odgrywa tutaj międzykomórkowa dyfuzja pośrednich wodorotlenków kwasu arachidonowego (13). Wydaje się, że lipoksyny są związkami ograniczającymi rozszerzanie się nacieku zapalnego. Działają one prawdopodobnie poprzez receptor serpentynowy sprzężony z białkiem G. Udowodniono między innymi, że zmniejszają zarówno odpowiedź neutrofilów na bodźce chemotaktyczne jak i produkcję wielu mediatorów przez komórki zapalne (17, 90).

1.7 Rola leukotrienów i leków antyleukotrienowych w patomechanizmie i leczeniu astmy.

W świetle współczesnych badań udział leukotrienów cysteinylowych w astmie wydaje się być niekwestionowany (82). W popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (*bronchoalveolar lavage* – BAL), uzyskiwanych od chorych na astmę oskrzelową wykazano znamienne wyższy poziom LTC₄ i LTB₄, nawet w bezobjawowych okresach przebiegu choroby (29). Ponadto po stymulacji alergenem astmatyków atopowych (71), a aspiryną astmatyków aspirynowych (15, 102, 114), obserwowano w BAL-u kilkakrotny wzrost poziomu leukotrienów C₄ i D₄, a w moczu leukotrienu E₄. Związki te wstrzyknięte podskórnie wywołują zaczerwienienie i obrzęk związany ze wzrostem przepuszczalności naczyń (104), zaś inhalowane przez osoby zdrowe są przyczyną skurczu oskrzeli (nawet 500-1000 razy silniejszego od wywołanego przez histaminę) (25) i ich nadwrażliwości (50) oraz nadprodukcji śluzu (62). Leukotrieny nasilają także indukowaną przez trombinę i czynnik wzrostu nabłonków (*epidermal growth factor* – EGF) proliferację mięśniówki gładkiej oskrzeli. Inne, mniej znane ich działanie wiąże się z nasileniem wrażliwości nerwu błędnego oraz zależnych od kapsaicyny afferentnych włókien C, które mogą wywoływać odruch kaszlu, skurcz mięśniówki gładkiej i nadprodukcję śluzu. Leukotrieny, a w szczególności LTB₄ i LTE₄ wykazują silną aktywność chemotaktyczną w stosunku do neutrofilów, eozynofilów i monocytów. Mogą również modyfikować funkcję komórek rzęskowych oskrzeli oraz wpływać na przebudowę ściany oskrzeli i przerost gruczołów śluzowych (11).

Pierwsze wprowadzone na rynek farmaceutyczny leki antyleukotrienowe blokowały 5-LO, FLAP i fosfolipazę A₂. Kolejna grupa, to antagoniści receptorów leukotrienów cysteinylowych, a więc zafirlukast (Accolate, AstraZeneca), montelukast (Singulair, Merck) oraz stosowany w Japonii pranlukast (Ultair, SmithKline Beecham). W układzie eksperymentalnym LTD₄ wywołuje skurcz mięśniówki gładkiej po około 4 minutach, natomiast efekt LTC₄ jest obserwowany po czasie 5 razy dłuższym. Nie wiadomo, czy ta różnica wiąże się z przemianą LTC₄ do LTD₄, czy też każde z nich działa na inny receptor. Do tej pory poznano dwa typy receptorów leukotrienów cysteinylowych. Receptor LT1 charakteryzuje się wysokim powinowactwem do leukotrienu D₄ i niskim do C₄. Wiadomo, że jest to receptor sprzężony z białkami G. Kilka sekund po jego pobudzeniu w komórce wzrasta poziom wapnia, a kilka minut później dochodzi między innymi do aktywacji topoizomery I, nasilenia transkrypcji

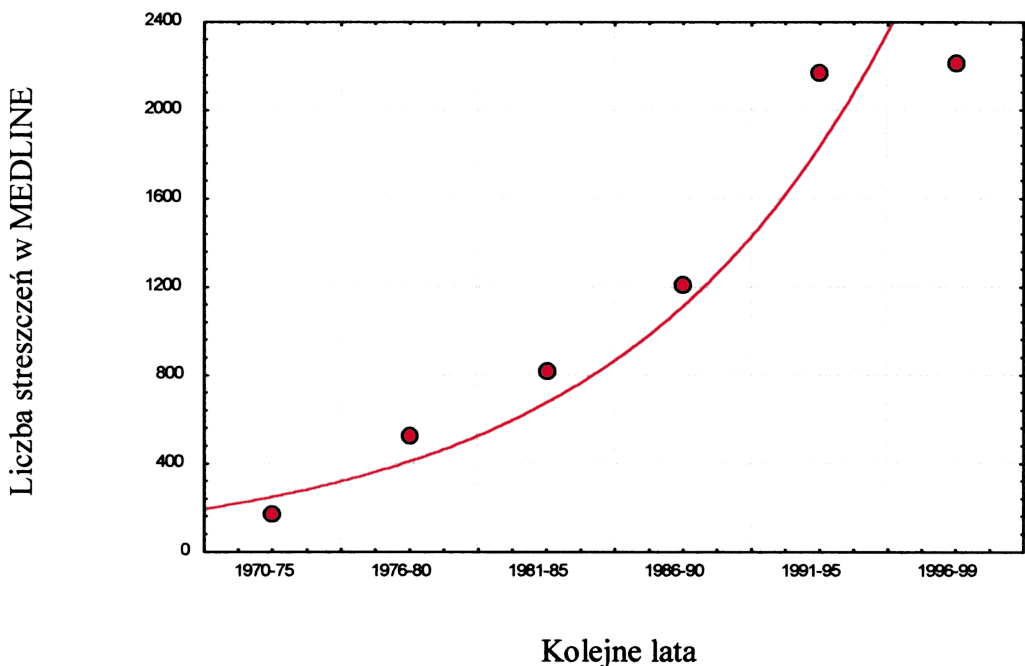
białek aktywujących fosfolipazy i wzrostu aktywności fosfolipazy A₂. Drugi typ receptorów leukotrienów cysteinylowych to LT₂. Ma on wysokie powinowactwo do LTC₄ i niskie do LTD₄. Dotąd niewiele wiadomo o jego przekaźnictwie wewnątrzkomórkowym (33).

Leki antyleukotrienowe znamienne zmniejszają skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli w izolowanych ludzkich preparatach inkubowanych *in vitro* z leukotrienami cysteinyłowymi. Dla pranlukastu wykazano nawet, że siła tego działania jest proporcjonalna do dawki leku (126). U zwierząt doświadczalnych leki antyleukotrienowe zapobiegają atakowi astmy po stymulacji alergenem, zmniejszają obrzęk i przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz przeciwdziałają rozwojowi nadwrażliwości oskrzeli (40). Zmniejszają także napływ komórek zapalnych, a w szczególności eozynofilów, do dróg oddechowych (66). Wydaje się, że poprzez blokadę receptorów LT zmniejsza się także dalsza nadprodukcję leukotrienów (49). U ludzi po zastosowaniu leków antyleukotrienowych wykazano między innymi zmniejszenie skurczu oskrzeli po stymulacji alergenem, znaczne złagodzenie objawów astmy wysiłkowej, aspirynowej oraz zmniejszenie częstości napadów duszności powodowanych zimnym powietrzem (46, 48).

Przeprowadzone w latach 1998-2000 wieloośrodkowe badania kliniczne wykazały, iż leki blokujące receptory leukotrienów cysteinylowych są skuteczne w wysokim odsetku chorych, który w zależności od typu astmy wynosi 40–70% (19,119). Stąd też blokery receptorów leukotrienowych znalazły się w oficjalnych zaleceniach opracowanych przez GINA (Global Initiative for Asthma), jako wskazane w leczeniu astmy, zwłaszcza o lekkim i umiarkowanym przebiegu przewlekłym. Są to leki doustne, więc stosunkowo łatwe w dawkowaniu i dobrze akceptowane przez pacjentów. Ponadto poznane do tej pory efekty uboczne ich stosowania są bardzo niewielkie. Ograniczają się jedynie do znikomych, często przejściowych dolegliwości żołądkowo-jelitowych i bólów głowy. Opisywane przypadki wystąpienia zespołu Churg-Stroussa w trakcie podawania tych preparatów mają prawdopodobnie związek nie tyle z ubocznym działaniem samego leku, co z redukcją kortykoterapii systemowej (40).

2. Budowa i funkcja eozynofilów.

Krwinka kwasochłonna została po raz pierwszy opisana przez Ehrlicha 120 lat temu. Od tego czasu wiele dowiedzieliśmy się o jej budowie i funkcji. Szczególnie w ciągu ostatnich kilkunastu lat widać wyraźny wzrost zainteresowania eozynofilami. Jeżeli przeanalizujemy ilość artykułów poświęconych tej komórce, okaże się, że w ostatnich latach wzrasta w zadziwiającym tempie (Rysunek 3).



Rysunek 3. Wzrost liczby publikacji dotyczących eozynofilów w latach 1970-1999.

W ubiegłym roku nawet po raz pierwszy zostało zorganizowane sympozjum w Lund, na którym przez pięć dni mówiono tylko o tej wciąż pod wieloma względami tajemniczej komórce. Niektóre aspekty funkcji eozynofila, jak udział w procesach alergicznych, obrona organizmu przed pasożytami, cytotoksyczność, neurotoksyczność, modulacja reakcji zapalnej i procesów nowotworowych, zostały zauważone wiele lat temu (134). Do końca nie wiadomo jednak na czym polega udział w tych procesach i jak wygląda regulacja tych mechanizmów.

2.1 Pochodzenie i różnicowanie eozynofilów.

Eozynofile wywodzą się z komórek pnia szpiku kostnego. W ich różnicowaniu i dojrzewaniu uczestniczy szereg czynników humoralnych produkowanych przez limfocyty T i komórki podścieliska szpiku. Główne trzy hormony układu krwiotwórczego warunkujące prawidłową hemopoezę eozynofilów to GM-CSF, IL-3 i IL-5 (9). Proces różnicowania i dojrzewania w szpiku trwa około 5 dni. Po tym czasie dojrzałe komórki kwasochłonne opuszczają szpik i krążą w krwi obwodowej przez około 25 godzin. Następnie wędrują do tkanek przyciągane przez czynniki chemotaktyczne, takie jak histamina i jej główny metabolit kwas imidazolowoocetowy, substancję PAF, leukotrieny, prostaglandyny, produkty rozpadu i metabolizmu bakterii oraz pasożytów, fibrynopeptyd A, interleukiny, a w szczególności IL-5 (20, 98). Wykazano, że podanie świnkom morskim przeciwciał wiążących IL-5, powodowało znaczne zmniejszenie napływu eozynofilów do dróg oddechowych do których następnie podawano LTD₄ (126). Szczególnie duże nagromadzenie tych komórek stwierdza się w tkankach mających kontakt ze środowiskiem zewnętrznym, a więc w przewodzie pokarmowym, górnych i dolnych drogach oddechowych oraz dolnych partiach układu moczowo-płciowego. Długość życia eozynofilów w tych tkankach wynosi minimum 6 dni, przy czym wyraźnie zwiększa się w obecności takich cytokin jak GM-CSF, IL-3 i IL-5.

2.2 Morfologia komórki.

Cechą charakterystyczną eozynofila jest okularowate jądro oraz kwasochłonne ziarnistości (Rysunek 4). Są to tzw. ziarnistości wtórne, zwane też dużymi lub specyficznymi. Składają się one z elektronowo gęstego, krystaloidalnego rdzenia otoczonego macierzą o mniejszej gęstości. W rdzeniu lokalizuje się główne białko zasadowe (MBP), natomiast w korze pozostałe białka polikationowe, czyli eozynofilowe białko kationowe (ECP), peroksydaza (EPO) oraz neurotoksyny (EDN) (35). MBP jest nieenzymatycznym białkiem o ciężarze około 14 kDa, wykazującym wysoką toksyczność w stosunku do pasożytów i komórek nowotworowych, ale także zdrowych tkanek. Ponadto może ono aktywować mastocyty i neutralizować heparynę.

ECP jest również toksyczne dla pasożytów i zdrowych tkanek, a ponadto wykazuje właściwości bakteriobójcze, neurotoksyczne, aktywujące mastocyty i czynniki humoralne układu krzepnięcia krwi oraz ma aktywność rybonukleazową. EDN ma budowę i właściwości podobne do ECP, ale charakteryzuje się 100-krotnie silniejszą aktywnością rybonukleazową. Kolejne białko ziarnistości wtórnych to EPO. W przeciwieństwie do trzech omówionych powyżej ma aktywność enzymatyczną. W obecności nadtlenu wodoru i jonów halidowych (metaloalogenowych, a głównie bromku), katalizuje powstanie kwasu hipohalowego (ang. *hypohalous acid*), który jest toksyczny dla pasożytów, bakterii, komórek nowotworowych i zdrowych tkanek (57).

Ziarnistości wtórne pojawiają się w trakcie eozynofilopoezy w mielocytach i powstają z dużych, sferycznych i ziarnistych tworów lizosomalnych. Niektóre z tych tworów tworzą trwałe, homogenne pod względem gęstości ziarnistości pierwotne, tzw. mikroziarnistości. Są one dotąd poznane bardzo słabo. Zawierają między innymi lizofosfolipazę, która krystalizując w ślinie tworzy znane od bardzo dawna kryształy Charcot-Laydena.

Trzeci typ ziarnistości eozynofila, to ziarnistości małe. Tworzą się one na etapie metamielocytów, a w mikroskopie elektronowym są widoczne jako struktury o jednorodnej gęstości. Wiadomo, że składają się z kwaśnej fosfatazy i arylosulfatazy B. Dokładna rola tych związków nie została jeszcze wyjaśniona.

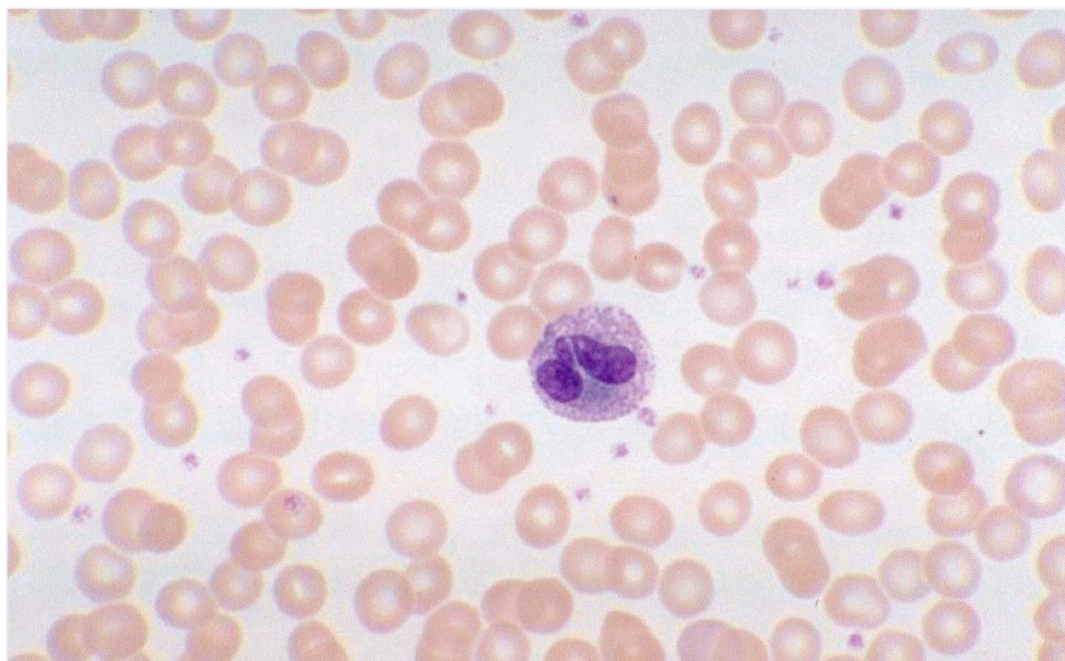
W obrazie pochodzącym z mikroskopu elektronowego widać także gładkie okrągłe lub półokrągłe struktury związane z błonami, określane jako struktury pęcherzykowo-cewkowe. Pełnią one ważną rolę przy degranulacji komórek i transporcie uwalnianych na zewnątrz mediatorów zapalnych.

Kolejnymi organellami komórki są ciała tłuszczowe, które nie różnią się od podobnych tworów występujących w innych komórkach organizmu. Liczba ciał tłuszczowych wzrasta po aktywacji i wydaje się, że jest to główny magazyn kwasu arachidonowego i zasadniczy ośrodek jego metabolizmu. Eozynofile zawierają również inne organelle komórkowe, takie jak siateczka endoplazmatyczna, wolne rybosomy, mitochondria i aparat Golgiego (Rysunek 5 i 6) (56).

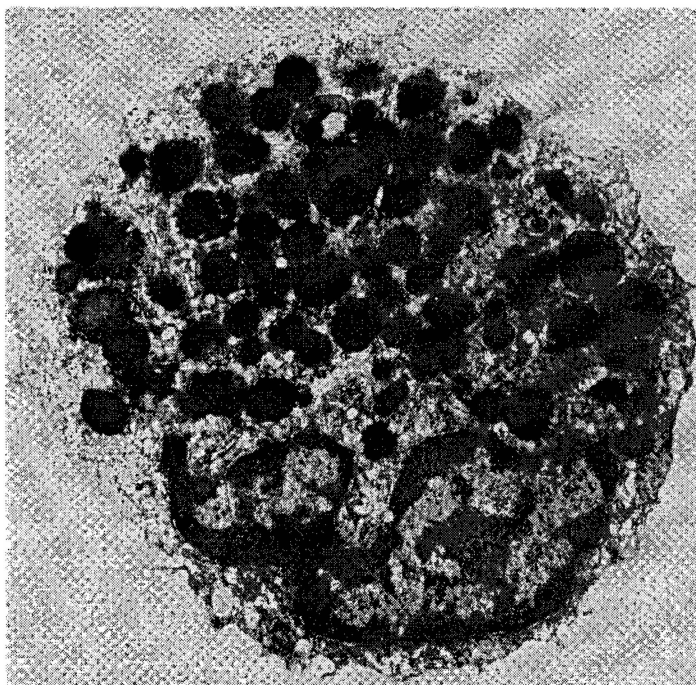
Oprócz depozytów nagromadzonych w ziarnistościach, eozynofile po aktywacji wydzielają związki wywodzące się ze struktur błonowych i organelli komórkowych, a produkowane *ad hoc*. Są to głównie mediatory lipidowe (leukotrieny cysteinylowe, lipoksyny, prostaglandyny, TXA₂, PAF) (52), cytokiny (GM-CSF, TGF- α , IL-3, IL-5,

IL-6) (12, 129) , enzymy (glukuronidazy, rybonukleazy, fosfolipazy, kolagenazy) oraz rodniki tlenowe (92).

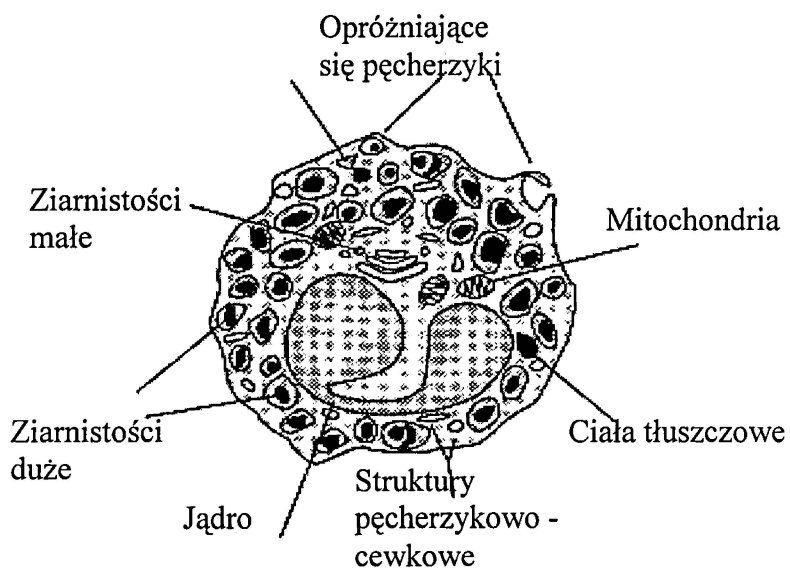
Nie wszystkie eozynofile są morfologicznie jednorodne. Niektóre z nich mają większe ziarnistości wtórne, więcej cytoplazmatycznych wakuoli i struktur pęcherzykowo-cewkowych, a zmiany markerów błonowych sugerują stan ich aktywacji (80). Odrębności struktury powodują zmiany gęstości, które można stwierdzić poprzez wirowanie komórek w gradientach gęstości. Eozynofile te są określane jako hipodensyjne i stanowią 10% puli eozynofilowej krwi osób zdrowych a 35-65% puli eozynofilowej chorych na astmę oskrzelową. W idiopatycznym zespole hipereozynofilowym mogą stanowić nawet 80% wszystkich komórek kwasochłonnych krwi (133). Podobny odsetek hipodensyjnych eozynofilów występuje też w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych astmatyków po stymulacji alergenem. Wydaje się więc, że hipodensyjne komórki są po prostu eozynofilami w stanie aktywacji, jednak przeprowadzane eksperymenty jednoznacznie nie udowodniły tej hipotezy (57).



Rysunek 4. Eozynofil w rozmazie krwi obwodowej.



Rysunek 5. Eozynofil – obraz z mikroskopu elektronowego.



Rysunek 6. Eozynofil – schemat budowy.

2.3 Receptory błonowe i markery powierzchniowe eozynofila.

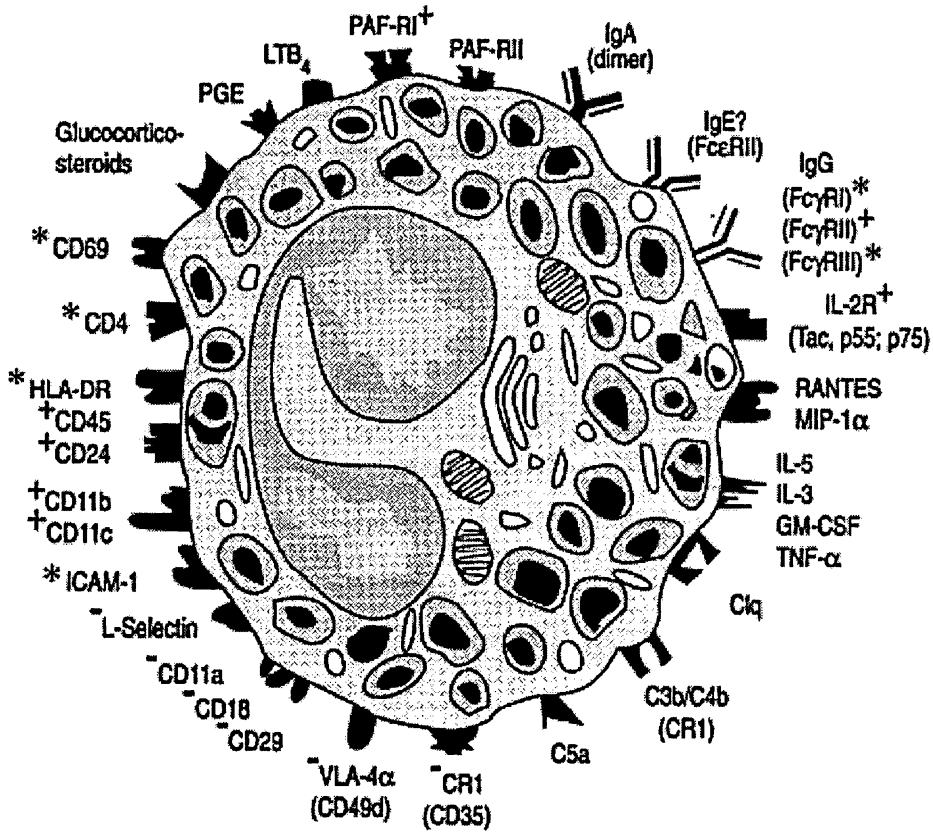
Na powierzchni eozynofila stwierdzono między innymi obecność receptorów dla:

- Immunoglobulin:
 - IgG – FcγRII (CDw32), a po aktywacji również FcγRI (CD64),
 - IgA (FcαR),
 - IgE głównie o niższym powinowactwie immunoglobuliny do receptora – FcεRII (CD23), ale również o wysokim powinowactwie – FcεRI;
- składowych kompleksu dopełniacza C1q, C3a, C3b, C5a;
- interleukin i czynników humoralnych: IL-3, IL-5, GM-CSF, TNFα, IFNα, IFNγ, IL-2, przy czym ten ostatni pojawia się dopiero po stymulacji komórki;
- mediatorów lipidowych – prostaglandyn, leukotrienów i PAF.

Ponadto na powierzchni eozynofila stwierdza się występowanie antygenów powierzchniowych, takich jak:

- antygeny zgodności tkankowej charakterystyczne dla wszystkich leukocytów, a więc HLA I (*human leukocyte antigen class I*) oraz CD45 (*common leukocyte antigen 45*);
- integryny uczestniczące w kontaktach międzykomórkowych, np. β₁-integryny, VLA4 (*very late antigen 4*), β₂-integryny, np. CD11a, CD11b, CD11c;
- markery z rodziny immunoglobulin, np. ICAM-1, VCAM-1;
- selektyny (132).

(Rysunek 7)



Rysunek 7. Schemat receptorów i markerów błonowych eozynofila.

- „+” oznacza, że receptor jest bardziej aktywny w trakcie przebywania komórki w tkankach, niż we krwi;
- „-” oznacza, że receptor jest mniej aktywny w trakcie przebywania komórki w tkankach, niż we krwi;
- „*” oznacza, że receptor jest aktywny tylko w trakcie przebywania komórki w tkankach;

3. Cel pracy.

Celem pracy jest:

- 1) określenie genetycznej ekspresji mRNA syntazy leukotrienu C₄ (LTC₄S) w eozynofilach chorych na astmę, z uwzględnieniem podziału na astmę aspirynową i niewrażliwą na aspirynę oraz w zdrowej grupie kontrolnej;
- 2) określenie ewentualnego związku pomiędzy ekspresją mRNA LTC₄S w eozynofilach, a obecnością wariantu C-444 regionu promotorowego LTC₄S.

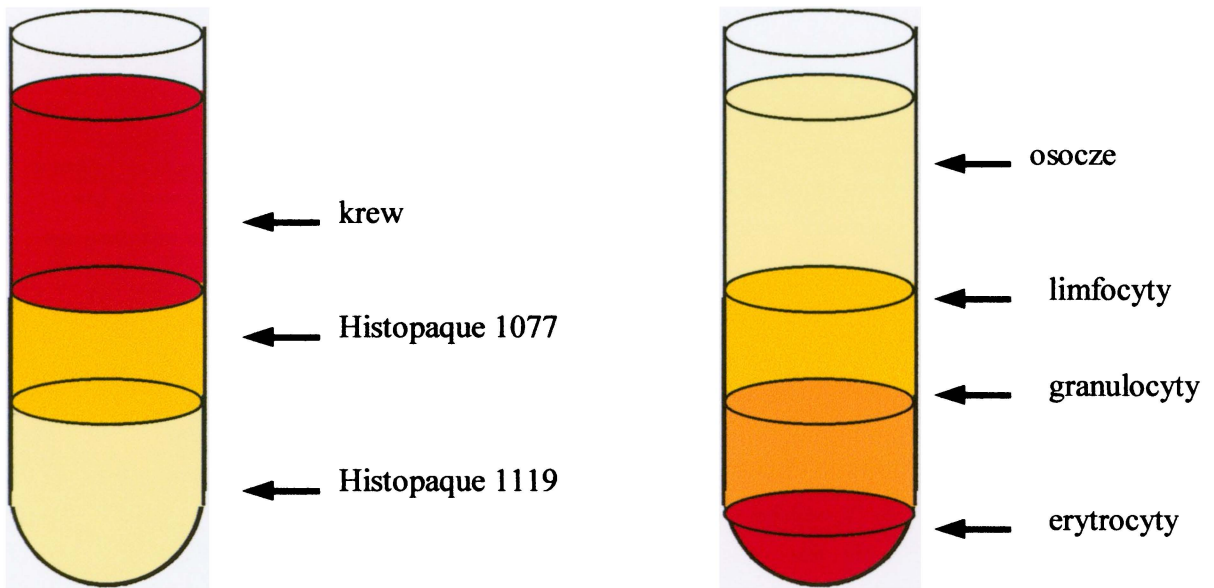
4. Metody oraz charakterystyka układów eksperymentalnych.

W przypadku badań nad jedną populacją komórek punktem krytycznym doświadczeń jest wyizolowanie jej w stanie czystym. Domieszka nawet 10% żywych komórek innego typu może zasadniczo zmieniać obraz markerów powierzchniowych i wydzielanych mediatorów. Ważne jest również, aby uzyskana populacja komórek była w stanie pobudzenia podobnym do stanu *in vivo*. Nie może być więc izolowana w sposób, który prowadziłby do jej aktywacji, na przykład po związaniu z przeciwciałem. Wymogi te spełnia zastosowana w pracy metoda negatywnej immunomagnetycznej separacji komórek (39). Poszukiwaną populację komórek krwi obwodowej uzyskuje się w wyniku oddzielenia z krwi wszystkich innych typów komórek, tak że pozostają w tym przypadku same eozynofile.

4.1 Opis negatywnej immunomagnetycznej separacji eozynofiliów.

1. Pobranie 45 ml krwi z żyły łokciowej z zastosowaniem EDTA jako antykoagulantu.
2. Oddzielenie limfocytów od granulocytów pełnej krwi obwodowej, poprzez wirowanie w gradientach gęstości.
 - a) rozcieńczenie krwi 0,9% roztworem NaCl w stosunku 5 do 1;
 - b) przygotowanie gradientu gęstości w stożkowej probówce Falcona o pojemności 50 mililitrów poprzez nałożenie 12 ml Histopaque 1077 g/ml na 12 ml Histopaque o gęstości 1119 g/ml;
 - c) nałożenie 25 mililitrów rozcieńczonej krwi na przygotowany wcześniej gradient;
 - d) wirowanie gradientów z krwią (300 g przez 30 minut w temperaturze pokojowej). Na tym etapie bardzo istotne jest powolne hamowanie na końcu wirowania (zbyt duże opóźnienie mogłoby naruszyć powstałe warstwy komórek).

Po zakończeniu wirowania uzyskuje się kilka warstw cieczy i zawiesin komórkowych zależnie od ich gęstości (Rysunek 8).



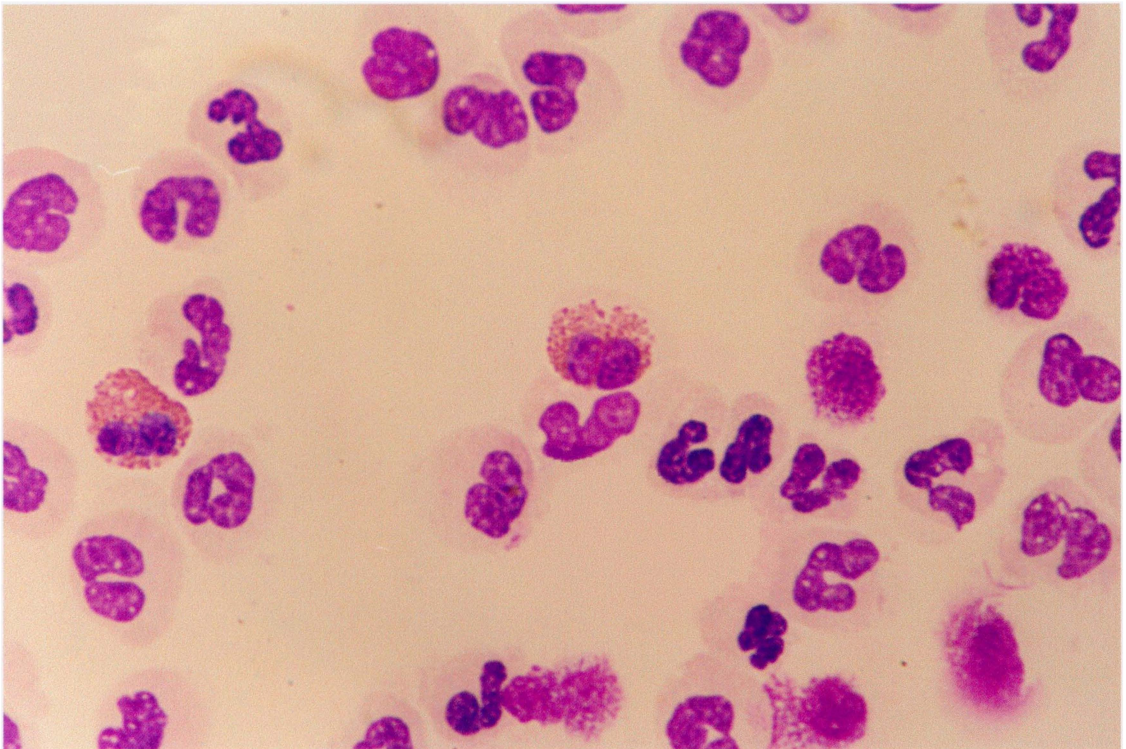
Przed wirowaniem.

Po wirowaniu.

Rysunek 8. Warstwy cieczy i rozkład komórek po wirowaniu krwi w gradientach gęstości.

3. Usunięcie warstwy osocza wraz z limfocytami, a następnie delikatne zebranie mieszaniny granulocytów. Mieszanina ta powinna składać się tylko z neutrofilów i eozynofilów, ponieważ bazofile jako komórki o gęstości mieszczącej się w zakresie 1072-1078 g/ml, a najczęściej 1074-1076 g/ml, pozostają razem z płytkami krwi we frakcji limfocytów (76); podobnie jak monocyty, których gęstość waha się w przedziale 1067-1077 g/ml (10). Średnia gęstość limfocytów wynosi 1073-1077g/ml, a neutrofilów i eozynofilów 1080-1090 g/ml (140).
4. Dwukrotne płukanie zebranej mieszaniny komórek w roztworze PBS z dodatkiem albuminy – stosowano 0,5% roztwór albuminy, (wirowania 280 g przez 15 minut w temperaturze pokojowej).
5. Liza domieszki erytrocytów w roztworze chlorku amonu (dokładny skład roztworu do lizy: chlorek amonu 155 mmol/l, KHCO_3 10 mmol/l, EDTA 0,1 mmol/l). Stosowany roztwór powinien mieć temperaturę 4°C, a procedura winna być prowadzona przez 10 minut na lodzie.

6. Wirowanie pozostałych po lizie komórek (300 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej).
7. Dwukrotne płukanie komórek w roztworze PBS z dodatkiem albuminy (wirowania 200 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej).
8. Zawieszenie komórek w roztworze PBS w zagęszczeniu 5×10^7 komórek w 1 ml buforu.



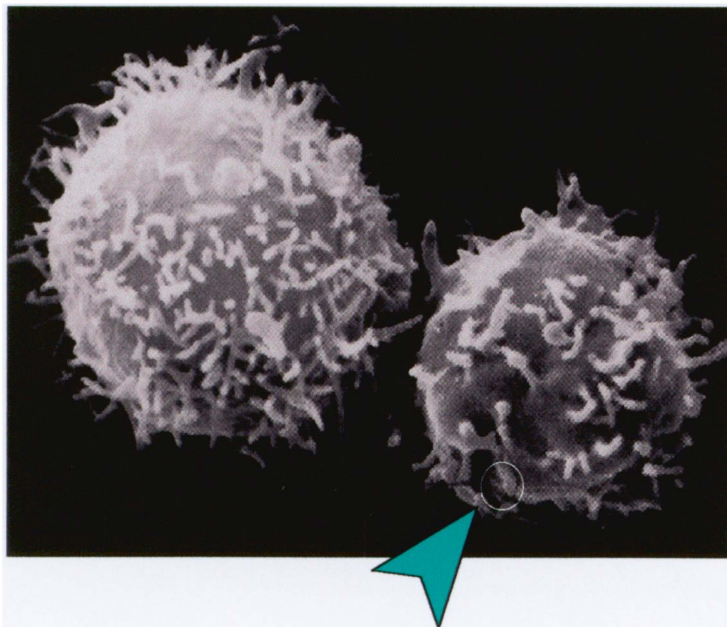
Rysunek 9. Zdjęcie preparatu rozmazu granulocytów.

Zdecydowana większość komórek to neutrofile.

9. Inkubacja zawiesiny granulocytów z mysimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu antygenowi CD16 (dodawano 50 μ l przeciwciał na 5×10^7 komórek – według zalecenia producenta przeciwciał).
- Stosowano przeciwciała CD16 Micro Beads (Miltenyi Biotec, USA). Były one sprzężone z magnetycznymi mikrogranulkami, czyli kulkami złożonymi z obojętnych polisacharydów i tlenków żelaza. Mała średnica mikrogranulek (około 50 nm) nie pozwalała na ich uwidocznienie w mikroskopie świetlnym oraz nie

powoduje zmian właściwości powierzchniowych komórek, do których te granulki są doczepione (Rysunek 10).

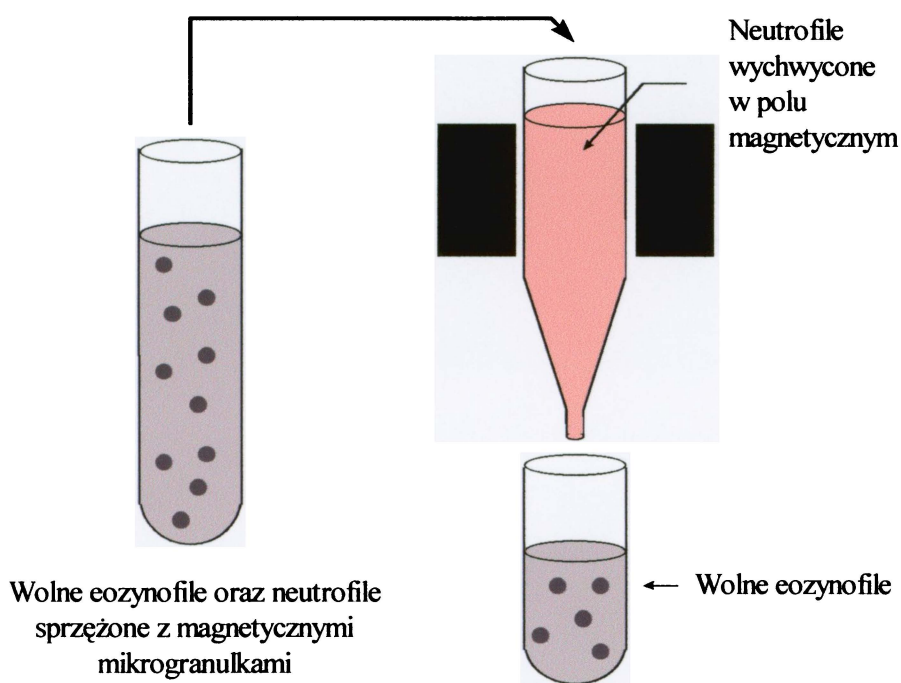
- Antygen CD16 jest receptorem o niskim powinowactwie do cząstek Fc immunoglobulin klasy G – FcγRIIIA i FcγRIIIB. Jest on obecny na powierzchni neutrofilów, komórek NK, silnie aktywowanych eozynofilów i niektórych limfocytów.
- Inkubacja z przeciwciałami trwała około 30 min i była prowadzona na lodzie.



Rysunek 10. Powierzchnia komórki z dołączoną magnetyczną mikrogranulką.

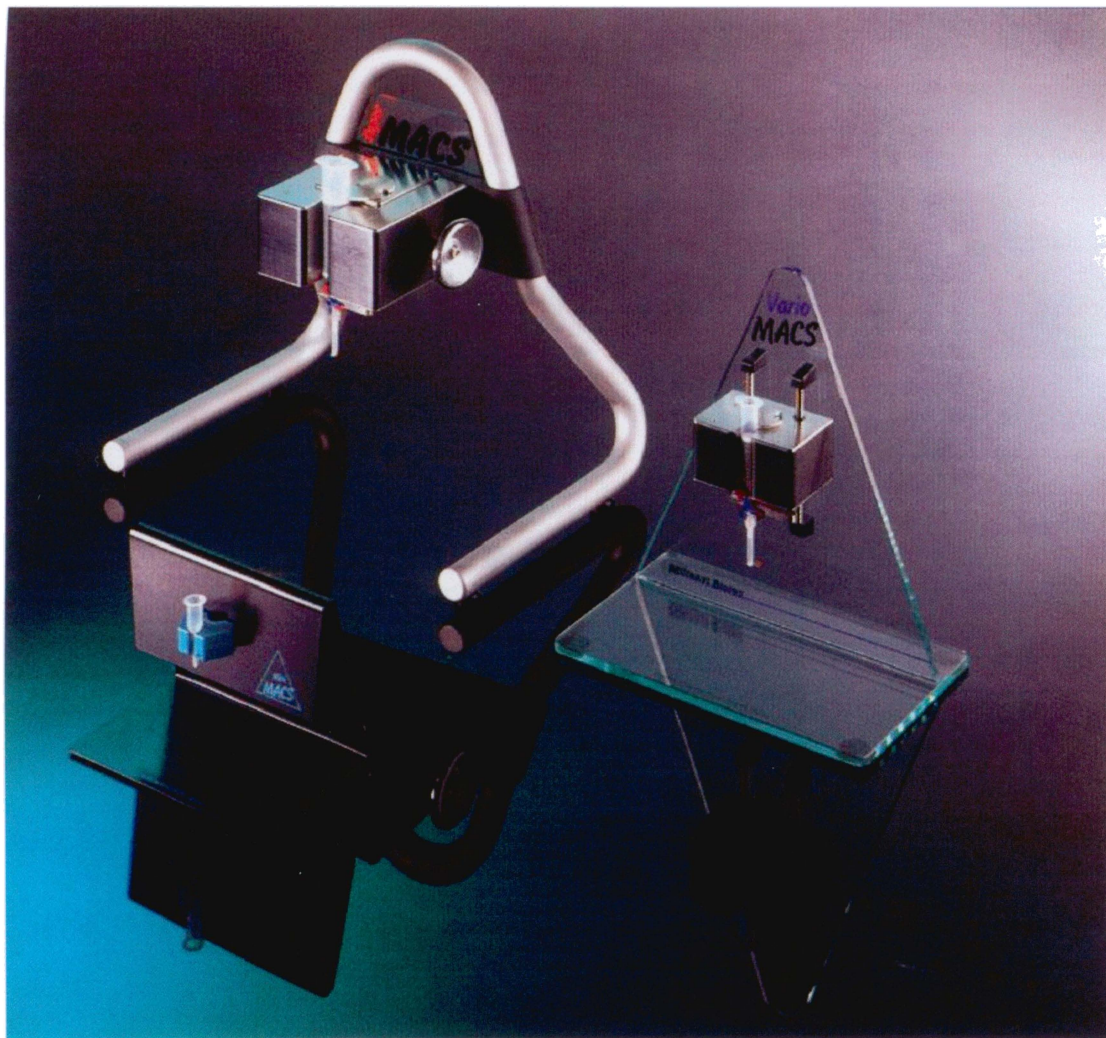
10. Odseparowanie wolnych eozynofilów od sprzężonych z magnetycznymi mikrogranulkami neutrofilów z zastosowaniem silnego pola magnetycznego.
 - Do wytwarzania pola magnetycznego użyto dwóch rodzajów separatorów firmy Miltenyi Biotec – MiniMACS i VarioMACS (Rysunek 12). Podstawową składową tego aparatu jest silny magnes wytwarzający pole magnetyczne. Natomiast ostateczna separacja odbywa się na kolumnach magnetycznych (Rysunek 13). Kolumny te są złożone z metalowych drucików umieszczonych w plastikowej obudowie. Całość przypomina strzykawkę i pozwala na swobodne przemieszczanie pomiędzy drucikami komórek o średnicy do 100 μm . Układ drucików powoduje 10000-krotne wzmocnienie wytwarzanego przez VarioMACS pola magnetycznego.

- Przepuszczenie przez kolumnę separacyjną umieszczoną w polu magnetycznym zawiesiny komórek złożonej z wolnych eozynofilów i neutrofilów sprzężonych z magnetycznymi mikrogranulkami pozwala na łatwe oddzielenie obu grup komórkowych. Neutrofile przywierają do drucików umieszczonych w kolumnie separacyjnej, a wolne eozynofile bez problemu przepływają przez tę kolumnę (Rysunek 11). Obie pôle komórek można następnie odzyskać i wykorzystywać w eksperymentach naukowych lub w pracy klinicznej.
- Metoda ta ma zastosowanie w izolacji nawet tak rzadkich komórek, jak komórki progenitorowe hemopoezy, które stanowią około 0,05% komórek jądrazstych krwi, komórki łożyska płodu obecne we krwi matki oraz komórki nowotworowe w krwi.



Rysunek 11. Uproszczony schemat immunomagnetycznej separacji komórek.

Neutrofile przywierają do drucików na kolumnie magnetycznej, a wolne eozynofile bez przeszkód przepływają przez kolumnę separacyjną.



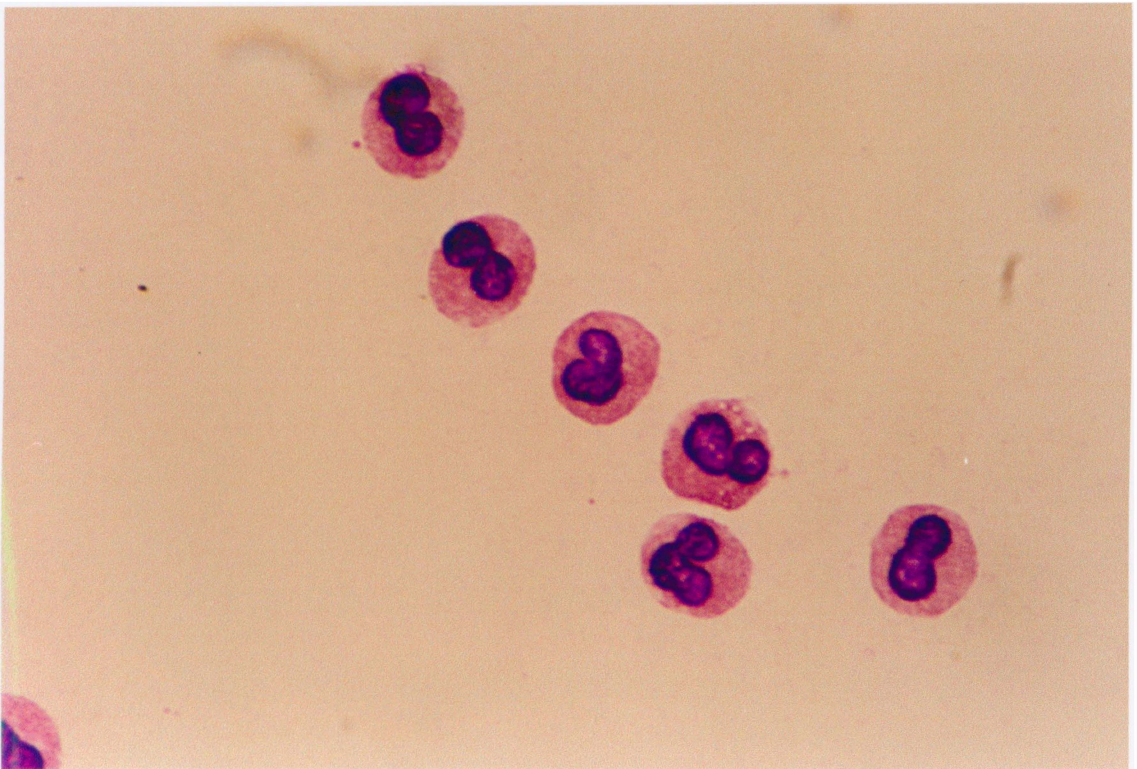
Rysunek 12. Urządzenia stosowane do immunomagnetycznej separacji komórek.

Największy (na zdjęciu u góry) SuperMACS stosowany między innymi w hematologii. Poniżej z prawej strony VarioMACS i z lewej MiniMACS. Oba znalazły zastosowanie w eksperymentach tej pracy.



Rysunek 13. Kolumna wykorzystywana do immunomagnetycznej negatywnej separacji.

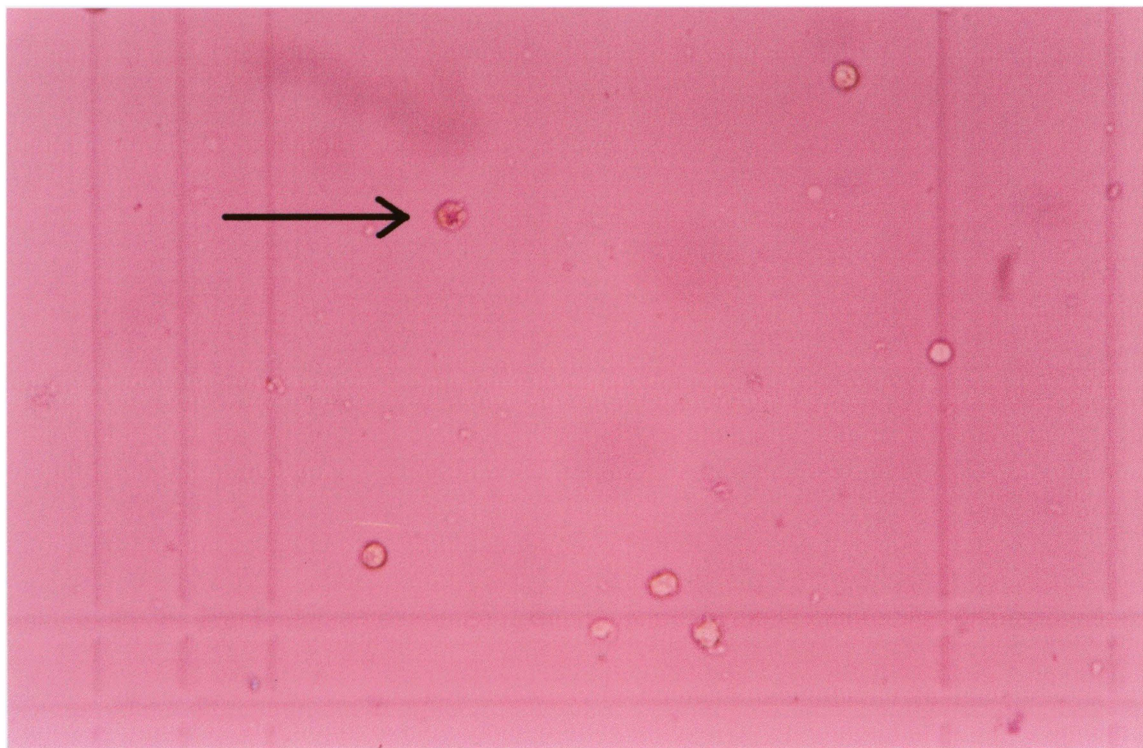
11. Wykonywanie rozmazów z otrzymywanych po izolacji komórek. Rozmazy barwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy, a następnie szacowano pod mikroskopem procentową domieszkę innych komórek niż eozynofile (Rysunek 14). Zawartość limfocytów i neutrofilów zwykle nie przekraczała łącznie 25%, a często była mniejsza niż 5%. Ponadto w oglądanych preparatach nie stwierdzano obecności bazofilów i monocytów.



Rysunek 14. Zdjęcie preparatu rozmazu eozynofilów po zakończeniu negatywnej immunomagnetycznej separacji tych komórek.

Wszystkie etapy izolacji były prowadzone w warunkach jałowych w komorze laminarnej ASSAB. Komórki inkubowano następnie przez około 18 godzin, co pozwalało na zmniejszenie ich pobudzenia po procedurach izolacyjnych. Inkubacje prowadzono w medium RPMI 1640 z dodatkiem FCS (10% składu medium), w temperaturze 37°C i w atmosferze wzbogaconej CO₂ do 5% składu gazów przy wilgotności powietrza 90%. Po 18 godzinach inkubacji zmieniano medium hodowlane i określano żywotność komórek po wybarwianiu ich zawiesiny błękitem trypanu przez 5

minut. Martwe komórki tracą zdolność błon cytoplazmatycznych do wydalenia elektrycznie dodatnio naładowanych barwników i barwią się na niebiesko. Takie komórki w eksperymentach stanowiły zawsze poniżej 10% (Rysunek 15).



Rysunek 15. Eozynofile wybarwione błękitem trypanu.

Komórki były wcześniej inkubowane w medium komórkowym przez 18 godzin.

Wśród komórek widoczna jedna martwa – zaznaczona strzałką.

W pierwszym etapie pracy do immunomagnetycznej izolacji eozynofików wykorzystywano MiniMACS. Jest to urządzenie, które służy głównie do izolacji pozytywnej. Jego pole magnetyczne nie jest tak silne jak w stosowanym w etapie drugim VarioMACS-ie. W związku z tym wśród wyizolowanych eozynofików uzyskiwano nieco więcej neutrofilów, które stanowiły nawet do 15% wszystkich komórek. Ponadto był to początek badań, więc z uwagi na nieco gorszą niż w późniejszych izolacjach technikę w rozmazach stwierdzano obecność pojedynczych limfocytów (nawet do 10%). Łącznie na tym etapie pracy domieszki innych komórek niż eozynofile sięgały czasem nawet 25-30%.

W drugim etapie pracy do izolacji używano VarioMACS. Ta modyfikacja znacznie obniżyła domieszkę neutrofilów wśród eozynofilów. Podobnie jedynie sporadycznie stwierdzano obecność limfocytów. Łącznie komórki inne niż eozynofile stanowiły w rozmazie 5 - 7% wszystkich komórek.

4.2 Stymulacja eozynofilów.

4.2.1 Charakterystyka substancji stosowanych do stymulacji eozynofilów.

W układach doświadczalnych pracy eozynofile inkubowano z IL-5, estrem forbolu, jonoforem wapnia i kwasem acetylosalicylowym.

a) Interleukina 5;

IL-5 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 20 kDa. W organizmie ludzkim jest ona produkowana głównie przez limfocyty Th typu 2. U ludzi wpływa jedynie na dojrzewanie i czynność eozynofilów. U myszy zakres jej działań jest szerszy i obejmuje także modyfikacje funkcji limfocytów B (32). Receptor dla IL-5 składa się z 2 podjednostek: większego łańcuch β i mniejszego łańcucha α (103). Dokładnie nie wiadomo co dzieje się po połączeniu IL-5 z receptorem na powierzchni eozynofila. Dane eksperymentalne dotyczące aktywowanych białek i układów przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego są bardzo skromne, a poza tym pochodzą przede wszystkim z badań nad komórkami linii nowotworowej. Te natomiast mogą w znacznej mierze odbiegać od realnych procesów zachodzących w eozynofilach (7).

Udowodniono, że IL-5 wpływa na powstanie w bazofilach i eozynofilach kilku rodzajów czynników transkrypcyjnych. W eozynofilach powstają 2 kompleksy białek łączących się z DNA. Jeden, to STAT1 α , drugi prawdopodobnie również należy do tej samej rodziny białek. Ich powstanie następuje nie w wyniku bezpośredniej aktywacji receptora, ale poprzez działanie kinazy JAK 2. W komórkach linii HL-60 długotrwała stymulacja IL-5 prowadzi do powstania kolejnych czynników transkrypcyjnych, takich jak TFC-myc i GATA-1 (5, 128). Wydaje się więc, że IL-5 powinna mieć wpływ

zarówno na regulację ekspresji genetycznej LTC₄S, jak również na samą produkcję leukotrienu C₄ przez LTC₄S.

Wiele danych eksperymentalnych wskazuje na związek IL-5 z produkcją LTC₄ przez eozynofile. Komórki te po stymulacji jonoforem wapnia i f-MLP produkują duże ilości LTC₄. Produkcja ta dodatkowo zwiększała się, jeżeli komórki poddawano wcześniejszej inkubacji z IL-5, IL-3, TGFβ lub GM-CSF (116). Nie wiadomo jednak jaka jest rola tej inkubacji, a więc czy ma związek tylko z synergistyczną regulacją samej produkcji leukotrienu przez LTC₄S, czy też wpływa głównie na transkrypcję genetyczną i translację białka tego enzymu.

b) PMA, czyli ester forbolu;

PMA (Phorbol myristate acetate), czyli ester forbolu, jest związkiem stosowanym w eksperymentach biologicznych od bardzo wielu lat. Powoduje on szybką translokację i aktywację kinaz białkowych C (PKC). Dzieje się to prawdopodobnie za pośrednictwem białka Rho, należącego do rodziny GTP-az. Ester forbolu w komórkach swoim działaniem przypomina hydrofobową kotwicę zaczepioną z jednej strony do lipidowych błon, a z drugiej do PKC. Rodzina PKC składa się z wielu izoenzymów (do tej pory scharakteryzowano 11) głównie zależnych od wapnia (α , β , γ), ale także wapniowoniezależnych (δ , ϵ , η , ϕ) i atypowych, np. ζ . Wszystkie one są bardzo ważnym, a często kluczowym elementem w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowym, niezależnie od rodzaju aktywowanego receptora. Mogą też modyfikować cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne (41).

Istnieją sprzeczne doniesienia odnośnie wpływu PKC na syntezę LTC₄. Niektórzy opisywali zwiększoną produkcję tego leukotrienu w hodowli mastocytów inkubowanych z PMA (51). Inni, w hodowlach eozynofilów, po PMA stwierdzali spadek syntezy leukotrienów, a wzrost po Bis I i kalfostynie C, które są inhibitorami PKC (26). W sekwencji białkowej syntazy LTC₄ istnieją dwa miejsca o strukturze Ser-Ala-Arg, które mogłyby być modyfikowane przez fosforylację. Udowodniono też, że taka fosforylacja po aktywacji PMA ma miejsce i wiąże się najprawdopodobniej ze spadkiem aktywności enzymu (38). Nikt natomiast nie sprawdzał, czy PKC ma wpływ na ekspresję genetyczną LTC₄S.

c) Jonofor wapnia;

Jonofor wapnia czyli związek określany jako A 23187 modyfikuje stężenie jonów wapnia w komórce, poprzez zablokowanie błonowych kanałów wapniowych w stanie ich otwarcia. W spoczynku stężenie wapnia w komórce jest poniżej 5×10^{-7} mol/l natomiast na zewnątrz 10^{-3} mol/l. W błonie komórkowej istnieją 4 typy kanałów błonowych oraz system aktywnej wymiany Na^+ na Ca^{+2} . Wzrost stężenia jonów wapnia w komórce powoduje natychmiastową aktywację bardzo wielu układów przekąźnikowych komórki, między innymi fosfolipazy C, która następnie aktywuje kinazę fosfatydyloinozytolową, a ta warunkuje powstawanie trójfosforanu inozytolu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG). Uruchamiane zostają następne kaskady białek, między innymi aktywuje się PKC (131). Ludzkie eozynofile krwi obwodowej, po stymulacji jonoforem wapnia, produkują duże ilości LTC_4 . Nie wiadomo natomiast, czy ten wzrost produkcji jest związany z aktywacją LTC_4S na poziomie białkowym, czy też na poziomie transkrypcji enzymu. Odkryto około 200 białek o strukturze *helix-loop-helix* i *EF-hand* (czyli klasycznej strukturze czynników transkrypcyjnych), które mogą być modyfikowane przez jony wapnia. Cztery najważniejsze i najlepiej poznane to kalmodulina, troponina C, parvalbumina i kalbindina (131).

d) Kwas acetylosalicylowy;

W opisywanych w pracy eksperymentach stosowano stężenia aspiryny 0,1 milimol/l. Natomiast stężenie powodujące zablokowanie 50% aktywności enzymu, czyli IC-50 (*half – maximal inhibitory concentration*), dla COX wynosi 0,05-0,1 milimol/l, a dla kinazy IKK 0,08 milimol/l, przy inkubacjach komórek z aspiryną przez dwie godziny. (139). Podobne stężenia uzyskiwane są w osoczu krwi po zażyciu 500 mg aspiryny. Osoby, które z powodu schorzeń reumatycznych otrzymywały duże dawki tego leku miały jego stężenie we krwi aż 1-5 milimol/l (45).

4.2.2 Układ stymulacji.

Stosowano plastikowe, płaskodenne płytki hodowlane z 96 dołkami. Komórki zawieszano po 500 000 w 200 μl medium. Układ eksperymentalny stanowiły:

- W pierwszej turze eksperymentów:
 - 1) komórki niestymulowane, będące wewnętrzną kontrolą eksperymentu,
 - 2) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5,
 - 3) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5, a następnie przez kolejne 2 godziny z estrem forbolu,
- W drugiej turze eksperymentów:
 - 1) komórki niestymulowane, stanowiące kontrolę eksperymentu,
 - 2) komórki inkubowane przez 2 godziny z kwasem acetylosalicylowym,
 - 3) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5,
 - 4) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5, a następnie przez kolejne 2 godziny z kwasem acetylosalicylowym,
 - 5) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5, a następnie przez kolejne 2 godziny z jonoforem wapnia.

Stężenia zastosowanych stymulantów w zawiesinie komórek przedstawiały się następująco:

IL-5 – 20 ng/ml,

jonofor wapnia – 5 μ mol/l,

kwas acetylosalicylowy – 0,1 mmol/l,

ester forbolu – 50 nmol/l,

Większość eksperymentów była przeprowadzana w parach.

4.3 Izolacja całkowitego komórkowego RNA.

Po zakończonych inkubacjach ze stymulantami zbierano komórki z nadsączem i całość odwirowywano (300 g przez 10 minut w temperaturze pokojowej). Następnie nadsącz mrożono i przechowywano w temperaturze minus 80°C do momentu oznaczania poziomu leukotrienu C₄, ale nie dłużej niż 3 miesiące. Z pozostałych komórek izolowano całkowite komórkowe RNA z zastosowaniem standardowych procedur opartych o lizę chaotropową, według metody opisywanej przez Chomczyńskiego i Sacchi. Do izolacji RNA wykorzystywano Tri Reagent firmy Sigma. Jego główne składniki to izotiocjanian guanidyny i fenol. Tri Reagent powoduje całkowitą lizę i rozpuszczenie komórek, a po dodaniu chloroformu dzieli się na 3 fazy.

Górna faza wodna zawiera RNA, środkowa interfaza to przede wszystkim długie łańcuchy DNA, a na dole pozostaje część organiczna z ciężkimi i nierozpuszczalnymi w wodzie białkami.

Szczegółowy opis izolacji RNA:

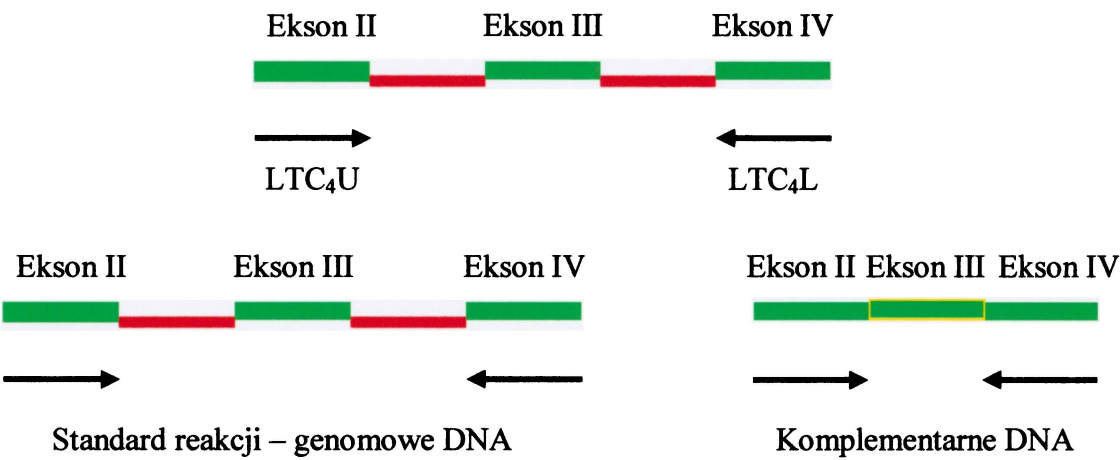
- 1) Homogenizacja i liza komórek poprzez dodanie Tri Reagentu w ilości 500 μ l odczynnika na 500 000 komórek. Pełną lizę materiału warunkuje dokładne rozbicie osadu i pozostawienie próbki na 5 minut w temperaturze pokojowej.
- 2) Dodanie 100 μ l chloroformu, a następnie wstrząsanie próbką przez około 15 sekund i pozostawienie jej przez 2-15 minut w temperaturze pokojowej, celem pełnego rozwarstwienia opisanych wyżej faz.
- 3) Odwirowanie już rozwarstwionych próbek (12 000 g przez 15 minut w temperaturze 4°C).
- 4) Przeniesienie górnej wodnej fazy z RNA do nowej próbówki.
- 5) Precypitacja RNA poprzez dodanie 250 μ l alkoholu izopropanolowego i pozostawienie próbki przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej.
- 6) Odwirowanie wytrąconego RNA (12 000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C).
Na tym etapie wytrącone RNA tworzy wyraźny osad na dnie próbówki.
- 7) Dwukrotne płukanie RNA w 75% etanolu z każdorazowym odwirowaniem (12 000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C).
- 8) Zalanie RNA etanolem.
Tak przygotowane RNA było przechowywane w temperaturze minus 80°C przez okres do 3 miesięcy.
- 9) Bezpośrednio przed przestąpieniem do eksperymentów z określaniem ekspresji genetycznej, RNA było suszone na lodzie przez 30 minut, a następnie rozpuszczane w wodzie.
- 10) Ostatni etap polegał na spektrofotometrycznym pomiarze stężenia RNA oraz ocenie obecności zanieczyszczeń białkowych wyrażonej stosunkiem absorpcji fal świetlnych o długościach 260 i 280 nm. Uzyskiwane stężenia RNA wahały się w granicach 0,1-2 μ g/ μ l, natomiast wskaźniki czystości z reguły były w granicach 1,6-1,7 co stanowiło zadowalający rezultat.

4.4 Ilościowa kompetycyjna reakcja RT-PCR.

W tak przygotowanym materiale badano poziom ekspresji genetycznej mRNA syntazy leukotrienu C₄ (LTC₄S). Tego typu badania określane są jako kompetycyjna reakcja RT-PCR. Przeprowadza się je dwuetapowo. W pierwszym etapie odwrotnej transkrypcji (*reverse transcription* – RT) mRNA jest przepisywane na komplementarne do niego DNA (cDNA). Następnie przeprowadza się reakcję łańcuchową polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR), w której oprócz cDNA dodaje się znaną ilość DNA genomowego (gDNA). Służy ono jako wewnętrzny standard reakcji, ponieważ różni się od cDNA obecnością intronów i po amplifikacji daje produkt o innej długości niż powielone cDNA. Przepisanie RNA na cDNA jest niezbędnym wstępem do dalszej reakcji PCR. W jego wyniku powstaje sekwencja komplementarna do nici RNA, przy czym uracyl jest zastąpiony tyminą (34).

Poniżej przedstawiono schemat sekwencji starterów oraz rozkład intronów i eksonów na powielanych matrycach cDNA i gDNA (Rysunek 16).

Startery: LTC₄U: 5' - cccgagttcgagcgcgtcta
LTC₄L: 5' - gccctggaagtagcggaggc



Rysunek 16. Uproszczony schemat reakcji RT-PCR.

W pracy zastosowano dwa alternatywne sposoby przeprowadzania izolacji eozynofilów (oba oparte na metodzie immunomagnetycznej separacji) i dwie różne metody reakcji RT-PCR. Inne były także układy stymulacji eozynofilów. Tym samym pracę i jej rezultaty można podzielić na dwie główne części. Jednak pomimo dwóch nieco różnych metod, opisywanych poniżej jako pierwszy i drugi etap pracy trendy statystyczne i wnioski są bardzo podobne.

W obu etapach nieco inne były warunki odwrotnej transkrypcji. Najpierw do reakcji RT wykorzystywano starter specyficzny dla nici DNA (opisywany powyżej jako LTC₄L) oraz polimerazę Tth (Promega, USA). Jest ona zarówno RNA- jak i DNA-zależna, a więc przepisuje zarówno RNA na cDNA jak i powiela matrycę DNA. Dokładny skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę przedstawia się następująco:

1 µl buforu Tth stężonego 10-krotnie,

0,5 µl dNTP o stężeniu 10 mmol/l,

0,5 µl startera LTC₄L o stężeniu 20 mmol/l,

0,5 µl, czyli 2,5 U polimerazy Tth,

matryca RNA 0,8 µg,

woda destylowana pozbawiona aktywności rybonukleazowej do 10 µl roztworu reakcyjnego.

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w temp 57°C przez 40 minut w probówkach o objętości 200 µl, w których objętość mieszaniny reakcyjnej (10 µl) przykrywano dodatkowo kroplą oleju mineralnego przeznaczonego do PCR. W ten sposób chroniono roztwór reakcyjny przed wyparowaniem.

W drugim etapie pracy reakcję RT przeprowadzano z zastosowaniem uniwersalnych starterów 15 oligoT (Promega, USA) i RNA-zależnej DNA polimerazy MMLV (Promega, USA). Są to odczynniki dedykowane tylko do pracy z RNA. Oligo T primer wykazuje silne powinowactwo do „ogonka” poli A, który dopisywany jest na końcu genów ulegających transkrypcji. Tak przepisywane cDNA zawiera więc nie tylko badaną sekwencję LTC₄S, ale także cDNA wszystkich genów ulegających aktualnie transkrypcji w komórce.

Dokładny skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę reakcji RT w drugim etapie eksperymentów przedstawia się następująco:

1 µl buforu MMLV stężonego 10-krotnie,

0,5 µl dNTP o stężeniu 10 mmol/l,

0,5 µg startera oligo T,

0,5 µl, czyli 100 U polimerazy MMLV,

matryca RNA 0,8 µg,

woda destylowana pozbawiona aktywności rybonukleazowej do 10 µl.

Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 1 godzinę w probówkach takich samych jak poprzednio.

Reakcja PCR była w obu etapach taka sama. Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę przedstawia się następująco:

5 µl buforu reakcyjnego stężonego 10-krotnie

0,5 µl dNTP o stężeniu 10 mmol/l,

0,5 µl starterów LTC₄U i LTC₄L, każdy o stężeniu 20 mmol/l,

2,5 µl DMSO (5% mieszaniny reakcyjnej),

1 U termostabilnej polimerazy, na przykład polimerazy *Tag*,

2 µl produktów powstałych w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji,

3 ng (czyli około 900 kopii) genomowego wzorcowego DNA (Promega, USA),

woda destylowana pozbawiona aktywności rybonukleazowej do 50 µl.

Przebieg reakcji PCR charakteryzuje inkubacja w trzech temperaturach:

- 1) Pierwszym etapem jest denaturacja w temperaturze 93-96°C. Jej zadaniem jest rozplecenie podwójnej nici DNA.
- 2) Następnie należy ochłodzić mieszaninę do optymalnie dobranej temperatury (42-68°C) w której zachodzi splatanie (ang. *annealing*), czyli przyłączenie starterów do matrycy i powstanie krótkich dwuniciowych odcinków na rozplecionych niciach DNA. Jest to początek replikacji.
- 3) Inkubacja w temperaturze 72°C, w której następuje elongacja, czyli wydłużenie nici. Polimeraza od końca 3' matrycy dołącza do starterów kolejne nukleotydy komplementarne do matrycy w tempie około kilkudziesięciu na sekundę. Ponieważ zastosowano 2 rodzaje starterów jeden komplementarny do nici czytanej od końca 5', drugi do nici czytanej od końca 3', synteza następuje na obu komplementarnych do siebie niciach matrycy.

Po elongacji ponownie podgrzewa się mieszaninę do temperatury denaturacji DNA i cykl rozpoczyna się od nowa (86).

Zdecydowana większość polimeraz występujących w żywych organizmach przy podgrzaniu do 94°C ulega denaturacji i traci swoją aktywność. Nie odnosi się to jednak do termostabilnych polimeraz pochodzących z bakterii żyjących w gorących źródłach wulkanicznych, np. bakterii *Thermophilus aquaticus*. Takie enzymy wytrzymują podgrzanie nawet do 96°C.

Do amplifikacji fragmentu LTC₄S zastosowano następujące parametry techniczne:

denaturacja – 94°C przez 30 sekund,

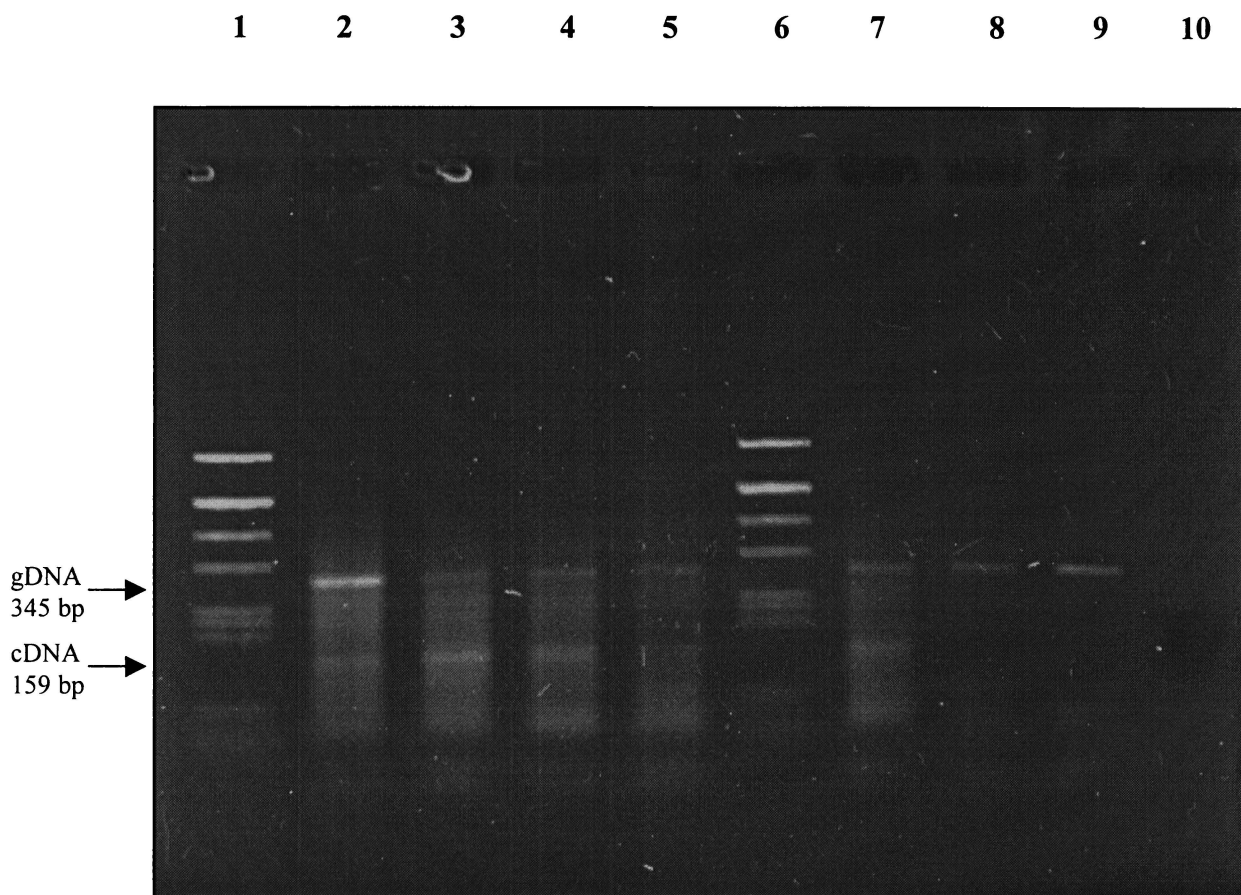
splatanie – 64 °C przez 30 sekund,

elongacja – 72°C przez 1 minutę,

ilość cykli – 30.

DMSO (dwumetylosulfotlenek) dodany do mieszaniny reakcyjnej pozwala obniżyć temperaturę hybrydyzacji DNA, a więc uzyskać efektywną denaturację i splatanie nici DNA w temperaturze wyższej niż wymagana dla danego fragmentu DNA, przez co zwiększa się swoistość reakcji.

W trakcie kolejnych cykli liczba syntetyzowanych cząsteczek wzrasta w postępie geometrycznym, a więc po każdym cyklu jest 2 razy więcej kopii DNA fragmentu pomiędzy dwoma zastosowanymi starterami. Liczba kopii DNA po zakończeniu 30 cykli przekracza kilka milionów i stanowi około 1 µg DNA. Taką ilość materiału genetycznego można już zobaczyć po odpowiednim wybarwieniu. Do tego celu może służyć bromek etydyny, który wykazuje powinowactwo do kwasów nukleinowych i „wchodzi” pomiędzy podwójne nici DNA. Następnie pobudzony do świecenia przez ultrafiolet, emituje kwanty energii świetlnej, które można obejrzyć i sfotografować (Rysunek 17).

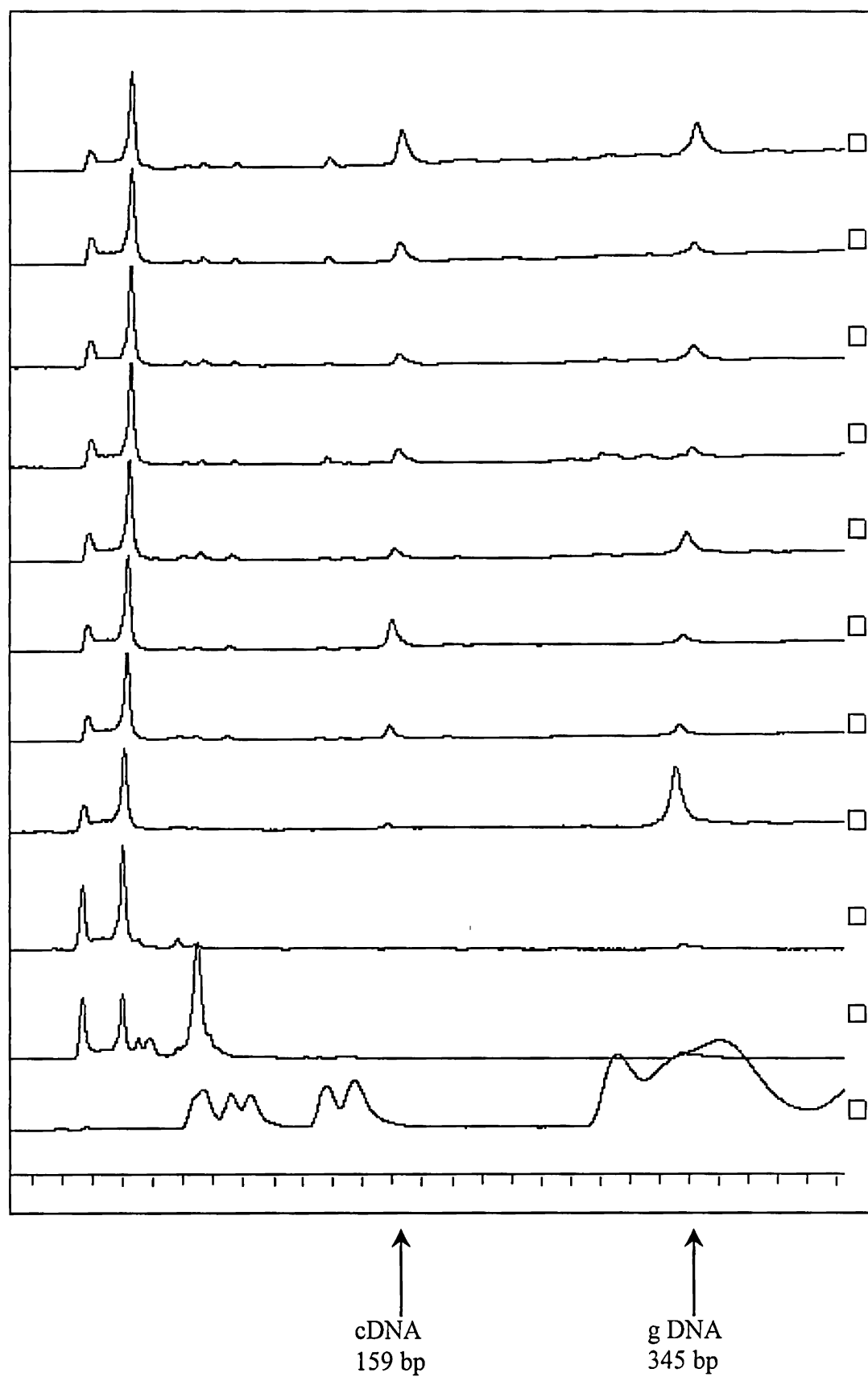
Kolejne numery studzienek:

Rysunek 17. Produkty amplifikacji PCR rozdzielone na żelu agarozowym.

DNA jest widoczne w postaci prążków wybarwionych bromkiem etydy. W 1 i 6 studzience obecny jest wzorzec masy cząsteczkowej DNA, powstały w wyniku trawienia plazmidu pBR322 enzymem *AluI*; widoczne fragmenty od 90 do 906 par zasad. W studzienkach 2, 3, 4, 5 i 7 stwierdzono występowanie zarówno gDNA jak i cDNA, natomiast w 8 i 9 tylko gDNA, w 10 studzience są obecne produkty reakcji, do której nie dodano żadnej matrycy, tzw. „ślepa kontrola reakcji”.

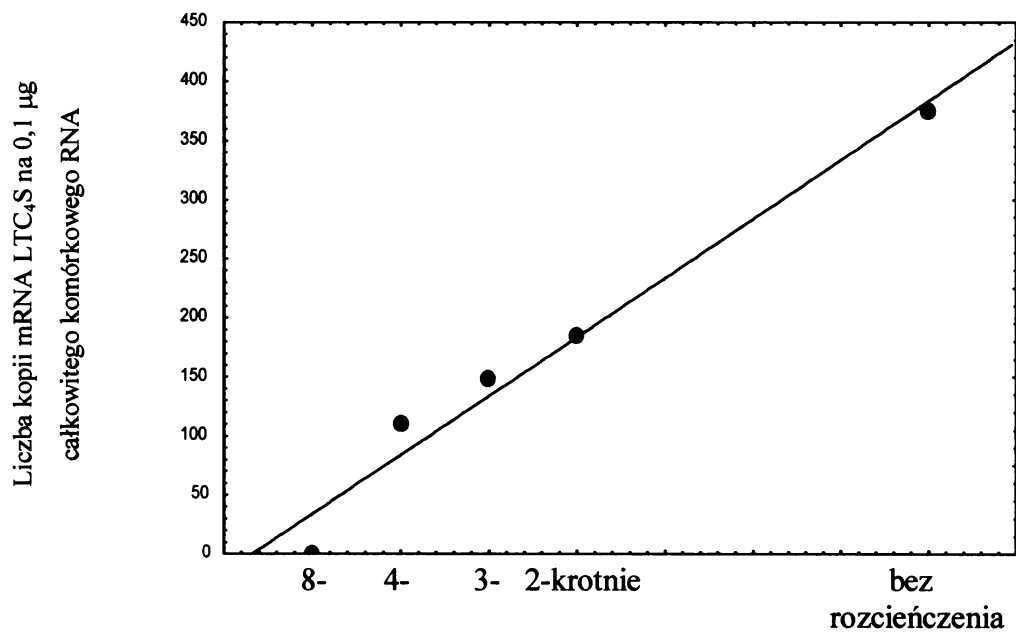
W trakcie reakcji PCR, w której obok komplementarnego DNA wprowadzono DNA genomowe, matryce cDNA i gDNA konkurują ze sobą o substraty reakcji. Ilościowe oszacowanie uzyskanych produktów było możliwe z wykorzystaniem sekwenatora ALFexpress, DNA Sequencer (Pharmacia Biotech). W urządzeniu tym zastosowano laser helowo-neonowy, emitujący światło o długości 632,8 nm. Jest on umieszczony na końcu płyty szklanej, na której przygotowuje się żel poliakrylamidowy. Produkty reakcji PCR wybarwia się fluorescencyjnym barwnikiem mającym powinowactwo do podwójnej nici DNA. W pracy stosowano barwnik YOYO-3 (Molecular Probes) ze spektrum absorpcji 612 i emisji 631 nm, a więc niemal idealny dla laseru opisanego powyżej. Wybarwione tym barwnikiem produkty reakcji PCR wędrują w polu elektrycznym żelu poliakrylamidowego i docierają do wiązki światła laserowego. Lekkie fragmenty DNA w polu elektrycznym przesuwają się szybciej niż cięższe, a więc wcześniej docierają do wiązki lasera. Fluorescencyjny barwnik jest pobudzany światłem lasera do emitowania kwantów energii świetlnej. Ilość wyemitowanego światła zależy od ilości barwnika, a ta od całkowitej ilości DNA. Następnie układy fotopowielaczy, w które urządzenie jest wyposażone, zbierają tę energię, wzmacniają i przesyłają do komputera. Tutaj następuje cyfrowy jej zapis i przedstawienie w postaci krzywej fluorymetrycznej. Interpretacja uzyskanych sygnałów odbywa się dzięki specjalnemu oprogramowaniu, Alfin i Allelelinks (Pharmacia, Biotech), pracującym w środowisku Microsoft Windows. Jednorazowa elektroforeza pozwala na jednoczesne zbadanie 40 próbek.

DNA powstałe w wyniku reakcji PCR na jednej matrycy i z jedną parą starterów ma niemal taką samą długość (możliwe są pojedyncze błędy przy wbudowywaniu nukleotydów przez polimerazę). Na krzywej fluorymetrycznej układa się w formie szczytu o wysokości zależnej od energii wyemitowanego światła. Ta z kolei uzależniona jest od ilości barwnika wiążącego się z DNA, a więc tym samym ilości DNA. Ponieważ reakcja ma charakter kompetycyjny wzajemny stosunek liczby kopii dodanych matryc warunkuje stosunek uzyskanych po powieleniu kopii gDNA i cDNA. Stosunek ten można łatwo obliczyć poprzez pomiar pól pod szczytami gDNA i cDNA na krzywej fluorymetrycznej. Znając ten stosunek i ilość dodanego do mieszaniny reakcyjnej gDNA łatwo można oszacować ilość cDNA na początku reakcji PCR.



Rysunek 18. Zapis fluorymetryczny z ALFexpress.

Na początku eksperymentów wykonano krzywą wzorcową ilościowej metody oznaczania cDNA. Służyła ona jako sprawdzian wiarygodności metody badawczej pracy. Najpierw wybraną próbkę po RT, w której stwierdzono wstępnie dużą liczbę transkryptów cDNA rozcieńczano w różnych proporcjach wodą. Następnie wykonywano reakcję PCR z serią próbek ze stałym dodatkiem gDNA i stałą objętością rozcieńczonej w różnych proporcjach mieszaniny po reakcji RT. Uzyskaną empirycznie liczbę kopii cDNA porównywano z liczbą obliczoną na podstawie rozcieńczenia wyjściowej próbki po RT. Eksperyment był prowadzony w parach. Poniżej przedstawiono wynik tego eksperymentu (Rysunek 19).



Wielokrotność rozcieńczeń wyjściowej próbki RT

Rysunek 19. Krzywa wzorcową reakcji RT-PCR.

W próbce, do której dodano przewidywaną liczbę kopii cDNA LTC₄S oszacowaną wstępnie na 50, nie stwierdzono obecności sygnału odpowiadającego położeniu cDNA. Powyżej tej liczby transkryptów uzyskiwano zadowalającą wiarygodność pomiarów liczby kopii cDNA w stosunku do wartości obliczonej na podstawie rozcieńczeń wyjściowej próbki.



Ponadto u 49 losowo wybranych osób oznaczono poziom leukotrienu C_4 w nadsączach hodowlanych. Oznaczenia te wykonano z zastosowaniem metody ELISA i wykorzystaniem zestawów firmy Cayman, USA. Ograniczenia ilościowe były podyktowane oczywiście realiami finansowymi.

Do analizy badań wykorzystano również wyniki genotypowania polimorfizmu regionu promotorowego LTC₄S na obecność nosicielstwa allelu C₋₄₄₄, z zastosowaniem metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) i użyciem enzymu restrykcyjnego *MspI*.

Analiza statystyczna została wykonana przy pomocy programu Statistica StatSoft. Różnice w częstościach allelicznych występowania allelu C regionu promotorowego C₋₄₄₄ LTC₄S liczono testem χ^2 . Wyniki przedstawiające ekspresję mRNA LTC₄S nie były zgodne z rozkładem normalnym, więc do ich porównania wykorzystano testy nieparametryczne: test *U* Manna-Whitneya w analizie międzygrupowej, a wewnątrz grupy test par Wilcozona. Z kolei poziomy leukotrienu C_4 miały rozkład zgodny z rozkładem normalnym, porównywano je więc testami *t* Studenta, odpowiednio dla zmiennych niepowiązanych i powiązanych. Korelacje pomiędzy ekspresją genetyczną mRNA a poziomem LTC₄ w nadsączach hodowlanych liczono testem korelacji rang Spearmana (60).

5. Grupy chorych.

5.1 Chorzy pierwszej tury eksperymentów.

W pierwszej turze eksperymenty przeprowadzono w grupie 91 osób, z czego:

- 25 stanowili chorzy na astmę aspirynową (AIA),
- 36 osoby chore na astmę bez nadwrażliwości na aspirynę (ATA),
- a pozostałe 30, to zdrowa grupa kontrolna (K).

W każdym przypadku nadwrażliwość na aspirynę została potwierdzona wykonaną prowokacyjną próbą wziewną. Wynik dodatni oznaczał 20% spadek nasilonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV₁, ang. *forced-expiratory volume in one second*) po podaniu inhalacyjnej aspiryny lizylowej.

Ponadto u każdego chorego określano stopień nasilenia astmy na podstawie klasyfikacji zatwierdzonej przez Global Strategy for Asthma Management and Prevention - NHLBI/WHO Workshop Report (Tabela 2) (36).

Tabela 2. Klasyfikacja stopni nasilenia astmy oraz ogólne wskazania terapeutyczne.

STOPIEŃ 1 – ASTMA SPORADYCZNA	
Objawy kliniczne przed leczeniem	Leczenie
Objawy rzadziej niż raz w tygodniu; Objawy nocne rzadziej niż dwa razy w miesiącu; Zaostrzenia trwające krótko – kilka godzin do kilku dni; Brak objawów pomiędzy napadami; FEV ₁ lub PEF > 80% wartości należnej; Zmienność dobową < 20%.	Krótko działające β ₂ -mimetyki doraźnie; W okresie zaostrzeń możliwa doustna kortykoterapia;
STOPIEŃ 2 – ASTMA PRZEWLEKŁA LEKKA	
Objawy kliniczne przed leczeniem	Leczenie
Objawy częściej niż raz na tydzień, ale nie codziennie; Objawy nocne częściej niż dwa razy w miesiącu; Zaostrzenia mogą wpływać na aktywność życiową i sen; FEV ₁ lub PEF > 80% wartości należnej; Zmienność dobową 20 – 30%.	Długo działające β ₂ -mimetyki; Glikokortykosteroidy wziewne w przewlekłym leczeniu; Kromoglikany; Metyloksantyny; Leki antyleukotrienowe;
STOPIEŃ 3 – ASTMA PRZEWLEKŁA UMIARKOWANA	
Objawy kliniczne przed leczeniem	Leczenie
Objawy codziennie; Zaostrzenia ograniczają aktywność i sen nocny; Objawy nocne częściej niż raz w tygodniu; Konieczność codziennego stosowania krótko działających β ₂ -mimetyków; FEV ₁ lub PEF w granicach 60 – 80% wartości należnej; Zmienność dobową 20% - 30%.	Długo działające β ₂ -mimetyki; Glikokortykosteroidy wziewne w przewlekłym leczeniu; Kromoglikany; Metyloksantyny; Leki antyleukotrienowe;
STOPIEŃ 4 – ASTMA CIĘŻKA	
Objawy kliniczne przed leczeniem	Leczenie
Objawy stałe; Zaostrzenia częste; Objawy nocne częste; Aktywność fizyczna znacznie ograniczona; Hospitalizacja w ciągu roku; Przebyte zaostrzenie zagrażające życiu; FEV ₁ lub PEF < 60% wartości należnej; Zmienność dobową > 30%.	Długo działające β ₂ -mimetyki; Glikokortykosteroidy wziewne w przewlekłym leczeniu; Metyloksantyny; Doustna kortykoterapia w przewlekłym leczeniu;

Wystarczy obecność tylko jednego objawu z wyższego stopnia nasilenia astmy, aby go przypisać danemu choremu.

Badane grupy	AIA	ATA	K
Wiek (lata)	44,8 (SD 8,9)	38,2 (SD 2,2)	35,6 (SD 2,4)
Płeć	15 kobiet 10 mężczyzn	21 kobiet 15 mężczyzn	13 kobiet 17 mężczyzn
Czas trwania astmy (lata)	8,4 (SD 3,8)	13 (SD 3,8)	
IgE całkowite (log)	1,8 (SD 0,39)	2,2 (SD 0,46)	1,5 (SD 0,07)
Eozynofilia bezwzględna	349 (SD 196)	417 (SD 358)	236 (SD 49)
Dodatni wynik testów skórnych przynajmniej na dwa standardowe alergeny wziewne.	19 osób	17 osób	3 osoby
Doustna kortykoterapia	10 osób	8 osób	
Średni stopień nasilenia astmy	2,4 (SD 1,06)	1,9 (SD 0,79)	

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna badanych grup.

Wszyscy chorzy na astmę byli w okresie stabilizacji objawów klinicznych, z FEV₁ przekraczającym 70% wartości należnej, poza tym nie byli obciążeni innymi ciężkimi schorzeniami towarzyszącymi, np. niewydolnością serca, nerek, czy wątroby.

5.2 Chorzy drugiej tury eksperymentów.

W drugiej turze eksperymentów podjęto próbę określenia wpływu farmakologicznych dawek aspiryny *in vitro*, na genetyczną ekspresję mRNA LTC₄S w ludzkich eozynofilach izolowanych z krwi obwodowej astmatyków, z uwzględnieniem podziału na astmę aspirynową i astmę niezależną od aspiryny.

Eksperymenty przeprowadzono w grupie 52 osób, z czego:

- 23 stanowili chorzy na astmę aspirynową (AIA),
- 29 chorzy na astmę bez nadwrażliwości na aspirynę (ATA).

W każdym przypadku nadwrażliwość na aspirynę została potwierdzona dodatnią próbą wziewną z aspiryną lizylową.

Podobnie jak w pierwszym etapie eksperymentów, chorzy byli w okresie stabilizacji objawów astmy, z FEV₁ powyżej 70% wartości należnej, ale charakteryzowali się podobnym stopniem nasilenia objawów astmy (astma przewlekła umiarkowana). Ponadto nie byli leczeni z powodu żadnych innych ciężkich schorzeń towarzyszących, np. niewydolności serca, nerek lub wątroby. W terapii przewlekłej astmy stosowano glikokortykosteroidy wziewne w dawce 800 – 1600 µg na dobę, długo działające β₂-mimetyki i preparaty teofilinowe o powolnym uwalnianiu. W niewielkim odsetku chorzy wymagali stosowania doustnych preparatów glikokortykosteroidów w dawce do 8 mg metyloprednizolonu na dobę, z uwagi na towarzyszące w przeszłości objawy astmy ciężkiej.

Badane grupy	AIA	ATA
Wiek (lata)	44,6 (SD 6,8)	45,8 (SD 7,1)
Płeć	15 kobiet 8 mężczyzn	19 kobiet 10 mężczyzn
Czas trwania astmy (lata)	13,5 (SD 7,6)	14,1 (SD 10,6)
IgE całkowite (log)	1,9 (SD 0,34)	2,0 (SD 0,4)
Eozynofilia bezwzględna	416 (SD 328)	291 (SD 231)
Dodatni wynik testów skórnych przynajmniej na dwa standardowe alergeny wziewne.	19 osób	17 osób
Doustna kortykoterapia	6 osób	5 osób

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna badanych grup chorych.

6. Wyniki.

6.1 Pierwsza tura eksperymentów.

U wszystkich osób określono wariant polimorficzny regionu promotorowego C₋₄₄₄ LTC₄S (Tabela 5).

Obecność wariantu allelicznego	AIA	ATA	K
AA	10	18	13
AC	10	14	15
CC	5	4	2

Tabela 5. Wyniki genotypowania polimorfizmu regionu promotorowego C₋₄₄₄ LTC₄S.

	AIA	ATA	K
Częstość występowania Allelu C	0,4	0,3	0,32

Tabela 6. Częstość występowania allelu C w poszczególnych badanych grupach.

Pomiędzy badanymi grupami nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic w częstościach występowania allelu C regionu promotorowego C₋₄₄₄ LTC₄S.

U wszystkich osób izolowano eozynofile krwi obwodowej i inkubowano w medium hodowlanym przez 18 godzin. Następnie zmieniano medium, sprawdzano żywotność komórek i dzielono je na 3 grupy:

- 1) komórki niestymulowane, pozostawione w medium na dwie godziny; były one kontrolą eksperymentu,
- 2) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5,
- 3) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5, a następnie stymulowane PMA przez kolejne 2 godziny.

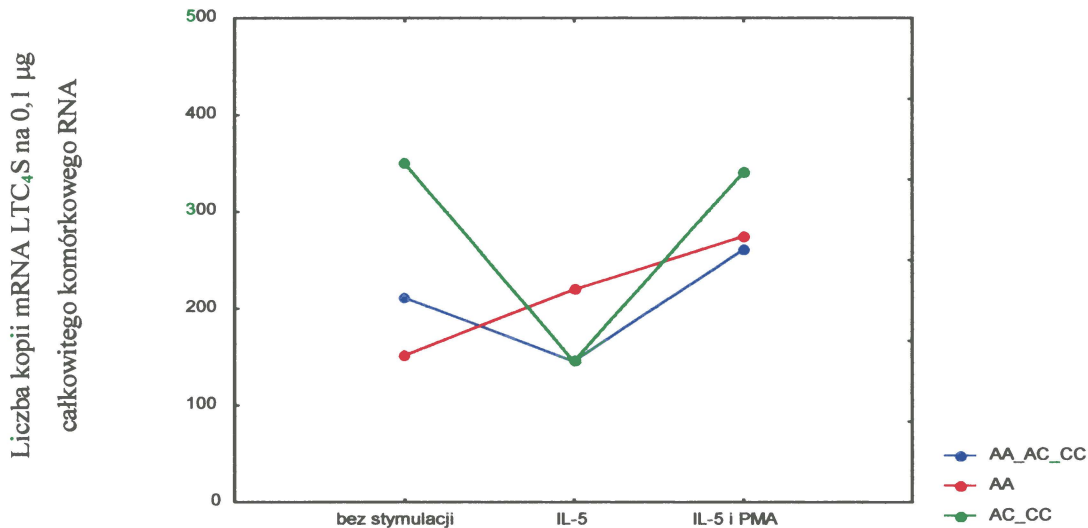
Po zakończeniu inkubacji nadsącz hodowlany mrożono, a z komórek izolowano całkowite komórkowe RNA. Następnie oznaczano liczbę kopii mRNA LTC₄S, zgodnie z opisem umieszczonym w rozdziale dotyczącym metodologii badań.

Poniżej zamieszczono zestawienia wyników genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA. Rozkład uzyskanych wyników nie był zgodny z rozkładem normalnym, w związku z tym obok wartości średnich umieszczono mediany, a w nawiasach błąd standardowy średniej oraz wartości na poziomie 25 i 75 percentyla. We wszystkich grupach uwzględniono podział na dwie podgrupy - podgrupę wariantu allelicznego AA oraz podgrupę wariantu AC i CC

- W grupie AIA.

Liczba kopii mRNA LTC ₄ S w grupie AIA w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA						
Badane komórki	Bez stymulacji		Stymulowane IL-5		Stymulowane IL-5 i PMA	
Zestawione wartości	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)
AIA wszystkie warianty polimorficzne	818 (412)	211 (99-402)	1398 (822)	146 (55-655)	503 (222)	261 (153-372)
AIA wariant alleliczny AA	301 (153)	152 (99-220)	644 (426)	220 (72-334)	275 (108)	274 (84-340)
AIA warianty alleliczne AC i CC	1180 (674)	350 (126-542)	1978 (1383)	146 (45-1092)	674 (384)	341 (166-648)

Tabela 7. Średnia liczba kopii mRNA LTC₄S oraz mediany w grupie AIA.



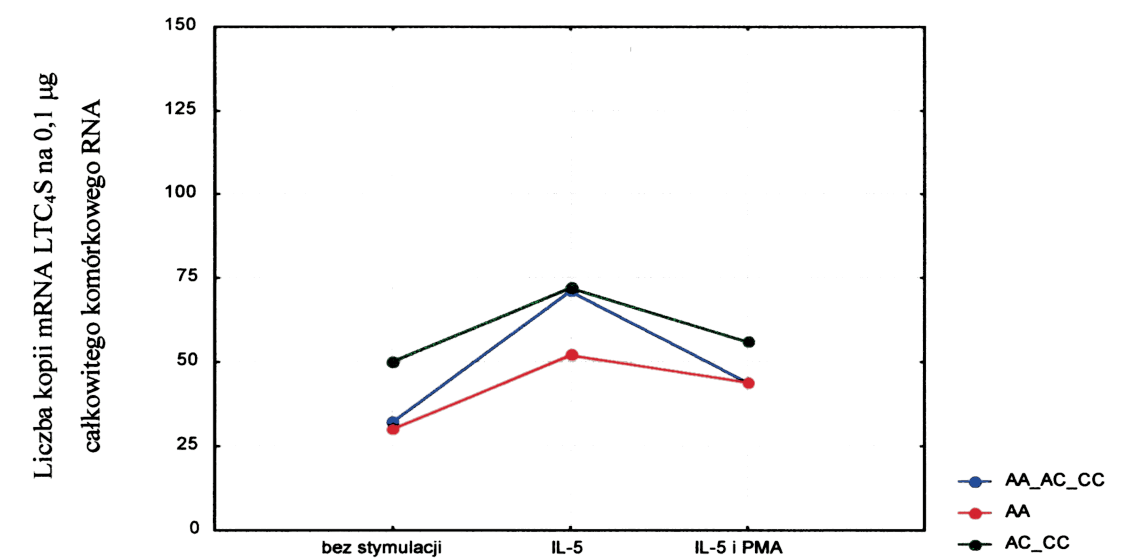
Rysunek 20. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC₄S w grupie AIA, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne regionu promotorowego LTC₄S.

Eozynofile izolowane od chorych na astmę aspirynową wykazywały wysoki poziom genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S przed stymulacjami, ale dalsze inkubacje zarówno z IL-5 jak i PMA nie wpłynęły zasadniczo na zmianę tej ekspresji.

- W grupie ATA.

Liczba kopii mRNA LTC ₄ S w grupie ATA w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA						
Badane komórki	Bez stymulacji		Stymulowane IL-5		Stymulowane IL-5 i PMA	
Zestawione wartości	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)
ATA wszystkie warianty polimorficzne	98 (23)	32 (11-107)	103 (21)	71 (32-130)	75 (18)	44 (16-100)
ATA wariant alleliczny AA	58 (16)	30 (8-91)	108 (36)	52 (24-156)	96 (37)	44 (15-137)
ATA warianty alleliczne AC i CC	133 (40)	50 (14-252)	98 (24)	72 (40-103)	57 (12)	56 (30-90)

Tabela 8. Średnia liczba kopii mRNA LTC₄S oraz mediany w grupie ATA.



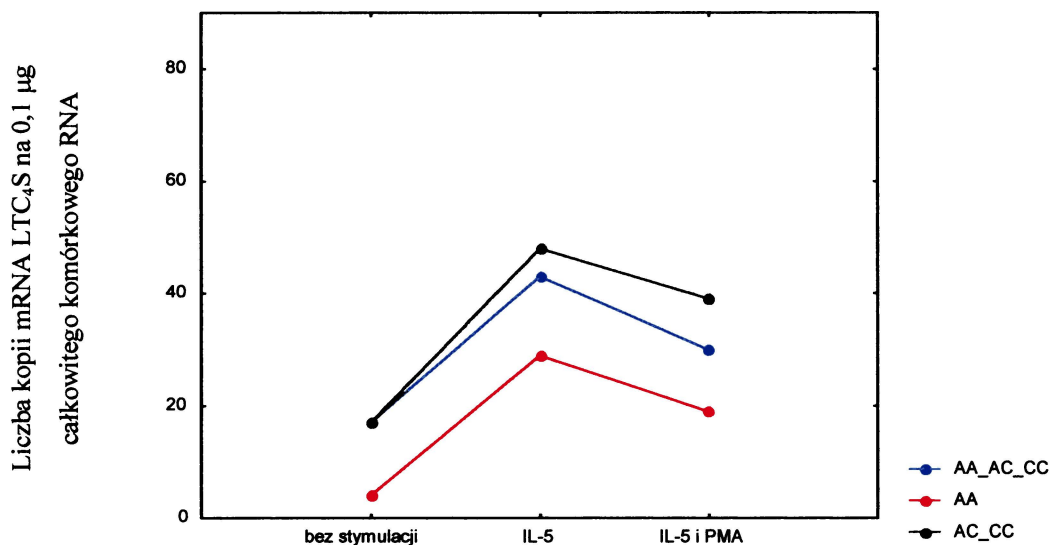
Rysunek 21. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC₄S w grupie ATA, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne LTC₄S.

Przedstawiciele grupy ATA mieli podstawowy poziom mRNA LTC₄S stosunkowo niski. Po stymulacji IL-5 zaobserwowano statystycznie znamieny jego wzrost (p=0,02). Dotyczył on jednak głównie wariantu polimorficznego AA (p=0,04), dla nosicieli wariantu C uzyskano nawet obniżenie wartości średniej. Dalsza inkubacja z PMA podobnie jak w grupie AIA nie spowodowała żadnych istotnych statystycznie zmian w badanej ekspresji, chociaż można zaobserwować wyraźną tendencję spadkową w oznaczeniach.

- W grupie kontrolnej.

Liczba kopii mRNA LTC ₄ S w grupie kontrolnej w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA						
Badane komórki	Bez stymulacji		Stymulowane IL-5		Stymulowane IL-5 i PMA	
Zestawione wartości	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 perc2entyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)
K wszystkie warianty polimorficzne	72 (22)	17 (0-55)	101 (23)	43 (14-180)	63 (25)	30 (7-87)
K wariant alleliczny AA	79 (39)	4 (0-39)	94 (39)	29 (10-124)	32 (16)	19 (7-50)
K warianty alleliczne AC i CC	70 (28)	17 (0-55)	112 (30)	48 (22-184)	89 (43)	39 (10-186)

Tabela 9. Średnia liczba kopii mRNA LTC₄S oraz mediany w grupie kontrolnej.

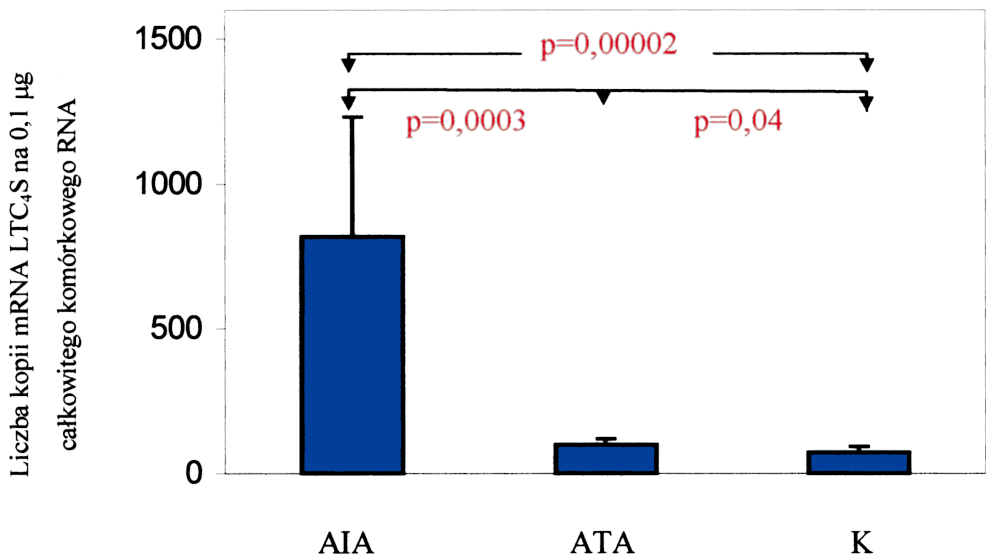


Rysunek 22. Graficzne przedstawienie median liczby kopii mRNA LTC₄S w grupie kontrolnej, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne regionu promotorowego LTC₄S.

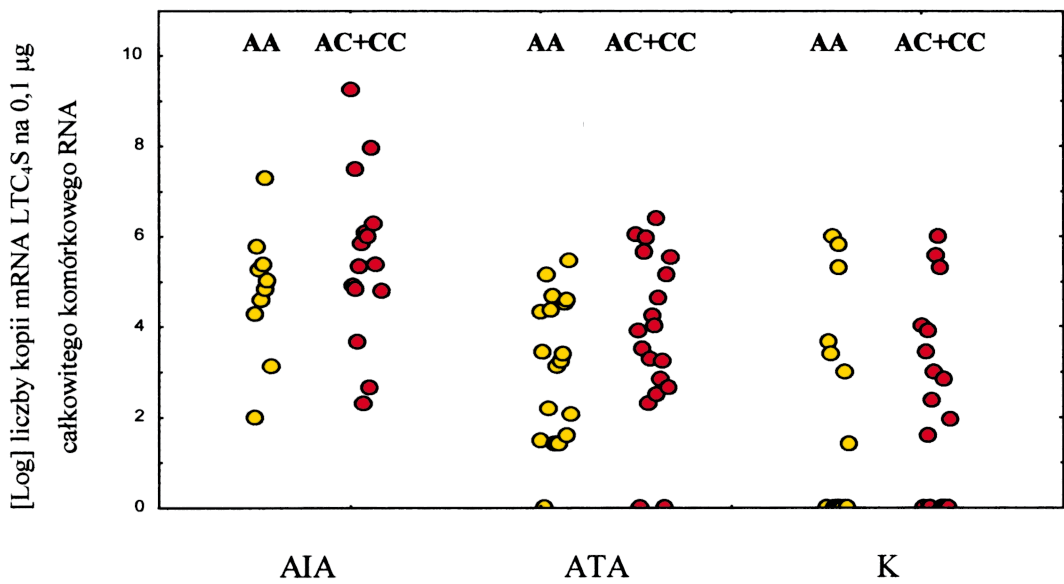
W kontroli, podobnie jak w grupie ATA, podstawowy poziom mRNA LTC₄S był stosunkowo niski. Po stymulacji IL-5 zanotowano jego statystycznie znamienne wzrost ($p=0,01$), który jednak podobnie jak u przedstawicieli ATA, dotyczył głównie wariantu polimorficznego AA ($p=0,04$). Natomiast dla wariantów AC i CC był bliski znamienności statystycznej ($p=0,09$). Dalsza inkubacja z PMA podobnie jak w dwóch pozostałych grupach spowodowała wyraźne obniżenie genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S, ale różnica nie osiągnęła statystycznej znamienności.

Analiza zależności międzygrupowych.

W grupie AIA wykazano statystycznie znacznie wyższy podstawowy poziom genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S, niż w pozostałych dwóch badanych grupach (Rysunek 23).



Rysunek 23. Podstawowe ekspresje mRNA LTC₄S w grupach AIA, ATA i kontroli.



Rysunek 24. Rozkład podstawowych ekspresji mRNA LTC₄S u poszczególnych chorych, z uwzględnieniem podziału na warianty polimorficzne LTC₄S.

Różnice w podstawowych ekspresjach były też znamienne dla analogicznych obliczeń w obu podgrupach wariantów allelicznych (Tabela 10).

	AIA vs. ATA	AIA vs. K
AA	p=0,008	P=0,02
AC i CC	p=0,017	P=0,0008

Tabela 10. Statystyczne znamienności różnic w podstawowych ekspresjach mRNA LTC₄S z uwzględnieniem podziału na warianty alleliczne regionu promotorowego LTC₄S.

Znamienne wyższa niż w kontroli była też podstawowa ekspresja mRNA LTC₄S u ATA (p=0,04). Po stymulacji IL-5 różnice te uległy zatarciu.

Na uwagę zasługuje ponadto istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stopniem nasilenia astmy a ekspresją mRNA LTC₄S w eozynofilach przed stymulacją (p=0,01), a także ujemnej, ale statystycznie nieznamiennej korelacji pomiędzy ekspresją mRNA LTC₄S, a dawką kortykoterapii systemowej (p=0,2).

Nie stwierdzono związku genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S z wariantem polimorficznym regionu promotorowego tego enzymu.

W opisie metodologii zamieszczono opis wykonanej krzywej wzorcowej reakcji RT-PCR (Rysunek 19). Próbkę po reakcji RT, o znanej, oznaczonej wcześniej liczbie transkryptów cDNA rozcieńczano kolejno wodą 2-, 3-, 4- oraz 8-krotnie. Następnie wykonywano PCR z serią próbek, w których dodawano stałą ilość genomowego DNA i tę samą objętość kolejno rozcieńczanych produktów reakcji RT. Następnie porównywano empirycznie uzyskane wyniki z przewidywanymi liczbami kopii wyliczonymi z rozcieńczeń wyjściowej próbki cDNA. Przy pierwszych trzech rozcieńczeniach wykonane empirycznie pomiary były zgodne z obliczonymi. Natomiast przy rozcieńczeniu 8-krotnym i przewidywanej liczbie kopii około 50, nie uzyskano sygnału cDNA. W związku z tym wyniki pomiarów poniżej 50 kopii mRNA LTC₄S mogą być wykonywane na granicy detekcji, a co za tym idzie mogą oddawać szum tła, a nie rzeczywisty sygnał reakcji RT.

Jeżeli uwzględnimy tylko wyniki pomiarów powyżej 50 kopii na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA, w grupie AIA pozostaje 12 osób z wariantem polimorficznym AC

i CC oraz 8 z genotypem AA. W grupie ATA 9 osób z wariantem polimorficznym AC i CC oraz 7 z wariantem AA, natomiast wśród osób zdrowych tylko 5 z genotypem zawierającym allel C i 3 z genotypem bez tego allelu. Po takiej analizie osoby z genotypem CC i AC wykazywały statystycznie znamienne wyższą podstawową ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S niż osoby z genotypem AA (809 ± 39 *versus* 249 ± 77 , $p=0,04$). Takiej zależności nie zauważono po inkubacji komórek z IL-5 i PMA.

Poziomy LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów.

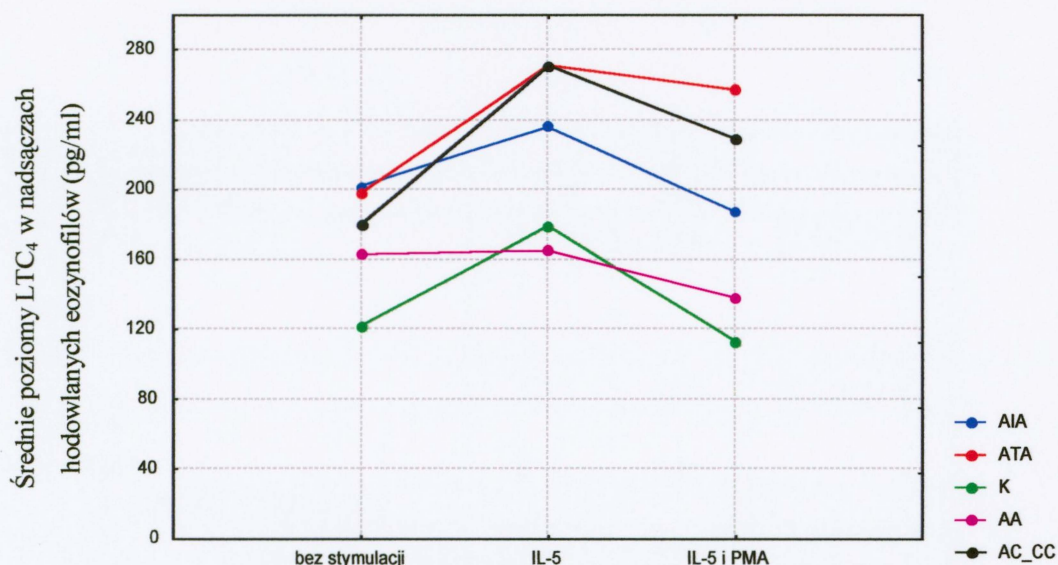
Dodatkowo u 18 losowo wybranych osób (5 z grupy AIA, 8 ATA i 5 zdrowych przedstawicieli kontroli) oznaczono poziom LTC₄ w nadsączu hodowlanym eozynofilów z wykorzystaniem metody Elisa (Cayman, USA).

Poniżej przedstawiono uzyskane wyniki.

Rozkład wyników był zgodny z rozkładem normalnym, w tabeli umieszczono więc wartość średnią, odchylenie standardowe i 95% przedział ufności średniej. Stężenia LTC₄ wyrażono w pg/ml.

Badane komórki	Bez stymulacji		Stymulowane IL-5		Stymulowane IL-5 i PMA	
	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej
AIA	203 (47)	145-260	236 (71)	147-324	187 (38)	94-282
ATA	198 (106)	110-286	271 (181)	120-423	257 (223)	297-812
K	121 (83)	34-209	178 (119)	30-326	113 (108)	37-180
Osoby z wariantem AA	163 (99)	59-267	165 (113)	46-283	138 (87)	80-356
Osoby z wariantem AC i CC	180 (89)	126-235	271 (143)	180-363	229 (164)	25-434

Tabela 11. Poziomy LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów.



Rysunek 25. Graficzny obraz przedstawiający średnie poziomy LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofiliów.

Średni poziom LTC₄ w nadsączach komórek AIA i ATA nie różnił się, natomiast w zdrowej kontroli był około 40% niższy, niż w pozostałych dwóch grupach. Różnica ta nie była znamienne statystycznie (ATA *versus* K, $p=0,15$ oraz AIA *versus* K, $p=0,08$). Po stymulacji IL-5 zaobserwowano wzrost poziomu LTC₄ w nadsączach eozynofiliów, ale statystyczną zmienność osiągnął on tylko dla nosicieli allelu C ($p=0,04$).

Ponadto stwierdzono obecność statystycznie istotnej dodatniej korelacji pomiędzy podstawową ekspresją genetyczną mRNA LTC₄S, a podstawowym poziomem leukotrienu C₄ w nadsączach ($p=0,04$), a także podstawową ekspresją mRNA LTC₄S i produkcją leukotrienu C₄ po stymulacji IL-5 ($p=0,01$). Bliska istotności statystycznej była też dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją mRNA LTC₄S i poziomem LTC₄ po IL-5 ($p=0,09$). Znamienne dodatnia korelacja łączyła również podstawową ekspresję mRNA LTC₄S i poziom LTC₄ po PMA ($p=0,01$).

6.2 Druga tura eksperymentów.

Podobnie jak w pierwszej turze badań u wszystkich osób przeprowadzono genotypowanie polimorfizmu regionu promotorowego C₄₄₄ LTC₄S (Tabela 12).

Obecność wariantu allelicznego	AIA	ATA
AA	12	11
AC	9	17
CC	2	1

Tabela 12. Wyniki genotypowania polimorfizmu regionu promotorowego C₋₄₄₄ LTC₄S.

	AIA	ATA
Częstość występowania Allelu C	0,28	0,3

Tabela 13. Częstość występowania allelu C w badanych grupach.

Nie stwierdzono różnic w częstościach występowania allelu C w badanych grupach chorych.

Od wszystkich osób izolowano eozynofile krwi obwodowej, które następnie inkubowano w medium hodowlanym przez 18 godzin celem uspokojenia po procedurze izolacyjnej. Po tym okresie zmieniano medium, sprawdzano żywotność komórek, a następnie dzielono je na 5 grup:

- 1) komórki niestymulowane, pozostawione w medium na dwie godziny; stanowiły one kontrolę eksperymentu,
- 2) komórki inkubowane przez 2 godziny z IL-5,
- 3) komórki inkubowane przez 2 godziny z ASA,
- 4) komórki inkubowane z IL-5 przez 2 godziny, a następnie z ASA przez kolejne 2 godziny.
- 5) komórki inkubowane z IL-5 przez 2 godziny, a następnie z jonoforem wapnia przez kolejne 2 godziny.

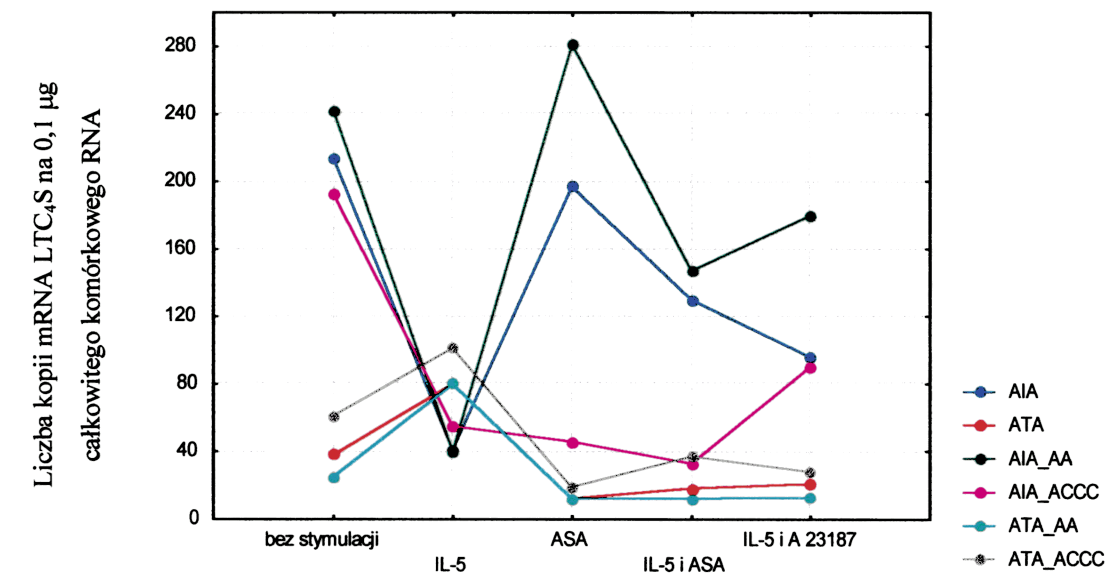
Po zakończeniu inkubacji nadsącza mrożono, a z komórek izolowano całkowite komórkowe RNA i badano ekspresję mRNA LTC₄S.

Poniżej zamieszczono zestawienie uzyskanych wyników eksperymentów (Tabela14).

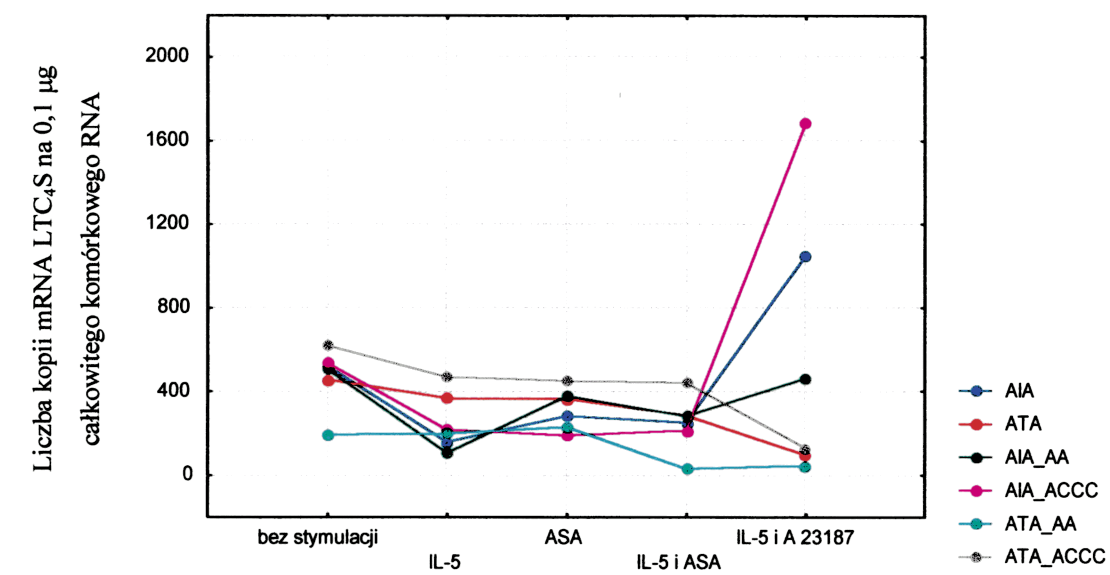
		AIA		ATA		AIA vs. ATA
		Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	Średnia (SE)	Mediana (25 percentyl, 75 percentyl)	
Komórki niestymulowane	Wszystkie warianty polimorficzne	520 (191)	214 (110-326)	457 (235)	38 (11-120)	0,009
	Wariant polimorficzny AA	506 (177)	242 (78-867)	194 (153)	25 (9-67)	0,003
	Warianty polimorficzne AC i CC	536 (360)	193 (110-305)	618 (367)	61 (11-164)	0,09
Po stymulacji IL-5	Wszystkie warianty polimorficzne	159 (52)	41 (5-227)	366 (162)	80 (22-388)	NS
	Wariant polimorficzny AA	106 (45)	40 (16-141)	199 (79)	80 (22-388)	NS
	Warianty polimorficzne AC i CC	217 (98)	55 (3-367)	468 (256)	101 (22-418)	NS
Po stymulacji ASA	Wszystkie warianty polimorficzne	283 (72)	197 (30-443)	366 (169)	12 (3-289)	NS
	Wariant polimorficzny AA	370 (123)	281 (35-639)	229 (139)	12 (0-510)	NS
	Warianty polimorficzne AC i CC	189 (61)	46 (27-421)	450 (260)	19 (0-510)	NS
Po stymulacji IL-5 i ASA	Wszystkie warianty polimorficzne	250 (74)	130 (8-329)	285 (128)	18 (2-89)	NS
	Wariant polimorficzny AA	282 (92)	147 (56-437)	30 (13)	12 (2-31)	0,01
	Warianty polimorficzne AC i CC	215 (122)	33 (1-217)	442 (198)	37 (2-394)	NS
Po stymulacji IL-5 i A 23187	Wszystkie warianty polimorficzne	1049 (482)	96 (11-504)	98 (34)	21 (2-110)	0,02
	Wariant polimorficzny AA	463 (221)	180 (32-415)	46 (26)	13 (2-34)	0,01
	Warianty polimorficzne AC i CC	1686 (965)	90 (6-1859)	130 (52)	28 (0-136)	NS

Tabela 14. Zestawienie wyników genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S w przeliczeniu na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA.

Rozkład uzyskanych wyników nie był zgodny z rozkładem normalnym, w związku z tym w tabeli umieszczono obok wartości średnich i błędów standardowych średnich, również mediany i wartości na poziomie 25 i 75 percentyla.

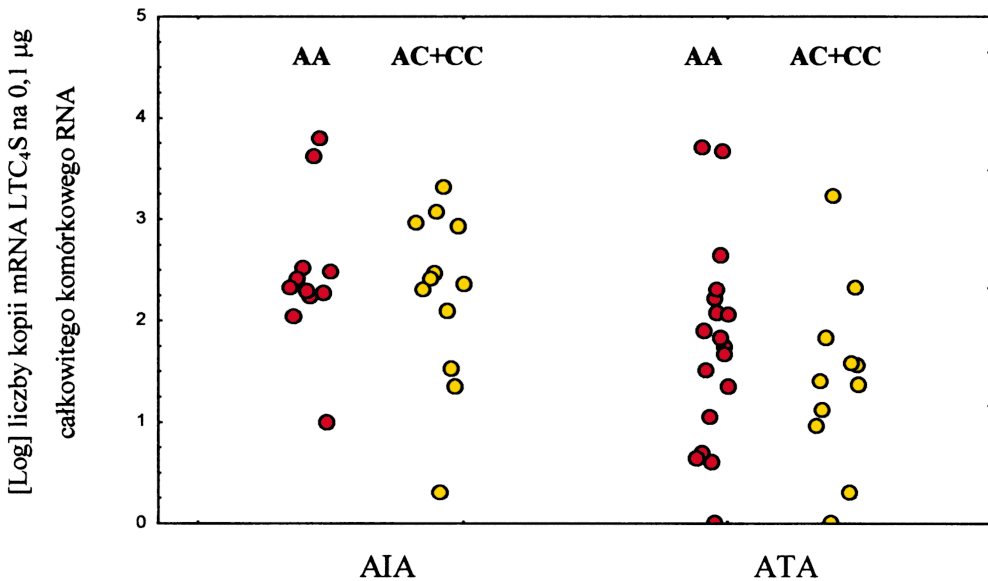


Rysunek 26. Zestawienie median genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S w drugiej turze eksperymentów.



Rysunek 27. Zestawienie średnich wartości genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S w drugiej turze eksperymentów.

Przed stymulacjami eozynofile astmatyków aspirynowych wykazywały statystycznie znacząco wyższą genetyczną ekspresję mRNA LTC₄S, niż komórki ATA. Różnica ta była istotna dla obu wariantów polimorficznych regionu promotorowego LTC₄S. Nie wykazano natomiast różnic w ekspresji mRNA LTC₄S pomiędzy chorymi z wariantem allelicznym AA, a nosicielami allelu C.



Rysunek 28. Rozkład podstawowych ekspresji mRNA LTC₄S u poszczególnych chorych w grupach AIA i ATA, z uwzględnieniem podziału na warianty alleliczne regionu promotorowego LTC₄S.

Po stymulacji IL-5 w grupie ATA zaobserwowano statystycznie znaczący wzrost ekspresji, ale tylko u osób, u których poziom podstawowy nie przekraczał 1500 kopii mRNA na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA (69 ± 19 versus 206 ± 56 , $p=0,02$). Pozostałe 3 osoby z podstawowym poziomem mRNA powyżej 1500 wykazywały raczej trend przeciwny. W grupie AIA z kolei zauważono zależność odwrotną, czyli obniżenie genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S po IL-5 ($p=0,04$). W szczególności dotyczyło to 5 osób, u których podstawowy poziom przekraczał 500 kopii (1809 ± 617 versus 160 ± 92 , $p=0,02$).

W obu grupach eksperymentalnych inkubacja z samym kwasem acetylosalicylowym nie wpłynęła zasadniczo na liczbę transkryptów mRNA LTC₄S.

Natomiast jeżeli doświadczenie to poprzedzono inkubacją z IL-5, zaobserwowano w grupie ATA spadek liczby transkryptów w porównaniu z ich liczbą po inkubacji jedynie z IL-5 (366 ± 162 *versus* 285 ± 128 , $p=0,02$). W grupie AIA z kolei zależność tutaj obserwowana była odwrotna, czyli prawie statystycznie znamiennej wzrost liczby transkryptów mRNA LTC₄S (159 ± 52 *versus* 250 ± 74 , $p=0,05$).

Podobny trend wystąpił po inkubacji komórek z IL-5 i jonoforem wapnia. Eozynofile ATA inkubowane z IL-5 i jonoforem wapnia w porównaniu do inkubowanych tylko z IL-5, statystycznie znacznie obniżyły ekspresję mRNA LTC₄S (366 ± 162 *versus* 98 ± 34 , $p=0,02$), natomiast AIA ją zwiększyły (159 ± 52 *versus* 1049 ± 482 , $p=0,02$).

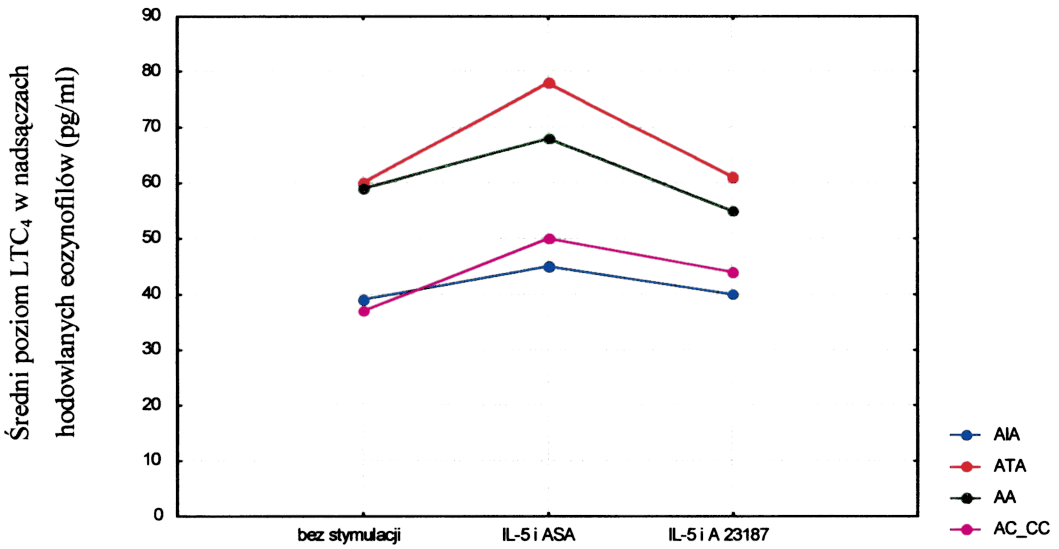
W obu turach eksperymentów w grupie ATA zauważono statystycznie znamiennej dodatnią korelację pomiędzy poziomem IgE, a wzrostem ekspresji mRNA LTC₄S po IL-5 ($p=0,04$). Natomiast w żadnej badanej grupie eksperymentalnej nie stwierdzono obecności związku pomiędzy produkcją LTC₄ lub genetyczną ekspresją mRNA LTC₄S i eozynofilią bezwzględna krwi obwodowej.

Poziomy LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów.

U 32 losowo wybranych osób (18 przedstawicieli AIA i 13 ATA) oznaczono poziom LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofilów bez stymulacji, stymulowanych IL-5 i ASA oraz stymulowanych IL-5 i jonoforem wapnia. Poniżej przedstawiono wyniki tych oznaczeń. Ponieważ rozkład wyników pokrywał się z rozkładem normalnym, w tabeli obok wartości średnich i odchylenia standardowego, umieszczono tylko 95% przedział ufności średniej. Stężenia LTC₄ wyrażono w pg/ml.

Badane komórki	Bez stymulacji		Stymulowane IL-5 i ASA		Stymulowane IL-5 i A 23187	
	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej	Średnia (SD)	95% przedział ufności średniej
AIA	39 (24)	26-50	45 (41)	26-65	40 (29)	26-55
ATA	60 (50)	28-92	78 (55)	43-114	62 (44)	35-91
Osoby z wariantem AA	59 (40)	36-81	68 (60)	35-101	55 (35)	35-76
Osoby z wariantem AC i CC	37 (33)	20-54	50 (42)	29-71	44 (38)	24-64

Tabela 15. Poziomy leukotrienu C₄ w nadsączach eozynofilów.



Rysunek 29. Graficzny obraz przedstawiający średni poziomy LTC₄ w nadsączach eozynofilów.

Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy produkcją podstawową LTC₄ przez eozynofile AIA i ATA. Nie stwierdzono również związku produkcji leukotrienu C₄ z obecnością allelu C wariantu polimorficznego regionu promotorowego C₄₄₄ LTC₄S.

Po stymulacji aspiryną uzyskano niewielki wzrost produkcji LTC₄ u AIA i statystycznie znamienny u ATA ($p=0,02$). Podobnie stymulacja jonoforem wapnia spowodowała tylko bardzo niewielkie wzrosty produkcji LTC₄, które były podobne i nieistotne w obu grupach.

Poza tym zaobserwowano dodatnią, ale statystycznie nieznamienną korelację pomiędzy podstawową produkcją LTC₄ przez eozynofile, a oznaczoną w nich ekspresją genetyczną mRNA LTC₄S ($p=0,2$). Natomiast dla komórek stymulowanych IL-5 i ASA oraz IL-5 i jonoforem wapnia korelacja ta w grupie ATA była słabo dodatnia, natomiast dla AIA ujemna.

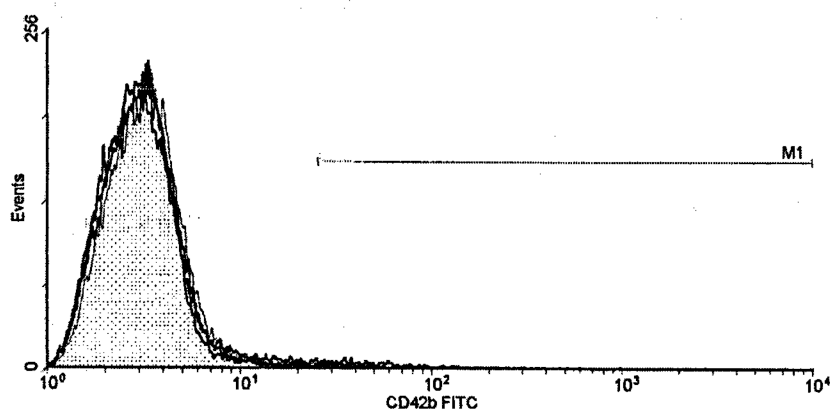
7. Dyskusja.

7.1 Domieszka innych typów komórek lub płytek krwi w badanym materiale izolacyjnym.

Izolowane ludzkie eozynofile w hodowli *in vitro* wykazują ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S, oraz produkują leukotrien C₄. Jest mało prawdopodobne, aby źródłem tych produktów były komórki inne niż eozynofile, obecne w badanym materiale. Średnia gęstość bazofilów wahała się w granicach 1074-1076 g/ml, a monocytów 1067-1077 g/ml. Oba typy komórek powinny pozostać więc w warstwie limfocytów powyżej Histopaque 1077 g/ml. W preparatach, wykonywanych po izolacji, nie stwierdzano obecności bazofilów ani monocytów, a jedynie pojedyncze neutrofile i limfocyty, które zgodnie z obserwacjami innych badaczy, nie produkują leukotrienu C₄ (1). Wydaje się więc, że zastosowana w pracy metoda negatywnej immunomagnetycznej separacji komórek z wykorzystaniem aparatu VarioMACS i kolumn AS, BS i CS, dedykowanych przez producenta do separacji negatywnej, spełnia stawiane jej wymagania. Izolowane komórki były żywe, a zawarte wśród nich bardzo niewielkie ilości neutrofilów i limfocytów, praktycznie można nie brać pod uwagę w analizie wyników. MiniMACS natomiast wytwarza pole o niewystarczającej sile i nie może być polecany do przeprowadzania immunomagnetycznej izolacji eozynofilów.

Na przełomie lat 80-tych i 90-tych szeroką popularnością cieszyły się hipotezy dotyczące udziału płytek krwi w patogenezie astmy oskrzelowej. U chorych na astmę i choroby alergiczne w surowicy krwi stwierdzano wyższe stężenia markerów aktywacji płytek, takich jak lyso-PAF, czynnik płytkowy 4, TXB₂ i β -tromboglobulinę (138). Patologię wykryto także w funkcjonowaniu trombocytów pobranych od tych chorych. Charakteryzowały się one mniejszą zdolnością do agregacji po stymulacjach *in vitro* (79), a u chorych na astmę aspirynową zanotowano silną ich aktywację po aspirynie (4). W związku z tymi obserwacjami obecność płytek w badanym materiale mogłaby zaburzać wyniki eksperymentów i prowadzić do mylnych wniosków. Płytki krwi posiadają wysoką ekspresję mRNA LTC₄S, a leukotrien C₄ produkują z dostarczonego im z zewnątrz, głównie pochodzącego od neutrofilów, leukotrienu A₄ (81). Eozynofile z kolei wydzielają bardzo niewielką ilość LTA₄, ale dużo substancji PAF, a więc bardzo silnego aktywatora trombocytów. Płytki krwi posiadają liczne adhezyjne białka powierzchniowe. Prawdopodobnie mogą one poprzez glikoproteinę IIb/IIIa lub

selektywną-P przylegać po aktywacji do reszt kwasu sialowego na powierzchni błon granulocytów (107). W rozmazach wykonywanych po izolacji nie stwierdzano obecności płytek. Jednak aby zupełnie wykluczyć adhezję płytek do powierzchni wyizolowanych eozynofików, dwukrotnie po zakończonej procedurze separacyjnej komórki inkubowano ze znakowanym fluoresceiną przeciwciałem skierowanym przeciwko integralnej płytkowej CD42b, czyli glikoproteinie Ib. Następnie określano fluorescencję komórek z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Kontrolę negatywną stanowiły komórki linii HL-60 różnicowane DMSO. Uzyskana fluorescencja była bardzo niska, prawdopodobnie pochodziła od fluorescencji własnej komórek, poza tym nie wykazano żadnych różnic pomiędzy komórkami negatywnej kontroli, a wyizolowanymi eozynofikami.



Rysunek 30. Krzywe fluorescencji z cytometru przepływowego.

7.2 Ekspresja genetyczna mRNA LTC₄S oraz produkcja LTC₄ przez eozynofile chorych na astmę oraz zdrową grupę kontrolną.

Ekspresja genetyczna mRNA LTC₄S w eozynofikach nie była dotąd badana ilościowo. Natomiast od połowy lat 80-tych prowadzono badania nad produkcją leukotrienów przez granulocyty krwi obwodowej. Opisywane powyżej w pracy wyniki eksperymentów dotyczących produkcji LTC₄ przez eozynofile są w dużej mierze podobne do obserwacji poczynionych przez innych badaczy (47, 97).

W eozynofilach astmatyków aspirynowych wykazano statystycznie znamienne wyższą podstawową ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S, niż w grupie ATA i zdrowej kontroli. Porównanie ATA i K wykazało także wyższą ekspresję mRNA LTC₄S w niestymulowanych eozynofilach ATA. Może to sugerować stan pobudzenia tych komórek już w krwi obwodowej chorych na astmę oskrzelową.

Metoda pracy polegała na oznaczaniu ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S w całkowitym komórkowym RNA. Wyniki nie dają więc żadnych danych odnośnie odsetka eozynofilów krwi, który wykazuje ekspresję tego enzymu. Nie wszystkie komórki chorych na astmę musiały wykazywać obecność mRNA tego enzymu. Odsetkowe różnice w liczbie eozynofilów z transkryptami mRNA LTC₄S w poszczególnych badanych grupach, mogą być bardzo niewielkie.

Nie można również wykluczyć, że w trakcie procedury izolacji doszło do bardzo silnego pobudzenia eozynofilów astmatyków aspirynowych, które utrzymywało się przez następnych 18 godzin ich uspakajania w medium hodowlanym. Jednak taka interpretacja wyników przemawia również za tendencją komórek AIA do wyższej ekspresji mRNA LTC₄S.

Należy też zwrócić uwagę na fakt, że zastosowana w pracy metoda badania żywotności eozynofilów nie pozwalała na uchwycenie komórek będących we wczesnej fazie apoptozy. Takie eozynofile zostały uznane za żywe, a ich poziom genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S mógłby odbiegać od spotykanego w ustroju (123). Z eksperymentów prowadzonych przez H.-U. Simona wynika, że eozynofile izolowane z tkanek objętych reakcją zapalną w astmie cechują się zaburzeniami apoptozy prowadzącymi do ich przedłużonego życia (99). Eozynofile osób zdrowych, a w mniejszym stopniu astmatyków bez nadwrażliwości na aspirynę, mogłyby w trakcie inkubacji trwającej 18 godzin i dalszych eksperymentów rozpocząć proces apoptozy. Jednak w ten sposób nie można wytłumaczyć różnego wpływu stosowanych stymulantów na ekspresję mRNA LTC₄S w badanych grupach komórek.

Na uwagę zasługuje także istnienie dodatniej, statystycznie znamiennej korelacji, pomiędzy stopniem nasilenia astmy oraz ekspresją mRNA LTC₄S w eozynofilach oraz ujemna korelacja pomiędzy ekspresją mRNA a dawką doustnej kortykoterapii. Związek produkcji leukotrienów przez eozynofile ze stosowaną farmakoterapią (89, 124) i nasileniem astmy (58) był już opisywany wcześniej. Wcześniej także zauważono powiązanie stopnia nasilenia astmy z poziomem LTE₄ w surowicy krwi chorych (14).

Nie wykazano natomiast różnic w produkcji leukotrienu C_4 przez niestymulowane eozynofile ATA i AIA. W grupie kontrolnej produkcja była o około 40% niższa, ale stwierdzana różnica nie była statystycznie znamienna. Należy zwrócić uwagę na różnice w bezwzględnych wartościach poziomu leukotrienu C_4 w nadsączach pochodzących z hodowli eozynofilów w pierwszym i drugim etapie badań. Różnice te mają prawdopodobnie związek z inną serią zestawów zakupionych do oznaczania tego leukotrienu lub domieszką innych komórek krwi w pierwszej turze eksperymentów. W związku z tym porównywanie tych dwóch grup wyników może prowadzić do błędnych wnioskowań.

Wyniki prac innych autorów wskazują na nieco wyższą produkcję leukotrienów przez eozynofile chorych na astmę, niż ludzi zdrowych (120, 53). Z drugiej strony można zacytować pracę, w której uzyskiwano wyższą produkcję przez eozynofile osób zdrowych niż astmatyków (42).

7.3 Regulacja ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S i produkcji LTC₄ przez IL-5.

W grupie ATA i K po inkubacji z IL-5 ekspresja mRNA LTC₄S uległa kilkakrotnemu wzrostowi, ale tylko wówczas, gdy wyjściowy poziom nie przekraczał 1500 kopii na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA. Na badaną ekspresję w eozynofilach AIA, IL-5 miała raczej wpływ odwrotny, chociaż u niektórych osób zauważono również wyraźne wzrosty po IL-5. Nasuwa się tutaj skojarzenie z eksperymentem, w którym badano chemotaksję eozynofilów po IL-5. Wrażliwe były tylko te komórki, które pochodziły od osób z prawidłową liczbą eozynofilów (93). Eozynofile od chorych z hipereozynofilią nie reagowały na tę cytokinę, co można tłumaczyć maksymalnym, już istniejącym, pobudzeniem tego receptora wynikającym albo z podwyższonego stężenia IL-5 w krwi obwodowej, albo z patologią gęstości, bądź struktury receptorowej. Przyczyna wysokiej, ale niereagującej na IL-5 ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S może mieć podobne przyczyny. Jednak badania przeprowadzane w naszej Katedrze nie wykazały wyższego poziomu IL-5 w krwi u osób z hipereozynofilią, a nawet zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy liczbą eozynofilów w krwi obwodowej, a stężeniem IL-5 we krwi (wyniki niepublikowane). W dostępnej literaturze nie wykazano także związku atopii z wyższą ekspresją receptora

dla IL-3, IL-5 i GM-CSF na powierzchni eozynofilów. A nawet w krwi noworodków rodziców z atopią ekspresja ta na komórkach progenitorowych hemopoezy (*stem cell*) była niższa (127). Nie jest więc wykluczone, że dla funkcji eozynofilów ważniejsze są zaburzenia czynności receptora lub szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowego.

Z drugiej strony jest faktem oczywistym, że IL-5 odgrywa istotną rolę w formowaniu nacieku zapalnego w drogach oddechowych chorych na astmę. Ludzkie przeciwciała skierowane przeciwko IL-5 i podane drogą dożylną, zmniejszają liczbę eozynofilów w krwi i płwocinie zarówno przed, jak i po stymulacji alergenem astmatyków atopowych (16). Poza tym w błonie śluzowej dróg oddechowych astmatyków stwierdzono znacznie więcej komórek wykazujących obecność mRNA dla powierzchniowego markera CD34 i podjednostki α receptora IL-5 (uważa się, że są to prekursorzy eozynofilów) (77, 78). Podobnie, po stymulacji alergenem astmatyków atopowych, więcej tych komórek pojawia się w szpiku (94). Potwierdza to po raz kolejny istotną rolę IL-5 w patomechanizmie nacieku eozynofilów w astmie. Wydaje się, że cytokina ta jest szczególnie istotna w patofizjologii astmy aspirynowej. W skrawkach oskrzelowych tych astmatyków ekspresja białka IL-5 była 2-4 razy wyższa w komórkach nabłonka oskrzeli, eozynofilach i mastocytach niż u chorych bez nadwrażliwości na aspirynę (105).

Być może ważny jest też fakt, że receptor dla IL-5 występuje zarówno w formie rozpuszczalnej jak i komórkowej (121). Dysproporcje w ich aktualnym stosunku w krwi, czy tkankach, mogłyby warunkować zaburzenia w efektach działania tej cytokiny.

Nie jest też wykluczone, że w funkcjonowaniu eozynofilów ważniejsze od samej IL-5 są efekty jej współdziałania z innymi znanymi, lub jeszcze niepoznanymi komórkami i cytokinami. W krwi chorych na atopowe zapalenie skóry z towarzyszącą astmą oskrzelową lub bez niej, stwierdzono podwyższony poziom RANTES w porównaniu do zdrowej kontroli lub osób jedynie z objawami pyłkowicy (37). Nie można więc wykluczyć, że niektóre z prozapalnych cytokin są wydzielane w większej ilości do krwi chorych na astmę i warunkują stan wzbudzenia niektórych komórek, w tym również eozynofilów. Odnotowane po IL-5 wzrosty były bardziej wyraźne w pierwszej turze eksperymentów, w której po procedurze izolacji uzyskiwano kilkunastoprocentową domieszkę limfocytów i neutrofilów. Obserwacja ta sugeruje dodatkowy efekt działania humoralnych interakcji międzykomórkowych, obserwowany także przez innych badaczy (27, 59).

Wzrost ekspresji mRNA LTC₄S po inkubacji z IL-5 tłumaczy opisywany w literaturze tzw. efekt „primingowy” interleukin. Eozynofile po stymulacji fMLP lub jonoforem wapnia produkowały dużą ilość leukotrienu C₄, ale ta produkcja rosła znamienne, jeżeli komórki wcześniej inkubowano przez 30-90 min z IL-5, IL-3, TNF α lub NGF (116, 117, 124). IL-5 łącząc się z odpowiednim receptorem na powierzchni eozynofila prawdopodobnie ma wpływ zarówno na aktywację enzymów uczestniczących w produkcji leukotrienów, jak i na regulację transkrypcji genetycznej rozmaitych genów. W regionie promotorowym LTC₄S stwierdzono obecność wielu sekwencji, które potencjalnie mogłyby przyłączać czynniki transkrypcyjne, takie jak AP-1, AP-2, SP-1, NF- κ B, STAT oraz CRE (cAMP Responsive Element) (8). Aktywację niektórych z nich obserwowano po inkubacji eozynofilów z IL-5 (2). Ponadto stwierdzono, że cytokina ta powoduje wzrost białkowej ekspresji FLAP i przesunięcie 5-lipoksygenazy do jądra eozynofila (21). Obserwacje te mogą świadczyć zarówno o bezpośrednim wpływie na produkcję, jak i regulację transkrypcji innych genów przez tę interleukinę. Nasuwa to również podejrzenie, że enzymy przemian kwasu arachidonowego są regulowane nie tyle wzrostem ekspresji, ile zmianami położenia wewnątrzkomórkowego.

Wzrosty poziomu mRNA LTC₄S odnotowane po IL-5 należą raczej do niewielkich. LTC₄S można zatem określić jako enzym konstytutywny. Wydaje się, że w komórkach o pochodzeniu epitelialnym, limfocytach i neutrofilach, promotor LTC₄S pozostaje pod stałym wpływem hamujących czynników transkrypcyjnych (95). Być może IL-5 prowadzi do odhamowania tej supresji, ale efekt ten u większości astmatyków aspirynowych nie jest widoczny. Sugeruje to nieco inny mechanizm regulacji transkrypcji tego genu w obu grupach chorych lub stan stałego odhamowania aktywności promotora u astmatyków aspirynowych.

W opisanych układach eksperymentalnych IL-5 spowodowała także wzrosty produkcji LTC₄ przez eozynofile. Dotyczyło to głównie wariantu polimorficznego C, ale także, choć w mniejszym stopniu, chorych z dwoma allelami A. Dodatnia statystycznie znamienna korelacja pomiędzy podstawową ekspresją genetyczną mRNA LTC₄S, a podstawowym poziomem leukotrienu C₄ oraz poziomem leukotrienu C₄ po IL-5, a także prawie znamienna korelacja pomiędzy ekspresją genetyczną mRNA LTC₄S a poziomem LTC₄ po IL-5, potwierdzają związek regulacji transkrypcji z regulacją translacji w komórce przez IL-5.

7.4 Wpływ PMA na ekspresję mRNA LTC₄S i produkcję LTC₄ przez eozynofile krwi obwodowej.

W przeprowadzonych eksperymentach po inkubacjach z estrem forbolu zaobserwowano tendencje do obniżania zarówno genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S, jak i poziomu leukotrienu C₄ w nadsączach hodowlanych. Wydaje się więc, że PKC nie aktywuje ani genetycznej ekspresji LTC₄S, ani produkcji leukotrienów cysteinylowych. Wyniki te są zgodne z publikacjami innych badaczy (3, 125). Zauważono nawet wzrost produkcji leukotrienów po dodaniu Bis I i kalfostyny C, a więc substancji hamujących działanie PKC (26).

7.5 Rola aspiryny w regulacji transkrypcji LTC₄S i produkcji leukotrienu C₄ przez eozynofile krwi obwodowej.

Zastanawiający jest efekt działania aspiryny w badanym układzie *in vitro*. W nadsączach pochodzących z inkubacji eozynofilów obu grup chorych z IL-5 i aspiryną zaobserwowano niewielkie, ale stałe wzrosty poziomu LTC₄. Osiągnęły one nawet znamienność statystyczną dla grupy ATA i prawdopodobnie miały związek tylko z zablokowaniem COX. Wydaje się, że bardziej widoczny wzrost produkcji leukotrienów u ATA niż AIA może mieć związek z efektem działania IL-5. Cytokina ta została dodana do eozynofilów 2 godziny przed aspiryną i spowodowała wzrost ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S, ale tylko u ATA.

Od około 3 lat pewną popularność w rozpoznawaniu *in vitro* alergii i nadwrażliwości na aspirynę zdobywają testy stymulacji pełnej krwi obwodowej alergenem lub niesterydowym lekiem przeciwzapalnym. W publikowanych wynikach tych badań aspiryna powodowała zawsze wzrosty produkcji leukotrienów, ale odnośnie różnic uzyskiwanych pomiędzy grupami AIA i ATA wyniki nie są spójne. Przeprowadzone w naszej Katedrze badania nie uwidoczniły wyraźnych różnic pomiędzy badanymi grupami chorych (75). Natomiast z innych ośrodków badawczych pochodzą doniesienia, iż po stymulacji aspiryną lub innymi niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi komórki krwi AIA produkowały leukotrienów cysteinylowych więcej (23, 64). Rozbieżność wyników może mieć związek ze stosowaniem w

eksperymentach zbyt wysokich, niespotykanych w organizmie stężeń aspiryny (0,5 - 1,1 mM), które mogłyby zmieniać właściwości fizjologiczne komórek. Poza tym część badaczy stosowała oprócz aspiryny inne niesterydowe leki przeciwzapalne, na przykład diklofenak i indometacynę, które w istotny sposób podwyższały czułość rozpoznawania *in vitro* nadwrażliwości na NLPZ; podobnie jak aktywacja procesu zapalnego, poprzez dodanie C5a składowej dopełniacza lub fMLP. Wydaje się również, iż kluczowa może być tutaj różna zawartość w stymulowanej krwi eozynofików i bazofików, a więc komórek produkujących najwięcej leukotrienów cysteinylowych, zbyt małe liczebności badanych grup eksperymentalnych (kilka osób) oraz brak jednorodności grupy pacjentów nadwrażliwych na aspirynę. Przykładowo wykazano, że nadwrażliwość na aspirynę ujawniająca się zmianami skórnymi predysponuje do najwyższej produkcji leukotrienów przez komórki krwi obwodowej (63). Na produkcję leukotrienów wpływa także nasilenie choroby i doustna kortykoterapia (58, 89), te zaś nie zawsze były uwzględniane w przeprowadzanych badaniach.

Wzrosty produkcji LTC₄ obserwowane w tej pracy po aspirynie w hodowlach eozynofików w żaden sposób nie tłumaczą mechanizmu nadwrażliwości u AIA. Miały one miejsce w komórkach uzyskiwanych od obu grup pacjentów, natomiast nadprodukcja leukotrienów po przyjętej doustnie aspirynie występuje tylko w grupie AIA i dotyczy stosunkowo małej dawki tego leku. Wydaje się więc, że problem astmy aspirynowej nie jest ograniczony tylko do pojedynczego typu komórek, ale wiąże się ze skomplikowanym mechanizmem regulacji i interakcji komórkowych, w których oprócz eozynofików krwi uczestniczą także inne komórki, mediatory tkankowe i układy enzymatyczne. Próby prowokacyjne z aspiryną wskazują między innymi na udział w reakcji nadwrażliwości w równej mierze eozynofików i mastocytów (67). Donosowe podanie aspiryny wywołuje 10-krotny wzrost ECP i 8-krotny wzrost tryptazy w popłuczynach nosa astmatyków aspirynowych (54). Wyższa ekspresja mRNA LTC₄S w eozynofikach krwi obwodowej mogłaby odgrywać jakąś rolę w patogenezie astmy aspirynowej, ale czynnikiem wywołującym atak duszności najpewniej nie jest bezpośrednio sama aspiryna.

Z kolei obserwowany po aspirynie spadek mRNA LTC₄S w grupie ATA najłatwiej wytłumaczyć wpływem modyfikującym czynniki transkrypcyjne. Aspiryna hamuje działanie kinazy IKK w komórce. Z kolei nieaktywna kinaza warunkuje trwałość połączenia ze sobą czynników transkrypcyjnych I-κB i NF-κB, a tym samym uniemożliwia migrację NF-κB do jądra komórkowego (30). Obecny w jądrze

komórkowym NF- κ B aktywuje transkrypcję wielu prozapalnych genów, a być może również LTC₄S.

W grupie AIA z kolei aspiryna nie tylko nie spowodowała spadku mRNA LTC₄S, ale nawet jej wzrost, jeżeli poprzedzona była inkubacją z IL-5. Może to sugerować brak wpływu na kinazę IKK u tych chorych lub dodatkową obecność innych mechanizmów regulacji ekspresji genetycznej tego enzymu. Nie można wykluczyć, że jest to jeden z dodatkowych czynników warunkujących nadwrażliwość na aspirynę w grupie AIA.

W patogenezie astmy aspirynowej pewną rolę mogą odgrywać także lipoksyny. W wyniku działania tego leku, po acetylacji COX, powstają analogi lipoksyn, np. 15-epiLXA₄, które są nawet 100 razy silniejsze i bardziej stabilne od wyjściowych związków (18, 118). Nie jest wykluczone, że u chorych z nadwrażliwością na aspirynę istnieje patologia, warunkująca stałe zaburzenia równowagi mediatorów reakcji zapalnej związane ze spadkiem produkcji przeciwzapalnych lipoksyn. Aspiryna natomiast w momencie jej zadziałania, spowodowałaby przechylenie szali równowagi na korzyść czynników prozapalnych.

7.6 Wpływ jonoforu wapnia na transkrypcję mRNA LTC₄S i produkcję leukotrienu C₄ przez eozynofile krwi obwodowej.

Jonofor wapnia powodował spadek genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S w grupie ATA, natomiast wzrost u AIA. Różny efekt działania jonoforu wapnia jest kolejnym argumentem przemawiającym za innym mechanizmem regulacji transkrypcji mRNA LTC₄S w obu badanych grupach chorych. Wydaje się, że w odpowiedzi na jonofor wapnia mogą być zaangażowane inne kinazy w cytoplazmie, a być może także inne lub inaczej aktywowane czynniki transkrypcyjne w jądrze.

Z kolei wpływ jonoforu wapnia na produkcję LTC₄ w nadsączach hodowlanych eozynofiliów wiązał się z niewielkimi, statystycznie nieistotnymi wzrostami produkcji tego leukotrienu. Były one takie same w obu badanych grupach chorych. Rozbieżność pomiędzy tendencjami do zmian ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S i produkcji LTC₄, świadczy najprawdopodobniej o braku bezpośredniego związku regulacji transkrypcji z produkcją LTC₄ przez jonofor wapniowy. Nasilenie produkcji realizuje się zapewne

bezpośrednio poprzez szybkie podwyższenie poziomu Ca^{+2} i ma związek tylko z aktywacją białek enzymatycznych uczestniczących w produkcji leukotrienów. Natomiast wpływ na regulację transkrypcji wiąże się z następową aktywacją czynników transkrypcyjnych, wymaga czasu i nie jest wykluczone, że mógłby także powodować zmiany w produkcji leukotrienów. Wymagałoby to jednak spełnienia określonych warunków, np. dłuższego czasu inkubacji, większej ilości substratów lub aktywacji dodatkowych enzymów, białek i mediatorów reakcji zapalnej.

Wzrosty opisywane w literaturze po jonoforze wapnia z reguły były znacznie wyższe, co można przykładowo wiązać z innym producentem odczynnika, ponieważ jonofor wapnia jest bardzo niestabilny i łatwo traci swą aktywność przy niewłaściwym przechowywaniu (27).

7.7 Wpływ polimorfizmu regionu promotorowego LTC₄S na regulację ekspresji mRNA LTC₄S.

Kolejne podejmowane w pracy zagadnienie wiąże się z wpływem polimorfizmu regionu promotorowego C₄₄₄ na ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S. W pierwszej turze eksperymentów obecność allelu C korelowała z wyższą podstawową ekspresją genetyczną mRNA LTC₄S oraz wyraźnym wzrostem poziomu LTC₄ w nadsącach eozynofilów po IL-5. Jednak w drugiej badanej grupie zależności te nie potwierdziły się. Taka rozbieżność wyników może wynikać z obecności w pierwszej fazie eksperymentów domieszki limfocytów i neutrofilów, a tym samym produkowanych przez nie czynników humoralnych innych niż IL-5. W drugim etapie badań domieszek tych komórek prawie nie stwierdzano.

W badaniach przeprowadzonych w naszej Katedrze, chorzy na astmę aspirynową, będący nosicielami allelu C, po stymulacji aspiryną wydzielali z moczem leukotrienu E₄ więcej, niż chorzy z allelem A (85). Być może decydująca jest tutaj obecność innych mediatorów i komórek reakcji zapalnej w organizmie, a różnica w produkcji leukotrienów ujawniłaby się dopiero w okresie zaostrzenia klinicznego astmy.

7.8 Podsumowanie dyskusji.

W świetle uzyskanych eksperymentalnie wyników można wnioskować o istotnej, ale nie krytycznej roli eozynofilów w patogenezie produkcji leukotrienów w astmie. Reakcja zapalna w tej chorobie ma miejsce głównie w drogach oddechowych. Tutaj następuje produkcja mediatorów zapalnych i zasadnicza aktywacja procesy zapalnego. Niewątpliwy jest w nim udział innych komórek, a w szczególności mastocytów i limfocytów (68). W literaturze wykazano nawet bardzo istotny wpływ monocytów na modyfikację produkcji leukotrienu LTC₄ przez eozynofile, który realizuje się najprawdopodobniej poprzez produkowane przez nie mediatory reakcji zapalnej, a w szczególności interleukiny i TNF α (27).

Przeprowadzone w pracy eksperymenty dają pewien wgląd w mechanizm regulacji transkrypcji mRNA LTC₄S.

Wydaje się, że już w krwi obwodowej eozynofile mogą być „przygotowywane” do zwiększonej produkcji LTC₄, a może również innych mediatorów zapalnych. Miałoby to związek z określonymi implikacjami terapeutycznymi. Przykładowo u osób z wyższą ekspresją badanego enzymu, bardziej celowe byłoby stosowanie leków antyleukotrienowych i przeciwciał wiążących IL-5, niż systemowej kortykoterapii w wysokich dawkach. Stan aktywacji eozynofilów zapewne nasila się jeszcze w tkance płucnej, gdzie w wyniku toczącej się uogólnionej reakcji zapalnej istnieje wysokie stężenie cytokin wpływających na funkcje eozynofilów, a szczególnie IL-5, IL-3 i GM-CSF, eotaksyny, RANTES, a nawet IL-9 (122).

Wydaje się, że komórki ATA łatwiej się stymulują, ale być może łatwiej też reagują na czynniki hamujące tę aktywację, szczególnie na poziomie regulacji ekspresji genetycznej. Nie jest wykluczone, że ta regulacja przebiega nieco inaczej u AIA niż u ATA. Eozynofile AIA z kolei po uzyskaniu wysokiej ekspresji mRNA utrzymują ją na stałym wysokim poziomie, pozostając w stanie „gotowości” do produkcji leukotrienów zarówno w drogach oddechowych, jak i we krwi. Wydaje się także, że problem astmy, a w szczególności astmy aspirynowej jest przynajmniej w pewnej części związany ze zmianami mechanizmów regulacji transkrypcji przez jądrowe czynniki transkrypcyjne.

8. Wnioski.

1. W ludzkich eozynofilach można określić ekspresję genetyczną mRNA syntazy leukotrienu C₄ (LTC₄S), która ma związek z produkcją leukotrienu C₄ (LTC₄).
2. Podstawowa ekspresję mRNA LTC₄S w eozynofilach osób chorych na astmę aspirynową (AIA) była statystycznie znamienne wyższa niż u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny (ATA) i w zdrowej grupie kontrolnej (K). Również w grupie ATA zaobserwowano znamienne wyższy poziom mRNA LTC₄S, niż w K.
3. Doświadczenia ze stymulacją eozynofilów IL-5, jonoforem wapnia i kwasem acetylosalicylowym wskazują na nieco inny mechanizm regulacji transkrypcji mRNA LTC₄S w obu grupach chorych. Inkubacja z IL-5 spowodowała wzrost ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S u ATA i K, natomiast u AIA zaobserwowano tendencje spadkowe. Jeżeli natomiast po inkubacji z IL-5 eozynofile stymulowano jonoforem wapnia i kwasem acetylosalicylowym, poziom ekspresji genetycznej mRNA LTC₄S w grupie ATA obniżył się, zaś u AIA wykazywał skłonność do wzrostu.

Wydaje się, że w niektórych komórkach LTC₄S pozostaje pod stałym wpływem hamujących czynników transkrypcyjnych, natomiast po IL-5 dochodzi do odblokowania tych wpływów.

4. U chorych na astmę istnieje skłonność do zwiększonej produkcji LTC₄, która jednak nie osiąga cech znamienności statystycznej.
5. Domieszka innych komórek wpływa modyfikująco na ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S i produkcję leukotrienów przez eozynofile.
6. Obecność allelu C regionu promotorowego LTC₄S może mieć pewien związek z wyższą ekspresją mRNA LTC₄S, chociaż z pewnością nie jest to główny i jedyny czynnik regulujący transkrypcję tego enzymu.

9. Streszczenie.

Eozynofilom przypisuje się ważną rolę w patogenezie astmy oskrzelowej. Ich liczba w krwi i popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych chorych na astmę jest podwyższona. Eozynofile po stymulacji *in vitro* produkują dużą ilość leukotrienów cysteinylowych, które są ważnymi mediatorami reakcji zapalnej astmy. Powodują między innymi skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli, nadprodukcję śluzu i wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Szczególnym typem astmy jest astma z nadwrażliwością na aspirynę. U około 10% dorosłych astmatyków po zażyciu niesterydowych leków przeciwzapalnych blokujących cyklooksygenazę dochodzi do nasilonego ataku astmy, któremu towarzyszy kilkakrotny wzrost produkcji leukotrienów cysteinylowych. Kluczowym enzymem w produkcji leukotrienów cysteinylowych jest syntaza leukotrienu C₄ (LTC₄S). W skrawkach oskrzelowych astmatyków aspirynowych wykazano wyższą ekspresję tego enzymu, niż u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny i w zdrowej grupie kontrolnej. Ponadto w naszej Katedrze znaleziono w regionie promotorowym LTC₄S (w pozycji -444) polimorfizm, polegający na transwersji nukleotydu A na C, który jest dwukrotnie częstszy w fenotypie astmy z nadwrażliwością na aspirynę. Polimorfizm ten występuje w regionie promotorowym i może mieć związek z wyższą ekspresją tego enzymu oraz nadprodukcją leukotrienów cysteinylowych.

Celem pracy było:

- 1) określenie genetycznej ekspresji mRNA syntazy leukotrienu C₄ w eozynofilach osób chorych na astmę, z uwzględnieniem podziału na astmę aspirynową i astmę niewrażliwą na aspirynę oraz w zdrowej grupie kontrolnej;
- 2) określenie ewentualnego związku pomiędzy ekspresją LTC₄S w eozynofilach, a obecnością wariantu C -444 regionu promotorowego LTC₄S.

Eozynofile izolowano z krwi obwodowej metodą negatywnej immunomagnetycznej separacji komórek. Następnie inkubowano je przez 18 godzin w medium komórkowym, po czym stymulowano IL-5, estrem forbolu, kwasem acetylosalicylowym i jonoforem wapnia. Z komórek izolowano całkowite komórkowe RNA, z użyciem standardowych procedur (Tri-zol), a następnie oznaczano genetyczną ekspresję mRNA LTC₄S metodą kompetycyjnej reakcji RT-PCR. Wewnętrzną kontrolę reakcji stanowiła znana ilość dodawanego genomowego DNA. Odczyt ilościowy umożliwiło zastosowanie laserowej fluorymetrii (ALFexpress). Wyniki określano w

liczbie kopii na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA. Zbierano również media komórkowe, które mrożono, a następnie oznaczano w nich poziom leukotrienu C₄.

Badania przeprowadzono w dwóch różniących się metodologią etapach. Najpierw do izolacji eozynofilów stosowano separator MiniMACS, a do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) użyto specyficznego startera i polimerazy Tth. Następnie eozynofile izolowano separatorem VarioMACS, a reakcję RT przeprowadzano z niespecyficznym starterem oligoT i polimerazą M-MLV. Efektem modyfikacji metody była znacznie mniejsza domieszka neutrofilów i limfocytów wśród wyizolowanych eozynofilów, co prawdopodobnie miało wpływ na wyniki badań.

Badaniem objęto łącznie 143 osoby. W każdym przypadku nadwrażliwość na aspirynę została potwierdzona wykonanym testem inhalacyjnym z aspiryną lizyową. W pierwszej turze eksperymentów przebadano 25 chorych na astmę aspirynową (AIA), 36 z astmą bez nadwrażliwości na aspirynę (ATA) i 30 zdrowych ochotników stanowiących grupę kontrolną (K). Natomiast poziomy leukotrienów oznaczono u 18 losowo wybranych osób: 5 z grupy AIA, 8 ATA i 5 K. Eksperymenty prowadzono w układzie: 1) komórki niestymulowane, 2) komórki stymulowane IL-5, 3) komórki stymulowane IL-5 i PMA. Wykazano wyższą podstawową ekspresję genetyczną mRNA LTC₄S u AIA niż u ATA, (818±412 *versus* 98±23, p=0,0003) oraz u AIA w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej (818±412 *versus* 72±22, p=0,00002). Ekspresja ta była również znamienne wyższa u ATA niż w grupie kontrolnej (98±23 *versus* 72±22, p=0,04).

Ponadto stwierdzono wyższą ekspresję mRNA LTC₄S u nosicieli allelu C wariantu polimorficznego C₋₄₄₄ regionu promotorowego LTC₄S, p=0,04 (przy analizie, na podstawie wykonanej krzywej wzorcowej reakcji RT-PCR, wyników powyżej 50 kopii na 0,1 µg całkowitego komórkowego RNA).

Po stymulacji IL-5 ekspresja mRNA LTC₄S u AIA nie uległa zmianie, natomiast u ATA i K wzrosła statystycznie znamienne (ATA: 98±23 *versus* 103±21, p=0,02; K: 72±22 *versus* 101±23, p=0,01). Dalsza inkubacja z PMA spowodowała zauważalny trend spadkowy w genetycznej ekspresji mRNA LTC₄S.

Nie stwierdzono różnic pomiędzy podstawowym poziomem leukotrienu C₄ w mediach komórkowych AIA i ATA (203±47 *versus* 198±106). Natomiast K miała tę produkcję o około 40% niższą, różnica ta nie była statystycznie znamienna. Po IL-5 produkcja leukotrienów wzrosła, ale statystycznie znamienne tylko dla nosicieli allelu

C. PMA obniżyło produkcję LTC₄ przez eozynofile, ale obserwowane spadki nie osiągnęły cech statystycznej znamienności. Ponadto stwierdzono statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy podstawową ekspresją mRNA LTC₄S i podstawową produkcją leukotrienu C₄ ($p=0,04$) oraz podstawową ekspresją mRNA LTC₄S i produkcją LTC₄ po IL-5 ($p=0,01$).

W drugiej turze eksperymentów badano wpływ kwasu acetylosalicylowego (ASA) w układzie *in vitro* na ekspresję mRNA LTC₄S w eozynofilach ATA i AIA. Ekspresję mRNA LTC₄S oznaczono u 23 przedstawicieli grupy AIA i 29 ATA. Z kolei poziom LTC₄ zmierzono u 18 losowo wybranych przedstawicieli AIA i 13 ATA. Eksperymenty przeprowadzano w układzie: 1) komórki niestymulowane, 2) stymulowane IL-5, 3) stymulowane ASA, 4) stymulowane IL-5 i ASA, 5) stymulowane IL-5 i jonoforem wapnia. Podobnie jak w pierwszej turze eozynofile AIA wykazywały znamienne wyższy poziom podstawowy mRNA LTC₄S (520 ± 191 *versus* 457 ± 235 , $p=0,009$).

Po IL-5 ekspresja mRNA LTC₄S u AIA obniżyła się (520 ± 191 *versus* 159 ± 52 , $p=0,04$), a u ATA znamienne wzrosła, ale tylko u osób z poziomem podstawowym poniżej 1500 kopii (69 ± 19 vs 206 ± 56 , $p=0,02$). ASA nie wpłynął zasadniczo na ekspresję mRNA LTC₄S, ale jeśli stymulacja ASA poprzedzona była inkubacją z IL-5, u ATA wystąpił spadek (366 ± 162 *versus* 285 ± 128 , $p=0,02$), a u AIA skłonność do wzrostu tej ekspresji (159 ± 52 *versus* 250 ± 74 , $p=0,05$). Analogicznie jonofor wapnia podwyższył ekspresję mRNA LTC₄S u AIA (159 ± 52 *versus* 1049 ± 482 , $p=0,02$), natomiast u ATA spowodował jej obniżenie (366 ± 162 *versus* 98 ± 34 , $p=0,02$).

Poziom LTC₄ w nadsącach hodowlanych eozynofilów oznaczono w układzie: poziom podstawowy, po stymulacji IL-5 i ASA oraz po stymulacji IL-5 i jonoforem wapnia. Nie stwierdzono różnic w poziomie podstawowym LTC₄ w grupach AIA i ATA (39 ± 24 *versus* 60 ± 50). Po stymulacji IL-5 i ASA zauważono wzrost produkcji LTC₄, ale ze statystyczną znamiennością tylko w grupie ATA (60 ± 50 *versus* 78 ± 55 , $p=0,02$). Podobnie po stymulacji IL-5 i jonoforem wapnia zaobserwowano wzrost produkcji LTC₄, ale był on bardzo niewielki, podobny w obu badanych grupach i nieistotny statystycznie.

W drugiej turze eksperymentów nie stwierdzono związku pomiędzy ekspresją mRNA LTC₄S oraz produkcją LTC₄, a obecnością wariantu polimorficznego C regionu promotorowego C₋₄₄₄.

10. Piśmiennictwo.

1. Aizawa T., Tamura G., Ohtsu H., Takishima T.: *Eosinophil and neutrophil production of leukotriene C₄ and B₄: comparison of cells from asthmatic subjects and healthy donors*. Ann. Allergy, 1990; 64: 287-292.
2. Alam R., Pazdrak K., Stafford S., Forsythe P.: *The interleukin-5 receptor interaction activates Lyn and Jak2 tyrosine kinases and propagates signals via the Ras-Raf-1-MAP kinase and the Jak-STAT pathways in eosinophils*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1995; 107: 226-227.
3. Ali A., Ford-Hutchinson A.W., Nicholson D.W.: *Activation of protein kinase C down-regulates leukotriene C₄ synthase activity and attenuates cysteinyl leukotriene production in an eosinophilic substrain of HL-60 cells*. J. Immunol., 1994; 153: 776-788.
4. Ameisen J.C., Capron A., Joseph M., Maclouf J., Vorng H., Pancre V., Fournier E., Wallaert B., Tonnel A.B.: *Aspirin-sensitive asthma; abnormal platelet response to drugs inducing asthmatic attacks. Diagnostic and physiopathological implications*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1985; 78: 438-448.
5. Bagley C.J., Woodcock J.M., Stomski F.C., Lopez A.F.: *The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common β subunit of the granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors*. Blood, 1997; 89: 1471-1482.
6. Barnett H.N.: *Aspirin in rheumatism: a warning*. Brit. Med. J., 1905; 2: 21.
7. Bates M.E., Busse W.W., Bertics P.J.: *Interleukin 5 signals through Shc and Grb2 in human eosinophils*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1998; 18: 75-83.
8. Bigby T.D., Hodulik C.R., Arden K.C., Fu L.: *Molecular cloning of the human leukotriene C₄ synthase gene and assignment to chromosome 5q35*. Mol. Med., 1996; 2: 637-646.
9. Boyce J.A., Lam B.K., Penrose J.F., Friend D.S., Parsons S., Owen W.F., Austen K.F.: *Expression of LTC₄ synthase during the development of eosinophils in vitro from cord blood progenitors*. Blood, 1996; 88: 4338-4347.
10. Brandslund I., Rasmussen J.M., Fisker D., Svehag S.E.: *Separation of human peripheral blood monocytes on continuous density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel Percoll*. J. Immunol. Methods, 1982; 48: 199-211.

11. Busse W.W.: *The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis*. Clin. Exp. Allergy, 1996; 26: 868-879.
12. Capron M.: *Receptors and mechanisms of activation of eosinophils*. W: Advances in Allergology and Clinical Immunology, red.: Godart P., Bosquet J., Michel F.B. The Parthenon Publishing Groups, Park Ridge 1992, 187-193.
13. Chavis C., Godard P., Crastes de Paulet A., Damon M.: *Formation of lipoxins and leukotrienes by human alveolar macrophages incubated with 15(S)-HETE: model for cellular cooperation between macrophages and airway epithelial cells*. Eicosanoids, 1992; 5: 203-211.
14. Chavis C., Van Vyve T., Chanez P., Farce M., Bousquet J., Michel F.B., Godard P.: *Leukotriene E₄ plasma levels in adult asthmatic patients with variable disease severity*. Allergy, 1997; 52: 589-592.
15. Christie P.E., Tagari P., Ford-Hutchinson A.W. i wsp.: *Urinary LTE₄ concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects*. Am. Rev. Respir. Dis., 1991; 143: 1025-1029.
16. Chung K.F.: *Therapeutic control of eosinophil accumulation and activation in asthma*. Eosinophil 1999 (materiały zjazdowe), Repro Ekonomikum; Uppsala 1999: 89-91.
17. Claria J., Serhan C.N.: *Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92: 9475-9479.
18. Clish C.B., O'Brien J.A., Gronert K., Stahl G.L., Petasis N.A., Serhan C.N.: *Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 96: 8247-8252.
19. Cloud M.L., Enas G.C., Kemp J. i wsp.: *A specific LTD₄/LTE₄ receptor antagonist improves pulmonary function in patients with mild, chronic asthma*. Am. Rev. Respir. Dis., 1989; 140: 1336-1339.
20. Coeffier E., Joseph D., Vargaftig B.B.: *Role of interleukin-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs*. Brit. J. Pharmacol., 1994; 113: 749-756.
21. Cowburn A.S., Holgate S.T., Sampson A.P.: *IL-5 increases expression of 5-lipoxygenase-activating protein and translocates 5-lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils*. J. Immunol., 1999; 163: 456-465.

22. Cowburn A.S., Sladek K., Soja J., Adamek L., Nizankowska E., Szczeklik A., Lam B.K., Penrose J.F., Austen K.F., Holgate ST., Sampson AP.: *Over-expression of leukotriene C₄ synthase in bronchial biopsies of aspirin-intolerant asthmatics*. J. Clin. Invest., 1998; 101: 834-846.
23. Czech W., Schöpf E., Kapp A.: *Release of sulfidoleukotrienes in vitro: its relevance in the diagnosis of pseudoallergy to acetylsalicylic acid*. Inflamm. Res., 1995; 44: 291-295.
24. Dahlén B., Kumlin M., Margolskee D.J., Larsson C., Blomqvist H., Williams V.C., Zetterström O., Dahlén S.-E.: *The leukotriene-receptor antagonist MK-0679 blocks airway obstruction induced by inhaled lysine-aspirin in aspirin-sensitive asthmatics*. Eur. Respir. J., 1993; 6: 1018-1026.
25. Dahlén S.-E., Hedqvist P., Hammarstrom S., Samuelsson B.: *Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi*. Nature, 1980; 288: 484-486.
26. Dent G., Munoz N.M., Ruhlmann E., Zhu X., Leff A.R., Magnussen H., Rabe K.F.: *Protein kinase C inhibition enhances platelet-activating factor-induced eicosanoid production in human eosinophils*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1998; 18: 136-144.
27. Dessein A.J., Lee T.H., Elsas P., Ravalese J., Silberstein D., David J.R., Austen K.F., Lewis R.A.: *Enhancement by monokines of leukotriene generation by human eosinophils and neutrophils stimulated with calcium ionophore A23187*. J. Immunol., 1986; 136: 3829-3838.
28. *Diagnostyka i leczenie astmy oskrzelowej. Raport Międzynarodowej Grupy Ekspertów*. (National Heart, Lung and Blood Institute, National Institute of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 1992). Med. Prakt., 1992; 15: 3-44.
29. Diaz P., Gonzalez M.C., Galleguillos F.R., Ancic P., Cromwell O., Shepherd D., Durham S.R., Gleich G.J., Kay A.B.: *Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions*. Am. Rev. Respir. Dis., 1989; 139: 1383-1389.
30. Di-Donato J.A., Hayawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M.: *A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B*. Nature, 1997; 388: 548-554.
31. Droszcz W.: *Astma oskrzelowa*. PZWL, Warszawa 1995, Wyd. II.
32. Feldmann M.: *Cell cooperation in the antibody response*. W: Immunology, Fourth Edition, red.: Roitt I., Brostoff J., Male D. Mosby 1996.

33. Gardiner P.J., Abram T.S., Tudhope S.R., Cuthbert N.J., Norman P., Brink C. *Leukotriene receptors and their selective antagonists*. W: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, Vol. 22, Sec. Int. Symposium on Trends in Eicosanoid Biology, red.: Dahlén S.-E., Hedqvist P., Samuelsson B., Taylor W.A., Fritsch J. Reven Press, New York 1995.
34. Gilliland G., Perrin S., Bunn H.F.: *Competitive PCR for quantification of mRNA*. W: *PCR Protocols – a Guide to Methods and Applications*, red.: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich 1990.
35. Gleich G.J., Adolphson C.R.: *The eosinophil leukocyte: structure and function*. *Adv. Immunol.*, 1986; 39: 177-253.
36. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. NHLBI Publication Number 95-3659, 1999; Chapter 5: *Diagnosis and Classification*.
37. Glück J., Rogala B.: *Chemokine RANTES in atopic dermatitis*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47: 367-372.
38. Gupta N., Nicholson D.W., Ford-Hutchinson A.W.: *Demonstration of cell-specific phosphorylation of LTC₄ synthase*. *FEBS Letter*, 1999; 449: 66-70.
39. Hansel T.T., De-Vries I.J., Iff T., Rihs S., Wandzilak M., Betz S., Blaser K., Walker C.: *An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils*. *J. Immunol. Methods*, 1991; 145: 105-110.
40. Hay D.: *Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. More than inhibitors of bronchoconstriction*. *Chest*, 1997; 111 (Suppl.): S35-S45.
41. Hippenstiel S., Kratz T., Krull M., Seybold J., von Eichel-Streiber C., Suttorp N.: *Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation*. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 1998; 245: 830-834.
42. Hodges M.K., Weller P.F., Gerard N.P., Ackerman S.J., Drazen J.M.: *Heterogeneity of leukotriene C₄ production by eosinophils from asthmatic and from normal subjects*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988; 138: 799-804.
43. Holgate S.T.: *Genetic and environmental interaction in allergy and asthma*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 104: 1139-1146.
44. Holt P.G., Macaubas C., Stumbles P.A., Sly P.D.: *The role of allergy in the development of asthma*. *Nature*, 1999; 402 (Suppl.): B12-B17.
45. Insel P. W: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*; red.: Harman J.G., Molinoff P.B., Rudden R.W., Gilman A.G. McGraw- Hill, New York 1996.

-
46. Israel E., Fischer A.R., Rosenberg M.A., Lilly C.M., Callery J.C., Shapiro J., Cohn J., Rubin P., Drazen J.M.: *The pivotal role of 5-lipoxygenase products in the reaction of aspirin-sensitive asthmatics to aspirin*. Am. Rev. Respir. Dis., 1993; 148: 1447-1451.
47. Kajita T., Yui Y., Mita H., Taniguchi N., Saito H., Mishima T., Shida T.: *Release of leukotriene C₄ from human eosinophils and its relation to the cell density*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1985; 78: 406-410.
48. Kane G.C., Pollice M., Kim C.J., Cohn J., Dworski R.T., Murray J.J., Sheller J.R., Fish J.E., Peters S.P.: *A controlled trial of the effect of the 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, on lung inflammation produced by segmental antigen challenge in human beings*. J. Allergy. Clin. Immunol., 1996; 97: 646-654.
49. Kawashima T., Iwamoto I., Nakagawa N., Tomioka H., Yoshida S.: *Inhibitory effect of pemirolast, a novel antiallergic drug, on leukotriene C₄ and granule protein release from human eosinophils*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1994; 103: 405-409.
50. Kaye M.G., Smith L.J.: *Effects of inhaled leukotriene D₄ and platelet-activating factor on airway reactivity in normal subjects*. Am. Rev. Respir. Dis., 1990; 141: 993-997.
51. Kimata M., Shichijo M., Miura T., Serizawa I., Inagaki N., Nagai H.: *Ca⁺² and protein C signaling for histamine and sulfidoleukotrienes released from human cultured mast cells*. Biochem. Biophys. Research Commun., 1999; 257: 895-900.
52. Kita H., Gleich G.J.: *Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation*. J. Exp. Med., 1996; 183: 2421-2426.
53. Kohi F., Miyagawa H., Agrawal D.K., Bewtra A.K., Townley R.G.: *Generation of leukotriene B₄ and C₄ from granulocytes of normal controls, allergic rhinitis and asthmatic subjects*. Ann. Allergy, 1990; 65: 228-232.
54. Kowalski M.L., Grzegorzczak J., Wojciechowska B., Poniatowska M.: *Intranasal challenge with aspirin induces cell influx and activation of eosinophils and mast cells in nasal secretion of ASA-sensitive patients*. Clin. Exp. Allergy, 1996; 26: 807-814.
55. Kowalski M.L., Pawliczak R., Woźniak J., Siuda K., Poniatowska M., Iwaszkiewicz J., Kornatowski T., Kaliner M.A.: *Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin tolerant patients*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2000; 161: 391-398.

-
56. Kroegel C., Virchow J.-C., Luttmann W., Walker C., Warner J.A.: *Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leukocyte (Part I)*. Eur. Respir. J., 1994; 7: 519-543.
57. Kroegel C., Warner J.A., Virchow J.-C., Matthys H.: *Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leukocyte (Part II)*. Eur. Respir. J., 1994; 7: 743-760.
58. Laviolette M., Ferland C., Comtois J.F., Champagne K., Bosse M., Boulet L.P.: *Blood eosinophil leukotriene C₄ production in asthma of different severities*. Eur. Respir. J., 1995; 8: 1465-1472.
59. Leff A., van Seventer G.A., Semnani R.T., Munoz N.M.: *Selective augmentation of LTC₄S synthesis in human eosinophils caused by CD3-stimulated TH2-like cells in vitro*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999; Suppl. (materiały zjazdowe): A 334.
60. Łomnicki A.: *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*. PWN, Warszawa 1995.
61. Małolepszy J.: *Patogeneza astmy oskrzelowej*. W: Choroby alergiczne i astma, red.: Małolepszy J. Volumed s.c., Wrocław 1996, Wyd. I.
62. Marom Z., Shelhamer J.H., Bach M.K., Morton D.R., Kaliner M.: *Slow-reacting substances, leukotrienes LTC₄ and LTD₄, increase the release of mucus from human airways in vitro*. Am. Rev. Respir. Dis., 1982; 126: 449-451.
63. May A., Weber A., Gall H., Kaufmann R., Zollner T.M.: *Means of increasing sensitivity of an in vitro diagnosis test for aspirin intolerance*. Clin. Exp. Allergy, 1999; 29: 1402-1411.
64. Mewes T., Riechelmann H., Klimek L.: *Increased in vitro cysteinyl leukotriene release from blood leukocytes in patients with asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance*. Allergy, 1996; 51: 506-510.
65. Monahan J., Siegel N., Keith R., Caparon M., Christine L., Compton R., Cusik S., Hirsch J., Huynh M., Devine C., Polazzi J., Rangwala S., Tsai B., Portanova J.: *Attenuation of IL-5-mediated signal transduction, eosinophil survival, and inflammatory mediator release by a soluble human IL-5 receptor*. J. Immunol., 1997; 159: 4024-4034.
66. Namovic M.T., Walsh R.E., Goodfellow C., Harris R.R., Carter G.W., Bell R.L.: *Pharmacological modulation of eosinophil influx into the lungs of Brown Norway rats*. Eur. J. Pharmacol., 1996; 315: 81-88.

67. Nasser S.M., Christie P.E., Pfister R., Sousa A.R., Walls A., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: *Effect of endobronchial aspirin challenge on inflammatory cells in bronchial biopsy samples from aspirin-sensitive asthmatic subjects*. Thorax, 1996; 51: 64-70.
68. Nasser S.M., Pfister R., Christie P.E., Sousa A.R., Barker J., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: *Inflammatory cell populations in bronchial biopsies from aspirin-sensitive asthmatic subjects*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 153: 90-96.
69. Noon L.: *Prophylactic inoculation against hay fever*. Lancet, 1911; 1: 1572-1579.
70. Oosaki R., Mizushima Y., Mita H., Shida T., Akiyama K., Kobayashi M.: *Urinary leukotriene E₄ and 11-dehydrothromboxane B₂ in patients with aspirin-sensitive asthma*. Allergy, 1997; 52: 470-473.
71. O'Sullivan S., Roquet A., Dahlén B., Dahlén S., Kumlin M.: *Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions*. Clin. Exp. Allergy, 1998; 28: 1332-1339.
72. Penrose J.F., Spector J., Baldasaro M., Xu Kongyi, Boyce J., Arm J.P., Austen K.F., Lam B.K.: *Molecular cloning of the gene for human leukotriene C₄ synthase*. J. Biol. Chemistry, 1996; 271: 11356-11361.
73. Penrose J.F., Spector J., Lam B.K., Friend D.S., Xu K., Jack R.M., Austen K.F.: *Purification of human lung leukotriene C₄ synthase and preparation of a polyclonal antibody*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1995; 152: 283-289.
74. Picado C., Fernandez-Morata J.C., Juan M., Roca-Ferrer J., Fuentes M., Xaubet A., Mullol J.: *Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirin-sensitive asthmatics*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999; 160: 291-296.
75. Pierzchalska M., Mastalerz L., Sanak M., Zazula M., Szczeklik A.: *A moderate and unspecific release of cysteinyl-leukotrienes by aspirin from peripheral blood leukocytes precludes its value for aspirin-sensitivity testing in asthma*. Clin. Exp. Allergy, (w druku).
76. Raghuprasad P.K.: *A rapid simple method of basophil purification by density centrifugation on Percoll*. J. Immunol., 1982; 129: 2128-2133.
77. Robinson D.S., Damia R., Zeibecoglou K., Molet S., North J., Yamada T., Barry-Kay A., Hamid Q.: *CD34⁺/IL-5R α mRNA⁺ cells in the bronchial mucosa in asthma: evidence for airway eosinophil progenitors*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1999; 20: 9-13.
78. Robinson D.S., Rankin S.M., Gregory B., Hamid Q., Kay A.B., Tavernier J.: *IL-5R α is up-regulated by IL-5 and IL-9 during eosinophil development, and CD34/IL-*

- 5R α cells can be detected in the airway in asthma.* Eosinophil 1999 (materiały zjazdowe), Repro Ekonomikum; Upsalla 1999: 23-25.
79. Rogala B., Gumprecht J., Gawlik R., Strojek K.: *Platelet aggregation in IgE-mediated allergy with elevated soluble Fc epsilon RII/CD23 level.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 1995; 5: 161-165.
80. Rothenberg M.E.: *Eosinophilia.* New Engl. J. Med., 1998; 338: 1592-1600.
81. Sala A., Zarini S., Folco G., Murphy R.C., Henson P.M.: *Differential metabolism of exogenous and endogenous arachidonic acid in human neutrophils.* J. Biol. Chem., 1999; 274: 28264-28269.
82. Sampson A.P.: *The leukotrienes: mediators of chronic inflammation in asthma.* Clin. Exp. Allergy, 1996; 26: 995-1004.
83. Samter M., Beers R.F.: *Intolerance to aspirin: clinical studies and consideration of its pathogenesis.* Ann. Intern. Med., 1968; 68: 975-983.
84. Samuelsson B.: *The leukotrienes: a new group of biological active compounds including SRS-A.* Trends in Pharmacological Sciences, 1980; 227.
85. Sanak M., Pierzchalska M., Bazan-Socha S., Szczeklik A.: *Enhanced expression of the leukotriene C₄ synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., (w druku).
86. Sanak M.: *Podstawy medycyny molekularnej, Odcinek 3: Diagnostyka molekularna-łańcuchowa reakcja odkryć.* Med. Prakt., 1998; 85: 152-159.
87. Sanak M.: *Podstawy medycyny molekularnej, Odcinek 9: Zapalenie, Cz. II - autakoidy.* Med. Prakt., 1999; 97: 151-158.
88. Sanak M., Simon H.-U., Szczeklik A.: *Leukotriene C₄ synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma.* Lancet, 1997; 350: 1599-1600.
89. Sano A., Munoz N.M., Sano H., Choi J., Zhu X., Jacobs B., Leff A.R.: *Inhibition of cPLA₂ translocation and leukotriene C₄ secretion by fluticasone propionate in exogenously activated human eosinophils.* Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999; 159: 1903-1909.
90. Scalia R., Gefen J., Petasis N.A., Serhan C.N., Lefler A.M.: *Lipoxin A₄ stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997; 94: 9967-9972.
91. Schafer D., Schmid M., Gode U.C., Baenkler H.W.: *Dynamics of eicosanoids in peripheral blood cells during bronchial provocation in aspirin-intolerant asthmatics.* Eur. Respir. J., 1999; 13: 638-646.

92. Sedgwick J.B., Geiger K.M., Busse W.W.: *Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma*. Am. Rev. Respir. Dis., 1990; 142: 120-125.
93. Sehmi R., Wardlaw A.J., Cromwell O., Kurihara K., Waltmann P., Kay A.B.: *Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects*. Blood, 1992; 79: 2952-2959.
94. Sehmi R., Wood L.J., Watson R., Foley R., Hamid Q., O'Byrne P.M., Denburg J.A.: *Allergen-induced increases in IL-5R α subunit expression on bone-marrow derived CD34+ cells from asthmatic subjects*. J. Clin. Invest., 1997; 100: 2466-2475.
95. Serio K.J., Hodulik C.R., Bigdy T.D.: *Identification of a novel transcriptional regulatory element important in the constitutive expression of the LTC₄ synthase gene in the monocyte-like cell line, THP-1*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999; Suppl (materiały konferencyjne): A 334.
96. Sestini P., Armetti L., Gambaro G., Pieroni M.G., Refini R.M., Sala A., Vaghi A., Folco G.C., Bianco S., Robuschi M.: *Inhaled PGE₂ prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE₄ excretion in aspirin-sensitive asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 153: 572-575.
97. Shaw R.J., Cromwell O., Kay A.B.: *Preferential generation of leukotriene C₄ by human eosinophils*. Clin. Exp. Immunol., 1984; 56: 716-722.
98. Shi H.-Z., Xiao Ch.-Q., Zhong D., Qin S.-M., Liu Y. i wsp.: *Effect of inhaled Interleukine-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998; 157: 204-209.
99. Simon H.-U., Alam R.: *Regulation of eosinophil apoptosis: transduction of survival and death signals*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1999; 118: 7-14.
100. Simon H.-U.: *Regulation of apoptosis in diseases associated with eosinophilia*. Eosinophil 1999 (materiały zjazdowe), Repro Ekonomikum; Uppsala 1999: 34.
101. Sladek K., Dworski R., Soja J., Sheller J.R., Niżankowska E., Oates J.A., Szczeklik A.: *Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1994; 149: 940-946.
102. Sladek K., Szczeklik A.: *Cysteinyl leukotriene overproduction and mast cell activation in aspirin-provoked bronchospasm in asthma*. Eur. Respir. J., 1993; 6: 391-399.
103. Sokół-Misiak W.: *Receptory jądrowe*. W: Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja, red.: Nowak J.Z., Zawilska J.B. PWN, Warszawa 1997.

-
104. Soter N.A., Lewis R.A., Corey E.J., Austen K.F.: *Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄, and LTB₄) in human skin*. J. Invest. Dermatol., 1983; 80: 115-119.
105. Sousa A.R., Lams B.F., Pfister R., Christie P.E., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: *Expression of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aspirin-sensitive and non-aspirin sensitive asthmatic airways*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997; 156: 1384-1389.
106. Sousa A.R., Pfister R., Christie P.E., Lane S.J., Nasser S.M., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: *Enhanced expression of cyclooxygenase isoenzyme 2 (COX-2) in asthmatic airways and its cellular distribution in aspirin-sensitive asthma*. Thorax, 1997; 52: 940-945.
107. Spangenberg P., Redlich H., Bergmann I., Losche W., Gotzrath M., Kehrel B.: *The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes*. Thromb. Haemost., 1993; 70: 514-521.
108. Szczeklik A., Gryglewski R.J., Czerniawska-Mysik G.: *Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis to asthma attacks in aspirin-sensitive patients*. Brit. Med. J., 1975; 1: 67-69.
109. Szczeklik A., Mastalerz L., Nizankowska E., Ćmiel A.: *Protective and bronchodilator effects of prostaglandin E and salbutamol in aspirin-induced asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 153: 567-571.
110. Szczeklik A.: *Mechanism of aspirin-induced asthma*. Allergy, 1997; 52: 613-619.
111. Szczeklik A.: *Mechanisms of aspirin-induced asthma*. W: Lung Biology in Health and Disease. Eicosanoids, Aspirin and Asthma, Vol. 114, red.: Szczeklik A., Gryglewski R., Vane J. Marcel Dekker; New York, Basel, Hong Kong 1998.
112. Szczeklik A., Nizankowska E., Bochenek G., Radwan J., Nagraba K., Świerczyńska M., Mejza F., Gielicz A.: *Regulatory role of COX products in asthma*. Eicosanoids 2000, 8-th Symposium of Jagiellonian Medical Research Centre, (materiały zjazdowe).
113. Szczeklik A., Sanak M., Nizankowska E. i wsp.: *Leukotriene C₄ synthase genetic polymorphism directs urinary cysteinyl-leukotriene response to aspirin challenge in asthma*. Allergy, 1998; Suppl, Abstracts of XVII Congress of EAACI.

114. Szczeklik A., Sladek K., Dworski R., Nizankowska E., Soja J., Sheller J., Oates J.: *Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin sensitive asthmatics*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 154: 1608-1614.
115. Szczeklik A.; Stevenson D.D.: *Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management*. J. Allergy Clin. Immunol., 1999; 104: 5-13.
116. Takafuji S., Bischoff S.C., De Weck A.L., Dahinden C.A.: *IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C₄ in response to soluble agonists*. J. Immunology, 1991; 147: 3855-3861.
117. Takafuji S., Tadokoro K., Ito K., Dahinden C.A.: *Effects of physiologic soluble agonists on leukotriene C₄ production and degranulation by human eosinophils*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1995; 108 (Suppl 1): 36-38.
118. Takano T., Fiore S., Maddox J.F., Brady H.R., Petasis N.A., Serhan C.N.: *Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors*. J. Exp. Med., 1997; 185: 1693-1704.
119. Taki F., Suzuki R., Torii K. i wsp.: *Reduction of the severity of bronchial hyperresponsiveness by the novel leukotriene antagonist 4-oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran hemihydrate*. Arzneimittelforschung, 1994; 44: 330-333.
120. Taniguchi N., Mita H., Saito H., Yui Y., Kajita T., Shida T.: *Increased generation of leukotriene C₄ from eosinophils in asthmatic patients*. Allergy, 1985; 40: 571-573.
121. Tavernier J., Tuypens T., Plaetinck G., Verhee A., Fiers W., Devos R.: *Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor alpha subunit*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89: 7041-7045.
122. Temann U.A., Geba G.P., Rankin J.A., Flavell R.A.: *Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia and bronchial hyperresponsiveness*. J. Exp. Med., 1998; 188: 1307-1320.
123. Tenisiwood M., Taillefer D., Lakins J., Guenette R., Mooibroek M., Daehlin L., Welsh J.: *Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues*. W: Apoptosis II: The Molecular Basis of Apoptosis in Disease. Current Communications in Cell and Molecular Biology (No. 8), red.: Tomei L.D., Cope F.O. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1994.

-
124. Tenor H., Hatzelmann A., Church M.K., Schudt C., Shute J.K.: *Effects of theophylline and rolipram on leukotriene C₄ (LTC₄) synthesis and chemotaxis of human eosinophils from normal and atopic subjects*. Brit. J. Pharmacol., 1996; 118: 1727-1735.
125. Tornhamre S., Edenius C., Lindgren J.: *Receptor-mediated regulation of leukotriene C₄ synthase activity in human platelets*. Eur. J. Biochem., 1995; 234: 513-520.
126. Underwood D.C., Osborn R.R., Newsholme S.J., Torphy T.J., Hay D.W.: *Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D administration in the guinea pig: modulation by the LTD₄ receptor antagonist, pranlukast, or a interleukin-5 monoclonal antibody*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1996; 154: 850-857.
127. Upham J.W., Hayes L.M., Lundahl J., Sehmi R., Denburg J.A.: *Reduced expression of hemopoietic cytokine receptor on cord blood progenitor cells in neonates at risk for atopy*. J. Allergy Clin. Immunol., 1999; 104: 370-375.
128. Van der Bruggen T., Koenderman L.: *Signal transduction in eosinophils*. Clin. Exper. Allergy, 1996; 26: 880-891.
129. Venge P.: *The eosinophil*. W: Advances in Allergology and Clinical Immunology, red.: Godart P., Bosquet J., Michel F.B. The Parthenon Publishing Groups, Park Ridge 1992.
130. Von Franke.: *Vergiftungserscheinungen nach Aspirin*. Munch. Med. Wochenschr., 1903: 1299-1300.
131. Warchoł J.: *Receptory komórkowe. Rola jonów Ca⁺² w powstawaniu odpowiedzi komórki wywołanej przez receptory błonowe*. W: Podstawy cytofizjologii, red.: Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoł J. PWN, Warszawa 1985, Wyd. I.
132. Wardlaw A.J., Walsh G.M., Symon F.A.: *Mechanisms of eosinophil and basophil migration*. Allergy, 1994; 49: 797-807.
133. Weller P.F., Bubley G.J.: *The idiopathic hypereosinophilic syndrome*. Blood, 1994; 83: 2759-2779.
134. Weller P.F.: *The immunobiology of eosinophils*. New Engl. J. Med., 1991; 324: 1110-1118.
135. Welsch D.J., Creely D.P., Hauser S., Mathis K., Krivi G., Isakson P.C.: *Molecular cloning and expression of human leukotriene-C₄ synthase*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1994; 91: 9745-9749.

-
136. Woolcock A.J., Peat J.K.: *Definicja, klasyfikacja, epidemiologia i czynniki ryzyka astmy oskrzelowej*. W: Astma oskrzelowa; Vademecum, red.: O'Byrne P., Thomson N. α-medica press, Bielsko-Biała 1995, Wyd. I.
137. Yamamoto H., Nagata M., Kuramitsu K., Tabe K., Kiuchi H., Sakamoto Y., Yamamoto K., Dohi Y.: *Inhibition of analgesic-induced asthma by leukotriene receptor antagonist ONO-1078*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1994; 150: 254-257.
138. Yamamoto H., Nagata M., Tabe K., Kimura I., Kiuchi H., Sakamoto Y., Yamamoto K., Dohi Y.: *The evidence of platelet activation in bronchial asthma* J. Allergy Clin. Immunol., 1993; 91: 79-87.
139. Yin M.-J., Yamamoto Y., Gaynor R.B.: *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β* . Nature, 1998; 396: 77-80.
140. Zipursky A., Bow E., Seshadri R.S., Brown E.J.: *Leukocyte density and volume in normal subjects and in patients with acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1976; 48: 361-371.