

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Jacek Faber

**OPRACOWANIE METODYKI OZNACZANIA
LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH
W MOCZU Z ZASTOSOWANIEM
SPEKTROMETRII MAS**

Praca doktorska

Promotor: *Prof. dr hab. med. Marek Sanak*

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJ
Kierownik Katedry: *Prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik*

Kraków, 2008

A mnie los pobłogosławił obfitością wujów i stryjów. To oni posłużyli mi za wzory, pomogli formować własne wyobrażenie o tym, kim powinien być mężczyzna.

William Wharton „Historie rodzinne”

Dla wujka Czesława.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Promotorowi, Panu Profesorowi Markowi Sanakowi, Kierownikowi Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej UJ za wszelką pomoc okazaną w trakcie realizacji tej pracy, cierpliwość, cenne uwagi oraz dyskusje na najróżniejsze tematy.

Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikowi, Kierownikowi II Katedry Chorób Wewnętrznych, pierwszemu promotorowi, za umożliwienie realizacji projektu badawczego.

Ani Gielicz, doktorowi Krzysztofowi Nagrabie za „chemiczne” wsparcie, interesujące uwagi, tlenek glinu.

Hanni Pluteckiej za pomoc w badaniach ELISA, oraz Sylwii, Gosi, Marcinowi i Bogusiowi za ciepłe przyjęcie w zespole.

Asi, Kasi, Agnieszce i Staszce za ciekawe rozmowy przy herbacie i ciastkach oraz cierpliwe znoszenie hałasu w pokoju obok.

Markowi Nodze za cenne uwagi i sugestie, niekończącą się historię z formatami, Ani Pasiece za edycję tekstu.

Klimkowi, Starym Bukłakom oraz tym wszystkim, którzy w różnoraki sposób wspierali mnie w trakcie studiów.

Rodzicom, Ani, Basi.

1. WSTĘP	5
1.1. SYNTEZA LEUKOTRIENÓW.....	5
1.2. FOSFOLIPAZA A _{2α}	8
1.3. FLAP I SYNTAZA LTC ₄	8
1.3.1. FLAP.....	9
1.3.2. Syntaza LTC ₄	9
1.4. 5-LIPOKSYGENAZA.....	11
1.4.1. Lokalizacja 5-LO w komórce.....	12
1.4.2. Aktywacja i regulacja aktywności 5-LO.....	12
1.4.3. Mechanizm działania 5-LO.....	13
1.5. ŹRÓDŁA LEUKOTRIENÓW.....	15
1.5.1. Pierwotne źródła komórkowe leukotrienów.....	16
1.5.2. Wtórne źródła komórkowe leukotrienów.....	16
1.6. EOKSYNY.....	17
1.7. RECEPTORY LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH.....	18
1.7.1. Receptor typu 1.....	18
1.7.2. Receptor typu 2.....	19
1.7.3. Receptor GPR17.....	19
1.7.4. Powinowactwo leukotrienów cysteinylowych do receptorów.....	20
1.8. FIZJOLOGICZNE DZIAŁANIE LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH.....	20
1.9. SUBSTANCJE CHEMICZNE O DZIAŁANIU ANTYLEUKOTRIENOWYM.....	21
1.9.1. Inhibitory 5-lipoksygenazy.....	21
1.9.1.1. Inhibitory 5-LO blokujące redukcję jonu żelaza.....	22
1.9.1.2. Inhibitory 5-LO helatujące jon żelaza.....	23
1.9.1.3. Inhibitory 5-LO - kompetytyory kwasu arachidonowego.....	24
1.9.1.4. Inhibitory 5-lipoksygenazy o mieszanym lub nie znanym mechanizmie działania.....	24
1.9.2. Inhibitory FLAP.....	25
1.9.3. Antagonista receptorów leukotrienu B ₄	26
1.9.4. Antagoniści receptorów leukotrienów cysteinylowych.....	26
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	28
3. MATERIAŁY I METODY	29
3.1. OPTIMALIZACJA SPRZĘTU I METODY OZNACZANIA ULTE ₄	29
3.1.1. Optymalizacja spektrometru masowego.....	29
3.1.2. Optymalizacja chromatografii cieczowej.....	31
3.2. GRUPY BADANYCH.....	33
3.3. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK.....	34
3.4. IZOLACJA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH Z MOCZU.....	34
3.5. OZNACZANIE LEUKOTRIENU E ₄ W MOCZU PRZY UŻYCIU KOMERCYJNEGO ZESTAWU ELISA.....	36
3.6. OZNACZANIE KREATYNINY W MOCZU.....	38
3.7. PORÓWNANIE METOD OZNACZANIA LTE ₄ W MOCZU: LC/MS I ELISA.....	38
3.8. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	40

4. WYNIKI BADAŃ	41
4.1. ZALEŻNOŚĆ SYGNAŁU OD ILOŚCI LTE ₄ ANALIZOWANEGO W UKŁADZIE LC/MS....	41
4.1.1. Analiza powtarzalności oznaczeń	44
4.2. WYNIKI OZNACZEŃ ZNANYCH ILOŚCI LTE ₄ METODĄ LC/MS I ELISA	46
4.2.1. Oznaczenia LTE ₄ rozpuszczonego w wodzie	46
4.2.2. Oznaczenia LTE ₄ rozpuszczonego w moczu	47
4.3. WYNIKI OZNACZEŃ uLTE ₄ METODĄ LC/MS W GRUPIE OSÓB ZDROWYCH.....	50
4.3. WYNIKI OZNACZEŃ uLTE ₄ METODĄ LC/MS W GRUPIE PACJENTÓW PODDANYCH ANGIOPLASTYCE SERCA	54
4.4. WYNIKI OZNACZEŃ uLTE ₄ METODĄ LC/MS W GRUPIE CHORYCH NA ASTMĘ	57
4.4. PORÓWNANIE OZNACZEŃ LTE ₄ W MOCZU METODAMI LC/MS I ELISA.....	58
5. DYSKUSJA WYNIKÓW	61
5.1. WALIDACJA METODY OZNACZANIA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH Z WYKORZYSTANIEM SPEKTROMETRII MASOWEJ I PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH CYSTEINYL-LEUKOTRIENE AFFINITY SORBENT	61
5.1.1. Zakres oznaczalności, próg detekcji	61
5.1.2. Specyficzność oznaczeń.....	61
5.1.3. Precyzja i dokładność oznaczeń.....	62
5.2. PORÓWNANIE POMIARÓW LTE ₄ W MOCZU METODAMI LC/MS I ELISA	65
5.3. PORÓWNANIE UZYSKANYCH WYNIKÓW Z DANymi LITERATUROWymi.....	65
5.4. MOŻLIWOŚCI MODYFIKACJI METODY LC/MS	69
6. WNIOSKI	70
7. STRESZCZENIE	71
8. SUMMARY	74
12. SPIS TABEL	78
12. SPIS WYKRESÓW	79
13. SPIS RYSUNKÓW	80
14. PIŚMIENNICTWO	82

1. WSTĘP

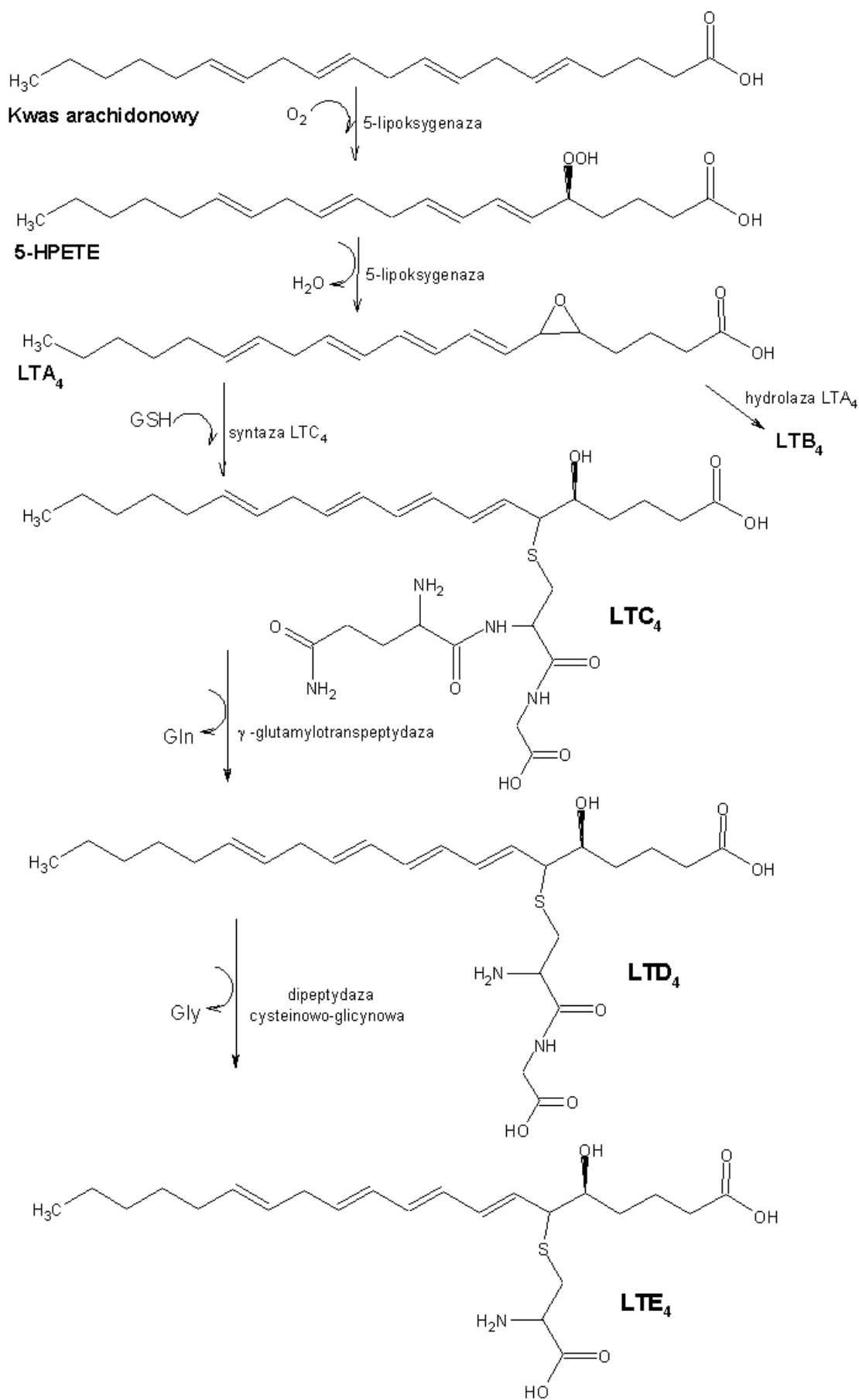
1.1. Synteza leukotrienów

Leukotrieny należą, obok prostaglandyn i tromboksanu A_2 , do grupy biologicznie czynnych pochodnych kwasu arachidonowego (AA) - 20-węglowego nienasyconego kwasu tłuszczowego współtworzącego fosfolipidy błon komórkowych.

Pierwszym etapem biosyntezy leukotrienów cysteinylowych (cysLTs), po zadziałaniu odpowiedniego bodźca (reakcja przeciwciało-antygen, bodziec zapalny, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia), jest powstanie na powierzchni błony okołojądrowej kompleksu enzymatycznego zbudowanego z cytozolowej fosfolipazy $A_{2\alpha}$ i 5-lipoksygenazy (5-LO) wskutek ich przemieszczenia z cytozolu [1-3]. 5-LO jest aktywowana przez białko FLAP (*5-lipoxygenase activating protein*) [4], będące integralnym składnikiem błony jądrowej. Nadto, aktywacja 5-LO wymaga obecności ATP i jonów wapnia.

Dzięki aktywności hydrolitycznej, fosfolipaza $A_{2\alpha}$ uwalnia kwas arachidonowy z kompleksu fosfolipidowego [5], przez co substrat ten może zostać dostarczony przez FLAP i zaprezentowany 5-LO.

Pod wpływem 5-lipoksygenazy [6] następuje dwuetapowe utlenienie kwasu arachidonowego. W pierwszym etapie dochodzi do addycji cząsteczki tlenu w pozycji C5 arachidonianu z równoczesnym przesunięciem protonu z pozycji C7 do powstającej w ten sposób grupy hydroperoksydowej (Rysunek 1). Migracja wiązania podwójnego tworzy układ dienowy. Tak powstaje kwas 5(S)-hydroperoksy-6-trans-8,11,14-cis-eikozatetraenowy (5-HPETE). Jest on niestabilnym związkiem ulegającym dalszej przemianie pod wpływem 5-LO do nietrwałej epoksydowej pochodnej - leukotrienu A_4 (LTA_4 , kwas 5(S)5,6-oksydo-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eikozatetraenowy) [7]. W tym etapie dochodzi do odczepienia wodoru z pozycji C10 i przesunięcia się o jedną pozycję układu dwóch wiązań podwójnych w wyniku czego powstaje trien. Alternatywny szlak przemiany 5-HPETE zachodzi pod wpływem peroksydazy glutationowej (EC 1.11.1.9) do kwasu 5-hydroksyeikozatetraenowego (5-HETE).



Rysunek 1. Szlak metaboliczny leukotrienów cisteinylowych.

Tak wytworzony LTA₄ pomimo, że jako substancja nietrwała charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania, może być na zasadzie transportu transcelularnego przenoszony do innych komórek, a tam podlegać dalszemu przekształcaniu. Może w ten sposób następować synteza leukotrienów w tzw. wtórnych źródłach komórkowych tj. w komórkach, które nie posiadają 5-LO np. komórki śródbłonna, płytki krwi, erytrocyty czy limfocyty T.

Dalszy metabolizm LTA₄ może przebiegać dwukierunkowo, w zależności od rodzaju komórki. Pod wpływem występującej w cytozolu hydrolazy LTA₄ (EC 3.3.2.6) [8] powstaje leukotrien B₄ (LTB₄, kwas 5(S),12(R)-dihydroksy-6,8,10,14-(Z,E,E,Z)-eikozatetraenowy) [9]. Hydrolaza LTA₄ przeprowadza stereospecyficzną addycję cząsteczki wody w pozycji C12 wraz z przesunięciem układu trzech podwójnych wiązań. Ten rodzaj przekształcenia LTA₄ w LTB₄ następuje np. w granulocytach obojętnochłonnych [10].

LTA₄ może ulegać także nieenzymatycznej hydrolizie do Δ^6 -trans-LTB₄ lub kwasu 5,6-dihydroksyeikozatetraenowego (5,6-diHETE) [11].

W niektórych komórkach, takich jak komórki tuczne, granulocyty zasadochłonne i kwasochłonne, obecny jest enzym syntaza leukotrienu C₄, który również znajduje się w błonie okołojądrowej. Ta S-transferaza glutationu sprzęga LTA₄ z glutationem-reaktywne wiązanie epoksydowe zostaje zerwane. W pozycji C6 tworzy się wiązanie tiolowe z atomem siarki reszty kwasu glutationowego z równoczesną redukcją tlenu w pozycji C5, przez co powstaje bardzo aktywny biologicznie leukotrien C₄ (LTC₄, kwas 5(S)-hydroksy-6(R)-glutationylo-7,9,-11,14-(E,E,Z,Z)-eikozatetraenowy) [12].

Uwalnianie LTB₄ i LTC₄ z cytoplazmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej odbywa się przy udziale swoistych przez błonowych transporterów [13]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej LTC₄ ulega przemianie do leukotrienu D₄ (LTD₄, kwas 5(S)-hydroksy-6(R)-S-cysteinylglicyno-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eikozatetraenowy) na drodze odszczepienia kwasu glutationowego przez γ -glutamylotranspeptydazę (EC 2.3.2.2). W kolejnym etapie dipeptydaza cysteinowo-glicynowa [14] odłączając od LTD₄ glicynę, doprowadza do powstania leukotrienu E₄ (LTE₄, kwas 5(S)-hydroksy-6(R)-S-cysteinyl-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eikozatetraenowy).

Najbardziej stabilny z trójki leukotrienów cysteinylowych: C₄, D₄ i E₄ jest LTE₄. W formie nie zmienionej lub jako N-acetylo-LTE₄ może być wydalany przez wątrobę

oraz nerki. Szacowane jest, że w moczu wolny LTE_4 stanowi około 8% ogólnoustrojowej produkcji tego mediatora [15].

1.2. Fosfolipaza $\text{A}_{2\alpha}$

Fosfolipaza $\text{A}_{2\alpha}$ - cPLA₂ (EC 3.1.1.4) należy do grupy wewnątrzkomórkowych fosfolipaz obecnych w cytozolu. Złożona z 721 aminokwasów ma masę 82016Da [16]. Jej zadaniem jest uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów przez katalizowanie reakcji hydrolizy w pozycji sn-2 (hydroliza prowadząca do uwolnienia reszt acylowych: C(=O)R) [17].

W trakcie przemian potranslacyjnych wiele reszt aminokwasowych fosfolipazy $\text{A}_{2\alpha}$ (seryny 434, 435, 437, 505, 727, 729) podlega fosforylacji katalizowanymi przez kinazy aktywowane mitogenami (MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*) [18].

Ważnym elementem struktury jest domena C2 zawierająca centrum katalityczne enzymu. Cechą charakterystyczną domeny C2 jest możliwość specyficznego wiązania dwóch jonów wapnia przez jedną cząsteczkę enzymu [19, 20]. Po wzroście stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych [21] i ich związaniu przez domenę C2, następują zmiany w strukturze umożliwiające wiązanie się enzymu z błonami. Aktywację enzymu poza jonami Ca^{2+} powodować mogą również jony Mg^{2+} . Najprawdopodobniej domena C2 odpowiada także za migrację fosfolipazy z cytozolu w kierunku aparatu Golgiego, powierzchni błony okołojądrowej [22]. Domena C2 jest źródłem analogicznych procesów w przypadku 5-lipoksygenazy.

1.3. FLAP i syntaza LTC_4

Białko FLAP oraz syntaza LTC_4 należą do dużej grupy białek błonowych uczestniczących w metabolizmie eikozanoidów i glutationu – MAPEG (*Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*). Do grupy tej należą także mikrosomalne transferazy glutationu (MGST-1, MGST-2, MGST-3; *microsomal glutathione transferases*) oraz syntaza prostaglandyny E [23].

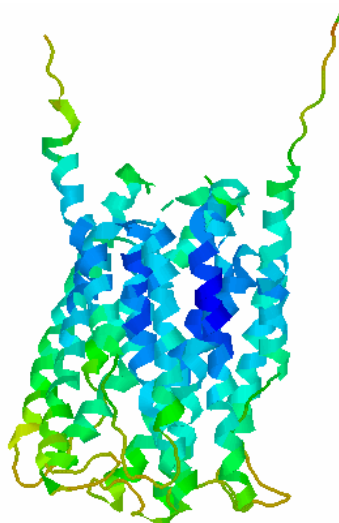
W obrębie MAPEG ludzka syntaza LTC_4 , białko FLAP oraz MGST2 tworzą podgrupę. Białka te mają zbliżone budowy. Powtarzające się elementy to min. struktura czwartorzędowa (z reguły tworzą one dimery, trimery). Każdy monomer posiada

transbłonowe helisy oraz kilka domen i motywów strukturalnych służących stabilizacji między podjednostkami, jak również oddziaływaniu z ligandami [24].

Homologia sekwencji między FLAP i syntaza LTC₄ wynosi 50% [25], między FLAP a syntazą PGE 33% [26]. Homologia sekwencji przejawia się nie tylko w strukturach różnego rzędu, lecz również w blokowaniu tych trzech białek przez jeden inhibitor MK-886 [26].

1.3.1. FLAP

Jest ono jedynym białkiem uczestniczącym w biosyntezie leukotrienów nie mającym aktywności enzymatycznej. Jego ekspresja następuje tylko w komórkach tworzonych w szpiku kostnym. Z prekursora o 161 aminokwasach tworzona jest forma natywna o 149 aminokwasach i masie 16908Da [27]. FLAP stanowi integralną część błony okołojądrowej. Każdy polipeptyd posiada trzy helisy transbłonowe (Rysunek 2). Jedyną jego funkcją jest selektywny transfer kwasu arachidonowego od fosfolipazy A_{2α} do 5-lipoksygenazy oraz ułatwianie 5-LO dwustopniowej przemiany kwasu arachidonowego: utleniania do 5-HPETE oraz dehydratacji do LTA₄. Dlatego też inhibicja FLAP prawie całkowicie zatrzymuje produkcję leukotrienów [28, 29].

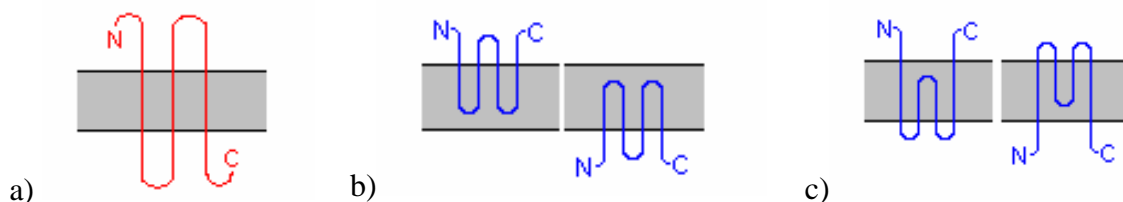


Rysunek 2. Białko FLAP- struktura trimeru [PDB: 2Q7M].

1.3.2. Syntaza LTC₄

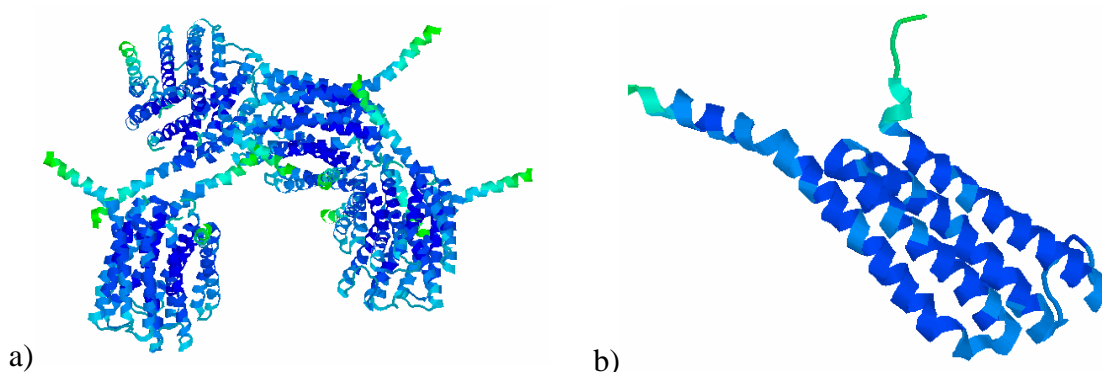
Syntaza LTC₄ (EC 4.4.1.20) złożona jest z 147 aminokwasów (masa 16212Da). Tworzy homodimery umiejscowione w błonie okołojądrowej oraz reticulum

endoplazmatycznym [30]. Najprawdopodobniej fragmenty cząsteczki syntazy LTC₄ obecne są tylko po zewnętrznej stronie błony okołojądrowej (od strony cytozolu) [31], czym różnią się do białka FLAP, którego reszty aminokwasowe umiejscowione są po obu stronach błony (Rysunek 3).



Rysunek 3. Porównanie umiejscowienia białka FLAP i syntazy LTC₄ w błonie okołojądrowej
 a) Białko FLAP. b) Najbardziej prawdopodobne lokalizacje syntazy LTC₄. c) Inne możliwe lokalizacje syntazy LTC₄.

Każdy monomer posiada cztery α -helisy (Rysunek 4), o których w takim przypadku w pełni nie można powiedzieć, że są helisami transbłonowymi. W strukturze wyróżnić można także trzy domeny [32] – hydrofobowe pętle stabilizujące strukturę czwartorzędową, równocześnie dwie z nich są elementami centrum aktywnego enzymu.



Rysunek 4. Struktura syntazy-LTC₄: a) dwa homodimery syntazy LTC₄ [PDB: 2PNO]
 b) Monomer: struktura miejsca aktywnego syntazy, w którym umieszczony jest glutation [PDB: 2UUH].

Zadaniem syntazy jest sprzężenie leukotrienu A₄ z glutationem. Enzym ten, w odróżnieniu od transferaz glutationowych (MGST2 oraz MGST3), nie uczestniczy w dołączaniu GSH do ksenobiotyków [33].

Miejsce aktywne syntazy leukotrienu C₄ umiejscowione jest po zewnętrznej stronie błony okołojądrowej. W przypadku reticulum endoplazmatycznego miejsce to znajduje się po wewnętrznej stronie błony. Dlatego po syntezie LTC₄ transportowany jest do cytoplazmy przez białka błonowe MRP-1 (*membrane protein*) [31]. Przed syntezą w analogiczny sposób importowana jest z cytozolu cząsteczka LTA₄. U myszy

blokada ekspresji białka MRP-1 całkowicie zatrzymuje transport LTC₄ do cytozolu [34].

Dwie z trzech hydrofobowych pętli znajdują się po tej samej stronie błony. Pierwsza pętla jednego monomeru wiąże LTA₄, druga sąsiedniego monomeru glutation [31]. Arginina z pierwszej pętli umożliwia tworzenie tiolanu i jego atak na pozycje C6 leukotrienu A₄, natomiast arginina w pętli drugiego monomeru jest donorem protonu dla tworzącej się w pozycji C5 grupy hydroksylowej [32].

1.4. 5-lipoksygenaza

Ludzka 5-lipoksygenaza (EC 1.13.11.34) jest złożona z 673 aminokwasów i posiada masę 77852Da. Pomimo tego, że białko to wyizolowano i sklonowano już w latach osiemdziesiątych dwudziestego wieku, dotychczas nie udało się rozwiązać jego struktury. Białko to posiada strukturę trzeciorzędową; tworzy tylko monomery. Ludzka 5-LO wykazuje podobieństwo działania oraz budowy z innymi lipoksygenazami, także innych gatunków. Na podstawie rozwiązanej struktury króliczej 15-lipoksygenazy (homologia sekwencji z ludzką 5-LO wynosi 38%) wnioskować można, że w strukturze obecnych jest wiele α -helis, pojedyncze β -struktury, motywy helisa-skręt-helisa oraz motyw β -baryłki będący częścią domeny C2.

Domena C2 znajduje się na N-koncu łańcucha. Podobnie jak w przypadku cytozolowej fosfolipazy A_{2 α} domena ta specyficznie wiąże dwa jony wapnia, umożliwia wiązanie się enzymu błonami [35], jak również odpowiada za ruch 5-LO z cytozolu w kierunku powierzchni błony okołojądrowej najczęściej wspólnie z fosfolipazą A_{2 α} . W eozynofilach zauważono, że przemieszczanie się 5-LO na powierzchni błony okołojądrowej jest sprzężone z uwalnianiem syntazy LTC₄ [37].

Domena C2 pełni funkcję regulatora całego enzymu poprzez swoje zdolności do wiązania jonów wapnia oraz różnych lipidów: lipidów błonowych, glicerydów, fosfatydylocholiny.

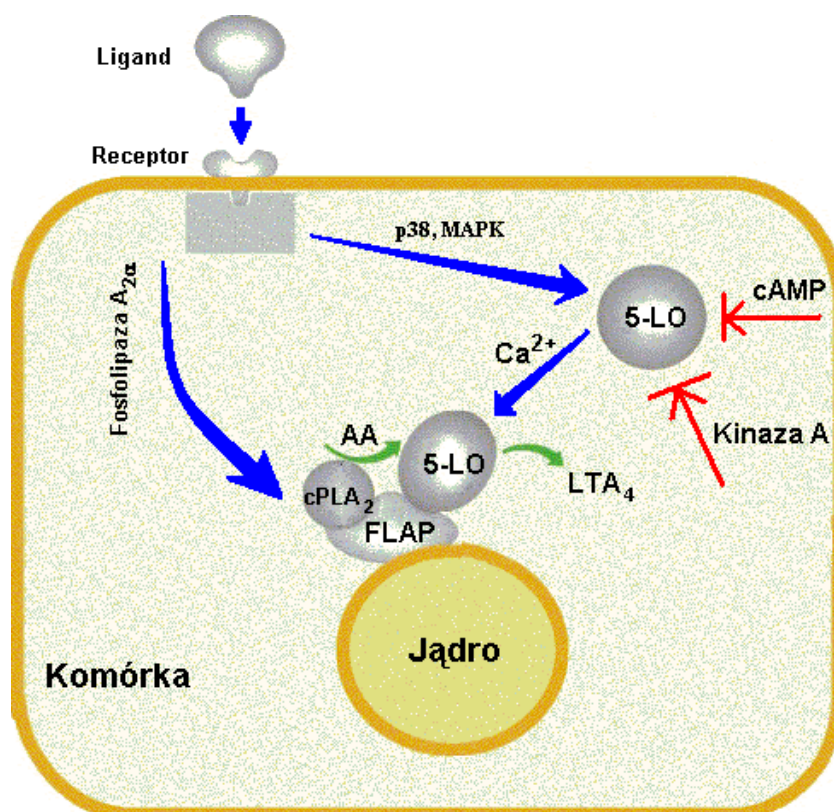
W centrum katalitycznym enzymu znajduje się niehemowy jon żelaza Fe²⁺, zchelatowany przez resztę kwasu asparaginowego (Asn554), trzy histydyny (His367, His372 i His550) oraz N-końcową izoleucynę (Ile673), która jest akceptorem oraz donorem elektronu w trakcie reakcji enzymatycznej. Obecny w centrum katalitycznym jon Fe²⁺, po aktywacji enzymu, zostaje utleniony do jonu Fe³⁺.

1.4.1. Lokalizacja 5-LO w komórce

5-lipoksygenaza umiejscowiona jest w cytozolu oraz nukleoplazmie w zależności od rodzaju komórki [35]. Lokalizacja tego enzymu determinuje miejsce jego aktywności. W neutrofilach cytoplazmatyczna 5-LO katalizuje utlenianie kwasu arachidonowego po zewnętrznej stronie błony okołojądrowej, w odróżnieniu od makrofagów płucnych (pęcherzykowych) czy komórek dendrycznych, w których 5-LO zawarta w nukleoplazmie działa po wewnętrznej stronie błony okołojądrowej [6].

1.4.2. Aktywacja i regulacja aktywności 5-LO

Wewnątrzkomórkowa ekspresja 5-lipoksygenazy jest regulowana przez wolny kwas arachidonowy uwalniany głównie przez fosfolipazę $A_{2\alpha}$. Enzym ten wpływa także na aktywność 5-LO. Schematycznie aktywacje, wpływ różnych czynników na aktywność 5-lipoksygenazy przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Aktywacja, stymulowanie i hamowanie aktywności 5-lipoksygenazy.

In vivo aktywność 5-lipoksygenazy może być regulowana przez jony wapnia, ATP, fosfatydylocholinę, lipidy [38]. Poziom aktywacji 5-LO przez różne czynniki w zależności od rodzaju komórki bywa zmienny. Nie mniej największą moc

w aktywacji 5-lipoksygenazy wykazuje jonofor A23187 dla jonów wapnia. Dla przykładu w neutrofilach „klasyczne” mediatory stanu zapalnego, takie jak: czynnik aktywujący płytki krwi (PAF), fMLP czy LTB₄, nieznacznie oddziałują na aktywność 5-LO [39].

Aktywacja oraz aktywność 5-lipoksygenazy stymulowana jest przez liczne kinazy, poprzez fosforylacje reszt aminokwasowych 5-LO, przede wszystkim seryn: Ser271, Ser523, Ser663 [40].

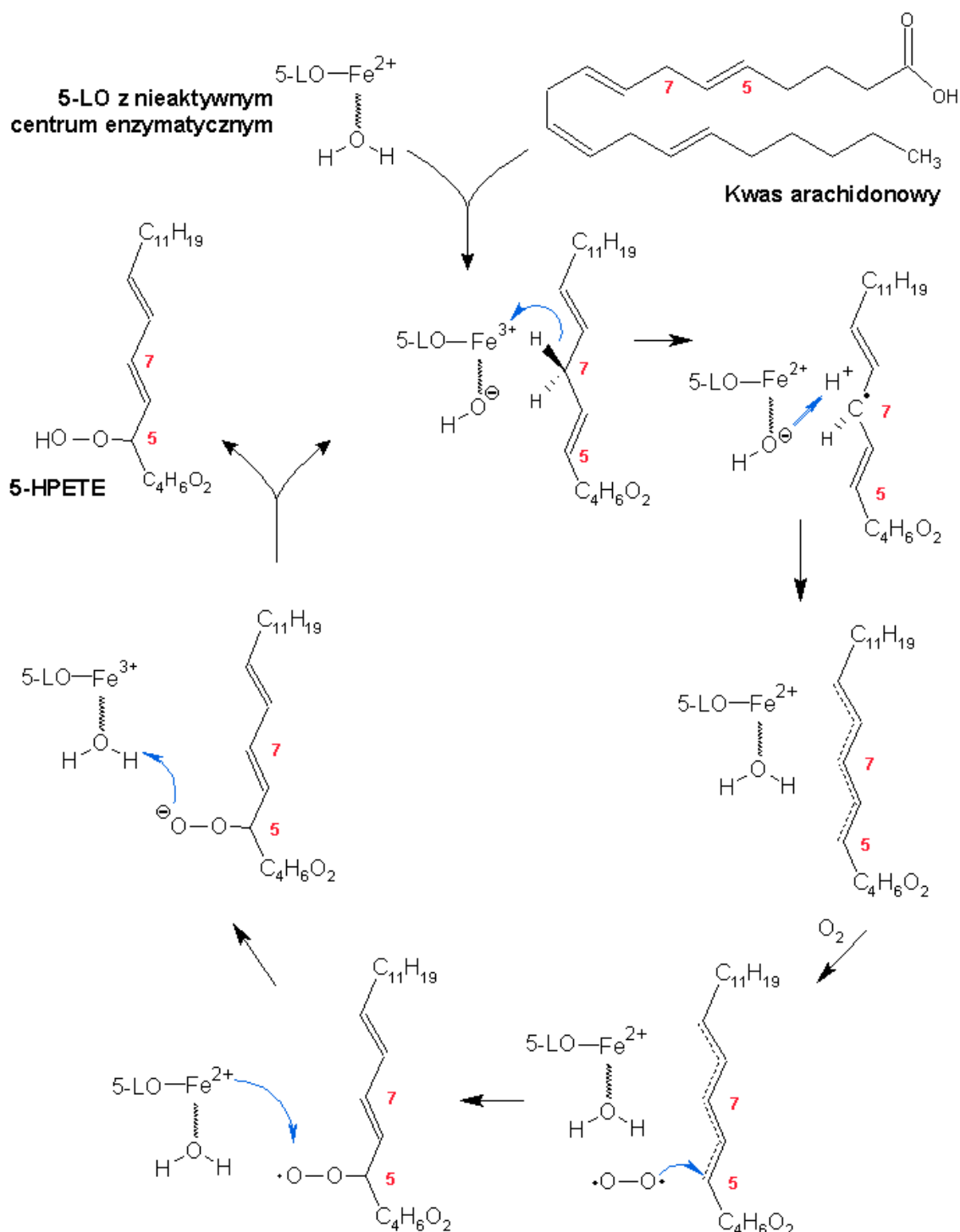
Dzięki fosforylacji Ser271 oraz Ser663, enzym p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) aktywuje 5-LO równolegle z wewnątrzkomórkowymi jonami wapnia, a blokada tej kinazy przez inhibitor skutecznie wpływa na spadek aktywacji 5-lipoksygenazy [41]. W innych przypadkach aktywacja 5-LO przez kinazy ma miejsce, gdy brak jest stymulacji ze strony jonów wapnia.

Kinaza A (PKA - *protein kinase A*) fosforylując serynę 523 istotnie zmniejsza aktywność 5-lipoksygenazy w ludzkich neutrofilach [42]. Seryna ta umiejscowiona jest blisko centrum aktywnego 5-LO, dlatego jej fosforylacja stwarza zawadę steryczną, blokującą dostęp do centrum katalitycznego enzymu. PKA hamuje migrację 5-lipoksygenazy w kierunku błony okołojądrowej [43]; dodatkowo wpływa także na umiejscowienie 5-LO w komórce, blokując jej lokalizację wokół błony okołojądrowej [44].

Innymi czynnikami wpływającymi na produkcję leukotrienów na tym etapie ich biosyntezy jest cAMP oraz peroksydazy. Wzrost stężenia komórkowego cAMP spowalnia działanie 5-LO. Peroksydaza glutationowa redukuje jon żelaza obecny w centrum katalitycznym 5-lipoksygenazy, blokując tym samym jej aktywność.

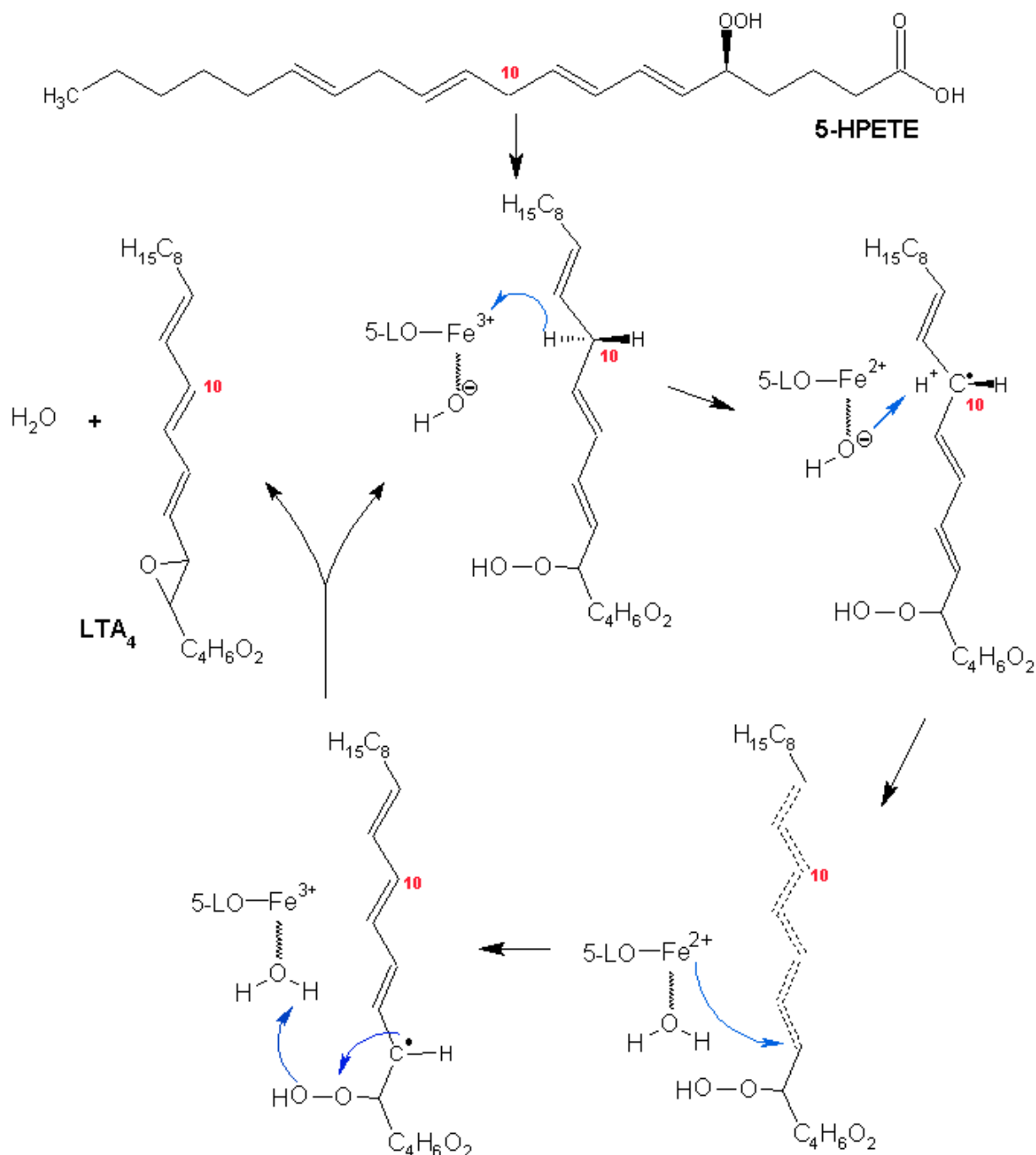
1.4.3. Mechanizm działania 5-LO

Zaproponowane na podstawie wyników modelowania molekularnego [45] centrum aktywne 5-LO po aktywacji zawiera jon żelaza Fe³⁺. W wyniku oderwania protonu od węgla C7 łańcucha kwasu arachidonowego jon Fe³⁺ ulega redukcji do jonu Fe²⁺, a węgiel C7 może utworzyć wiązanie podwójne z węglem C6 (następuje „przeskok” wiązania podwójnego C5=C6) tworząc dien. W tej sytuacji węgiel C5, posiadający wolny elektron, jest w stanie przyłączyć cząsteczkę tlenu. Zwrot protonu związanego przez jon żelaza tworzy grupę hydroperosydową w pozycji C5 (Rysunek 6).



Rysunek 6. Proponowany mechanizm utleniania kwasu arachidonowego do 5-HPETE przez 5-LO (niebieskie strzałki oznaczają zmianę pozycji przez elektron).

W kolejnym cyklu jon Fe³⁺ przejmuje elektron z pozycji C10, co powoduje przesunięcie układu dienowego i utworzenie trienu. Węgiel C6 z wolnym elektronem tworzy wiązanie z tlenem połączonym już z węglem C5, stanowiąc wiązanie epoksydowe. Wyłączona z grupy hydroperoksydowej grupa hydroksylowa tworzy cząsteczkę wody z protonem oddawanym przez jon żelaza (Rysunek 7).



Rysunek 7. Proponowany mechanizm utleniania 5-HPETE do LTA₄ przez 5-LO (niebieskie strzałki oznaczają zmianę pozycji przez elektron).

1.5. Źródła leukotrienów

Leukotrieny wytwarzać mogą tylko te komórki, które zawierają enzymy niezbędne w ich biosyntezie. Jednoczesne występowanie 5-lipoksygenazy oraz białka FLAP ograniczone jest do komórek tworzących w szpiku kostnym. Komórki te, syntetyzujące leukotrieny z kwasu arachidonowego, stanowią tzw. pierwotne źródła

leukotrienów. Inne, mogące metabolizować LTA_4 do LTB_4 lub leukotrienów cysteinylowych, są wtórnymi źródłami.

1.5.1. Pierwotne źródła komórkowe leukotrienów

Komórki te są podstawowym źródłem leukotrienów B_4 i C_4 w organizmie. Zależnie od rodzaju wytwarzają różne ilości i rodzaje leukotrienów. Produkują LTB_4 lub LTC_4 , lecz rzadko oba jednocześnie.

Eozynofile są głównym źródłem leukotrienu C_4 [46], z których mogą być wytwarzane leukotrieny D_4 i E_4 [47]. Jednakże po odpowiedniej stymulacji np. immunologicznej eozynofile mogą produkować LTB_4 . Podobnie mastocyty są w stanie produkować LTB_4 oraz LTC_4 [48], natomiast dojrzałe komórki produkują już tylko leukotrien C_4 [49, 50].

Makrofagi wytwarzające LTB_4 [51, 52] mają także zdolność biosyntezy LTC_4 . Monocyty oraz neutrofile [10] produkują leukotrien B_4 .

Bazofile wytwarzają LTB_4 , jednak po stymulacji swoistym alergenem przechodzą na produkcję leukotrienów cysteinylowych [53].

1.5.2. Wtórne źródła komórkowe leukotrienów

W odniesieniu do komórek będących pierwotnymi źródłami leukotrienów produkcja LTs przez wtórne źródła na drodze biosyntezy transcelularnej jest zdecydowanie mniejsza [54]. Komórki te zawierają hydrolazę LTA_4 bądź syntazę LTC_4 to znaczy, że mogą wytwarzać tylko LTB_4 albo leukotrieny cysteinyłowe. Większość leukotrienu A_4 wykorzystywanego w syntezie transcelularnej pochodzi od neutrofilii.

Erytrocyty zawierające hydrolazę LTA_4 [55] produkują LTB_4 ; ich interakcja z neutrofilami została wykazana już w latach osiemdziesiątych [56]. Między tymi komórkami występuje bardzo ciekawy mechanizm kontroli produkcji leukotrienów. Wysoka zawartość leukotrienu A_4 powoduje blokowanie aktywności hydrolazy poprzez samobójcze hamowanie aktywności enzymatycznej i znaczący spadek LTB_4 produkowanego przez erytrocyty. Zmniejszona ilość LTA_4 pobudza erytrocyty do produkcji LTB_4 , który aktywuje neutrofile do biosyntezy leukotrienu A_4 .

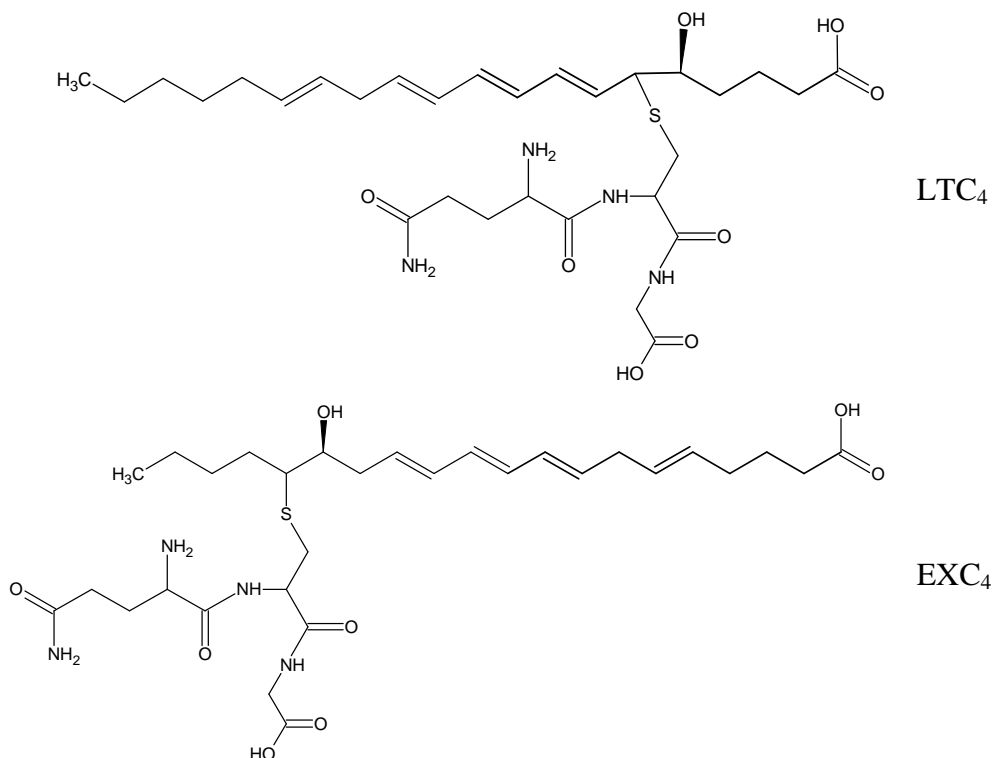
Podobnie komórki nabłonka dróg oddechowych [57] oraz limfocyty T wytwarzają LTB_4 na drodze metabolizmu transcelularnego.

Neutrofile oddziałują także z komórkami śródbłonka [58] oraz płytkami krwi [59], które dzięki posiadaniu syntazy LTC_4 wytwarzają leukotrien C_4 .

1.6. Eoksyny

Na początku tego roku ukazał się artykuł opisujący odkrycie w ludzkich eozynofilah nieznanych dotychczas pochodnych kwasu arachidonowego – eoksyn [60]. Stanowią one analogi leukotrienów cysteinylowych. Również ich biosynteza jest bardzo podobna do produkcji cysLTs.

Alternatywnym szlakiem przemiany kwasu arachidonowego wobec przemiany przez 5-lipoksygenazę oraz cyklooksygenazę jest utlenianie kwasu arachidonowego przy udziale 15-lipoksygenazy do kwasu 15(*S*)-hydroperoxy-eikozatetraenowego [15-HPETE] oraz kwasu 15(*S*)-hydroksy-eikozatetraenowego [15-HETE]. 15-HETE jest podstawowym metabolitem kwasu arachidonowego powstałym w wyniku aktywności enzymatycznej 15-LO [61]. 15-HPETE może ulegać dehydratacji do kwasu 14,15-epoxy-eikozatetraenowego (14,15-LTA₄). Ten analog LTA₄ jest sprzęgany z glutationem w pozycji C14. W ten sposób powstaje 14,15-LTC₄ (EXC₄) (Rysunek 8).



Rysunek 8. Porównanie struktur LTC_4 i EXC_4 .

W czasie inkubacji *in vitro* eozynofili z kwasem arachidonowym ponad produkcję LTC₄ preferowana jest synteza 14,15-LTC₄ (EXC₄), który jest przekształcony do 14,15-LTD₄ (EXD₄) a dalej do 14,15-LTE₄ (EXE₄) [61]. *In vitro* synteza wyłącznie leukotrienów cysteinylowych następuje po aktywacji jonoforu wapniowego, natomiast czynniki prozapalne takie jak PGE₂ oraz IL-5 stymulują produkcję EXC₄, co świadczy o tym, że w tej biosyntezie wykorzystywany jest kwas arachidonowy zawarty w komórce. Obecność EXC₄ została stwierdzona również w mastocytach oraz polipach nosa, i zapalnych komórkach Reed-Sternberga [62].

In vitro eoksyny zwiększają przepuszczalność komórek śródbłonna. Sugeruje to, że również te pochodne kwasu arachidonowego zawiadują przepuszczalnością naczyń, a w mocy działania nieznacznie ustępują LTD₄ oraz LTC₄.

1.7. Receptory leukotrienów cysteinylowych

Dotychczas odkryto i sklonowano dwa ludzkie receptory leukotrienów cysteinylowych: cysLT1R [63, 64] oraz cysLT2R [65]. Ostatnio pojawiły się doniesienia o odkryciu nowego receptora odmiennego od dwójki pozostałych.

1.7.1. Receptor typu 1

CysLT1R występuje w komórkach mięśni gładkich oskrzeli, bazofilach, neutrofilach, monocytach, makrofagach, eozynofilach krwi obwodowej, limfocytach B czy komórkach macierzystych krwi CD34 [66]. Aktywność biologiczna leukotrienów cysteinylowych jest w znacznej części prozapalna - cysLTs powodują zwężanie dróg oddechowych (skurcz mięśni gładkich oskrzeli, zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych (wysięki), chemotaksję eozynofili). Wszystkie wymienione zjawiska są skutkiem pobudzenia receptora typu pierwszego (CysLT1R) [63, 67]. Receptor ten jest również celem działania kilku antagonistów – leków przeciwastmatycznych takich jak: montelukast (MK-0476, Merck Sharp Dome) [68], zafirlukast (ICI 204,219, Zeneca Pharmaceuticals) [69] czy pranlukast (ONO-1078, SmithKline Beecham) [70].

Receptor ten zbudowany jest z 337 aminokwasów tworzących siedem transbłonowych helis sprzężonych z białkiem G (GPCR: G-protein-coupled receptor) [63].

1.7.2. Receptor typu 2

Drugi typ receptora - cysLT2R złożony z 346 aminokwasów - wykazuje 38%-ową homologię z cysLT1R [71]. Obecność mRNA receptora typu 2 zidentyfikowano w komórkach Purkiniego serca, komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych, leukocytach, rdzeniu nadnerczy oraz w mózgu [71, 72]. Pobudzenie tego receptora związane jest z tym działaniem leukotrienów, które dotyczy naczyń krwionośnym [73], ich zwężeniem, wysiękami. Pobudzenie cysLTR2 w mózgu prowadzi do osłabienia bariery krew-mózg skutkujące obrzękiem mózgu [74].

Wspólna aktywacja obu receptorów jest charakterystyczna dla bazofili, mastocytów, monocytów, eozynofili czy makrofagów [75, 76]. Antagoniści receptora typu 1 (montelukast, zafirlukast, pranlukast) wykazują słabe powinowactwo do receptora typu 2; szczególnie niska kompetycja występuje względem leukotrienu D₄. Przykładem nieselektywnego antagonisty obu typów receptora jest BAY u9773 [77], lecz jego użyteczność, jako antagonisty cysLT2R, jest bardzo wątpliwa. Kilku autorów [65] dowodzi, że BAY u9773 wykazuje właściwości agonisty receptora typu II porównywalną z LTE₄, jak również powoduje skurcz żył płucnych [78].

1.7.3. Receptor GPR17

Przed dwoma laty doniesiono o odkryciu kolejnego, nietypowego receptora leukotrienów cysteinylowych [79]. Receptor GPR17 jest swego rodzaju hybrydą między receptorem nukleotydów purynowych (P2Y) oraz receptorem leukotrienów cysteinylowych (cysLTR). Jest on aktywowany zarówno przez leukotrieny oraz nukleotydy takie jak uracyl, a jego pobudzenie prowadzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia oraz inhibicji cykazy adenylowej. Występowanie receptora tego typu zlokalizowano w organach narażonych na niedokrwienie, jak serce, mózg, nerki.

Badania przeprowadzone na myszach pokazują, że blokowanie GPR17 przez antagonistów P2Y oraz cysLTR istotnie obniża uszkodzenia tkanek spowodowane stanem niedokrwinnym. Autorzy tych badań sugerują, że GPR17 w stanach niedokrwiniennych odpowiada za negatywne działania leukotrienów i nukleotydów.

1.7.4. Powinowactwo leukotrienów cysteinylowych do receptorów

Najwyższą biologiczną aktywność wobec receptorów leukotrienów cysteinylowych typu 1 i 2 wykazują leukotrieny D₄ oraz C₄. LTE₄ działa średnio około 60 razy słabiej (zależnie od rodzaju komórki i typu receptora od 10 do 100 razy słabiej).

Dla receptora cysLT1R szereg aktywności leukotrienów cysteinylowych wygląda następująco LTD₄ > LTC₄ > LTE₄ [63, 72]. Dla receptora typu II LTD₄ = LTC₄ > LTE₄ [65, 71, 72].

Leukotrien C₄ najprawdopodobniej nie działa bezpośrednio na receptory tylko ulega przemianie do LTD₄, który to aktywuje receptory. Taka hipoteza tłumaczy zbliżone oddziaływanie obu leukotrienów, a zarazem różnice w czasach reakcji po podaniu leukotrienów; w przypadku LTD₄ czas ten wynosi około 5min, dla LTC₄ około 12-20min.

1.8. Fizjologiczne działanie leukotrienów cysteinylowych

Leukotrieny cysteinylowe, znane uprzednio jako wolno działające substancje w anafilaksji (SRS-A), obecne są przy każdym stanie zapalnym. Działają na oskrzela stukrotnie silniej aniżeli histamina. Powodują wiele efektów patofizjologicznych:

- skurcz oskrzeli i zwiększenie ich nadreaktywności oraz wzmożoną produkcję wydzieliny śluzowej
- obrzęk błony śluzowej oskrzeli
- zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych, powstawanie przesieków
- ułatwianie migracji komórek zapalnych przez śródbłonek naczyń [80]
- nasilenie stanu zapalnego [81], obrzęku czy odmy [82].

Leukotrieny pełnią funkcję ważnego mediatora prozapalnego w patogenezie astmy [83] i chorób alergicznych [84], chorobach układu krążenia, pokrzywki czy atopowego zapalenia skóry [81].

Pobudzają do wzrostu komórki mięśni gładkich dróg oddechowych, czym mogą przyczyniać się do przebudowy oskrzeli [85] i trwałej utraty czynności wentylacyjnej w przewlekłej astmie ciężkiej [86].

Ich produkcja jest zwiększona w wielu chorobach, takich jak: astma oskrzelowa [86], uogólnione stany zapalne i zakażenia [87], zespół ostrej niewydolności oddechowej [88, 89].

U osób cierpiących na astmę występuje wzmożone wydzielanie leukotrienu E_4 w moczu podczas zaostrzenia astmy, astmie wysiłkowej po wysiłku lub prowokacji zimnym powietrzem, astmie atopowej po prowokacji alergenem, astmie aspirynowej po prowokacji aspiryną. U osób z astmą aspirynową (AIA) zawartość LTE_4 w moczu jest około 4-6 razy większa niż u astmatyków dobrze tolerujących aspirynę (ATA). Po prowokacji aspiryną różnica tą zwiększa się jeszcze bardziej (średnio czterokrotnie) [90].

Także poza moczem w okresie objawowym u astmatyków następuje zwiększone wydzielanie leukotrienów B_4 i C_4 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL).

Leukotrieny cysteinylowe wzmagają odpowiedź chemotaktyczną. LTD_4 jest chemoakraktanem wobec eozynofili, pobudza biosyntezę IL-1 przez monocyty. Podobnie jak IL-2 może stymulować produkcję interferonów przez limfocyty T.

1.9. Substancje chemiczne o działaniu antyleukotrienowym

Hamowanie działania leukotrienów cysteinylowych i LTB_4 może przebiegać na kilku niezależnych etapach syntezy leukotrienów lub blokowania receptorów. Stosowane obecnie leki antyleukotrienowe można sklasyfikować ze względu na miejsce ich działania na następujące grupy:

- inhibitory 5-lipoksygenazy
- inhibitory FLAP
- antagoniści receptorów leukotrienów cysteinylowych
- antagoniści receptorów leukotrienu B_4 .

Dwa pierwsze typy leków antyleukotrienowych skupiają się na hamowaniu produkcji leukotrienów, pozostałe na blokowaniu ich działania.

1.9.1. Inhibitory 5-lipoksygenazy

Jest to pierwszy etap na szlaku syntezy leukotrienów, gdzie można hamować ich produkcję. Inhibitory fosfolipazy $A_{2\alpha}$ nie są dobrym rozwiązaniem, gdyż blokują

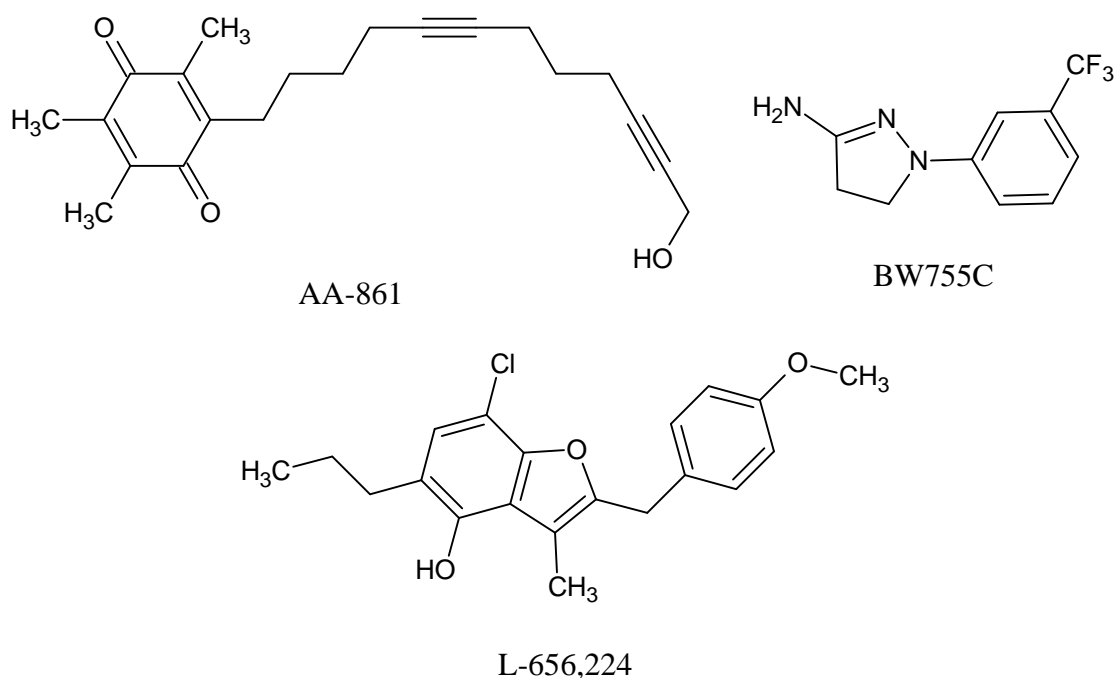
biosyntezę innych eikozanoidów. Dodatkowo glikokortykoidy blokujące cPLA₂ nie wstrzymują w pełni produkcji leukotrienów, a zwiększają ekspresję białka FLAP i 5-LO.

Inhibitory 5-lipoksygenazy ze względu na mechanizm działania można podzielić na grupy:

- inhibitory blokujące redukcję jonu żelaza
- inhibitory helatujące jon żelaza
- inhibitory kompetycyjne wobec kwasu arachidonowego
- inne o mieszanym lub nie znanym mechanizmie działania.

1.9.1.1. Inhibitory 5-LO blokujące redukcję jonu żelaza

Są to substancje uniemożliwiające redukcję jonu Fe³⁺ do Fe²⁺ niezbędną w cyklu utleniania kwasu arachidonowego. Związki te zawierają lipofilne elementy mogące łatwo się redukować, na przykład: kwas kawowy, flawonoidy (np. cirsiliol), kumarynę, lub pochodne fenidonu. Charakteryzują się wysoką skutecznością w blokowaniu aktywności 5-LO, ale niestety wykazują niską selektywność działania. Hamują aktywność innych lipoksygenaz: 12-LO, 15-LO oraz cyklooksygenaz. Posiadają wiele niepożądanych skutków ubocznych (tworzenie methemoglobiny) a także interferują z innymi układami, w których następują reakcje redoks. Przykłady leków antyleukotrienowych blokujących redukcję Fe³⁺ przedstawiono na rysunku 9.

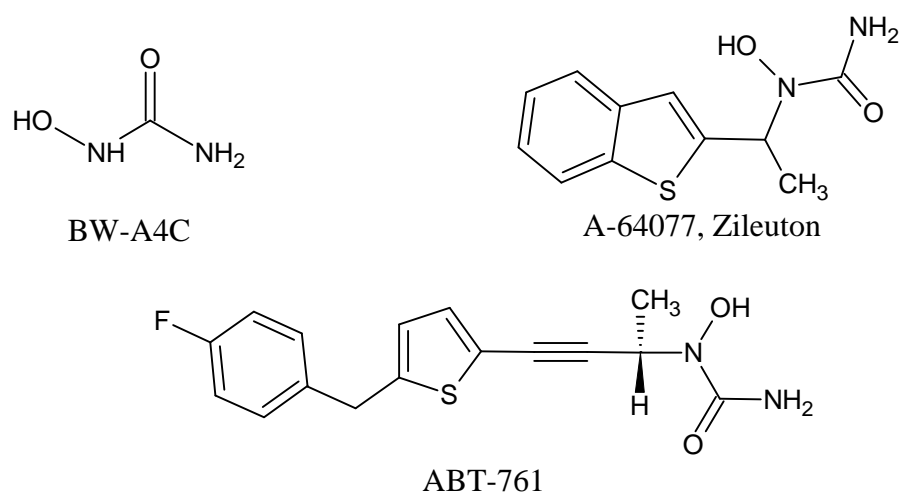


Rysunek 9. Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO blokujących redukcję jonu żelaza.

- AA-861: (Biomol) - stosowany protekcyjnie w obręku mózgu po krótkotrwałych stanach niedokrwienych [91]
- L-656,224: blokuje syntezę LTs w leukocytach ($IC_{50} = 40nM$). Jest również słabym inhibitorem 12-LO, 15-LO, COX-1.

1.9.1.2. Inhibitory 5-LO helatujące jon żelaza

Leki tego typu są najczęściej pochodnymi N-hydroksykarbamidów lub kwasów hydroksamowych. Helatują jon żelaza, posiadają z reguły cechy słabego reduktora. W porównaniu do związków blokujących redukcję jonu żelaza charakteryzują się wyższą selektywnością działania. Przykłady takich substancji przedstawiono poniżej (Rysunek 10).

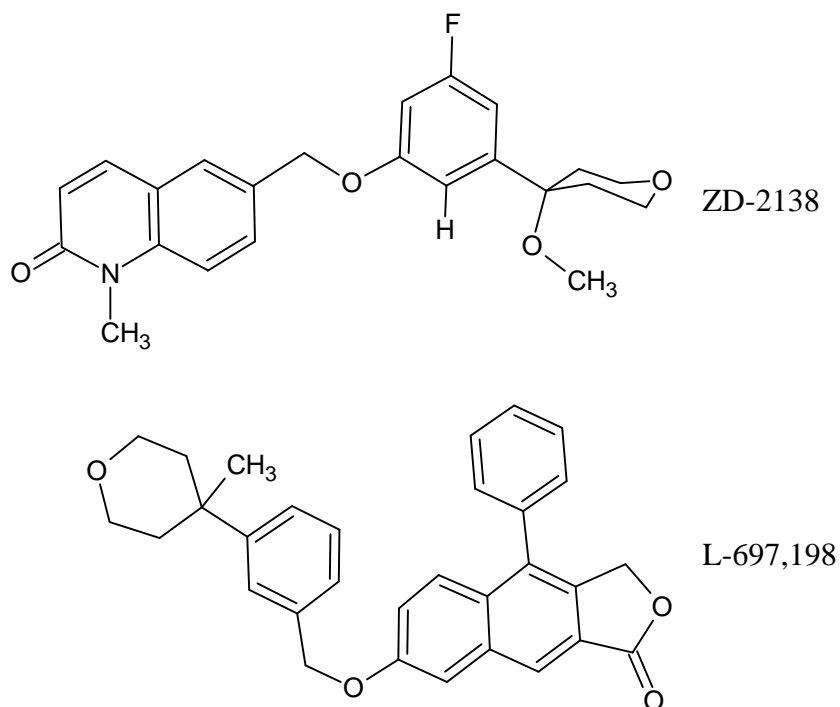


Rysunek 10. Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO helatujących jon żelaza.

- BW-A4C (Sigma-Aldrich): kwas hydroksamowy, inhibitor 5-LO w granulocytach ($IC_{50} = 40nM$) [92], osłabia resorpcję tkanki kostnej. Jego pochodna, kwas acetylohydroksamowy jest bardziej selektywny w działaniu, jednak działa tylko *in vitro*, *in vivo* jest bardzo szybko usuwany
- A-64077: zileuton, stabilna pochodna N-hydroksykarbamidów o słabszym działaniu niż BW-A4C – $IC_{50} = 500-1000nM$. Dotychczas jedyny dopuszczony do użytku lek z tej grupy inhibitorów. Podawany doustnie, wchłania się szybko [93]. Wiąże się z białkami w 93%. Ma krótki czas działania - czas połowicznego rozpadu około 2,5 godziny
- ABT-761: atreleuton - w badaniach na zwierzętach charakteryzuje się silniejszym działaniem od zileutonu oraz dłuższym czasem półtrwania (około 15 godzin), jednakże wykazuje silne interakcje w lekami steroidowymi.

1.9.1.3. Inhibitory 5-LO - kompetyty kwasu arachidonowego

Poprzez swoje podobieństwo strukturalne do kwasu arachidonowego są wysoce selektywnymi inhibitorami 5-LO. Przykłady zaprezentowano na rysunku 11.



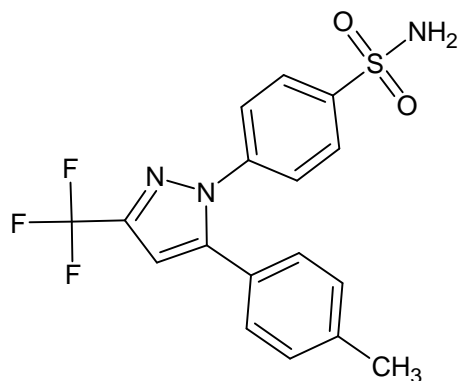
Rysunek 11. Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO kompetycyjnych wobec kwasu arachidonowego.

- ZD-2138 (Zeneca Pharmaceuticals): pochodna kwasu metoksyalkilotiazolowego oraz metoksytetrahydropiranu, słabo rozpuszczalny w wodzie o krótkim czasie półtrwania. Jego pochodna etylowa – ZM 230487 jest silniejszym inhibitorem ($IC_{50} = 20-50nM$) [94]
- L-697,198 (Merck-Frosst): sprzężenie metoksyterahydropiranu i naftalenu, hamuje biosyntezę leukotrienu B_4 w neutrofilach ($IC_{50} = 1,5nM$).

1.9.1.4. Inhibitory 5-lipoksygenazy o mieszanym lub nie znanym mechanizmie działania

W tym roku wykazano [95], że celekoksyb (G.D. Searle & Co.) selektywny inhibitor cyklooksyzgenazy 2, wprawdzie w mniejszym stopniu, lecz hamuje aktywność 5-lipoksygenazy. Dotychczas nie ustalono, jaki jest mechanizm blokowania 5-LO. Porównując strukturę celekoksylu (Rysunek 12) do innych inhibitorów 5-LO, można przyjąć hipotezę, że nie jest to inhibitor blokujący redukcję jonu żelaza czy też helatujący go. Autorzy [95] sugerują istnienie innego, nowego mechanizmu blokowania

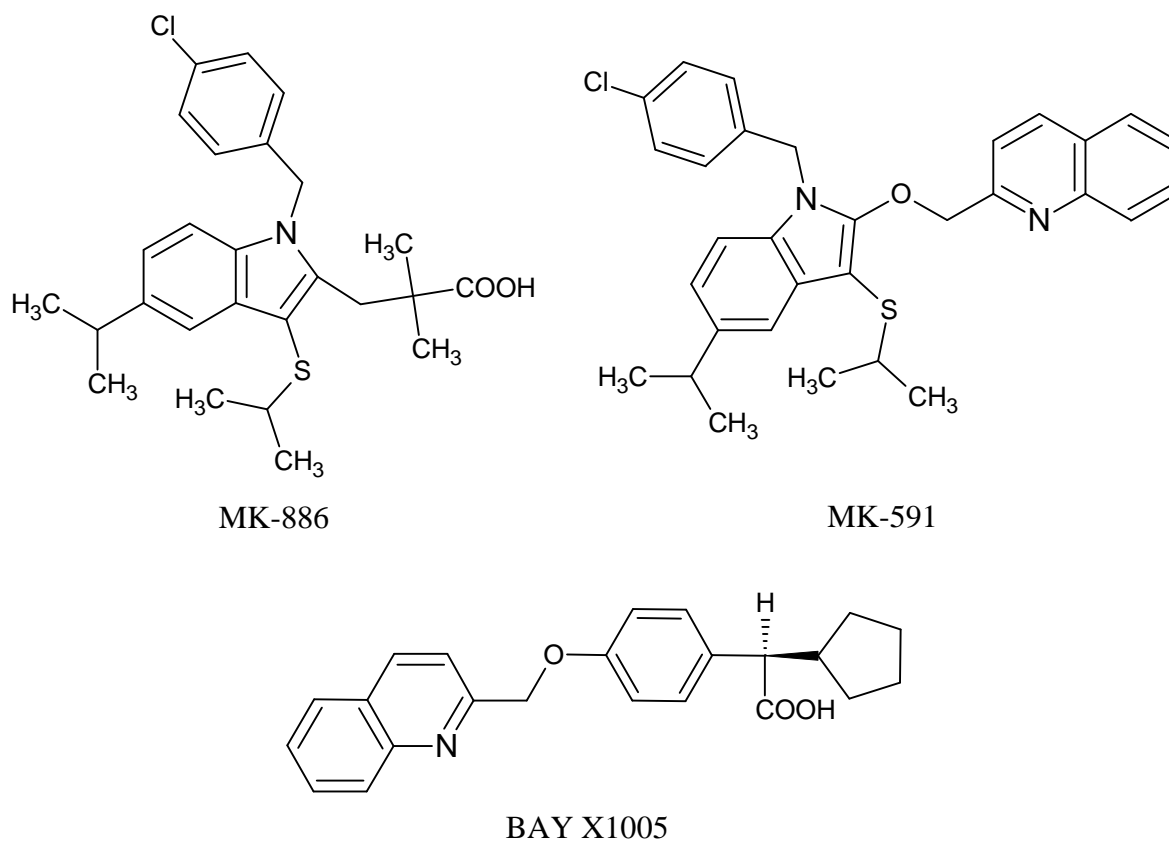
aktywności 5-lipoksygenazy. Warto zaznaczyć, że celekoksyb nie hamuje 12-LO oraz 15-LO.



Rysunek 12. Wzór strukturalny celekoksybu.

1.9.2. Inhibitory FLAP

Inhibitory te pozwoliły zidentyfikować białko FLAP i wykazać jego niezbędną obecność w procesie biosyntezy leukotrienów [96]. Związki te hamując produkcję leukotrienów nie blokują 5-lipoksygenazy. Przykłady inhibitorów FLAP zaprezentowano na rysunku 13.

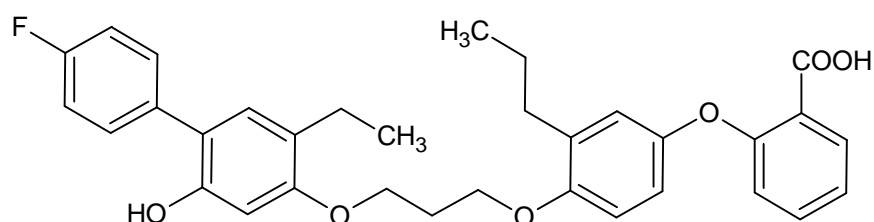


Rysunek 13. Wzory strukturalne inhibitorów FLAP.

- MK-886: 15-deoksy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandyna J₂ (Merck-Frosst) (IC₅₀ = 2,5nM)
- BAY X1005 (Cayman Chemical): o podobnych właściwościach jak MK-886
- MK-591 (Merck-Frosst): związek będący połączeniem elementów MK-886 i BAY X1005.

1.9.3. Antagonista receptorów leukotrienu B₄

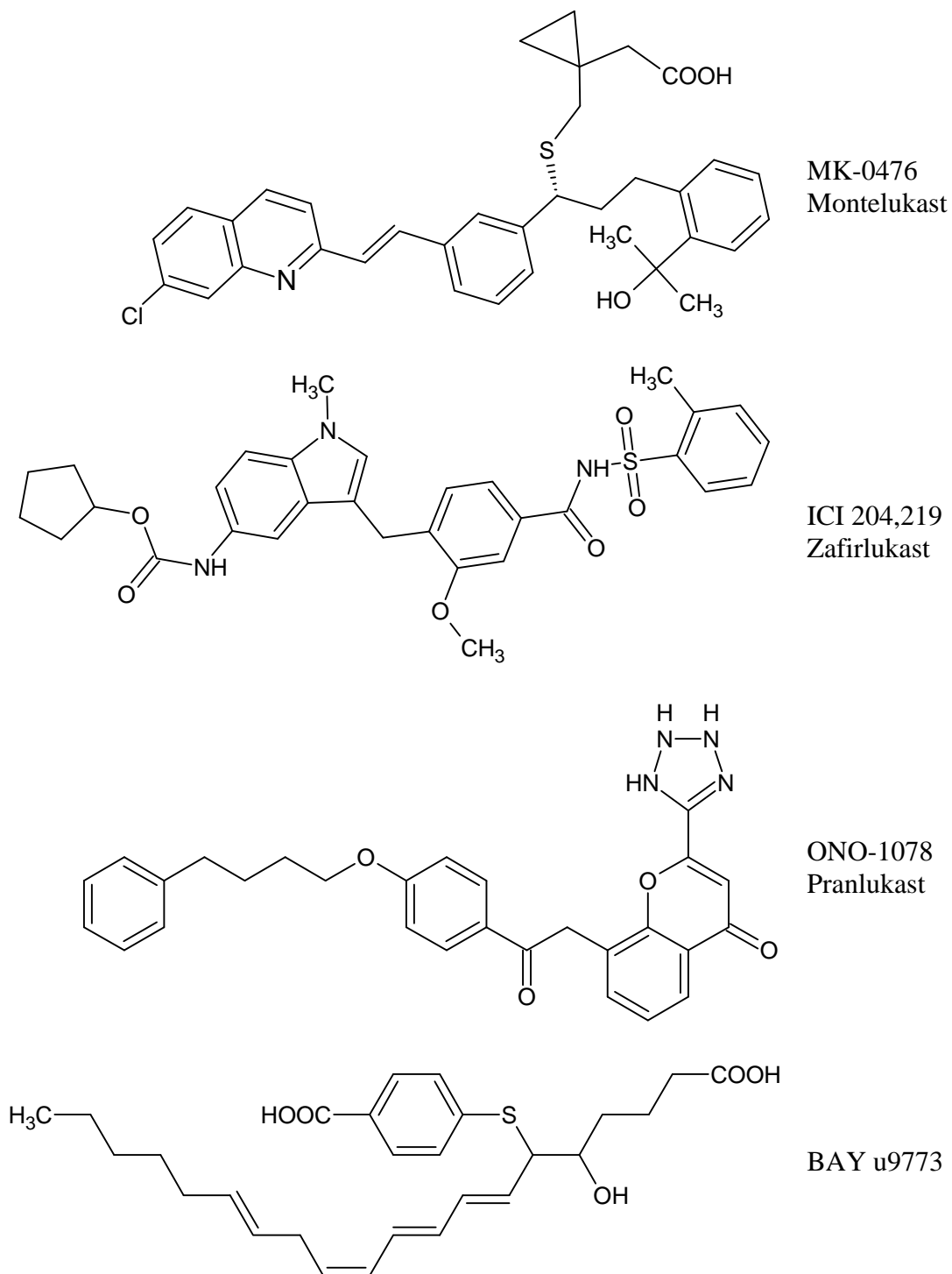
Najbardziej znanym inhibitorem receptora leukotrienu B₄ – LBT1 jest LY 293111 [97] (Rysunek 14). Związek ten jest także słabym inhibitorem 5-lipoksygenazy, w badaniach in vitro wykorzystywany jako lek antynowotworowy [91].



Rysunek 14. Wzór strukturalny LY 293111- antagonisty receptora LTB₄.

1.9.4. Antagoniści receptorów leukotrienów cysteinyłowych

Związki tego typu, będąc antagonistami receptorów cysteinyłowych typu I lub II, blokują działanie leukotrienów C₄, D₄ oraz E₄. Charakteryzują się niską toksycznością. Są stosowane częściej u dzieci niż dorosłych. Przykłady leków przeciwastmatycznych tego typu przedstawiono na rysunku 15.



Rysunek 15. Wzory strukturalne antagonistów receptorów leukotrienów cysteinylowych.

- MK-0476 montelukast (Merck Sharp Dome), ICI 204,219 zafirlukast (Zeneca Pharmaceuticals), ONO-1078 pranlukast (SmithKlineBeecham), inhibitory cysLTR1, wykazujące słabe działanie wobec cysLTR2
- BAY u9773 (Cayman Chemical) nieselektywny antagonist receptorów cysLTR1 oraz cysLTR2.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Pomiar leukotrienu E_4 w moczu pozwala ocenić ogólnoustrojową produkcję leukotrienów cysteinylowych. Oznaczenie $uLTE_4$ umożliwia ocenę stanów zapalnych przebiegających ze zwiększoną produkcją leukotrienów oraz skuteczność prowadzonej terapii.

Celem tej pracy jest:

1. Opracowanie metodyki oznaczania leukotrienu E_4 w moczu.
2. Optymalizacja i standaryzacja nowej metody LC/MS.
3. Praktyczne wykorzystanie nowej metody do pomiaru $uLTE_4$ u chorych na astmę, choroby układu krążenia oraz osób zdrowych.
4. Porównanie pomiarów uzyskanych za pomocą opracowanej metody z oznaczeniami wykonanymi powszechnie stosowaną komercyjną techniką ELISA.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Optymalizacja sprzętu i metody oznaczania uLTE₄

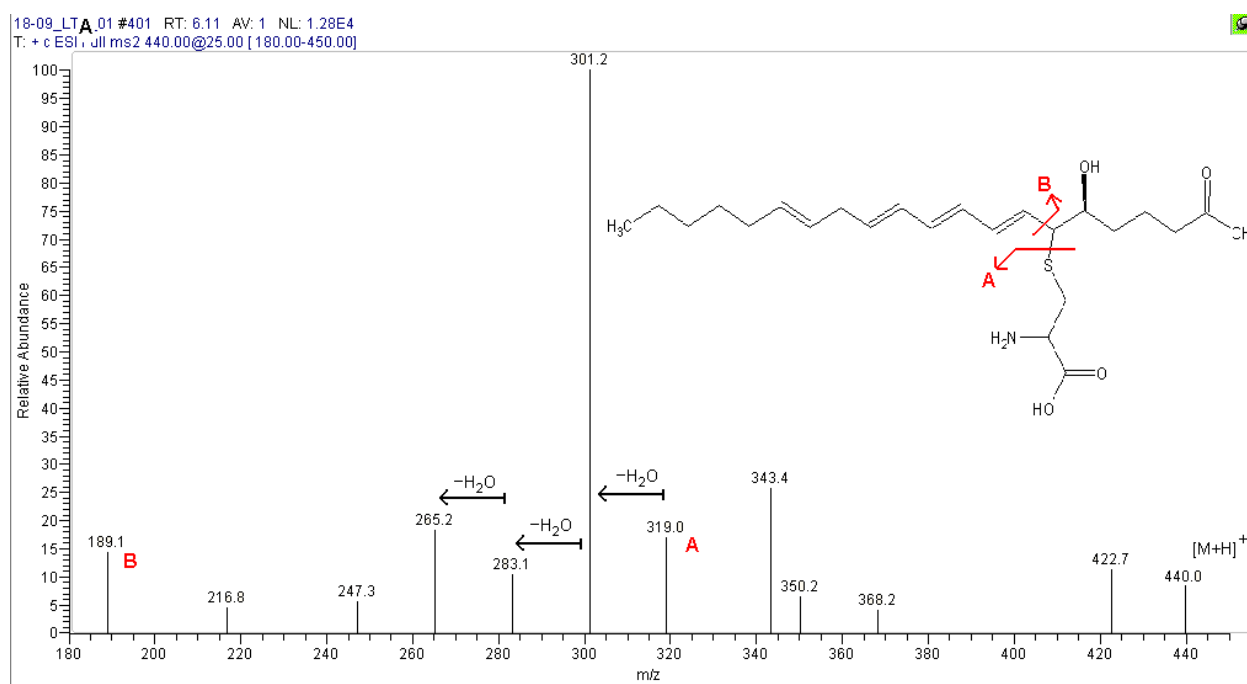
3.1.1. Optymalizacja spektrometru masowego

W badaniach wykorzystywano spektrometr masowy LCQ Advantage (Thermo Finnigan) z źródłem jonów typu *electrospray* i pułapką jonową jako analizatorem. W trakcie optymalizacji stosowano leukotrien E₄ (Cayman-Chemical): masa cząsteczkowa: 439,6 g/mol, czystość > 97%, stężenie 50mg/ml, rozpuszczony w etanolu, pochodzenie – brak danych, możliwe domieszki: izomer 11-trans-LTE₄. W tabeli 1 przedstawiono fizyczną charakterystykę LTE₄.

Tabela 1. Charakterystyka leukotrienu E₄.

Wzór sumaryczny	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅ S
Masa cząsteczkowa uśredniona	439,610 g/mol
Masa cząsteczkowa monoizotopowa	439,239 g/mol

Na rysunku 16 przedstawiono widmo fragmentacyjne stosowanego standardu, potwierdzające, że jest to leukotrien E₄.



Rysunek 16. Widmo fragmentacyjne LTE₄: jonizacja pozytywna, jon macierzysty m/z = 440 ± 0,5, energia fragmentacji 25%, zakres skanowania dla jonów potomnych m/z = 180 – 450.

W wyniku przeprowadzonych badań zestawione w tabeli 2 parametry spektrometru wydają się być najlepsze w przypadku badanego analitu.

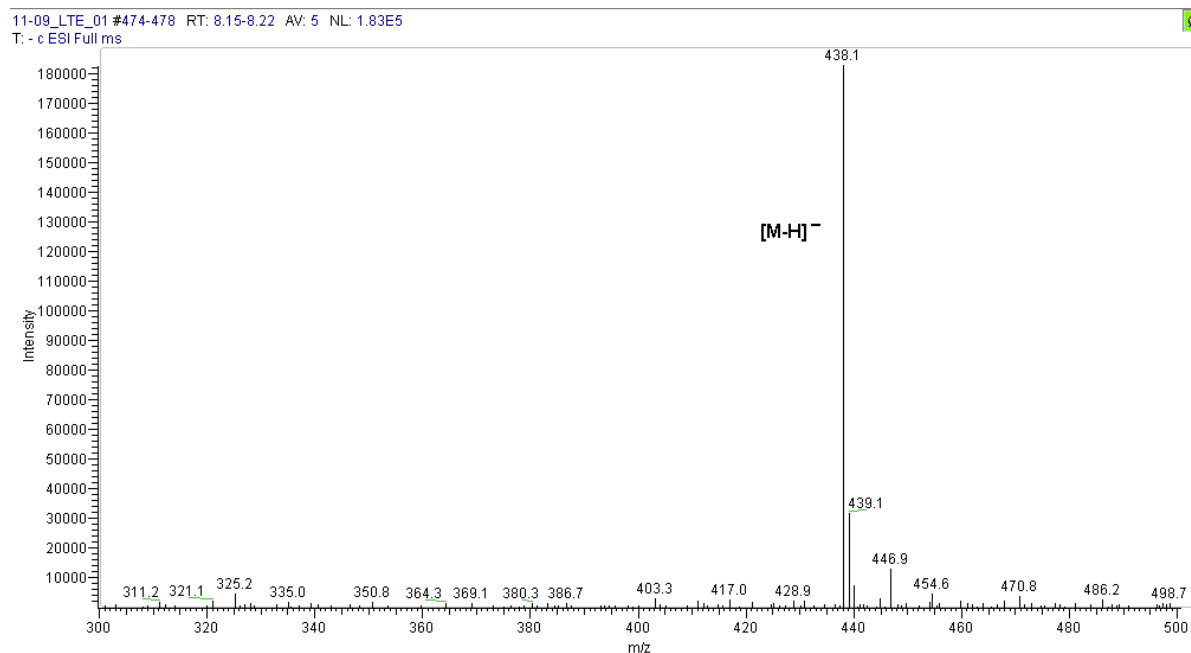
Tabela 2. Ustawienia spektrometru masowego (LCQ Advantage, Thermo Finnigan).

Parametry źródła jonów	
Napięcie	- 5.2 kV
Przepływ gazu	10
Temperatura kapilary	220°C
Napięcie na kapilarze	27 V
Parametry pułapki jonów	
Napięcie na skimerze	55.00 V
Czas otwarcia	50 ms

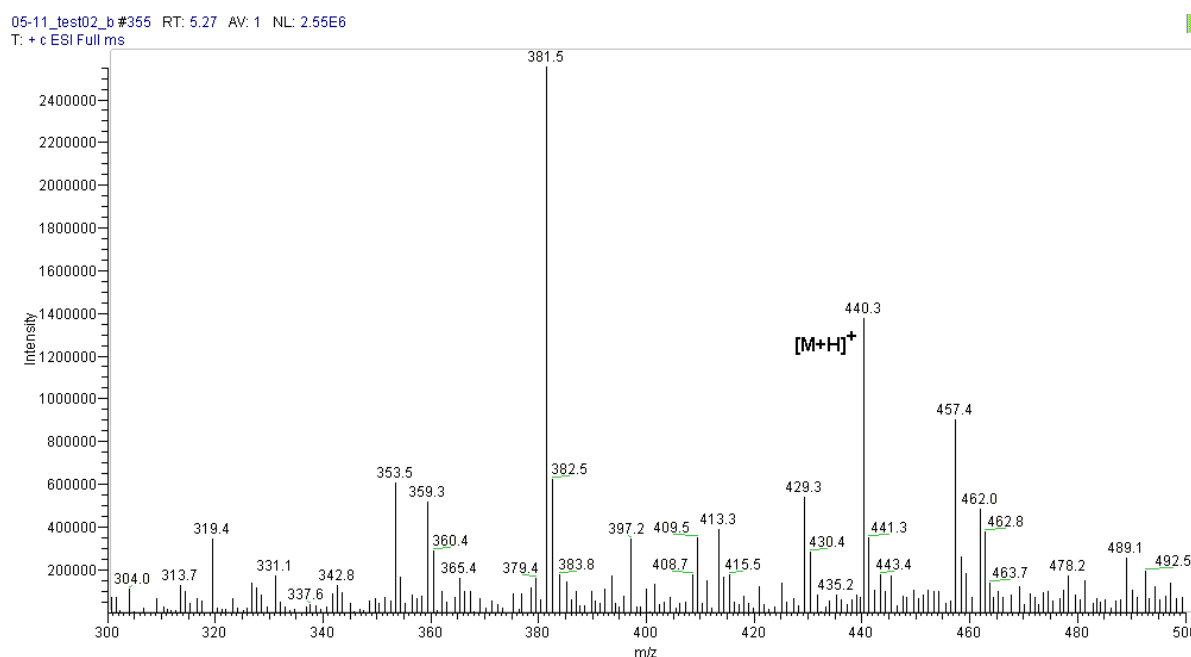
Napięcie na kapilarze (*capillary voltage*) wynosiło -5.2kV. W badaniu stosowano jonizację dodatnią, ponieważ intensywność sygnału dla leukotrienów cysteinylowych, w odróżnieniu od prostaglandyn F, E, jest znacznie wyższa dla tej jonizacji aniżeli dla negatywnej, chociaż wybór tego trybu jonizacji wiązał się z podniesieniem poziomu tła (Rysunki 17 i 18). Temperatura kapilary wynosiła 220°C; dla wyższych temperatur intensywność zmniejszała się w związku z fragmentacją analitu. Parametry: napięcie na kapilarze oraz skimerze są wynikami autotuningu, pozostałe były zmieniane ręcznie.

Czas otwarcia pułapki ustalono na 50ms. Jest to najdłuższy czas otwarcia pułapki, dla którego empirycznie wykazano maksimum intensywności pików dla LTE₄ i d₃-LTE₄. Przy wydłużonym czasie napełniania pułapki jonowej następuje fragmentacja analitu w pułapce i najprawdopodobniej zjawisko *space charge* [98], co prowadzi do spadku ilości zliczanych jonów.

Wśród tych parametrów największy wpływ na podniesienie liczby zliczanych jonów miały przepływ gazu, temperatura kapilary oraz czas otwarcia pułapki - parametry, które w największym stopniu wpływały na efektywność jonizacji oraz stabilność wytworzonych jonów. Optymalizacja tych trzech parametrów pozwoliła na ponad 60-krotne podniesienie intensywności względem wartości parametrów wyznaczonych w procesie autotuningu. Całościowo optymalizacja spowodowała wzrost intensywności pików o ponad dwa rzędy wielkości.



Rysunek 17. Widmo masowe LTE₄ – jonizacja negatywna.



Rysunek 18. Widmo masowe LTE₄ – jonizacja pozytywna. Widoczny jon m/z = 381,5 to pozostałość mieszaniny kalibracyjnej.

3.1.2. Optymalizacja chromatografii ciekowej

Układ ciekowy stanowił wysokosprawny chromatograf ciekowy z odwróconym układem faz – pompa LC Pump Surveyor (Thermo Finnigan) z kolumną o średnicy wewnętrznej 1.0mm i długości 15cm, z wypełnieniem C18 PepMap 100,

o ziarnistości 3 μ m (LC Packings). Kolumnę tą wymieniono po wykonaniu wstępnych eksperymentów na kolumnę Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, USA): średnica wewnętrzna 1mm, długość 15cm, ziarnistość 3,5 μ m, z dołączoną prekolumną Zorbax Eclipse XDB (Agilent Technologies, USA): średnica wewnętrzna 1mm, długość 17mm, ziarnistość 5 μ m. Wymiana kolumny podyktowana była częstym przytkaniem się pierwszej kolumny, wpływającym na zmienne wydłużanie się czasu retencji. Druga kolumna z dołączoną prekolumną charakteryzuje się wysoką stabilnością pracy - czasów retencji i ciśnień (oporów). Czas retencji dla tego samego rozdziału gradientowego w przypadku kolumny Zorbax Eclipse XDB uległ skróceniu z 27,44min do 26,15min. Kolumny stabilizowano termicznie w temperaturze 25°C.

Rozdziały chromatograficzne wykonywano stosując gradient z fazą polarną (A): H₂O (J.T.Baker albo woda demineralizowana MILIQplus firmy Milopore), 0.02% kwas trifluorooctowy - TFA (Sigma-Aldrich), 10mM kwas octowy – AcOH (Merck-Schuchardt) oraz fazą niepolarną (B): acetonitryl - ACN (J.T.Baker), 0.02% TFA, 10mM AcOH. Parametry rozdziału gradientowego zastosowane w pracy przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Układ faz w rozdziale gradientowym.

Czas [min]	% Fazy A	% Fazy B
0-5	100	0
10	60	40
15	80	20
20-30	0	100
30-45	100	0

Wprowadzenie do eluentu kwasów octowego i trifluorooctowego służyło uzyskaniu lepszej jakości chromatogramu. Jonizacja cząsteczek leukotrienu po zakwaszeniu eluentu kwasem octowym jest bardziej wydajna (o około 15%) w stosunku do kwasu mrówkowego [99]. Niewielka ilość TFA (0,02%) poprawia symetrię pików chromatograficznych, ponieważ znosi oddziaływania niespecyficzne pomiędzy analizowanymi związkami a wypełnieniem kolumny. Po dodaniu TFA szerokość pików uległa skróceniu z około 50-60s do 40-45s, przede wszystkim od strony ramienia zstępującego.

W badaniu postanowiono stosować jako fazę niepolarną acetonitryl. Inne źródła [100] sugerują, że najlepszy dla rozdziału produktów 5-lipoksygenazy jest metanol, zaś acetonitryl jest lepszy w przypadku rozdziału pochodnych cyklooksigenazy (COX) – prostanoidów. W badaniu tym zdecydowano jednakże stosować acetonitryl, gdyż ważniejsze od rozdzielania różnych leukotrienów było uzyskanie dobrych widm masowych i chromatogramu. Dla tych samych przepływów acetonitryl zapewniał lepsze zagęszczenie leukotrienu E₄, średnio opuszczał on kolumnę w czasie 30s, w odróżnieniu od 45s w przypadku metanolu. Ponieważ wydajności jonizacji dla obu rozpuszczalników były porównywalne, do dalszego użytku wybrano acetonitryl.

Wykorzystywana pompa może tworzyć gradient przy przepływie powyżej 100μl/min ze względu na mieszalnik znajdujący się przed tłokami pompy – mieszanie po stronie niskich ciśnień. Uzyskanie rozdziału gradientowego dla stosowanych kolumn możliwe było dzięki zastosowaniu podziału eluentu (*splitu*); dla przepływu 150μl/min na kolumnie Zorbax Eclipse XDB uzyskano przepływ w przedziale 30-40 μl/min, ciśnienie dla fazy polarnej wynosiło 116barów oraz 52barów dla fazy niepolarnej. Do wykonania splitu zastosowano trójnik oraz 17,8m odcinek kapilary o średnicy wewnętrznej 96μm.

3.2. Grupy badanych

Materiał do badań stanowiły próbki moczu pobierane od pacjentów uczestniczących w badaniach naukowych prowadzonych w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ oraz od osób zdrowych:

- a) osoby zdrowe – 50 osób (nr zgody komisji bioetycznej KBET/148/B/2005)
- b) pacjenci poddawani zabiegom angioplastycznym: 133 osoby (nr zgody komisji bioetycznej KBET/138/B/2006)
- c) chorzy na astmę – 38 osób (nr zgody komisji bioetycznej KBET/148/B/2005).

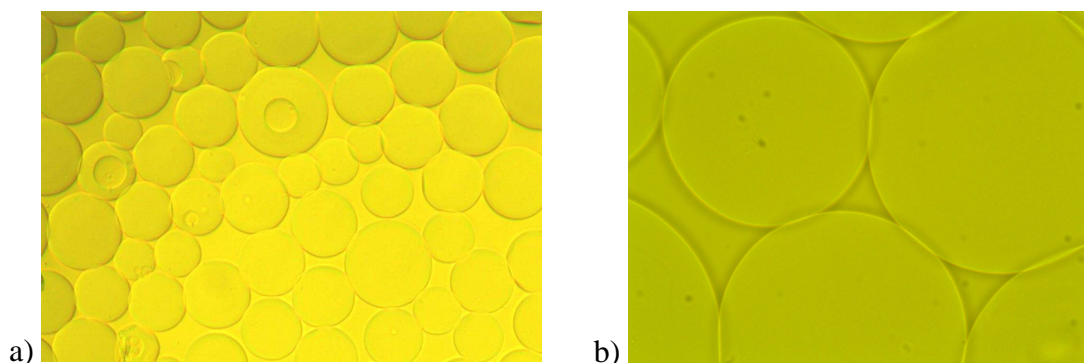
3.3. Przygotowanie próbek

Pobrane próbki moczu przechowywano w temperaturze -80°C . Czas przechowywania był krótszy niż 6 miesięcy i nie miał wpływu na zawartość mierzonego analitu. Jeżeli w moczu znajdowała się domieszka krwi (krwiomocz) próbkę wirowano w celu sedymentacji elementów morfotycznych (4000rpm, 10min) a supernatant zamrażano. Po rozmrożeniu próbki moczu wirowano by usunąć strąty moczanowe (4000rpm, 10min). Wirowanie moczu natychmiast po rozmrożeniu pozwala uniknąć wytrącania się kwasu moczowego w kolejnych etapach analizy, dlatego każda próbka była zamrażana, nawet gdy możliwa była jej natychmiastowa analiza.

Objętość 25ml tak przygotowanego moczu mieszano z 25ml roztworu soli fizjologicznej buforowanego fosforanami (PBS) o $\text{pH} = 7,2$ (naważka PBS, EuroImmun). Prawidłowy mocz ma lekko kwaśny odczyn. Ponadto występuje zmienność odczynu pomiędzy próbkami od różnych osób, jak również pomiędzy próbkami pobranymi od tej samej osoby w różnym czasie. Obniżone pH , jak również jego zmienność, wpływają na stopień odzysku leukotrienu z moczu w następnym etapie przygotowania matrycy biologicznej. Dodatek PBS buforował pH do wartości optymalnej dla zastosowanej techniki immunoadsorpcyjnej.

3.4. Izolacja leukotrienów cysteinylowych z moczu

Do mieszaniny równych objętości moczu i PBS umieszczonych w stożkodennych probówkach polipropylenowych o pojemności 50ml (Falcon lub Saerstedt) dodano standard wewnętrzny w ilości 1500 albo 2500pg d_3 -[20,20,20]-LTE₄ (Biomol) oraz 100 lub 150 μL zawiesiny mikrocząstek sefarozy opłaszczonych mysimi przeciwciałami monoklonalnymi Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent (Cayman Chemical) (Rysunek 19).



Rysunek 19. Mikroskopowy obraz ziaren żelu Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent (Cayman Chemical). a) 100-krotne powiększenie, b) 400-krotne powiększenie.

Różne ilości wzorca wewnętrznego wynikały z różnic w oczekiwanej ilości analitu. Wzorzec o masie 1500pg był dodawany do próbek osób zdrowych tak, aby ilości d_3 -LTE₄ i analitu były zbliżone. W przypadku próbek pacjentów, którzy mieli wykonywane zabiegi kardiologiczne, dodawano 2500pg d_3 -LTE₄. Badania własne wykazały, że proporcja analit:wzorzec w zakresie 0,2-2 nie wpływa na wynik oznaczenia, dlatego w kolejnych analizach dodawano 2500pg wzorca. Równoległe ze wzrostem ilości wzorca zwiększono ilość cząstek adsorpcyjnych. Ich zdolność adsorpcyjna cząsteczek leukotrienu E₄ wynosi co najmniej 100ng/ml. Producent nie podaje informacji na temat specyficzności przeciwciał oraz stałej dysocjacji przeciwciało-leukotrien. Z innych badań wartość stałej dysocjacji szacowana jest na 3pg/ml (12,83 pM).

Dodanie znanej ilości identycznego chemicznie standardu do próbki biologicznej przed rozpoczęciem izolacji analitu i jego pomiaru pozwala na kompensację błędu metody spowodowanego zmienną wydajnością immunoadsorpcji oraz ograniczoną sprawnością i nieilościowym transferem analitu do systemu pomiarowego opartego na spektrometrii mas.

Całość reakcji immunoadsorpcyjnej umieszczano na 20min w temperaturze 37°C w probówkach stożkodennych o pojemności 50ml, a następnie delikatnie mieszano przez 40min posługując się mieszadłem rolkowym, po czym wirowano (5min, 500g) w celu sedymentacji cząstek adsorpcyjnych. Nadsącz zlano, osad adsorbenta przeniesiono na próbki polipropylenowych o pojemności 2,5ml. Materiał płukano 2,5ml PBSu i ponownie wirowano (5min, 500g) w celu sedymentacji adsorbentu.

Producent immunoadsorbentu w instrukcji z 2004 roku zalecał przeprowadzenie dodatkowego płukania wodą. Stosowany wzorzec posiada deuterium w tej części cząsteczki leukotrienu, która najprawdopodobniej stanowi część epitopu dla przeciwciał. Może to powodować *efekt Ubbelohde'a* (efekt izotopowy polegający na wydłużeniu wiązań wodorowych po wymianie w tworzących je cząsteczkach protonu na deuterium). Taki efekt byłby źródłem istotnego błędu systematycznego prowadzącego do zawyżenia wyniku oznaczenia. Dodatkowe płukanie wodą zmniejszyłoby siłę jonowa roztworu, co w konsekwencji powodować mogłoby dalsze osłabienie wiązania wzorca, jak również i analitu przez przeciwciała. Wykonane analizy próbek wody, którą przepłukiwano immunosorbent, nie wykazały jednoznacznie obecności deuterowanego leukotrienu; w przypadku dwóch próbek dla masy i czasu retencji charakterystycznego

dla d_3 -LTE₄ obserwowano pik nieznacznie wystający ponad poziom szumów. Pomimo braku przekonujących dowodów na niepożądaną elucję deuterowanego standardu zrezygnowano z dodatkowego przemywania immunosorbentu wodą. W instrukcji producenta z 2006 roku brak jest już informacji o dodatkowym wykonaniu płukania z użyciem wody.

Po przemyciu, immunosorbent zawieszono w schłodzonym do -15°C metanolu czystości HPLC (J.T.Baker). Całość dynamicznie mieszano przez 5 minut z użyciem Vortexu, a następnie wirowano (10min, 4500rpm). Nadsącz metanolu, który wypłukuje z immunosorbentu związane z przeciwciałem leukotrienu, zbierano do mikropróbówek Eppendorfa. Płukanie schłodzonym metanolem powtarzano jeszcze dwukrotnie.

Metanol zebrany po elucji leukotrienu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem (CentriVap, Labanco) do objętości 40-50µl. Przed analizą w układzie LC/MS próbkę wirowano, aby nie wprowadzić do pętli wstrzykowej ewentualnych pozostałości sefarozy.

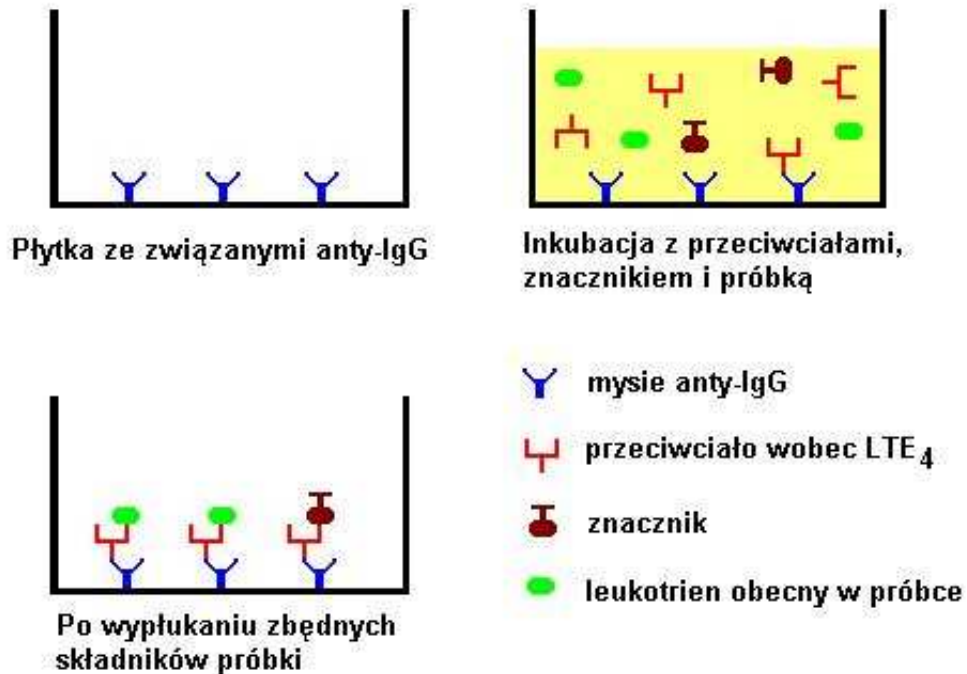
Rejestrację widm masowych wykonywano w trybie monitorowania pojedynczego jonu SIM (*Single Ion Monitoring*) w zakresie $m/z = 439,0-444,0$. Zakres ten obejmował zarówno analit oraz wzorzec wewnętrzny: dla LTE₄ $m/z = 440,1-440,4$, dla d_3 -LTE₄ $m/z = 443,1-443,4$. Zastosowanie trybu monitorowania wielu jonów - osobno analitu i wzorca - wiązało się z dwukrotnym spadkiem liczby rejestrowanych jonów.

Analizę widm masowych przeprowadzono programem Xcalibur 1.1 (Thermo Finnigan). Oznaczenie LTE₄ polegało na pomiarze powierzchni pików chromatograficznych (nie dokonywano odejmowania linii podstawowej).

3.5. Oznaczenie leukotrienu E₄ w moczu przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA

W badaniu tym używano zestawu Leukotriene E₄ EIA Kit firmy Cayman Chemical. Zestaw ten wykorzystuje w oznaczeniu kompetytywne wiązanie przez immobilizowane przeciwciało monoklonalne leukotrienu i jego analogu (tracera) znakowanego achetylocholinoesterazą (AChE). Kolejnym etapem oznaczenia jest przeprowadzenie barwnej reakcji enzymatycznej. Stężenie znacznika jest zawsze stałe, natomiast różna zawartość LTE₄ w próbce powoduje zmienną ilość przyłączonego do

przeciwciał kompetitora, która jest odwrotnie proporcjonalna do ilości LTE₄ w mierzonej próbce. Schemat oznaczania LTE₄ przy użyciu zestawu ELISA zaprezentowano na rysunku 20.



Rysunek 20. Schemat oznaczania LTE₄ z użyciem zestawu ELISA.

Po nałożeniu próbki (50μl) na płytkę 96-dołkową, inkubacji (18 godzin) oraz płukaniu płytki, wprowadza się do jej studzienek odczynnik Ellmansa (czas inkubacji 60min) zawierający barwny substrat dla AchE. W efekcie enzymatycznej reakcji powstaje barwny produkt, którego absorbancję odczytuje się przy długości fali 412nm. Ilość związanego znacznika odczytuje się w oparciu o krzywą wzorcową, wykonaną dla znanych ilości LTE₄ z przedziału 7,5pg do 1000pg. W sposób pośredni, poprzez ilość znacznika wyznacza się zawartość LTE₄ w próbce. Próbkę moczu były mierzone po uprzednim rozcieńczeniu 1:10 w PBS i nakładane w objętości 50μl. Absorbancje dla standardów mieściły się w podziale w przedziale 0,07 – 0,80; dla zdecydowanej większości próbek zawierały się wewnątrz tego przedziału. Dla kilku próbek pacjentów chorujących na astmę i wrażliwych na aspirynę, w przypadkach gdy absorbancja wykroczyła poza przedział absorbancji standardów, wykonywano dodatkowe rozcieńczenia próbki moczu.

Mimo zadowalającej czułości metody immunoenzymatyczne (ELISA) obarczone są istotnym błędem pomiarowym wynikającym z:

- możliwości krzyżowej reaktywności przeciwciał z innymi pochodnymi kwasu arachidonowego,
- interakcją między stosowanymi przeciwciałami a białkami zawartymi w złożonych matrycach biologicznych,
- trudnością w oszacowaniu strat mierzonych analitu podczas przygotowania próbki, często polegającego na adsorpcji z użyciem fazy stałej.

3.6. Oznaczanie kreatyniny w moczu

Stężenie kreatyniny w analizowanych próbkach moczu wyznaczano aparatem VITROS 250 firmy Johnson&Johnson. Wynik oznaczenia uLTE₄ przeliczano, wyrażając go w postaci ilości leukotrienu E₄ na miligram kreatyniny. Przyjęto taki sposób standaryzacji, gdyż uznawany jest obecnie jako najlepszy [101].

3.7. Porównanie metod oznaczania LTE₄ w moczu: LC/MS i ELISA

Aby ocenić wiarygodność wyników oznaczeń metodą LC/MS postanowiono wykonać oznaczenia tych samych próbek techniką ELISA.

Wykonano serię oznaczeń metodami ELISA oraz LC/MS znanych ilości LTE₄. Leukotrien rozpuszczony był w wodzie oraz w moczu. Dokładny opis ilości dodawanego leukotrienu oraz ilości powtórzeń przedstawiono w tabeli 4 oraz 5.

Tabela 4. Przygotowanie dodatków LTE₄ w wodzie i moczu oznaczanych metodą LC/MS.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Ilość powtórzeń		Objętość próbki 25ml. Objętości dodawanego LTE ₄ o stężeniu 100 pg/μl
	LTE ₄ rozpuszczony w		
	Wodzie	Moczu	
0	2	2	0
20	2	2	5,0 μl
50	2	2	12,5 μl
80	2	-	20,0 μl
100	2	2	25,0 μl
120	2	-	30,0 μl
150	2	2	37,5 μl
200	2	2	50,0 μl

Tabela 5. Przygotowanie dodatków LTE₄ w wodzie i moczu oznaczanych metodą ELISA.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Ilość powtórzeń		Objętość próbki 500µl. Objętości dodawanego LTE ₄
	LTE ₄ rozpuszczony w		
	Wodzie	Moczu	
0	2	2	0
20	2	2	1,0 µl o stężeniu 10pg/µl
50	2	2	2,5 µl o stężeniu 10pg/µl
80	2	2	4,0 µl o stężeniu 10pg/µl
100	2	2	5,0 µl o stężeniu 10pg/µl
120	2	2	6,0 µl o stężeniu 10pg/µl
150	2	2	7,5 µl o stężeniu 10pg/µl
200	2	2	10 µl o stężeniu 10pg/µl
500	2	2	2,5 µl o stężeniu 100pg/µl
1000	2	2	5,0 µl o stężeniu 100pg/µl
2000	2	1	10,0 µl o stężeniu 100pg/µl

Próbki moczu, w którym był rozpuszczony LTE₄, były inne w trakcie analizy metodą ELISA i LC/MS. W obu przypadkach pochodziły od osób zdrowych i charakteryzowały się zbliżoną zawartością kreatyniny (Tabela 6).

Tabela 6. Zawartości kreatyniny w próbkach moczu użytych do analizy dodatków LTE₄.

Metoda	Zawartość kreatyniny w moczu [mg/ml]
ELISA	0,74
LC/MS	0,88

W trakcie analizy domieszki LTE₄ w moczu metodą LC/MS postanowiono zrezygnować z dwóch próbek o zawartości LTE₄ 80 i 120pg/ml ze względu na brak wystarczającej ilości tej samej próbki moczu. Eliminacja tych dwóch punktów pomiarowych nie miała wpływu na wynik badania.

3.8. Analiza statystyczna

Uczestników badania charakteryzowano pod względem płci oraz wieku podając wartość średnią i odchylenie standardowe.

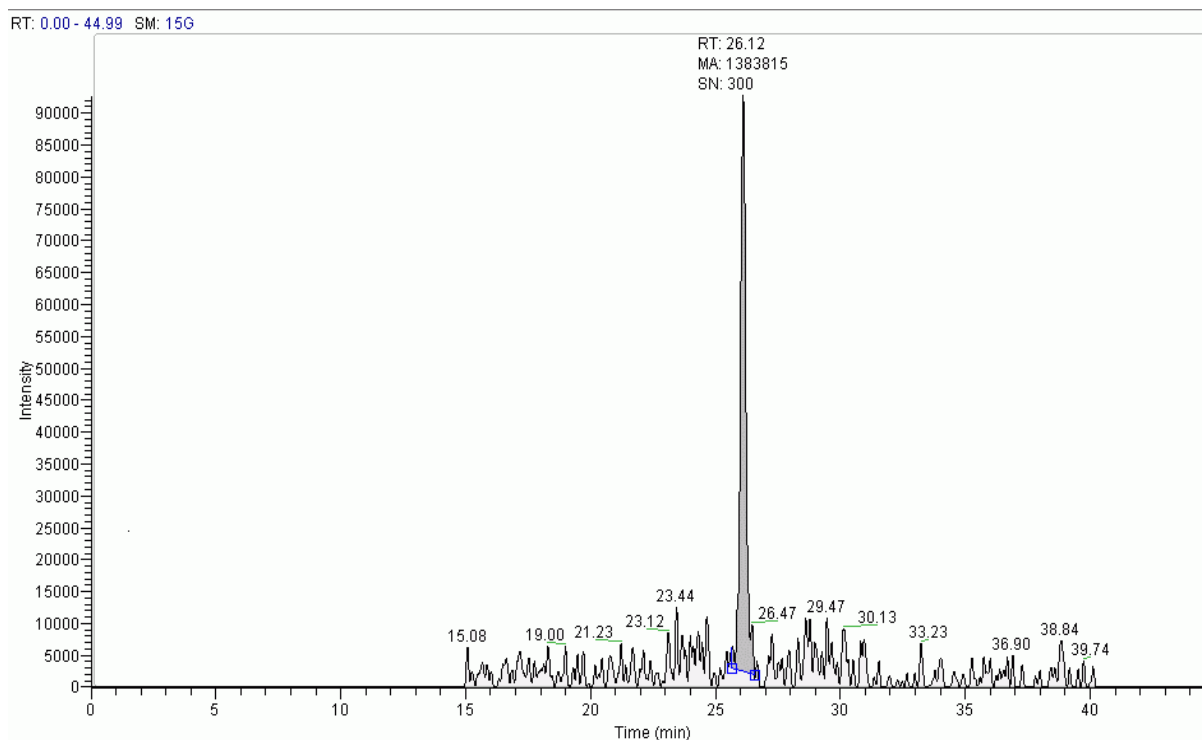
Wpływ zileutonu oraz przezskórnej angioplastyki wieńcowej na ogólnoustrojową produkcję LTE₄ określano jedno- i wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA), wykonując następnie testy *post hoc*.

Zgodność z rozkładem normalnym rozkładu wyników oznaczeń uLTE₄ u osób zdrowych określano w oparciu o wyniki testu Shapiro-Wilka. Wymienione obliczenia wykonano pakietem statystycznym STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc.). W obliczeniach przyjęto 5%-owy poziom istotności.

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Zależność sygnału od ilości LTE₄ analizowanego w układzie LC/MS

Dla ustalonych, optymalnych parametrów analizy w układzie LC/MS wykonano serie pomiarów sygnału - intensywności integralnej pików chromatograficznych (powierzchnia pod pikiem) w zależności od ilości standardu leukotrienu E₄ zawartego w pętli nastrzykowej. Przykładowy chromatogram przedstawiono na rysunku 21. Uzyskane dane zestawiono w tabeli 7 oraz graficznie na wykresie 1.

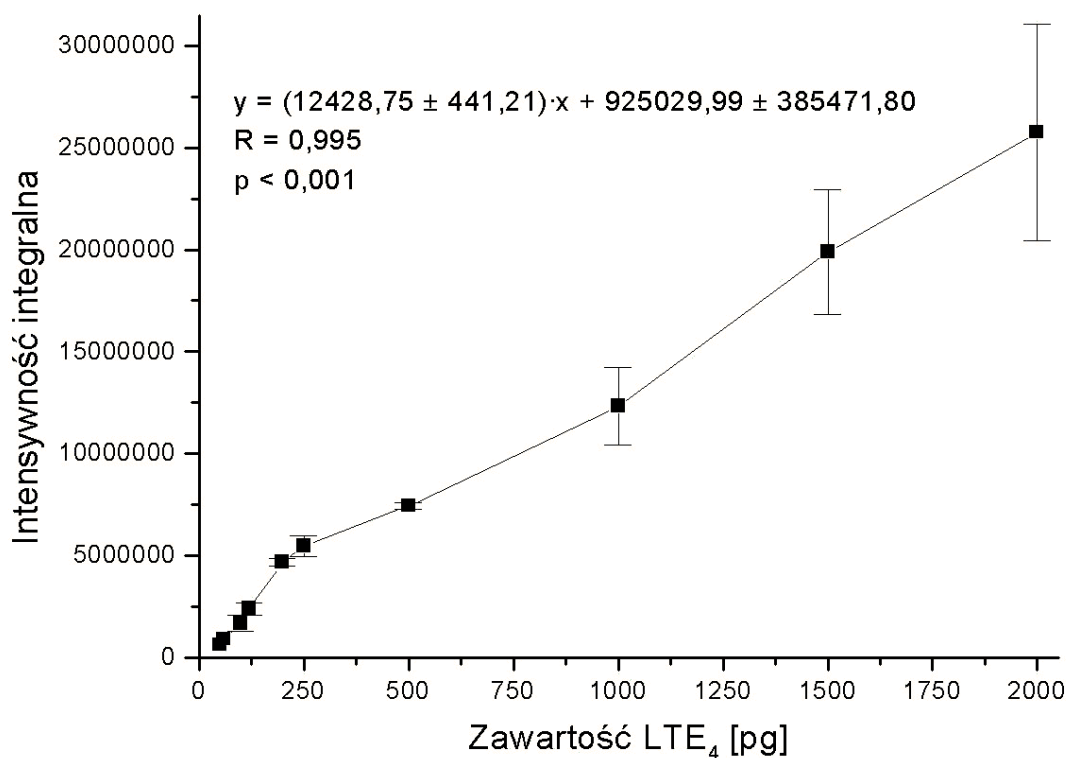


Rysunek 21. Chromatogram standardu LTE₄ (zawartość 200pg).

Istotne różnice w wielkości odchylenia standardowego dla różnych ilości LTE₄ wynikają z niejednakowej liczby powtórzeń. Większość punktów pomiarowych – 6 wykonano dla zakresu korespondującego z zawartością uLTE₄ u większości osób badanych. Część powtórzeń wykonywana była w różnych dniach, a czułość wykorzystywanych urządzeń nie jest stała w czasie.

Tabela 7. Zależność intensywności integralnej od ilości analizowanego LTE₄.
W nawiasach podano liczbę przeprowadzonych pomiarów.

Ilość LTE ₄ [pg]	Średnia intensywność integralna	Odchylenie standardowe - SD	% SD
2000 (n=3)	25760834	5306354	20.60
1500 (n=3)	19882445	3069680	15.44
1000 (n=3)	12313689	1890295	15.35
500 (n=3)	7433590	151715	2.04
250 (n=2)	5465641	508296	9.30
200 (n=2)	4682513	182505	3.90
120 (n=3)	2388281	304168	12.74
100 (n=3)	1659210	392367	23.65
60 (n=1)	898892	---	---
50 (n=1)	603402	---	---



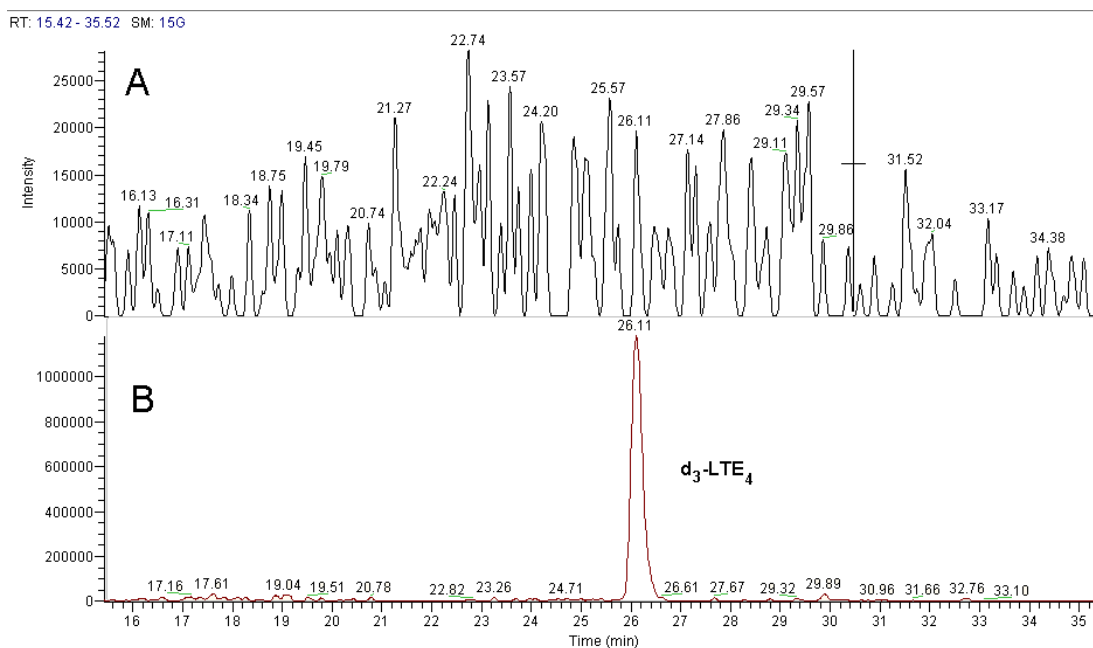
Wykres 1. Zależność intensywności integralnej od ilości LTE₄.

W szerokim zakresie ilości LTE₄ relacja z uzyskanymi wartościami sygnału ma charakter liniowy. Dla niższych zawartości (poniżej 120pg) następuje załamanie się trendu i spadek intensywności sygnału.

Wyniki te służą oszacowaniu możliwości sprzętu, sprawdzeniu progu detekcji i oznaczalności czy też zakresu, w jakim można uzyskać wiarygodne wyniki przy konkretnej konfiguracji spektrometru masowego. Dane te nie mogą być traktowane jako miara zakresu oznaczalności metody. Pokazują także, dlaczego w przypadku pułapki jonowej nie można oznaczać analitu z użyciem krzywej kalibracyjnej. Wprowadzie korelacja dla powyższej zależności jest wysoka ($R = 0,995$, przy $p < 0,001$), jednak największe odchylenia od prostej (największy błąd oznaczenia) występują dla ilości leukotrienu poniżej 200pg, tj. przedziału, do którego należy 83,2% wszystkich wyznaczonych zawartości uLTE₄. Wyniki te uzasadniają również stosowność użycia standardu wewnętrznego.

Dodanie na samym początku analizy standardu wewnętrznego powoduje, że wszelkie zmiany w stopniu odzysku analitu przez przeciwciała czy też zmienna odpowiedź spektrometru masowego na te same ilości składnika są niwelowane przez stałość proporcji analitu i wzorca wewnętrznego, który podlega także tym wszystkim procesom wprowadzającym błąd oznaczenia.

Wzorzec wewnętrzny powinien charakteryzować się właściwościami fizykochemicznymi, chromatograficznymi i widmami zbliżonymi do właściwości analitu, a ponadto wzorzec powinien dać się oddzielić od badanego analitu. Dlatego idealnym standardem wewnętrznym jest izotop analitu – d₃-LTE₄, który można rozdzielić metodą spektrometrii masowej.

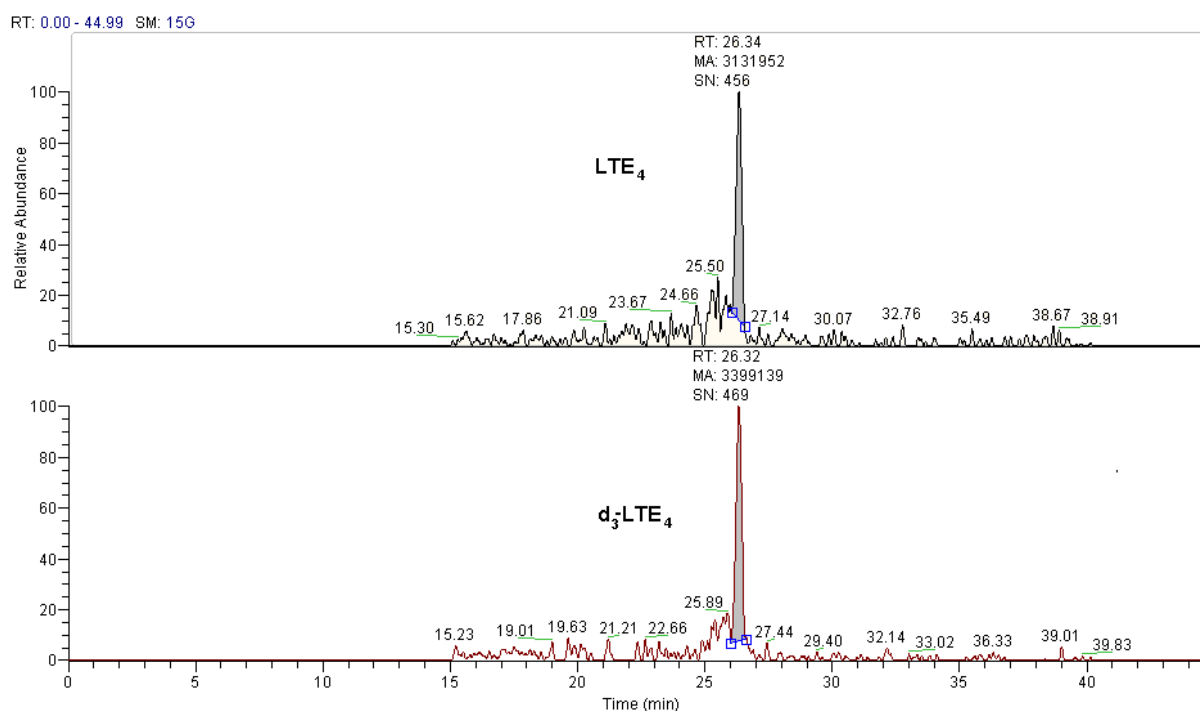


Rysunek 22. Chromatogram wzorca wewnętrznego d₃-LTE₄ (1000pg). A): m/z = 440,1-440,4. B): m/z = 443,1-443,4.

Na rysunku 22 przedstawiono chromatogram próbki d_3 -LTE₄, obrazujący czystość izotopową wzorca, która według producenta jest wyższa niż 98%.

Zawartość LTE₄ wyznaczono porównując intensywności integralne pików chromatograficznych dla wzorca i analitu. Uzyskaną wartość dzielono przez objętość moczu, z której ekstrahowano analit oraz stężenie kreatyniny w moczu.

Chromatogram wykreślono dla zakresu $m/z = 440,1-440,4$ dla analitu oraz $443,1-443,4$ dla deuterowanego leukotrienu E₄. Przykładowych chromatogram z oznaczenia próbki przedstawiono na poniższym rysunku 23.



Rysunek 23. Chromatogram analizowanej próbki: LTE₄ $m/z = 440,1-440,4$, d_3 -LTE₄ $m/z = 443,1-443,4$.

Odzysk leukotrienu E₄ przy zastosowaniu opisanej procedury immunoadsorpcji kształtuje się na poziomie około 60-65%.

4.1.1. Analiza powtarzalności oznaczeń

Pomimo teoretycznej niskiej stabilności pułapki jonowej wykonano analizę powtarzalności wyników. Analizę tę przeprowadzono dla standardu wewnętrznego, którego zawartość była stała w próbkach. Pomiary wykonano tego samego dnia, celem uniknięcia fluktuacji wyników ze względu na możliwość zmiany odpowiedzi sprzętu w dłuższym czasie wynikającej np. z jego zanieczyszczenia.

W tabeli 8 zamieszczono wartości intensywności integralnej dla jednakowego dodatku standardu d₃-LTE₄.

Tabela 8. Wartości intensywności integralnej dla wzorca wewnętrznego d₃-LTE₄.

Lp.	Intensywność integralna
1	13574580
2	12548916
3	11768919
4	12366410
Średnia	12564706,25
SD	751153,13
% SD	5,97 %

Na wyniki te należy spojrzeć bardzo krytycznie. Wartość sygnału silnie zależy od ilości standardu w pętli nastrzykowej, co zależy od objętości metanolu jaka pozostała po procedurze izolacji. Starano się aby objętości metanolu, w jakim rozpuszczony był analit, były jednakowe. Wyniki te przedstawiają powtarzalność metody dla konkretnej serii izolacji i analiz próbek.

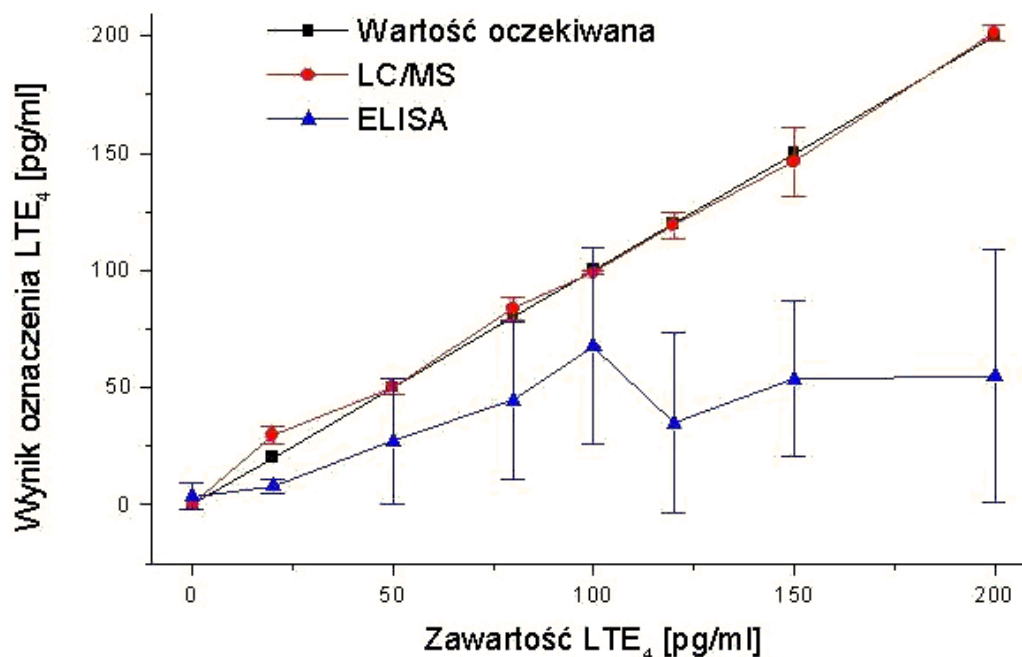
4.2. Wyniki oznaczeń znanych ilości LTE₄ metodą LC/MS i ELISA

4.2.1. Oznaczenia LTE₄ rozpuszczonego w wodzie

Uzyskane wyniki pomiaru zawartości dodatków znanych ilości leukotrienu E₄ zawartego w wodzie umieszczono w tabeli 9 oraz przedstawiono na wykresie 2.

Tabela 9. Wyniki oznaczeń znanych ilości LTE₄ rozpuszczonego w wodzie metodą LC/MS oraz ELISA.

Ilość LTE ₄ [pg/ml]	Wynik oznaczenia LTE ₄ [pg/ml]	
	LS/MS	ELISA
0	0	3.75 ± 5.30
20	29.63 ± 3.75	8.00 ± 2.83
50	50.15 ± 3.44	27.15 ± 26.66
80	83.82 ± 4.89	44.37 ± 33.42
100	98.94 ± 0.68	67.40 ± 41.87
120	119.21 ± 5.75	34.75 ± 38.54
150	146.24 ± 14.69	53.51 ± 33.23
200	201.29 ± 3.37	54.91 ± 53.87
500	---	168.73 ± 12.34
1000	---	364.99 ± 104.63
2000	---	985.13 ± 21.04



Wykres 2. Wyniki oznaczeń metodą LC/MS oraz ELISA znanych ilości LTE₄ rozpuszczonych w wodzie.

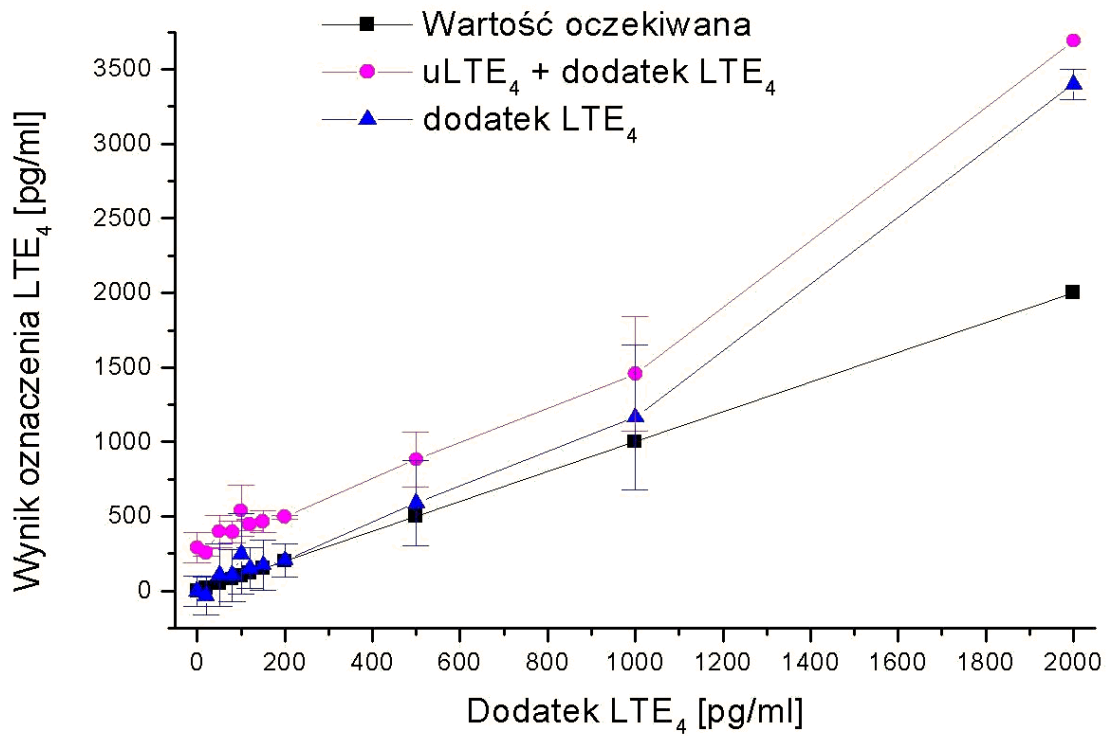
Wyniki oznaczeń są zadowalające dla metody LC/MS. W przypadku ELISA występują poważne odstępstwa od wartości rzeczywistych, przede wszystkim w zakresie niższych zawartości. Dla wartości 500 pg/ml i wyższych w wynikach oznaczeń metodą ELISA zostaje już zachowana proporcja zbliżona do rzeczywistej proporcji w zawartościach leukotrienu.

4.2.2. Oznaczenia LTE₄ rozpuszczonego w moczu

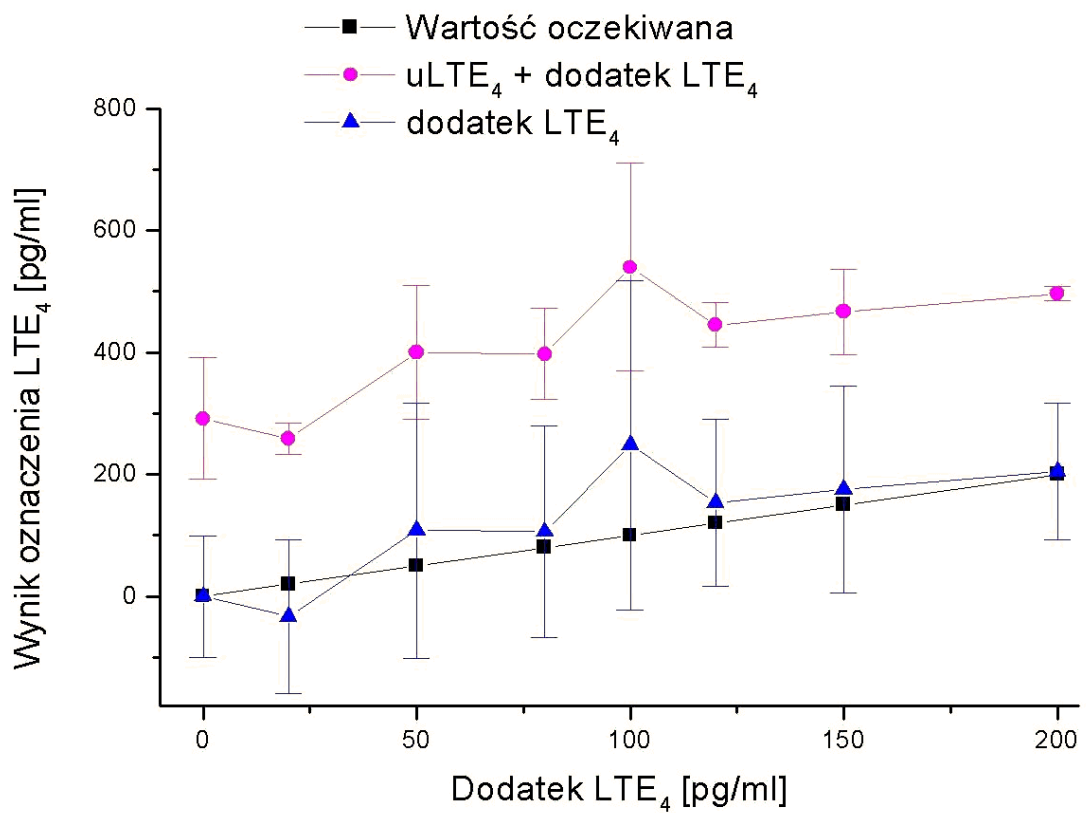
Wyniki pomiarów dodatków LTE₄ w moczu wykonane techniką ELISA oraz LC/MS przedstawiono w tabelach 10 i 11 oraz na wykresach 3-5.

Tabela 10. Wyniki oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu metodą ELISA.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Wynik oznaczenia uLTE ₄ + dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Wyliczony wynik oznaczenia dodatku LTE ₄ [pg/ml]
0	291,50 ± 99,70	0,00 ± 99,70
20	258,50 ± 26,16	-33,00 ± 125,86
50	399,50 ± 109,60	108,00 ± 209,30
80	397,50 ± 74,25	106,00 ± 173,95
100	539,50 ± 170,41	248,00 ± 270,11
120	445,00 ± 36,77	153,50 ± 136,47
150	466,50 ± 70,00	175,00 ± 169,70
200	496,50 ± 12,02	205,00 ± 111,72
500	882,50 ± 185,97	591,00 ± 285,67
1000	1456,50 ± 383,96	1165,00 ± 483,66
2000	3690,00	3398,50 ± 99,70



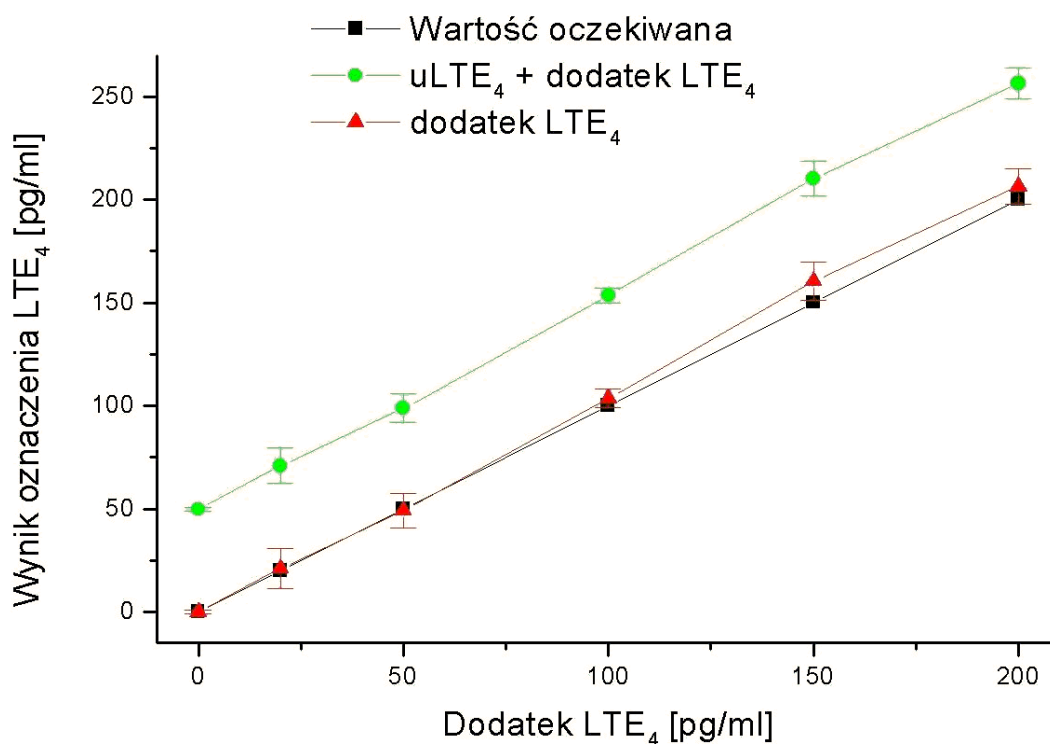
Wykres 3. Wyniki oznaczeń metodą ELISA dodatków LTE₄ (0-2000 pg/ml) w moczu.



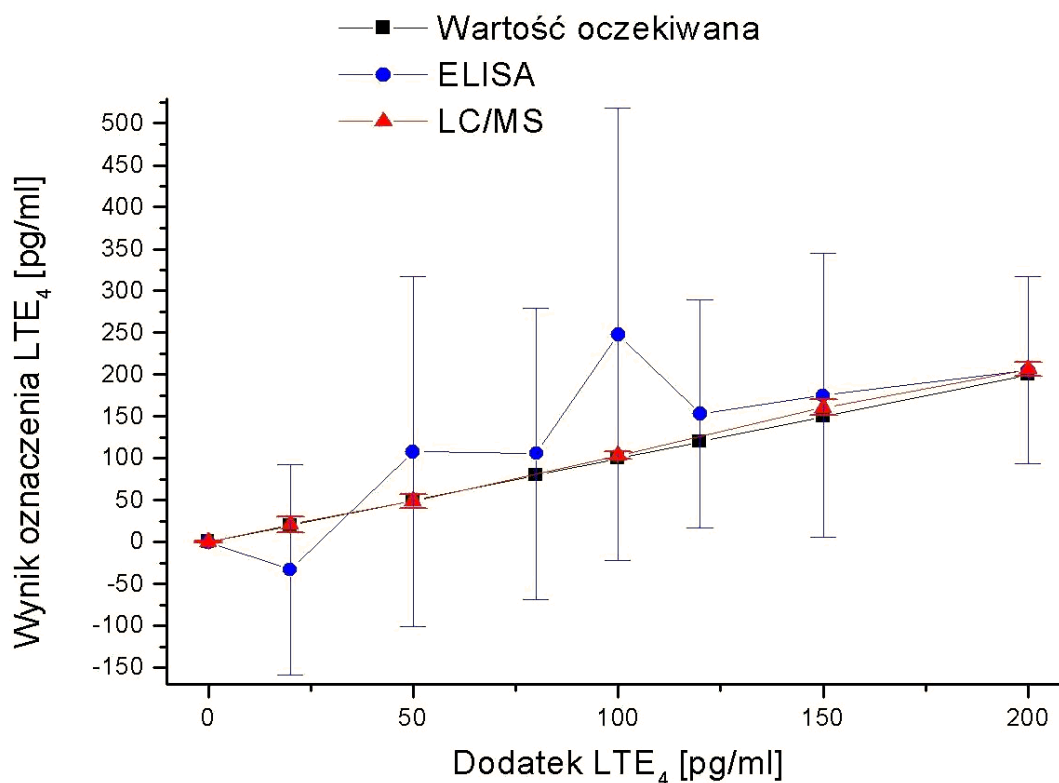
Wykres 4. Wyniki oznaczeń metodą ELISA dodatków LTE₄ (0-200 pg/ml) w moczu.

Tabela 11. Wyniki oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu metodą LC/MS.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Wynik oznaczenia uLTE ₄ + dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Wyliczony wynik oznaczenia dodatku LTE ₄ [pg/ml]
0	49,82 ± 1,04	0 ± 1,04
20	71,04 ± 8,70	21,22 ± 9,74
50	98,99 ± 7,20	49,06 ± 8,24
100	153,55 ± 3,54	103,72 ± 4,58
150	210,38 ± 8,39	160,55 ± 9,43
200	256,39 ± 7,62	206,57 ± 8,66

Wykres 5. Wyniki oznaczeń metodą LC/MS dodatków LTE₄ w moczu.

Poniżej na wykresie 6 zestawiono wyniki oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu wyznaczonych obiema metodami.

Wykres 6. Porównanie wyników oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu metodą ELISA i LC/MS.

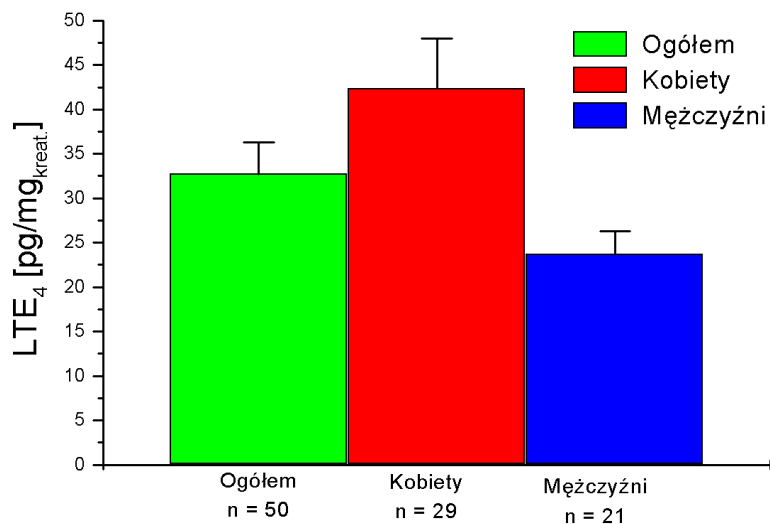
4.3. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w grupie osób zdrowych

W badaniu uczestniczyło 50 zdrowych dorosłych osób, które nie przyjmowały żadnych leków. Charakterystykę grupy oraz wyniki oznaczeń zestawiono w tabeli 12 oraz wykresie 7.

Tabela 12. Wyniki oznaczenia uLTE₄ metodą LC/MS w grupie osób zdrowych.

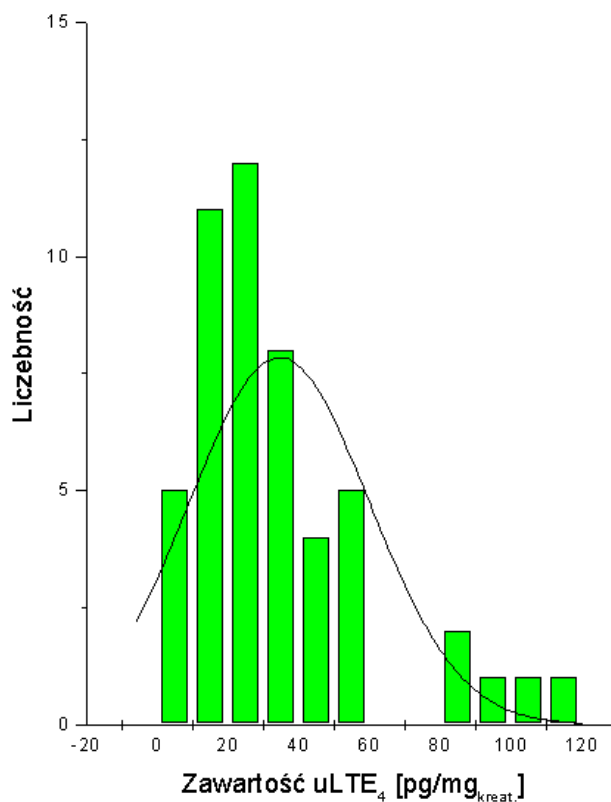
Badani	Liczebność	Wiek [lata]	Wynik [pg/mg _{kreat.}]	95% przedział ufności [pg/mg _{kreat.}]
Ogółem	50	31,4 (21-60)	32,72 ± 25,10	27,30 – 41,76
Kobiety	29	33,8 (21-60)	42,39 ± 29,80	31,05 – 53,77
Mężczyźni	21	28,5 (21-49)	23,69 ± 11,40	18,45 – 28,88

W grupie kobiet obserwowany jest wyższy poziom uLTE₄ względem grupy mężczyzn, różnica ta jest istotna statystycznie (Test U Manna-Whitneya dla zmiennych nieparametrycznych, $p < 0,01$).



Wykres 7. Stężenie LTE₄ w moczu osób zdrowych.

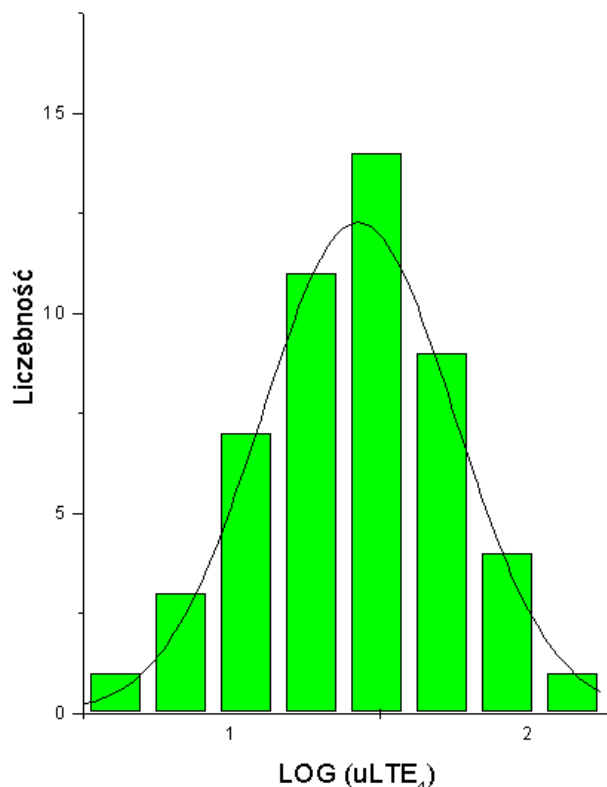
Zbadano także, czy rozkład wyników oznaczeń uLTE₄ w grupie osób zdrowych jest zgodny z rozkładem normalnym. Na wykresie 8 przedstawiono histogram wyników dla ogółu zdrowych uczestniczących w badaniu.



Wykres 8. Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu osób zdrowych (n=50). Szereg rozdzielczy - 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego.

Rozkład wyników oznaczeń uLTE₄ w badanej grupie osób zdrowych nie jest zgodny z rozkładem normalnym ($p = 0,00004$, wynik testu Shapiro-Wilka pozwala odrzucić hipotezę o zgodności z rozkładem normalnym).

Wyniki powyższe poddano przekształceniu – logarytmowaniu. Po tej transformacji ponownie zestawiono wyniki z rozkładem normalnym (Wykres 9).



Wykres 9. Histogram przekształconych wyników oznaczeń leukotrienu w moczu osób zdrowych (n=50). Szereg rozdzielczy - 0,2. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego.

Przekształcone wyniki przyjmują rozkład zgodny z rozkładem normalnym ($p = 0,8183$; test Shapiro-Wilka).

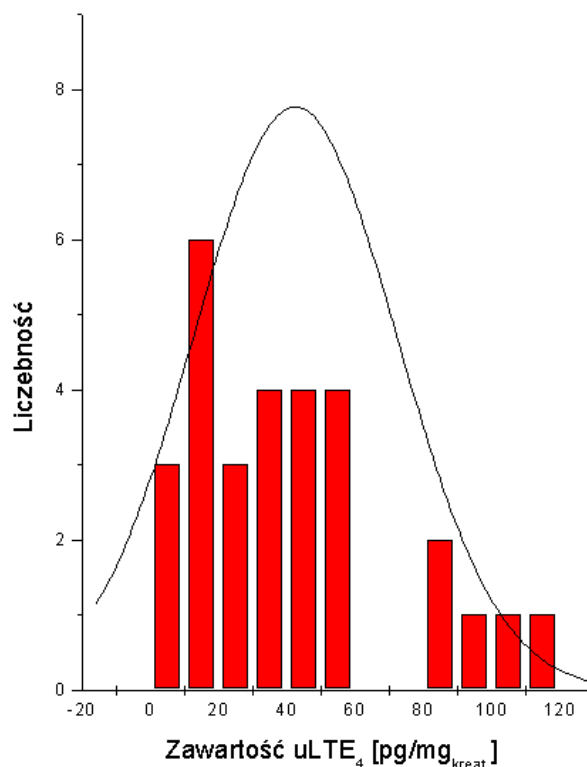
Wartość średnia zawartości leukotrienu w moczu – $\text{LOG}(\text{uLTE}_4)$ wynosi 1,426, a wartość odchylenia standardowego 0,325. W oparciu o te dane wyznaczono przedział zawierający 95% wyników:

$$\text{- dolny kres przedziału: } \inf [\text{LOG}(\text{uLTE}_4)] = 1,426 - 2 \cdot 0,325 = 0,776,$$

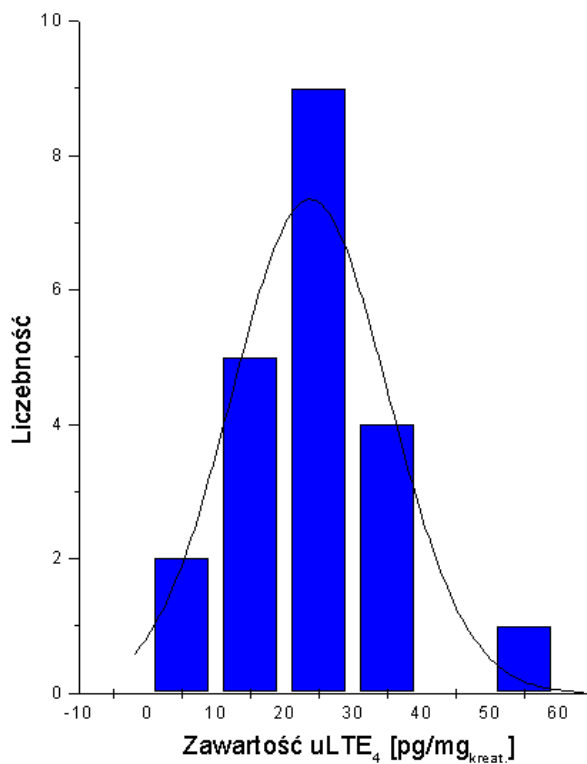
$$\text{- górny kres przedziału: } \sup [\text{LOG}(\text{uLTE}_4)] = 1,426 + 2 \cdot 0,325 = 2,077.$$

Wykonano odwrotną transformację (obliczono wartości funkcji wykładniczej dla dolnego i górnego kresu) wyznaczając przedział wartości referencyjnych zawartości LTE_4 w moczu osób zdrowych: **5,69 – 119,42** pg/mg kreatyniny.

Ze względu na różnice w ilości uLTE_4 u zdrowych kobiet i mężczyzn wykonano dodatkowo oddzielne histogramy dla grupy kobiet (Wykres 10) oraz mężczyzn (Wykres 11).



Wykres 10. Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu zdrowych kobiet (n=29). Szereg rozdzielczy- 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego. Rozkład niezgodny z rozkładem normalnym $p= 0,028$; po przekształceniu logarytmicznym, zgodny z rozkładem normalnym $p= 0,310$.



Wykres 11. Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu zdrowych mężczyzn (n=21). Szereg rozdzielczy- 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym $p= 0,240$; po przekształceniu logarytmicznym, zgodny z rozkładem normalnym $p= 0,302$.

4.3. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w grupie pacjentów poddanych angioplastyce serca

Osoby z badanej grupy zostały zrekrutowane w ramach dwóch niezależnych projektów badawczych. W pierwszym uczestniczyły 23 osoby. Celem tego projektu było sprawdzenie, czy z zabiegiem przezskórnej angioplastyki powiązany jest wzrost poziomu LTE₄ w moczu odzwierciedlający jego nasiloną biosyntezę spowodowaną interwencją wewnątrzwieńcową. Grupę kontrolną stanowiło 18 pacjentów, którzy mieli wykonywaną tylko koronarografię – CC (*coronary catheterization*), natomiast grupę badaną 5 pacjentów, u których przeprowadzono także zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej – PCI (*percutaneous coronary intervention*).

Próbki moczu były pobierane tuż przed zabiegiem – 0h, dwie i cztery godziny po zabiegu: 2h, 4h. Pomiary wykonywane były bez znajomości rozpoznania klinicznego – próba jednokrotnie zaślepią. Wyniki przedstawiono w tabeli 13 oraz na wykresie 12.

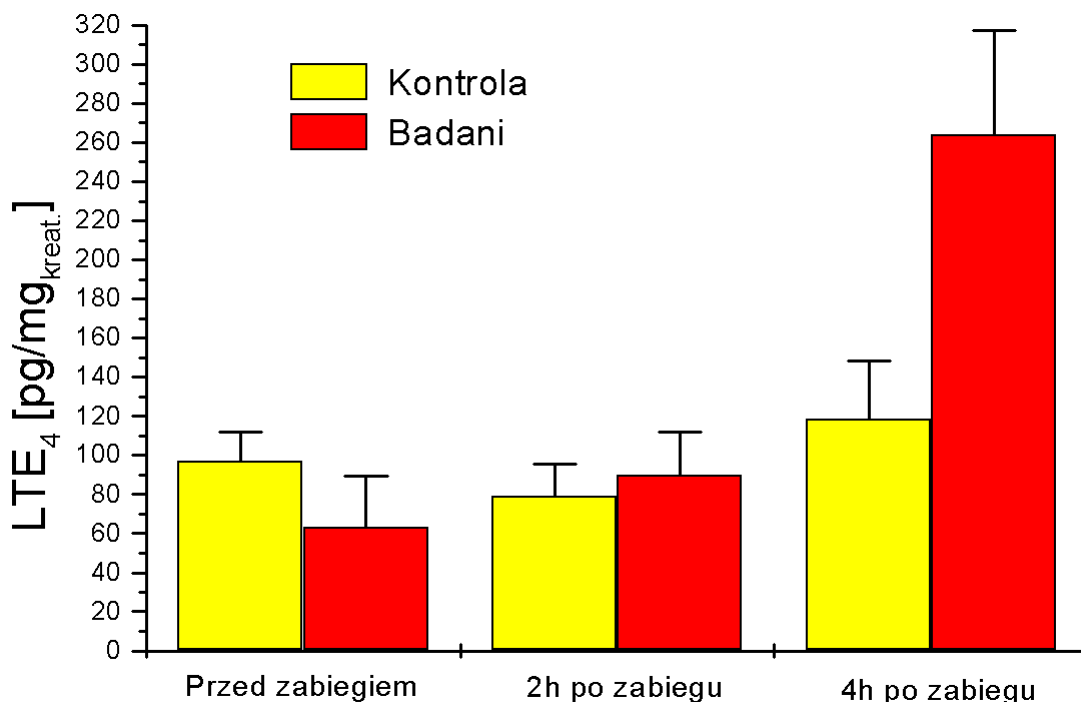
Tabela 13. Charakterystyka grupy kontrolnej i badanej oraz wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu zabiegu przezskórnej angioplastyki na biosyntezę leukotrienów.

Charakterystyka grupy	Kontrola	Badani	P
Liczebność (Kobiety/Mężczyźni)	18 (2/16)	5 (1/4)	IS
Wiek [lata]	60,33 ± 11,49	65,00 ± 11,30	IS
Czas pobrania próbki	uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]		
0h (przed zabiegiem)	97,00 ± 14,72	63,17 ± 26,33	
2h (2h po zabiegu)	79,16 ± 16,34	89,66 ± 22,23	
4h (4h po zabiegu)	118,43 ± 29,59	264,16 ± 52,92* #	

IS – istotne statycznie

* - $p < 0,05$ efekt interwencji wewnątrznaczyniowej, porównując między grupami próbek moczu pobrane 4 godziny po zabiegu (test U-Mann-Whitneya dla danych nieparametrycznych)

- $p < 0,05$ efekt interwencji wewnątrznaczyniowej, porównując w obrębie grupy do próbek moczu pobranych wcześniej (test U-Mann-Whitneya dla danych nieparametrycznych)



Wykres 12. Poziomy uLTE₄ w grupie kontrolnej i badanej w badaniu wpływu zabiegu przezskórnej angioplastyki na biosyntezę leukotrienów.

W grupie pacjentów, którzy mieli wykonywany zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej, w próbkach pobieranych cztery godziny po zabiegu nastąpił istotny wzrost zawartości leukotrienu E₄ w moczu, zarówno wobec wcześniej pobranych próbek w obrębie samej grupy, jak również w odniesieniu do próbek 4h w grupie kontrolnej.

Drugi projekt obejmował ocenę wpływu zileutonu – inhibitora 5-lipoksygenazy na biosyntezę leukotrienów u chorych poddawanych koronarografii i przezskórnej angioplastyce tętnic wieńcowych. Celem tego projektu było sprawdzenie, czy i w jakim stopniu zileuton hamuje biosyntezę leukotrienów w grupie chorych poddawanych zabiegom kardiologicznym oraz czy ta blokada wpływa na akcję serca i może mieć jakieś implikacje w leczeniu pacjentów z tą chorobą.

Wszystkie oznaczenia wykonywane były zgodnie z zasadą podwójnie zaślepionej próby. Charakterystyka badanych grup oraz wyniki oznaczeń przedstawiono w tabelach 14 i 15 oraz na wykresie 13.

Tabela 14. Charakterystyka grup w badaniu wpływu zileutonu na biosyntezę cysLTs.

Charakterystyka grupy	Zileuton (n=61)	Placebo (n=49)	P
Wiek [Lata]	60,7 ± 7,5	59,1 ± 7,8	NS
Kobiety/Mężczyźni	24 (39%) / 37 (61%)	16 (32%) / 34 (68%)	NS
Przezskórna angioplastyka wieńcowa (PCI)	21 (34%)	11 (22%)	NS

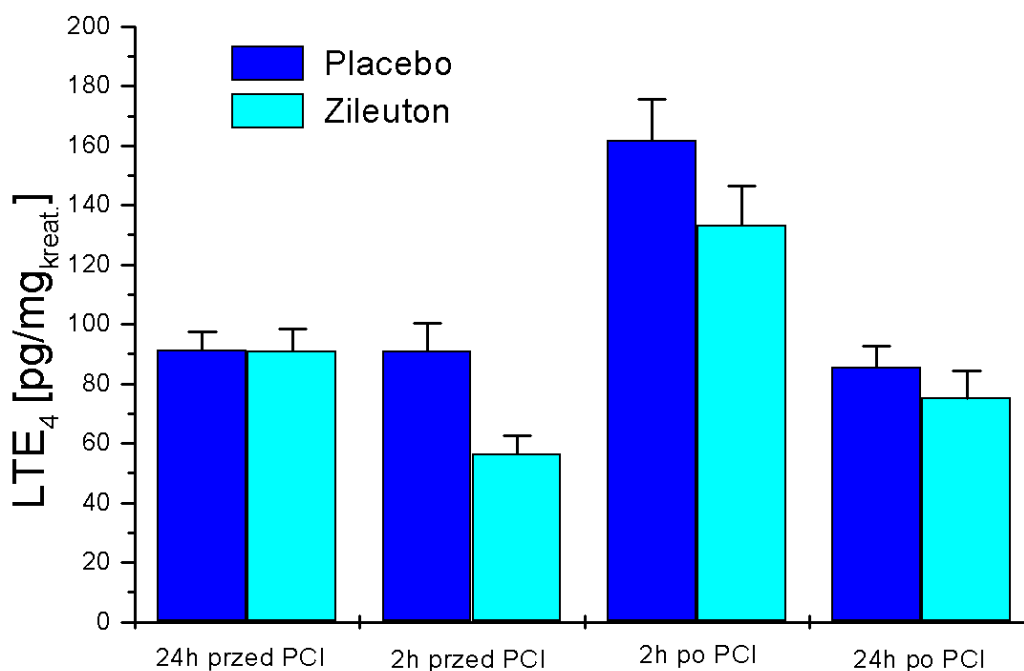
NS – nieistotne statystycznie

Tabela 15. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu zileutonu na produkcję cysLTs.

Czas pobrania próbki	Zawartość uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]	
	Zileuton (n=61)	Placebo (n=49)
24h przed PCI	91,01 [28,17 – 200,19]	91,27 [30,34 – 162,63]
2h przed PCI	56,40 [18,76 – 150,13] ^{* ¶}	90,81 [24,94 – 247,93]
2h po PCI	133,40 [25,29 – 369,39] ^{* &}	161,84 [60,00 – 330,49] [*]
24h po PCI	75,20 [18,16 – 233,66] [*]	85,57 [26,18 – 167,39] [*]

* - p<0,0001 – efekt leczenia, w odniesieniu do wcześniejszej próbki moczu w obrębie grupy,

¶ - p<0,01, & - p<0,05 – efekt działania zileutonu, porównując między grupami próbki pobrane w tym samym czasie.

Wykres 13. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu zileutonu na biosyntezę cysLTs.

Zileuton średnio o 30% obniża ogólnoustrojową produkcję leukotrienów cysteinylowych.

Dla grupy kontrolnej wykonano analizę współczynnika zmienności wewnątrzosobniczej oraz wewnątrzgrupowej. Do analizy wykorzystano wartości uLTE₄ w pierwszej i ostatniej próbie. Powinny to być dwa pomiary tej samej zmiennej – tego samego stanu. Wyznaczone współczynniki przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Współczynniki zmienności wewnątrzosobniczej i wewnątrzgrupowej grupy kontrolnej w badaniu wpływu zileutonu na produkcję cysLTs.

Współczynnik zmienności	Wartość [%]
Wewnątrzosobniczej	7,88
Wewnątrzgrupowej	1,07

Iloraz współczynnika zmienności wewnątrzgrupowej (zewnątrzosobniczej) i wewnątrzosobniczej tzw. zmienność populacyjna, wynosi 0,14. Wartość ta informuje, że dla badanej cechy – ilość leukotrienu w moczu, w obrębie grupy kontrolnej (populacji), występuje niewielka zmienność cechy między osobami, natomiast istnieje duża zmienność dla poszczególnych osób.

4.4. Wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS w grupie chorych na astmę

W badaniu uczestniczyło 38 osób. Uczestnicy badania byli poddawani próbom prowokacyjnym z użyciem aspiryny, celekokoxybu oraz placebo. Dla części pacjentów (12 osób) wykonano kompletne oznaczenia przebiegów czasowych uLTE₄ dla próbek pobranych przed podaniem leku, w chwili podania, oraz dwie i cztery godziny po podaniu. Dla pozostałych osób określono wyjściowe poziomy leukotrienu (w próbkach przed podaniem leku).

Wyniki oznaczeń próbek wyjściowych podzielono ze względu na rozpoznanie typu astmy, która na podstawie wyniku prób prowokacyjnych klasyfikowała pacjenta do jednej z dwóch grup (Tabela 17):

- pacjenci wrażliwi na aspirynę – AIA (*aspirin-intolerant asthma*),
- pacjenci tolerujący aspirynę – ATA (*aspirin-tolerant asthma*).

Tabela 17. Wyniki oznaczeń uLTE₄ w grupie pacjentów ATA oraz AIA.

Liczebność (Kobiety/Mężczyźni)	ATA	AIA
		6 (4/2)
Wiek	44 (21-66)	45 (36-59)
uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]	166,75 (10,74-424,29)	955,64 (118,92-3791,80)*

* - $p < 0,01$ – różnica znacząca statystycznie, w odniesieniu do grupy ATA (Test U-Mann-Whitneya dla danych nieparametrycznych)

Wyniki potwierdziły istotny wzrost ilości wydalanego leukotrienu E₄ u osób z astmą aspirynową po podaniu aspiryny.

Obecnie uLTE₄ jest najlepszym biomarkerem astmy aspirynowej [102, 103]. Są podejmowane próby, aby dokonywać pomiaru leukotrienu E₄ w kondensatach powietrza – mniej skomplikowanej matrycy biologicznej [104, 105], jednakże ze względu na jeszcze mniejsze stężenie LTE₄ (od 1 do 20 pg/ml) i trudności zebraniu większych objętości kondensatu powietrza oddechowego, oznaczenie tego analitu metodą LC/MS stawia znacznie większe wyzwania sprzętowe niż w przypadku oznaczania leukotrienu E₄ w moczu.

4.4. Porównanie oznaczeń LTE₄ w moczu metodami LC/MS i ELISA

Równolegle do oznaczeń LTE₄ wykonanych metodą LC/MS dla części losowo wybranych próbek moczu wykonano oznaczenia powszechnie stosowaną komercyjną techniką ELISA (Leukotriene E₄ EIA Kit, Cayman Chemical).

Korelacja wyników uzyskanych obiema metodami różni się istotnie dla poszczególnych badanych grup (Tabela 18).

Tabela 18. Korelacja wyników LC/MS i ELISA.

Badana grupa	Współczynnik korelacji liniowej Pearsona	Liczba próbek (punktów wspólnych)
Osoby zdrowe	0,1141	31
Osoby z chorobą niedokrwienną serca	0,6139	23
Astmatycy	0,8563	71

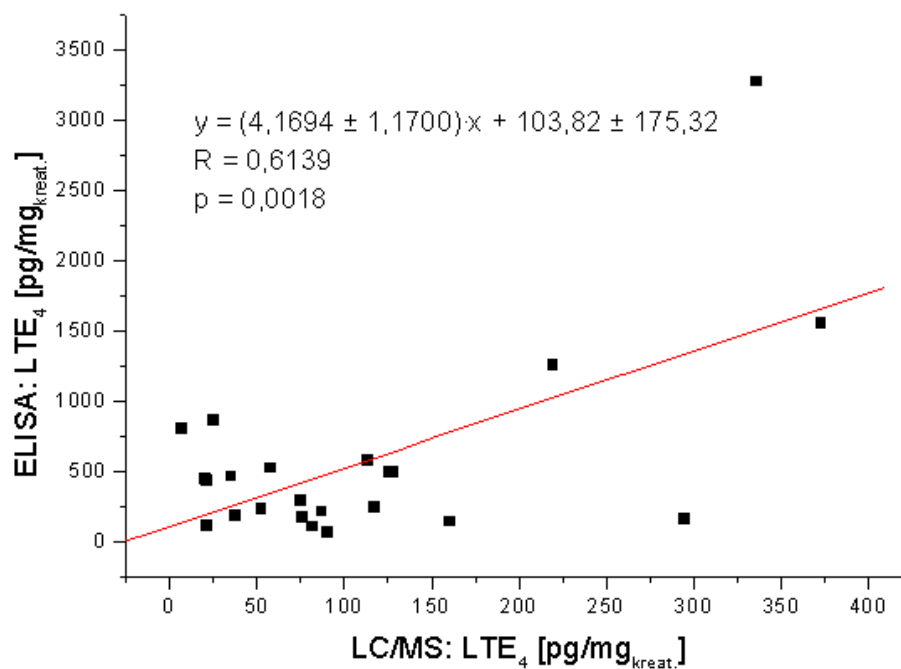
Dla dwóch ostatnich grup wykonano wykresy obrazujące korelację obu metod (Wykres 14, 15).

Dla grupy pacjentów poddawanych zabiegom angioplastycznym korelacje wyników opisuje równanie:

$$y = (4,1694 \pm 1,1700) \cdot x + 103,82 \pm 175,32 \text{ dla } R = 0,6139$$

gdzie: y – wynik oznaczenia uLTE₄ metoda ELISA

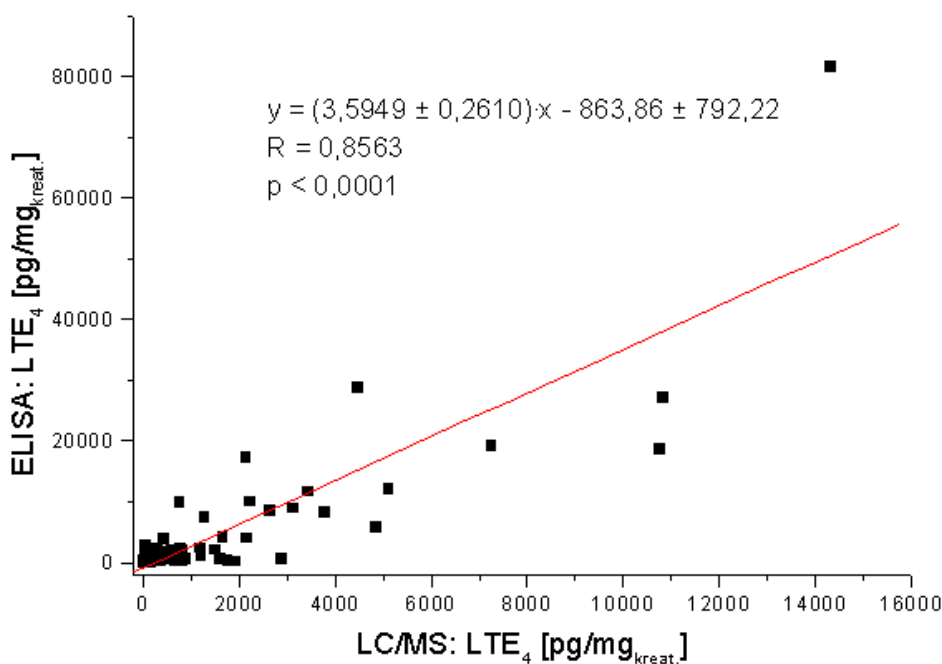
x – wynik oznaczenia uLTE₄ metoda LC/MS



Wykres 14. Korelacja wyników ELISA i LC/MS dla grupy osób z chorobą niedokrwienną serca.

Dla osób chorujących na astmę zależność ta przedstawia się następująco:

$$y = (3,5949 \pm 0,2610) \cdot x - 863,86 \pm 792,22 \text{ R} = 0,8563$$



Wykres 15. Korelacja wyników ELISA i LC/MS dla grupy osób chorych na astmę.

Wyniki oznaczeń leukotrienu E₄ w moczu metodą ELISA są blisko czterokrotnie wyższe od tych, które uzyskano opracowaną metodą LC/MS. Próbę wyjaśnienia rozbieżności w wynikach przedstawiono w punkcie 5.2.

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

5.1. Walidacja metody oznaczania leukotrienów cysteinyłowych z wykorzystaniem spektrometrii masowej i przeciwciał monoklonalnych Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent

5.1.1. Zakres oznaczalności, próg detekcji

Opracowana metoda zapewnia wiarygodne i pewne wyniki oznaczania uLTE₄, jeżeli na kolumnę chromatograficzną wprowadzi się co najmniej 100pg leukotrienu E₄ wyizolowanego z moczu. Przy założeniu odzysku przez przeciwciała na poziomie 60-65%, dolny próg oznaczalności wynosi 6,7 pg/ml moczu. Wyznaczony górny próg wynosił 2000pg/ml - jest to największa ilość leukotrienu, dla której wykonywano analizy z użyciem standardu LTE₄; wartość ta może być zwiększona.

Próg detekcji wynosi 3,3 pg/ml. Obniżenie tej wartości nie jest możliwe ze względu na stałą dysocjacji wiązania przeciwciało-leukotrien wynoszącą 3 pg/ml.

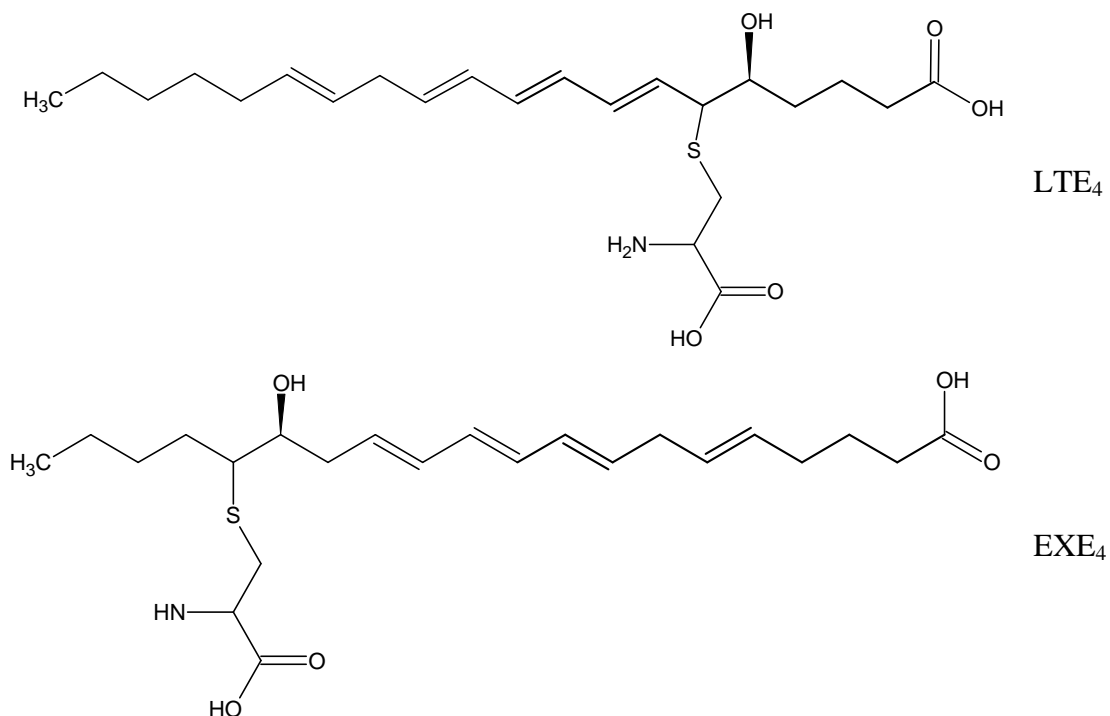
W przedziale 0-200pg/ml uLTE₄ można oznaczać stosując tylko jedną ilość wzorca wewnętrznego. Wartość 200pg/ml nie jest górnym kresem przedziału liniowej zależności analit-wzorzec tylko najwyższą wartością, dla której stwierdzono występowanie takiej zależności. W przypadku wykroczenia poza ten zakres wystarczy zwiększyć ilość wzorca, aby mieć pewność poprawności oznaczenia.

5.1.2. Specyficzność oznaczeń

W czasie całej procedury analitycznej występują trzy etapy, które jednoznacznie identyfikują analit jako LTE₄. Pierwszym jest izolacja z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent wychwytyje wszystkie leukotrieny cysteinyłowe. Kolejny etap zawężający ilość możliwych związków to rozdział chromatograficzny, a ostatnim jest analiza w oparciu o masę cząsteczkową w spektrometrze masowym. Opracowaną metodę można zatem uznać za wysoce swoistą.

Prawdopodobieństwo, że istnieje inny związek, który jest wychwytywany przez Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent i charakteryzuje się tym samym czasem retencji oraz widmem masowym co LTE₄, jest bardzo niskie, wręcz zerowe. Istnieje wprawdzie substancja, która ma identyczną masę jak LTE₄ i której widmo masowe jest takie same,

co LTE₄, tj. eoksyna E₄ (Rysunek 24). Widma MS/MS pozwalają już rozróżnić oba związki.



Rysunek 24. Porównanie wzorów strukturalnych LTE₄ i EXE₄.

EXE₄ ulega jednakże innemu niż LTE₄ rozdziałowi na kolumnie chromatograficznej [60]. Dotychczas nie określono, czy EXE₄ – izomer leukotrienu E₄ wykazuje także powinowactwo do przeciwciał monoklonalnych zawartych w żelu Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent.

5.1.3. Precyzja i dokładność oznaczeń

Przyglądając się już wartościom odchyień standardowych wartości średnich oznaczeń, dostrzec można, że precyzja oznaczeń uLTE₄ metodą LC/MS jest wyższa od precyzji oznaczeń techniką ELISA.

Ze względu na zróżnicowane rozkłady wartości oznaczeń uLTE₄ obiema metodami, porównano współczynniki zmienności - CV (*coefficient of variation*) wartości oznaczeń dla dodatków LTE₄ w moczu w zakresie 20-200pg/ml (Tabela 19).

Tabela 19. Wartości współczynników zmienności oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Współczynnik zmienności – CV [%]	
	LC/MS	ELISA
20	45.90	381.41
50	16.80	193.80
80	---	164.10
100	4.41	108.92
120	---	88.91
150	5.88	96.97
200	4.19	54.50

Precyzja wyników LC/MS jest co najmniej o rząd wielkości wyższa w zestawieniu do rezultatów ELISA.

W badaniu dodatków leukotrienu E₄ w moczu możliwe jest określenie błędów standardowych, ilustrujących dokładność oznaczeń (Tabela 20).

Tabela 20. Błędy standardowe oznaczeń dodatków LTE₄ w moczu.

Dodatek LTE ₄ [pg/ml]	Błąd standardowy [pg/ml]	
	LC/MS	ELISA
20	1,22	53.00
50	0,94	58.00
80	---	26.00
100	3,72	148.00
120	---	33.50
150	10,55	25.00
200	6,57	5.00
Wartość średnia	4,22 ± 4,52	34,64 ± 60,72

Analiza zawartości LTE₄ w moczu metodą LC/MS jest bardziej precyzyjna i dokładna w porównaniu do analizy ELISA.

Oznaczanie uLTE₄ metodą LC/MS jest niewątpliwie bardziej czasochłonne aniżeli analiza z wykorzystaniem zestawu *Leukotriene E₄ EIA KIT*. Opracowana metoda posiada jednakże znaczące zalety. Wiarygodność oznaczeń w niskich zakresach uLTE₄ (poniżej 200pg/ml) jest większa w zestawieniu do oznaczeń techniką ELISA.

Rozdzielczość nowej metody jest także wyższa. Pozwala na wykrycie zmian w stężeniu uLTE₄, które w analizie ELISA mogą być niezauważalne ze względu na wysoki błąd, przede wszystkim dla niższych stężeń LTE₄ w moczu. Metoda LC/MS pozwoliła zaobserwować, że poziom leukotrienu E₄ w moczu jest niższy u zdrowych mężczyzn w porównaniu do zdrowych kobiet.

Dodatkowo precyzja i dokładność pomiarów nie jest tak silnie zależna od matrycy jak w przypadku metody ELISA. Zmiana matrycy z wody na mocz pogarsza istotnie precyzję i dokładność oznaczeń ELISA.

Przykłady klinicznego wykorzystania zalet opracowanej metody przedstawiono w rozdziale 4. Dzięki powtarzalności pomiarów stwierdzono, że:

- poziom uLTE₄ u osób zdrowych jest niższy niż u osób chorujących na astmę.
- osoby z astmą aspirynową mają wyższą zawartość LTE₄ w moczu w porównaniu do astmatyków niewrażliwych na aspirynę.
- zileuton średnio o 30% zmniejsza produkcję leukotrienów cysteinylowych, co jest zgodne w innymi badaniami [106]. W przypadku pacjentki chorej na astmę aspirynową zaobserwowano także, że zileuton istotnie obniżał poziom uLTE₄ [107]. Osoba ta wykazywała bardzo nasiloną reakcję po prowokacji kwasem acetylosalicylowym. Poziom uLTE₄ wyjściowych próbek kształtował się w przedziale 2876,47 – 4388,14 pg/mg kreatyniny, w wyniku prowokacji wzrósł do 14310,89 pg/mg kreatyniny. Po rozpoczęciu przyjmowania zileutonu wartość ta obniżyła się do poziomu 46,18 pg/mg kreatyniny, a następnie do 25,18 pg/mg kreatyniny. W efekcie zaprzestania podawania leku zawartość leukotrienu E₄ wzrosła do 1761,88 pg/mg kreatyniny.
- u osób z chorobą wieńcową obserwowany jest podniesiony poziom leukotrienu E₄ w moczu w porównaniu do osób zdrowych.
- zabieg przezskórnej angioplastyki wieńcowej podnosi średnio o 40% poziom uLTE₄ w pierwszych godzinach po interwencji.

5.2. Porównanie pomiarów LTE₄ w moczu metodami LC/MS i ELISA

Wyniki oznaczeń próbek pacjentów z astmą oraz chorobą wieńcową metodą ELISA są blisko czterokrotnie wyższe od tych, które uzyskano opracowaną metodą LC/MS. Podobną zależność potwierdzają dane literaturowe - wyniki oznaczeń uLTE₄ metodą ELISA dla tych samych grup badanych są wyższe aniżeli te otrzymane metodą RIA czy też spektrometrii masowej [punkt 5.3].

Próbie wyjaśnienia tak znaczących różnic w korelacji ELISA–LC/MS w zależności od zawartości uLTE₄ zaprezentowano poniżej.

ELISA daje wiarygodne wyniki, jeżeli zawartość uLTE₄ przekracza 150pg/ml. Dla niższych wartości immobilizowane przeciwciała monoklonalne najprawdopodobniej wychwytyją inne składniki moczu, dając błędne – zawyżone wyniki oznaczeń. Wraz ze wzrostem stężenia leukotrienu w moczu to niepożądane powinowactwo do innych cząstek obecnych w nim ma już mniejszy wpływ na oznaczenie, najprawdopodobniej dzięki kompetycji z cząsteczkami LTE₄. Jeżeli leukotrien był rozpuszczony w wodzie, wówczas wyniki były zaniżone względem oznaczeń w układzie LC/MS. W wodzie brak jest artefaktów mających powinowactwo do przeciwciał, a możliwe, że zmniejszenie siły jonowej środowiska reakcji antygen-przeciwciało, powoduje zmniejszone wiązanie analitu w takim eksperymencie.

Poprawa współczynnika korelacji wyników oznaczenia LTE₄ w moczu otrzymanych obiema metodami wraz ze zwiększaniem się zawartości leukotrienu jest często spotykanym zjawiskiem w analityce, bowiem zmniejsza się wtedy udział niekontrolowanych w warunkach oznaczenia ELISA czynników zakłócających. Są nimi najczęściej inne cząsteczki wykazujące swoistą reaktywność krzyżową z przeciwciałem albo niespecyficzna adsorpcja reagentów zestawu do oznaczeń, która powoduje zaburzenie liniowości metody i zawyżone wyniki w przypadku niewielkiego stężenia analitu.

5.3. Porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi

Uzyskane wyniki oznaczenia leukotrienu E₄ w moczu zestawiono z danymi literaturowymi dotyczącymi zawartości tego metabolitu w moczu. Ze względu na wspomniane rozbieżności wyników oznaczeń metodą ELISA, starano się przede

wszystkim skonfrontować rezultaty badań z tymi pracami, w których wykorzystywano metodę spektrometrii mas.

Wyszukano w sumie 12 prac z ostatnich 15 lat, w których oznaczenia leukotrienu E₄ w moczu wykonano za pomocą najróżniejszych technik spektrometrii masowej. Wyniki te odnosiły się z reguły do jednostek chorobowych niebadanych w tej pracy np. choroba Leśniowskiego-Crona (przewlekłe ziarniakowate zapalenie jelit), atopowe zapalenie skóry czy cukrzyca typu pierwszego. Dlatego zdecydowano się na porównanie z wynikami osób zdrowych, które w przypadku sześciu prac stanowiły grupę kontrolną.

W pracach [108-114] zestawionych w tabeli 21 oznaczenia uLTE₄ dokonano wykorzystując wzorzec wewnętrzny – deuterowany leukotrien E₄, natomiast w ostatniej [99] oznaczenie wykonano w oparciu o krzywą kalibracyjną.

Tabela 21. Wyniki oznaczenia uLTE₄ dla osób zdrowych techniką spektrometrii masowej.

Źródło	Charakterystyka grupy		Zawartość uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]	Technika oczyszczania	Układ pomiarowy
	Liczebność (Kobiety/Mężczyźni)	Wiek			
108	30 (17/13)	34 (23-60)	32,3 (21,8-58,58)	Sep-Pak	LC/MS/MS
109	28 (16/12)	38,5 (23-59)	25,5 (13,9-54,1)	Sep-Pak	LC/MS/MS
110	13	28 (22-39)	56,6 ± 16,0	Sep-Pak	LC/MS/MS
111	10	72 ± 4	59 ± 54	Sep-Pak	LC/MS/MS
112	17 (5/12)	25 (22-38)	60 ± 19 (36-91)	Sep-Pak	LC/MS/MS
113	10	brak danych	61,3 ± 18,7	LC	LC/MS/MS
114	11	brak danych	66,06 ± 38,86	Sep-Pak	GC/MS/MS
99	1	brak danych	155,5 pg/ml brak informacji o zawartości kreatyniny	LC	LC/MS/MS

Otrzymany w przeprowadzonym badaniu wynik **32,72 ± 25,10** pg/mg kreatyniny (n=50) w granicach błędu jest zgodny ze wszystkimi wyżej cytowanymi wynikami. Wyniki są wysoce zgodne w przypadku dwóch pierwszych cytowanych badań [108, 109], dla których liczebność, skład i wiek członków grup kontrolnych są najbardziej zbliżone do grupy zdrowych uczestniczących w badaniu.

Wyniki badania [114] 66,06 ± 38,86 pg/mg kreatyniny należy traktować z dużą ostrożnością. Analiza leukotrienu z użyciem chromatografii gazowej jest bardzo

problematiczna. Leukotrien E₄ jest związkiem nietrwałym termicznie, z reguły ulega rozpadowi już na samym początku kolumny chromatograficznej.

W badaniu przedstawionym w publikacji [110] wykonane przy pomocy układu LC/MS/MS oznaczenia uLTE₄ dotyczyły także grupy 14 astmatyków (5 kobiet i 9 mężczyzn w wieku 33-71 lat), którzy nie byli wrażliwi na aspirynę –ATA. Podawany wynik 192 ± 122 pg/mg kreatyniny potwierdza wiarygodność uzyskanych rezultatów dla analogicznej grupy $166,75$ pg/mg kreatyniny (10,74-424,29) n= 6.

Dokonano także analizy wyników [86, 115-118] pomiaru uLTE₄ u osób zdrowych, astmatyków oraz osób z chorobą niedokrwienną serca w oparciu o techniki radioimmunologiczne (RIA) (Tabela 22).

Tabela 22. Wyniki oznaczenia uLTE₄ techniką RIA.

Źródło	Grupa	Charakterystyka grupy		Zawartość uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]
		Liczebność (Kobiety/Mężczyźni)	Wiek	
115	Zdrowi	12 (6/6)	54 ± 16	28 ± 16
116	Zdrowi	19	3-15 mies	128,24 (85,50 – 256,49)
117	AIA	12 (9/3)	36,7	350 ± 120
				610 ± 270 po podaniu ASA
118	IHD	10 (6/4)	61-78	$34,9 \pm 7,1$
				$24,5 \pm 4,7$ po rewaskularyzacji
86	ATA	184	15-54	144,9 (120,3 – 174,5)

IHD – choroba niedokrwienna serca

Powyższe wyniki są zgodne z otrzymanymi z wykorzystaniem spektrometrii masowej. Wyniki oznaczeń w moczu LTE₄ metodą RIA oraz różnych technik spektrometrii masowej są wysoce wiarygodne.

Dla porównania podobną analizę przeprowadzano dla wyników [119-125] oznaczeń uLTE₄ wyznaczonych metodą ELISA (Tabela 23).

Tabela 23. Wyniki oznaczenia uLTE₄ metodą ELISA u osób zdrowych oraz astmatyków.

Źródło	Grupa	Charakterystyka grupy		Oczyszczanie moczu	Zawartość uLTE ₄ [pg/mg _{kreat.}]	
		Liczebność (Kobiety/Mężczyźni)	Wiek			
119	Zdrowi	28	10,5	Brak	189 (51-253,2)	
120	AIA NP	10	22-49	Brak	432,3 ± 88,1	
	AIA	24	18-56		330,7 ± 72,3	
	Astma	39	18-66		129,1 ± 74,8	
	Zdrowi	34	19-57		66,5 ± 20,6	
121	AIA	64 (41/23)		C18HD HPLC	227,2 (30,9-1465,7)	
	ATA	73 (35/38)			90,3 (16,5-915,8)	
122	AIA	118 (61/57)	67	41,8 ± 11,9 (25-70)	Brak	433,0 ± 361,7
			51			858,0 ± 471,6
	ATA					333,1 ± 202,8
			318,0 ± 198,7			
123	Zdrowi	30 (9/21)		Brak	55,9 ± 18,9	
	Astma	40 (14/26)			125,6 ± 54,5	
124	AIA	65 (41/24)		Brak	1420,9 ± 1185,9	
	ATA	66 (39/27)			428,8 ± 337,5	
	Zdrowi	50 (33/17)			336,8 ± 191,1	
125	AIA	16 (9/7)		HPLC	717 ± 274	

AIA NP - osoby wrażliwe na aspirynę, z polipem nosa (*aspirin induced asthma with nasal polyps*)

Rozbieżności wyników dla powyższych badań są bardzo duże. Przykładowo dla badania [121] zawartość leukotrienu E₄ w moczu w grupie AIA jest niższa aniżeli osób zdrowych w badaniu [124].

Bardzo duży wpływ na wynik oznaczenia uLTE₄ przy użyciu technik immunoenzymatycznych ma przygotowanie próbki moczu do oznaczenia. Wyniki ELISA w przypadku wstępnego oczyszczenia na kolumnie adsorpcyjnej SEP-PAK lub C18HD cartridge są bardziej zbliżone do LC/MS. Dlatego nie można bezpośrednio porównywać wyników bez znajomości sposobu przygotowania próbki. Powoduje to także trudności w porównywaniu wyników opublikowanych przez różne grupy badawcze, a w konsekwencji kwestionowanie przydatności oznaczeń uLTE₄ jako biomarkera chorób o podłożu zapalnym przebiegających z nadprodukcją leukotrienów

cysteinylowych. Pozostałe leukotrieny cysteinyłowe – C₄, D₄ ze względu na swoją reaktywność nie są dobrymi biomarkerami. Także analiza LTE₄ w innych materiałach biologicznych, jak krew czy osocze, nie jest dobrym rozwiązaniem. Są to matryce zawierające znacznie więcej czynników zakłócających i utrudniających analizę. Próbki takie wymagają odbiałczania, co wiąże się ze stratami analitu. Pobieranie materiału - krwi/osocza - jest inwazyjne; także zawartość analitu w jednostce objętości jest niska, co wymusza pobranie większej ilości próbki.

5.4. Możliwości modyfikacji metody LC/MS

Jak pokazano w punkcie 5.1.1. nie można obniżyć progu detekcji LTE₄ poniżej 3pg/ml. Można natomiast zmniejszyć objętość moczu, z której ekstrahuje się leukotrien. W Pracowni Spektrometrii Masowej II Katedry Chorób Wewnętrznych od niedawna jest nowy spektrometr mogący oznaczać mniejsze ilości analitu. To potrójny kwadrupol o wyższej czułości, który w odróżnieniu od pułapki jonowej pozwala na szybszą i bardziej wydajną analizę MS/MS. Urządzenie to umożliwia jednoczesną analizę wielu związków w trybie MS/MS bez straty liczby jonów, jak to ma miejsce w pułapce jonowej. Ten tryb analizy istotnie obniża poziom tła. To wszystko pozwala na zmniejszenie objętości próbki moczu do 5-10ml. Wykorzystanie autosamplera pozwoliłoby na skrócenie czasu pracy – przyspieszenie analizy próbek.

6. WNIOSKI

1. Z powodzeniem opracowano nową metodę oznaczania leukotrienu E₄ w moczu, wykorzystującą przeciwciała monoklonalne (Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent), dodatek wzorca wewnętrznego oraz chromatografię cieczową sprzężoną z spektrometrią mas.
2. Nowa metoda umożliwia oznaczanie wydalanego leukotrienu E₄ w moczu, jeśli jego stężenie przekracza 6,7 pg/ml. Górna granica zakresu oznaczalności wynosi 2000 pg/ml, natomiast w przedziale 0-200 pg/ml można stosować jeden, ten sam dodatek wzorca wewnętrznego. Otrzymywane wyniki są wiarygodne, precyzyjne i dokładne. Wysoka czułość metody pozwoliła na zaobserwowanie hamowania biosyntezy leukotrienów przez zileuton – inhibitor 5-lipoksygenazy. Odzysk leukotrienu E₄ z moczu przez przeciwciała monoklonalne wynosi 60-65%.
3. Wyznaczony metodą LC/MS przedział wartości referencyjnych ilości LTE₄ wydalanego w moczu osób zdrowych wynosi 5,69 – 119,42 pg/mg kreatyniny. Wartość ta jest znamienne wyższa w przypadku osób chorujących na astmę. Dodatkowo potwierdzono, że u osób z astmą aspirynową stężenie LTE₄ w moczu jest większe niż u chorych na astmę dobrze tolerujących aspirynę. W grupie osób z chorobą niedokrwienną serca zaobserwowano wzrost ilości wydalanego LTE₄ w odniesieniu do osób zdrowych. Poziom ten wzrasta przejściowo o 40% po interwencji wieńcowej.
4. Metoda LC/MS daje wyniki zgodne z wynikami ELISA dla poziomów LTE₄ w moczu wyższych od 200pg/ml. Jeżeli stężenie wydalonego leukotrienu jest mniejsze wówczas wiarygodność wyników ELISA zmniejsza się, a współczynnik zmienności i błąd standardowy oznaczeń techniką LC/MS są z reguły o rząd wielkości niższe w odniesieniu do oznaczeń ELISA.

7. STRESZCZENIE

Leukotrieny należą, obok prostaglandyn i tromboksanu A_2 , do grupy biologicznie czynnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych pochodnych kwasu arachidonowego, współtworzące fosfolipidy błon komórkowych. Leukotrieny cysteinylowe powodują wiele efektów patofizjologicznych min. skurcz oskrzeli i zwiększenie ich nadreaktywności, zwiększenie przepuszczalności naczyń włosowatych, wzmożoną produkcję śluzu, mają działanie chemotaktycznie. Ich produkcja jest zwiększona w wielu chorobach takich jak: astma oskrzelowa, uogólnione stany zapalne i zakażenia, zespół ostrej niewydolności oddechowej.

Wiarygodne i powtarzalne określenie ilości produkowanych leukotrienów cysteinylowych może być pomocne zarówno w rozpoznaniu i ocenie stanu zaawansowania choroby jak i monitorowaniu skuteczności zastosowanego leczenia. Dotychczas pomiary stężenia LTE_4 przeprowadzono w takich materiałach biologicznych jak osocze krwi, popłuczyny oskrzelikowo-płucne, kondensat wydychanego powietrza i w moczu. Posługiwano się zazwyczaj pośrednimi metodami pomiarowymi polegającymi na wykorzystaniu przeciwciał swoiście wiążących leukotrieny cysteinylowe. Mimo zadowalającej czułości tych metod obarczone są one błędami pomiarowymi. Celem tej pracy było opracowanie metodyki oznaczania leukotrienu cysteinylowego E_4 w próbkach moczu, optymalizacja i standaryzacja tej metody oraz jej praktyczne wykorzystanie do pomiaru LTE_4 u chorych na astmę, choroby układu krążenia oraz osób zdrowych.

Materiał do badań stanowiły próbki moczu pobierane od pacjentów uczestniczących w badaniach naukowych prowadzonych w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJ CM oraz od osób zdrowych. Do mieszaniny równych objętości moczu i PBS dodano standard wewnętrzny d_3 - LTE_4 oraz zawiesiny mikrocząstek sefarozy opłaszczonych mysimi przeciwciałami monoklonalnymi *Cysteinyl-Leukotriene Affinity Sorbent*. Po przemyciu PBSem immunosorbent zawieszono w schłodzonym metanolu. Nadsącz metanolu, który wypłukuje z immunosorbentu leukotrieny związane z przeciwciałem, analizowano w układzie LC/MS. Układ ten stanowił wysokosprawny chromatograf cieczowy z odwróconym układem faz połączony z spektrometrem masowym LCQ Advantage z źródłem jonów typu *electrospray* i pułapką jonową jako analizatorem. Zawartość LTE_4 wyznaczono porównując intensywności integralne pików

chromatograficznych dla wzorca i analitu. Wyniki oznaczeń wyrażano w ilości LTE₄ na miligram kreatyniny.

Z powodzeniem opracowano metodę oznaczania leukotrienów cysteinylowych w moczu z wykorzystaniem spektrometrii masowej i przeciwciał monoklonalnych, oraz zastosowano ją w badaniach klinicznych. Opracowana metoda zapewnia wiarygodne i pewne wyniki oznaczania uLTE₄. Przedział oznaczalności wynosi 6,7-2000 pg LTE₄/ml moczu, próg detekcji 3,3 pg/ml. W przedziale 0-200pg/ml uLTE₄ można oznaczać analit stosując tylko jedną ilość wzorca wewnętrznego.

W grupie 50 zdrowych dorosłych osób (29 kobiet i 21 mężczyzn, o średniej wieku 31,4), średnie stężenie LTE₄ w moczu wynosi $32,72 \pm 25,10$ pg/mg kreatyniny, a przedział wartości referencyjnych stężenia LTE₄ w moczu 5,69 – 119,42 pg/mg kreatyniny. U osób z chorobą wieńcową stwierdzono, że zabieg przezskórnej angioplastyki podnosi średnio o 40% poziom uLTE₄ w pierwszych godzinach po interwencji. Badając wpływ ziletonu – inhibitora 5-lipoksygenazy, na biosyntezę leukotrienów u 110 osób (49 grupa kontrolna/61 grupa badana) poddawanych koronarografii i przezskórnej angioplastyce tętnic wieńcowych, wykazano, że zileton obniża średnio o 30% produkcję leukotrienów cysteinylowych. W grupie 38 astmatyków potwierdzono, zwiększone wydalanie LTE₄ w moczu w porównaniu do osób zdrowych. Stężenie uLTE₄ u osób dobrze tolerujących aspirynę jest niższe niż u osób z astmą aspirynową, u których po prowokacji kwasem acetylosalicylowym następuje wzmożona biosynteza leukotrienów.

Walidację nowej metody dokonano w oparciu o oznaczenia znanych ilości leukotrienu w wodzie i moczu. Wyniki te porównano z oznaczeniami wykonanymi powszechnie stosowaną komercyjną techniką ELISA. Na podstawie tych danych stwierdzono, że analiza zawartości LTE₄ w moczu metodą LC/MS jest bardziej precyzyjna i dokładna w porównaniu do analizy ELISA. Dla stężeń leukotrienu E₄ w moczu poniżej 200pg/ml moczu, precyzja wyników LC/MS jest o co najmniej o jeden rząd wielkości wyższa, a błędy standardowe średnio o rząd wielkości niższe w zestawieniu do rezultatów ELISA. Opracowaną metodę należy uznać za wysoce swoistą. W trakcie całej procedury analitycznej, występują trzy etapy, które jednoznacznie identyfikują analit jako LTE₄. To wszystko sprawia, że metoda LC/MS oznaczeń uLTE₄ jest wiarygodna. Dodatkowo precyzja i dokładność pomiarów nie jest

tak silnie zależna od matrycy biologicznej, jak w przypadku ELISA. Rozdzielczość nowej metody jest także wyższa. Pozwala na wykrycie zmian w stężeniu uLTE₄, które w analizie ELISA mogą być niezauważalne.

8. SUMMARY

Leukotrienes together with prostaglandins and thromboxane A₂ are biologically active, polyunsaturated derivatives of arachidonic acid, present in the phospholipids of cells membrane. Cysteinyl leukotrienes cause many pathophysiological effects: bronchial hyperreactivity and bronchospasm, increased microvasculare permeability, mucous secretion, and are chemoattractants to the inflammatory cells. Their production is increased in such diseases as: bronchial asthma, inflammation, infection, or acute respiratory distress syndrome.

Reliable and reproducible estimation of cysteinyl leukotrienes biosynthesis is useful in detection and evaluation of diseases and also in monitoring of treatment's efficacy. Measurements of LTE₄, the end metabolite of cysteinyl leukotrienes, were accomplished in several biological materials: blood serum, bronchoalveolar lavage fluid, exhaled breath condensate and urine. Usually indirect methods of measurement were used, based on leukotrienes-specific antibodies. Despite high sensitivity of these methods, they are prone to many measurement errors. The aim of this work was to develop, characterize and validate a new method of quantitative analysis of LTE₄, and to test its practical application among patients with asthma, ischemic heart disease and healthy subjects.

Biological materials used in the present work were urine samples from patients enrolled in clinical studies conducted at II Department of Internal Medicine Jagiellonian University Medical College. Samples of urine were pH adjusted and spiked with the deuterated internal standard (d₃-LTE₄) for extraction using cysteinyl leukotriene affinity sorbent coated with specific monoclonal antibodies. The analyte was eluted from the pelleted resin and resuspended in methanol. Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). The LC/MS system consisted of a reversed phase column connected to the LCQ Advantage mass spectrometer equipped with electrospray ion source and ion trap as an analyzer. LTE₄ concentration was calculated by comparison of integral intensities of chromatographic peaks corresponding to the analyte and to the internal standard. LTE₄ concentrations were expressed as pg/mg of creatinine.

The method of quantitative analysis of cysteinyl leukotrienes in urine based on immunoaffinity extraction and mass spectrometry and was successfully developed and

proved useful in clinical research. The method provides reliable and reproducible results of LTE_4 measurement. The assay range is 6.7-2000 pg LTE_4 /ml of urine and the detection limit is 3.3 pg/ml. Single amount of internal standard can be used to determine uLTE_4 in the range of 0-200pg/ml.

In the group of 50 healthy adults (29 women and 21 men of average age of 31.4) the mean uLTE_4 concentration is 32.72 ± 25.10 pg/mg of creatinine. The range of reference values of LTE_4 in urine is 5.69 – 119.42 pg/mg of creatinine.

Among patients with ischaemic heart disease, whom percutaneous coronary intervention was performed, an increase of average 40% uLTE_4 concentration within first hours after the procedure was noted. During investigation of the 5-LO inhibitor – zileutone on leukotrienes biosynthesis, based on 110 observations of patients with coronary artery disease (49 control group/61 investigated group), it was shown that this drug decreased on average 30% the production of leukotrienes. In addition, increased systemic biosynthesis LTE_4 was documented by uLTE_4 excretion measurements in the group of 38 asthmatic patients. A distinct phenotype of bronchial asthma – aspirin-sensitive asthma, was found to correlate with elevated concentration of LTE_4 in urine, by comparison with asthmatics who tolerated aspirin well..

The validation of LC/MS method was performed using the model samples prepared by dissolving of known amount of LTE_4 in the water and urine. Results obtained by the method were compared the commercial immunoenzymatic (ELISA) Kit. On the basis of comparison results, LC/MS method of measurement of uLTE_4 was found more accurate and precise than ELISA. In case of uLTE_4 concentration lower than 200pg/ml of urine, the precision of LC/MS results was at least 10 times higher, and the standard error is on average 10 times less than using ELISA measurements. LC/MS method should be also considered as very specific. During the whole analytical procedure there are three steps that identify the measured analyte as LTE_4 . It causes LC/MS method of uLTE_4 measurement very reliable. Moreover, the precision and accuracy of analysis is less sensitive to biological matrix interference in comparison with ELISA. The resolution of LC/MS method is high enough to detect changes in uLTE_4 concentration, which can be overlooked using ELISA.

10. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

5,6-diHETE	kwask 5,6-dihydroksyeikozatetraenowy
12-LO	12-lipoksygenaza
15-LO	15-lipoksygenaza
5-HETE	kwask 5-hydroksyeikozatetraenowy
5-HPETE	kwask 5(S)-hydroperoksy-6-trans-8,11,14-cis-eikozatetraenowy
5-LO	5-lipoksygenaza
AA	kwask arachidonowy
AchE	achetylocholinoesteraza
ACN	acetonitryl
AcOH	kwask octowy
AIA	astma z nadwrażliwością na aspirynę (<i>aspirin-intolerant asthma</i>)
AIA NP	astma z nadwrażliwością na aspirynę z polipem nosa
ASA	kwask acetylosalicylowy, aspiryna
ATA	astma z tolerancją na aspirynę (<i>aspirin-tolerant asthma</i>)
ATP	adenozynotryfosforan
BAL	popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan
CC	koronarografia (<i>coronary catheterization</i>)
COX	cyklooksygenaza
CV	współczynniki zmienności (<i>coefficient of variation</i>)
cysLTR	receptor leukotrienów cysteinylowych
cysLTs	leukotrieny cysteinylowe
EC	numer enzymu (<i>enzyme commission, enzyme catalogue</i>)
ELISA	oznaczenie metodą enzymatyczną immunoabsorbpcji (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EXC ₄	eoksyna C ₄
EXD ₄	eoksyna D ₄
EXE ₄	eoksyna E ₄
FLAP	białko aktywujące 5-lipoksygenazę (<i>5-lipoxygenase activating protein</i>)
fMLP	formylometioninoleucynofenyloalanina
GC	chromatografia gazowa
GPCR	receptor sprzężony z białkiem G (<i>G-protein-coupled receptor</i>)
GSH	glutation

HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IHD	choroba niedokrwienna serca (<i>ischaemic heart disease</i>)
IL	interleukina
LC	chromatografia cieczowa
LC/MS	chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrią mas
LTA ₄	leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotrien B ₄
LBT	receptor leukotrienu B ₄
LTC ₄	leukotrien C ₄
LTE ₄	leukotrien E ₄
m/z	współczynnik masy i ładunku jonu
MAPEG	białka błonowe uczestniczące w metabolizmie eikozanoidów i glutationu (<i>membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>)
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MGST	transferaza glutationu
MRP	białko błonowe (<i>membrane protein</i>)
MS	spektrometria mas, spektrometr masowy
MS/MS	tandemowa spektrometria mas
PAF	czynnik aktywujący płytki krwi (<i>platelet-activating factor</i>)
PBS	roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami
PCI	przezskórna angioplastyka wieńcowa (<i>percutaneous coronary intervention</i>)
PDB	protein data bank
PGE	prostaglandyna E
PKA	kinaza A
RIA	metody radioimmunologiczne
SD	odchylenie standardowe
SIM	tryb monitorowania pojedynczego jonu (<i>single ion monitoring</i>)
SRS-A	wolno działające substancje w anafilaksji
TFA	kwask trifluoroctowy
uLTE ₄	leukotrien E ₄ zawarty w moczu

12. SPIS TABEL

Tabela 1.	Charakterystyka leukotrienu E ₄	29
Tabela 2.	Ustawienia spektrometru masowego (LCQ Advantage, Thermo Finnigan)	30
Tabela 3.	Układ faz w rozdziale gradientowym	32
Tabela 4.	Przygotowanie dodatków LTE ₄ w wodzie i moczu oznaczanych metodą LC/MS	38
Tabela 5.	Przygotowanie dodatków LTE ₄ w wodzie i moczu oznaczanych metodą ELISA	39
Tabela 6.	Zawartości kreatyniny w próbkach moczu użytych do analizy dodatków LTE ₄	39
Tabela 7.	Zależność intensywności integralnej od ilości analizowanego LTE ₄ . W nawiasach podano liczbę przeprowadzonych pomiarów	42
Tabela 8.	Wartości intensywności integralnej dla wzorca wewnętrznego d ₃ -LTE ₄	45
Tabela 9.	Wyniki oznaczeń znanych ilości LTE ₄ rozpuszczonego w wodzie metodą LC/MS oraz ELISA	46
Tabela 10.	Wyniki oznaczeń dodatków LTE ₄ w moczu metodą ELISA	47
Tabela 11.	Wyniki oznaczeń dodatków LTE ₄ w moczu metodą LC/MS	49
Tabela 12.	Wyniki oznaczenia uLTE ₄ metodą LC/MS w grupie osób zdrowych	50
Tabela 13.	Charakterystyka grupy kontrolnej i badanej oraz wyniki oznaczeń uLTE ₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu zabiegu przezskórnej angioplastyki na biosyntezę leukotrienów	54
Tabela 14.	Charakterystyka grup w badaniu wpływu ziletonu na biosyntezę cysLTs	56
Tabela 15.	Wyniki oznaczeń uLTE ₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu ziletonu na produkcję cysLTs	56
Tabela 16.	Współczynniki zmienności wewnątrzsobniczej i wewnątrzgrupowej grupy kontrolnej w badaniu wpływu ziletonu na produkcję cysLTs ...	57
Tabela 17.	Wyniki oznaczeń uLTE ₄ w grupie pacjentów ATA oraz AIA	58
Tabela 18.	Korelacja wyników LC/MS i ELISA	58
Tabela 19.	Wartości współczynników zmienności oznaczeń dodatków LTE ₄ w moczu	63
Tabela 20.	Błędy standardowe oznaczeń dodatków LTE ₄ w moczu	63
Tabela 21.	Wyniki oznaczenia uLTE ₄ dla osób zdrowych techniką spektrometrii masowej	66
Tabela 22.	Wyniki oznaczenia uLTE ₄ techniką RIA	67
Tabela 23.	Wyniki oznaczenia uLTE ₄ metodą ELISA u osób zdrowych oraz astmatyków	68

12. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1.	Zależność intensywności integralnej od ilości LTE ₄	42
Wykres 2.	Wyniki oznaczeń metodą LC/MS oraz ELISA znanych ilości LTE ₄ rozpuszczonych w wodzie	46
Wykres 3.	Wyniki oznaczeń metodą ELISA dodatków LTE ₄ (0-2000 pg/ml) w moczu	48
Wykres 4.	Wyniki oznaczeń metodą ELISA dodatków LTE ₄ (0-200 pg/ml) w moczu	48
Wykres 5.	Wyniki oznaczeń metoda LC/MS dodatków LTE ₄ w moczu	49
Wykres 6.	Porównanie wyników oznaczeń dodatków LTE ₄ w moczu metodą ELISA i LC/MS	50
Wykres 7.	Stężenie LTE ₄ w moczu osób zdrowych	51
Wykres 8.	Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu osób zdrowych (n=50). Szereg rozdzielczy - 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego	51
Wykres 9.	Histogram przekształconych wyników oznaczeń leukotrienu w moczu osób zdrowych (n=50). Szereg rozdzielczy - 0,2. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego	52
Wykres 10.	Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu zdrowych kobiet (n=29). Szereg rozdzielczy- 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego. Rozkład nie zgodny z rozkładem normalnym p= 0,028; po przekształceniu (logarytmowaniu) wyników p= 0,310 ..	53
Wykres 11.	Histogram wyników oznaczeń leukotrienu w moczu zdrowych mężczyzn (n=21). Szereg rozdzielczy- 10. Linia czarna obrazuje krzywą rozkładu normalnego. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym p=0,240 (test Shapiro-Wilka). Po przekształceniu (logarytmowaniu) wyników p= 0,302	53
Wykres 12.	Poziomy uLTE ₄ w grupie kontrolnej i badanej w badaniu wpływu zabiegu przezskórnej angioplastyki na biosyntezę leukotrienów	55
Wykres 13.	Wyniki oznaczeń uLTE ₄ metodą LC/MS w badaniu wpływu zileutonu na biosyntezę cysLTs	56
Wykres 14.	Korelacja wyników ELISA i LC/MS dla grupy osób z chorobą niedokrwienną serca	59
Wykres 15.	Korelacja wyników ELISA i LC/MS dla grupy osób chorych na astmę	59

13. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1.	Szlak metaboliczny leukotrienów cysteinylowych	6
Rysunek 2.	Białko FLAP- struktura trimeru [PDB: 2Q7M]	9
Rysunek 3.	Porównanie umiejscowienia białka FLAP i syntazy LTC ₄ w błonie okołojądrowej a) Białko FLAP. b) Najbardziej prawdopodobne lokalizacje syntazy LTC ₄ . c) Inne możliwe lokalizacje syntazy LTC ₄	10
Rysunek 4.	Struktura syntazy-LTC ₄ : a) dwa homodimery syntazy LTC ₄ [PDB: 2PNO] b) Monomer struktura miejsca aktywnego syntazy, w którym umieszczony jest glutation [PDB: 2UUH]	10
Rysunek 5.	Aktywacja, stymulowanie i hamowanie aktywności 5-lipoksygenazy	12
Rysunek 6.	Proponowany mechanizm utleniania kwasu arachidonowego do 5-HPETE przez 5-LO (niebieskie strzałki oznaczają zmianę pozycji przez elektron)	14
Rysunek 7.	Proponowany mechanizm utleniania 5-HPETE do LTA ₄ przez 5-LO (niebieskie strzałki oznaczają zmianę pozycji przez elektron)	15
Rysunek 8.	Porównanie struktur LTC ₄ i EXC ₄	17
Rysunek 9.	Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO blokujących redukcję jonu żelaza	22
Rysunek 10.	Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO helatujących jon żelaza	23
Rysunek 11.	Wzory strukturalne inhibitorów 5-LO kompetycyjnych wobec kwasu arachidonowego	24
Rysunek 12.	Wzór strukturalny celekoksybu	25
Rysunek 13.	Wzory strukturalne inhibitorów FLAP	25
Rysunek 14.	Wzór strukturalny LY 293111- antagonisty receptora LTB ₄	26
Rysunek 15.	Wzory strukturalne antagonistów receptorów leukotrienów cysteinylowych	27
Rysunek 16.	Widmo fragmentacyjne LTE ₄ : jonizacja pozytywna, jon macierzysty m/z = 440 ± 0,5, energia fragmentacji 25%, zakres skanowania dla jonów potomnych m/z = 180 – 450	29
Rysunek 17.	Widmo masowe LTE ₄ – jonizacja negatywna	31
Rysunek 18.	Widmo masowe LTE ₄ – jonizacja pozytywna. Widoczny jon m/z = 381,5 to pozostałość mieszaniny kalibracyjnej	31
Rysunek 19.	Mikroskopowy obraz ziaren żeluz Cysteinył-Leukotriene Affinity Sorbent (Cayman Chemical). a) 100-krotne powiększenie, b) 400-krotne powiększenie	34
Rysunek 20.	Schemat oznaczania LTE ₄ z użyciem zestawu ELISA	37
Rysunek 21.	Chromatogram standardu LTE ₄ (zawartość 200pg)	41
Rysunek 22.	Chromatogram wzorca wewnętrznego d ₃ -LTE ₄ (1000pg). A): m/z = 440,1-440,4. B): m/z = 443.1-443.4	43

Rysunek 23. Chromatogram analizowanej próbki: LTE ₄ m/z = 440,1-440,4, d ₃ - LTE ₄ m/z = 443.1-443.4	44
Rysunek 24. Porównanie wzorów strukturalnych LTE ₄ i EXE ₄	62

14. PIŚMIENNICTWO

1. Woods J.W., Evans, J.F., Ethier D., Scott S., Vickers P.J., Hearn L., Heibin J.A., Charleson S., 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 1993; 178: 1935–1946.
2. Peters-Golden M., Brock T.G., Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000; 161: 36–40.
3. Diaz B.L., Arm J.P. Phospholipase A2. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003; 69(2-3): 87-97.
4. Peters-Golden M., Brock T.G., 5-Lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003; 69(2-3): 99-109.
5. Leslie C.C., Regulation of the specific release of arachidonic acid by phospholipase A2. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004; 70: 373–376.
6. Luo M., Jones S. M., Peters-Golden M. and Brock T. G., Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B₄ synthetic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100: 12165–12170.
7. Murphy R.C., Gijon M.A., Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *The Biochemical Journal*, 2007; 405: 379–395.
8. Kirkland T.A., Adler M., Bauman J.G., Chen M., Haeggstrom J.Z., King B., Kochanny M.J., Liang A.M., Mendoza L., Phillips G.B., Thunnissen M., Trinh, L., Whitlow M., Ye B., Ye H., Parkinson J., Guilford W.J., Synthesis of glutamic acid analogs as potent inhibitors of leukotriene A₄ hydrolase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008; 16(9): 4963-4983.
9. Haeggstrom J.Z., Leukotriene A₄ hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B₄ biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279: 50639-50642.
10. Sala A., Zarini S., Folco G., Murphy R.C., Henson PM., Differential metabolism of exogenous and endogenous arachidonic acid in human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(40): 28264-28269.
11. Borgeat P., Samuelsson B., Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979; 76(7): 3213-3217.
12. Penrose J.F., Austen K.F., Lam B.K., LTC₄-synthase: a key enzyme in cysteinyl leukotriene formation. *Novel Inhibitors of Leukotrienes*, Birkhäuser, Basel 1999, 23.

13. Lam B.K., Leukotriene C₄ synthase. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003; 69: 111–116.
14. Habib G.M., Shi Z.Z., Cuevas A.A., Lieberman M.W., Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family. The FASEB Journal, 2003, 17: 1313-1315.
15. Sala A., Voelkel N., Maclouf J., Murphy R.C., Leukotriene E₄ elimination and metabolism in normal human subjects. The Journal of Biological Chemistry, 1990; 35: 21771-21778.
16. Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., Somers, W.S., Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. Cell, 1999; 97: 349-360.
17. Muthalif M.M., Ljuca F., Roaten J.B., Pentapaty N., Uddin M.R., Malik K.U., Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A₂ contribute to mitogenic signaling in myeloblastic leukemia U-937 cells. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001; 298: 272–278.
18. Hefner Y., Borsch-Haubold A.G., Murakami M., Wilde J.I., Pasquet S., Schieltz D., Ghomashchi F., Yates J.R. 3rd, Armstrong C.G., Paterson A., Cohen P., Fukunaga R., Hunter T., Kudo I., Watson S.P., Gelb M.H., Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases. The Journal of Biological Chemistry, 2000; 275: 37542–3751.
19. Hammarberg T., Provost P., Persson B., Rådmark O., The N-terminal Domain of 5-Lipoxygenase Binds Calcium and Mediates Calcium Stimulation of Enzyme Activity, The Journal Of Biological Chemistry, 2000; 275(49): 38787-38793.
20. Kulkarni S., Das S., Funk C.D., Murray D., Cho W., Molecular basis of the specific subcellular localization of the C₂-like domain of 5-lipoxygenase. The Journal of Biological Chemistry, 2002; 277: 13167–13174.
21. Hirabayashi T., Murayama T., Shimizu T., Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006; 27: 1168–1173.
22. Evans J.H., Leslie C.C., The cytosolic phospholipase A₂ catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. The Journal of Biological Chemistry, 2004; 279: 6005–6016.
23. Bresell A., Weinander R., Lundqvist G., Raza H., Shimoji M., Sun T.H., Balk L., Wiklund R., Eriksson J., Jansson C., Persson B., Jakobsson P.J., Morgenstern R.. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. The FEBS Journal, 2005; 272(7): 1688-1703.
24. Hebert H., Jegerschöld C., The structure of membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism as determined by electron crystallography. Current Opinion in Structural Biology, 2007; 17(4): 396-404.

25. Penrose J.F., Spector J., Lam B.K., Friend D.S., Xu K., Jack R.M., Austen K.F., Purification of human lung LTC₄ synthase and preparation of a polyclonal antibody. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995; 152(1): 283–289.
26. Mancini J.A., Blood K., Guay J., Gordon R., Claveau D., Chan C.C., Riendeau D., Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276: 4469–4475.
27. Ferguson A.D., McKeever B.M., Xu S., Wisniewski D., Miller D.K., Yamin T.T., Spencer R.H., Chu L., Ujjainwalla F., Cunningham B.R., Evans J.F., Becker J.W. Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science*, 2007; 317: 510-512.
28. Young R.N., Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1999; 34: 671–685.
29. Evans J.F., Ferguson A.D., Mosley R.T., Hutchinson J.H., What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2008; 29(2): 72-78.
30. Mandal A.K., Skoch J., Bacskai B.J., Hyman B.T., Christmas P., Miller D., Yamin T.D., Xu S., Wisniewski D., Evans J.F., Soberman R.J., The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2004; 101(17): 6587-6592.
31. Christmas P., Weber B.M., McKee M., Brown D., Soberman R.J., Membrane Localization and Topology of Leukotriene C₄ Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(32): 28902-28908.
32. Ago H., Kanaoka Y., Irikura D., Lam B.K., Shimamura T., Austen K.F., Miyano M., Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature*, 2007; 448: 609-612.
33. Jakobsson P.J., Mancini J.A., Riendeau D., Ford-Hutchinson A.W., Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272: 22934-22939.
34. Wijnholds J., Evers R., van Leusden M.R., Mol C.A., Zaman G.J., Mayer U., Beijnen J.H., van der Valk M., Krimpenfort P., Borst P., Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nature Medicine*, 1997; 3(11): 1275-1279.
35. Pande, A.H., Qin, S., Tatulian, S.A., Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase. *The Biophysical Journal*, 2005, 88: 4084-4094.
36. Peters-Golden M., Brock T.G., Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets, *The FASEB Letters*, 2001; 487(3): 323-326.

37. Brock T.G., Anderson J.A., Fries F.P., Peters-Golden M., Sporn P.H., Decreased leukotriene C₄ synthesis accompanies adherence-dependent nuclear import of 5-lipoxygenase in human blood eosinophils. *The Journal of Immunology*, 1999; 162: 1669-1676.
38. Werz O., 5-Lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy*, 2002; 1(1): 23-44.
39. Werz O., Steinhilber D., Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 2006; 112(3): 701-718.
40. Werz O., Bürkert E., Fischer L., Szellas D., Dishart D., Samuelsson B., Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *The FASEB Journal*, 2002; 16: 1441-1443.
41. Werz O., Bürkert E., Rådmark O., Steinhilber D., Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes, *Blood*, 2002; 99: 1044-1052.
42. Luo M., Jones S.M., Phare S.M., Coffey M.J., Peters-Golden M., Brock T.G., Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279: 41512-41520.
43. Flamand N., Surette M.E., Picard S., Bourgoin S., Borgeat P., Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Molecular Pharmacology*, 2002; 62: 250-256.
44. Luo M., Jones S.M., Flamand N., Aronoff D.M., Peters-Golden M., Brock T.G., Phosphorylation by protein kinase A inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280: 40609-40616.
45. Radmark O., Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins And Other Lipid Mediators*, 2002; 68-69: 211-234
46. Leff A.R., Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000; 161: 125-132.
47. Bandeira-Melo C., Weller P.F., Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003; 69(2-3): 135-143.
48. Boyce J.A., Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunological Reviews*, 2007; 217: 168-185.
49. Mortaz E., Redegeld F.A., Dunsmore K., Odoms K., Wong H.R., Nijkamp F.P., Engels F., Stimulation of cysteinyl leukotriene production in mast cells by heat shock and acetylsalicylic acid. *European Journal of Pharmacology*, 2007; 561(1-3): 214-219.

50. Austen K.F., The mast cell and the cysteinyl leukotrienes. Novartis Foundation Symposium, 2005; 271: 166-175.
51. Pacheco P., Vieira-de-Abreu A., Gomes R.N., Barbosa-Lima G., Wermelinger L.B., Maya-Monteiro C.M., Silva A.R., Bozza M.T., Castro-Faria-Neto H.C., Bandeira-Melo C., Bozza P.T., Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B₄-Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response. *The Journal of Immunology*, 2007; 179: 8500-8508.
52. Beck-Speier I., Dayal N., Karg E., Maier K.L., Schumann G., Schulz H., Semmler M., Takenaka S., Stettmaier K., Bors W., Ghio A., Samet J.M., Heyder J., Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radical Biology And Medicine*, 2005; 38(8): 1080-1092.
53. Bandeira-Melo C., Phoofolo M., Weller P.F., Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C₄ production in eosinophils and basophils. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2001; 276: 22779–22787.
54. Folco G., Murphy R.C., Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses. *Pharmacological Reviews*, 2006; 58(3): 375-388.
55. Haeggstrom J.Z., Leukotriene A₄ hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B₄ biosynthesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 2004; 279: 50639-50642.
56. McGee J.E., Fitzpatrick F.A., Erythrocyte-neutrophil interactions: formation of leukotriene B₄ by transcellular biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986; 83: 1349-1353.
57. Klockmann M.T., Jahn H.U., Hippenstiel S., Krämer H.J., Suttorp N., Interaction of human neutrophils with airway epithelial cells: reduction of leukotriene B₄ generation by epithelial cell derived prostaglandin E₂. *Journal Of Cellular Physiology*, 1998; 175(3): 268-275.
58. Feinmark S.J., Cannon P.J., Endothelial cell leukotriene C₄ synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1986; 261: 16466-16472.
59. Maclouf J., Murphy R.C., Henson P.M., Transcellular biosynthesis of sulfidopeptide leukotrienes during receptor-mediated stimulation of human neutrophil/platelet mixtures. *Blood*, 1990; 76: 1838-1844.
60. Feltenmark S., Gautam N., Brunnström A., Griffiths W., Backman L., Edenius C., Lindbom L., Björkholm M., Claesson H.E., Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008; 105(2): 680-685.

61. Bradding P., Redington A.E., Djukanovic R., Conrad D.J., Holgate S.T., 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995; 151(4): 1201-1204.
62. Claesson H.E., Griffiths W.J., Brunnström A., Schain F., Andersson E., Feltenmark S., Johnson H.A., Porwit A., Sjöberg J., Björkholm M., Hodgkin Reed-Sternberg cells express 15-lipoxygenase-1 and are putative producers of eoxins in vivo: novel insight into the inflammatory features of classical Hodgkin lymphoma. *The FEBS Journal*, 2008; 275(16): 4222-4234.
63. Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateaufneuf A., Stocco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L. Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T., Evans J.F., Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*, 1999; 399: 789-793.
64. Sarau H.M., Ames R.S., Chambers J., Ellis C., Elshourbagy N., Foley J.J., Schmidt D.B., Muccitelli R.M., Jenkins O., Murdock P.R., Herrity N.C., Halsey W., Sathe G., Muir A.I., Nuthulaganti P., Dytko G.M., Buckley P.T., Wilson S., Bergsma D.J., Hay D.W., Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Molecular Pharmacology*, 1999; 56: 657-663.
65. Nothacker H.P., Wang Z., Zhu Y., Reinscheid R.K., Lin S.H., Civelli O., Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Molecular Pharmacology*, 2000; 58: 1601-1608.
66. Bautz F., Denzlinger C., Kanz L., Möhle R., Chemotaxis and transendothelial migration of CD34+ hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood*, 2001; 97(11): 3433-3440.
67. Figueroa D.J., Breyer R.M., Defoe S.K., Kargman S., Daugherty B.L., Waldburger K., Liu Q., Clements M., Zeng Z., O'Neill G.P., Jones T.R., Lynch K.R., Austin C.P., Evans J.F., Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2001; 163: 226-233.
68. Joos S., Miksch A., Szecsenyi J., Wieseler B., Grouven U., Kaiser T., Schneider A., Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax*, 2008; 63(5): 453-462.
69. Riccioni G., Bucciarelli T., Mancini B., Di Ilio C., D'Orazio N., Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Current Medicinal Chemistry*, 2007; 14(18): 1966-1977.
70. Tamaoki J., Isono K., Taira M., Tagaya E., Nakata J., Kawatani K., Nagai A., Role of regular treatment with inhaled corticosteroid or leukotriene receptor antagonist in mild intermittent asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2008; 29(2): 189-196.

71. Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng R., Williams D.L. Jr, Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M.K., Coulombe N., Liu Y., Austin C.P., George S.R., O'Neill G.P., Metters K.M., Lynch K.R., Evans J.F., Characterization of the Human Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(39): 30531-30536.
72. Takasaki J., Kamohara M., Matsumoto M., Saito T., Sugimoto T., Ohishi T., Ishi, H., Ota T., Nishikawa T., Kawai Y., Masuho Y., Isoga, T., Suzuki Y., Sugano S., Furuichi K., The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT2 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000; 274: 316-322.
73. Bäck M., Leukotriene Receptors: Crucial Components in Vascular Inflammation. *The ScientificWorld Journal*, 2007; 7: 1422-4439.
74. Wang M.L., Huang X.J., Fang S.H., Yuan Y.M., Zhang W.P., Lu Y.B., Ding Q., Wei E.Q., Leukotriene D4 induces brain edema and enhances CysLT2 receptor-mediated aquaporin 4 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 350: 399-404.
75. Fujii M., Tanaka H., Abe S., Interferon-gamma Up-regulates Expression of Cysteinyl Leukotriene Type 2 Receptors on Eosinophils in Asthmatic Patients. *Chest*, 2005; 28(5): 3148-3155.
76. Mellor E.A., Austen K.F., Boyce J.A., Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: functional distinction from CysLT1R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100: 11589-11593.
77. Obinata H., Yokomizo T., Shimizu T., Izumi T., Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 2003; 309: 114-119.
78. Walch L., Norel X., Bäck M., Gascard J.P., Dahlén S.E., Brink C., Pharmacological evidence for a novel cysteinyl-leukotriene receptor subtype in human pulmonary artery smooth muscle. *British Journal Of Pharmacology*, 2002; 137: 1339–1345.
79. Ciana P., Fumagalli M., Trincavelli M.L., Verderio C., Rosa P., Lecca D., Ferrario S., Parravicini C., Capra V., Gelosa P., Guerrini U., Belcredito S., Cimino M., Sironi L., Tremoli E., Rovati G.E., Martini C., Abbracchio M.P., The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 2006; 25(19): 4615-4627.
80. Boyce J.A., Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chemical Immunology and Allergy*, 2005; 87: 59–79
81. Rovati G.E., Capra V., Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *The Scientific World Journal*, 2007; 7: 1375-1392.

82. Busse W., Kraft M., Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: strategic target for therapy. *Chest*, 2005; 127(4): 1312-1326.
83. Christie P.E., Henderson W.R. Jr, Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clinical Allergy And Immunology*, 2002; 16: 233-254.
84. Funk C.D., Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 2001; 294(5548): 1871-1875.
85. Frank J.A., Matthay M.A., Leukotrienes in acute lung injury: a potential therapeutic target? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005; 172(3): 261-272.
86. Green S.A., Malice M.P., Tanaka W., Tozzi C.A., Reiss T.F., Increase in urinary leukotriene LTE4 levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax* 2004; 59: 100-104.
87. Nathan C., Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-852.
88. Ware L.B., Matthay M.A., The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal Of Medicine* 2000; 342(18): 1334-1349.
89. Bonnans C., Levy B.D., Lipid mediators as agonists for the resolution of acute lung inflammation and injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007; 36(2): 201-205.
90. Wenzel S.E., The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003; 69: 145-155.
91. Ihara A., Wada K., Yoneda M., Fujisawa N., Takahashi H., Nakajima A., Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2007; 103(1): 24-32.
92. Fischer L., Szellas D., Rådmark O., Steinhilber D., Werz O., Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors. *The FASEB Journal*, 2003; 17(8): 949-951.
93. Berger W., De Chandt M.T., Cairns C.B., Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *International Journal of Clinical Practice*, 2007; 61(4): 663-676.
94. Claesson H.E., Dahlen S.E., Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *Journal of Internal Medicine*, 1999; 245: 205–227.
95. Maier T.J., Tausch L., Hoernig M., Coste O., Schmidt R., Angioni C., Metzner J., Groesch S., Pergola C., Steinhilber D., Werz O., Geisslinger G., Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*, 2008; 76(7): 862-872.

96. Miller D.K., Gillard J.W., Vickers P.J., Sadowski S., Léveillé C., Mancini J.A., Charleson P., Dixon R.A., Ford-Hutchinson A.W., Fortin R., Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production, *Nature*, 1990; 343; 278-281.
97. Tong W.G., Ding X.Z., Talamonti M.S., Bell R.H., Adrian T.E., Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 induces S-phase cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*. 2007; 18(5): 535-541.
98. Bush K.L., Space Charge in Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Forum*, 2004; 19(6): 35-38.
99. Kishi N., Mano N., Asakawa N., Direct injection method for quantitation of endogenous leukotriene E₄ in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with a column-switching technique. *Analytical Sciences*, 2001; 17: 709-713.
100. Powell, W.S., Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases. *Analytical Biochemistry*, 1985; 148(1): 59-69
101. Kumlin M., Stensvad F., Larsson L., Dahlen B., Dahlen S.E., Validation and application of a new simple strategy for measurements of urinary leukotriene E₄ in humans. *Clinical and Experimental Allergy*, 1995; 25: 467-479.
102. Cai C., Yang J., Hu S., Zhou M., Guo W., Relationship between urinary cysteinyl leukotriene E₄ levels and clinical response to antileukotriene treatment in patients with asthma. *Lung*, 2007; 185(2): 105-112.
103. Rabinovitch N., Urinary Leukotriene E₄. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2007; 27(4): 651-664.
104. Shibata A., Katsunuma T., Tomikawa M., Tan A., Yuki K., Akashi K., Eto Y., Increased leukotriene E₄ in the exhaled breath condensate of children with mild asthma. *Chest*, 2006; 130(6): 1718-1722.
105. Tsuburai T., Mita H., Tsurikisawa N., Oshikata C., Ono E., Fukutomi Y., Tanimoto H., Sekiya K., Otomo M., Maeda Y., Taniguchi M., Ikehara K., Akiyama K., Relationship between cysteinyl leukotriene in exhaled breath condensate and the severity of asthma in adult asthmatics in Japan. *Allergy* 2008; 57(2): 121-129.
106. Grissom C.K., Richer L.D., Elstad M.R., The effects of a 5-lipoxygenase inhibitor on acute mountain sickness and urinary leukotriene e₄ after ascent to high altitude. *Chest*, 2005; 127(2): 565-570.
107. Mastalerz L., Sanak M., Gawlewicz A., Gielicz A., Faber J., Szczeklik A., Different eicosanoid profile of the hypersensitivity reactions triggered by aspirin and celecoxib in a patient with sinusitis, asthma, and urticaria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006; 118(4): 957-958.

108. Stanke-Labesque F., Pofelski J., Moreau-Gaudry A., Bessard G., Bonaz B., Urinary leukotriene E4 excretion: A biomarker of inflammatory bowel disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008; 14(6): 769-774.
109. Hardy G., Boizel R., Bessard J., Cracowski J.L., Bessard G., Halimi G., Stanke-Labesque F., Urinary leukotriene E4 excretion is increased in type 1 diabetic patients A quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 2005; 78(1-4): 291-299.
110. Suzuki N., Hishinuma T., Abe F., Omata K., Ito S., Sugiyama M., Mizugaki M., Difference in urinary LTE4 and 11-dehydro-TXB2 excretion in asthmatic patients. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 2000; 62(4): 395-403.
111. Nakamura H., Hishinuma T., Suzuki N., Chiba S., Tsukamoto H., Takabatake M., Sawai T., Mitomo T., Inoue H., Matsumoto F., Mizugaki M., Difference in urinary 11-dehydro TXB2 and LTE4 excretion in patients with rheumatoid arthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2001, 65(5-6): 301-306.
112. Hishinuma T., Suzuki N., Aiba S., Tagami H., Mizugaki M., Increased urinary leukotriene E4 excretion in patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 2001; 144(1): 19-23.
113. Mizugaki M., Hishinuma T., Suzuki N., Determination of leukotriene E4 in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Application*, 1999, 729(1-2): 279-285.
114. Tsikas D., Fauler J., Gutzki F.M., Röder T., Bestmann H.J., Frölich J.C., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of leukotriene E4 in human urine using deuterium-labelled leukotriene E4 standards. *The Journal of Chromatography A*, 1993; 622(1): 1-7.
115. Cipollone F., Ganci A., Greco A., Panara M.R., Pasquale M., Di Gregorio D., Porreca E., Mezzetti A., Cuccurullo F., Patrignani P., Modulation of Aspirin-Insensitive Eicosanoid Biosynthesis by 6-Methylprednisolone in Unstable Angina. *Circulation*, 2003; 107; 55-61.
116. Wojnarowski C., Halmerbauer G., Mayatepek E., Gartner C., Frischer T., Forster J., Kuehr J., Collaborative SPACE Team. Study on the Prevention of Allergy in Children in Europe. Urinary leukotriene E(4), eosinophil protein X, and nasal eosinophil cationic protein are not associated with respiratory symptoms in 1-year-old children. *Allergy*, 2001; 56(9): 883-888.
117. Kawano T., Matsuse H, Kondo Y., Machida I., Saeki S., Tomari S., Mitsuta K, Fukushima C., Obase Y., Shimoda T., Kohno S., Tacrolimus reduces urinary excretion of leukotriene E4 and inhibits aspirin-induced asthma to threshold dose of aspirin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 114: 1278-1281.
118. Rossi P., Kuukasjärvi P., Salenius J.P., Riutta A., The effect of revascularisation of an ischaemic lower limb on leukotriene E4 production. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2001, 64(6): 289-290.

119. 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. *Clinical and Experimental Allergy*, 1998; 28(11): 1332-1339.
120. Micheletto C., Visconti M., Tognella S., Facchini F.M., Dal Negro R.W., Aspirin induced asthma (AIA) with nasal polyps has the highest basal LTE₄ excretion: a study vs AIA without polyps, mild topic asthma, and normal controls. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2006; 38(1): 20-23.
121. Higashi N., Taniguchi M., Mita H., Kawagishi Y., Ishii T., Higashi A., Osame M., Akiyama K., Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E₄ excretion (hyperleukotrienuria): Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 113(2): 277-283.
122. Micheletto C., Tognella S., Visconti M., Trevisan F., Dal Negro R.W., Changes in urinary LTE₄ and nasal functions following nasal provocation test with ASA in ASA-tolerant and -intolerant asthmatic. *Respiratory Medicine*, 2006; 100, 2144–2150.
123. Gaki E., Papatheodorou G., Ischaki E., Grammenou V., Papa I., Loukides S., Leukotriene E(4) in urine in patients with asthma and COPD-the effect of smoking habit. *Respiratory Medicine* 2007; 101(4): 826-832.
124. Bochenek G., Nagraba K., Nizankowska E., Szczeklik A., A controlled study of 9alpha, 11beta-PGF₂ (a prostaglandin D₂ metabolite) in plasma and urine of patients with bronchial asthma and healthy controls after aspirin challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 111(4): 743-749.
125. Yoshida S., Sakamoto H., Ishizaki Y., Onuma K., Shoji T., Nakagawa H., Hasegawa H., Nakabayashi M., Amayasu H., Efficacy of leukotriene receptor antagonist in bronchial hyperresponsiveness and hypersensitivity to analgesic in aspirin-intolerant asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 2000; 30(1): 64-70.