

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Agnieszka Gawlewicz-Mrocza

**Zaburzenia równowagi prostaglandyny E<sub>2</sub> i leukotrienów  
cysteinylowych w astmie oskrzelowej z nadwrażliwością na  
aspirynę**

*Praca doktorska*

Promotor: Dr hab. med. Lucyna Mastalerz

Pracę wykonano w Klinice Pulmonologii  
II Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ  
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Ewa Nizankowska-Mogilnicka  
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2007

*Mojemu Promotorowi  
Pani Dr hab. med. Lucynie Mastalerz za opiekę  
naukową w czasie prowadzenia badań i pisanie  
pracy, siłę motywacji i ogromną życzliwość składam  
serdeczne podziękowanie.*

*Panu Profesorowi Andrzejowi Szczeklikowi za  
naukową inspirację i cenne rady w czasie  
prowadzenia badań – szczerze dziękuję.*

*Wyrazy wdzięczności dla Pani Profesor Ewy  
Niżankowskiej-Mogilnickiej za trud włożony  
w kształcenie mnie w dziedzinie chorób  
wewnętrznych i pulmonologii.*

## Spis treści:

1. Wprowadzenie .....	5
1.1. Astma aspirynowa.....	5
1.2. Historia aspiryny.....	5
1.3. Historia naturalna astmy aspirynowej.....	7
1.4. Diagnostyka astmy aspirynowej .....	7
1.5. Aspiryna i inne inhibitory cyklooksygenaz .....	9
1.6. Patogeneza astmy aspirynowej – hipotezy .....	9
1.7. Patogeneza astmy aspirynowej – fakty .....	11
1.7.1. Eikozanoidy .....	11
1.7.2. Leukotrieny w astmie aspirynowej .....	12
1.7.3. Prostanoidy .....	14
1.7.4. Prostaglandyna E <sub>2</sub> .....	16
1.7.5. Metabolizm PGE <sub>2</sub> .....	17
1.7.6. PGE <sub>2</sub> w astmie oskrzelowej.....	21
2. Założenia pracy .....	25
3. Cele badania.....	26
4. Materiały i metody.....	27
4.1. Etap I – charakterystyka badanych .....	27
4.2. Etap I – opis badania.....	30
4.3. Etap II – opis badania i charakterystyka chorych .....	34
4.4. Metody laboratoryjne.....	36
4.5. Opracowanie statystyczne.....	38
5. Wyniki .....	39
5.1. Etap I.....	39
5.1.1. Reakcja kliniczna .....	39
5.1.2. PGE <sub>2</sub> -M w moczu .....	41
5.1.3. Korelacje PGE <sub>2</sub> -M .....	47
5.1.4. Tetranor-PGE-M w moczu .....	49
5.1.5. Korelacje tetranor-PGE-M.....	54
5.1.6. Stężenie LTE <sub>4</sub> w moczu.....	56
5.1.7. Korelacje LTE <sub>4</sub> .....	58
5.1.8. Analiza korelacji między stężeniami LTE <sub>4</sub> i PGE <sub>2</sub> -M w moczu .....	59
5.1.9. Analiza korelacji między stężeniami LTE <sub>4</sub> i tetranor-PGE-M w moczu.....	59
5.2. Etap II .....	60
5.2.1. Reakcja kliniczna.....	60
5.2.2. PGE <sub>2</sub> -M w moczu .....	60
5.2.3. Tetranor-PGE-M w moczu .....	61
6. Dyskusja.....	63
6.1. Wiarygodność wyników .....	63
6.2. Omówienie wyników .....	64
6.3. Perspektywy dalszych badań .....	70
7. Wnioski.....	72
8. Streszczenie .....	73
Summary.....	75
9. Piśmiennictwo.....	77
Spis tabel.....	89
Spis rysunków.....	90

## Wykaz skrótów

AIA	astma aspirynowa ( <i>aspirin-induced asthma</i> )
AIANE	Europejska Sieć Aspirynowa ( <i>European Network on Aspirin-Induced Asthma</i> )
ASA	kwask acetylosalicylowy ( <i>acetylsalicylic acid</i> )
ATA	astma z dobrą tolerancją aspiryny ( <i>aspirin-tolerant asthma</i> )
BAL	popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe ( <i>bronchoalveolar lavage</i> )
CAMP	cykliczny adenozynomonofosforan
COX-1	cyklooksygenaza 1
COX-2	cyklooksygenaza 2
cPLA <sub>2</sub>	cytozolowa fosfolipaza A <sub>2</sub>
CysLT1	receptor leukotrienów cysteinylowych typu 1
CysLT2	receptor leukotrienów cysteinylowych typu 2
Cys LTs	leukotrieny cysteinyłowe
ECP	eozynofilowe białko kationowe
FEV <sub>1</sub>	natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
FLAP	białko aktywujące 5-lipoksygenazę
GC/MS	chromatografia gazowa/spektrometria mas
GLM	model liniowy ( <i>General Linear Model</i> )
15-HETE	kwask 15- hydroksyeikozatetraenowy
IgE	immunoglobulina E
IL	interleukina
5-LO	5-lipoksygenaza
LTA <sub>4</sub>	leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leukotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leukotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leukotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leukotrien E <sub>4</sub>
MOAT	wieloswoisty transporter anionów organicznych ( <i>multispecific organic anion transporter</i> )
NSLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
PD <sub>20</sub>	dawka prowokacyjna powodująca zmniejszenie FEV <sub>1</sub> o 20%
PGs	prostaglandyny
PGD <sub>2</sub>	prostaglandyna D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandyna E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	prostaglandyna F <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub> /PGH <sub>2</sub>	cykliczne wewnętrzne nadtlenki prostaglandynowe
PGT	transporter prostaglandyn ( <i>prostaglandin transporter</i> )

# 1. Wprowadzenie

## 1.1. Astma aspirynowa

Astma oskrzelowa jest z patofizjologicznego punktu widzenia przewlekłym stanem zapalnym oskrzeli, w którym istotną rolę odgrywają komórki, takie jak eozynofile, mastocyty i bazofile, ulegające okresowej aktywacji pod wpływem różnych bodźców, czego rezultatem jest uwalnianie z nich mediatorów zapalnych. Te z kolei wpływają na skurcz mięśni gładkich oraz wzmożone wydzielanie śluzu, co prowadzi do zwężenia światła oskrzeli. Konsekwencją są objawy kliniczne w postaci duszności, kaszlu, świszczącego oddechu, ściskania w klatce piersiowej. Bodźce wywołujące napad duszności mogą być bardzo różne [24]. Wśród dorosłych chorych na astmę u 3-21% stwierdza się nadwrażliwość na aspirynę (*acetylsalicylic acid* – ASA) i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSLPZ) [36,111]. Zespół objawów klinicznych, które pojawiają się w 15-30 min, a niekiedy po kilku godzinach od zażycia tabletki aspiryny został szczegółowo opisany. W literaturze medycznej powszechnie określa się go mianem astmy aspirynowej (*aspirin-induced asthma* – AIA). Ostatnio postuluje się, by używać nazwy: choroba układu oddechowego zaostrzana przez aspirynę (ang. *aspirin-exacerbated respiratory disease* - AERD) [106,115]. Termin ten ma wskazywać na szerszy aspekt tego zjawiska obejmujący również górne drogi oddechowe. U podłoża zjawisk związanych z nadwrażliwością na aspirynę leżą procesy zachodzące na poziomie komórkowym i molekularnym. Enigmatyczna do lat 70. substancja anafilaktyczna (*slow reacting substance of anaphylaxis* – SRS-A) powodująca skurcz oskrzeli u chorych na astmę okazała się mieszaniną leukotrienów cysteinylowych (cys-LTs), związków należących do grupy eikozanoidów [88]. Później wykazano, że są one głównymi mediatorami reakcji nadwrażliwości na aspirynę [11,12,48,103,104]. Odkrycie mechanizmu działania aspiryny [127] przyczyniło się do zwrócenia uwagi również na rolę innych eikozanoidów, takich jak prostaglandyny [117] czy lipoksyny [13,91,98] w patogenezie AIA.

## 1.2. Historia aspiryny

Już w czasach Hipokratesa znano właściwości przeciwbólowe, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe salicylanów, które zawierały stosowane wówczas wywary z kory wierzby i soku topoli [126]. W roku 1763 Edward Stone przeprowadził pierwsze badanie z grupą kontrolną, które wskazywało na skuteczność leczenia zapalenia stawów

wyciągiem z kory wierzby [107]. Dopiero po stu latach z wyciągu tego wyizolowano glikozyd i opracowano chemiczną syntezę salicylanu sodu [126].

Aspiryna (kwas acetylosalicylowy) została zsyntetyzowana w 1897 roku przez Feliksa Hoffmana, który poszukiwał dla swojego cierpiącego ojca skutecznego leku przeciwbólowego [126]. Dwa lata później w fabryce farmaceutycznej firmy Bayer rozpoczęto produkcję kwasu acetylosalicylowego na skalę przemysłową. Od tej pory aspiryna stała się najczęściej używanym lekiem przeciwbólowym i przeciwzapalnym dostępnym bez recepty [126]. W 1902 roku poznański lekarz J. Hirschberg opisał pierwszego chorego, u którego po zażyciu tabletki aspiryny wystąpił obrzęk naczyń ruchomy [34]. W 1911 roku Gilbert przedstawił pierwszą chorą na astmę oskrzelową, u której aspiryna wywołała silny napad duszności [23]. O występowaniu objawów duszności i stanu zapalnego nosa i zatok przynosowych w powiązaniu z zażyciem aspiryny pisali już na początku XX wieku Widali i wsp. [129]. W literaturze polskiej pierwszy opis tego zespołu został przedstawiony przez krakowskiego lekarza Wierzuchowskiego w 1925 roku [130]. W latach 60. termin „triada aspirynowa” oznaczający zespół kliniczny charakteryzujący się polipami nosa, astmą oskrzelową i nadwrażliwością na aspirynę został rozpowszechniony dzięki Samterowi i Beersowi [89]. W latach 70. okazało się, że aspiryna wywiera działanie przeciwzapalne przez nieodwracalne wiązanie się z cyklooksygenazą (COX), jednym z enzymów na szlaku przemian kwasu arachidonowego, wielonienasyconego kwasu tłuszczowego wchodzącego w skład błon komórkowych [127]. W 1975 roku Szczeklik, Gryglewski i Czerniawska-Mysik stwierdzili, że objawy nadwrażliwości na aspirynę nie wynikają z reakcji immunologicznej, lecz związane są z farmakologicznym działaniem aspiryny [108]. Dopiero w 1991 roku odkryto, że COX istnieje w postaci dwóch izoform: jednej - stale obecnej w większości komórek organizmu i drugiej - indukowanej w komórkach stanu zapalnego pod wpływem bodźców zapalnych [47]. Wkrótce po odkryciu mechanizmu działania aspiryny stwierdzono, że inne leki, które blokują cyklooksygenazę, również mogą wywoływać objawy triady aspirynowej [127]. Po wprowadzeniu w latach 90. selektywnych inhibitorów cyklooksygenazy-2 (COX-2) stwierdzono, iż u większości chorych na astmę aspirynową nie wywołują one reakcji takiej jak nieselektywne inhibitory COX, a więc są lekami bezpiecznymi dla tych chorych [30,110,113]. Nie znaleziono jednak dokładnego wytłumaczenia tego zjawiska na płaszczyźnie patofizjologicznej. Wiadomo jedynie, iż podanie selektywnych

inhibitorów COX-2 nie wywołuje typowego dla aspiryny i innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych wzrostu wydalania cys-LTs z moczem [30,110].

### **1.3. Historia naturalna astmy aspirynowej**

Obraz kliniczny astmy aspirynowej prześledzono na podstawie obserwacji klinicznej i leczenia 500 chorych na astmę aspirynową z 10 krajów europejskich w ramach Europejskiej Sieci Astmy Aspirynowej (*European Network on Aspirin-Induced Asthma* - AIANE) [111]. Pierwsze objawy omawianego zespołu pojawiają się około 30. roku życia. Astma aspirynowa dwukrotnie częściej dotyczy kobiet. Sekwencja zdarzeń u wszystkich chorych jest bardzo podobna. Nierzadko ich wystąpienie poprzedza infekcja wirusowa górnych dróg oddechowych. Zwykle pierwszym objawem jest eozynofilowe zapalenie błony śluzowej nosa z obfitą wodnistą wydzieliną. Ma ono charakter uporczywy, często prowadzi do wykształcenia polipów nosa. Z upływem miesięcy, a nieraz i lat (1–5 lat) rozwija się astma oskrzelowa i nadwrażliwość na aspirynę. U chorych, którzy do tej pory stosowali aspirynę i inne NSLPZ bez jakichkolwiek działań niepożądanych, kolejne zażycie leku wywołuje napad duszności z towarzyszącym wodnistym katarem, uczuciem ściskania w klatce piersiowej, często z zaczerwienieniem twarzy, bólem brzucha, nudnościami, bólem głowy. Niekiedy zażycie aspiryny może prowadzić do wstrząsu zagrażającego życiu. Bywa również, że przyjęcie ASA lub innego NSLPZ wywołuje pierwszy napad duszności astmatycznej (u osób bez dotychczasowego rozpoznania astmy). Następnie zapalenie alergiczne toczy się w oskrzelach chorych niezależnie od unikania NSLPZ. Astma u tych chorych częściej ma wyższy stopień ciężkości. Badania wykazały, że u 39–51% chorych na astmę z nadwrażliwością na aspirynę istnieje konieczność przewlekłego stosowania steroidów systemowych [56,111].

### **1.4. Diagnostyka astmy aspirynowej**

Rozpoznanie chorych na astmę oskrzelową, u których występuje nadwrażliwość na aspirynę, jest niezwykle ważne z uwagi na ryzyko niebezpiecznych reakcji polekowych. Stwierdzono, iż dane uzyskane od chorych w wywiadzie lekarskim są znacznie zaniżone (częstość rozpoznań AIA wśród chorych na astmę wynosi 3%) w porównaniu z częstością rozpoznań astmy aspirynowej na podstawie testów prowokacyjnych (21% chorych na astmę oskrzelową) [36].

W dalszym ciągu najbardziej obiektywną metodą w rozpoznawaniu AIA pozostają próby prowokacyjne z aspiryną. W zależności od drogi podania można wyróżnić cztery ich rodzaje: doustną, wziewną (inhalacyjną), donosową i dożylną [7,62,64,71,112]. Próby prowokacyjne polegają na podawaniu aspiryny w stopniowo wzrastających dawkach. Przy ich przeprowadzaniu konieczne jest staranne monitorowanie objawów oskrzelowych i pozaoskrzelowych. Z uwagi na ryzyko niebezpiecznych reakcji powinno się je przeprowadzać tylko w wyspecjalizowanych ośrodkach przy pełnym zabezpieczeniu reanimacyjnym.

Za złoty standard w rozpoznawaniu astmy z nadwrażliwością na ASA uważa się doustny test prowokacyjny z aspiryną. Naśladuje on naturalną ekspozycję na aspirynę. Jego czułość szacuje się na 89%, a swoistość – na 93% [71]. W naszej Katedrze (II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie) test doustny wykonuje się w ciągu dwóch dni. W pierwszym dniu badania podawane jest placebo, w drugim - aspiryna w czterech wzrastających w postępie geometrycznym dawkach (27, 44, 117 i 312 mg) stosowanych co 90 minut aż do osiągnięcia kumulacyjnej dawki 500 mg.

W porównaniu z próbą doustną test wziewny (inhalacyjny) z aspiryną lizynową jest bezpieczniejszy i mniej czasochłonny, o podobnej swoistości (93%), ale nieco mniejszej czułości (77%) [71].

Próba donosowa z aspiryną cechuje się około 80% czułością i 95% swoistością [62]. Wynik próby określa się za pomocą rynomanometrii i objawów klinicznych z górnych dróg oddechowych. Test ten jest bezpieczny (zwykle nie występują objawy oskrzelowe i ogólne) i może służyć jako badanie przesiewowe, zwłaszcza w przypadkach niestabilności drzewa oskrzelowego, uniemożliwiającej wykonanie próby doustnej czy inhalacyjnej [62].

Test dożylny wykonywany jest rzadko, głównie w Japonii [64].

W badaniach naukowych wykorzystuje się także dooskrzelową próbę prowokacyjną z aspiryną polegającą na aplikacji roztworu aspiryny lizynowej do oskrzeli w czasie bronchofiberoskopii [69,114].

Ponieważ u podstawy AIA leżą zaburzenia w metabolizmie kwasu arachidonowego, obiecującym wydaje się opracowanie testu *in vitro*, który umożliwiłby rozpoznawanie astmy aspirynowej, bez przeprowadzania czasochłonnych i obciążonych pewnym ryzykiem prób prowokacyjnych. Ostatnio Kowalski i wsp. zaproponowali rozpoznawanie nadwrażliwości na aspirynę za pomocą badania generacji kwasu 15-



hydroksyeikozatetraenowego (15-HETE) przez leukocyty krwi obwodowej (tzw. *Aspirin-Sensitive Patients Identification Test - ASPITest*) [44].

### **1.5. Aspiryna i inne inhibitory cyklooksygenaz**

Dopiero 74 lata po odkryciu aspiryny J. Vane opisał mechanizm jej działania, polegający na hamowaniu cyklooksygenazy [127]. Około 20 lat później, po odkryciu istnienia dwóch izoform COX, stwierdzono, że aspiryna hamuje przede wszystkim COX-1 (około 200 razy silniej niż COX-2 w badaniach *in vitro*) [125].

Dwie główne izoformy cyklooksygenazy: COX-1 i COX-2, kodowane są przez dwa różne geny [125]. COX-1 podlega konstytutywnej ekspresji w większości komórek organizmu [125], odgrywa fizjologiczną rolę w różnych narządach (m.in. cytoprotekcyjną – w żołądku i nerkach). COX-2 zwana indukowaną, powstaje w miejscach toczącego się zapalenia i miejscach nowotworzenia, chociaż wykazano, iż w niewielkich ilościach podlega także konstytutywnej ekspresji w niektórych narządach na przykład mózgu, korze nerek i jądrach [27,125]. W błonie śluzowej oskrzeli zarówno chorych na astmę, jak i ludzi zdrowych, stwierdza się występowanie obu izoform COX [16,70,119].

### **1.6. Patogeneza astmy aspirynowej – hipotezy**

#### **Hipoteza cyklooksygenazowa**

Od kiedy stwierdzono, że zażycie aspiryny u części chorych na astmę wywołuje objawy podobne do występujących po ekspozycji na alergen, próbowano wytłumaczyć patomechanizm tego zjawiska. W 1975 roku Szczeklik, Gryglewski i Czerniawska-Mysik zaproponowali hipotezę, według której napady duszności po zażyciu NSLPZ u chorych na astmę są spowodowane zablokowaniem cyklooksygenazy przez te leki [108]. Hipotezę tę oparto na następujących obserwacjach:

- Stwierdzono, że wszystkie leki, które powodują napady duszności u chorych na AIA hamują COX.
- Oceniana w badaniach *in vitro* siła działania blokującego COX przez NSLPZ koreluje z ryzykiem poważnych objawów klinicznych u chorych na astmę aspirynową.
- Chorzy na AIA mogą zażywać leki przeciwbólowe, które hamują COX w niewielkim stopniu albo nie działają na ten enzym: trójsalicylan cholinowo-

magnezowy, dekstropropoksyfen, salicylamid, salicylan choliny, benzydaminę, azapropazon i paracetamol (w dawkach nieprzekraczających 1000 mg).

- Ponadto po uzyskaniu tolerancji na aspirynę (poprzez podawanie w określonych odstępach czasu stopniowo zwiększanych dawek) chorzy tolerują również inne NSLPZ.

Konsekwencją tej hipotezy oraz późniejszego odkrycia nadprodukcji leukotrienów w astmie aspirynowej jest teoria cyklooksigenazowa [118], zgodnie z którą zablokowanie cyklooksigenazy przez aspirynę prowadzi do zmiany kierunku (swoistego *shuntu*) metabolizmu kwasu arachidonowego na drogę przemiany przez 5-lipoksygenazę (5-LO).

### **Hipoteza wirusowa**

Ponieważ wywiad rodzinny jest dodatni jedynie u 5,1% chorych, a objawy choroby pojawiają się zwykle dopiero w 3 lub 4 dekadzie życia [111], wydaje się prawdopodobne, iż w rozwoju AIA bierze udział czynnik lub czynniki środowiskowe. W 1988 roku wysunięto hipotezę, iż wyjściową przyczyną choroby może być przetrwałe zakażenie wirusowe [116]. Miałoby ono prowadzić do rozwoju odpowiedzi immunologicznej zależnej od cytotoksycznych limfocytów T. Ich aktywność, hamowana przez endogenną PGE<sub>2</sub>, ujawniałaby się po przyjęciu NSLPZ, blokujących wytwarzanie tej prostaglandyny. Atak limfocytów T na komórki strukturalne dróg oddechowych prowadziłby do uwalniania mediatorów zapalnych i w efekcie do rozwoju choroby.

### ***Hipoteza o roli zmniejszonej produkcji PGE<sub>2</sub>***

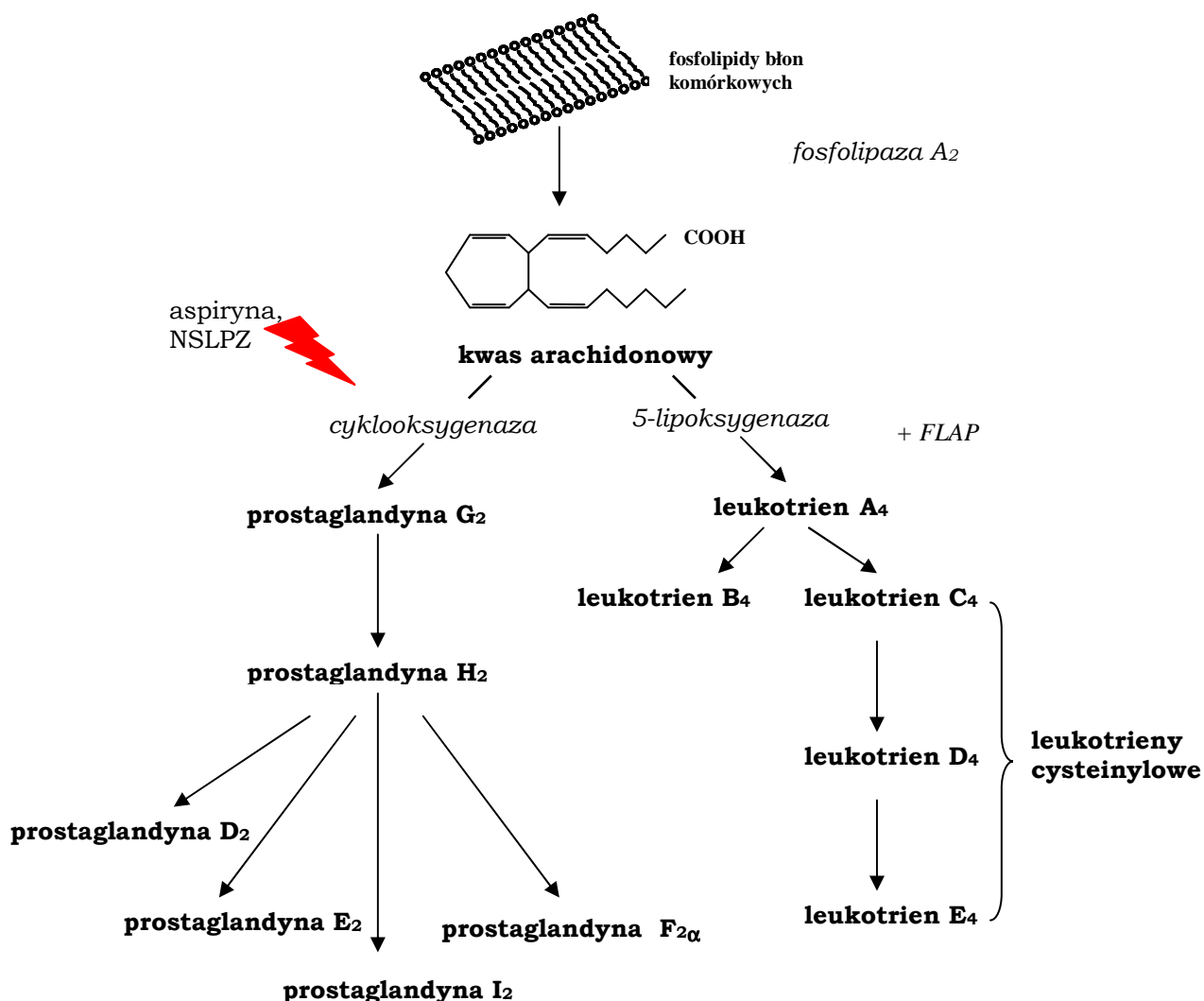
Wypadkową obu przedstawionych koncepcji jest hipoteza, która zakłada udział PGE<sub>2</sub> w patogenezie astmy aspirynowej. Zaproponowana przez A. Szczeklika w 1995 roku, opiera się ona o wyniki badań doświadczalnych, które wskazują, iż zaburzeniu produkcji PGE<sub>2</sub> przez aspirynę towarzyszy wzrost biosyntezy leukotrienów cysteinylowych [117].

## **1.7. Patogeneza astmy aspirynowej – fakty**

Niektóre aspekty patogenezy astmy aspirynowej udało się wyjaśnić. Wiadomo, że odrębny charakter astmy aspirynowej wynika z odmiennych niż u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny zaburzeń metabolizmu kwasu arachidonowego [79].

### **1.7.1. Eikozanoidy**

Eikozanoidy odgrywają rolę przekaźników pierwszego rzędu, które miejscowo w komórce korygują, tzn. wzmacniają lub osłabiają, regulacyjną czynność hormonów i neuromediatorów. Wszechobecność eikozanoidów w organizmie wynika z faktu, iż substrat do ich syntezy - kwas arachidonowy, dwudziestowęglowy wielonienasycony kwas tłuszczowy, jest przechowywany w fosfolipidach błony komórkowej każdej żywej komórki [79,132]. Fosfolipazy mikrosomowe i cytozolowe uwalniają kwas arachidonowy z fosfolipidów błon komórkowych. Następnie enzymy oksydacyjne przekształcają go w charakterystyczny dla danej komórki eikozanoid. Wolny kwas arachidonowy jest m.in. substratem dla lipoksygenazy i cyklooksygenazy (rys. 1) [132].



Rys. 1. Szlak przemian kwasu arachidonowego przez ścieżki cyklooksygenazy i 5-lipoksygenazy

### 1.7.2. Leukotrieny w astmie aspirynowej

Chorych na astmę aspirynową - w porównaniu z chorymi na astmę oskrzelową dobrze tolerującymi aspirynę oraz z osobami zdrowymi - charakteryzuje zwiększona podstawowa produkcja leukotrienów cysteinylowych [11,48,59,102,103]. W astmie aspirynowej podstawowe wydalanie tych leukotrienów z moczem jest od 2–10 razy większe niż w astmie z dobrą tolerancją aspiryny – co stanowi odzwierciedlenie zwiększenia ich ogólnoustrojowej produkcji [41,48,103,104]. Co więcej, wydalanie cyst-LTs z moczem w AIA zwiększa się kilkakrotnie po prowokacji aspiryną w przeciwieństwie do chorych na ATA, u których nie ulega ono zmianie [11,12,48,103].

W popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (*bronchoalveolar lavage fluid* – BAL) pochodzących od chorych na AIA stwierdzono większe stężenia cys-LTs niż w grupie ATA [102]. Ponadto podanie aspiryny – w inhalacji lub dooskrzelowo – u chorych na astmę aspirynową zwiększało poziom cys-LTs w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych [102, 114] i w moczu [69].

Próba donosowa z aspiryną wywoływała wzrost stężenia cys-LTs w popłuczynach z nosa u chorych na astmę aspirynową w porównaniu z chorymi na ATA [17,83].

Ostatnie lata przyniosły rozwój metod o znacznie mniejszej inwazyjności (plwocina indukowana) lub całkowicie nieinwazyjnych (kondensat powietrza wydechowego). Zakłada się, że mediatory i cytokiny znajdujące się w tych materiałach biologicznych powstają w dolnych drogach oddechowych. Wyniki tych nieinwazyjnych badań nad miejscową produkcją cys-LTs w astmie aspirynowej nie są już tak zgodne.

W plwocinie indukowanej nie stwierdzono różnic w stężeniach cys-LTs między grupami AIA i ATA, mimo iż u tych samych chorych wydalanie cys-LTs z moczem było istotnie wyższe w grupie z nadwrażliwością na aspirynę [33].

W kondensacie powietrza wydechowego wyższe niż u ATA stężenia cys-LTs stwierdzano jedynie u chorych na AIA, którzy nie przyjmowali steroidów wziewnych [2]. U chorych na astmę z nadwrażliwością na aspirynę leczonych steroidami wziewnymi stężenia cys-LTs w kondensacie powietrza wydechowego były podobne do wartości osiąganych w grupie chorych na astmę z dobrą tolerancją ASA [2]. Natomiast stężenia cys-LTs w kondensacie powietrza wydechowego znamienne wzrastały po prowokacji aspiryną w grupie AIA w stosunku do grupy chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny [90].

Zjawisko zwiększonej produkcji leukotrienów cysteinylowych w warunkach podstawowych, jak i po prowokacji ASA, częściowo udało się wyjaśnić przez stwierdzenie zwiększonej (w porównaniu z ATA) ekspresji syntazy LTC<sub>4</sub>, końcowego enzymu na drodze przemian cys-LTs w mastocytach i eozynofilach błony śluzowej oskrzeli chorych na AIA [15]. Podwyższony poziom cys-LTs w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych korelował dodatnio z liczbą komórek wykazujących ekspresję LTC<sub>4</sub>S w bioptatach oskrzeli [15]. Przynajmniej w pewnym zakresie zjawisko to można tłumaczyć większą częstością wariantu allelicznego –444C w rejonie części promotorowej genu LTC<sub>4</sub>S u chorych na AIA [92,93].

Ostatnio pojawiły się prace, w których zwiększoną produkcję cys-LTs u chorych na astmę aspirynową przypisuje się głównie współistnieniu przewlekłego zapalenia błony śluzowej nosa i zatok przynosowych z polipowatością [32,80,105]. U chorych na ATA, u których nos i zatoki były zajęte przez przewlekły proces zapalny, wykazano również zwiększoną produkcję cys-LTs, w porównaniu z chorymi na ATA bez zmian w górnych drogach oddechowych [32].

Tak więc leukotrieny cysteinylowe wyłoniły się jako główne mediatory w patogenezie astmy aspirynowej.

W innej postaci nadwrażliwości na aspirynę – u chorych reagujących pokrzywką i(lub) obrzękiem naczynioruchowym - stwierdzono również zwiększone wydalanie LTE<sub>4</sub> z moczem w warunkach podstawowych i po doustnym teście prowokacyjnym z ASA w stosunku do osób zdrowych oraz chorych na przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną dobrze tolerujących aspirynę [60]. Wykazano, iż leukotrieny cysteinylowe odgrywają też rolę w innych, oprócz astmy oskrzelowej, procesach alergicznych, m.in. w zaostrzeniu atopowego zapalenia skóry [1].

Po sklonowaniu receptorów dla leukotrienów cysteinylowych - cysLT1 i cysLT2 - zwrócono uwagę na ich rolę w patogenezie nadwrażliwości na ASA [54,120]. Wykazano, że leukocyty śluzówki nosa chorych na AIA z nieżytem nosa i zatok przynosowych wykazują nadmierną ekspresję receptora cysLT1 w porównaniu z osobami niewrażliwymi na ASA. Nie wykazano takiej zależności w odniesieniu do receptorów cysLT2 [14]. Zwraca się też uwagę na możliwy udział polimorfizmów genów dla receptorów cysteinylowych w patogenezie astmy z nadwrażliwością na aspirynę [75].

### **1.7.3. Prostanoidy**

Już w latach 30. XX wieku dwaj badacze, Von Euler i Goldblatt, niezależnie od siebie wykryli w płynie nasiennym substancję kurczącą pasek wyizolowanego mięśnia macicy [132]. Substancja ta wstrzyknięta dożylnie zwierzętom laboratoryjnym wykazywała działanie hipotensyjne.

W 1957 roku Bergström i Sjövall wyosobnili z płynu nasiennego substancje lipidowe zawierające pierścień cyklopentanowy. Substancję lepiej rozpuszczalną w eterze etylowym nazwano prostaglandyną E (PGE), a w buforze fosforanowym – prostaglandyną F (PGF). W 1964 roku stwierdzono, że prostaglandyny (PGs) są syntetyzowane w organizmie z tzw. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

[99,132]. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe, jak kwas linolenowy, są przetwarzane w wątrobie do kwasu dihomo- $\gamma$ -linolenowego, a ten do kwasu arachidonowego (*arachidonic acid* – AA). Z kwasu dihomo- $\gamma$ -linolenowego powstają prostaglandyny monoenowe (PGE<sub>1</sub>), z kwasu arachidonowego - dienowe (PGE<sub>2</sub>). Ludzie stosujący przeciętną dietę europejską wytwarzają w swoich tkankach prawie wyłącznie prostaglandyny dienowe, które wywodzą się z kwasu arachidonowego [132].

Kwas arachidonowy jest substratem dla syntazy prostaglandyny G/H, częściej nazywanej cyklooksyzgenazą (COX). Enzym ten wykazuje aktywność cyklooksyzgenazową i peroksydazową [114,132]. Katalizuje on powstanie cyklicznych wewnętrznych nadtlenków prostaglandynowych (PGG<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub>). Są one bardzo nietrwałe i łatwo ulegają rozpadowi do kwasu tłuszczowego i dialdehydu malonowego, o ile wcześniej nie zostaną przekształcone przez tkankowo swoiste izomerazy (syntetazy) do prostanoidów: tromboksanów (w płytkach krwi), prostacykliny (w śródbłonku naczyń) i prostaglandyn (w pozostałych tkankach) [114].

Prostaglandyny nie są magazynowane w organizmie. Tworzą się w miarę potrzeb *ex tempore* i znikają w bardzo krótkim czasie po wykonaniu swego zadania [132]. W wielu komórkach znajduje się układ enzymatyczny unieczyniający prostaglandyny. Większość prostaglandyn jest rozkładana w prawie 90–95% podczas jednego pasażu przez płuca [85]. Tylko niewielkie ilości, które uniknęły rozkładu w krążeniu płucnym, są metabolizowane w wątrobie i nerkach. Produkty tego metabolizmu wydalane są głównie z moczem [67,132].

Dla badań nad systemową produkcją prostaglandyn jest ważne oznaczanie ich metabolitów w moczu [67,97]. Oznaczanie macierzystego związku prostaglandyn w różnych materiałach biologicznych jest często zakłócone przez generację tych cząsteczek *ex vivo*, np. przy pobieraniu krwi dochodzi do aktywacji płytek i innych komórek zdolnych do produkcji eikozanoidów [67,97,132]. Uszkodzenie, zwykłe nacięcie czy nawet dotknięcie tkanki izolowanej prowadzi do zwiększenia zawartości prostaglandyn. Jeśli zastosowana metoda pobierania próbek wywołuje odczyn zapalny, można się spodziewać większego niż normalnie stężenia eikozanoidów w oznaczeniach [67,132].

#### 1.7.4. Prostaglandyna E<sub>2</sub>

Prostaglandynę E<sub>2</sub> odkryto, jako jedną z pierwszych, już w latach 40. ubiegłego wieku, a jej strukturę chemiczną ustalono w latach 60. [27,99,132]. PGE<sub>2</sub> powstaje na drodze przemiany kwasu arachidonowego pod wpływem COX. Najpierw tworzą się cykliczne wewnętrzne nadtlenki PGG<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, które następnie ulegają działaniu syntazy PGE<sub>2</sub>. W komórce istnieją dwie formy syntazy PGE<sub>2</sub> - błonowa i cytozolowa [99]. Błonowa syntaza PGE<sub>2</sub> jest czynnościowo związana z COX-2 – odpowiada za proces zapalny i opóźnioną syntezę PGE<sub>2</sub> [66]. Cytozolowa syntaza PGE<sub>2</sub>, zależna od COX-1, odgrywa rolę w natychmiastowej syntezie PGE<sub>2</sub> i utrzymaniu homeostazy tkankowej [121].

PGE<sub>2</sub> działa przez cztery receptory: EP1, EP2, EP3 i EP4, co determinuje jej różnorodne funkcje w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych [20,68]. Receptory te, związane z białkiem G, złożone są z siedmiu domen tkwiących w błonie komórkowej. Każdy z tych receptorów kodowany jest przez oddzielny gen, a receptor EP3 występuje w kilku wariantach wynikających z odmiennego składowania mRNA dla tego receptora [20,68].

Pobudzenie receptorów EP2 i EP4 wiąże się ze wzrostem stężenia cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) - są to tzw. „receptory rozkurczowe”. Aktywacja receptora EP3 zwanego „hamującym” powoduje zmniejszenie cAMP. Działanie na receptor EP1, któremu przypisuje się rolę „skurczową”, prowadzi do wzrostu wapnia wewnątrzkomórkowego [27]. Rolę tych receptorów badano na modelach zwierzęcych, głównie u myszy pozbawionych genów dla poszczególnych receptorów („*knock-out mice*”) [68]. Wykazano znaczenie receptorów EP1 rozmieszczonych na komórkach nerwowych nerwów rdzeniowych w odczuwaniu bólu związanego z zapaleniem. Receptory EP2 zlokalizowane są na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i oskrzeli oraz w żeńskim układzie rozrodczym. Przez te receptory prostaglandyna E<sub>2</sub> rozkurcza mięśnie gładkie oskrzeli i naczyń krwionośnych oraz bierze udział w dojrzewaniu komórki jajowej i owulacji. Ponadto aktywacja receptora EP2 przez PGE<sub>2</sub> wpływa na zahamowanie degranulacji komórek tucznych [38]. Receptory EP3 zlokalizowane są prawdopodobnie w ośrodkowym układzie nerwowym i uczestniczą w powstawaniu gorączki w odpowiedzi na pirogeny [68]. Wykazano także rolę tych receptorów w supresji zapalenia alergicznego [51]. Receptory EP4 zlokalizowane na osteoklastach odgrywają rolę w resorpcji kości [68].



Znaczenie poszczególnych receptorów PGE<sub>2</sub> oraz ich dokładna dystrybucja komórkowa u ludzi wciąż pozostają przedmiotem badań [38,51,74,131].

PGE<sub>2</sub> powstaje w dużych ilościach w miejscach, gdzie toczy się stan zapalny i pośredniczy w powstawaniu wielu cech zapalenia. Silnie rozszerza naczynia i działa synergistycznie z innymi mediatorami i chemotaksynami, nasilając przepuszczalność mikronaczyń i prowadząc do obrzęku [27]. Proces ten w warunkach stanu zapalnego odbywa się głównie przy udziale indukowanej COX-2, która powstaje w różnych typach komórek pod wpływem m.in. czynnika transkrypcyjnego NF-κB [4,42]. PGE<sub>2</sub> odpowiada za wzrost temperatury, a także zwiększa wrażliwość na ból obwodowych zakończeń nerwowych zlokalizowanych śródskórnio. Oprócz właściwości zapalnych opisywano także jej rolę immunomodulacyjną. Odgrywa ona bowiem znaczenie w ustępowaniu procesu zapalnego [99].

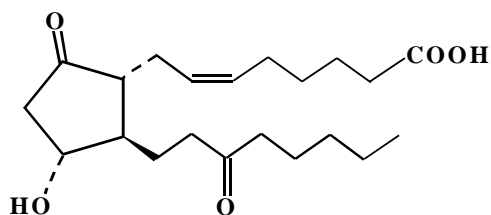
U osób zdrowych podanie nieselektywnego inhibitora COX (ibuprofenu), jak i selektywnego inhibitora COX-2 (rofekoksybu) prowadzi do podobnego zmniejszenia stężenia PGE<sub>2</sub> w moczu, co wskazywałoby, że za produkcję PGE<sub>2</sub> *in vivo* odpowiada głównie COX-2 [67]. U osób zdrowych ogólnoustrojowa produkcja PGE<sub>2</sub> (określana na podstawie wydalania z moczem jej metabolitu - kwasu 9,15-diketo-11α-hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano -1,20 dikarboksyłowego) jest dwukrotnie większa u mężczyzn niż u kobiet [67].

#### **1.7.5. Metabolizm PGE<sub>2</sub>**

Podobnie jak większość prostaglandyn, PGE<sub>2</sub> ulega szybkiej degradacji (co utrudnia możliwości jej oznaczania). Czas biologicznego półtrwania PGE<sub>2</sub> w układzie krążenia wynosi 30 sekund, a prawidłowe stężenie - 3-12 pg/ml osocza krwi [19]. Udowodniono, iż metabolizm PGE<sub>2</sub> odbywa się dwustopniowo. Najpierw PGE<sub>2</sub> przenika przez błonę komórkową do cytoplazmy, a następnie podlega oksydacji wewnątrz komórki [96]. Transport do komórki wymaga białek nośnikowych, ponieważ prostaglandyny słabo dyfundują przez błony komórkowe. Transport ten jest czynnikiem wpływającym na tempo inaktywacji PGE<sub>2</sub> [96]. Główne nośniki PGE<sub>2</sub> to PGT (*prostaglandin transporter* - transporter prostaglandyn zwany także *matrin*) oraz wieloswoisty transporter anionów organicznych (*multispecific organic anion transporter* – MOAT) [35]. Zahamowanie transportu dokomórkowego np. przez różne leki, w tym indometacynę, hamuje katabolizm PGE<sub>2</sub> [5]. Cytokiny prozapalne mogą

wpływać na działanie prostaglandyn przez koordynowanie aktywności enzymów katalizujących zarówno syntezę, jak i katabolizm prostaglandyn [65].

Wewnątrz komórki  $\text{PGE}_2$  podlega działaniu dehydrogenazy 15-hydroksyprostaglandynowej (15-PGDH). Następuje utlenienie grupy hydroksylowej przy węglu C-15 i utworzenie w tym miejscu grupy karbonylowej (ketonowej  $=\text{C}=\text{O}$ ). Powstały związek, 15-keto- $\text{PGE}_2$ , jest nieaktywny biologicznie i nietrwały. Ulega on dalszej przemianie, polegającej na uwodornieniu przy udziale 15-keto-prostaglandyno- $\Delta^{13}$  reduktazy do 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandyny  $\text{E}_2$ , nazywanej w skrócie  $\text{PGE}_2\text{-M}$  (rys. 2) [31].

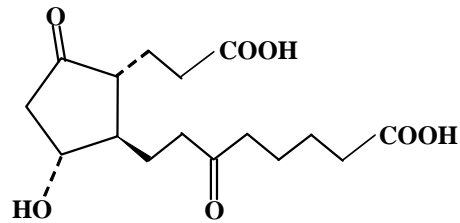


Rys. 2. Metabolit 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGE}_2$  ( $\text{PGE}_2\text{-M}$ )

Badania wykazały, że poziom tego metabolitu u zdrowego człowieka w osoczu wynosi 20-50 pg/ml [95]. Wadą tego związku, jeśli chodzi o ilościowe oznaczanie, jest jego szybka degradacja, bowiem jego okres półtrwania wynosi 8 minut [95,132]. 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandyna  $\text{E}_2$  ulega nie tylko reakcjom z udziałem enzymów, ale także przemianom nieenzymatycznym [19]. W przemianach tych odgrywają rolę takie czynniki, jak pH środowiska, temperatura czy obecność innych substancji, na przykład białka - albuminy. W środowisku o pH równym 7 lub zbliżonym do tej wartości oraz kwaśnym i bez obecności w nim albuminy, następuje dehydratacja (odszczępienie cząsteczki wody) i powstaje nietrwały metabolit, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandyna  $\text{A}_2$  [19]. W roztworach alkalicznych lub obojętnych (ale zawierających albuminę, która jest katalizatorem reakcji) 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGE}_2$  ulega szybko spontanicznej cyklizacji do 11-deoksy-13,14-dihydro-15-keto-11 $\beta$ ,16 $\xi$ -cyklo-prostaglandyny  $\text{E}_2$  (bicyklo- $\text{PGE}_2$ ) [19,26,39]. Metabolit bicyklo- $\text{PGE}_2$  jest związkiem trwałym chemicznie, a więc wygodnym do ilościowego oznaczania. Zmiana jego stężenia bardzo dobrze odzwierciedla zmianę poziomu samej  $\text{PGE}_2$  w organizmie [26].

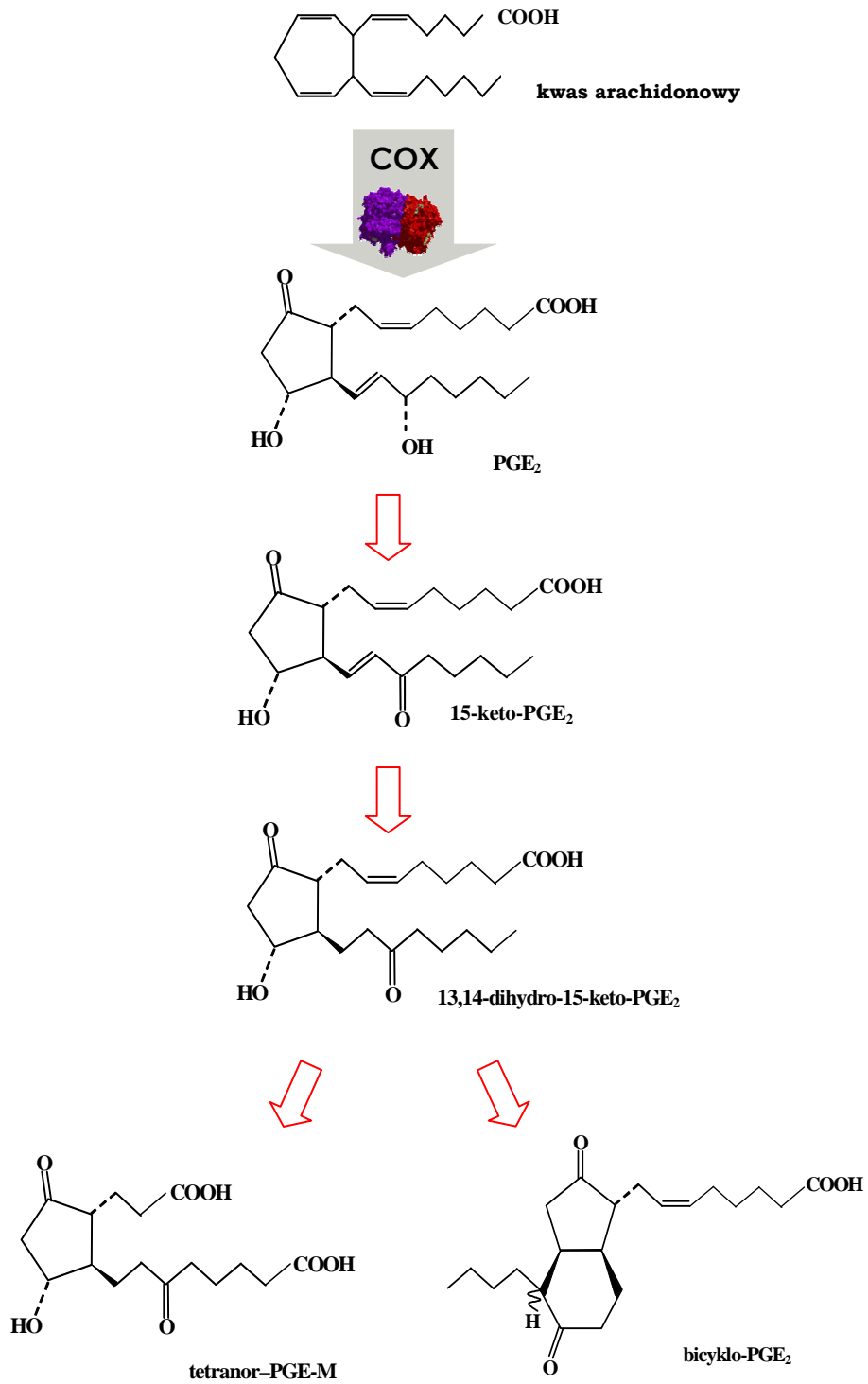
Kolejną drogą przemiany 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandyny  $\text{E}_2$  są reakcje  $\beta$ - i  $\omega$ -oksydacji. Prowadzą one do powstania związków o coraz krótszych łańcuchach

bocznych: dinor-, trinor-, i tertranor-metabolitów. Związki te są wydalane z moczem [97]. Kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20 dikarboksylowy (tetranor-PGE-M) - to główny metabolit prostaglandyny E<sub>2</sub> (rys. 3) [97].



Rys. 3. Stabilny metabolit PGE<sub>2</sub> – tetranor- PGE-M

Osoby zdrowe wydalają z moczem 7-45  $\mu$ g tego związku w ciągu doby. Metabolit ten jest trwały i jest uważany za marker biosyntezy PGE<sub>2</sub> [97]. Schemat metabolizmu PGE<sub>2</sub> przedstawia rysunek (rys. 4).



Rys. 4. Droga przemiany kwasu arachidonowego do prostaglandyny E<sub>2</sub> i jej metabolitów

### **1.7.6. PGE<sub>2</sub> w astmie oskrzelowej**

PGE<sub>2</sub> jest prostaglandyną wytwarzaną w największych ilościach w układzie oddechowym. Produkują ją komórki nabłonka, mięśni gładkich, fibroblasty, eozynofile, makrofagi i komórki dendrytyczne [53,84].

Prostaglandyna ta w układzie oddechowym wykazuje działanie rozszerzające oskrzela, toteż od dawna znajduje się w centrum uwagi badaczy zajmujących się astmą, upatrujących patomechanizm astmy oskrzelowej w zaburzeniach równowagi między substancjami rozszerzającymi i kurczącymi oskrzela [76].

Wyniki dotychczasowych badań nad rolą PGE<sub>2</sub> w patogenezie astmy oskrzelowej nie są jednoznaczne. Z jednej strony z uwagi na jej prozapalne działanie mogłaby ona odgrywać rolę w procesie zapalenia astmatycznego [27]. Z drugiej strony - wykazano jej ochronne działanie na bodźce stymulujące skurcz oskrzeli [22,61,77,78, 100,109]. Różnice te być może należy rozpatrywać przez pryzmat receptorowego działania PGE<sub>2</sub>.

W szczególności PGE<sub>2</sub> wydaje się odgrywać istotną rolę w astmie aspirynowej. Po zablokowaniu COX przez aspirynę stężenie tej prostaglandyny najprawdopodobniej obniża się, co powoduje niedobór mediatora o działaniu rozszerzającym oskrzela na korzyść substancji kurczących mięśnie gładkie oskrzeli [117]. Ale to samo zjawisko powinno zachodzić u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Dlaczego więc w tej grupie nie obserwuje się reakcji nadwrażliwości po zażyciu ASA?

#### ***Rola ochronna PGE<sub>2</sub> w astmie oskrzelowej***

Wykazano, iż PGE<sub>2</sub> podana w inhalacji zmniejsza lub zapobiega skurczowi oskrzeli indukowanemu alergenem [22,78], wysiłkiem fizycznym [61] i aspiryną [100,109]. W przypadku prowokacji aspiryną u chorych na AIA inhalacja PGE<sub>2</sub> zapobiega wystąpieniu charakterystycznego wzrostu stężenia cys-LTs w moczu [100].

W badaniu *in vitro* wzrost wydzielania cys-LTs przez leukocyty krwi obwodowej od chorych na AIA po stymulacji aspiryną ulegał zahamowaniu pod wpływem PGE<sub>2</sub> [10].

Wykazano również, iż PGE<sub>2</sub> hamuje proliferację miocytów i aktywność fibroblastów, uwalnianie acetylocholinę z zakończeń nerwowych [100] i tlenu azotu z komórek zawierających indukowaną syntazę tlenu azotu [40], dzięki czemu moduluje napięcie mięśni gładkich oskrzeli zarówno osób zdrowych, jak i chorych na astmę oskrzelową. Ponadto PGE<sub>2</sub> osłabia aktywację komórek zapalnych - ma zdolność

hamowania degranulacji mastocytów i eozynofików [38] oraz działa hamująco na syntezę cys-LTs [46,122].

### ***Produkcja PGE<sub>2</sub> w oskrzelach w astmie aspirynowej***

W badaniach nad miejscową (oskrzelową) produkcją eikozanoidów w astmie aspirynowej wykazano, że w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych podstawowy poziom PGE<sub>2</sub> był znamienne wyższy u chorych na AIA w porównaniu z ATA [102]. Po inhalacji aspiryny lizynowej u chorych na astmę aspirynową dochodziło do istotnego zmniejszenia stężenia PGE<sub>2</sub> w BAL-u w porównaniu ze stężeniami podstawowymi [102]. W kolejnych badaniach w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych nie stwierdzono jednak różnic w podstawowych stężeniach PGE<sub>2</sub> między grupami AIA i ATA. Po dooskrzelowym podaniu aspiryny stężenie PGE<sub>2</sub> w BAL-u obniżało się znamienne w obu grupach [114].

W płwocinie indukowanej nie stwierdzono różnic między grupami AIA i ATA w zakresie podstawowych stężeń PGE<sub>2</sub> [33], jakkolwiek u chorych na astmę oskrzelową (bez rozróżnienia na grupy AIA i ATA) stężenie PGE<sub>2</sub> w płwocinie indukowanej było większe niż u osób zdrowych i ściśle korelowało z eozynofilią bezwzględna i stężeniem ECP (*eosinophilic cationic protein* - eozynofilowe białko kationowe) [87].

W badaniach kondensatu powietrza wydechowego nie stwierdzono różnic między grupami AIA i ATA w zakresie stężeń PGE<sub>2</sub> w warunkach podstawowych [2,90] ani po teście prowokacyjnym z aspiryną [90].

W hodowli fibroblastów oskrzeli od chorych na AIA, ATA i zdrowych osób nie było różnic między grupami w podstawowym uwalnianiu PGE<sub>2</sub> przez te komórki. W odpowiedzi na bodźce zapalne fibroblasty od osób zdrowych znacznie (35-krotnie) zwiększały produkcję PGE<sub>2</sub>. Ta sama reakcja u chorych na ATA miała nieco mniejsze nasilenie (wzrost 16-krotny), a u chorych na AIA odpowiedź na bodźce zapalne była najslabsza (wzrost 4-krotny) [84].

### ***PGE<sub>2</sub> w górnych drogach oddechowych w nadwrażliwości na aspirynę***

Poszukując wyjaśnienia roli PGE<sub>2</sub> u chorych z nadwrażliwością na aspirynę, badano także zjawiska zachodzące w górnych drogach oddechowych, które jak się obecnie uważa, stanowią *continuum* z dolnymi drogami oddechowymi [106].

W płynie z płukania jamy nosowej, zarówno w grupie AIA, jak i ATA, stężenie PGE<sub>2</sub> znamienne obniżało się po podaniu aspiryny miejscowo w postaci roztworu

aspiryny lizynowej wstrzykiwanego do badanego nozdrza [83]. Podobnie po doustnym teście prowokacyjnym z aspiryną stężenie PGE<sub>2</sub> obniżało się w popłuczynach z jamy nosowej, zarówno u chorych na astmę aspirynową, jak i u chorych na astmę dobrze tolerujących aspirynę [17].

Komórki nabłonka polipów nosa od chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na ASA skojarzoną z nieżytem nosa produkowały mniej PGE<sub>2</sub> w porównaniu z grupą chorych na ATA i przewlekły nieżyt nosa. Po stymulacji tych komórek aspiryną w przypadku nadwrażliwości na ASA spadek generacji PGE<sub>2</sub> był większy niż w hodowli komórek pochodzących od chorych z grupy ATA [43].

Podobne wyniki przyniosło badanie biopsji śluzówki nosa i zatok od chorych z nadwrażliwością na ASA - stwierdzono zmniejszony poziom mRNA COX-2 i stężenia PGE<sub>2</sub> w porównaniu z chorymi z nieżytem nosa bez nadwrażliwości na ASA [81]. Również w błonie śluzowej operacyjnie usuniętych polipów nosa od chorych na AIA stwierdzono znacznie mniejszą ekspresję COX-2 w porównaniu z ATA [82].

### ***Produkcja PGE<sub>2</sub> przez komórki krwi obwodowej w astmie aspirynowej***

Pojedyncze obserwacje dotyczące zwiększonego uwalniania PGE<sub>2</sub> przez leukocyty krwi obwodowej w AIA [25] nie zostały potwierdzone w innych badaniach [124]. W badaniu komórek krwi obwodowej (łącznie monocytów, limfocytów i leukocytów) od chorych na AIA w warunkach podstawowych okazało się, iż produkują one więcej cys-LTs i mniej PGE<sub>2</sub> niż w przypadku ATA. Po prowokacji aspiryną w grupie AIA następował znaczny wzrost uwalniania cys-LTs, bez zmian w uwalnianiu PGE<sub>2</sub>, podczas gdy w komórkach z grupy ATA znacznemu zmniejszeniu uwalniania PGE<sub>2</sub> nie towarzyszyły żadne zmiany w zakresie cysLTs [94].

Z kolei komórki dendrytyczne uzyskane z krwi obwodowej chorych na astmę oskrzelową (bez rozróżnienia na AIA i ATA) produkują więcej PGE<sub>2</sub> w porównaniu z osobami zdrowymi [53].

### ***Rola receptorów dla PGE<sub>2</sub> w astmie aspirynowej***

Poszukując wytłumaczenia zjawisk zachodzących w astmie aspirynowej w ostatnich latach zwrócono uwagę na receptory dla PGE<sub>2</sub>. Zauważono, że w biopsjach błony śluzowej nosa uzyskanych od chorych na nieżyt nosa z nadwrażliwością na aspirynę odsetek komórek zapalnych - neutrofilii, mastocytów, eozynofili i limfocytów T - wykazujących ekspresję receptora dla PGE<sub>2</sub> typu EP2 jest istotnie mniejszy

w porównaniu z chorymi na nieżyt nosa bez nadwrażliwości na aspirynę [131]. Receptor ten mediuje przeciwzapalne działanie prostaglandyny E<sub>2</sub>.

Jinnai i wsp. przebadali 370 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w 63 genach kandydackich od 198 chorych na astmę aspirynową. Stwierdzili oni częstsze występowanie polimorfizmu uS5 w rejonie regulatorowym genu receptora dla PGE<sub>2</sub> typu EP2 [37]. Badacze wskazują, iż występowanie tego polimorfizmu u części chorych na AIA jest odpowiedzialne za zmniejszenie ekspresji receptora EP2 na mastocytach, eozynofilach i makrofagach w porównaniu z osobami niewykazującymi tego polimorfizmu. To z kolei mogłoby się przyczyniać do supresji przeciwzapalnego i bronchoprotekcyjnego działania PGE<sub>2</sub> u chorych na AIA.

### ***Zaburzenia równowagi między syntezą i katabolizmem PGE<sub>2</sub> w astmie oskrzelowej***

Niedawno pojawiły się sugestie, iż u podłoża patofizjologii astmy oskrzelowej mogą też leżeć zaburzenia równowagi między aktywnością enzymów odpowiedzialnych za syntezę PGE<sub>2</sub> (syntaz PGE<sub>2</sub>) a enzymami związanymi z jej katabolizmem w płucach (dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa - 15-PGDH) [123]. Wykazano, że stymulacja przez IL-13 komórek nabłonka oskrzeli chorych na astmę wywołuje zmniejszenie ekspresji indukowanej błonowej syntazy PGE. IL-13 jest jedną z interleukin produkowanych przez limfocyty Th<sub>2</sub> – komórki silnie zaangażowane w rozwój zapalenia alergicznego. Jednocześnie stymulacja tą interleukiną komórek nabłonka oskrzeli wywoływała wzrost ekspresji 15-PGDH w porównaniu z osobami zdrowymi [123]. Konsekwencją tych zmian w ekspresji enzymów odpowiedzialnych za syntezę i rozkład PGE<sub>2</sub> mogłoby być zmniejszenie poziomu tej prostaglandyny w drogach oddechowych u chorych na astmę oskrzelową.



## 2. Założenia pracy

Dotychczas w patogenezie astmy aspirynowej bezspornym pozostaje fakt większego niż w astmie z dobrą tolerancją aspiryny wydalania leukotrienów cysteinylowych z moczem w warunkach podstawowych oraz wzrost wydalania cys-LTs po prowokacji aspiryną.

W oparciu o hipotezy oraz dotychczasowe wyniki badań zwiększona produkcja cys-LTs po podaniu aspiryny u chorych na AIA mogłaby wynikać z zablokowania COX-1 przez aspirynę, co w konsekwencji powodowałoby zmniejszenie syntezy PGE<sub>2</sub>. Niedobór tej prostaglandyny przyczyniałby się do ułatwienia czy też odblokowania syntezy cys-LTs przez 5-LO.

Dotychczasowe badania dotyczące produkcji PGE<sub>2</sub> w astmie z nadwrażliwością na aspirynę skupiały się raczej na określeniu jej miejscowej produkcji. Oznaczano ją w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych [102,114], popłuczynach z nosa [17,83], płwocinie indukowanej [33] i kondensacie powietrza wydechowego [2,90]. Oznaczano ją także w bioptatach błony śluzowej nosa i zatok przynosowych [81] oraz polipów nosa u chorych z nieżytem nosa w przebiegu nadwrażliwości na aspirynę [43].

Interesujące, w kontekście istniejących hipotez oraz dotychczasowych wyników badań, byłoby poznanie ogólnoustrojowej produkcji prostaglandyny E<sub>2</sub> u chorych na astmę oskrzelową, a szczególnie chorych na astmę aspirynową. Ciekawe byłoby też ustalenie, jak na ogólnoustrojową produkcję PGE<sub>2</sub> u tych chorych wpływa zażycie aspiryny. Uważa się, że o systemowej produkcji PGE<sub>2</sub> świadczą jej metabolity wydalane z moczem [8,67,97]. Dotychczas nigdy nie prowadzono ilościowych oznaczeń produktów metabolizmu PGE<sub>2</sub> w moczu u chorych na astmę oskrzelową. Prace nad tym zagadnieniem od niedawna prowadzone są w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie [57].

Badanie ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> na podstawie wydalania jej metabolitów z moczem jest tematem niniejszej pracy. Cenne byłoby także uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy między systemową produkcją leukotrienów cysteinylowych a systemową produkcją PGE<sub>2</sub> zachodzi jakiś związek.

### 3. Cele badania

1. Porównanie wydalania z moczem głównych metabolitów prostaglandyny E<sub>2</sub>: 13,14-dihydro-15-keto PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>-M) i kwasu 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksyłowego (tetranor-PGE-M) w dwóch grupach chorych na astmę: z nadwrażliwością i bez nadwrażliwości na aspirynę w warunkach podstawowych oraz po prowokacji aspiryną (nieselektywnym inhibitorem COX) i celekoksybem (selektywnym inhibitorem COX-2).
2. Ustalenie związku pomiędzy ogólnoustrojową produkcją PGE<sub>2</sub> (określaną na podstawie wydalania jej metabolitów z moczem) a ogólnoustrojową produkcją leukotrienów cysteinylowych (określaną na podstawie ich wydalania z moczem) u chorych na astmę aspirynową i chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny.
3. Próba przybliżenia odpowiedzi na pytanie: jaką rolę w astmie z nadwrażliwością na aspirynę odgrywa PGE<sub>2</sub>?

## 4. Materiały i metody

Badanie składało się z dwóch etapów.

Etap I polegał na przeprowadzeniu doustnego testu prowokacyjnego z wzrastającymi dawkami aspiryny oraz testu prowokacyjnego z jednorazową dawką celekoksybu w dwóch grupach chorych na astmę oskrzelową: z nadwrażliwością na aspirynę i dobrą tolerancją aspiryny. Etap II polegał na wykluczeniu lub potwierdzeniu wpływu różnych dawek aspiryny na wydalanie metabolitów PGE<sub>2</sub> z moczem.

W I etapie u chorych na astmę aspirynową reakcja nadwrażliwości wystąpiła po różnych dawkach kumulacyjnych aspiryny (w tym u 9 chorych po dawce kumulacyjnej 188 mg), natomiast wszyscy chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny otrzymali aspirynę w dawce kumulacyjnej 500 mg. Dlatego w II etapie u 10 chorych na astmę dobrze tolerujących aspirynę przeprowadzono test prowokacyjny z aspiryną do dawki kumulacyjnej 188 mg.

### 4.1. Etap I – charakterystyka badanych

W I etapie badanie zostało przeprowadzone u 34 chorych na astmę oskrzelową rekrutowanych z Poradni Przyklinicznej Kliniki Pulmonologii II Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie. 17 osób stanowili chorzy na astmę aspirynową, która została rozpoznana na podstawie dodatniego wyniku doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną wykonanego w ciągu dwóch ostatnich lat przed badaniem. 17 osób stanowili chorzy na astmę z ujemnym wywiadem w kierunku nadwrażliwości na aspirynę. Chorzy ci zażywali aspirynę lub inne NSLPZ w ciągu ostatnich 6 miesięcy bez żadnych działań niepożądanych. Grupy chorych na astmę aspirynową (AIA) i chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny (ATA) nie różniły się pod względem parametrów demograficznych oraz parametrów klinicznych, spirometrycznych i laboratoryjnych (czasu trwania astmy, dawki kortykosteroidów wziewnych, podstawowej wartości FEV<sub>1</sub> w każdym dniu badania, eozynofilii bezwzględnej, IgE całkowitego w surowicy, dodatnich testów skórnych). Nie było różnic między grupami również w zakresie czasu trwania astmy i średniej dawki stosowanych kortykosteroidów wziewnych. Nikt z chorych nie zażywał steroidów doustnych. Charakterystykę grup przedstawia tabela (tab.1).

Tabela 1. Kliniczna charakterystyka chorych biorących udział w pierwszym etapie badania.

CHARAKTERYSTYKA	AIA	ATA	p
Liczba chorych	17	17	
Wiek (lata)	42,1±13,8 41 (31-53)	44,5±11,3 44 (37-53)	0,50
Płeć ♀/♂	9/8	13/4	0,28
Czas trwania astmy (lata)	8,0±7,7 5 (2-10)	11,5±9,9 8 (3-20)	0,22
Dawka steroidów wziewnych (µg/d)	1622±777,5 1600 (1000-1600)	1412,5±846,9 1000 (800-1600)	0,14
FEV <sub>1</sub> w dniu placebo (% wartości należnej)	90,4±10,7 94,8 (82,5-98,1)	91,0±11,9 91,5 (81,5-98,9)	0,68
FEV <sub>1</sub> w dniu aspiryny (% wartości należnej)	91,6±11,2 93,9 (85,3-99,8)	94,1±12,0 94,0 (81,9-100,2)	0,71
FEV <sub>1</sub> w dniu celekoksybu (% wartości należnej)	89,4±9,8 90,2 (84,1-93,6)	90,6±13,7 92,0 (78,0-95,7)	0,85
IgE całkowite (IU/ml)	195,4±239,9 157 (47,4-226)	157,1±195,2 69,8 (39,9-152)	0,58
Testy skórne (+/-)	8/6	8/7	0,99
Eozynofilia bezwzględna (1/mm <sup>3</sup> )	433,4±342,8 371 (159-669)	359,3±254,2 312(175-378)	0,68

Wyniki przedstawiono jako średnią ±odchylenie standardowe. Poniżej podano medianę oraz dolny i górny kwartył (w nawiasach).

AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny.

Grupę kontrolną stanowili zdrowi, rekrutowani spośród pracowników II Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ w Krakowie i studentów medycyny. Były to osoby bez chorób atopowych, pokrzywki i astmy w wywiadzie, dobrze tolerujący aspirynę i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne. Rutynowe badania lekarskie nie wykazały u nich odchyłeń od normy. Grupa ta służyła do porównania podstawowego wydalania metabolitów PGE<sub>2</sub> i LTE<sub>4</sub> z moczem. Przez przynajmniej 14 dni przed rozpoczęciem badań zdrowi nie zażywali żadnych leków, w tym również aspiryny i innych NSLPZ, hamujących cyklooksygenazę.

Wszystkie osoby, które brały udział w badaniach wyraziły pisemną świadomą zgodę na badania i zapoznały się z ich celem i założeniami. Projekt badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego, nr zgody KBET/147/B/2005.

***Kryteria włączenia do badania:***

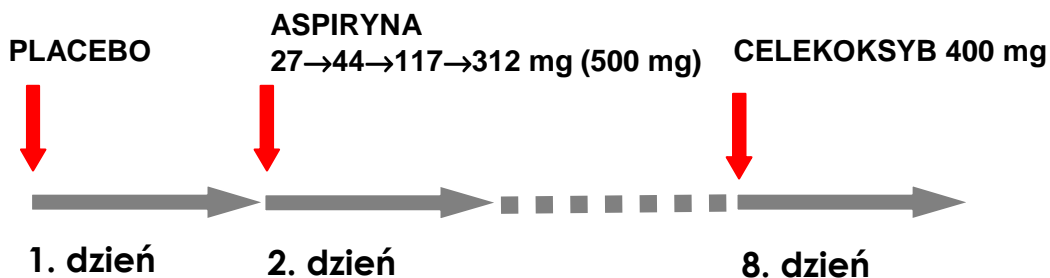
- Wiek 18-70 lat.
- Rozpoznana astma oskrzelowa wg kryteriów zgodnych z międzynarodowymi wytycznymi (*Global Initiative for Asthma - GINA 2005*) [24].
- Dobra kontrola astmy w ciągu ostatniego miesiąca.

***Kryteria wykluczające:***

- FEV<sub>1</sub> poniżej 70% wartości należnej w dniu badania.
- Spadek FEV<sub>1</sub> ≥15% podczas próby z placebo.
- Występowanie zaostrzenia i(lub) hospitalizacja w ciągu ostatnich 3 miesięcy przed rekrutacją.
- Stosowanie kortykosteroidów systemowych w ciągu ostatnich 4 tygodni przed badaniem.
- Choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy: czynna lub w wywiadzie.
- Inne niż astma choroby dolnych dróg oddechowych.
- Inne ciężkie choroby przewlekłe np. układu krążenia, cukrzyca, choroby nowotworowe, choroby nerek, układu pokarmowego.
- Chorzy, u których występowały gwałtowne lub niebezpieczne dla życia reakcje po NSLPZ: obrzęk naczynioruchowy, zespół Stevensa-Jonsona, zespół Lyella, wstrząs anafilaktyczny.
- Ciąża, laktacja.
- Dodatkowo: nadużywanie alkoholu, stosowanie środków odurzających, czynne i bierne palenie papierosów.
- W czasie trwania badania: trudności w sprostaniu wymaganiom protokołu, wycofanie zgody na kontynuację badania.

## 4.2. Etap I – opis badania

Badanie przeprowadzono metodą pojedynczo ślepej próby kontrolowanej placebo. Badanie polegało na wykonaniu doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną i celekoksybem w odstępie siedmiodniowym. Doustny test prowokacyjny z aspiryną wykonano w czasie 2 kolejnych dni. Plan badania przedstawia rysunek (rys.5).



Rys. 5. Plan badania – etap I

Chorzy zostali poinformowani o konieczności odstawienia leków przed badaniem: długo działających  $\beta_2$ -mimetyków - na 24 godziny, krótko działających  $\beta_2$ -mimetyków - na 6 godzin, bromku ipratropium – na 8 godzin, blokerów receptorów leukotrienowych (montelukast, zafirlukast) - na 5 dni, teofiliny o powolnym uwalnianiu - na 24 godziny, krótko działających leków przeciwhistaminowych - na 5 dni, a długo działających leków przeciwhistaminowych - na czas ich działania farmakologicznego. Chorzy mogli przyjmować steroidy wziewne w dawce nie większej niż 2000  $\mu\text{g}$  budesonidu na dobę.

W pierwszym dniu badania chorzy przyjmowali doustnie placebo w sposób identyczny jak aspirynę. W drugim dniu badania chorym podawano doustnie aspirynę we wzrastających dawkach co 1,5 godziny do dawki kumulacyjnej 500 mg. Po tygodniu przerwy u chorych przeprowadzano doustny test prowokacyjny z jednorazową dawką celekoksybu (400 mg). W każdym dniu przed przystąpieniem do badania chorzy byli oceniani pod kątem stabilności astmy oskrzelowej (na podstawie wywiadu dotyczącego objawów klinicznych i przyjmowanych leków oraz badania przedmiotowego), jak również spełniania kryteriów włączenia bądź kryteriów wykluczających (m.in. na podstawie badania spirometrycznego).

Badanie lekarskie przeprowadzono także w chwili zakończenia próby i(lub) wystąpienia reakcji oraz w ciągu sześciu godzin od momentu wystąpieniu reakcji klinicznej.

### ***Doustny test prowokacyjny z aspiryną***

Test doustny z aspiryną przeprowadzono według zmodyfikowanej metody opisanej przez Niżankowską i wsp. z zastosowaniem pojedynczo ślepej próby z placebo, w ciągu dwóch kolejnych dni [71].

W pierwszym dniu badania w celu wyeliminowania dużej niestabilności dróg oddechowych chorym podawano placebo - cztery kapsułki co 1,5 godziny. W drugim dniu badania kolejne wzrastające w postępie geometrycznym dawki aspiryny (27, 44, 117 i 312 mg) podawano podobnie jak placebo, co 1,5 godziny do osiągnięcia kumulacyjnej dawki 500 mg (tab. 2). Aspiryna i placebo miały postać identycznych kapsułek.

Tabela 2. Schemat doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną (etap I).

Godzina	Dzień 1	Dzień 2	
		dawka aspiryny (mg)	dawka kumulacyjna aspiryny (mg)
8.00	placebo	27	(27)
9.30	placebo	44	(71)
11.00	placebo	117	(188)
12.30	placebo	312	(500)

Podczas trwania testów prowokacyjnych chorych uważnie obserwowano pod kątem pojawiania się następujących objawów: drapania w gardle, kaszlu, świszczącego oddechu, duszności, wydzieliny i(lub) blokady nosa, łzawienia oczu, obrzęku spojówek, obrzęku warg i twarzy, a także nudności, wymiotów, bólu w klatce piersiowej, bólu brzucha i bólu głowy. Próbę z placebo przerywano, gdy wystąpiły wahania w kolejnych pomiarach FEV<sub>1</sub> o  $\geq 15\%$  (świadczyło to o niestabilności oskrzeli), a chorego wykluczano z dalszej części badania. Próbę z aspiryną przerywano, gdy spadek FEV<sub>1</sub> wyniósł przynajmniej 20% w stosunku do wartości wyjściowej (próba dodatnia) lub 1,5 godziny po podaniu ostatniej dawki aspiryny (koniec próby – tzw. czas „0”), czyli w momencie osiągnięcia dawki kumulacyjnej aspiryny 500 mg. Dawkę kumulacyjną aspiryny, przy której wystąpił spadek FEV<sub>1</sub> o 20% określano jako dawkę prowokacyjną (*provocation dose* - PD<sub>20</sub>).

W razie wystąpienia intensywnych objawów oskrzelowych lub pozaoskrzelowych stosowano leczenie objawowe, a obserwację wydłużano do 24 lub 48 godzin. Każdy chory w dniu testu prowokacyjnego z aspiryną był hospitalizowany. Pomiary wartości FEV<sub>1</sub> wykonywano wyjściowo tuż przed podaniem pierwszej dawki placebo lub leku (wartość podstawowa), a następnie co 30 minut (w czasie testu oraz przez 4 godziny od momentu zakończenia próby z aspiryną).

W dniu podawania placebo mocz do badań pobierano od chorych na początku badania, następnie 1,5 godziny po ostatniej dawce placebo oraz 2 i 4 godziny później. W dniu podawania aspiryny u chorych z ujemnym testem prowokacyjnym, u których nie wystąpiły żadne objawy kliniczne w czasie do 1,5 godziny po podaniu ostatniej dawki aspiryny (grupa ATA), mocz pobierany był na początku badania, 1,5 godziny po ostatniej dawce leku oraz 2 i 4 godziny później. U chorych z dodatnią reakcją na aspirynę (grupa AIA) pobierano mocz na oznaczanie metabolitów PGE<sub>2</sub> i LTE<sub>4</sub> przed rozpoczęciem testu prowokacyjnego z aspiryną (wartość podstawowa), w czasie wystąpienia reakcji (czas „0”), a następnie 2 i 4 godziny po wystąpieniu reakcji klinicznej.

#### ***Doustny test prowokacyjny z celekoksybem***

Po tygodniu przerwy chorzy zgłaszali się ponownie w celu przeprowadzenia próby prowokacyjnej z celekoksybem (selektywnym inhibitorem COX-2). Z uwagi na udowodnione bezpieczeństwo stosowania leków z tej grupy u większości chorych z nadwrażliwością na aspirynę [30,110] lek ten podawano w jednorazowej dawce 400 mg (tab.3). Jak przed doustnym testem prowokacyjnym z ASA obowiązywały takie same zasady odstawienia leków. Podobnie jak w poprzednich dniach badania, za koniec próby (czas „0”) uznawano czas 1,5 godziny po podaniu leku. Wyjściowo tuż przed podaniem leku, jak i w chwili zakończenia próby oraz 2 i 4 godziny później pobierano mocz do badania stężenia metabolitów PGE<sub>2</sub> i LTE<sub>4</sub>. Pomiary FEV<sub>1</sub> wykonywano przed rozpoczęciem próby oraz co 30 min do 4 godzin po zakończeniu próby. Test uznawano za dodatni, jeżeli w którymkolwiek momencie obserwacji po podaniu celekoksybu FEV<sub>1</sub> zmniejszyło się o co najmniej 20% w porównaniu do wartości wyjściowej.



Tabela 3. Schemat doustnego testu prowokacyjnego z celekoksybem (etap I).

<b>Dzień 8</b>	<b>dawka celekoksybu (mg)</b>	<b>dawka kumulacyjna celekoksybu (mg)</b>
godz. 8.30	400	(400)

***Pomiar natężonej objętości pierwszosekundowej (forced expiratory volume in one second - FEV<sub>1</sub>)***

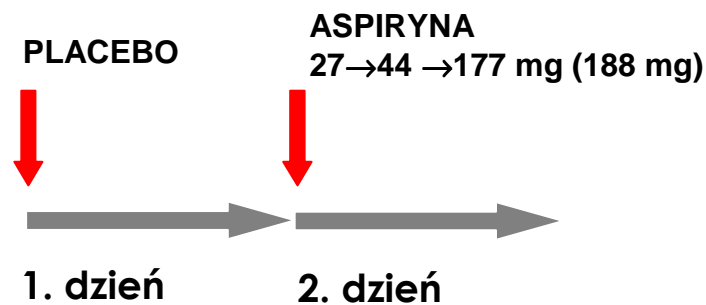
Pomiary FEV<sub>1</sub> wykonano w Pracowni Badań Czynnościowych Płuc II Katedry Chorób Wewnętrznych CM UJ przy użyciu spirometru komputerowego - pneumotachografu (Pneumoscreen, E. Jaeger, Niemcy). Wartości należne FEV<sub>1</sub> dla poszczególnych badanych obliczono, uwzględniając ich płeć, wiek i wzrost z nomogramów opracowanych na spotkaniu roboczym Europejskiej Wspólnoty Węgla i Stali i opublikowanych w czasopiśmie „*Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire*” (1983, 19, supl.5).

**Przygotowywanie próbek moczu do oznaczania stężenia metabolitów PGE<sub>2</sub> i LTE<sub>4</sub>**

Pierwsza próbka moczu pochodziła z dwugodzinnej zbiórki moczu, tzn. wszyscy chorzy oddawali mocz nocny o godzinie 6.00 rano, a następnie zgłaszali się do Pracowni Badań Czynnościowych Płuc, gdzie o godzinie 8.00 na początku badania pobierano pierwszą próbkę moczu. Chorzy oddawali mocz do badania o tej samej godzinie przed podaniem pierwszej dawki leku (lub placebo) w celu uniknięcia wpływu pory dnia na badany parametr. Kolejną próbkę moczu pobierano w chwili wystąpienia reakcji (czas „0”), a w przypadku braku reakcji - w chwili zakończenia próby, czyli 1,5 godziny po podaniu ostatniej dawki placebo, aspiryny lub celekoksybu. Następne próbki moczu pobierano co 2 godziny w czasie czterogodzinnej obserwacji (były to również dwugodzinne zbiórki moczu). Bezpośrednio po uzyskaniu moczu, próbki odwirowywano przy obrotach 3000/min przez 10 min w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu nadsącz (supernatant) przechowywano w temperaturze -80 °C nie dłużej niż 6 tygodni.

### 4.3. Etap II – opis badania i charakterystyka chorych

II etap badania przeprowadzono po zakończeniu I etapu badania i opracowaniu jego wyników. Badanie to miało na celu wyeliminowanie wpływu dawki aspiryny na otrzymane wyniki w pierwszym etapie. Badanie przeprowadzono metodą pojedynczo ślepej próby kontrolowanej placebo. Polegało ono na wykonaniu doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną do dawki kumulacyjnej 188 mg (rys.6).



Rys. 6. Plan badania - etap II

W badaniu uczestniczyło 10 losowo wybranych chorych z grupy ATA, biorących udział w I etapie badania. Do ich wylosowania użyto standardowego generatora liczb pseudolosowych z rozkładu jednostajnego.

Charakterystykę chorych badanych w II etapie przedstawiono w tabeli (tab.4).

Tabela 4. Charakterystyka chorych biorących udział w drugim etapie badania.

CHARAKTERYSTYKA	ATA
Liczba chorych	10
Wiek (lata)	40,7±12,2 39 (32-52)
Płeć ♀/♂	6/4
Czas trwania astmy (lata)	12,3±11,2 9,5 (3-20)
Dawka steroidów wziewnych (µg/d)	1040±397,8 800 (600-1600)
FEV <sub>1</sub> w dniu placebo (% wartości należnej)	88,8±9,3 89,2 (81,5-92,6)
FEV <sub>1</sub> w dniu aspiryny (% wartości należnej)	90,1±11,8 91,0 (78,9-100,2)
IgE całkowite (IU/ml)	226,6±230,7 115,5 (45,7-409)
Testy skórne (+/-)	8/3
Eozynofilia bezwzględna (1/mm <sup>3</sup> )	322,1±227,3 371 (159-669)

Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Poniżej podano medianę oraz dolny i górny kwartyl (w nawiasach).  
ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny.

Przed doustną próbą prowokacyjną z aspiryną w II etapie obowiązywały podobne zasady odstawienia leków jak przed badaniami I etapie. W pierwszym dniu badania podawano 3 kapsułki placebo (a nie 4, jak w I etapie) w odstępach 1,5 godziny. W drugim dniu badania podawano aspirynę we wzrastających w postępie geometrycznym dawkach (co 1,5 godziny): 27→44→117 mg do dawki kumulacyjnej 188 mg. (tab.5). Mocz na badanie metabolitów PGE<sub>2</sub> pobierano identycznie jak w etapie I.

Tabela 5. Schemat doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną (etap II).

Godzina	Dzień 1	Dzień 2	
		dawka aspiryny (mg)	dawka kumulacyjna aspiryny (mg)
8.00	placebo	27	(27)
9.30	placebo	44	(71)
11.00	placebo	117	(188)

#### 4.4. Metody laboratoryjne

##### *Oznaczanie metabolitów PGE<sub>2</sub>*

###### *Oznaczanie PGE<sub>2</sub>-M*

Metabolit prostaglandyny E<sub>2</sub> – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>-M) - w moczu oznaczano metodą immunoenzymatyczną (*enzyme immunoassay* – EIA, Cayman Chemicals, Prostaglandin E Metabolite EIA Kit) [86].

Do dołków płytki inkubacyjnej opłaszczonej monoklonalnymi przeciwciałami przeciw IgG dodawano poliklonalne królicze przeciwciała przeciw PGE<sub>2</sub>-M, znaną ilość PGE<sub>2</sub>-M związanego z acetylocholinesterazą (*tracer*) oraz badaną próbkę moczu. PGE<sub>2</sub>-M z moczu konkurował z PGE<sub>2</sub>-M związanym z acetylocholinesterazą o wiązanie z ww. przeciwciałami króliczymi. Opłaszczone na płytce mysie przeciwciała monoklonalne przeciw IgG wiązały powstałe kompleksy antygen-przeciwciało. Niezwiązane reagenty zostały wypłukane. Po dodaniu do płytki substratu dla acetylocholinesterazy (odczynnika Ullmana) powstał produkt silnie pochłaniający fale świetlne o długości 412 nm. Określona spektrofotometrycznie intensywność zabarwienia była odwrotnie proporcjonalna do zawartości PGE<sub>2</sub>-M w badanej próbce moczu.

Stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu wyrażone zostały w pikogramach na miligram kreatyniny.

###### *Oznaczanie tetranor-PGE-M*

Stężenie kwasu 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksyłowego (tetranor-PGE-M) oznaczano metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas, techniką ujemnej jonizacji chemicznej (GC-NICI-MS – *gas chromatography - negative ion chemical ionisation - mass spectrometry*, Hewlett Packard, Palo Alto, Calif., USA) z zastosowaniem standardu wewnętrznego [67,97,101]. Objętość 0,5 ml moczu rozcieńczano wodą destylowaną do 1 ml. Do tak

przygotowanej próbki dodawano 15 ng standardu wewnętrznego, czyli metabolit prostaglandyny zawierający 6 atomów deuteru, zamiast wodoru: tetranor-PGEM-d<sub>6</sub>. Roztwór zakwaszono 1N HCl do osiągnięcia pH 3 i dwukrotnie dokonywano ekstrakcji prostaglandyn przy użyciu kolejno 1 ml i 1,5 ml octanu etylu. Następnie przeprowadzano derywatyzację i oczyszczanie próbki przez jej rozdział na płytkach chromatografii cienkowarstwowej (TLC – *thin layer chromatography*). Po nastrzyknięciu na kolumnę chromatografu gazowego, połączonego ze spektrometrem mas przy użyciu techniki chemicznej jonizacji ujemnej rejestrowano jony poszukiwanej prostaglandyny i zastosowanego deuterowanego wzorca wewnętrznego: 637 m/z dla tetranor-PGE-M i 643 m/z dla tetranor-PGEM-d<sub>6</sub>. Stężenia tetranor-PGE-M w moczu zostały wyrażone w nanogramach na miligram kreatyniny [21].

#### ***Oznaczenie LTE<sub>4</sub> w moczu***

LTE<sub>4</sub> w moczu oznaczano metodą immunoenzymatyczną (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI USA, USA) według Kumlin i wsp. [49,50].

#### ***Stężenie IgE całkowitego w surowicy***

Stężenie IgE całkowitego oznaczano metodą nefelometryczną (test N Latex IgE firmy Behring).

#### ***Eozynofilia bezwzględna***

Wykorzystując metodę mikroskopową oznaczano liczbę eozynofilów w mm<sup>3</sup> krwi barwionej floksyną umieszczonej w komorze Bürkera.

#### ***Testy skórne punktowe***

Za pomocą punktowych testów skórnych (*skin prick test*, SPT) oceniano reakcję skóry na popularne alergenów wziewne. Za dodatni wynik testu przyjmowano wystąpienie odczynu bąblowego o średniej wielkości (uzyskanej z dwóch średnic mierzonych pod kątem 90°) większej o przynajmniej 3 mm od tzw. dodatniej kontroli (reakcji skóry na histaminę).

Do wykonania SPT użyto zestawu pospolitych alergenów: pyłków drzew, traw, zbóż, chwastów, sierści zwierząt: psa, kota i konia, alergenów grzybów i roztoczy kurzu domowego (Allergopharma).

#### 4.5. Opracowanie statystyczne

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu STATISICA™ (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA). Jako statystyk opisowych badanych grup użyto średnich i odchyłeń standardowych oraz mediany i kwartyli (dolnego i górnego). Za odstające uznano te obserwacje, których odległość od odpowiedniego (bliższego) kwartyla jest zawarta pomiędzy  $1,5 \div 3$  odległości międzykwartylowej (wysokość „skrzynki”).

Jednoczesny wpływ zmiennych jakościowych (grupujących) oraz ilościowych (towarzyszących), a także wpływ ich interakcji na wyróżnioną zmienną ilościową zwaną odpowiedzią w warunkach eksperymentu kontrolowanego badano wykorzystując metodologię ogólnych modeli liniowych (GLM – *General Linear Model*), która obejmuje w szczególności analizę wariancji (ANOVA – do porównywania wielu grup) i analizę kowariancji (ANCOVA – do porównywania wielu grup w obecności ilościowych zmiennych towarzyszących). Podejście to pozwala w efektywny sposób wydobyć informację nawet z małych prób poprzez stosowną konstrukcję modelu eksperymentu uwzględniającego krzyżowanie i zagnieżdżanie czynników. Kluczowe w tym podejściu założenie jednorodności wariancji w grupach weryfikowano testami Bartletta i Levene’a. Normalność reszt sprawdzano graficznie wykorzystując wykresy kwantylowe i pomocniczo test Shapiro-Wilka. Do porównań wielokrotnych użyto testu post hoc Tukeya dla nierównolicznych grup (wariant Spjotvolla-Stoline’a), a porównania z wyróżnioną grupą kontrolną prowadzono testem Dunnetta.

W przypadku, gdy założenie jednorodności wariancji było nieuprawnione stosowano transformację stabilizującą wariancję. We wszystkich rozważanych w pracy przypadkach była to transformacja logarytmiczna.

W przypadkach, gdy transformacja stabilizująca wariancję była nieskuteczna zastosowano nieparametryczną ANOVA Kruskala-Wallisa i Friedmana oraz testy Mana-Whitneya i Wilcoxon do porównań parami.

Współczynnik korelacji rangowej Spearmanna posłużył do zbadania monotonicznej zależności między zmiennymi ilościowymi. Poziom istotności testów ustalono jako  $\alpha = 0,05$ .

## 5. Wyniki

### 5.1. Etap I

#### 5.1.1. Reakcja kliniczna

U żadnego z 34 chorych nie wystąpiły objawy kliniczne ani oskrzelowe, ani ze strony innych narządów w czasie podawania placebo. Nie obserwowano też niestabilności drzewa oskrzelowego, mierzonej spirometrycznie (zmienność FEV<sub>1</sub> nie przekroczyła 15%).

U wszystkich chorych z uprzednio rozpoznaną astmą aspirynową wystąpiła reakcja po aspirynie. W większości przypadków AIA reakcje były typowe: wyciek wodnistej wydzieliny z nosa, blokada nosa, łzawienie oczu, zaczerwienienie skóry twarzy i szyi, uczucie ściskania w klatce piersiowej i duszność z towarzyszącym zmniejszeniem FEV<sub>1</sub> o co najmniej 20%. Objawy te u 9 chorych ustąpiły samoistnie.

W 7 przypadkach chorzy wymagali podania salbutamolu w aerozolu dla odwrócenia obturacji oskrzeli. U 1 chorego reakcja oskrzelowa wystąpiła po podaniu dawki 27 mg ASA, u 2 – po 44 mg ASA, u 9 - po 117 mg ASA, a po podaniu całkowitej dawki kumulacyjnej aspiryny 500 mg – u 5 chorych.

U jednej pacjentki (J.M., lat 29) reakcja była bardzo nasiloną. Pół godziny po trzeciej dawce aspiryny (tj. dawce kumulacyjnej 188 mg) wystąpił kaszel, drapanie w gardle, zaczerwienienie twarzy, spadek FEV<sub>1</sub> o 27%. Następnie pojawiła się blokada nosa, uczucie gorąca, ucisku w klatce piersiowej i spłycenia oddechu. W badaniu przedmiotowym nie stwierdzono świstów nad płucami. Chorej podano β<sub>2</sub>-mimetyk (salbutamol w dawce 5 mg) w nebulizacji oraz steroid ogólnoustrojowo (metylprednizolon w dawce 80 mg). Kolejne pomiary systemowego ciśnienia tętniczego wykazały spadek wartości ze 100/60 mmHg (wyjściowo) do 80/40 mmHg oraz saturacji z 98% (wyjściowo) do 84%. Chora wymagała podania adrenaliny oraz kilkudniowej obserwacji na oddziale intensywnej opieki medycznej. W następnym dniu po próbie z aspiryną u chorej pojawiały się liczne zmiany pokrzywkowe na skórze całego ciała, które całkowicie ustąpiły dopiero po 2 dniach.

Co ciekawe, w dniu próby z celekoksybem u tej samej chorej 1,5 godziny po podaniu celekoksybu doszło do skurczu oskrzeli ze spadkiem FEV<sub>1</sub> o 21% i uczuciem duszności. Po kilku godzinach od zakończenia próby prowokacyjnej z celekoksybem na

skórze ciała pojawiły się pojedyncze zmiany pokrzywkowe, które następnego dnia ustąpiły.

Wyjściowe stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu u tej chorej były wyższe od wszystkich pozostałych chorych z grupy AIA. Po podaniu aspiryny zaobserwowano bardzo znaczny wzrost stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu w porównaniu do wartości wyjściowej (2,5-krotny [250%] w 2. godzinie i 7-krotny [700%] w 4. godzinie po zakończeniu próby tzn. stężenie podstawowe wynosiło 11 638 pg/mg kreatyniny, w 2. i 4. godzinie po zakończeniu próby odpowiednio: 27 027 i 81 632 pg/mg kreatyniny). Po podaniu celekoksybu również wystąpił wzrost wydalania LTE<sub>4</sub> z moczem w porównaniu do stężenia podstawowego, choć mniejszy niż po podaniu ASA (2-krotny [200%] w 2. godzinie i 3-krotny [300%] w 4. godzinie po zakończeniu próby, tzn. stężenie podstawowe wynosiło 8 888 pg/mg kreatyniny, w 2. i 4. godzinie po zakończeniu próby odpowiednio: 17 316 i 28 750 pg/mg kreatyniny).

Można podejrzewać, że chorzy z dużą „wrażliwością” na blokowanie COX-1 i nasiloną reakcją po aspirynie mogą także reagować na selektywne inhibitory COX-2, które w małym stopniu (jak celekoksyb) hamują również COX-1 [3]. U większości chorych na AIA leki te nie wywołują niepożądanych objawów [30,110]. Istnieją jednak pojedyncze doniesienia na temat reakcji nadwrażliwości po selektywnych inhibitorach COX-2 u osób z nadwrażliwością na aspirynę [3,28,29,55,58]. Dlatego należy zalecać, aby u chorych z nadwrażliwością na aspirynę zachować ostrożność przy stosowaniu selektywnych inhibitorów COX-2. Pierwszą dawkę leku chory powinien przyjmować pod nadzorem lekarza i podlegać kilkugodzinnej obserwacji w ośrodku medycznym.

U pozostałych 16 chorych z AIA nie zaobserwowano żadnych objawów klinicznych ani istotnych zmian w wartościach FEV<sub>1</sub> w czasie testu z celekoksybem, jak również w ciągu 4 godzin obserwacji po jego zakończeniu.

U jednego chorego z grupy AIA (F.P., lat 24) po przyjęciu trzeciej dawki aspiryny (tj. dawki kumulacyjnej 188 mg) wystąpił spadek wartości FEV<sub>1</sub> o 28%. Towarzyszyło temu nastrzyknięcie spojówek oraz zaczerwienienie twarzy. Następnie pojawił się silny ból w nadbrzuszu. Ból przejściowo zmniejszył się po leku rozkurczowym (drotawerynie podanej domięśniowo w dawce 40 mg), ale po godzinie powrócił. Pacjent dodatkowo skarżył się na ból za mostkiem i pieczenie w przełyku. W badaniu przedmiotowym brzuch był miękki, palpacyjnie bolesny w okolicy nadbrzusza i śródbrzusza. W badaniach laboratoryjnych zwracały uwagę podwyższona leukocytoza we krwi (11,7 tys./mm<sup>3</sup>), wysoki poziom amylazy w surowicy krwi (2031



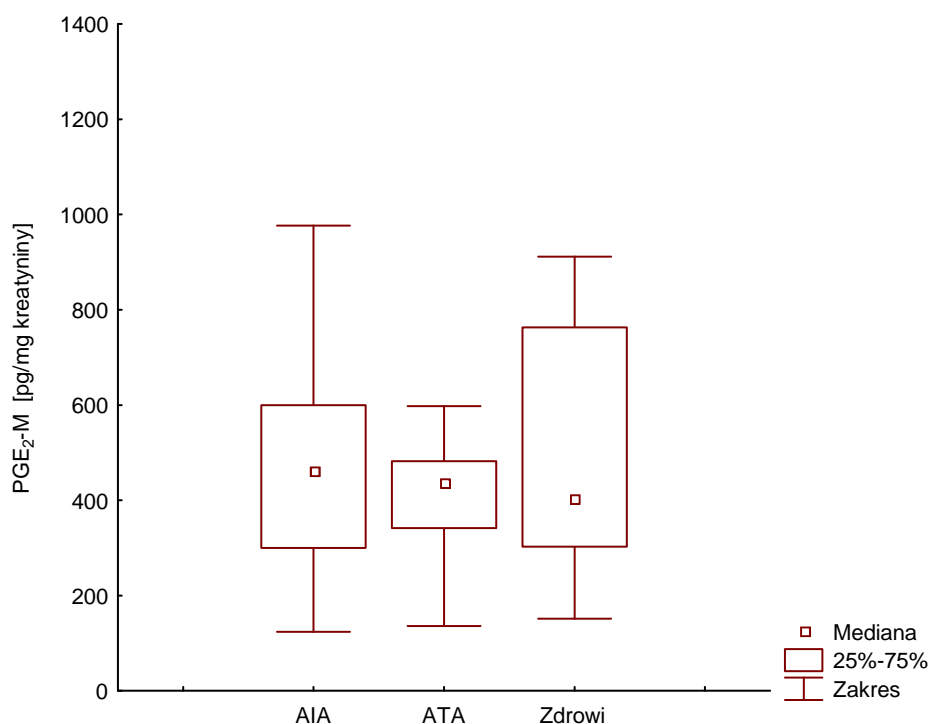
U/ml, zakres wartości referencyjnych 30-110 U/ml) i moczu (6718 U/l, zakres wartości referencyjnych 32-640 U/l) oraz lipazy w surowicy krwi (615 U/l, zakres wartości referencyjnych 23-300 U/l) Badanie gastroscopowe nie ujawniło zmian w zakresie błony śluzowej przełyku i żołądka. W badaniu ultrasonograficznym obraz narządów jamy brzusznej był prawidłowy. Dolegliwości ustąpiły po kilku godzinach. Nastąpiła także normalizacja liczby leukocytów we krwi obwodowej, stężenia parametrów trzustkowych we krwi i moczu. Opisywana reakcja może świadczyć o podrażnieniu trzustki u chorego z nadwrażliwością na ASA. Nie wiadomo jednak, w wyniku jakich mechanizmów aspiryna mogłaby wywołać tę reakcję, choć jest mało prawdopodobne, by obserwowane dolegliwości były tylko dziełem przypadku.

W grupie ATA w żadnym dniu badania (tj. w dniu podawania placebo, aspiryny i celekoksybu) nie obserwowano żadnych objawów klinicznych ani zmian w wartościach FEV<sub>1</sub>.

### **5.1.2. PGE<sub>2</sub>-M w moczu**

#### ***Podstawowe stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu***

Nie było istotnych różnic w wartościach podstawowych stężeń PGE<sub>2</sub>-M w moczu między badanymi grupami i grupą kontrolną złożoną z osób zdrowych (p=0,66) (rys. 7)



Rys. 7. Wartości podstawowe PGE<sub>2</sub>-M w moczu w grupach AIA, ATA i zdrowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>.

W tabeli przedstawiono wartości podstawowych stężeń PGE<sub>2</sub>-M we wszystkich badanych grupach (tab. 6).

Tabela 6. Wartości podstawowe PGE<sub>2</sub>-M w moczu w grupach AIA, ATA i u osób zdrowych.

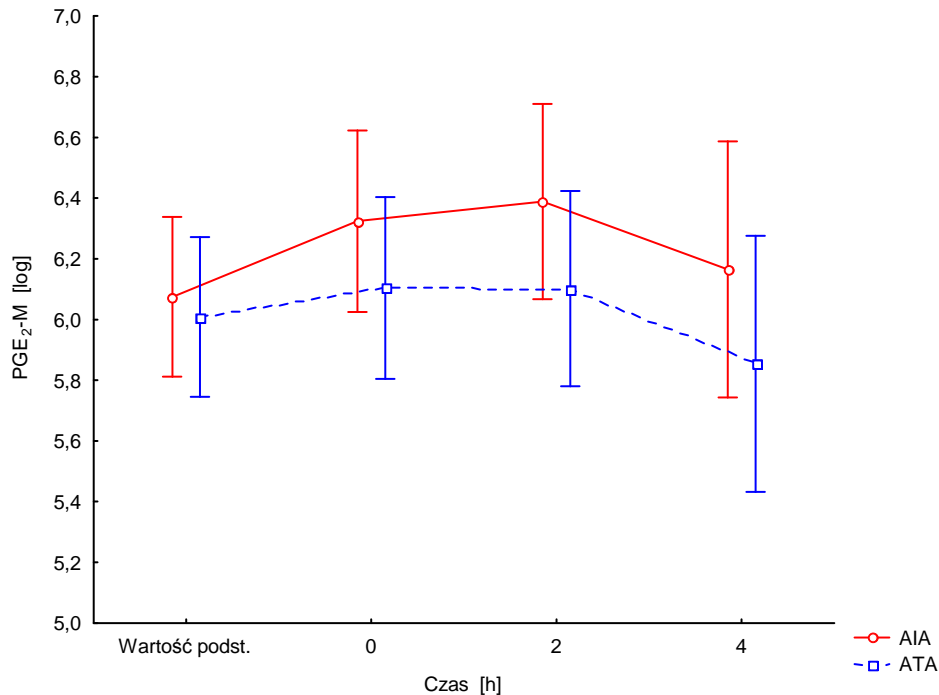
Oznaczany związek	AIA (n=17)	ATA (n=17)	Zdrowi (n=30)	p		
				AIA vs ATA	AIA vs Zdrowi	ATA vs Zdrowi
<b>PGE<sub>2</sub>-M w moczu (pg/mg kreatyniny)</b>	503.77±277.69 464 (300-600)	451.41±212.48 438 (342-482)	879.47±210.78 403 (303-763)	0,96	0,88	0,72

Wyniki przedstawiono jako średnią±odchylenie standardowe. Poniżej podano medianę oraz dolny i górny kwartył (w nawiasach).

AIA - chorzy na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę. ATA - chorzy na astmę oskrzelową z dobrą tolerancją aspiryny. Zdrowi - grupa kontrolna złożona z osób zdrowych.

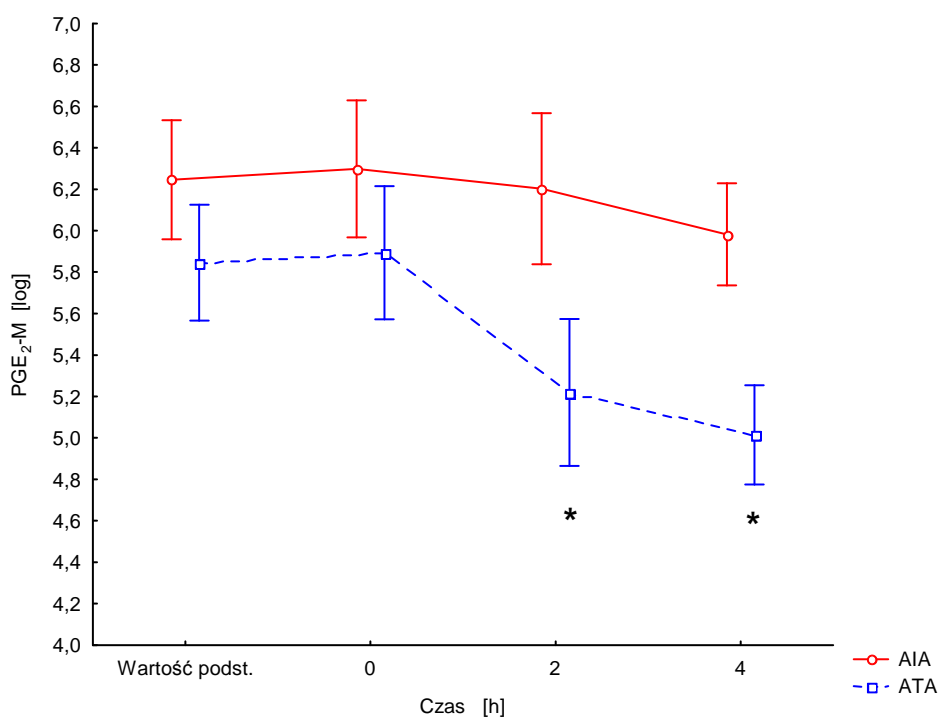
### ***PGE<sub>2</sub>-M w moczu w czasie doustnego testu z aspiryną***

Po podaniu placebo nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w średnich stężeniach PGE<sub>2</sub>-M w moczu między grupami AIA i ATA ( $p=0,28$ , ANOVA) (rys. 8). Nie było też istotnych zmian stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu po prowokacji placebo w odniesieniu do wartości podstawowych ( $p=0,12$ , ANOVA).



Rys. 8. Zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w grupie AIA i ATA w dniu placebo. \*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. Wartość podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

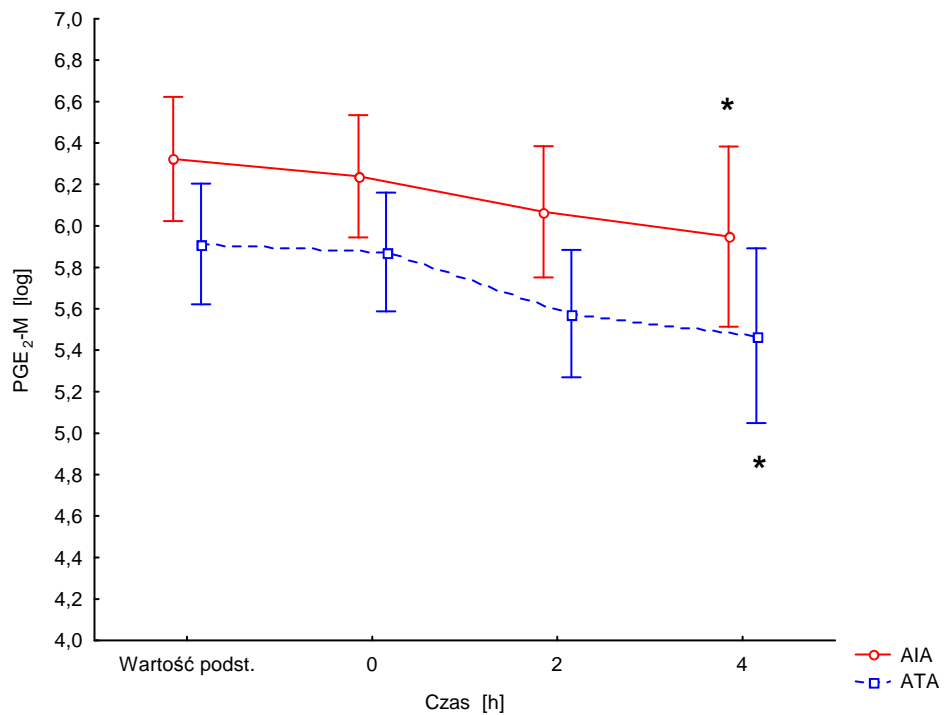
Po aspirynie zaobserwowano istotne różnice w stężeniu PGE<sub>2</sub>-M między grupami AIA i ATA. W grupie AIA średnie stężenie PGE<sub>2</sub>-M po podaniu aspiryny było wyższe niż w grupie ATA ( $p<0,001$ , ANOVA) (rys. 9). W porównaniu do wartości podstawowych stężenie to nie zmieniło się istotnie w żadnym punkcie czasowym obserwacji u chorych z nadwrażliwością na aspirynę (tj. w momencie zakończenia próby, w 2. i 4. godzinie obserwacji). W grupie z dobrą tolerancją ASA stężenie PGE<sub>2</sub>-M zmniejszyło się znacząco w 2. ( $p<0,001$ , test Dunnetta) i 4. godzinie ( $p<0,001$ , test Dunnetta) po zakończeniu testu w porównaniu do wartości podstawowych. Stężenie to osiągnęło najniższy poziom w 4. godzinie obserwacji.



Rys. 9. Zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w grupach AIA i ATA po podaniu aspiryny. \*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

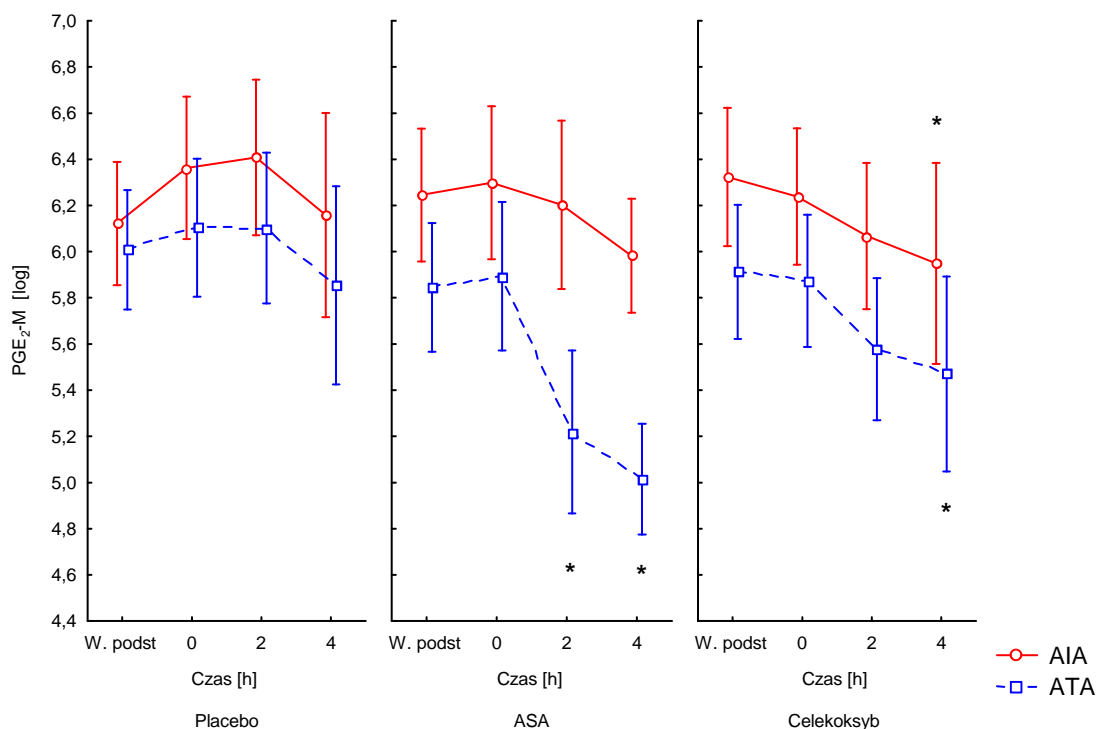
### ***PGE<sub>2</sub>-M w moczu w czasie doustnego testu z celekoksybem***

Po podaniu celekoksybu w grupie AIA średnie stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu było znamienne wyższe w porównaniu do grupy ATA (p=0,04, ANOVA, rys.10). W obu badanych grupach (odpowiednio AIA i ATA) stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu zmniejszało się w 2. godzinie obserwacji (odpowiednio p=0,08 i p=0,05, test Dunnetta), osiągając istotność statystyczną w 4. godzinie (odpowiednio p=0,04 i p=0,007, test Dunnetta) po teście z celekoksybem w porównaniu do wartości podstawowych.



Rys. 10. Zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w grupach AIA i ATA w po podaniu celekoksybu. \*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. Wartość podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

Poniżej zestawiono zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w moczu grupach AIA i ATA w poszczególnych dniach badania (rys. 11).

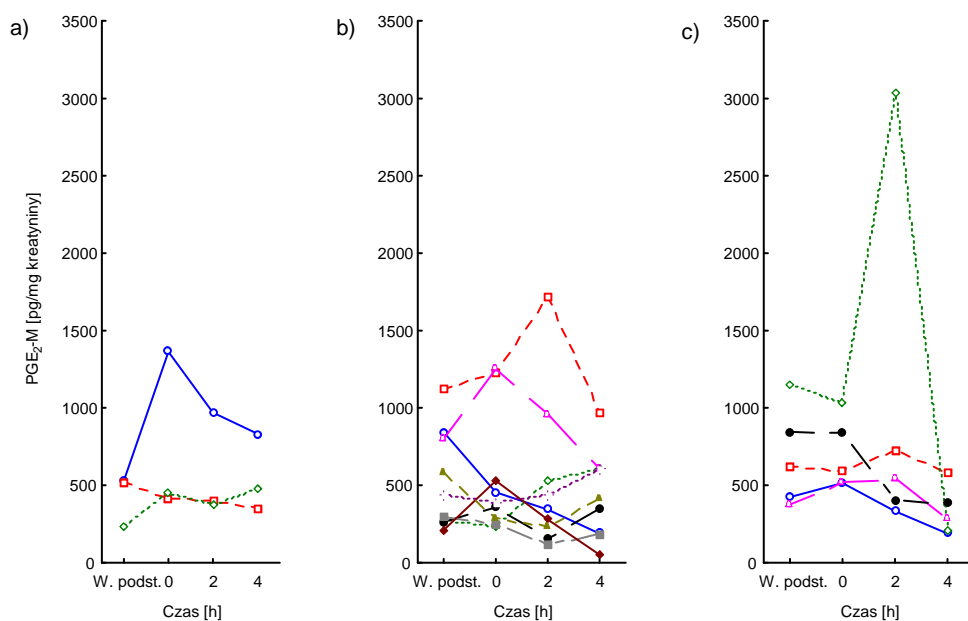


Rys. 11. Zestawienie zmian w stężeniach PGE<sub>2</sub>-M w poszczególnych dniach badania w grupach AIA i ATA.

\*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

Stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu u poszczególnych chorych z AIA nie zależało od dawki prowokacyjnej aspiryny, która wywołała reakcję oskrzelową (p=0,43, ANCOVA).

Poniżej przedstawiono zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w moczu w czasie testu prowokacyjnego z aspiryną u indywidualnych chorych, u których reakcje wystąpiły po kumulacyjnej dawce ASA: a) małej (27 mg i 71 mg) – 3 chorych, b) średniej (188 mg) – 9 chorych i c) dużej (500 mg) – 5 chorych (rys. 12).



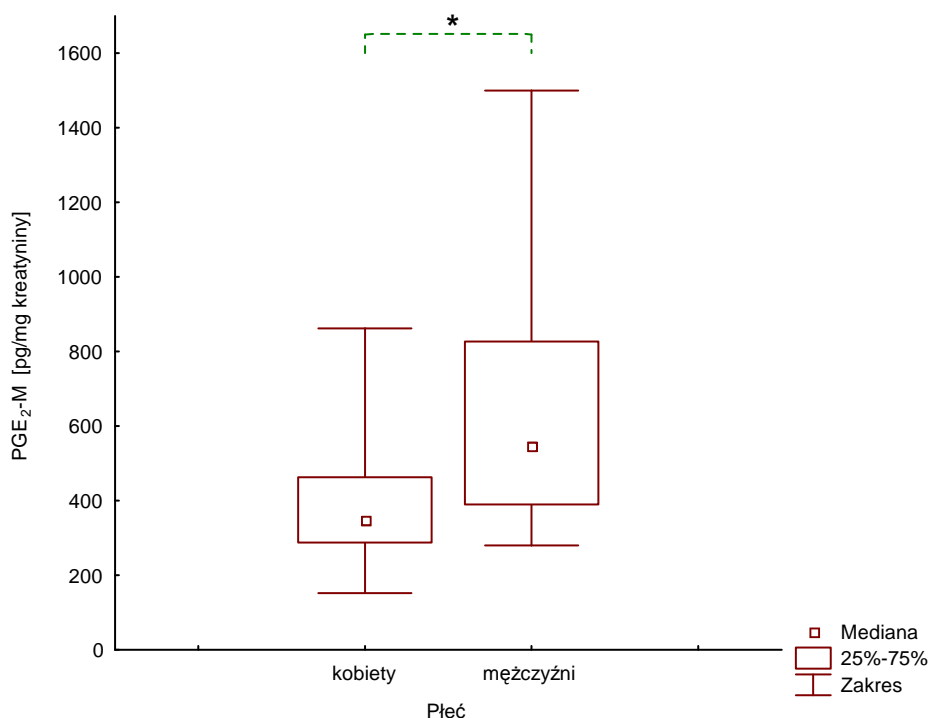
Rys. 12. Zmiany stężeń PGE<sub>2</sub>-M w czasie u poszczególnych chorych na astmę aspirynową w zależności od dawki prowokacyjnej aspiryny: a) małej, b) średniej, c) dużej.

PGE<sub>2</sub>-M - 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

### 5.1.3. Korelacje PGE<sub>2</sub>-M

#### *Korelacje PGE<sub>2</sub>-M z płcią*

Stwierdzono, że u osób zdrowych podstawowe stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu jest 1,59 (o 59%) razy większe u mężczyzn niż u kobiet ( $p=0,01$ , ANOVA) (rys. 13). Natomiast w badanych grupach AIA i ATA nie stwierdzono żadnego związku między płcią a stężeniami PGE<sub>2</sub>-M w moczu zarówno w warunkach podstawowych, jak też po prowokacji placebo, aspiryną czy celekoksybem ( $p=0,18$ , ANOVA).



Rys. 13. Podstawowe stężenie PGE<sub>2</sub>-M u osób zdrowych w zależności od płci.  
\* istotność statystyczna. PGE<sub>2</sub>-M – 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>.

### ***Korelacje PGE<sub>2</sub>-M z IgE***

Podstawowe stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu oraz 4 godziny po teście z aspiryną korelowało dodatnio z poziomem całkowitego IgE w surowicy (odpowiednio: współczynnik korelacji Spearmana  $r=0,51$ ,  $p=0,03$ ;  $r=0,55$ ,  $p=0,02$ ) u chorych na astmę aspirynową. Nie zauważono takiego związku w grupie ATA.

### ***Związek PGE<sub>2</sub>-M z testami skórnymi***

W grupie AIA osoby z dodatnim wynikiem testów skórnych miały nieco wyższy poziom PGE<sub>2</sub>-M w moczu w momencie zakończenia próby z aspiryną, czyli w czasie „0” ( $p=0,03$ , test Manna-Whitneya). W grupie ATA nie było żadnego związku pomiędzy wynikiem testów skórnych a stężeniem PGE<sub>2</sub>-M w moczu.

### ***Korelacja PGE<sub>2</sub>-M z innymi parametrami klinicznymi***

Za pomocą współczynnika korelacji Spearmana, mierzącego siłę monotonicznej zależności stwierdzono, że w grupie AIA nie było żadnych istotnych korelacji stężenia PGE<sub>2</sub>-M w dniu próby z aspiryną z następującymi parametrami:



- eozynofilią bezwzględną,
- dawką prowokacyjną aspiryny,
- odsetkiem spadku FEV<sub>1</sub>,
- dawką steroidów wziewnych.

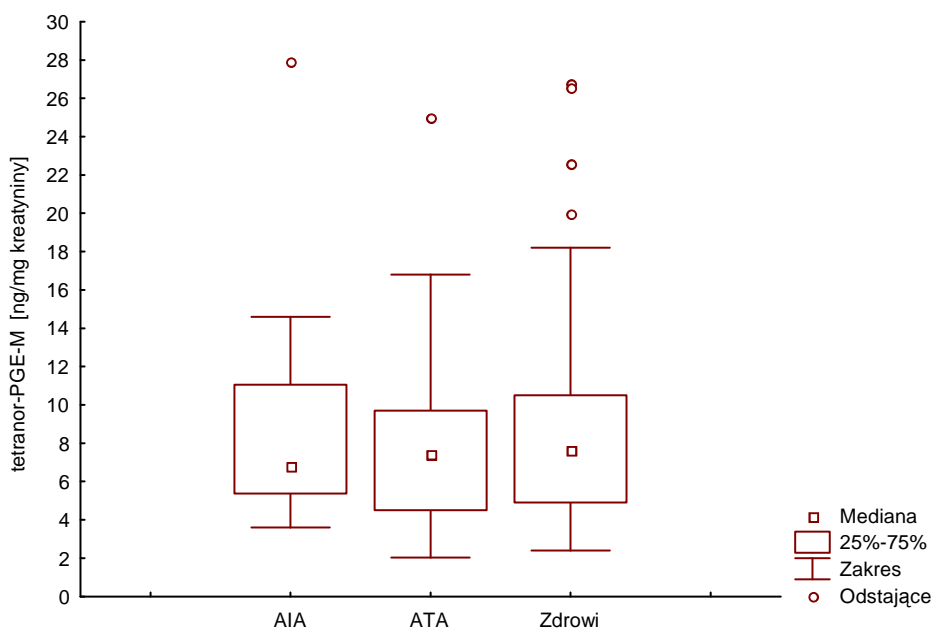
W grupie ATA nie stwierdzono żadnych istotnych korelacji stężenia PGE<sub>2</sub>-M w dniu próby z ASA z następującymi parametrami:

- stężeniem całkowitego IgE w surowicy krwi,
- eozynofilią bezwzględną,
- testami skórnymi,
- dawką steroidów wziewnych.

#### 5.1.4. Tetranor-PGE-M w moczu

##### *Podstawowe stężenia tetranor-PGE-M w moczu*

Wartości stężeń podstawowych tetranor-PGE-M (tab.7) nie różniły się znamienne między badanymi grupami oraz osobami zdrowymi (p=0,73, ANOVA) (rys. 14).



Rys. 14. Wartości podstawowe tetranor-PGE-M w moczu w grupach AIA, ATA i zdrowych.

Tetranor-PGE-M - kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksylowy. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Zdrowi - grupa kontrolna złożona z osób zdrowych.

Tabela 7. Wartości podstawowe tetranor-PGE-M w moczu w grupach AIA i ATA i u osób zdrowych.

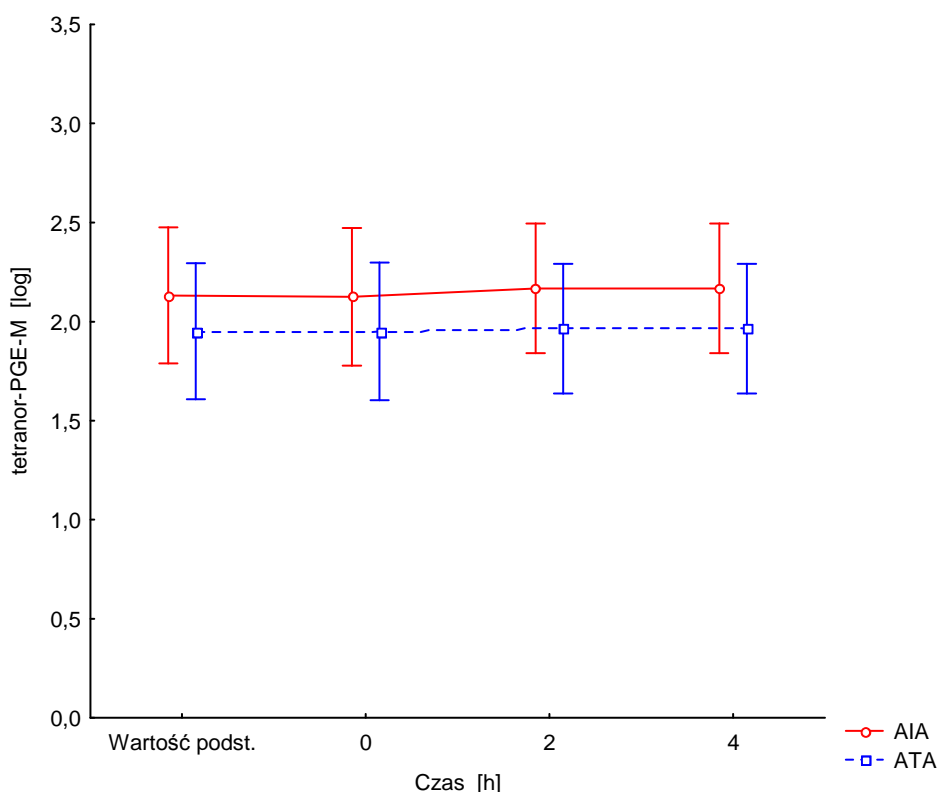
Oznaczany związek	AIA (n=17)	ATA (n=17)	Zdrowi (n=30)	p		
				AIA vs ATA	AIA vs Zdrowi	ATA vs Zdrowi
<b>Tetranor-PGE-M w moczu (ng/mg kreatyniny)</b>	11.30±10.18 6.9 (5.4-11.1)	8.58±5.89 7.4 (4.5-9.7)	10.06±8.43 7.6 (4.9-10.5)	0.72	0.96	0.87

Wyniki przedstawiono jako średnią±odchylenie standardowe. Poniżej podano medianę oraz dolny i górny kwartył (w nawiasach).

AIA - chorzy na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę. ATA - chorzy na astmę oskrzelową z dobrą tolerancją aspiryny. Zdrowi - grupa kontrolna złożona z osób zdrowych. Tetranor-PGE-M - kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowy.

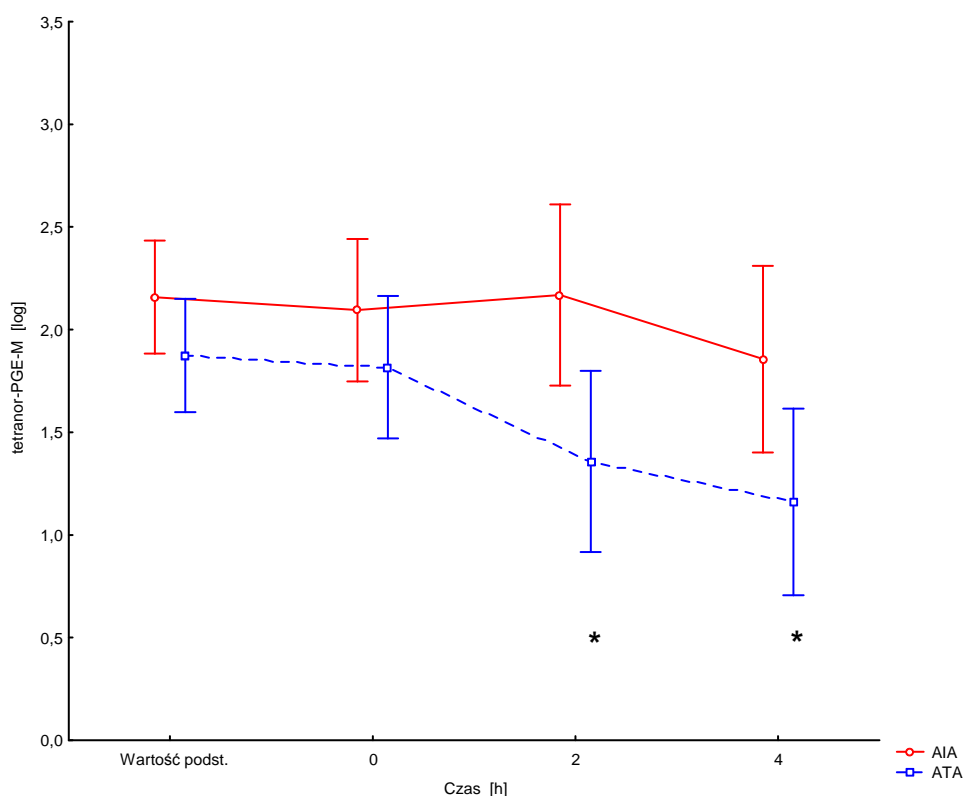
### ***Tetranor-PGE-M w moczu w czasie doustnego testu z aspiryną***

Po podaniu placebo nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu tetranor-PGE-M między grupami AIA i ATA (p=0,41, ANOVA). Poziom tych stężeń nie zmienił się w żadnym punkcie czasowym obserwacji (p=0,99, ANOVA) (rys. 15).



Rys. 15. Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu placebo. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Tetranor-PGE-M – kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowy. Wartość podst.- wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

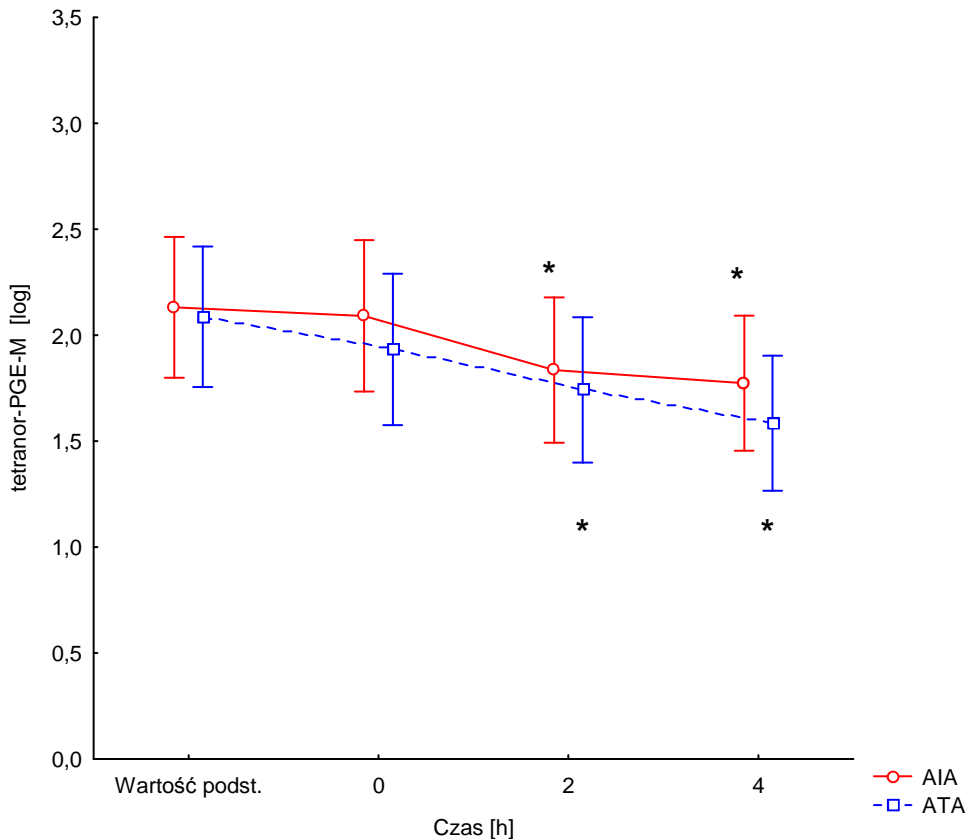
W dniu podawania aspiryny stężenie tetranor-PGE-M nie zmieniło się w żadnym momencie obserwacji u chorych z AIA ( $p=0,18$ , ANOVA), natomiast w grupie z dobrą tolerancją aspiryny stężenie metabolitu PGE<sub>2</sub> znacząco zmniejszyło się w 2. ( $p=0,001$ , test Dunnetta) i 4. ( $p<0,001$ , test Dunnetta) godzinie obserwacji po zakończeniu testu w porównaniu do wartości stężeń podstawowych (rys. 16).



Rys. 16. Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu aspiryny. \*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Tetranor-PGE-M – kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowy. Wartość podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

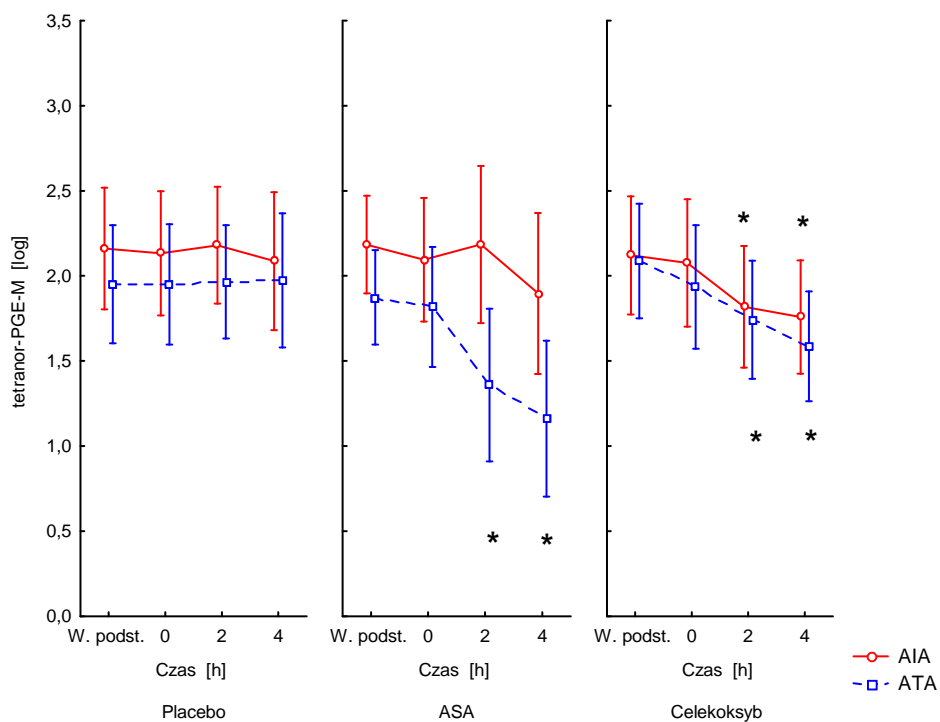
### ***Tetranor-PGE-M w moczu w czasie doustnego testu z celekoksybem***

Po teście prowokacyjnym z celekoksybem nie było znamienych różnic w stężeniach tetranor-PGE-M między grupami AIA i ATA ( $p=0,58$ , ANOVA) (rys. 17). W obu grupach (odpowiednio AIA i ATA) obserwowano znamienne zmniejszenie się stężeń metabolitu PGE<sub>2</sub> w 2. (odpowiednio  $p<0,001$  i  $p<0,001$ , test Dunnetta) i 4. godzinie (odpowiednio  $p=0,009$  i  $p<0,001$ , test Dunnetta) po zakończeniu testu z celekoksybem, w porównaniu do wartości podstawowych.



Rys. 17. Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu celekoksybu. \*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych. AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Tetranor-PGE-M – kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowy. Wartość podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

Poniżej zestawiono zmiany stężeń tetranor-PGE-M w moczu w grupach AIA i ATA w poszczególnych dniach badania (rys. 18).



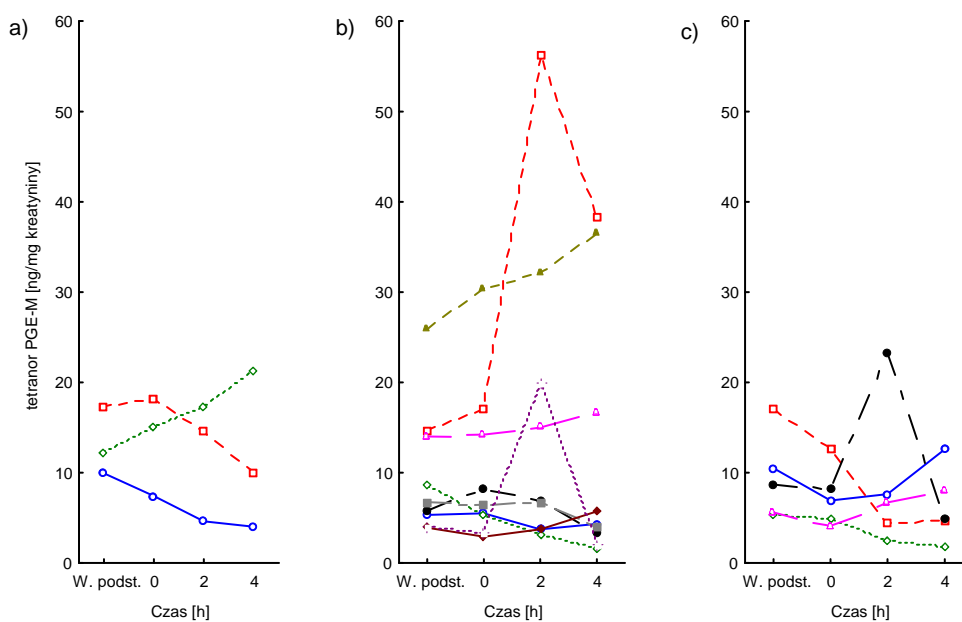
Rys. 18. Zestawienie zmian stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w poszczególnych dniach badania.

\*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych.

AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. Tetranor-PGE-M – kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowy. W. podst. – wartość podstawowa.

Stężenie tetranor-PGE-M w moczu u poszczególnych chorych z AIA nie zależało od dawki prowokacyjnej aspiryny, która wywołała reakcję oskrzelową (ANCOVA,  $p=0,32$ ).

Poniżej przedstawiono zmiany stężeń tetranor-PGE-M w moczu w czasie testu prowokacyjnego z aspiryną u chorych, u których reakcje wystąpiły po kumulacyjnej dawce ASA: a) małej (27 mg i 71 mg) – 3 chorych, b) średniej (188 mg) – 9 chorych i c) dużej (500 mg) – 5 chorych (rys. 19).

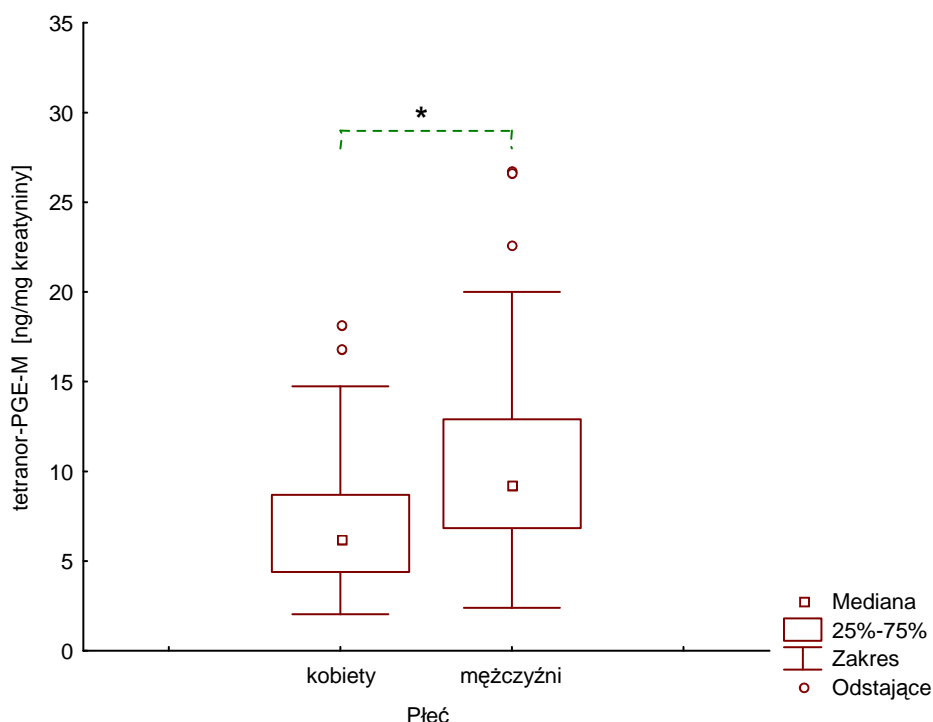


Rys. 19. Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w czasie u poszczególnych chorych na AIA w zależności od dawki prowokacyjnej aspiryny: a) małej, b) średniej, c) dużej. Tetranor-PGE-M - kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksyłowy. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

### 5.1.5. Korelacje tetranor-PGE-M

#### Związek tetranor-PGE-M z płcią

W grupie osób zdrowych podstawowe stężenie tetranor-PGE-M w moczu było 1,39 razy (o 39%) większe u mężczyzn niż u kobiet ( $p=0,03$ , ANOVA) (rys. 20).



Rys. 20. Podstawowe stężenie tetranor-PGE-M u osób zdrowych w zależności od płci.

\*istotność statystyczna. Tetranor-PGE-M - kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksylowy.

Natomiast nie było związku między płcią a stężeniem tego metabolitu w moczu w warunkach podstawowych ani w żadnym punkcie czasowym obserwacji po testach z placebo, aspiryną i celekoksybem w grupach AIA i ATA ( $p=0,26$  ANOVA).

#### ***Korelacja tetranor-PGE-M z eozynofilią bezwzględną***

W grupie AIA zaobserwowano istotną dodatnią korelację stężenia tetranor-PGE-M w moczu w 2 godzinie po teście z aspiryną z poziomem eozynofilii bezwzględnej ( $r=0,67$ ,  $p=0,003$ ). Nie zaobserwowano żadnego związku stężenia tetranor-PGE-M w moczu z eozynofilią bezwzględną w dniu podawania aspiryny w grupie ATA.

#### ***Korelacja PGE<sub>2</sub>-M z innymi parametrami klinicznymi***

Za pomocą współczynnika korelacji Spearmana, mierzącego siłę monotonicznej zależności stwierdzono, że w grupie AIA nie było żadnych istotnych korelacji stężenia PGE<sub>2</sub>-M w dniu próby z ASA z następującymi parametrami:

- stężeniem całkowitego IgE w surowicy krwi,

- testami skórnymi,
- dawką prowokacyjną aspiryny,
- odsetkiem spadku FEV<sub>1</sub>,
- dawką steroidów wziewnych.

W grupie ATA nie stwierdzono żadnych istotnych korelacji stężenia PGE<sub>2</sub>-M w dniu próby z ASA z następującymi parametrami:

- stężeniem całkowitego IgE w surowicy krwi,
- eozynofilią bezwzględna,
- testami skórnymi,
- dawką steroidów wziewnych.

#### 5.1.6. Stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu

Podstawowe stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu było istotnie wyższe u chorych z grupy AIA w porównaniu z chorymi dobrze tolerującymi ASA (p=0,000, test Manna-Whitneya) i osobami zdrowymi ( p<0,001, test Manna-Whitneya) (tab. 8). Między grupą ATA i osobami zdrowymi nie stwierdzono różnicy w zakresie podstawowych stężeń LTE<sub>4</sub> w moczu (p=0,39, test Manna-Whitneya).

Tabela 8. Wartości podstawowe LTE<sub>4</sub> w moczu w grupach AIA, ATA i u osób zdrowych.

Oznaczany związek	AIA (n=17)	ATA (n=17)	Zdrowi (n=30)	P		
				AIA vs ATA	AIA vs Zdrowi	ATA vs Zdrowi
LTE <sub>4</sub> w moczu (pg/mg kreatyniny)	1846±2747 1347 (355-2036)	342±277 220 (160-361)	257±180 222 (119-315)	<0.001	<0.001	0.39

Wartości przedstawiono jako średnią±odchylenie standardowe. Poniżej podano medianę oraz dolny i górny kwartył (w nawiasach).

AIA - chorzy z astmą oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę

ATA - chorzy z astmą oskrzelową z dobrą tolerancją aspirynę

Zdrowi - grupa kontrolna złożona z osób zdrowych

#### *LTE<sub>4</sub> w moczu w czasie doustnego testu z aspiryną*

W dniu podawania placebo w grupie AIA obserwowano istotnie wyższe stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu niż w grupie ATA (p=0,003, ANOVA). W grupie AIA stwierdzono stały istotny spadek poziomu LTE<sub>4</sub> w czasie (p<0,001, ANOVA). Już w czasie „0” w grupie AIA stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu jest istotnie niższe niż podstawowe (p<0,001, test



Dunnetta). W kolejnych momentach obserwacji (2. i 4. godzinie) różnica poziomu LTE<sub>4</sub> w odniesieniu do poziomu podstawowego jeszcze się powiększa (odpowiednio  $p < 0,001$  i  $p < 0,001$ , test Dunnetta).

W grupie ATA stwierdzono podobną tendencję, lecz o mniejszej dynamice zmian. W 2. godzinie obserwacji po teście poziom LTE<sub>4</sub> jest prawie istotnie niższy niż podstawowy ( $p = 0,06$ , test Dunnetta), a dopiero w 4. godzinie po teście stężenie LTE<sub>4</sub> jest istotnie niższe niż podstawowe ( $p < 0,001$ , test Dunnetta) (rys.21).

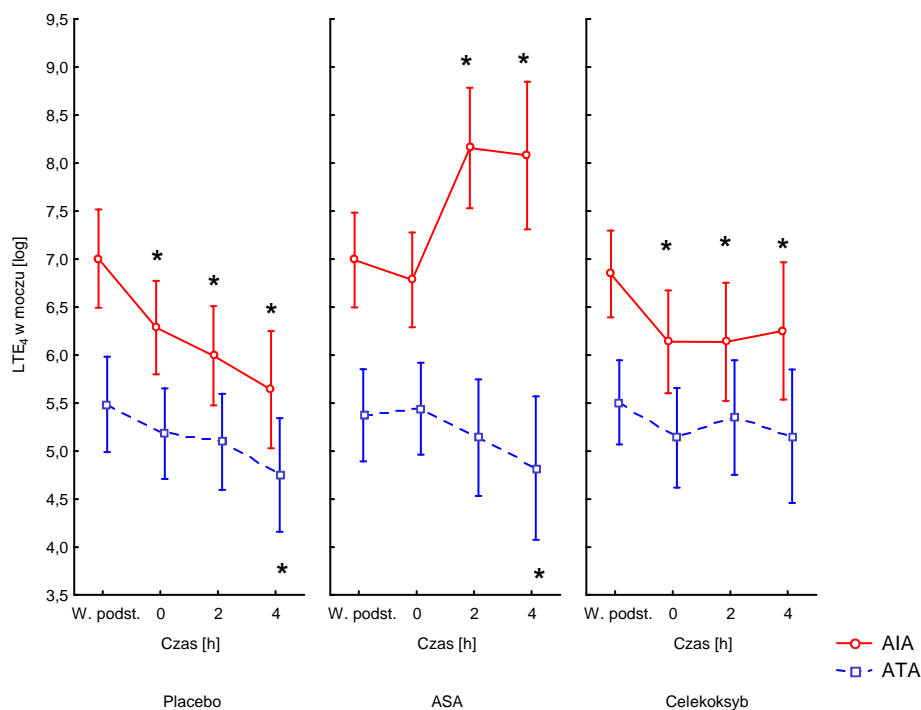
W przypadku podania aspiryny grupy AIA i ATA różniły się między sobą średnim poziomem LTE<sub>4</sub>, który był istotnie wyższy w grupie AIA niż w ATA ( $p < 0,001$ , ANOVA).

W grupie AIA stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu znamienne wzrosło w 2. ( $p = 0,001$ , test Dunnetta) i 4. godzinie ( $p = 0,003$ , test Dunnetta) po zakończeniu testu z aspiryną w porównaniu do wartości podstawowych.

W grupie ATA obserwujemy istotny spadek poziomu LTE<sub>4</sub> w czasie ( $p < 0,001$ , ANOVA), który osiąga statystyczną istotność w 4. godzinie po teście z aspiryną ( $p = 0,03$ , test Dunnetta)

#### ***LTE<sub>4</sub> w moczu w czasie doustnego testu z celekoksybem***

W przypadku podania celekoksybu grupy AIA i ATA różniły się między sobą średnim stężeniem LTE<sub>4</sub> w moczu, które było istotnie wyższe w grupie AIA niż w ATA ( $p = 0,006$ , ANOVA). Dynamika zmian jest podobna w obu grupach. W grupie AIA obserwujemy jednak spadek poziomu LTE<sub>4</sub> już w chwili 0 ( $p = 0,02$ , test Dunnetta), który utrzymuje się w następnych momentach obserwacji na tym poziomie (odpowiednio w 2. i 4. godzinie po teście:  $p = 0,02$ ;  $p = 0,03$ , test Dunnetta). W grupie ATA zmiany stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu nie są statystycznie istotne ( $p = 0,129$ , ANOVA). Zestawienie zmian stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu w poszczególnych dniach badania przedstawia rysunek (rys. 21).



Rys. 21. Zestawienie zmian stężeń LTE<sub>4</sub> w grupach AIA i ATA w dniu prowokacji placebo, ASA i celekoksybem.

\*istotność statystyczna w porównaniu do wartości podstawowych.

AIA – chorzy na astmę z nadwrażliwością na aspirynę. ATA – chorzy na astmę z dobrą tolerancją aspiryny. ASA – aspiryna. LTE<sub>4</sub> – leukotrien E<sub>4</sub>. Czas [h] – czas w godzinach.

### 5.1.7. Korelacje LTE<sub>4</sub>

#### *Korelacja LTE<sub>4</sub> z eozynofilią bezwzględną*

Wykazano, że istnieje dodatnia korelacja między stężeniem LTE<sub>4</sub> w moczu (w warunkach podstawowych i po teście z ASA) i eozynofilią bezwzględną w grupie chorych z nadwrażliwością na aspirynę (współczynnik korelacji Spearmana  $r=0,78$ ,  $p<0,001$ ). Nie obserwowano podobnego związku w grupie ATA.

#### *Analiza związków LTE<sub>4</sub> z parametrami klinicznymi chorych*

W grupie AIA nie zaobserwowano żadnego związku między stężeniem LTE<sub>4</sub> w moczu w dniu podawania aspiryny niżej wymienionymi parametrami:

- całkowitym stężeniem IgE w surowicy krwi,
- testami skórnymi,
- odsetkiem spadku FEV<sub>1</sub>,
- dawką prowokacyjną aspiryny,
- dawką steroidów wziewnych.

W grupie ATA nie zaobserwowano żadnego związku LTE<sub>4</sub> z wymienionymi niżej wielkościami:

- eozynofilią bezwzględną,
- całkowitym stężeniem IgE w surowicy krwi,
- testami skórnymi,
- dawką steroidów wziewnych.

#### **5.1.8. Analiza korelacji między stężeniami LTE<sub>4</sub> i PGE<sub>2</sub>-M w moczu**

W grupie AIA w dniach testu z placebo, aspiryną i celekoksybem nie stwierdzono żadnego związku między stężeniem LTE<sub>4</sub> a stężeniem PGE<sub>2</sub>-M w moczu.

W grupie ATA stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem LTE<sub>4</sub> w moczu i stężeniem PGE<sub>2</sub>M po podaniu ASA w 4. godzinie obserwacji (współczynnik korelacji Spearmana  $r=0,63$ ,  $p=0,006$ ). Po podaniu placebo i celekoksybu w grupie ATA nie stwierdzono żadnego związku między stężeniami badanych eikozanoidów.

#### **5.1.9. Analiza korelacji między stężeniami LTE<sub>4</sub> i tetranor-PGE-M w moczu**

W grupie AIA po podaniu placebo, aspiryny i celekoksybu nie wykazano żadnego związku między stężeniem LTE<sub>4</sub> i tetranor-PGE-M w moczu.

W grupie ATA po podaniu placebo, aspiryny i celekoksybu nie wykazano żadnego związku między stężeniem LTE<sub>4</sub> i tetranor-PGE-M w moczu.

## 5.2. Etap II

### 5.2.1. Reakcja kliniczna

U żadnego z 10 badanych chorych z dobrą tolerancją aspiryny w żadnym z dni badania (tj. dniu placebo i aspiryny) nie wystąpiły reakcje niepożądane. Nie obserwowano też niestabilności drzewa oskrzelowego mierzonej spirometrycznie.

### 5.2.2. PGE<sub>2</sub>-M w moczu

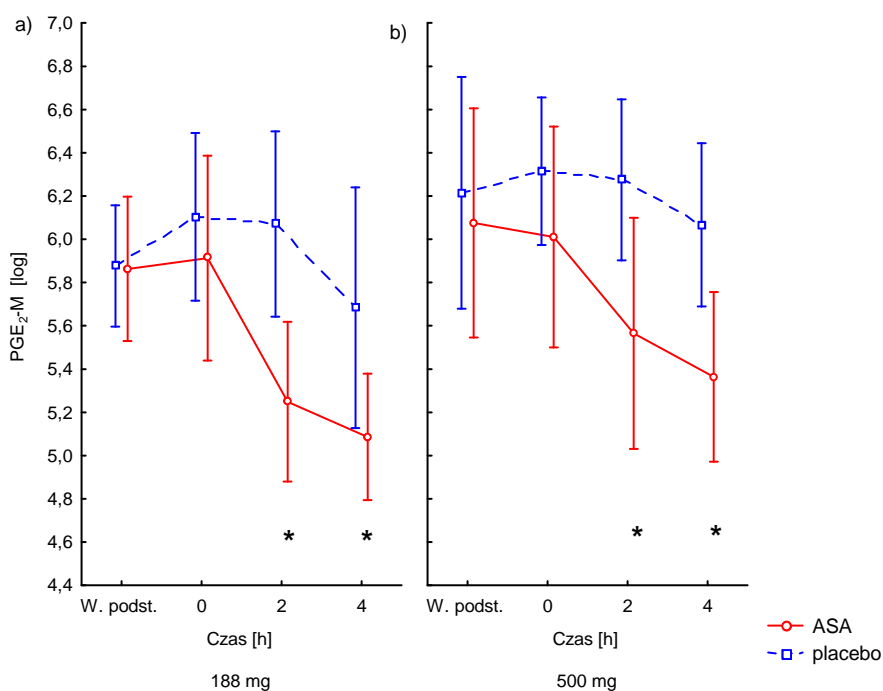
Nie było istotnych różnic między podstawowymi poziomami PGE<sub>2</sub>-M w moczu w dniu podawania aspiryny i placebo ( $p=0,38$ , ANOVA). Między stężeniami PGE<sub>2</sub>-M w dniu podawania placebo i w dniu podawania aspiryny zaobserwowano istotne różnice ( $p<0,001$ , ANOVA).

Po podaniu aspiryny nastąpiło obniżenie stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu w 2. i 4. godzinie po zakończeniu testu w porównaniu do wartości podstawowych (odpowiednio:  $p=0,005$  i  $p<0,001$ , test Dunetta).

Po podaniu placebo nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu w czasie (rys. 22 a).

Dla porównania obliczeń statystycznych dokonano dla tych samych 10 osób tym razem uwzględniając wyniki oznaczeń PGE<sub>2</sub>-M uzyskane w etapie I (tzn. w czasie testu prowokacyjnego z dawką kumulacyjną aspiryny 500 mg). W tym przypadku również nie było różnic między podstawowymi stężeniami PGE<sub>2</sub>-M w moczu w dniu placebo i dniu aspiryny ( $p=0,936$ , ANOVA). Między stężeniami PGE<sub>2</sub>-M w moczu po podaniu placebo i po prowokacji aspiryną zaobserwowano istotne różnice ( $p=0,02$ , ANOVA). Okazało się, iż podobnie jak po prowokacji aspiryną w łącznej dawce 188 mg, tak i po kumulacyjnej dawce 500 mg u tych samych 10 chorych następuje zmniejszenie wydalania PGE<sub>2</sub>-M z moczem w 2. i 4. godzinie po teście w porównaniu do wartości podstawowych (odpowiednio:  $p=0,012$  i  $p=0,001$ , test Dunetta) (rys.22 b).

Po podaniu placebo nie zaobserwowano istotnych zmian stężenia PGE<sub>2</sub>-M w czasie w porównaniu do wartości podstawowych (rys.22 b).



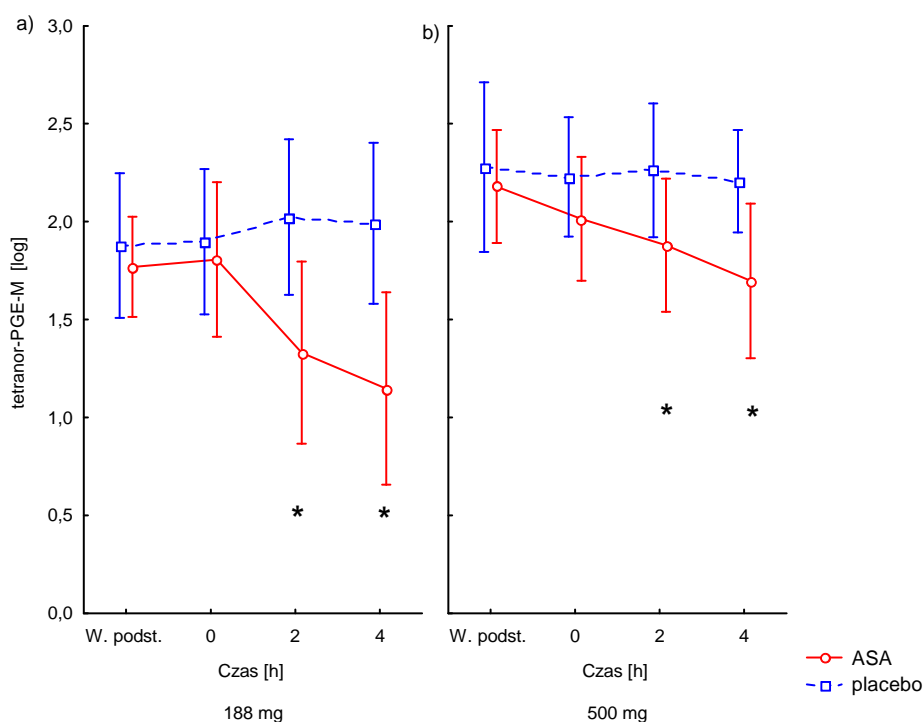
Rys. 22. Zmiany w czasie stężenia PGE<sub>2</sub>-M w moczu w grupie ATA w dniu placebo i aspiryny: a/ po dawce prowokacyjnej 188 mg; b/ po dawce prowokacyjnej 500 mg. PGE<sub>2</sub>-M - 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>. ASA – aspiryna. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

Powyższe wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosku, iż aspiryna zmniejsza znamienne stężenie PGE<sub>2</sub>-M w moczu w grupie ATA niezależnie od dawki prowokacyjnej aspiryny.

### 5.2.3. Tetranor-PGE-M w moczu

U 10 chorych na ATA, u których przeprowadzono test prowokacyjny z aspiryną do dawki kumulacyjnej 188 mg oznaczano także metabolit tetranor-PGE-M w moczu. Stwierdzono, że nie było różnic między podstawowymi stężeniami tetranor-PGE-M w moczu w dniu placebo i dniu aspiryny ( $p=0,58$ , ANOVA). Istotne różnice między stężeniami tetranor-PGE-M w moczu obserwowano po podaniu placebo i po prowokacji aspiryną w dawce kumulacyjnej 188 mg u 10 badanych chorych dobrze tolerujących aspirynę ( $p=0,04$ , ANOVA). Po podaniu aspiryny stężenie tetranor-PGE-M w moczu istotnie zmniejszyło się w 2. i 4. godzinie po teście w stosunku do wartości podstawowych (odpowiednio  $p<0,001$  i  $p<0,001$ , test Dunnetta) (rys.23 a). Po podaniu placebo nie było istotnych zmian w czasie stężenia tetranor-PGE-M w porównaniu do wartości podstawowych (rys.23 a).

Podobne zależności obserwowano u tych samych 10 chorych, jeśli obliczenia dotyczyły stężeń tetranor-PGE-M w moczu pobranym w dniu testu prowokacyjnego z aspiryną do dawki kumulacyjnej 500 mg (etap I). Stwierdzono, że nie było różnic w zakresie podstawowych stężeń tetranor-PGE-M między dniem placebo i dniem aspiryny ( $p=0,51$ , ANOVA) (rys.23 b). Istotne różnice w zakresie stężeń tetranor-PGE-M obserwowano między dniem placebo i dniem aspiryny u 10 badanych chorych dobrze tolerujących aspirynę ( $p=0,01$ , ANOVA). Po podaniu 500 mg ASA stężenie tetranor-PGE-M u tych 10 chorych na ATA zmniejsza się w stosunku do wartości podstawowych w 2. i 4. godzinie po teście (odpowiednio  $p=0,03$  i  $p=0,002$ , test Dunnetta). Po podaniu placebo nie było istotnych zmian w czasie stężenia tetranor-PGE-M w porównaniu do wartości podstawowych (rys. 23 b).



Rys. 23. Zmiany w czasie stężenia tetranor-PGE-M w moczu w grupie ATA w dniu placebo i aspiryny: a/ po dawce prowokacyjnej 188 mg; b/ po dawce prowokacyjnej 500 mg.

Tetranor-PGE-M - kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksyłowy. ASA – aspiryna. W. podst. – wartość podstawowa. Czas [h] – czas w godzinach.

Wyniki powyższego badania pozwalają wyciągnąć wniosek, iż stężenie tetranor-PGE-M w grupie ATA nie zależy od dawki aspiryny.

## 6. Dyskusja

Badanie niniejsze zostało przeprowadzone w dwóch etapach. W pierwszym etapie wzięły udział dwie równe grupy liczące po 17 osób: AIA i ATA. Drugi etap badania miał na celu wykluczenie wpływu dawki aspiryny na wyniki oznaczeń PGE<sub>2</sub> w grupie ATA. W drugim etapie doustny test prowokacyjny z aspiryną przeprowadzono u 10 chorych z grupy ATA zgodnie z protokołem, ale tylko do dawki kumulacyjnej 188 mg, tj. dawki, po której u większości chorych na AIA wystąpiła reakcja nadwrażliwości.

### 6.1. Wiarygodność wyników

Testy prowokacyjne przeprowadzono metodą pojedynczo ślepej próby, ponieważ dotychczasowe doświadczenia z przeprowadzaniem prób prowokacyjnych u chorych na AIA wskazują, że metodyka ta zapewnia odpowiednią wiarygodność [71]. Podawanie placebo w pierwszym dniu badania pozwala na wykluczenie chorych z niestabilnym przebiegiem astmy. Przeprowadzenie testów prowokacyjnych metodą podwójnie ślepej próby nie jest konieczne, bowiem ocena kliniczna w czasie badania obejmuje także pomiary obiektywne (spirometria).

Testy prowokacyjne były przeprowadzane w tych samych warunkach zewnętrznych zawsze o tej samej porze dnia.

W badaniach brali udział chorzy z nadwrażliwością na NSLPZ potwierdzoną w czasie 24 miesięcy przed rozpoczęciem badania dodatnim wynikiem doustnej próby prowokacyjnej z aspiryną. Ma to duże znaczenie praktyczne, ponieważ pewne rozpoznanie astmy aspirynowej jest możliwe jedynie na podstawie testu prowokacyjnego z aspiryną [7,36,71].

W badaniach brali udział chorzy w różnym wieku i z odmienną charakterystyką astmy (wynik testów skórnych, stężenie IgE całkowitego, różny czas trwania choroby). Natomiast między badanymi grupami AIA i ATA nie było istotnych różnic w zakresie charakterystyki chorych.

Dla zwiększenia wiarygodności uzyskanych danych metabolity PGE<sub>2</sub> oznaczano dwoma metodami: immunoenzymatyczną (EIA) i spektrometryczną (GC-NICI-SM). Metoda EIA, dzięki istniejącym na rynku gotowym zestawom, pozwala na szybkie uzyskanie wyników, jednakże metabolit przez nią oznaczany 13,14-dihydro-15 keto-

PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>-M) jest mało stabilny [26]. Metoda spektrometrii mas w połączeniu z chromatografią gazową i techniką ujemnej jonizacji jest czułą i swoistą metodą pozwalającą oznaczać stabilny metabolit PGE<sub>2</sub> – kwas 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksylowy – (tetranor-PGE-M) [31,67,73,97,101].

## 6.2. Omówienie wyników

Prawie cały metabolizm PGE<sub>2</sub>, powstającej w różnych miejscach organizmu, odbywa się w płucach [86]. Następnie produkty metabolizmu PGE<sub>2</sub> wydalane są z moczem [67,97]. Oznaczanie PGE<sub>2</sub> w osoczu nie pozwala na wiarygodną ocenę endogennej produkcji PGE<sub>2</sub> z uwagi na krótki okres półtrwania tej prostaglandyny (ok. 30 s) szybko metabolizowanej w płucach [19,21,85] oraz jej uwalnianie *ex vivo* w czasie pobierania krwi [67,97,132]. Nerki są jednym z głównych miejsc syntezy prostaglandyn, w tym także PGE<sub>2</sub>. Na syntezę tę wpływ mają: wiek, ilość spożywanej soli, niektóre leki (głównie inhibitory enzymu konwertującego angiotenzynę) [63]. Nerkowa PGE<sub>2</sub> wydalana jest jednak z moczem w postaci macierzystego związku i nie zwiększa puli metabolitów powstających w wyniku ogólnoustrojowej inaktywacji PGE<sub>2</sub> [67]. Metabolity PGE<sub>2</sub> wydalane z moczem świadczą zatem o systemowej produkcji prostaglandyny E<sub>2</sub> [8,9,67,101].

### *Podstawowe stężenia PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę i osób zdrowych*

W niniejszym badaniu wartości podstawowe obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu nie różniły się między badanymi grupami (AIA i ATA) oraz grupą kontrolną osób zdrowych.

U zdrowych osób stężenie obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu było wyższe u mężczyzn niż u kobiet. Jest to zgodne z dotychczasowymi doniesieniami [67]. W niniejszym badaniu porównano także podstawowe wydalanie metabolitów PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę w zależności od płci. Ciekawe, iż u chorych na astmę oskrzelową nie stwierdzono różnic między obu płciami w podstawowym stężeniu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu.

### *Zmiany stężeń metabolitów PGE<sub>2</sub> po prowokacji aspiryną i celekoksybem*

Zaskakujące okazują się wyniki badania metabolitów PGE<sub>2</sub> w czasie próby prowokacyjnej z aspiryną. W grupie AIA stężenie dwóch różnych metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu mierzone dwoma metodami laboratoryjnymi nie zmieniało się po podaniu



aspiryny. Natomiast w grupie ATA aspiryna powodowała znamienne zmniejszenie stężenia obu metabolitów w moczu.

Wiemy, że aspiryna działa przez hamowanie cyklooksygenaz (silniejsze - COX-1, dużo słabsze - COX-2), co prowadzi do zmniejszenia stężenia produktów reakcji przez nią katalizowanych. Rzeczywiście w grupie ATA podanie aspiryny spowodowało zmniejszenie produkcji ogólnoustrojowej PGE<sub>2</sub>. Dlaczego więc w grupie AIA nie obserwujemy zmian w wydalaniu metabolitów PGE<sub>2</sub> po aspirynie?

Do tej pory w założeniach patogenetycznych astmy aspirynowej przyjmowano, że to raczej niedobór PGE<sub>2</sub>, eikozanoidu rozszerzającego oskrzela i hamującego produkcję cys-LTs, odgrywa rolę w skurczu oskrzeli indukowanym aspiryną [117].

Za hipotezą tą przemawiają następujące wyniki badań:

- 1) inhalacja egzogennej PGE<sub>2</sub> zapobiega skurczowi oskrzeli indukowanemu aspiryną i jednocześnie hamuje typowy dla AIA poaspirynowy wzrost wydalania cys-LTs z moczem [100,109];
- 2) komórki nabłonka operacyjnie usuniętych polipów nosa lub komórki z biopsji śluzówki nosa i zatok od chorych na AIA produkują mniej PGE<sub>2</sub> niż odpowiednie komórki od chorych na ATA [43,81];
- 3) komórki krwi obwodowej od chorych na AIA uwalniają mniej PGE<sub>2</sub> niż odpowiednie komórki od chorych na ATA [94];
- 4) fibroblasty oskrzeli od chorych na AIA uwalniają mniej PGE<sub>2</sub> w porównaniu z chorymi z dobrą tolerancją aspiryny [84];
- 5) mniejsza ekspresja COX-2 w tkance polipów nosa u chorych z nadwrażliwością na aspirynę w porównaniu z chorymi z dobrą tolerancją aspiryny może prowadzić do zmniejszonej syntezy PGE<sub>2</sub> [82].

Wyniki przeprowadzonego badania są inne niż oczekiwano. W kontekście przedstawionych wyżej doniesień można by się spodziewać większego niż w grupie ATA obniżenia stężenia PGE<sub>2</sub> u chorych na AIA po prowokacji aspiryną. Okazało się jednak, że u chorych z nadwrażliwością na aspirynę stężenie metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu nie tylko nie zmniejszyło się bardziej niż w grupie ATA, ale nie wykazywało znamiennych wahań w czasie całego testu prowokacyjnego z ASA.

Wątpliwości co do dokładności oznaczenia metabolitu PGE<sub>2</sub> metodą immunoenzymatyczną rozwiano po oznaczeniu drugiego głównego metabolitu PGE<sub>2</sub> (tetranor-PGE-M) metodą GC-NICI-SM. Tak jak w przypadku PGE<sub>2</sub>-M stężenia

tetranor-PGE-M po prowokacji ASA nie uległy istotnym statystycznie zmianom w stosunku do wartości wyjściowych.

Być może wytłumaczenia uzyskanych wyników należy upatrywać w komórkowym mechanizmie astmy aspirynowej. Nadwrażliwość na ASA i inne NSLPZ związana jest ze szczególnym typem zapalenia, w którym dochodzi do degranulacji mastocytów w narządach docelowych, takich jak ściana oskrzela, śluzówka nosa i zatok przynosowych - w astmie aspirynowej [64] i skóra - w pokrzywce aspirynowej [60]. Udokumentowano to na podstawie: 1) wzrostu PGD<sub>2</sub> w surowicy krwi [6], moczu [64,72] i BAL-u [114], 2) histaminy w wydzielinie z nosa [17,18,45] i BAL-u [114] oraz 3) tryptazy w surowicy krwi [6,103]. Można przypuszczać, że aktywowane mastocyty zwiększają nie tylko produkcję PGD<sub>2</sub>, ale i PGE<sub>2</sub>. Dodatnia korelacja między stężeniem całkowitego IgE i poziomem PGE<sub>2</sub> w moczu obserwowana w niniejszym badaniu w warunkach podstawowych, jak i po prowokacji aspiryną, pośrednio wskazuje na udział mastocytów w produkcji PGE<sub>2</sub>. Być może mediatory zapalne uwalniane przez aktywowane mastocyty w czasie dodatniego testu z aspiryną stymulują (przez aktywację fosfolipazy A<sub>2</sub>) biosyntezę PGE<sub>2</sub> w innych komórkach. Komórkami zaangażowanymi we wzrost produkcji PGE<sub>2</sub> mogłyby być także nabłonek i mięśnie gładkie oskrzeli, makrofagi, limfocyty i eozynofile. Ten wzrost systemowej produkcji PGE<sub>2</sub> zależałby głównie od aktywności COX-2, którą aspiryna hamuje tylko w niewielkim stopniu.

Trzeba też sobie uświadomić, że reakcja na aspirynę jest ostrym stanem nakładającym się na przewlekłe zapalenie astmatyczne. Można się więc spodziewać, że w tym przypadku dochodzi wręcz do aktywacji COX-2, która jest enzymem indukowanym w miejscach toczącego się zapalenia. Rzeczywiście, w dotychczasowych badaniach przeprowadzonych u osób zdrowych nioselektywne blokowanie COX, jak i selektywne blokowanie COX-2 zmniejszało produkcję PGE<sub>2</sub> w podobnym stopniu [67]. Podobną zależność obserwujemy w przypadku chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny opisanych w niniejszej pracy.

Z kolei celekoksyb, selektywnie blokujący COX-2, który nie wywołał reakcji nadwrażliwości u większości chorych biorących udział w przedstawianym badaniu, zmniejszał wydalanie obu metabolitów z moczem podobnie w obu grupach: AIA i ATA.

Być może rzeczywiście w czasie reakcji nadwrażliwości na aspirynę indukowana w komórkach zapalnych cyklooksygenaza-2 z jednej strony przyczyniałyby

się do zwiększenia syntezy PGE<sub>2</sub>. Z drugiej zaś strony cytokiny zapalne uwalniane w czasie reakcji na aspirynę mogłyby wpływać modulująco na drogę przemiany PGE<sub>2</sub>. Wykazano, że w komórkach nabłonka dróg oddechowych osób chorych na astmę oskrzelową IL-13 hamuje enzym syntazę PGE-1, a zwiększa ekspresję enzymu katabolizującego PGE<sub>2</sub>, czyli dehydrogenazę 15-prostaglandynową [123]. IL-13 jest jedną z cytokin uwalnianych przez limfocyty Th<sub>2</sub>, biorące udział w zapaleniu alergicznym. Jednocześnie wykazano, iż interleukina ta zmniejsza poziom COX-2 [123]. Do tej pory nie oceniano poziomu 15-PGDH w drogach oddechowych u chorych na astmę z nadwrażliwością na aspirynę, ale na podstawie dotychczasowych wyników badań można się spodziewać, że poziom tego enzymu jest w tym przypadku zwiększony w porównaniu z grupą ATA i osób zdrowych. Katabolizm PGE<sub>2</sub> zależy także od szybkości transportu tej prostaglandyny do komórek przy udziale białek nośnikowych [5,96]. Wykazano, iż indometacyna i inne NSLPZ hamują transport prostaglandyn do komórek u szczurów [5]. Nie badano tego zjawiska u chorych na astmę oskrzelową. Być może aspiryna u osób nadwrażliwych zmniejsza tempo dkomórkowego transportu PGE<sub>2</sub>, zwalniając przy tym jej katabolizm?

Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki należy rozważyć także w świetle najnowszych badań nad rolą receptorów dla PGE<sub>2</sub> w nadwrażliwości na aspirynę.

Ying i wsp. [131] zauważyli, że w biopsjach śluzówki nosa uzyskanych od chorych na nieżyt nosa z nadwrażliwością na aspirynę odsetek komórek zapalnych - neutrofilii, mastocytów, eozynofili i limfocytów T - wykazujących ekspresję receptora typu EP2 jest istotnie mniejszy w porównaniu z chorymi na nieżyt nosa bez nadwrażliwości na aspirynę. Ponieważ PGE<sub>2</sub> wywiera swoje przeciwzapalne działanie przez receptor EP2 na leukocytach, jego zmniejszona ekspresja mogłaby przynajmniej częściowo odpowiadać za nasilenie nacieku zapalnego i zwiększoną produkcję leukotrienów cysteinylowych u chorych z nadwrażliwością na aspirynę [131].

Z kolei Jinnai i wsp. sugerują, iż nadwrażliwość na aspirynę u niektórych chorych na astmę oskrzelową może być związana z polimorfizmem w obrębie genu receptora dla PGE<sub>2</sub> typu EP2, determinującego mniejszą niż u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny ekspresję tego receptora na komórkach dróg oddechowych chorych na AIA [37].

Jeżeli tak rzeczywiście jest, to mniejsza ekspresja receptora EP2 na komórkach dróg oddechowych u chorych na astmę aspirynową z jednej strony powodowałaby słabszą odpowiedź na prostaglandynę E<sub>2</sub> działającą rozszerzająco na oskrzela

i przeciwzapalnie. Ponadto podanie aspiryny przynajmniej przejściowo zmniejszałoby produkcję PGE<sub>2</sub>, dając przewagę prozapalnym leukotrienom. Z drugiej strony ta szczególna „oporność” na PGE<sub>2</sub> mogłaby stymulować komórki do zwiększenia produkcji PGE<sub>2</sub> w mechanizmie *up-regulation*. Tłumaczyłoby to brak zmian w stężeniach wydalanych metabolitów PGE<sub>2</sub> po prowokacji aspiryną u chorych na AIA obserwowany w niniejszym badaniu. Jednocześnie „opornością” na PGE<sub>2</sub> można by wytłumaczyć, dlaczego wzrost produkcji endogennej PGE<sub>2</sub> nie przekłada się na jej ochronne działanie na oskrzela.

Być może też wpływ PGE<sub>2</sub> na te same receptory w AIA i ATA jest różny lub należy poszukiwać innych receptorów, przez które działa PGE<sub>2</sub> w astmie aspirynowej?

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, rodzi się pytanie: dlaczego więc nie obserwowano wzrostu, czy też wahań, ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> u chorych na AIA po podaniu aspiryny, a jedynie brak zmian w stężeniach jej metabolitów w moczu? Być może zmniejszonemu poziomowi PGE<sub>2</sub> w drzewie oskrzelowym towarzyszy wzrost ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> związanej z ostrym stanem zapalnym w czasie reakcji nadwrażliwości na aspirynę? Rzeczywiście, dotychczasowe wyniki badań nad lokalną produkcją PGE<sub>2</sub> w astmie aspirynowej wskazują, że jej poziom w drogach oddechowych u tych chorych może być niższy niż u chorych na astmę bez nadwrażliwości na aspirynę [43,82,84].

### ***Czy stężenie PGE<sub>2</sub> po prowokacji aspiryną zależało od dawki aspiryny?***

W pierwszym etapie badania w grupie AIA reakcja wystąpiła po różnych dawkach aspiryny, w tym aż u 9 chorych po trzeciej dawce aspiryny (czyli kumulacyjnej dawce 188mg). Natomiast w grupie ATA test z aspiryną przeprowadzono, podając cztery wzrastające dawki aspiryny do dawki kumulacyjnej 500 mg. Zrodziła się więc wątpliwość, czy na wyniki stężenia metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu w pierwszym etapie badania miał wpływ fakt, że dawki prowokacyjne aspiryny w grupie AIA i ATA były różne. Wszyscy chorzy z dobrą tolerancją aspiryny otrzymali bowiem dawkę kumulacyjną aspiryny 500 mg.

Aby wyeliminować wpływ dawki aspiryny na wyniki stężeń metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu w grupie z dobrą tolerancją aspiryny, przeprowadzono drugi etap badania. U 10 chorych z grupy ATA, którzy brali udział także w pierwszym etapie przeprowadzono test prowokacyjny z aspiryną podając 3 kolejne dawki aspiryny zgodnie z protokołem do dawki kumulacyjnej 188 mg.

Okazało się, że u chorych na ATA po podaniu dawki kumulacyjnej aspiryny 188 mg, inaczej niż w dniu placebo, dochodzi do znamienego zmniejszenia stężenia obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w wydalonym moczu. Podobne wyniki uzyskano w grupie 17 chorych na ATA w pierwszym etapie badania po dawce kumulacyjnej 500 mg.

W obrębie tej samej grupy 10 chorych dokonano również analizy wyników stężeń metabolitów PGE<sub>2</sub> uzyskanych w pierwszym etapie badania. Podobnie jak w przypadku mniejszej dawki kumulacyjnej (188 mg) stwierdzono, iż podanie aspiryny do dawki kumulacyjnej 500 mg powoduje znamienne zmniejszenie wydalania obu metabolitów PGE<sub>2</sub> z moczem.

Na podstawie powyższych analiz można wyciągnąć wniosek, iż uzyskane w badaniu wyniki stężenia PGE<sub>2</sub>-M i tetranor-PGE-M w moczu nie zależały od dawki kumulacyjnej aspiryny, zarówno w grupie astmy aspirynowej, jak i w grupie chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny.

### ***Ogólnoustrojowa produkcja PGE<sub>2</sub> a wydalanie leukotrienów cysteinylowych***

Analizę ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> postanowiono przeprowadzić także w kontekście systemowej produkcji leukotrienów cysteinylowych, których rola w astmie z nadwrażliwością na aspirynę została potwierdzona [11,12,102,103,114].

Badanie systemowej produkcji cys-LTs wydalanych z moczem przeprowadzono w pierwszym etapie badania. Wyniki te są zgodne z dotychczasowymi, wielokrotnie już potwierdzonymi danymi [11,12,103,114].

Podstawowe wydalanie LTE<sub>4</sub> z moczem u chorych na AIA jest większe niż u chorych na ATA. Po prowokacji aspiryną następuje znamieny wzrost wydalania LTE<sub>4</sub> u tych chorych w stosunku do wartości wyjściowych. Zjawiska tego nie obserwowano w grupie ATA.

Ciekawe, że po podaniu celekoksylu w grupie AIA obserwowano spadek stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu w chwili zakończenia testu w porównaniu z wartościami wyjściowymi. W kolejnych godzinach stężenie LTE<sub>4</sub> utrzymywało się na podobnym poziomie jak w chwili zakończenia testu. W dotychczasowych doniesieniach u chorych z nadwrażliwością na aspirynę nie stwierdzano zmian po podaniu selektywnych inhibitorów COX-2 w wydalaniu LTE<sub>4</sub> z moczem [30,110]. Obserwację tę trudno wytłumaczyć. Być może rolę odgrywa tu zmniejszenie prozapalnego działania PGE<sub>2</sub> przez receptory EP1. Można też podejrzewać, że istnieje okołodobowa zmienność w wydalaniu cys-LTs, gdyż podobną tendencję do zmniejszania się stężenia LTE<sub>4</sub>

w moczu w kolejnych godzinach badania odnotowano również w dniu placebo zarówno w grupie AIA jak i ATA.

W niniejszym badaniu podjęto próbę uchwycenia korelacji między systemową produkcją cys-LTs i PGE<sub>2</sub> w astmie z nadwrażliwością i bez nadwrażliwości na aspirynę. Zaskakujące jest, iż nie udało się ustalić żadnej zależności między uwalnianiem tych eikozanoidów. Być może źródła komórkowe, z których pochodzą leukotrieny cysteinylowe i prostaglandyna E<sub>2</sub> są różne? Wiadomo, że eozynofile i mastocyty odgrywają dużą rolę w produkcji cys-LTs w astmie aspirynowej. Nie wiadomo jednak, jakie komórki odpowiadają za produkcję PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę aspirynową. Prawdopodobne jest też, że mediatory zapalne wydzielane podczas reakcji nadwrażliwości na aspirynę w różny sposób modulują drogi przemian i uwalnianie eikozanoidów, w tym cys-LTs i PGE<sub>2</sub>.

Uzyskane wyniki odnoszą się do ogólnoustrojowej produkcji prostaglandyny E<sub>2</sub> i leukotrienów cysteinylowych. Być może zaburzenia eikozanoidów toczące się miejscowo w oskrzelach u chorych z nadwrażliwością na aspirynę nie znajdują odzwierciedlenia w systemowej produkcji tych mediatorów. Wskazują na to obserwacje dotyczące lokalnej produkcji leukotrienów cysteinylowych i PGE<sub>2</sub> (w dolnych i górnych drogach oddechowych) u chorych na AIA zarówno w warunkach podstawowych, jak i po prowokacji aspiryną [43,81,83,103,114].

Dodatnia zależność między poziomem LTE<sub>4</sub> w moczu po prowokacji aspiryną a eozynofilią bezwzględną stwierdzona u chorych na AIA sugeruje, że leukocyty kwasochłonne odrywają rolę w reakcji nadwrażliwości na aspirynę, przyczyniając się do wzrostu produkcji cys-LTs i są głównym źródłem cys-LTs. Jest to zgodne z dotychczasową wiedzą na temat udziału eozynofili w zapaleniu dróg oddechowych w astmie aspirynowej [106].

### **6.3. Perspektywy dalszych badań**

Wyniki niniejszej pracy po raz pierwszy dają wgląd w ogólnoustrojową produkcję prostaglandyny E<sub>2</sub> u chorych z nadwrażliwością na aspirynę w warunkach podstawowych, jak i po prowokacji aspiryną (nieselektywnym inhibitorem COX) oraz celekoksybem (selektywnym inhibitorem COX-2). Rozpatrywano je w kontekście zmian w systemowym wydzielaniu innych eikozanoidów silnie uwikłanych w patogenezę astmy aspirynowej - leukotrienów cysteinylowych. Ponieważ jednak prezentowane dane odzwierciedlają systemową produkcję PGE<sub>2</sub> i innych pochodnych

kwasu arachidonowego, nie można ich bezpośrednio ekstrapolować na reakcje i zależności między eikozanoidami zachodzące lokalnie w drogach oddechowych u chorych na astmę aspirynową.

Interesujące byłoby badanie, w którym po prowokacji aspiryną oceniano by jednocześnie lokalną (w drogach oddechowych) i ogólnoustrojową (w moczu) produkcję PGE<sub>2</sub> w astmie aspirynowej w odniesieniu do innych ważnych w tym procesie metabolitów kwasu arachidonowego. Badania takie z pewnością byłyby jednak trudne technicznie do przeprowadzenia i mogłyby wzbudzać wątpliwości etyczne (zwłaszcza jeśli chodzi o indukowanie płwociny u chorych z reakcją po aspirynie).

W przedstawionym tu badaniu nie udało się do końca rozwikłać tajemniczego udziału prostaglandyny E<sub>2</sub> w patogenezie astmy aspirynowej. Pojawiło się wiele nowych pytań, na które warto by w przyszłości odpowiedzieć. Jakie komórki odpowiadają za ogólnoustrojową produkcję PGE<sub>2</sub>? Jak w kontekście systemowej produkcji PGE<sub>2</sub> wygląda jej synteza lokalna w drogach oddechowych, zwłaszcza po zadziałaniu aspiryny i innych inhibitorów COX-1?

Wolno sądzić, iż uzyskane wyniki przybliżają nieco poznanie skomplikowanych związków i zależności między eikozanoidami, leżących u podstaw astmy aspirynowej i stanowić będą zachętę do dalszych badań.

## 7. Wnioski

1. Nie ma różnic w podstawowej ogólnoustrojowej produkcji  $\text{PGE}_2$  między chorymi na astmę aspirynową i astmę z dobrą tolerancją aspiryny oraz osobami zdrowymi.
2. Aspiryna nie zmienia ogólnoustrojowej produkcji  $\text{PGE}_2$  u chorych na astmę aspirynową, hamuje natomiast tę produkcję u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny.
3. Selektywny inhibitor COX-2 (celekoksyb) zmniejsza ogólnoustrojową produkcję  $\text{PGE}_2$  u chorych na astmę oskrzelową (zarówno astmę aspirynową jak i astmę bez nadwrażliwości na aspirynę).
4. Wydalanie  $\text{PGE}_2$  z moczem u chorych na astmę aspirynową i astmę z dobrą tolerancją aspiryny nie zależy od dawki prowokacyjnej aspiryny.
5. Nie stwierdza się żadnej zależności między ogólnoustrojową produkcją leukotrienów cysteinylowych a ogólnoustrojową produkcją  $\text{PGE}_2$  u chorych na astmę oskrzelową, zarówno z nadwrażliwością na aspirynę jak i dobrą tolerancją aspiryny.



## 8. Streszczenie

**Wstęp:** Prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), jako produkt przemiany kwasu arachidonowego przez cyklooksyzgenazę (COX), o działaniu rozszerzającym oskrzela i hamującym uwalnianie prozapalnych leukotrienów cysteinylowych (cys-LTs) wydaje się odgrywać istotne znaczenie w patogenezie astmy aspirynowej (AIA). Jednak wyniki badań dotyczące jej roli w AIA nie są jednoznaczne. Prawie cały metabolizm PGE<sub>2</sub> odbywa się w płucach. Produkty tego metabolizmu wydalone są z moczem. Uważa się, że ich stężenie w wydalonym moczu jest wskaźnikiem ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub>.

**Założenia i cel pracy:** Dotychczas nie było badań oceniających ogólnoustrojową produkcję PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę oskrzelową. W niniejszej pracy postanowiono zbadać ogólnoustrojową produkcję PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę oskrzelową z nadwrażliwością na aspirynę i dobrą tolerancją aspiryny (ATA) w warunkach podstawowych oraz po prowokacji aspiryną (nieselektywnym inhibitorem COX) oraz celekoksybem (selektywnym inhibitorem COX-2). Próbowano także ustalić, czy istnieje zależność między wydalaniem cys-LTs z moczem a wydalaniem metabolitów PGE<sub>2</sub> w warunkach podstawowych oraz po prowokacji aspiryną.

**Materiały i metody:** Doustny test prowokacyjny z aspiryną z użyciem placebo oraz doustny test z celekoksybem przeprowadzono u 17 chorych na AIA i 17 chorych na ATA. Mocz na metabolity PGE<sub>2</sub> i leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) pobierano przed rozpoczęciem badania i w momencie zakończenia próby prowokacyjnej z placebo lub aspiryną, lub celekoksybem oraz 2 i 4 godziny później. W moczu oznaczano stężenia dwóch głównych metabolitów PGE<sub>2</sub>: 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>-M) – metodą immunoenzymatyczną (EIA) i kwasu 9,15-diketo-11 $\alpha$ -hydroksy-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20- dikarboksyłowego (tetranor-PGE-M) – metodą spektrometrii mas w połączeniu z chromatografią gazową, techniką ujemnej jonizacji (GC-NICI-MS). Stężenie LTE<sub>4</sub> w moczu oznaczano metodą EIA. Dodatkowo u 30 osób zdrowych pobrano mocz na badanie podstawowych stężeń metabolitów PGE<sub>2</sub>. Ponieważ dawki prowokacyjne aspiryny u chorych na AIA były różne, a w grupie ATA wszyscy badani otrzymali dawkę kumulacyjną aspiryny 500 mg, postanowiono przeprowadzić drugi etap badania u chorych na ATA. Miał on na celu wyeliminowanie wpływu dawki aspiryny na wyniki uzyskane w pierwszym etapie badania u chorych na ATA. Test prowokacyjny z aspiryną do dawki kumulacyjnej 188 mg przeprowadzono u 10 chorych

losowo wybranych z grupy ATA biorących udział w pierwszym etapie badania. Była to dawka kumulacyjna, która wywołała reakcję nadwrażliwości u 9 chorych na AIA w pierwszym etapie badania. Podobnie jak w pierwszym etapie mocz na metabolity PGE<sub>2</sub> pobierano przed rozpoczęciem badania i w momencie zakończenia próby prowokacyjnej z placebo lub aspiryną oraz 2 i 4 godziny później.

**Wyniki:** Stężenia obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu w warunkach podstawowych nie różniły się między 3 grupami: AIA, ATA i osobami zdrowymi. Wydalanie obu metabolitów z moczem u osób zdrowych było większe u mężczyzn niż u kobiet. W grupie AIA i ATA nie stwierdzono różnic między obu płciami w zakresie podstawowego stężenia metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu. Po prowokacji aspiryną stężenie obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu nie zmieniło się w grupie AIA w żadnym punkcie czasowym obserwacji, natomiast w grupie ATA – stężenie obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu znamienne zmniejszyło się po podaniu aspiryny. Wydalanie metabolitów PGE<sub>2</sub> z moczem po prowokacji aspiryną w żadnej z grup nie zależało od dawki. Po prowokacji celekoksymbem w obu grupach badanych (AIA i ATA) obserwowano znamienne zmniejszenie stężenia obu metabolitów PGE<sub>2</sub> w moczu w stosunku do wartości podstawowych. W czasie próby prowokacyjnej z aspiryną w grupie AIA obserwowano typowy wzrost stężenia LTE<sub>4</sub> w moczu po prowokacji aspiryną.

Nie stwierdzono żadnej korelacji wydalania metabolitów PGE<sub>2</sub> z wydalaniem LTE<sub>4</sub> z moczem w żadnej z badanych grup ani w warunkach podstawowych ani po prowokacji aspiryną.

**Wnioski:** Nie ma różnic w podstawowej ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> między chorymi na astmę aspirynową i astmę z dobrą tolerancją aspiryny oraz osobami zdrowymi.

Aspiryna nie zmienia ogólnoustrojowej produkcji PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę aspirynową, natomiast u chorych na astmę z dobrą tolerancją aspiryny powoduje jej istotne zmniejszenie.

Selektywny inhibitor COX-2 zmniejsza ogólnoustrojową produkcję PGE<sub>2</sub> zarówno u chorych na AIA, jak i chorych na ATA.

Nie ma korelacji między ogólnoustrojową produkcją cys-LTs i PGE<sub>2</sub> u chorych na astmę aspirynową.

## Summary

**Introduction:** Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a product of arachidonic acid metabolism of cyclooxygenase, exerting bronchodilatory action and suppressing the release of proinflammatory cysteinyl leukotrienes (cys-LTs), seems to be of importance in the pathogenesis of aspirin-induced asthma (AIA). However the results of its role in AIA are diverse. PGE<sub>2</sub> is predominantly metabolized in the lungs. Products of its metabolism are excreted in urine. It has been assumed that their urinary concentration is an index of systemic PGE<sub>2</sub> production.

**Objective:** So far there have been no studies evaluating systemic PGE<sub>2</sub> production in patients with bronchial asthma. In the presented thesis, the evaluation of systemic PGE<sub>2</sub> production in aspirin-induced asthma patients and aspirin-tolerant asthmatics (ATA) was undertaken both at baseline and following aspirin (nonselective COX inhibitor) and celecoxib (selective COX-2 inhibitor) challenge. The point of interest was also to find a correlation between cys-LTs urinary excretion and PGE<sub>2</sub> metabolites levels in urine at baseline and following aspirin challenge.

**Methods:** Placebo controlled oral aspirin challenge test and celecoxib challenge test were performed in 17 AIA and 17 ATA patients. Urine for PGE<sub>2</sub> metabolites and leukotriene E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) determinations was collected at baseline, at the time of the end of the challenge and 2 and 4 hrs later. Two main prostaglandin E<sub>2</sub> metabolites were determined in urine, i.e.: 13,14-dihydro-15keto-PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>-M) using commercial enzyme immunoassay (EIA) and 9,15-dioxo-11 $\alpha$ -hydroxy-2,3,4,5-tetranor-prostane-1,20-dioic acid (tetranor-PGE-M) using gas chromatography/mass spectrometry. LTE<sub>4</sub> concentrations in urine were measured using EIA. Moreover, base levels of urinary PGE<sub>2</sub> metabolites were evaluated in 30 healthy volunteers. Because provocation doses of aspirin were different in AIA patients and all ATA patients had received 500 mg cumulative dose of aspirin, the second phase of the study was undertaken. It was planned to eliminate the dose influence on results obtained in ATA patients in the first phase of the study. An aspirin provocation test with a cumulative dose of ASA 188 mg was performed in 10 patients randomly chosen from ATA group (that had taken part in the first phase of study). A dose of 188 mg was the cumulative dose of aspirin which provoked hypersensitivity reaction in 9 AIA patients in the first phase of the study.

Urinary collection for PGE<sub>2</sub> metabolites determination was performed in the same scheme as in the first phase of the study.

**Results:** At baseline, mean prostaglandin E<sub>2</sub> metabolites values did not differ between the three groups: AIA, ATA and healthy controls. Urinary levels of both PGE<sub>2</sub> metabolites in healthy controls were higher in men than in women. In the AIA and ATA groups there was no difference between genders in terms of basal urinary levels of PGE<sub>2</sub> metabolites. Following aspirin challenge both PGE<sub>2</sub> metabolites became significantly depressed in the aspirin-tolerant group, but their mean level remained unchanged in the aspirin-sensitive group. The dose of aspirin had no effect on magnitude of the response of the PGE<sub>2</sub> metabolites and its duration. In both study groups urinary PGE<sub>2</sub> metabolites decreased following celecoxib challenge. Typical (as reported previously) LTE<sub>4</sub> level increase in urine was observed following aspirin challenge. No correlation was found between urinary levels of PGE<sub>2</sub> metabolites and LTE<sub>4</sub> in AIA patients.

**Conclusion:** There are no differences in baseline systemic PGE<sub>2</sub> production between aspirin-induced asthma patients, aspirin-tolerant asthmatics and healthy controls.

Aspirin does not change systemic PGE<sub>2</sub> production in aspirin-induced asthma, however decreases it in aspirin-tolerant asthmatics.

Selective COX-2 inhibitor decreases systemic PGE<sub>2</sub> production both in AIA and ATA.

There is no correlation between systemic cys-LTs and PGE<sub>2</sub> production in aspirin-induced asthma.

## 9. Piśmiennictwo

1. Adamek-Guzik T., Guzik T.J., Czerniawska-Mysik G., Korpanty G., Mastalerz L., Radwan J., Szczeklik A.: Urinary leukotriene levels are increased during exacerbation of atopic eczema/dermatitis syndrome. Relation to clinical status. *Allergy*, 2002; 57:732-736.
2. Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S., Górski P., Barnes P.J.: Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 166:301-306.
3. Baldassare S., Schandene L., Choufani G., Michils A.: Asthma attacks induced by low doses of celecoxib, aspirin, and acetaminophen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117:215-217.
4. Barnes P.J., Adcock I.M.: Transcription factors and asthma. *Eur. Respir. J.*, 1998; 12:221-234.
5. Bito L.Z., Baroody R.A., Reitz M.E.: Dependence of pulmonary prostaglandin metabolism on carrier-mediated transport processes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 1977; 232:382-387.
6. Bochenek G., Nagraba K., Niżankowska E., Szczeklik A.: A controlled study of  $9\alpha11\beta$ PGF<sub>2</sub> (a prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite) in plasma and urine of patients with bronchial asthma and healthy controls after aspirin challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111:743-749.
7. Bochenek G., Niżankowska E., Szczeklik A.: Testing for aspirin hypersensitivity. *Allergy*, 2002; 57:562-565.
8. Bothwell W., Verburg M., Wynalda M., Daniels E.G., Fitzpatrick F.A.: A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. An indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1982; 220:229-235.
9. Cagen L.M., McGiff J.C.: Measurement of prostaglandins and prostaglandin metabolites. *Hypertension Research. Methods and Models*. Ed.: F.M. Radzialowski. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1982:139-194.
10. Celik G., Bavbek S., Misirligil Z., Melli M.: Release of cysteinyl leukotrienes with aspirin stimulation and the effect of prostaglandin E(2) on this release from peripheral blood leucocytes in aspirin-induced asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy*, 2001; 31:1615-1622.
11. Christie P.E., Tagari P., Ford-Hutchinson A.W., Black C., Markendorf A., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: Urinary leukotriene E<sub>4</sub> after lysine aspirin inhalation in asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992; 146:1531-1534.

12. Christie P.E., Tagari P., Ford-Hutchinson A.W., Charlesson S., Chee P., Arm J.P., Lee T.H.: Urinary leukotriene E<sub>4</sub> concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991; 143:1025-1029.
13. Clària J., Serhan C.N.: Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995; 92:9475-9479.
14. Corrigan C., Mallett K., Ying S., Roberts D., Parikh A., Scadding G., Lee T.: Expression of cysteinyl leukotrienes receptors cysLT1 and cysLT2 in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005; 115:316-322.
15. Cowburn A.S., Sładek K., Soja J., Adamek Ł., Nizankowska E., Szczeklik A., Lam B.K., Penrose J.F., Austen F., Holgate S.T., Sampson A.P.: Overexpression of leukotriene C<sub>4</sub> synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101:834-846.
16. Demoly P., Jaffuel D., Lequeux N., Weksler B., Creminon C., Michel F.B., Godard P., Bousquet J.: Prostaglandin H synthase 1 and 2 immunoreactivities in the bronchial mucosa of asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 155:670-675.
17. Ferreri N.R., Holland W.C., Stevenson D.D., Spiegelberg H.L.: Release of leukotrienes, prostaglandins and histamine into nasal secretions of aspirin-sensitive asthmatics during reaction to aspirin. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988; 137:847-854.
18. Fischer A.R., Rosenberg M.A., Lilly CM., Callery J.L., Rubin P., Cohn P.: Direct evidence for a role of the mast cell in the nasal response to aspirin in aspirin-sensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994; 94:1046-1056.
19. Fitzpatrick F.A., Aguirre R., Pike J. E., Lincoln F. H.: The stability of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins*, 1980; 19:917-931.
20. Funk CD.: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001; 294:1871-1875.
21. Gawlewicz-Mroccka A., Gielicz A., Mastalerz L., Szczeklik A.: Metabolizm prostaglandyny E<sub>2</sub>, możliwości jej oznaczania w płynach biologicznych i rola w nadwrażliwości na aspirynę. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2006; 6:578-586.
22. Gauvreau M.G., Watson R.M., O'Byrne P.M.: Protective effects of inhaled PGE<sub>2</sub> on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 159:31-36.
23. Gilbert G.B.: Unusual idiosyncrasy to aspirin. *JAMA*, 1911; 56:1262.

24. Global Initiative for Asthma (GINA): Global Strategy for Asthma Management and Prevention, NIH Publication No 02-3659, 2004 (update 2005), National Institutes of Health/National Heart, Lung and Blood Institute. Adres internetowy: <http://www.ginasthma.org>.
25. Goetel E.J., Valacer D.J.: Abnormal response to aspirin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1986; 77:693-698.
26. Granström E., Hamberg M., Hansson G., Kindahl H.: Chemical instability of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin E<sub>2</sub>: reason for low assay reliability. *Prostaglandins*, 1980; 19:933-957.
27. Griffiths R.J.: Prostaglandins and inflammation. W: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 3rd ed. Edited by J.J.Gallin and R. Snyderman, Lippincot Williams &Wilkins, Philadelphia,1999.
28. Grimm V., Rakoski J., Ring J.: Urticaria nad angioedema induced by COX-2 inhibitors. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002; 109:370.
29. Grob M., Pichler W.J., Wutrich B.: Anaphilaxis to celecoxib. *Allergy*, 2002; 57:264-265.
30. Gyllfors P., Bochenek G., Overholt J., Drupka D., Kumlin M., Sheller J., Niżankowska, E., Isakson P.C., Mejza F., Lefkovith J.B., Dahlen S-E., Szczeklik A., Murray J.J., Dahlen B.: Biochemical and clinical evidence that aspirin-intolerant asthmatic subjects tolerate the cyclooxygenase-2-selective analgetic drug celecoxib. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111:1116-1121.
31. Hamberg M., Samuelson B.: On the metabolism of prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> in man. *J. Biol. Chem.*, 1971; 246:6713-6721.
32. Higashi N., Taniguchi M., Mita H., Kawagishi Y., Ishi T., Higashi A., Osame M., Akiyama K.: Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E<sub>4</sub> excretion (hyperleukotrienuria): involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 113:277-283.
33. Higashi N., Taniguchi M., Mita H., Osame M., Akiyama K.: A comparative study of eicosanoid concentrations in sputum and urine in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2002; 32:1484-1490.
34. Hirschberg J.: Mittheilung über einen Fall von Nebenwirkung des Aspirin. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1902; 28:416.
35. Ivanov A.I., Scheck A.C., Romanowsky A.A.: Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E<sub>2</sub> in lipopolysaccharide fever. *Am. J. Physiol.*, 2003; 284:698-706.

36. Jenkins K., Costell J., Hodge L.: Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. *Br. Med. J.*, 2004; 328:434-441.
37. Jinnai N., Sakagami T., Sekigawa T., Kakihira M., Nakajima T., Yoshida K., Goto S., Hasegawa T., Koshino T., Hasegawa Y., Inoue H., Suzuki N., Sano Y., Inoue I.: Polymorphisms in the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: a candidate gene approach. *Human Mol. Genet.*, 2004; 13:3203-3217.
38. Kay L.J., Yeo W.W., Peachell P.T.: Prostaglandin E<sub>2</sub> activates EP2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 147:707-713.
39. Kelly R.W., Abel M.H.: The measurement of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin E<sub>2</sub> by combined gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, 1983; 10:276-279.
40. Kharitonov S.A., Sapienza M.A., Barnes P.J., Chung K.F.: Prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> reduce exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects irrespective of airway calibre changes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 158:1374-1378.
41. Kim S.H., Park H.S.: Pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 6:17-22.
42. Kopp E., Ghosh S.: Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 1994; 265:956-959.
43. Kowalski M.L., Pawliczak R., Woźniak J., Siuda K., Poniatowska M., Iwaszkiewicz J., Kornatowski T., Kaliner M.A.: Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000;161:391-398.
44. Kowalski M.L., Ptasńska A., Jędrzejczak M., Bienkiewicz B., Cieślak M., Grzegorzczak J., Pawliczak R., DuBuske L.: Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (ASPITest)\*. *Allergy*, 2005; 60:1139-1145.
45. Kowalski M.L., Śliwińska-Kowalska M., Igarashi Y., White M.V., Wojciechowska B., Brayton P., Kaulbach H., Roźniecki J., Kaliner M.A.: Nasal secretions in response to acetylsalicylic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993; 91:580-598.
46. Kuehl F.A., Dougherty H.W. Ham E.A.: Interactions between prostaglandins and leukotrienes. *Biochem. Pharmacol.*, 1984; 33:1-5.
47. Kujubu D.A., Fletcher B.S., Varnum B.C., Lim R.W. Herschman H.R.: TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3Ts cells encodes



- a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:12866-12872.
48. Kumlin M., Dahlén B., Björck T., Zetterström O., Granström E., Dahlén S.-E.: Urinary excretion of leukotriene E<sub>4</sub> and 11-dehydro-thromboxane B<sub>2</sub> in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, leukotriene D<sub>4</sub> and histamine in asthmatics. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992; 146:96-103.
  49. Kumlin M., Stensvad F., Larsson L., Dahlén B., Dahlén S.-E.: Validation and application of a new simple strategy for measurements of leukotriene E<sub>4</sub> in human urine. *Clin. Exp. Allergy*, 1995; 25:467-479.
  50. Kumlin M.: Measurement of leukotrienes in humans. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 2000; 161:102-106.
  51. Kunikata T., Yamane H., Segi E., Matsuoka T., Sugimoto Y., Satoshi T., Tanaka H., Nagai H., Ichikawa A., Narumiya S.: Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunol.*, 2005; 5:524-531.
  52. Laitinen L.A., Laitinen A., Haahtela T., Vilkkä V., Spur B.W., Lee T.H.: Leukotrienes E<sub>4</sub> and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993; 341:989-990.
  53. Long J.A., Fogel-Petrovic M., Knight D.A., Thompson P.J., Upham J.W.: Higher prostaglandin E<sub>2</sub> production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004; 170:485-491.
  54. Lynch K.R., O'Neil G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramovitz M., Figureoa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chateauneuf A., Stoccy R., Grieg G.M., Karman S., Hook S.B., Hosfield E., Williams D.L. Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T., Evans J.F.: Characterisation of the human cysteinyl leukotrienes CysLT1 receptor. *Nature*, 1999; 399:789-93.
  55. Marshall L.L.: Angioedema associated with aspirin and rofecoxib. *Ann. Pharmacother.*, 2005; 39:944-948.
  56. Mascia K., Haselkorn T., Deniz Y.M., Miller D.P., Bleecker E.R., Borish L. for the TENOR Study Group: Aspirin sensitivity and severity of asthma: Evidence for irreversible airway obstruction in patients with severe or difficult-to-treat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005; 116:970-975.
  57. Mastalerz L., Sanak M., Gawlewicz-Mroccka A., Gielicz A., Ćmiel A., Szczeklik A.: Prostaglandin E<sub>2</sub> and cysteinyl-leukotrienes systemic production in asthma patients with and without aspirin hypersensitivity. Abstrakt nr 1430, konferencja American Thoracic Society, San Francisco, USA, 2007.

58. Mastalerz L., Sanak M., Gawlewicz-Mroczka 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. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 118:957-958.
59. Mastalerz L., Sanak M., Szczeklik A.: Serum interleukin-5 in aspirin-induced asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2001; 31:1036-1040.
60. Mastalerz L., Setkowicz M., Sanak M., Szczeklik A.: Hypersensitivity to aspirin: common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004; 113:771-775.
61. Melillo E., Wooley K.L., Manning P.J., Watson R.M., O'Byrne P.M.: Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994; 149:1138-1141.
62. Milewski M., Mastalerz L., Nizankowska E., Szczeklik A.: Nasal provocation test for diagnosis of aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998; 101:581-586.
63. Miller M.J., Westlin W.F., McNeill H., McGiff J.C.: Renal prostaglandin efflux induced by vasopressin, dDAVP and arachidonic acid: contrasting profile and sites of release. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1986; 8:577-584.
64. Mita H., Endoh S., Kudoh M., Kawagishi Y., Kobayashi M., Taniguchi M., Akiyama K.: Possible involvement of mast-cell activation in aspirin provocation of aspirin-induced asthma. *Allergy*, 2001; 56:1061-1067.
65. Mitchell M.D., Goodwin V., Mesnage J., Kielan J.A.: Cytokine-induced coordinate expression of enzyme of prostaglandin biosynthesis and metabolism: 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Prostaglandins, Leukot. Essen. Fatty Acids*, 2000; 62:1-5.
66. Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh S., Kudo I.: Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:32783-32792.
67. Murphey L.J., Williams M.K., Sanchez S.C., Byrne L.M., Csiki I., Oates J.A., Johnson D.H., Morrow J.D.: Quantification of the major urinary metabolite of PGE<sub>2</sub> by a liquid chromatographic/mass spectrometric assay: determination of cyclooxygenase-specific PGE<sub>2</sub> synthesis in healthy humans and those with lung cancer. *Anal. Biochem.*, 2004; 334:266-275.
68. Narumiya S., FitzGerald G.A.: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108:25-30.
69. Nasser S., Christie P.E., Pfister R., Sousa A.R., Walls A., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: Effect of endobronchial aspirin challenge on inflammatory cells in

- bronchial biopsy samples from aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Thorax*, 1996; 51:64-70.
70. Nasser S.M., Pfister R., Christie P.E., Sousa A.R., Barker J., Schmitz-Schumann M., Lee T.H.: Inflammatory cell populations in bronchial biopsies from aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153:90-96.
  71. Nizankowska E., Bestyńska-Krypel A., Ćmiel A., Szczeklik A.: Oral and bronchial provocation tests with aspirin for diagnosis of aspirin-induced asthma. *Eur. Respir. J.*, 2000; 15:863-869.
  72. O'Sullivan S., Dahlen B., Dahlen S.-E., Kumlin M.: Increased urinary excretion of the prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite 9alpha11beta-prostaglandin F<sub>2</sub> after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced bronchconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996; 8:421-432.
  73. Oates J.A., FitzGerald G.A., Branch R.A., Jackson E.K., Knapp H.R., Roberts L.J.: Clinical implications of prostaglandin and thromboxan A<sub>2</sub> formation (2). *N. Eng. J. Med.*, 1988; 319:761-767.
  74. Okano M., Sugata Y., Fujiwara TY., Matsumoto R., Nishibori M, Shimizu K., Maeda M., Kimura Y., Kariya S., Hattori H., Yokoyama M., Kino K., Nishizaki K.: E prostanoid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Immunology*, 2006; 118:343-352.
  75. Park J.S., Chang H.S., Park C.S., Lee J.H., Lee Y.M., Choi J.H., Park H.S., Kim L.H., Park B.L., Choi Y.H., Shin H.D.: Association analysis of cysteinyl-leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005; 15:483-492.
  76. Pavord I.D., Tattersfield A.E.: Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E<sub>2</sub>. *Lancet*, 1995; 345:436.
  77. Pavord I.D., Wiśniewski A., Mathur R., Wahedna I., Knox A.J., Tattersfield A.E.: Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on bronchial reactivity to sodium metabisulphite and metacholine in subjects with asthma. *Thorax*, 1991; 46:633-637.
  78. Pavord I.D., Wong C.S., Williams J., Tattersfield A.E.: Effect of inhaled prostaglandin E<sub>2</sub> on allergen-induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1993; 148:87-90.
  79. Pawliczak R., Kowalski M.L.: Metabolites of arachidonic acid (eicosanoids) in the airways – the role of epithelium in synthesis of eicosanoids. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1998; 52:187-199.
  80. Pawliczak R., Lewandowska-Polak A., Kowalski M.L.: Pathogenesis of nasal polyps: an update. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2005; 5:463-471.

81. Perez-Novo C.A., Watlet J.B., Claeys C., Van Cauwenberge P., Bachert C.: Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005; 115:1189-1196.
82. Picado C., Fernandez-Morata J.C., Juan M., Roca-Ferrer J., Fuentes M., Xaubet A., Mullol J.: Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirin-sensitive asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 160:291-296.
83. Picado C., Ramis I., Rosello J., Prat J., Bulbena O., Plaza V., Montserrat J.M., Gelpi E.: Release of peptide leukotriene into nasal secretion after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992; 145:65-69.
84. Pierzchalska M., Szabo Z., Sanak M., Soja J., Szczeklik A.: Deficient prostaglandin E<sub>2</sub> production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients with special reference to aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111:1041-1048.
85. Piper P.J., Vane J.R., Wyllie J.H.: Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature*, 1970; 225:600-604.
86. Pradelles P., Grassi J., Maclouf J.A.: Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.*, 1985; 57:1170-1173.
87. Profita M., Sala A., Bonanno A., Riccobono L., Siena L., Melis M.R., Di Giorgi R., Mirabella F., Gjomarkaj M., Bonsignore G., Vignola A.M.: Increased prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 112:709-716.
88. Samuelsson B.: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983; 220:568-573.
89. Samter M., Beers R.F.Jr: Intolerance to aspirin: clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann. Intern. Med.*, 1968; 68:975-983.
90. Sanak M., Kiełbasa B., Bochenek G., Szczeklik A.: Exhaled eicosanoids following oral aspirin challenge in asthmatic patients. *Clin. Exp. Allergy*, 2004; 34:1899-1904.
91. Sanak M., Levy B.D., Clish C.D., Chiang N., Gronert K., Mastalerz L., Serhan C.N., Szczeklik A.: Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 2000; 16:44-49.
92. Sanak M., Simon H.-U., Szczeklik A.: Leukotriene C<sub>4</sub> synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet*, 1997; 350:1599-1600.

93. Sayers I., Barton S., Rorke S., Beghe B., Hayward B., Van Eerdevegh ., Keith T., Clough J.B., Ye S., Holloway J.W., Sampson A.P., Holgate S.T.: Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leukotriene C<sub>4</sub> synthase gene (LTC<sub>4</sub>S) in asthma. *Thorax*, 2003; 58:417-424.
94. Schäfer D., Schmid M., Gode U.C., Baenkler H-W.: Dynamics of eicosanoids in peripheral blood cells during bronchial provocation in aspirin-intolerant asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 1999; 13:638-646.
95. Schrör K., Smith III E.F.: Dictionary of prostaglandins and related compounds. München, Medikon Verl., 1990.
96. Schuster V.L.: Molecular mechanism of prostaglandin transport. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998; 60:221-242.
97. Schweer H., Meese C.O., Seyberth H.W.: Determination of 11 $\alpha$ -hydroxy-9,15-dioxo-2,3,4,5,20-pentanoic-19-carboxyprostanic acid and 9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -dihydroxy-15-oxo-2,3,4,5,20-pentanoic-19-carboxyprostanic acid by gas chromatography/negative ion chemical ionisation triple-stage quadrupole mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 1990; 189:54-58.
98. Serhan C.N.: Cell-cell interactions in the generation of eicosanoids: Charting the routes and products of transcellular biosynthesis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1993; 121:372-374.
99. Serhan N.C., Levy B.: Success of prostaglandin E<sub>2</sub> in structure – function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2003; 200:8609-8611.
100. Sestini P., Armetti L., Gambaro G., Pieroni M.G., Refini R.M., Sala A., Vaghi A., Folco G.C., Bianco S., Robuschi M.: Inhaled PGE<sub>2</sub> prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE<sub>4</sub> excretion in aspirin-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153:572-575.
101. Seyberth H.W., Sweetman B.J., Frolich J.C., Oates J.A.: Quantifications of the major urinary metabolite of the E prostaglandins by mass spectrometry: evaluation of the method's application to clinical studies. *Prostaglandins*, 1976; 11:381-397.
102. Śladek K., Dworski R., Soja J., Sheller J.R., Nizankowska E., Oates J.A., Szczeklik A.: Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994; 149:940-946.
103. Śladek K., Szczeklik A.: Cysteinyl leukotrienes overproduction and mast cell activation in aspirin-provoked bronchospasm in asthma. *Eur. Respir. J.*, 1993; 6:1018-1026.
104. Smith C.M., Hawksworth R.J., Thien F.C., Christie P.E., Lee T.H.: Urinary leukotriene E<sub>4</sub> in bronchial asthma. *Eur. Respir. J.*, 1992; 5:693-699.

105. Sousa A.R., Parikh A., Scadding G., Corrigan C.J., Lee T.H.: Leukotrienes receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347:1493-1499.
106. Stevenson D.D., Szczeklik A.: Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 118:773-86.
107. Stone E.: An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 1763; 53:195-200.
108. Szczeklik A., Gryglewski J.R., Czerniawska-Mysik G.: Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *Br. Med. J.*, 1975; 1:67-69.
109. Szczeklik A., Mastalerz L., Nizankowska E., Ćmiel A.: Protective and bronchodilator effects of prostaglandin E and salbutamol in aspirin-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153:567-571.
110. Szczeklik A., Nizankowska E., Bochenek G., Nagraba K., Mejza F., Świerczyńska M.: Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2001; 31:219-225.
111. Szczeklik A., Nizankowska E., Duplaga M.: Natural history of aspirin-induced asthma. *Eur Respir. J.*, 2000; 16:432-436.
112. Szczeklik A., Sanak M.: The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006; 533:145-155.
113. Szczeklik A., Sanak M.: The role of COX-1 and COX-2 in asthma pathogenesis and its significance in the use of selective inhibitors. *Clin. Exp. Allergy*, 2002; 32:339-342.
114. Szczeklik A., Sładek K., Dworski R., Nizankowska E., Soja J., Sheller J.R., Oates J.A.: Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 154:1608-1614.
115. Szczeklik A., Stevenson D.D.: Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111:913-921.
116. Szczeklik A.: Aspirin-induced asthma as a viral disease. *Clin. Allergy*, 1988; 18:15-20.
117. Szczeklik A.: Prostaglandin E<sub>2</sub> and aspirin-induced asthma. *Lancet*, 1995; 345: 1056.
118. Szczeklik A.: The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. *Eur. Respir. J.*, 1990; 3:588-593.

119. Taha R., Olivenstein R., Utsumi T., Ernst P., Barnes P.J., Roger I.W., Gidia A.: Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000; 161:636-640.
120. Takasaki J., Kamohara M., Matsumoto M., Saito T., Sugimoto T., Ohishi T., Ishii H., Ota T., Nishikawa T., Kawai Y., Mashuo Y., Isogai T., Suzuki Y., Sugano S., Furuichi K.: The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotrienes CysLT(2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 274:316-322.
121. Tanioka T., Nakatani Y., Senmyo N., Murakami M., Kudo I.: Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:32775-32782.
122. Tenor H., Shute J.K., Church M.K.: Endogenously-released PGE<sub>2</sub> inhibits LTC<sub>4</sub> synthesis in human eosinophils: a possible mechanism contributing to aspirin induced asthma (AIA). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996; 153:684.
123. Trudeau J., Hu H., Chibana K., Chu H.W., Westcott J.Y., Wenzel S.E.: Selective downregulation of prostaglandin E<sub>2</sub>-related pathways by the Th<sub>2</sub> cytokine IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006; 117:1446-1454.
124. Tsuda M., Sakakibara H., Kamidaira T., Saga T., Suetsugu S., Umeda H.: Arachidonic acid metabolism of peripheral blood leukocytes in aspirin-induced asthma. *Abstrakt. N. Engl. Region. Proc.*, 1988; 9:437.
125. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M.: Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998; 38:97-120.
126. Vane J.R., Botting R.M.: The history of aspirin. W: Vane J.R., Botting R.M. (red.): Aspirin and other salicylates. London, Chapman & Hall Medical. 1992; 3-16.
127. Vane J.R.: Inhibition of prostaglandin as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, 1971; 231: 232-235.
128. Warner T., Giuliano F., Vojnovic I., Mitchell A., Vane J.R.: Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96:7563-7568.
129. Widal F., Abrami P., Lermoyez J.: Anaphylaxie et idiosyncrasie. *Press Medical*, 1922; 30:189-193.
130. Wierzuchowski M.: Dożylne stosowanie peptonu w dychawicy oskrzelowej. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 1925; 2:42-76.

131. Ying S., Meng Q., Scadding G., Parikh A., Corrigan C.J., Lee T.H.: Aspirin sensitive rhinosinusitis is associated with reduce E-prostanoid 2 (EP2) receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells. *J. Allergy Clin. Immuno.*, 2006; 117:312-318.
132. Zaorska B.: Prostaglandyny i inne eikozanoidy, PZWL, Warszawa, 1986.



## Spis tabel

Tabela 1.	Kliniczna charakterystyka chorych biorących udział w pierwszym etapie badania. ....	28
Tabela 2.	Schemat doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną (etap I). ....	31
Tabela 3.	Schemat doustnego testu prowokacyjnego z celekoksybem (etap I). ....	33
Tabela 4.	Charakterystyka chorych biorących udział w drugim etapie badania. ....	35
Tabela 5.	Schemat doustnego testu prowokacyjnego z aspiryną (etap II). ....	36
Tabela 6.	Wartości podstawowe PGE <sub>2</sub> -M w moczu w grupach AIA, ATA i u osób zdrowych. ....	42
Tabela 7.	Wartości podstawowe tetranor-PGE-M w moczu w grupach AIA i ATA i u osób zdrowych. ....	50
Tabela 8.	Wartości podstawowe LTE <sub>4</sub> w moczu w grupach AIA, ATA i u osób zdrowych. ....	56

## Spis rysunków

Rys. 1.	Szlak przemian kwasu arachidonowego przez ścieżki cyklooksygenazy i 5-lipoksygenazy .....	12
Rys. 2.	Metabolit 13,14-dihydro-15-keto-PGE <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> -M).....	18
Rys. 3.	Stabilny metabolit PGE <sub>2</sub> – tetranor- PGE-M.....	19
Rys. 4.	Droga przemiany kwasu arachidonowego do prostaglandyny E <sub>2</sub> i jej metabolitów .....	20
Rys. 5.	Plan badania – etap I.....	30
Rys. 6.	Plan badania - etap II.....	34
Rys. 7.	Wartości podstawowe PGE <sub>2</sub> -M w moczu w grupach AIA, ATA i zdrowych.....	42
Rys. 8.	Zmiany stężeń PGE <sub>2</sub> -M w grupie AIA i ATA w dniu placebo. ....	43
Rys. 9.	Zmiany stężeń PGE <sub>2</sub> -M w grupach AIA i ATA po podaniu aspiryny. ....	44
Rys. 10.	Zmiany stężeń PGE <sub>2</sub> -M w grupach AIA i ATA w po podaniu celekoksybu. ....	45
Rys. 11.	Zestawienie zmian w stężeniach PGE <sub>2</sub> -M w poszczególnych dniach badania w grupach AIA i ATA.....	46
Rys. 12.	Zmiany stężeń PGE <sub>2</sub> -M w czasie u poszczególnych chorych na astmę aspirynową w zależności od dawki prowokacyjnej aspiryny: a) małej, b) średniej, c) dużej.....	47
Rys. 13.	Podstawowe stężenie PGE <sub>2</sub> -M u osób zdrowych w zależności od płci. ....	48
Rys. 14.	Wartości podstawowe tetranor-PGE-M w moczu w grupach AIA, ATA i zdrowych.....	49
Rys. 15.	Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu placebo. ....	50
Rys. 16.	Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu aspiryny. ....	51
Rys. 17.	Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w dniu celekoksybu. ....	52
Rys. 18.	Zestawienie zmian stężeń tetranor-PGE-M w grupie AIA i ATA w poszczególnych dniach badania. ....	53
Rys. 19.	Zmiany stężeń tetranor-PGE-M w czasie u poszczególnych chorych na AIA w zależności od dawki prowokacyjnej aspiryny: a) małej, b) średniej, c) dużej.....	54
Rys. 20.	Podstawowe stężenie tetranor-PGE-M u osób zdrowych w zależności od płci. ....	55
Rys. 21.	Zestawienie zmian stężeń LTE <sub>4</sub> w grupach AIA i ATA w dniu prowokacji placebo, ASA i celekoksybem.....	58
Rys. 22.	Zmiany w czasie stężenia PGE <sub>2</sub> -M w moczu w grupie ATA w dniu placebo i aspiryny: a/ po dawce prowokacyjnej 188 mg; b/ po dawce prowokacyjnej 500 mg.....	61
Rys. 23.	Zmiany w czasie stężenia tetranor-PGE-M w moczu w grupie ATA w dniu placebo i aspiryny: a/ po dawce prowokacyjnej 188 mg; b/ po dawce prowokacyjnej 500 mg. ....	62