

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Hanna Rybarczyk

**POLIMORFIZMY S-TRANSFERAZY GLUTATIONU P1 I M1
A BIOSYNTETA
LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH
U CHORYCH NA ASTMĘ OSKRZELOWĄ**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. Marek Sanak

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki
Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2005

Pragnę złożyć podziękowania:

Promotorowi, Panu Docentowi Markowi Sanakowi, Kierownikowi Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, za cenne rady i trafne uwagi oraz wszechstronną pomoc, jakiej udzielił mi w trakcie realizacji i pisania niniejszej pracy.

Panu Profesorowi, Andrzejowi Szczeklikowi, Kierownikowi II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za umożliwienie mi wykonania badań w powyższej Katedrze oraz jego ogromne zaangażowanie w realizację tego projektu.

Pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, zwłaszcza personelowi Pracowni Biologii Molekularnej, za wszelką pomoc, zaangażowanie oraz miłą atmosferę.

Pracownikom II Katedry Chorób Wewnętrznych, którzy pomagali mi w realizacji zadania badawczego.

1. WSTĘP

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	5
1.1 Astma oskrzelowa	5
1.2 Astma aspirynowa	6
1.3 Biosynteza leukotrienów	6
1.4 Syntaza leukotrienu C ₄	10
1.5 S-transferazy glutationu	12
1.6 Glutation	16
1.7 Gen oporności wielolekowej <i>MDR1</i> (multidrug resistance protein 1)	19
2. Założenia i cele	22
3. Materiały i metody	24
3.1 Osoby badane	24
3.1.1 Grupa chorych	24
3.1.2 Grupa kontrolna	24
3.2 Metodyka	25
3.2.1 Plan badań	25
3.2.2 Izolacja DNA oraz reakcja łańcuchowa polimerazy	27
3.2.3 Diagnostyka molekularna – metodyka genotypowania poszczególnych polimorfizmów	30
3.2.3.1 Analiza polimorfizmu 313 A>G genu <i>GSTP1</i>	30
3.2.3.2 Analiza polimorfizmu delecyjnego genu <i>GSTM1</i>	33
3.2.3.3 Analiza polimorfizmu 3435 C>T genu <i>MDR1</i>	36
3.2.3.4 Analiza polimorfizmu -444 A>C genu <i>LTC₄S</i>	38
3.2.4 Stymulacja leukocytów krwi obwodowej	41
3.2.5 Oznaczanie poziomu LTC ₄ i LTE ₄ w nadsączach hodowlanych leukocytów	42
3.2.6 Identyfikacja leukotrienów cysteinylowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC- MS)	45
3.2.7 Oznaczanie poziomu glutationu w próbkach metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)	49
3.2.8 Analiza statystyczna	52
4. Wyniki	54
a) Polimorfizm S-transferazy glutationu P1	55
b) Polimorfizm s-transferazy glutationu M1	57
c) Polimorfizm <i>MDR1</i>	58
d) Polimorfizm syntazy leukotrienu C ₄	60
4.1 Asocjacje genetyczne badanych polimorfizmów; iloraz szans wystąpienia astmy	61
4.1.1 <i>GSTP1</i>	62
a) Astma vs. Kontrola	62
b) AIA vs. ATA (ATA jako kontrola)	63
c) POCHP vs. Kontrola	63

4.1.2	<i>GSTM1</i>	63
a)	Astma vs. Kontrola.....	63
b)	POCHP vs. Kontrola.....	64
4.1.3	<i>LTC₄S</i>	64
a)	Astma vs. Kontrola.....	64
b)	AIA vs. ATA	64
4.2	Czynnościowe badanie płuc i cechy atopii w badanych grupach.	65
4.2.1	FEV ₁ %.....	65
4.2.2	Testy skórne	66
4.2.3	Poziomy całkowite IgE.....	67
4.3	Produkcja leukotrienów cysteinylowych.....	68
4.3.1	Ustalenie stężenia kwasu arachidonowego przy stymulacji leukocytów.....	68
4.3.2	Produkcja CysLTs mierzona metodą EIA i stężenia GSH	70
a)	Stężenia leukotrienu C ₄	70
b)	Stężenia leukotrienu E ₄	71
c)	Stężenia glutationu.....	73
4.3.3	Korelacje między stężeniami leukotrienów cysteinylowych (EIA) a glutationem.....	74
4.3.4	Produkcja CysLTs mierzona metodą HPLC w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS).....	76
4.3.5	CysLTs w grupach w zależności od wariantów genetycznych zbadanych genów.....	78
a)	<i>GSTP1</i>	78
b)	<i>GSTM1</i>	81
c)	<i>MDR1</i>	81
d)	Syntaza leukotrienu C ₄	82
4.4	Produkcja CysLTs a charakterystyka kliniczna.....	82
4.4.1	Liczba leukocytów krwi obwodowej a stężenia leukotrienów C ₄ i E ₄	82
4.4.2	Eozynofilia bezwzględna a stężenia leukotrienów C ₄ i E ₄	82
4.4.3	Leczenie astmy steroidami a stężenia leukotrienów C ₄ i E ₄	83
5.	Dyskusja	84
5.1	Biosynteza leukotrienów cysteinylowych w komórkach krwi obwodowej.....	84
5.2	Wpływ polimorfizmów <i>GSTP1</i> , <i>GSTM1</i> na rozwój astmy	85
5.3	Wpływ polimorfizmów <i>GSTP1</i> , <i>GSTM1</i> na rozwój POCHP.....	88
5.4	Wpływ polimorfizmów <i>MDR1</i> , <i>LTC₄S</i> na rozwój astmy	88
5.5	Produkcja leukotrienów cysteinylowych.....	90
6.	Wnioski końcowe	95
7.	Streszczenie	96
8.	Summary	100
9.	Załączniki	102
I	Wykaz stosowanych skrótów.....	102
II	Odczynniki.....	105

1. Izolacja DNA.....	105
2. Reakcja PCR:.....	105
3. Trawienie restrykcyjne produktów amplifikacji.....	106
4. Genotypowanie.....	106
5. Stymulacja leukocytów krwi obwodowej.....	107
6. Pomiar produkcji leukotrienów cysteinylowych (CysLTs) <i>in vitro</i>	107
7. Pomiar stężenia glutationu (GSH) metodą HPLC.....	108
8. Identyfikacja leukotrienów cysteinylowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS).....	109
10. Piśmiennictwo.....	110

1.1 ASTMA OSKRZELOWA

Astma oskrzelowa jest chorobą znaną od wieków, a pierwsze doniesienia na jej temat pochodzą z 1500 r. p.n.e.. Słowo *astma* pochodzi z języka greckiego i dosłownie oznacza „szybkie oddychanie uwarunkowane uczuciem duszności” [23]. Współczesna definicja astmy zakłada, że astma jest przewlekłą chorobą zapalną, w której uczestniczy wiele komórek. Są to przede wszystkim komórki tuczne (mastocyty), eozynofile, bazofile, neutrofile, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, fibroblasty, komórki śródbłonna, nabłonna oraz limfocyty T. U osób podatnych, zapalenie wywołuje nawroty świszczącego oddechu, duszności, uczucie ściśnięcia klatki piersiowej i kaszlu, pojawiającego się głównie w nocy i wczesnym rankiem. Objawy te są bardzo często powiązane z rozległym, ale zmiennym zaburzeniem przepływu powietrza, które jest częściowo odwracalne, samoistnie lub pod wpływem leczenia. Stanowi zapalnemu bardzo często towarzyszy nadwrażliwość oskrzeli na różne bodźce [23,26,68].

Astmę pod względem etiologicznym, można podzielić na astmę atopową i nieatopową, gdzie przez atopię rozumiemy dziedzicznie uwarunkowanej predyspozycji do nadmiernego wytwarzania przeciwciał typu IgE. W przypadku astmy atopowej możemy zawsze mówić o astmie alergicznej, mechanizmu tego nie udaje się wykazać w astmie nieatopowej. Jak się szacuje, alergia jest przyczyną powstawania astmy w 90% u dzieci i 50% u osób dorosłych [14,56]. Astmę atopową możemy podzielić na: astmę zaostrzaną przez infekcje, z nietolerancją niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), wysiłkową lub o innej etiologii. Pod względem klinicznym astmę dzielimy na: sporadyczną, przewlekłą lekką, przewlekłą średnio ciężką oraz przewlekłą ciężką. Należy także pamiętać o astmie trudnej, steroidoopornej [23].

Astma, będąc chorobą cywilizacyjną, występuje znacznie częściej w krajach wysoko uprzemysłowionych, zwłaszcza tam gdzie zanieczyszczenia środowiska, przede wszystkim atmosfery są bardzo duże [26]. Innymi czynnikami przyczyniającymi się do jej rozwoju mogą być: czynniki genetyczne, wiek, płeć i jak wspomniano wcześniej atopia [23,91].

1.2 ASTMA ASPIRYNOWA

Szczególną postacią astmy jest jej odmiana aspirynowa (AIA). Astma ta charakteryzuje się nadwrażliwością na NLPZ, w tym na aspirynę [23]. Ten rodzaj astmy jest częsty i występuje u 10-20% dorosłych chorych na astmę, u których przeprowadzono próby prowokacyjne z NLPZ [73,76]. Biorąc tylko pod uwagę dane z wywiadu, na astmę aspirynową cierpi zaledwie około 3-5% astmatyków [94,113]. AIA zazwyczaj przebiega jako astma ciężka [76,98] oraz częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn [96]. Astmie tej bardzo często towarzyszy polipowatość błony śluzowej nosa i przewlekłe zapalenia zatok obocznych oraz wodnisty katar [73,76,94,113]. U chorych na AIA obserwuje się silne napady duszności po podaniu kwasu acetylosalicylowego (ASA). Patogeneza AIA jest złożona i obejmuje m.in. przewlekłe zapalenie wywołane przez eozynofile i zwiększoną aktywację komórek tucznych [76]. Teoria ckllooksygenazowa astmy aspirynowej zakłada, że wskutek hamowania przez aspirynę enzymu cyklooksygenazy-1 (COX-1) w drogach oddechowych chorych i niedoboru prostaglandyny E₂, zachodzi zwiększona produkcja leukotrienów cysteinylowych (CysLTs) [80,115], które powodują nasilenie stanu zapalnego i skurcz oskrzeli [94]. Wysokie poziomy CysLTs stwierdzone w moczu chorych na AIA, zwiększają się jeszcze bardziej po podaniu kwasu acetylosalicylowego podczas próby prowokacyjnej [95]. Innym zaburzeniem metabolicznym obserwowanym u chorych na astmę aspirynową jest zmniejszona produkcja lipoksyn - endogennych regulatorów stanu zapalnego, które hamują działanie czynników prozapalnych w tym CysLTs [93].

1.3 BIOSYNTeza LEUKOTRIENÓW

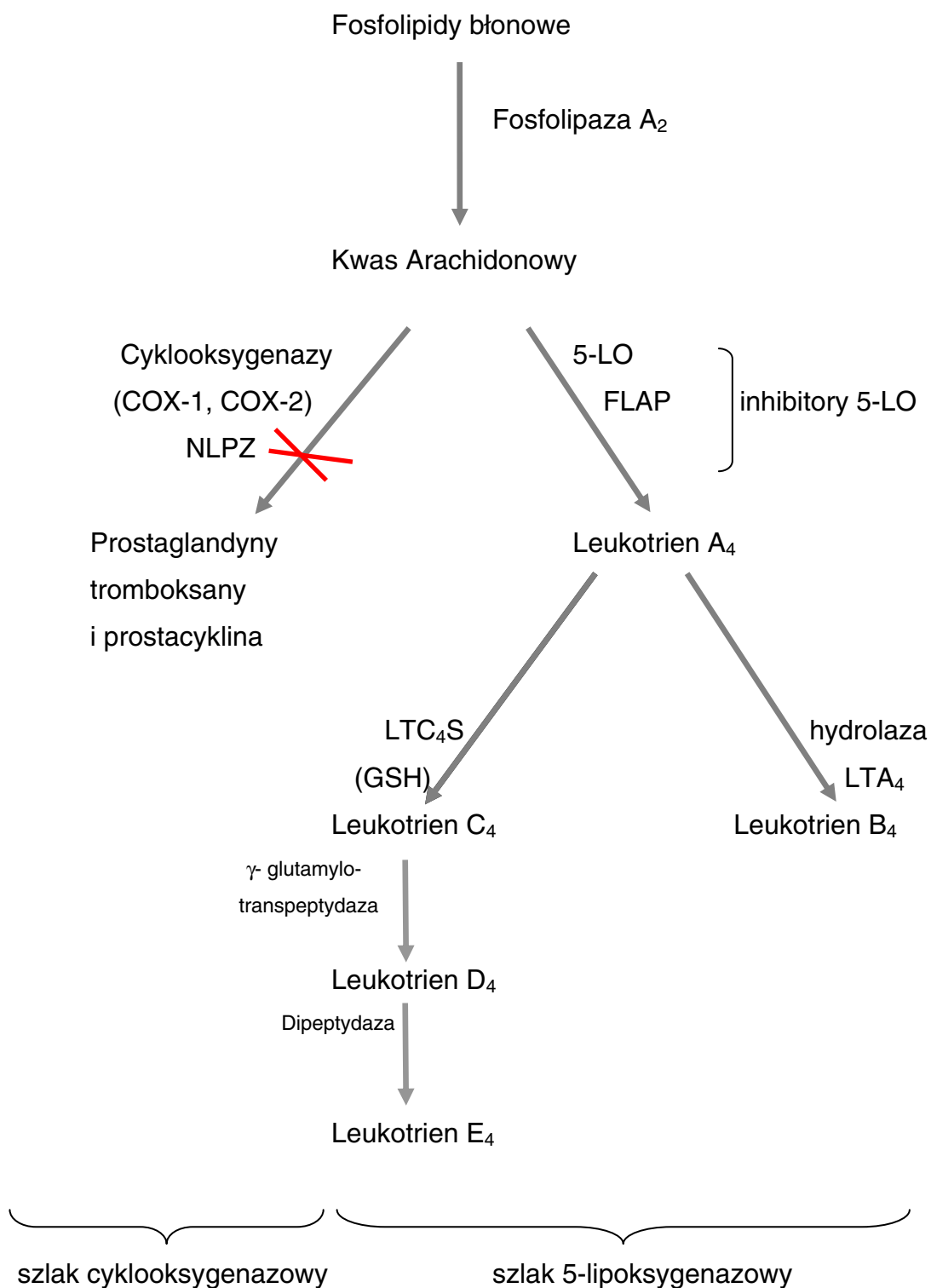
Leukotrieny są podstawowym składnikiem znanej od 1938 roku „wolno działającej substancji anafilaksji (SRS-A)” [8,47]. Współczesna nazwa „leukotrieny” wywodzi się od słowa leukocyt i potrójnego wiązania nienasyconego struktury chemicznej tych związków [23]. Leukotrieny produkowane są przede wszystkim przez komórki zapalne, takie jak: leukocyty, monocyty, makrofagi i komórki tuczne. Leukotrieny cysteinyłowe (LTC₄, LTD₄) są produkowane głównie przez eozynofile, bazofile i komórki

tuczne, podczas gdy leukotrien B₄ (LT B₄) jest syntetyzowany w neutrofilach i makrofagach [32,38].

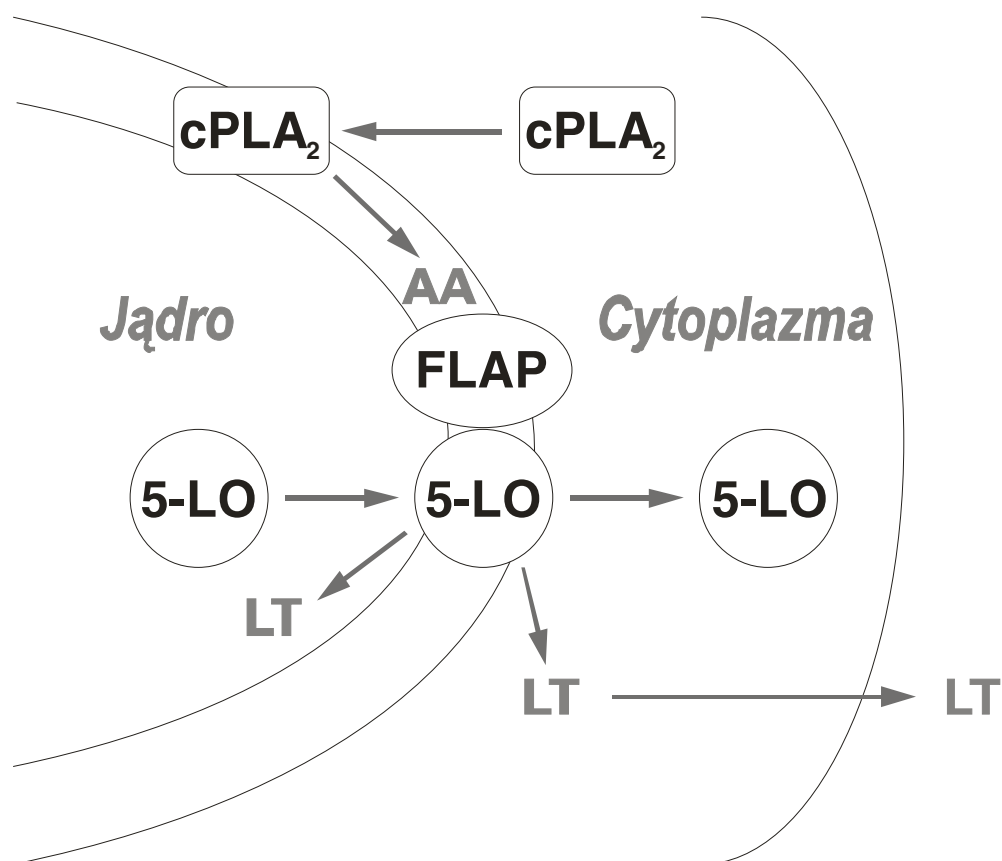
CysLTs są silnymi substancjami powodującymi skurcz oskrzeli, 100-1000 razy mocniejszymi niż histamina [126]. Są one odpowiedzialne za: skurcz mięśni gładkich, zwiększanie przepuszczalności naczyń włosowatych, nadmierne wydzielanie śluzu, nadreaktywność oskrzeli, napływ eozynofiliów do miejsca stanu zapalnego oraz przebudowę dróg oddechowych przez wzmaganie proliferacji fibroblastów, mięśni gładkich, komórek epitelialnych w płucach [2,19,21,27,38,46]. Leukotrieny są metabolitami kwasu arachidonowego (AA), będącego składnikiem fosfolipidów błon komórkowych. Enzym fosfolipaza A₂ (PLA₂), jest niezbędna do rozpoczęcia syntezy LTs polegającej na hydrolizie AA z błonowych fosfolipidów. PLA₂ jest enzymem o masie molekularnej 85 kDa, do którego aktywacji i translokacji w pobliże błon niezbędne są jony wapnia [38,82]. Wolny kwas arachidonowy wyłapywany jest przez białko FLAP (5-LO activating protein, 18 kDa, obecne w błonie jądrowej) i prezentowany enzymowi 5-lipoksygenazie (5-LO). 5-LO jest rozpuszczalnym monomerem o masie molekularnej 78 kDa. Do maksymalnej aktywności enzym ten potrzebuje jonów wapnia i ATP. 5-LO katalizują dwuetapową reakcję:

- 1) utleniania AA do niestabilnej formy 5-HPETE,
- 2) odwodnienia 5-HPETE.

Efektom tego jest powstanie niestabilnego leukotrienu A₄ (LTA₄). W zależności od rodzaju komórki, LTA₄ może być albo metabolizowany przy udziale hydrolazy LTA₄ do LTB₄, albo przy udziale syntazy leukotrienu C₄ (LTC₄S) sprzęgany z glutationem i przekształcany do LTC₄. Leukotrien C₄ jest transportowany do przestrzeni międzykomórkowej przy udziale białka P-glikoproteiny, kodowanej przez gen *MDR1* (multidrug resistance 1 protein) [16,32]. LTC₄ jest metabolizowany do równie aktywnego LTD₄ przez γ -glutamyl transpeptydazę, a następnie do LTE₄ przy udziale dipeptydazy. LTC₄ i LTD₄ mają krótki okres półtrwania, zaś LTE₄ jest najbardziej stabilną postacią LTs, z długim czasem półtrwania, ale najmniejszym powinowactwem do receptorów [2, 38, 67, 82] (Schemat 1,2).



Schemat 1. Kaskada przemian kwasu arachidonowego [126].

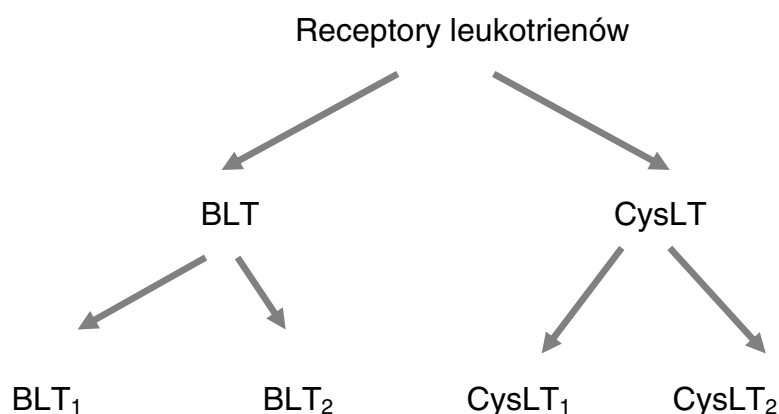


Schemat 2 Schemat przedstawiający miejsce lokalizacji kwasu arachidonowego i jego przemiany do leukotrienów w różnych częściach komórki [82].

Istnieją dwa rodzaje receptorów błonowych dla LTB₄ (LTB₁, LTB₂) różniących się powinowactwem i ekspresją komórkową. Receptor LTB₁ jest receptorem transbłonowym, 7-krotnie przechodzącym przez błonę komórkową i sprzężonym z białkami G, o masie molekularnej 43 kDa. Receptor ten obecny jest tylko na komórkach zapalnych (leukocyty) i ma duże powinowactwo do leukotrienu B₄. Jest on niezbędny do chemotaksji, mobilizacji wapnia oraz adhezji do komórek śródbłonna. LTB₂ jest niedawno odkrytym receptorem, ma podobną budowę do LTB₁ z tą różnicą, że występuje on w różnych tkankach, a nie tylko na leukocytach.

Leukotrieny cysteinylowe mają dwa receptory błonowe: CysLT₁ i CysLT₂. Tak jak receptory LTB₄, są one receptorami przezbłonowymi sprzężonymi z białkami G. CysLT₁ obecne są w śledzionie, leukocytach, makrofagach tkankowych, tkance płucnej i mięśniach gładkich. Ligandem dla nich jest przede wszystkim LTD₄, następnie LTC₄. Najstabilniej wiązany jest

LTE_4 ($LTD_4 > LTC_4 > LTE_4$). Gen kodujący ten receptor znajduje się na chromosomie X. $CysLT_2$ obecne są w dużej liczbie w sercu, mózgu, leukocytach, śledzionie, łożysku, zaś w małej liczbie w płucach. Receptor ten wiąże z podobnym powinowactwem LTD_4 i LTC_4 , a znacznie słabiej LTE_4 ($LTD_4 = LTC_4 \gg LTE_4$) [2,11,38] (Schemat 3).



Schemat 3 Rodzaje receptorów leukotrienowych [57].

1.4 SYNTAZA LEUKOTRIENU C_4

Syntaza leukotrienu C_4 jest specyficznym enzymem, należącym do rodziny *S*-transferaz glutationu, jednak różni ją od GST selektywność wobec substratu, lokalizacja mikrosomalna, niezdolność do wiązania ksenobiotyków, odmienna podatność na inhibitory oraz brak zdolności wiązania przeciwciał przeciwko znanym GSTs [6]. Badając lokalizację LTC_4S zauważono, że aktywna forma enzymu obecna jest w błonie otoczki jądrowej od strony cytoplazmy i w retikulum endoplazmatycznym, gdzie poziomy GSH (substratu dla LTC_4S) dochodzą nawet do 2-3 mM [16]. Najobfitszymi miejscami lokalizacji syntazy leukotrienu C_4 są błony komórkowe w płucach, homogenaty płytkowe i nerki [105].

Syntaza leukotrienu C_4 wraz z GST należy do dużej rodziny enzymów błonowych MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism), których większość jest zaangażowana w produkcję eikozanoidów i usuwanie z organizmu ksenobiotyków. MAPEG obecne są zarówno u prokariotów jak i u eukariotów. Istnieją 4 podgrupy MAPEG (I-IV)

spośród których wyróżniamy 6 ludzkich izoenzymów, klasyfikowanych w podgrupach I, II, IV. Są to: FLAP, syntaza leukotrienu C₄, mikrosomalna S-transferaza glutationu 1(MGST), MGST2, MGST3 i syntaza prostaglandyny E₂, dawniej znana jako MGST1-L1. Podgrupa III w całości składa się z MGST-LP (MGST- like protein) obecnych w roślinach, grzybach, bakteriach [6, 40,53] (Tabela 1).

Tabela 1 Tabela przedstawiająca podgrupy MAPEG.

PODGRUPY MAPEG			
I	II	III	IV
FLAP LTC ₄ S MGST2	MGST3	MGST-LP: -bakteri -roślin -grzybów	MGST1 PGES1

Syntaza leukotrienu C₄ jest białkiem integralnym błony o masie 18 kDa. Jest homodimerem peptydów zbudowanych z 150 aminokwasów [99]. Ma ona dwa miejsca fosforylacji przy udziale kinazy białkowej C (PKC) i w 31% podobna jest w swej budowie do białka FLAP. Gen kodujący LTC₄S znajduje się na ramieniu długim chromosomu 5 (5q35) [97,101] i składa się z 5 małych eksonów i 4 małych intronów. Region kontrolujący transkrypcję - promotor genu *LTC₄S* zawiera między innymi motywy SP-1, AP-1, AP-2 [6].

LTC₄S, będąc ostatnim enzymem w szlaku lipoksygenazowym produkującym CysLTs, odgrywa ważną rolę w kontroli produkcji leukotrienów. Ma to szczególne znaczenie u chorych na astmę nadwrażliwych na aspirynę, gdyż stwierdza się u nich nadprodukcję CysLTs. Dlatego też dużym zainteresowaniem cieszy się polimorfizm w rejonie promotorowym genu kodującego syntazę leukotrienu C₄. Polimorfizm ten zlokalizowany w pozycji -444 polega na zamianie adeniny na cytozynę (-444A>C) i może być związany ze szczególnym przebiegiem astmy, zwłaszcza jej postaci AIA [98]. W badaniach grupy chorych na astmę w Polsce zauważono większą częstość

występowania allelu C₋₄₄₄ u chorych wrażliwych na aspirynę [95,98,99]. Podobne badania przeprowadzono w Stanach Zjednoczonych, jednakże bez potwierdzenia asocjacji polimorfizmu -444A>C z AIA [121].

1.5 S-TRANSFERAZY GLUTATIONU

S-transferazy glutationu (GST-EC 2.5.1.18) należą do grupy enzymów sprzęgających substancje elektrofilne ze zredukowanym glutationem (GHS). Ich głównym zadaniem jest detoksyfikacja różnych ksenobiotyków w II fazie ich biotransformacji. GSH obecne są zarówno u ssaków jak i u bakterii, roślin, grzybów, owadów oraz robaków pasożytniczych w jelicie [79,106].

Znane są trzy izoformy GST. Dwie z nich wykazują duże podobieństwo i należą do nich formy mitochondrialne oraz cytoplazmatyczne GST. Trzecią izoformą jest mikrosomalna GST, która jest klasyfikowana do grupy MAPEG. Wszystkie te trzy grupy enzymów wykazują zdolność do sprzęgania GSH z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem. Ich główną rolą w organizmie jest metabolizowanie m.in. związków obecnych w zanieczyszczeniach powietrza, insektycydów, kancerogenów i reaktywnych produktów powstałych w wyniku działania „stresu tlenowego”, a także wielu leków. Wszystkie te związki są transportowane z komórek przy pomocy transportera kodowanego przez gen *MDR1*. Stąd też duże zainteresowanie GST w farmakologii i toksykologii [40,120].

Wyróżnia się 7 klas cytoplazmatycznych GSTs. Należą do nich Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega i Zeta (Tabela 2)[110]

Tabela 2 Tabela przedstawiająca poszczególne klasy cytoplazmatycznych izoform GST, ich lokalizację chromosomową i podklasy [90].

Klasy GST	Lokalizacja na chromosomie	Podklasy
Alfa	6p	A1-A5
Mu	1p13.3	M1-M5
Pi	11q13	P1
Theta	22q11.2	T1-T2
Zeta	14q	Z1
Sigma	4q	S1
Omega	10q	O1-O2

Wszystkie te klasy różnią się między sobą lokalizacją i powinowactwem do egzogennych substratów i oraz ksenobiotyków, zaś cechą je łączącą jest występowanie w cytoplazmie. Wykazano, że ekspresję GSTs można mierzyć w różnych tkankach ludzkich, zwłaszcza w osoczu, surowicy a także w moczu, a podwyższone ich aktywności mogą być związane z występowaniem wielu chorób. Podwyższone poziomy Alfa GST w moczu mogą świadczyć o uszkodzeniu nerek. Ogólny wzrost aktywności GST w osoczu może być związany z uszkodzeniem wątroby spowodowanym przez alkohol, paracetamol lub z ostrym albo przewlekłym zapaleniem wątroby [60,86].

Do mitochondrialnej klasy GST należy tylko jeden enzym – Kappa GST. Gen, który go koduje znajduje się na chromosomie 7 (7q35). Istnieje tylko jedna podklasa tego enzymu - GSTK1 [79]. U myszy GSTK1 obecny jest w mitochondriach wątroby, nerek, żołądka i serca. Ludzki GSTK1 obecny jest w mitochondriach różnorodnych tkanek. Zauważono, że Kappa GST obecny też jest w peroksosomach, co mogłoby tłumaczyć jego rolę w β -oksydacji kwasów tłuszczowych [40].

Mikrosomalna forma GST zawiera trzy klasy: MGST1, MGST2, MGST3. Geny je kodujące znajdują się odpowiednio na chromosomach: MGST1- 12p12.3-p12.1; MGST2- 4q28-q31; MGST3- 1q23 [79]. Mikrosomalne izoformy GST (zawłaszcza MGST2 i 3), oprócz tego że mogą przeprowadzać

detoksyfikacje egzogennych substratów, mogą także katalizować reakcję sprzęgania GSH z LTA₄ i brać udział w powstawaniu LTC₄. Miejscem występowania MGST są przede wszystkim mikrosomy wątroby oraz komórki śródbłónka [105].

Wśród cytoplazmatycznych klas GST istnieje wiele polimorfizmów, które mogą powodować zmianę lub utratę powinowactwa dla wybranych ksenobiotyków. Najważniejszymi polimorfizmami są te, które obecne są w klasie Mu, Pi i Theta. Mogą one być powiązane z występowaniem wielu chorób takich jak astma [1], POCHP [58], niektóre rodzaje nowotworów [102] czy reumatoidalne zapalenie stawów [72].

Enzym GSTP1 obficie występuje w komórkach nabłonkowych płuc oraz w nieorzęsonych komórkach oskrzelikowych (Clara cells), w których odpowiedzialny jest za detoksyfikację wielu ksenobiotyków [28,31]. Jego główną rolę w drogach oddechowych jest usuwanie reaktywnych form tlenu (ROS), powstałych w komórkach zapalnych, immunologicznych lub strukturalnych pod wpływem wielu bodźców. Takimi bodźcami mogą być mediatory lipidowe, chemokiny, białka ziarnistości eozynofilów, a także niektóre substancje znajdujące się w zanieczyszczonym powietrzu (np. ozon, spaliny) [44]. ROS mogą powodować powstawanie pośredników zapalnych (w tym także leukotrienów) oraz bezpośrednio utleniać kwas arachidonowy do izoprostanów, a za tym nasilać objawy stanu zapalnego w płucach [25]. Warto tutaj zaznaczyć, że ROS potrafią nasilać zapalenie przez aktywację niektórych kinaz sygnałowych (JNK, MAPK) lub aktywację czynników transkrypcyjnych (NF-kappaB, AP-1), co powoduje zachwianie równowagi pomiędzy ekspresją mediatorów pro- i antyzapalnych w płucach. Jak się okazuje substancje powstałe pod wpływem utleniania („stresu tlenowego”) mogą być ważnym czynnikiem w patogenezie astmy i POCHP [37,87]. Polimorfizm w obrębie genu *GSTP1* polegający na zamianie Ile w pozycji 105 łańcucha aminokwasowego na Val powoduje zmianę powinowactwa tego enzymu do substratów (np.ROS) [31]. Zauważono że allel protekcyjny ¹⁰⁵Val znacznie częściej występuje u ludzi zdrowych niż u chorych na astmę, zwłaszcza jeżeli brano pod uwagę atopię i nadreaktywność oskrzeli. Stąd wysunięto wniosek, że istnieje asocjacja pomiędzy polimorfizmem *GSTP1* a fenotypem astmy [31,39,89,108] oraz że gen kodujący enzym GSTP1 może być genem

zaangażowanym w rozwój astmy [66]. Homozygotyczność *GSTP1* Val/Val¹⁰⁵ może być ochronna w rozwoju nadreaktywności oskrzeli i astmy zawodowej spowodowanej ponad 10 letnią ekspozycją na diisocyjanian toluenu [71,81]

Mutacja w genie *GSTP1*, powodująca podstawienie 105 Ile →Val (313A>G), może też być powiązana z patogenezą przewlekłej obturacyjnej choroby płuc lub rozwojem rozedmy płuc. Homozygotyczność Ile/Ile¹⁰⁵ charakteryzuje mniejszą zdolność do biotransformacji ksenobiotyków kancerogennych obecnych w dymie tytoniowym i jest częstsza u ludzi chorych na POCHP [50]. Homozygoty Val/Val¹⁰⁵ posiadają większą zdolność do metabolizowania niektórych aromatycznych epoksydów, ale są bardziej narażone na ryzyko zachorowania na raka płuc [42,50,58,125]. Polimorfizm 313A>G *GSTP1* może być też powiązany z wystąpieniem raka piersi [24], płuc [109] a także pęcherza moczowego u palaczy [37,42].

Polimorfizm genu *GSTM1* typu delecyjnego null polega na usunięciu fragmentu genu, co powoduje brak powstawania jego produktu białkowego i brak aktywności enzymu. Polimorfizm ten, podobnie jak *GSTT1* null nie jest powiązany z rozwojem astmy, atopią czy nadreaktywnością oskrzeli [31]. Delecja genu *GSTM1* jest częstsza u chorych z ostrą postacią POCHP [14]. Zauważono także, że delecja ta jest częściej powiązana ze wzrostem zachorowania na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc w populacji białej (40-50%) [58].

S-transferaza glutationu Mu jest enzymem, który katalizuje reakcje eliminacji izotiocyanianu (rodanku) z organizmu. Związek ten w normalnych warunkach bardzo szybko ulega biotransformacji. Zauważono jednak, że u osób z zawodową ekspozycją, u których występuje delecja *GSTM1* null/null pojawia się efekt ochronny izotiocyanianu. Może to być związane z tym, że izotiocyanian hamuje kancerogenezę w płucach [4,65].

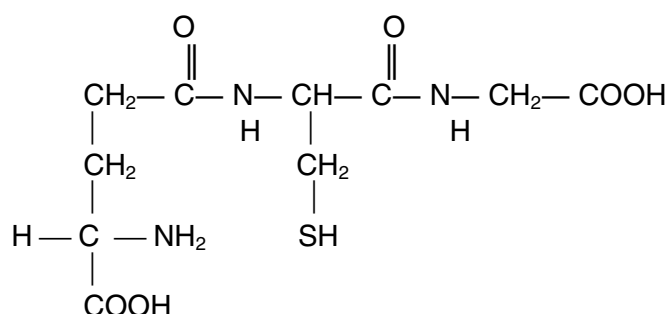
Delecja genu *GSTM1* null, zwłaszcza w powiązaniu z delecją *GSTT1* null i polimorfizmem *CYP1A1* może powodować wzrost ryzyka zachorowania na różne typy raka płuc u ludzi, którzy nałogowo palili tytoń [20,41,74,78] lub przebywali w najbardziej uprzemysłowionych regionach Polski (np.: Śląsk) [9]. Wśród kobiet, które nie paliły tytoniu, ale były narażone na działanie związków zawartych w dymie tytoniowym, można także zauważyć zależność między

delecją GSTM1 null/null a ryzykiem zachorowania na raka płuc [3]. Brak enzymu GSTM1 nie tylko może być związane z rozwojem raka płuc, może także być ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka skóry [43,109] i pęcherza moczowego [102]. Połączenie polimorfizmu S-transferazy glutationu Mu i Theta może być przyczyną wystąpienia wieńcowej choroby serca u palaczy [37]. Nie zauważono związku pomiędzy polimorfizmem GSTM1 i GSTT1 a występowaniem raka jajnika [18], a także raka piersi [33,64].

1.6 GLUTATION

Glutation (GSH) jest trójpeptydem zbudowanym z γ -glutamilo-cysteinylo-glicyny (H- γ -Glu-Cys-Gly-OH) (Rys 1). Występuje on w komórkach w bardzo wysokim stężeniu 0,5-10 mM. Do funkcji biologicznych, które spełnia GSH należą:

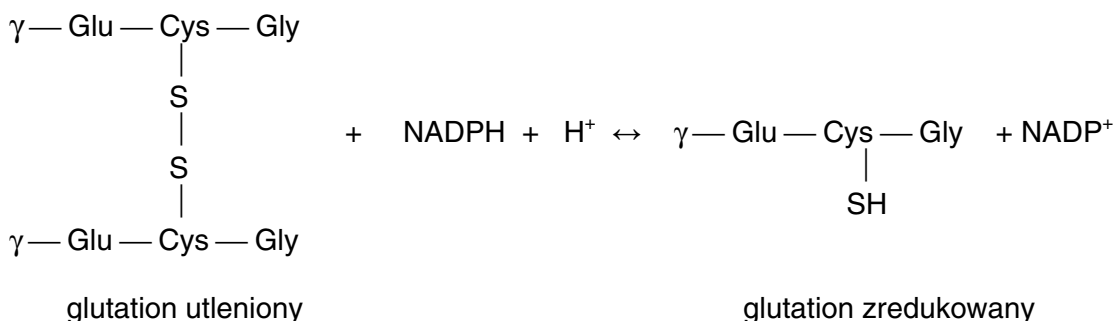
1. ochrona komórek przed uszkodzeniami pod wpływem utleniania,
2. transport aminokwasów i synteza białek, kwasów nukleinowych, leukotrienów i prostaglandyn,
3. regulacja aktywacji enzymów i odpowiedzi immunologicznej,
4. magazynowanie cysteiny,
5. zachowanie homeostazy komórkowej,
6. detoksyfikacja organizmu z jonów żelaza, toksyn, ksenobiotyków,
7. regulacja ekspresji genów [77, 88, 124].



Rysunek 1 Budowa chemiczna glutationu.

Utlenianie GSH prowadzi do powstania formy utlenionej GSSG albo dwusiarczku GSH (RSSG). Wszystkie trzy formy mogą istnieć w komórkach

jednocześnie, ale w normalnych warunkach istnieje przewaga formy zredukowanej GSH (90%) nad utlenioną (GSSG i RSSG po 5%).



Rysunek 2 Przemiany glutationu.

GSH w komórce występuje najobficiej w cytoplazmie i mitochondriach, ale można go też stwierdzić w płynach ustrojowych takich jak osocze, żółć, popłuczyny oskrzelikowo-płucne (BALF). U szczurów najwyższe stężenia tkankowe GSH wykazano w wątrobie, mózgu, nerkach, sercu [88] a także w płucach, zwłaszcza w nieorzęzionych komórkach oskrzelikowych (Clara cells). Występowanie tak obfite w płucach i wątrobie może być związane z główną rolą jaką pełni GSH, czyli z detoksyfikacją komórek z ksenobiotyków [84,127].

W komórce GSH powstaje na drodze tzw. „cyklu γ -glutamylowego”. Jest on dwuetapowy i do jego przeprowadzenia niezbędna jest odpowiednia ilość ATP. Pierwszy etap wymaga obecności enzymu syntazy gamma-glutamyl-cysteiny (zwanego też ligazą glutaminiano-cysteinową). W drugim etapie reakcji bierze udział syntaza glutationu, która dołącza glicynę do powstałej w pierwszym etapie γ -glutamyl-cysteiny. Substratami potrzebnymi w tych reakcjach są: L-glutaminian, L-cysteina i glicyna. Reakcje te zachodzą w cytoplazmie [124]. GSH może być produkowany przez makrofagi, limfocyty, fibroblasty oraz komórki nabłonków do przestrzeni pozakomórkowej dzięki transportowi aktywnemu. Stężenia GSH w osoczu są jednak znacznie niższe od poziomów komórkowych, nie mniej jednak zdarza się, że komórki czerpią glutation z osocza zwłaszcza gdy jego stężenie w cytoplazmie znacznie się obniży. Bardzo często ma to miejsce w płucach, gdzie braki GSH w komórkach, wykorzystanego do detoksyfikacji ksenobiotyku, są uzupełniane

przez GSH transportowany aktywnie z osocza. Należy jednak pamiętać, że okres półtrwania glutationu w osoczu jest bardzo krótki i wynosi około 1,6 min.[88]. Pomimo tego, że glutation powstaje w cytoplazmie komórki, jego biodegradacja odbywa się w przestrzeni międzykomórkowej. Glutation jest katabolizowany przez enzymy:

- a) γ -glutamylotranspeptydazę, który rozkłada GSH do cysteinyl-glicyny i glutaminianu,
- b) dipeptydazę, który przeprowadza reakcję rozpadu cysteinyl-glicyny do glicyny i cysteiny.

Wszystkie te produkty mogą być ponownie absorbowane do wnętrza komórki i mogą posłużyć do produkcji nowych cząsteczek glutationu [124]. W komórkach zawsze istnieje bilans pomiędzy produkcją a zużyciem GSH.

Regulacja biosyntezy glutationu odbywa się na poziomie enzymu syntazy gamma-glutamyl-cysteiny, biorącego udział w powstawaniu GSH. Region promotorowy tego enzymu bogaty jest w elementy *cis*-regulatorowe, miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych Sp-1, TRE, AP-2, NF κ B, EpRE (electrophile response element) często zwanego ARE (antioxidant response element). Synteza GSH może być regulowana przez wiele substancji. Jedną z substancji, która pobudza komórki do produkcji GSH jest 4HNE (4-hydroxynonenal). Jest to reaktywny aldehyd, który w warunkach fizjologicznych produkowany jest w odpowiedzi na zakażenie i różne substancje zware w zanieczyszczonym powietrzu (np.: ozon, NO₂). Stymulacja komórek do produkcji GSH przez 4HNE odbywa się poprzez aktywację ścieżki kinaz Janusa (JNK), a co za tym idzie powstanie czynnika transkrypcyjnego AP-1 wskutek fosforylacji białek rodziny Jun: c-Jun i JunB. Powstały AP-1 wiąże się do elementów TRE w rejonie paromotorowym enzymu niezbędnego do produkcji GSH. Fosforylowane białka Jun mogą także powodować powstawanie czynnika transkrypcyjnego działającego na wspomniany element EpER przy udziale innych białek [22].

1.7 GEN OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ *MDR1* (MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN 1)

MDR1 (*ABCB1*) jest genem kodującym białko P-glikoproteinę (PGP). Białko to należy do superrodziny transporterów błonowych ABC, ATP-zależnych. U ludzi jest około 48 rodzajów takich transporterów [104]. Mogą być one obecne zarówno w błonie komórkowej jak i w błonach wewnątrzkomórkowych. Główną rolą ABC transporterów jest przenoszenie różnych substancji, którymi mogą być: jony, cukry, aminokwasy, glikany, peptydy, proteiny, fosfolipidy, różne toksyny, a także leki.

Istnieje 7 podrodzin ABC transporterów:

- a) ABC1 (12 przedstawicieli),
- b) MDR/TAP (11 przedstawicieli),
- c) MRP/CFTR (12 przedstawicieli),
- d) ALD (4 przedstawicieli),
- e) OABP (1 przedstawiciel),
- f) GCN20 (3 przedstawicieli),
- g) White (1 przedstawiciel).

Okazuje się, że u ludzi najwięcej białek należy do podrodzin MDR/TAP oraz MRP/CFTR, których głównym zadaniem jest transport ksenobiotyków. Dlatego też z dużym zainteresowaniem bada się produkt genu *MDR1* P-glikoproteinę (PGP). Jej główna funkcja polega na ochronie komórek przed potencjalnie toksycznymi substancjami, które obecne są np. w pożywieniu [104]. Okazuje się, że razem z enzymami metabolizującymi ksenobiotyki (np.: cytochrom P450 3A4, CYP3A4), PGP jest jednym z ważniejszych mechanizmów ochronnych przeciwko potencjalnie toksycznym składnikom pożywienia.

P-glikoproteina działa poprzez:

- a) ograniczanie wchłaniania do organizmu leków przyjmowanych drogą pokarmową,
- b) eliminację leków z krwi do żółci i moczu,
- c) ograniczenie penetracji leku znajdującego się w krążeniu do mózgu, jąder, limfocytów oraz przez łożysko do płodu [29].

Produkt genu *MDR1* obecny jest w wielu tkankach, w tym w:

- a) jelicie cienkim, grubym
- b) nerkach,
- c) makrofagach, komórkach dendrytycznych, limfocytach T i B, PBMC,
- d) nadnerczach,
- e) wątrobie,
- f) komórkach śródbłonna naczyń włosowatych mózgu, jąder i łożyska [51,59,75,118].

Substratami P-glikoproteiny mogą być: leki nasercowe (digoksyny), inhibitory proteaz HIV, leki przeciwnowotworowe, immunosupresyjne (np. cyklosporyna), antagoniści β -adrenoceptora oraz antybiotyki. PGP pierwszy raz została opisana w komórkach nowotworowych, które wykazywały oporność na działanie wielu leków przeciwnowotworowych - oporność wielolekową - w związku z jej dużą ekspresją.

Gen kodujący P-glikoproteinę (*MDR1*) znajduje się na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21). Składa się on z 28 eksonów i koduje polipeptyd wielkości 1280 aminokwasów i masy około 170 kDa. Przechodzi on przez błonę siedmiokrotnie oraz ma miejsca wiązania ATP [49]. Większość mutacji występujących w genie *MDR1* dotyczy głównie domen błonowych 5,6,11,12, czyli tych które są odpowiedzialne za specyfikę substratową [104]. Znanych jest też wiele polimorfizmów genu kodującego P-glikoproteinę. Spośród nich tylko ten w pozycji 3435 łańcucha nukleotydowego, polegający na zamianie cytozyny na tyminę, jest wiązany ze zmniejszoną ekspresją P- glikoproteiny. Polimorfizm 3435C>T w eksonie 26 jest mutacją synonimiczną, nie powodującą zamiany izoleucyny w pozycji 1145 łańcucha aminokwasowego.

Opisano różnice etniczne częstości występowania alleli polimorfizmu *MDR1* 3435 C>T. U Europejczyków i białych mieszkańców Ameryki częstość alleli C i T jest podobna (około 50%). U ludności Afrykańskiej allel T występuje rzadziej niż 6%. Genotyp TT związany jest ze zmniejszoną ekspresją P-glikoproteiny, zaś CC związany jest ze zwiększoną jej ekspresją. Częstsze występowanie wariantu 3435CC u ludności Afrykańskiej usiłuje się wiązać z tym, że ludność ta jest narażona na częstsze występowanie zakażeń jelitowych wywołanych bakteriami i wirusami. Jak się okazuje, osoby będące

homozygotami CC skuteczniej eliminują substancje, które mogą nasilać objawy zatrucia pokarmowego [49,104]. Zauważono także, że istnieje związek pomiędzy występowaniem polimorfizmu 3435 C>T, a stężeniem w surowicy leku digoksyny. Okazuje się, że osoby o genotypie CC mające większą ekspresję P-glikoproteiny, osiągają mniejsze stężenie leku w surowicy. U homozygot TT ekspresja PGP w nabłonku jelit jest obniżona, a stężenie leku w surowicy wzrasta [48,123].

Polimorfizm *MDR1* 3435 C>T może być powiązany z występowaniem niektórych chorób, takich jak:

- a) rak jelita grubego,
- b) ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci,
- c) stany zapalne jelita grubego,
- d) rak nerki,
- e) padaczka lekooporna,
- f) HIV,
- g) choroba Parkinsona [29,30,45,59].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Kliniczne testy prowokacyjne mające na celu ustalenie czy chory cierpi na astmę z nadwrażliwością na aspirynę (AIA), czy też dobrze toleruje niesteroidowe leki przeciwzapalne (ATA) nadal nie są wykonywane w wielu ośrodkach. Przeprowadzanie prób aspirynowych u chorych na astmę wymaga dobrego zaplecza medycznego i jest czasochłonne. Dlatego ciągle są poszukiwane markery biochemiczne, dzięki którym rozpoznanie AIA możliwe byłoby na podstawie badania laboratoryjnego.

Wiadomo, że chorzy na AIA produkują znacznie więcej leukotrienów cysteinylowych. Dlatego też w celu różnicowania astmy, a także dla oszacowania zdolności do ich biosyntezy, może posłużyć metoda pomiaru stężeń leukotrienów cysteinylowych produkowanych przez izolowane leukocyty z krwi obwodowej pacjentów. Zależy ona zapewne od czynników warunkowanych genetycznie – polimorfizmów, oraz od dostępności substratów – kwasu arachidonowego i glutationu. Wśród genów, szczególnie atrakcyjne wydają się te wiązane funkcjonalnie z podatnością na astmę oskrzelową.

Celem pracy było :

1. Ustalenie częstości występowania wybranych wariantów allelicznych dla genów kodujących:
 - a) S- transferazę glutationu (GST) P1 i M1,
 - b) P-glikoproteinę 1 (transporter odpowiadający za wielolekową oporność - *MDR1*),
 - c) syntazę leukotrienu C₄u chorych na astmę oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POCHP) i u osób zdrowych, oraz zbadanie czy polimorfizmy te znajdują się w równowadze genetycznej.

2. Porównanie częstości występowania funkcjonalnych wariantów ¹⁰⁵ Val dla *GSTP1* i null dla *GSTM1* u chorych na astmę tolerujących aspirynę (ATA), wrażliwych na aspirynę (AIA) oraz u chorych na POCHP.
3. Zbadanie korelacji polimorfizmów *GSTP1*, *GSTM1* z atopią i parametrami czynności płuc.
4. Zbadanie wpływu polimorfizmów *GSTP1*, *GSTM1*, *MDR1* i *LTC₄S* na biosyntezę leukotrienów cysteinylowych (LTC₄, LTE₄) u chorych na astmę oskrzelową, w modelu aktywowanych leukocytów izolowanych z krwi obwodowej.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 OSOBY BADANE

3.1.1 GRUPA CHORYCH

W badaniach wzięło udział 665 chorych, w tym 113 chorych na astmę aspirynową (AIA), 286 chorych na astmę dobrze tolerujących aspirynę (ATA), 56 osób chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POCHP) oraz 210 osób zdrowych. Przedział wiekowy u chorych na astmę wynosił 17-81 lat, u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc wynosił 44-83 lata. W grupie AIA było 76 kobiet i 37 mężczyzn, w grupie ATA było 184 kobiet i 102 mężczyzn, zaś w grupie POCHP była znaczna przewaga mężczyzn 49 do 7 kobiet. Wszyscy pacjenci którzy brali udział w badaniu znajdowali się pod stałą opieką ambulatoryjną II Katedry Chorób Wewnętrznych w Krakowie (Tabela 3)

3.1.2 GRUPA KONTROLNA

Grupę kontrolną stanowiło 210 osób w przedziale wiekowym od 17-82 lat. Część kontroli stanowili zdrowi ochotnicy rekrutowani spośród pracowników II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ w Krakowie. Dodatkowo do kontroli włączono próbę populacyjną losowo wybranych mężczyzn i kobiet dzielnic: II, V, IX, XI i XIII miasta Krakowa. Grupę kontrolną stanowiło 107 kobiet i 103 mężczyzn (Tabela 3).

Badanie przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (nr KBET/365/B/2003).

Tabela 3 Charakterystyka chorych biorących udział w pierwszym etapie badań.

	ASTMA			POCHP	KONT
		AIA	ATA		
Wiek (lat)*	46,2±14,1	46,7±11,6	46,5±14,6	66,7±10,7	49,4±17,81
Płeć K/M	260/139	76/37	184/102	7/49	107/103
IgE całkowite w surowicy (UI/ml)*	178,8±216,5	136,27±180,44	201±230,5	—	81,4±153,4
Polimorfizm <i>GSTP1</i> (n zbadanych osób)	399	113	286	56	210
Polimorfizm <i>GSTM1</i> (n zbadanych osób)	399	113	286	56	210
Polimorfizm <i>MDR1</i> (n zbadanych osób)	194	96	98	—	100

*Wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD).

3.2 METODYKA

3.2.1 PLAN BADAŃ

Badania były przeprowadzane w dwóch etapach.

Pierwszy etap polegał na zebraniu grupy 665 osób, w tym chorych na astmę (AIA) i (ATA), przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POCHP) oraz zdrowej kontroli. Osoby te poddano diagnostyce molekularnej polegającej na genotypowaniu poszczególnych polimorfizmów. Dla całej grupy były to analizy genotypowania genów *GSTP1* i *GSTM1*. Dodatkowo u 304 osób (100 osób kontroli, 96 ATA i 98 AIA) przeprowadzono analizę genotypowania genu *MDR1* (Tabela 3).

Drugi etap polegał na tym, że na podstawie genotypowania *GSTP1* wylosowano z poszczególnych grup łącznie 74 osoby o genotypach *GSTP1*

AA, AG, GG. Osobom tym pobierano krew i przeprowadzono eksperymenty mające na celu pomiar produkcji leukotrienów cysteinylowych (LTC_4 i LTE_4 w pg/mL) w zawiesinie leukocytów krwi obwodowej. Produkcja CysLTs mierzona była w nadsączach metodą ELISA. Dodatkowo, w celu weryfikacji tych związków w mierzonych immunoenzymatycznie próbkach, u części osób sprawdzono rzeczywistą obecność leukotrienów C_4 , D_4 i E_4 w nadsączach hodowlanych przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS). W przypadkach tych oznaczono również poziom glutationu (GSH) w nadsączach hodowlanych (u niektórych pacjentów także w surowicy) metodą HPLC. U 103 osób, w tym u wszystkich pacjentów badanych w drugim etapie, przeprowadzono genotypowanie w kierunku polimorfizmu genu kodującego syntazę leukotrienu C_4 (LTC_4S) w celu sprawdzenia jej ewentualnego wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych.

Wszyscy badani w dniu pobrania krwi do izolacji leukocytów mieli wykonaną spirometrię oraz oznaczoną morfologię krwi wraz z obrazem odsetkowym krwinek białych a także zbadany poziom IgE. Chorzy na astmę (ATA, AIA) mieli wykonane wcześniej udokumentowane testy w kierunku rozpoznania astmy, obejmujące punktowe testy skórne z pospolitymi aeroalergenami, w przypadku AIA mieli także wykonane doustne lub wziewne próby prowokacyjne z kwasem acetylosalicylowym. (Tabela 4).

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna osób biorących udział w drugiej części badań (stymulacja leukocytów krwi obwodowej *in vitro*).

	ASTMA			KONT
		AIA	ATA	
Wiek*	46,8±10,9	48±10,1	46±11,3	38,3±10,1
Płeć K/M	34/11	7/3	27/8	18/11
IgE całkowite w surowicy (UI/ml)*	226±306,2	185,7±247,7	237,3±328,2	93,7±174,1
FEV1 akt %*	88,9±20,1	82,5±19,8	90,8±20,3	103,3±14,3
Atopia Tak/Nie	24/11	6/2	18/9	—
Dawka steroidów wziewnych*	861,1±262,5	937,5±176,7	828,98±289,3	—
Dawka steroidów doustnych*	8,3±18,6	2,9±5,6	10,1±20,6	—
Polimorfizm <i>LTC4S</i> (n przebadanych osób)	74	39	35	29
Poziomy CysLTs (n przebadanych osób)	45	10	35	29
Stężenie GSH (n przebadanych osób)	35	5	30	23

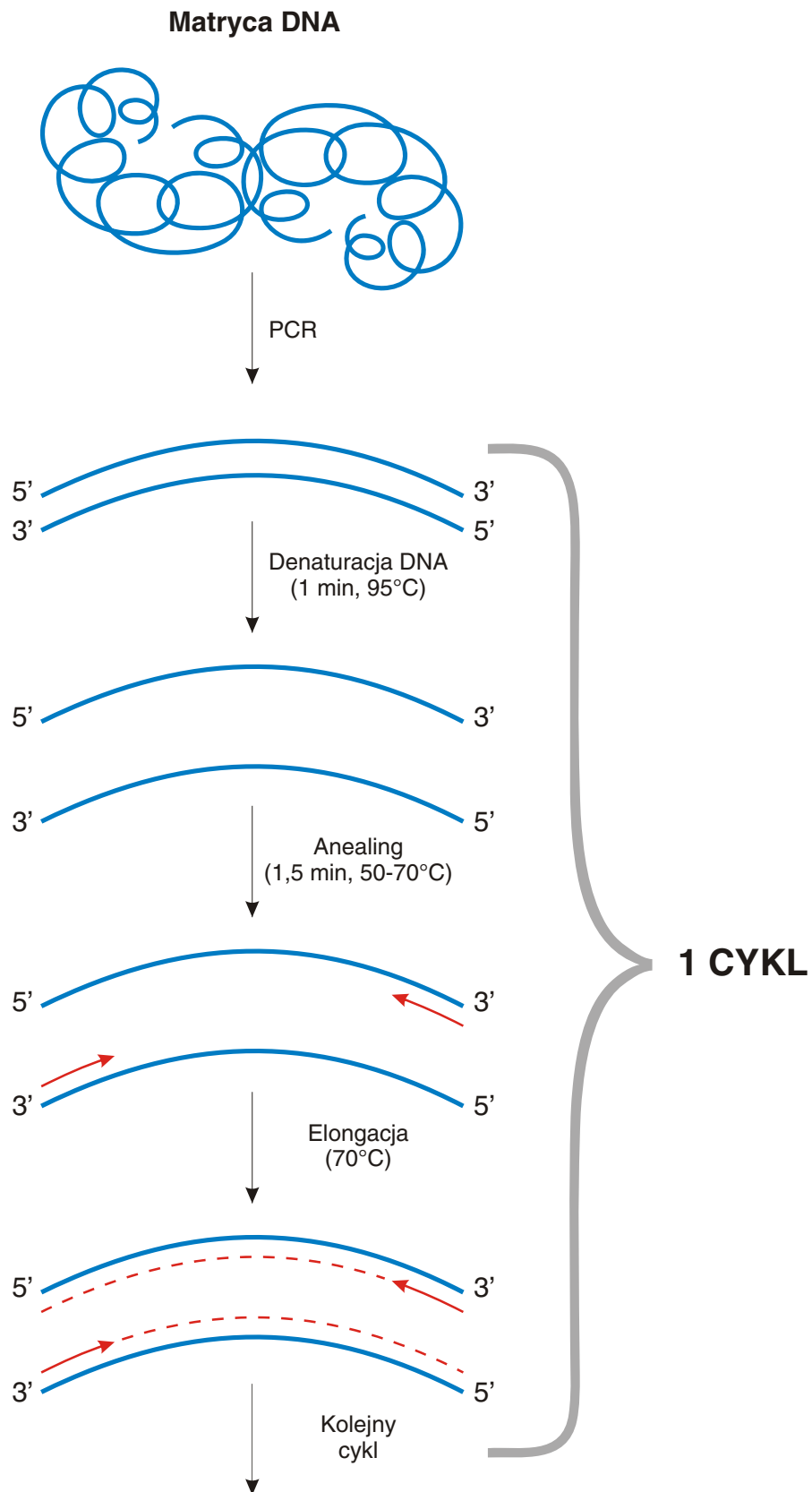
*Wartości średnie ± odchylenie standardowe.

3.2.2 IZOLACJA DNA ORAZ REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY

Krew obwodową osób chorych jaki i kontroli pobierano do probówek zawierających jako antykoagulant EDTA (NA₂EDTA). DNA izolowano z krwinek białych metodą Chomczyński i Sacchi (DNAzol, Gibco BRL). Do

pełnej krwi pacjentów dodawano 1/100 objętości 6% dekstranu w celu sedimentacji leukocytów i odstawiano w temperaturze 4°C na około 1 godzinę. Po tym czasie zbierano bogatokomórkowy nadsącz i wirowano przez 10 min/2000 rpm. Następnie zlewano nadsącz a osad komórek zalewano 0,4 ml DNAzolu zawierającego roztwór lizujący - izotiocyanian guanidyny. Całość intensywnie wstrząsano. Po upłynięciu komórek, DNA wytrącano 95% alkoholem etylowym dodawanym w objętości 0,2 ml. Wyizolowane DNA płukano kilkakrotnie w objętości 0,5 ml 75% alkoholu etylowego i suszono w cieplarni w 37°C przez około 30 min. Po wysuszeniu, DNA rozpuszczano 350µl wody redestylowanej. Genomowe DNA przechowywano w temperaturze -20°C – w celu przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

PCR jest metodą enzymatyczną *in vitro*, służącą do powielania krótkich fragmentów DNA. Swoistość tej reakcji polega na użyciu specyficznych starterów (primerów) oligonukleotydowych, które hybrydują z komplementarnymi sekwencjami na przeciwnych niciach matrycy DNA. Dają one początek syntezie wybranego fragmentu docelowego. Każdy cykl reakcji PCR składa się z kilku etapów. Pierwszym jest denaturacja wstępna próbki DNA w temperaturze 90-96°C, co daje możliwość rozdzielenia się podwójnej nici DNA. Następnym etapem jest hybrydyzacja (*ang. annealing*), podczas której startery wiążą się z DNA w temperaturze 42-68°C. Elongacja w temperaturze 72°C prowadzi do kopiowania nici DNA przez termostabilną polimerazę. Powtarzane cykle denaturacji, hybrydyzacji i elongacji namnażają ostateczny produkt amplifikacji w postępie geometrycznym. Po około 30–40 cyklach można otrzymać nawet około miliarda kopii DNA. (Rys 1). Produkty amplifikacji wykrywa się, metodą elektroforezy w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, który wnika w cząsteczki DNA. W świetle UV rejestruje się sygnały w postaci fluoryzujących prążków w odpowiedniej odległości od linii startu elektroforezy, przy zachowanej proporcji między dystansem migracji a ilością par zasad fragmentu.



Rysunek 3 Schemat reakcji PCR. Czerwone strzałki oznaczają kierunek przyłączania się starterów.

3.2.3 DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA – METODYKA GENOTYPOWANIA POSZCZEGÓLNYCH POLIMORFIZMÓW

3.2.3.1 ANALIZA POLIMORFIZMU 313 A>G GENU *GSTP1*

DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej było podawane amplifikacji metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Polimorfizm 313 A>G wykrywano ograniczając fragment genu odpowiednio zaprojektowanymi starterami. Primery projektowane były na podstawie opublikowanej sekwencji genu *GSTP1* (GenBank M24485), przy użyciu programu Oligo wersja 5.0. Do badań używano starterów o sekwencji GSTP1 5: 5'-CCT GGG CTC TAT GGG AAG GAC, GSTP1 3: 3'- CAA GCC ACC TGA GGG GTA AG. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze (T3 thermocycler, Biometra) w poniższym profilu termicznym:

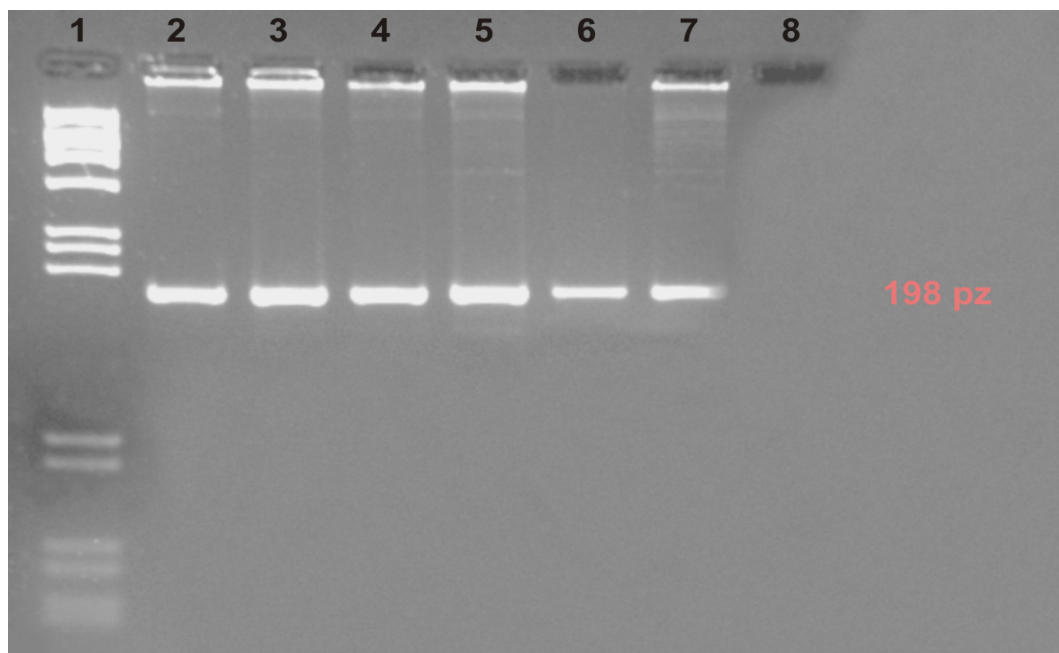
denaturacja wstępna	94°C 5min	} 30 cykli
denaturacja	94°C 1 min	
annealing	63°C 1 min	
elongacja	72°C 1 min	
elongacja końcowa	72°C 5 min	

Mieszanina PCR była przygotowywana w objętości 20 µl i zawierała:

- 10 mM Tris-HCl
- 50 mM KCl
- 2,5 mM MgCl₂
- 50 ng każdego startera (*GSTP1* 5, *GSTP1* 3)
- 0,2 mM każdego z nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,55 j. polimerazy DNA
- 0,1 µg genomowego DNA

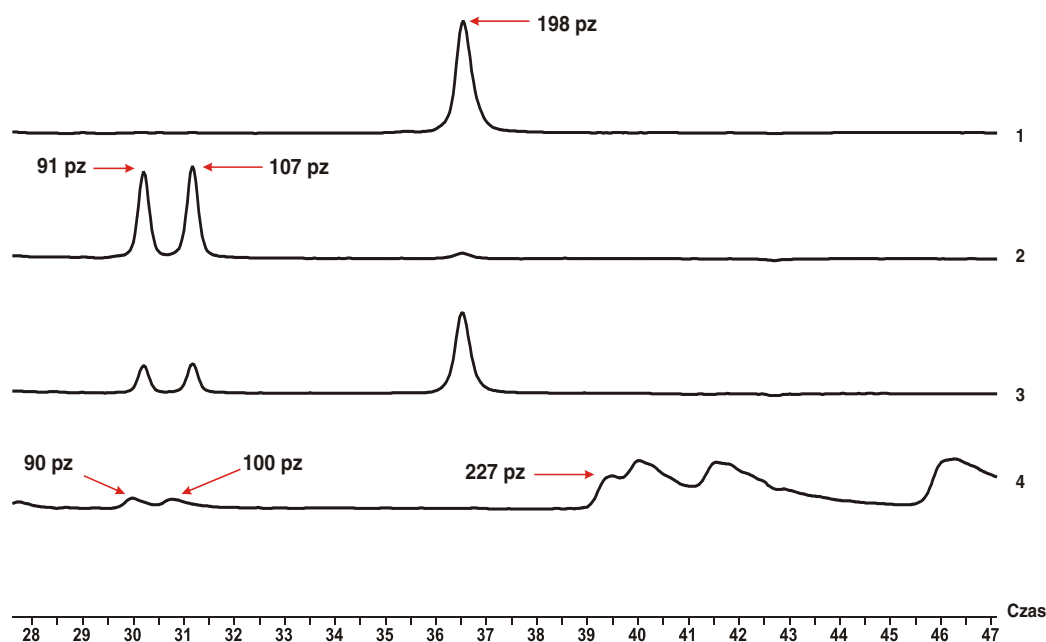
Produkty amplifikacji o długości 198 par zasad (Fotografia 1), trawiono enzymem restrykcyjnym *A*/w26I. Tranzycję A→G w pozycji 313 nukleotydu sekwencji cDNA, wykrywano na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Sekwencja nukleotydów rozpoznawana przez enzym to: GTCTC(N)1/5↓. Produktu amplifikacji (6 µl) inkubowano z 2,5 jednostki

enzymu *A/w26I* przez kilkanaście godzin w 37°C. Produkty trawienia rozdzielano na 6% żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem zautomatyzowanej elektroforezy i laserowo wzbudzonej fluorescencji (ALFexpress DNA Sequencer, Pharmacia Biotech). Do produktów trawienia dodawano barwnika fluorescencyjnego YOYO-3 o spektrum absorpcji 612 nm, emisji 631 nm i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny. Barwnik YOYO-3 ma zdolność wiązania się z nukleotydami cząsteczki dwuniciowego DNA (interkalacji). Wiązka lasera (helowo-neonowa $\lambda=608$ nm) wzbudzała świecenie barwnika YOYO-3. Emitowane światło było rejestrowane przez fotodetektory, wzmacniane i przesyłane do komputera, w którym zainstalowano oprogramowanie Alfin i Allelelinks pracujące w środowisku Microsoft Windows. Intensywność fluorescencji była wizualizowana w postaci krzywej fluorymetrycznej. Homozygoty dzikie o genotypie 313 AA charakteryzowały się obecnością jednego prążka o długości 198 par zasad. Homozygoty zmutowane o genotypie 313 GG posiadały dwa prążki o długościach: 107, 91 par zasad. W przypadku heterozygot AG powstają trzy prążki o długościach: 91,107,198 par zasad (Fluorogram 1).



Fotografia 1 Elektroforeza produktów amplifikacji 313 A>G genu *GSTP1* na żelu agarozowym.

Linia 1 - marker długości pBR322 DNA/*A*/*ul*,
Linia 2-7 – produkty amplifikacji o długości 198 par zasad,
Linia 8 – kontrola ujemna – brak DNA matrycowego



Fluorogram 1 Analiza RFLP 313 A>G dla genu *GSTP1*. Produkty PCR o długości 198 par zasad trawiono enzymem *A/w26I* i rozdzielano na 6% żelu poliakrylamidowym.

- Linia 1 – homozygota o genotypie 313AA, obecny 1 fragment restrykcyjny o długości 198 par zasad.
- Linia 2 – homozygota o genotypie 313GG, obecne dwa fragmenty restrykcyjne o długościach 91,107 par zasad.
- Linia 3 – heterozygota o genotypie 313AG, obecne 3 fragmenty restrykcyjne o długościach 91,107,198 par zasad.
- Linia 4 - marker długości pBR322 DNA/*AluI*

3.2.3.2 ANALIZA POLIMORFIZMU DELECyjNEGO GENU *GSTM1*

Polimorfizm w obrębie genu *GSTM1* polega na delecji fragmentu genu o długości 230 par zasad. Ponieważ delecja fragmentu uniemożliwia jego amplifikację, co może mieć miejsce także z innego powodu, degradacji DNA genomowego, dlatego też w celu wiarygodnej identyfikacji delecji lub normy stosowano standard podlegający równoczesnej amplifikacji fragmentu genu *GSTM4* o długości 158 par zasad. Obecność tego prążka dowodziła poprawności wykonania reakcji amplifikacji i służyła za kontrolę przy odczycie homozygotycznej delecji w genie *GSTM1*. Startery do wykrywania

polimorfizmu w obrębie genu *GSTM1*, jak i pozytywnej weryfikacji poprawności genotypowania zaczerpnięto z publikacji [10] i częściowo zmodyfikowano (Rys. 2). Były to: *GSTM1* 5 (P1): 5'- CGC CAT CTT GTG CTA CAT TGG CCG; *GSTM1* 3 (P3): 3'- TTC TTG ATT GTA GCA GAT CA. Starter antysensowny, specyficzny dla fragmentu genu *GSTM4* zaprojektowany został na podstawie opublikowanej sekwencji genu *GSTM4* (GenBank X68677) i miał sekwencję (P2); 3'- ATC TTC TCC TCT TCT GTC TC, natomiast starterem sensownym był P1, który był wspólny dla obu genów. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze przy poniższym profilu termicznym:

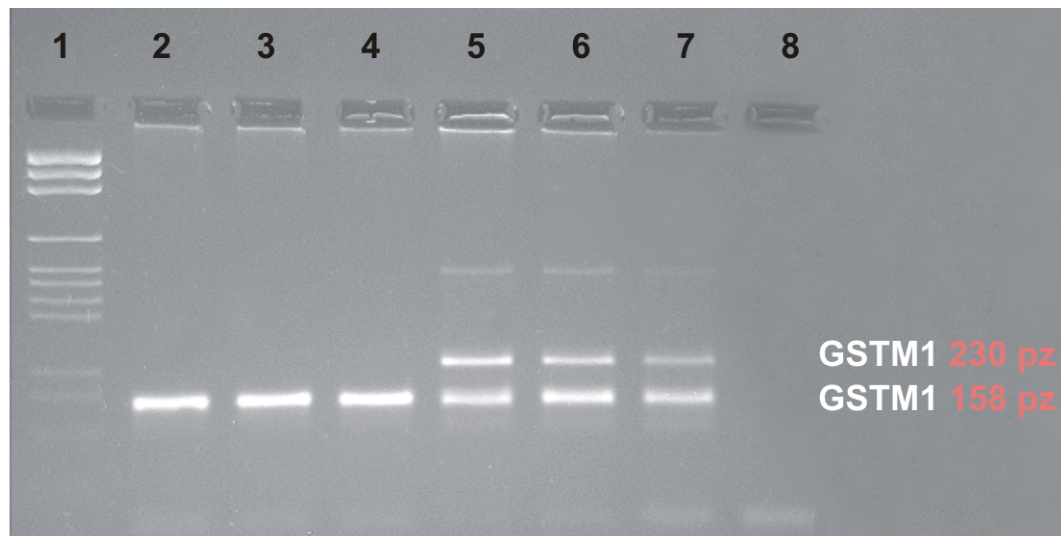
denaturacja wstępna	94°C 5min	
denaturacja	94°C 1 min	} 34 cykle
annealing	58°C 30 sek.	
elongacja	72°C 1 min	
elongacja końcowa	72°C 10 min	

Mieszanina PCR była przygotowywana w objętości 25 µl i zawierała:

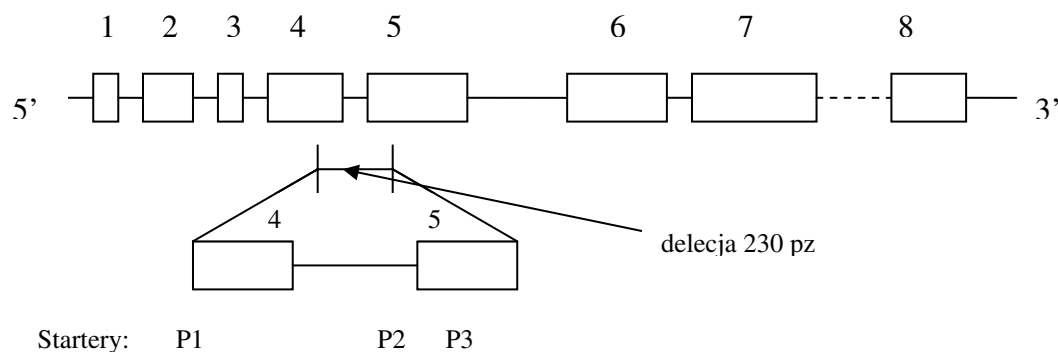
- 10 mM Tris-HCl
- 50 mM KCl
- 2,5 mM MgCl₂
- 50 ng każdego primera (P1, P2, P3)
- 0,2 mM każdego z nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,55 j. polimerazy DNA
- 0,1 µg genomowego DNA

Produkty amplifikacji były bezpośrednio analizowane techniką elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Wykrywano świecące prążki DNA w świetle lampy UV transiluminatora, sprzężonego z kamerą fotograficzną, drukarką i komputerem. W środowisku Microsoft Windows posłużono się oprogramowaniem do wizualizacji i dokumentacji elektroforezy na żelach agarozowych (ImagerMaster VDS-Pharmacia Biotech). Osoby mające przynajmniej jeden allel bez delecji (typ dziki), charakteryzuje obecność obu produktów amplifikacji: *GSTM1* 230 par zasad i *GSTM4* 158 par zasad. Przy zastosowaniu tej techniki nie można stwierdzić czy jest to heterozygota czy homozygota dzika. U osób z delecją w obu allelach genu *GSTM1* nie stwierdzano produktu wielkości 230 par zasad, obserwując tylko

prążek pochodzący z kontrolnego genu *GSTM4* (158 par zasad) (Fotografia 2).



Fotografia 2 Elektroforeza produktów genotypowania *GSTM1* na żelu agarozowym. Linia 1- marker DNA pBR322 DNA/*A*/*ul*,
Linia 2, 3, 4 – *GSTM1 null/null* (delecja),
Linia 5,6,7 – *GSTM1* typ dziki,
Linia 8 – kontrola ujemna – brak DNA matrycowego



Rysunek 2 Schemat genu *GSTM1*. Starter P1 jest w eksonie 4, zaś startery dolne P2 i P3 są zlokalizowane w eksonie 5. Startery P1 i P2 przyłączają się do genu *GSTM4* (standard wewnętrzny), zaś startery P1 i P3 są specyficzne dla *GSTM1* [124].

3.2.3.3 ANALIZA POLIMORFIZMU 3435 C>T GENU *MDR1*

Przeprowadzono analizę długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dla polimorfizmu 3435 C>T genu *MDR1*. Synonimiczną zamianę nukleotydową, nie wywołującą zmiany sensu kodonu dla izoleucyny w pozycji 1145 łańcucha aminokwasowego wykrywano używając enzymu restrykcyjnego. Startery zaprojektowano posługując się znaną sekwencją genu *MDR1* (GenBank M29445). Używano starterów o sekwencjach *MDR1* 5: 5'GGC AAA GAA ATA AAG CGA CT; *MDR1* 3: 5' ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG. Reakcję PCR przeprowadzano w następujących warunkach termicznych:

denaturacja wstępna	94°C 5min	} 30 cykli
denaturacja	94°C 1 min	
hybrydyzacja	63°C 1 min	
elongacja	72°C 1 min	
elongacja końcowa	72°C 5 min	

Mieszanina PCR przygotowywana w objętości 20 μ l zawierała:

10 mM Tris-HCl

50 mM KCl

2,5 mM MgCl₂

50 ng każdego primera (MDR1 5, MDR1 3)

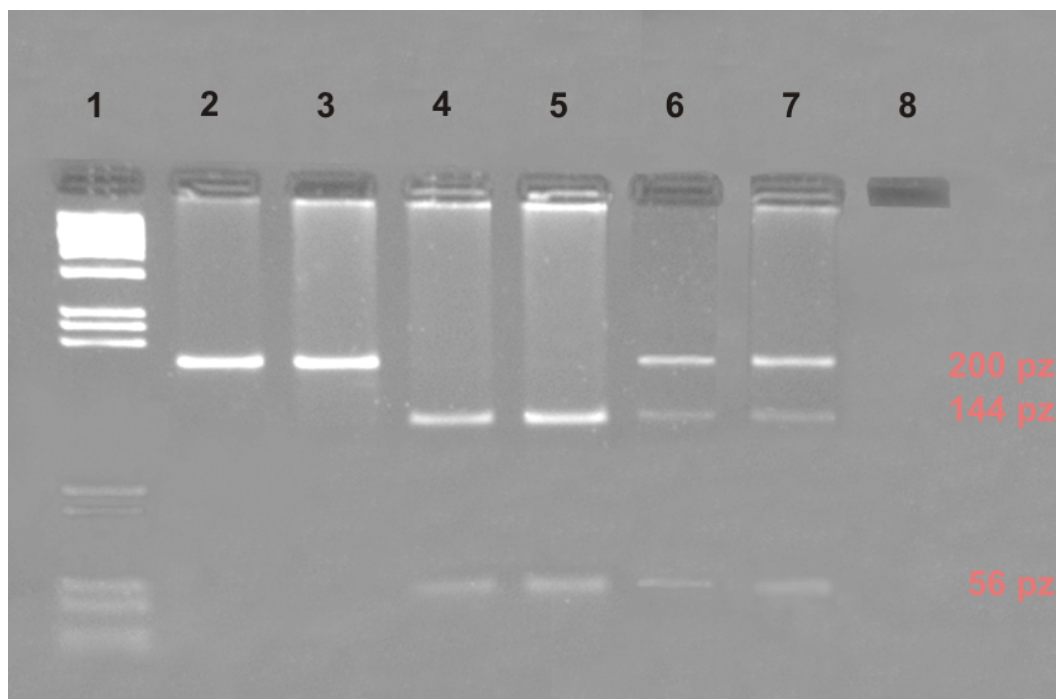
0,2 mM każdego z nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,55 j. polimerazy DNA

0,1 μ g genomowego DNA

Produkty amplifikacji o długości 200 par zasad trawiono enzymem restrykcyjnym *Bsp*143I. Enzym ten rozpoznaje tranzycję C→T w pozycji 3435 nukleotydu sekwencji cDNA (sekwencja cięta przez enzym to ↓GATC). *Bsp*143I rozpoznaje sekwencję allelu prawidłowego (typ dziki).

Do 6 μ l mieszaniny PCR dodawano 2,5 jednostki enzymu i inkubowano w temperaturze 37°C przez kilkanaście godzin. Po tym czasie produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy. U homozygot zmutowanych (TT) obserwowano tylko jeden prążek o długości 200 par zasad. Homozygoty zdrowe (CC) charakteryzowały się dwoma prążkami o długościach 144 i 56 par zasad, zaś heterozygoty (CT) posiadały prążki o długości 200, 144, 56 par zasad (Fotografia 3).



Fotografia 1 Analiza RFLP dla 3435 C>T genu *MDR1*. Produkty PCR o długości 200 par zasad trawiono enzymem *BSP143I* i rozdzielano na żelu agarozowym.

Linia 1 - marker długości pBR322 DNA/*A**l**u*1

Linia 2,3 – homozygota 3435TT, jeden fragment restrykcyjny o długości 200 par zasad.

Linia 4,5 – homozygota 3435CC, dwa fragmenty restrykcyjne o długościach 56 i 144 par zasad.

Linia 6,7 – heterozygota 3435CT, trzy fragmenty restrykcyjne o długościach 56,144 i 200 par zasad.

Linia 8 - kontrola ujemna – brak DNA matrycowego

3.2.3.4 ANALIZA POLIMORFIZMU-444 A>C GENU *LTC₄S*

Przeprowadzono analizę długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) polimorfizmu regionu promotorowego genu *LTC₄S*, gdzie zamianę -444 A→C wykrywano dzięki użyciu odpowiednich starterów o sekwencji: *LTC₄S* 5: 5' CTT CCG CAG AGG AGG GTT TGG; *LTC₄S* 3: 3' TCG TGC CCC TTC CTT GCC TAG T. Do amplifikacji fragmentu *LTC₄S* zastosowano następujące parametry reakcji:

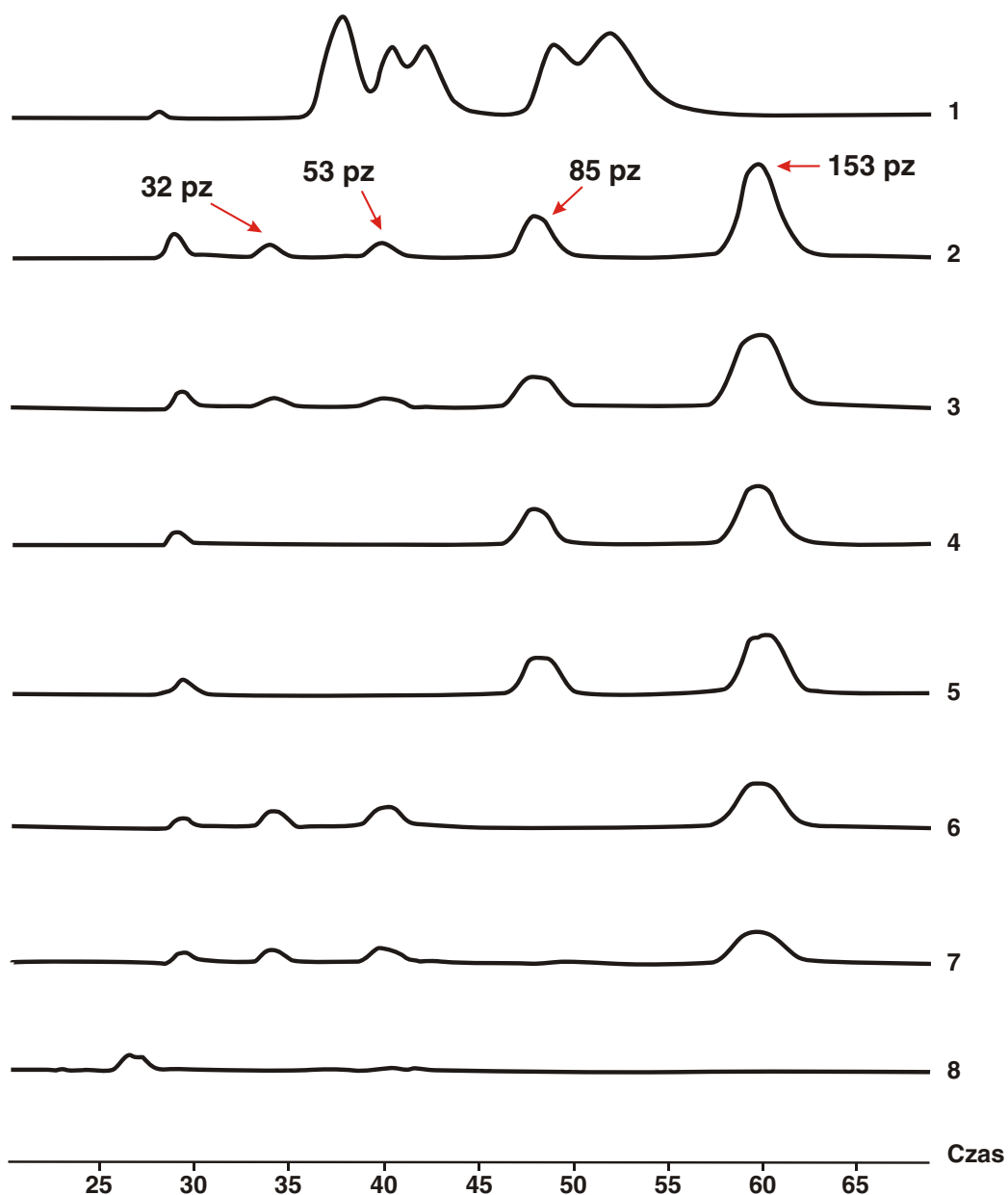
denaturacja wstępna	94°C 5min	
denaturacja	94°C 1 min	} 34 cykle
hybrydyzacja	58°C 30 sek.	
elongacja	72°C 1 min	
elongacja końcowa	72°C 10 min	

Mieszanina reakcyjna PCR była przygotowana w objętości 25 µl i zawierała:

10 mM Tris-HCl
50 mM KCl
2,5 mM MgCl₂
50 ng każdego primera (LTC₄S 5, LTC₄S 3)
0,2 mM każdego z nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,55 j. polimerazy DNA
0,1 µg genomowego DNA
2% DMSO

Dodatek DMSO do reakcji, pozwalał na obniżenie temperatury hybrydyzacji DNA. Dzięki temu można było uzyskać efektywną denaturację i splatanie nici DNA w temperaturze niższej niż wymagana jest dla danego fragmentu DNA, przez co zwiększono wydajność reakcji.

Po zakończeniu reakcji PCR do 4 µl mieszaniny zawierającej fragment o długości 238 par zasad dodawano 2,5 jednostki enzymu *Msp*I i inkubowano w temperaturze 37°C przez kilkanaście godzin. Enzym restrykcyjny rozpoznawał sekwencję C↓CGG która nie występuje w allelu prawidłowym. Detekcję powstałych fragmentów restrykcyjnych w amplifikowanego fragmentu genu *LTC₄S* przeprowadzano elektroforetycznie w 6% żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem laserowej analizy fluorescencji, jak to opisano wcześniej. Osoby będące homozygotami (AA) charakteryzowały się prążkami o długościach 153 i 85 par zasad. Homozygoty zmutowane (CC) miały fragmenty o długościach 153, 53 i 32 par zasad. Heterozygoty (AC) miały wszystkie wymienione prążki (Fluorogram 2).



Fluorogram 2 Analiza RFLP dla -444 A>C genu *LTC₄S*. Produkty PCR o długości 238 par zasad trawiono enzymem *Msp*1 i rozdzielano na 6% żelu poliakrylamidowym.

Linia 1 - marker długości pBR322 DNA/*Alu*1

Linia 2,3 – heterozygota o genotypie -444AC , obecne 4 fragmenty restrykcyjne o długościach 32, 53, 85, 153 par zasad

Linia 4,5 – homozygota o genotypie -444AA, obecne dwa fragmenty restrykcyjne o długościach 85, 153 par zasad.

Linia 6,7 – homozygota o genotypie -444CC, obecne trzy fragmenty restrykcyjne o długościach 32, 53, 153 par zasad.

Linia 8 - kontrola ujemna – brak DNA matrycowego

3.2.4 STYMULACJA LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ

Z badanej grupy 659 osób o znanym genotypie GSTP1, wybrano 74 osoby ($ATA=35$: $k/m=27/8$; $A/A=10$: $k/m=7/3$; $kont=29$: $k/m=18/11$). Osoby te charakteryzowały się zdefiniowanymi genotypami GSTP1 (AA, GG lub AG, Tabela 5). Od osób tych pobierano 7 ml krwi żyłnej na antykoagulant EDTA w celu przeprowadzenia stymulacji leukocytów. Dodatkowo pobierano 2,5 ml krwi na skrzep w celu oznaczenia poziomu całkowitego IgE w surowicy metodą nefelometryczną (Behring, Nephelometer Analyzer II, Niemcy).

Z pobranej krwi, 2 ml zużyto w celu zbadania morfologii (Sysmex K-800, Japonia) i wykonania rozmazu ręcznego. Pozostałe 5 ml krwi wykorzystywano do stymulacji leukocytów *in vitro*. Krew tą zalewano 1,25 ml 6% dekstranu w celu sedymentacji krwinek czerwonych i otrzymaniu osocza bogatokomórkowego. Otrzymane osocze przenoszono do czystej probówki i wirowano przy 130g przez 10 minut w 4°C. Następnie zlewano nadsącz a znajdujące się w osadzie leukocyty zawieszano w 5 ml płynu hodowlanego HBSS z dodatkiem 0,1% albuminy wołowej (BSA), interleukiny-3 (IL-3, 20 ng/ml) oraz kwasu arachidonowego (AA 5 μ M). Całość inkubowano przez 30 minut w 37°C w cieplarni (Heraeus) gdzie atmosfera wzbogacona była w CO₂ do 5% składu gazów a wilgotność powietrza wynosiła 90%. Po inkubacji zawiesinę prestymulowanych komórek (*priming*) wirowano w warunkach podanych wyżej i jednokrotnie płukano 5 ml płynu HBSS z dodatkiem 0,1% BSA oraz IL-3. Znajdujące się na dnie probówki leukocyty zawieszano ponownie w 5 ml płynu HBSS z dodatkiem 0,1% BSA oraz IL-3, mieszano, a następnie rozdzielano po 1ml do 4 dołków w 24-dołkowej płytce przeznaczonej do hodowli komórek w zawieszynie (Sarstedt, Niemcy). Do dwóch dołków dodawano jonomycynę wraz z kwasem arachidonowym (0,2mM JON + AA), dwa zaś zawierały komórki tylko w obecności kwasu arachidonowego (kontrola, AA). Jonomycyna, która jest bardziej efektywna od jonoforu wapnia A23187, dodana do hodowli komórkowych powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Wzrost stężenia jonów wapnia powoduje natychmiastową aktywację wielu układów przekąźnikowych komórki, czego wynikiem może być np. wzrost ilości produkowanego LTC₄.

Tak przygotowane płytki inkubowano w 37°C w cieplarni przez 60 minut. Następnie zawartość dołków przenoszono do probówek, które znajdowały się na lodzie aby zapobiec degradacji leukotrienów cysteinylowych. Całość wirowano w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 14000 obrotów na minutę. Nadsączy z hodowli przenoszono do czystych probówek i mrożono w temperaturze -80°C do czasu oznaczania stężeń leukotrienów cysteinylowych (LTC₄ i LTE₄) i poziomu glutationu (GSH), nie dłużej niż 3 tyg.

Wszystkie czynności były przeprowadzane w warunkach jałowych w komorze laminarnej Heraeus.

Tabela 5 Liczebności w poszczególnych grupach pod względem polimorfizmu *GSTP1*.

Grupy	N	Kobiety	Mężczyźni	<i>GSTP1</i>		
				AA	AG	GG
	74	52	22	36	30	9
ATA	35	27	8	19	13	3
AIA	10	7	3	6	3	2
KONT	29	18	11	11	14	4

3.2.5 OZNACZANIE POZIOMU LTC₄ I LTE₄ W NADSĄCZACH HODOWLANYCH LEUKOCYTÓW

Pomiary stężeń leukotrienów cysteinylowych LTC₄ oraz LTE₄ w nadsączach hodowlanych leukocytów były wykonane przy użyciu komercyjnych zestawów EIA. Zasada działania zestawu w obu przypadkach jest taka sama i polega na kompetytywnym wiązaniu leukotrienu lub jego znakowanego acetylocholinesterazą (AChE) analogu (*tracera*) przez immobilizowane przeciwciała, a następnie enzymatycznej reakcji barwnej. Zestawy różnią się między sobą tylko rodzajem przeciwciała; przeciwko LTC₄ lub LTE₄ i dodawanym standardem wzorcowym. Specyficzność wiązania LTC₄ i LTC₅, w zestawie EIA LTC₄, wynosi 100%, zaś wiązania LTD₄ i LTD₅ wynosi

odpowiednio 46% i 48%. Reakcja polega na współzawodnictwie pomiędzy wolnym LTC₄ lub LTE₄ a znacznikiem kompetytywnym o ograniczoną ilość przeciwciał. Stężenie znacznika jest zawsze stałe zaś stężenie wolnych CysLTs jest różne, dlatego też połączenie tracera z przeciwciałami jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia wolnych CysLTs. Po przepłukaniu płytki dodaje się odczynnik Ellmansa, który zawiera substrat barwny dla AchE. Enzymatyczny produkt reakcji jest koloru żółtego a jego absorbancja odczytywana jest przy długości fali 412 nm. Intensywność koloru jest proporcjonalna do ilości związanego znacznika LTC₄ lub LTE₄, co z kolei jest przeliczane na podstawie krzywej wzorcowej do ilości wolnego LTC₄ lub LTE₄ w oparciu o poniższy wzór matematyczny (Rys 3).

$$\text{Absorbancja} \propto [\text{związany LTE}_4, \text{LTC}_4 \text{ tracer}] \propto 1/[\text{LTE}_4, \text{LTC}_4]$$

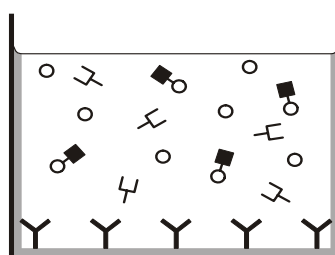
Dla każdego pacjenta oznaczano w duplikatach stężenia LTC₄ i LTE₄ w nadsącach z hodowli bez stymulacji i po stymulacji. Ze względu na oczekiwane duże ilości CysLTs w próbkach po stymulacji przed pomiarem EIA rozcieńczano je 10-krotnie, co uwzględniano w późniejszych obliczeniach. Wszystkie czynności podczas nastawiania płytki były wykonywane według instrukcji zalecanej przez producenta zestawu. Dla każdej płytki testowej do oznaczeń EIA przygotowywano nowe odczynniki oraz robiono nową krzywą standardową z rozcieńczeń 1000 pg, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62,5 pg, 31 pg, 15 pg, 7,5 pg. Do pomiaru leukotrienów stosowano po 50 µl nadsączy z hodowli leukocytów. Po skompletowaniu reakcji (50 µl znacznika AchE, bufor oraz przeciwciała przeciwko CysLTs) całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin w ciemności. Po tym czasie płytkę przepłukiwano pięciokrotnie we wcześniej przygotowanym buforze zawierającym Tween 20 a następnie dodawano 200 µl odczynnika Ellmansa. Odczyt absorbancji próbek w płytce przy długości 412 nm przeprowadzano w czytniku kolorymetrycznym (Bhering EL 311, Microplate Reader, Niemcy), po 60—90 min. inkubacji z wytrząsaniem. Wyniki absorbancji przeliczano na stężenia LTC₄ lub LTE₄ przy

użyciu krzywej standardowej kompetycji. Obliczenia wykonywano zgodnie z zaleceniami znajdującymi się w instrukcji.

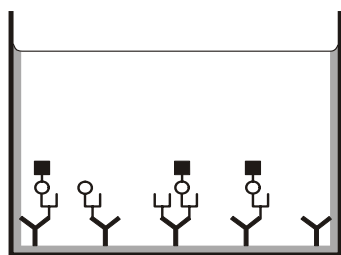
- Y - Monoklonalne mysie przeciwciała
- - Białka blokujące
- - Acetylocholinesteraza związana z LTC₄, LTE₄ znacznikiem
- ⌵ - Specyficzne przeciwciała przeciwko LTC₄, LTE₄
- - Wolne LTC₄, LTE₄



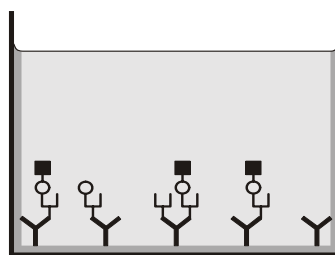
1. Płytkę opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi mysimi i zablokowana odpowiednimi białkami



2. Inkubacja ze znacznikiem przeciwciałami albo ze standardem albo z badanymi próbkami



3. Płukanie w celu usunięcia niezwiązanych odczynników



4. Wywoływanie płytki z odczynnikiem Ellmans'a

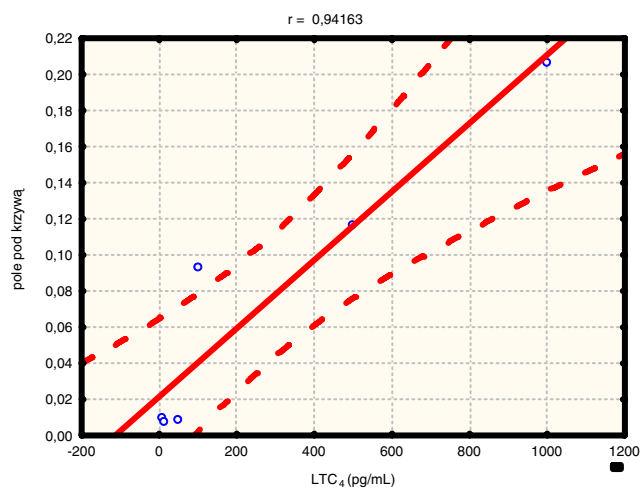
Rysunek 3 Schemat przedstawiający przebieg reakcji ELISA według instrukcji obsługi Leukotriene C₄ EIA Kit, Cayman.

3.2.6 IDENTYFIKACJA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAPHII CIECZOWEJ W POŁĄCZENIU ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (LC-MS)

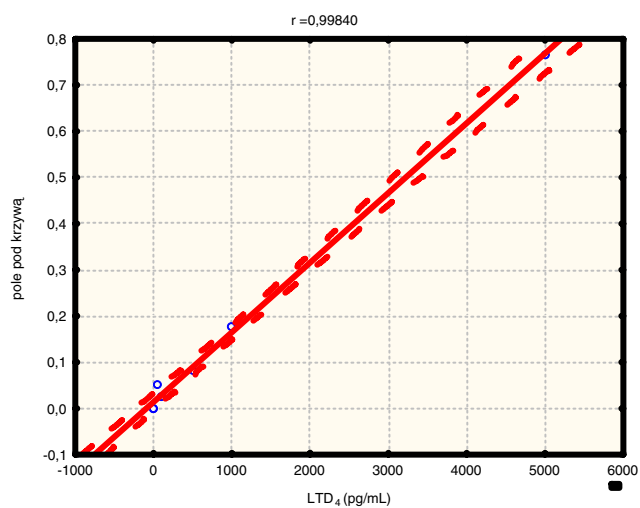
U losowo wybranych 12 osób, spośród 74 badanych u których przeprowadzano stymulację leukocytów, zweryfikowano obecność leukotrienów cysteinylowych LTC₄, LTD₄, LTE₄ w nadsączach hodowlanych metodą fizyczną, opartą na wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (LC-MS). Metoda ta miała na celu potwierdzenie, że związki zmierzone metodą EIA, były rzeczywiście leukotrienami cysteinyłowymi. Ze względu na mniejszą czułość metody - około 200pg/1mL płynu hodowlanego, do oznaczeń stężeń CysLTs posłużyły tylko próbki po stymulacji jonomycyną. Próbki przed rozdziałem poddawano przygotowaniu, którego celem było oczyszczenie próbek poprzez usunięcie zanieczyszczeń i wyizolowanie badanego składnika z matrycy biologicznej, oraz jego zagęszczenie. Do 0,4 ml próbki (nadsączu), przed jej przygotowaniem, dodano leukotrien deuterowany LTE₄-d₃ w ilości 5 ng, który pełnił rolę wzorca wewnętrznego (internal standard) w celu kompensacji strat podczas preparatyki. Próbkę zakwaszano kwasem octowym do pH 4,0 i nakładano na kolumnkę ekstrakcyjną z fazą stałą (sepak C-18 , Bakerbond spe, Baker, USA) połączoną z podciśnieniowym systemem do filtracji próbek Baker spe-12G (Baker, USA). Kolumnkę (sepak) wcześniej kondycjonowano 6 ml metanolu i 5 ml wody destylowanej. Sepak po nałożeniu próbki przemywano wodą destylowaną (10 ml), następnie 50% metanolem (2,5 ml) i n-heptanem (2,5 ml) w celu wyeliminowania zatrzymanych związków polarnych, słabo polarnych i niepolarnych. Pozostałą w sepaku wodę starano się usunąć przez godzinne jego suszenie w strumieniu azotu. Następnie leukotrieny LTC₄, LTE₄, LTD₄, oraz standard LTE₄-d₃, związane cały czas z fazą stałą wmywano z kolumnki metanolem (1,5 ml). Rozpuszczalnik ten odparowywano w strumieniu azotu. Tak przygotowaną próbkę rozpuszczano w 20 µl fazy mobilnej, składającej się z metanolu-acetonitrylu–wody–kwasu octowego (56:24:20:0,1) doprowadzonej do pH 5,6 przy pomocy amoniaku. Próbkę analizowano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Surveyor ThermoFinnigan) połączonej z spektrometrią mas (LCQ Advantage ThermoFinnigan, LC-MS)

typu pułapka jonowa (ion trap) z jonizacją dodatnią, w ciśnieniu atmosferycznym typu „electrospray”- ESI. Przy tej technice jonizacji powstaje pozorny jon molekularny $[M+H]^+$. Materiał analizowany w objętości 10 μ l wprowadzano mikrostrzykawką do pętli 5 μ l w zaworze sześciodrożnym (reodyna), skąd próbka była podawana na kolumnę chromatograficzną o odwróconych fazach (Nucleosil C-18 Macherey-Nagel, Niemcy). Chromatogram rozwijano w temperaturze pokojowej izokratyczną fazą mobilną z szybkością 0,4 ml/min. Parametry spektrometru mas i jonizacji ustalono następująco: napięcie na końcu igły rozpylacza (electrospray) - 4,5kV, stalową kapilarę podgrzano do temperatury 200°C i przyłożono do niej potencjał 60V, napięcie na soczewkach wynosiło 50V a na powielaczu elektronowym 900 V. Przepływ gazu rozpylającego, którym był azot ustalono na 60 jednostek.

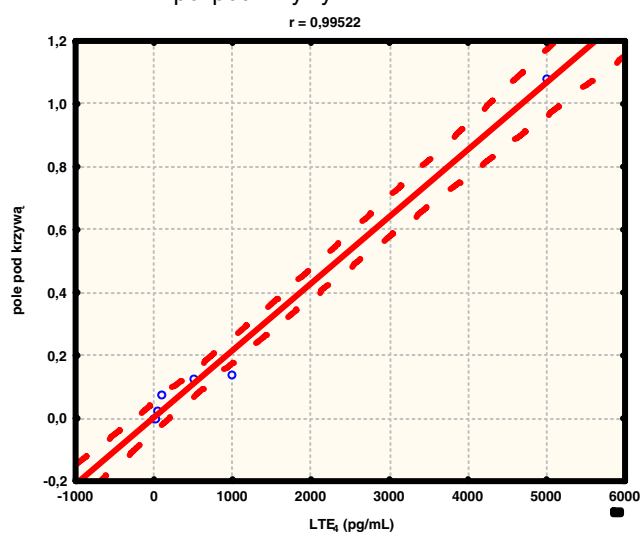
Przy analizie próbek wykorzystano możliwość pracy w systemie tandem (MS/MS), polegającym na selektywnej analizie jonów potomnych, jaką oferują spektrometry mas z pułapką jonową (tandem w czasie). Jony macierzyste dodatnie, różne dla poszczególnych leukotrienów (LTC_4 $m/z=626$, LTD_4 $m/z=497$, LTE_4 $m/z=440$, LTE_4-d_3 $m/z=443$) były fragmentowane przy energii 47% a następnie rejestrowano widmo charakterystycznych jonów potomnych w zakresach (LTC_4 $m/z=250-650$, LTD_4 $m/z=250-500$, LTE_4 $m/z=250-450$, LTE_4-d_3 $m/z=250-440$). Z takiego widma wybrano dwa jony fragmentacyjne o największej intensywności, służące do ilościowego oszacowania zawartości leukotrienów w próbkach. Dla LTC_4 były to jony $m/z=608$ i $m/z=308$, LTD_4 – $m/z=319$ i $m/z=301$, LTE_4 $m/z=319$ i $m/z=301$, LTE_4-d_3 $m/z=322$ i $m/z=304$. Czasy retencji kolumny chromatograficznej dla poszczególnych leukotrienów wynosiły odpowiednio $LTC_4RT=5,05$ min, $LTD_4RT=9,97$ min, $LTE_4RT=11,05$ min, $LTE_4-d_3RT=11,01$ min. (Wykres 4). Przed oszacowaniem stężenia leukotrienów cysteinylowych w nadsączach próbek hodowlanych wykonywano krzywą standardową. Krzywa ta wykreślona została na podstawie znanych stężeń standardu LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 , (5pg, 10pg, 50pg, 100pg, 500pg, 1000pg, 5000pg) i odpowiadających im pól pod pikami spektrogramu (Wykres 1,2,3). Otrzymane krzywe standardowe pozwoliły na wyliczenie stężeń CysLTs w nadsączach hodowlanych.



Wykres 1 Krzywa standardowa dla określonych stężeń standardu LTC_4 i odpowiadających im pól pod krzywymi

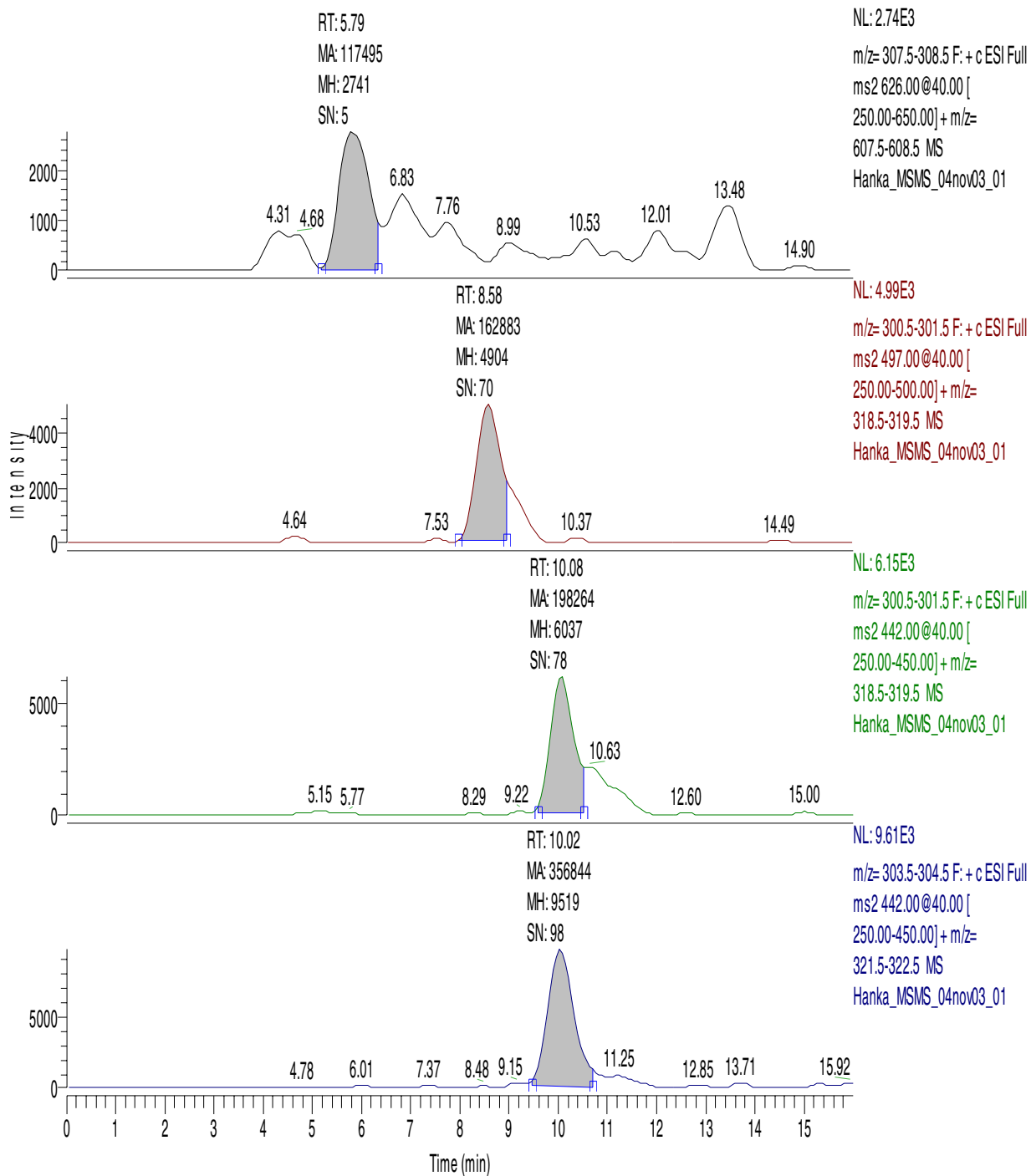


Wykres 2 Krzywa standardowa dla określonych stężeń standardu LTD_4 i odpowiadających im pól pod krzywymi



Wykres 3 Krzywa standardowa dla określonych stężeń standardu LTE_4 i odpowiadających im pól pod krzywymi

RT: 0.00 - 15.99 SM: 15G



Wykres 4 Czasy retencji dla poszczególnych leukotrienów.

Wykres 1 – standard LTC₄, RT: 5, 76 min.,

Wykres 2 - standard LTD₄, RT: 8,58 min.,

Wykres 3 - standard LTE₄, RT: 10,08 min.,

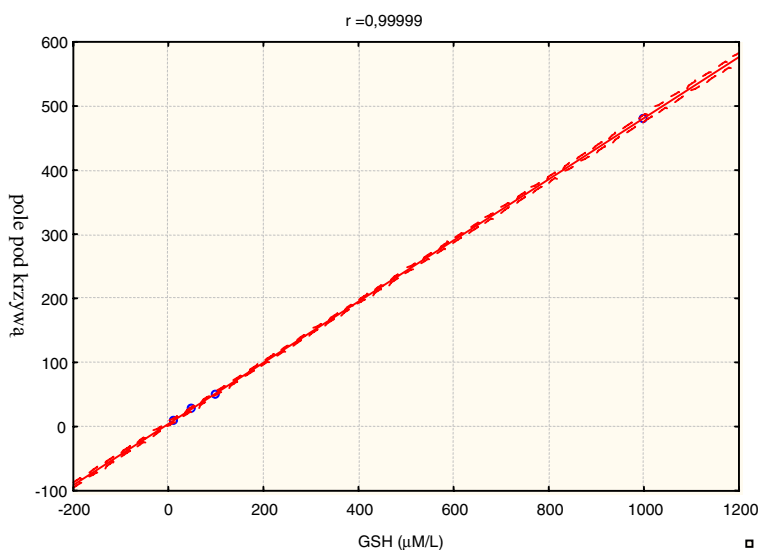
Wykres 2 - standard LTE₄-d₃, RT: 10,02 min.,

3.2.7 OZNACZANIE POZIOMU GLUTATIONU W PRÓBKACH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

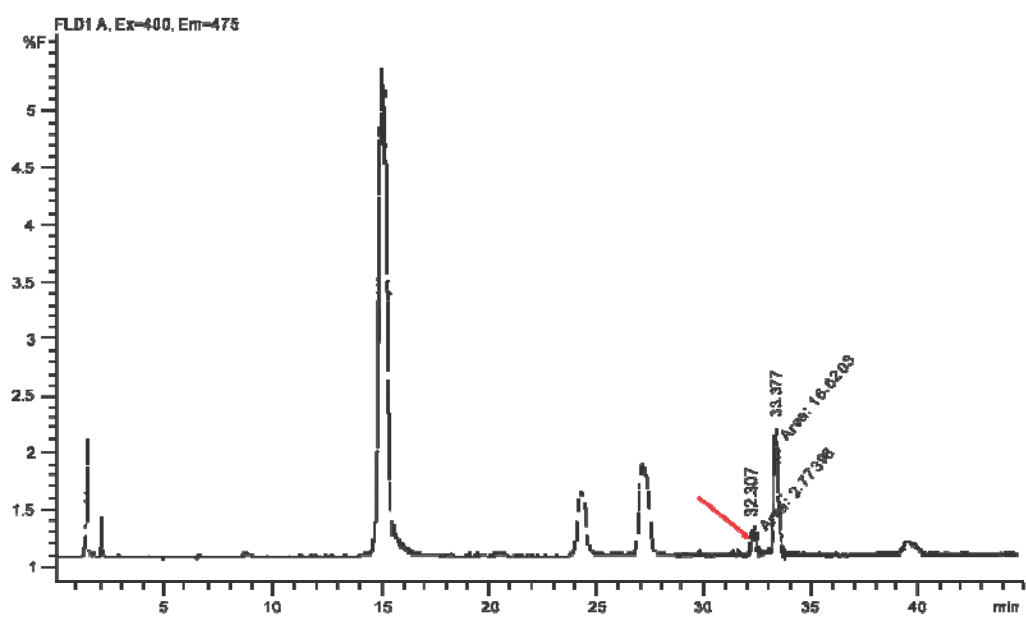
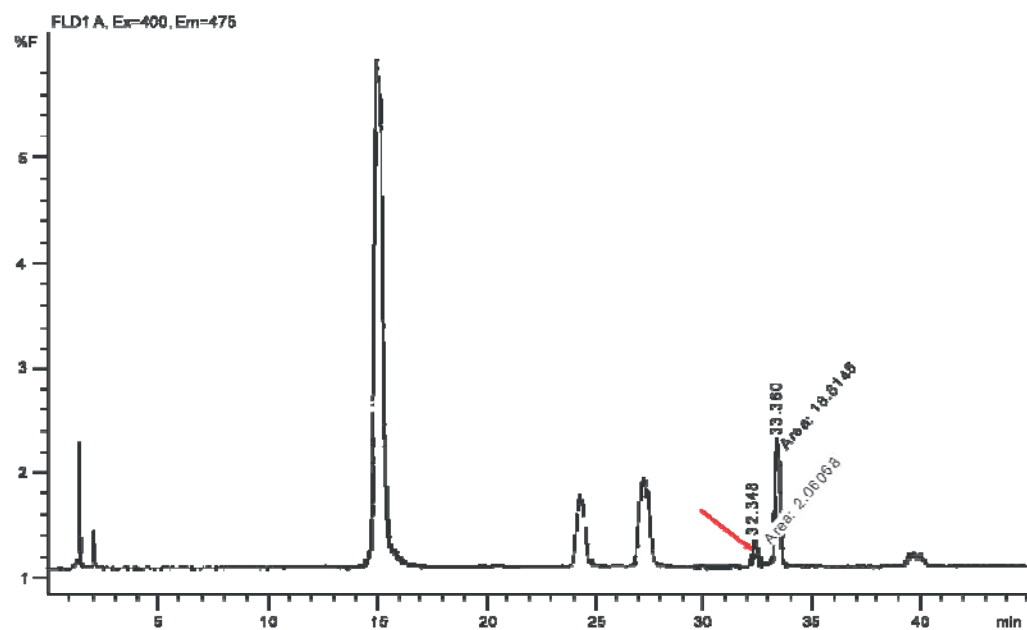
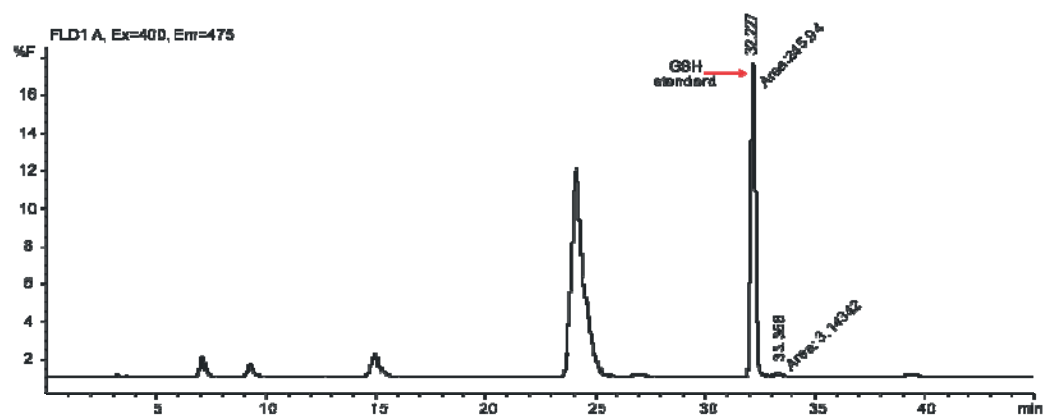
U 58 osób, spośród 74 u których przeprowadzano stymulację leukocytów izolowanych z pełnej krwi obwodowej, oznaczano w nadsącach hodowlanych stężenie glutationu (GSH) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej. Próbki przed rozdzieleniem przy użyciu HPLC podano derywatyzacji metodą Mansoor i wsp. [69]. Do 30 μ l nadsącza hodowlanego dodawano 30 μ l 2 M borowodoru sodu (NaBH_4) w 0,05M NaOH i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej w celu redukcji wiązań dwusiarczkowych. Po strąceniu białek przez dodanie 60 μ l 20% kwasu sulfosalicylowego oraz 100 μ l dithioerytroliu (DTE), by jego stężenie końcowe wyniosło 50 μ M, próbki trzymano na lodzie przez 30 min. Po tym czasie zawartość wirowano przez 10 min. z szybkością 14000 rpm w temperaturze 4°C. Z otrzymanych nadsączy pobierano 60 μ l i ponownie dodawano 30 μ l 1,4M NaBH_4 w 0,05M NaOH, inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie derywatyzowano grupy sulfhydrylowe przez dodanie 130 μ l roztworu składającego się z 65% DMSO i 35% wody v/v, i zawierającego: 51mM NaCl, 140mM HBr, 50 μ l 1M N-etylmorfolinę (pH=9) oraz 10 μ l 20mM monobromobimaine (mBrB) w acetonitrylu. Całość inkubowano przez 10 min. w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przerywano reakcję dodając 20 μ l 1,06M kwasu nadchlorowego (HClO_4). Tak przygotowane próbki były analizowane w systemie HPLC składającym się z: chromatografu Hewlett Packard 1050 z autosamplerem Hewlett Packard 1100 oraz detektorem fluorymetrycznym (HP Programable Fluorescence detector 1046A) przy długościach fali wzbudzenia 400nm i emisji 475 nm. Otrzymane dane były analizowane przy użyciu oprogramowania HP ChemStation (HP Vectra Xm). Na kolumnę HPLC, poprzedzoną prekolumną (C_{18} , ODS-Hypersil, Knauer, Germany), nastrzykiwano automatycznie po 20 μ l badanej próbki. Temperatura termostatu kolumny stabilizowała ją w temperaturze 24°C, zaś przepływ fazy mobilnej wynosił 1,5 ml/min. Rozdział próbki odbywał się w buforze A o składzie: 1,65%

wodorotlenku czterobutyloamoniowego, 0,8% kwasu ortofosforowego, 0,25% kwasu octowego lodowatego i wody (pH=3,85 p). Bufor B zawierał: 20% acetonitryl, 1,65% wodorotlenek czterobutyloamoniowy, 0,25% kwas octowy lodowaty, 0,8% kwas ortofosforowy i wodę (pH=3,85). Bufor C składał się z 75% acetonitrylu w wodzie. Gradientowy profil elucyjny chromatogramu był następujący: 0-13 min, 6-22% B; 13,1-25 min, 22-40% B; 25,1-30 min, 40-75 % B, 30-40 min, 40-75 % B. Po każdym rozdziale, kolumna była płukana przez 5 min buforem C, aby usunąć późno wymywany materiał fluorescencyjny. Czas retencji dla glutationu wynosił 32 min (Wykres 6). Przed oznaczaniem glutationu w nadsączach hodowlanych wykonywano krzywą standardową. Krzywa ta wykreślona została na podstawie znanych stężeń standardu GSH (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) i odpowiadających im powierzchni pod pikami chromatogramu. Współczynnik korelacji dla standardów wynosił $R=0,999$ (Wykres 5). Wartości krzywej zostały zapisane w programie do obliczeń stężenia, dzięki czemu automatycznie wyznaczono stężenie glutationu w nadsączach hodowlanych. Dane te były weryfikowane na podstawie wydruków raportowych.

U 29 osób spośród 74 badanych pobrano także 2,5 ml krwi żyłnej obwodowej na EDTA w celu oznaczenia poziomu GSH w surowicy. Wszystkie czynności związane z obróbką i rozdziałem próbek były wykonywane zgodnie z metodyką opisaną wyżej.



Wykres 5 Krzywa standardowa dla poszczególnych stężeń standardu GSH.



Wykres 6 Czasy retencji glutationu po rozdzieleniu próbek (czerwone strzałki) i odpowiadające im pola pod krzywymi.

Wykres 1- glutation standard 100 μM , RT:32,3 min.,

Wykres 2 - glutation w nadsączu hodowlanym bez stymulacji jonomycyną (AA), RT:32,348min.,

Wykres 3- glutation w nadsączu hodowlanym po stymulacji jonomycyną (AA+Jon), RT:32,307min.,

3.2.8 ANALIZA STATYSTYCZNA

Przeprowadzono obliczenia statystyczne na komputerze IBM PC korzystając z programu STATISTICA 6.0, wersja polska. Wyliczono częstości genotypowe, częstości alleliczne i wartości oczekiwane dla częstości genotypów na podstawie obserwowanych częstości allelicznych w każdej z badanych grup (ATA, AIA, POCHP, kontrola). Sprawdzono ewentualne odstępstwa od prawa Hardy'ego-Weinberg'a ($p^2+2pq+q^2=1$) testem Chi-kwadrat. Częstości alleliczne obliczano wg wzoru:

$$p=(2AA+Aa)/2N$$

$$q=(2aa+Aa)/2N$$

Wartości oczekiwane obliczano wg wzoru:

$$AA=p^2N$$

$$Aa=2pqN$$

$$aa=q^2N$$

AA- liczba homozygot dzikich

aa- liczba homozygot zmutowanych

Aa- liczba heterozygot

N- całkowita liczba badanych.

Porównywano testem Chi-kwadrat różnice między grupami (AIA vs Kontrola, ATA vs Kontrola, Astma vs Kontrola) w zakresie częstości allelicznych dla polimorfizmów 313A>G *GSTP1*, *GSTM1*, 3435C>T *MDR1*, -444A>C *LTC₄S*. Dla 74 osób, od których pobierano krew do stymulacji leukocytów *in vitro*, testowano różnice między średnimi dla: stężeń LTC₄, LTE₄ i GSH; wyjściowo i

po stymulacji w zależności od genotypu A313G *GSTP1*, A-444C *LTC4S*, C3435T *MDR1* w każdej grupie. W tym celu posłużono się testem nieparametrycznym rang-U Mann-Whitney'a. Sprawdzono także w każdej z grup zależności między stężeniami LTC₄, LTE₄ wyjściowo i po stymulacji a: FEV₁%, IgE całkowitym, leukocytozą, eozynofilą i stosowanymi dawkami steroidów doustnych i wziewnych, wykorzystując analizę wariancji (ANOVA). Korelacje między stężeniami LTC₄, LTE₄ oraz GSH w próbkach niestymulowanych i po stymulacji badano w grupach nieparametryczną metodą rang Spearmana.

Iloraz szans wystąpienia astmy lub POCHP oraz przedział ufności (5-95%) obliczono za pomocą programu StatsDirect.

4. WYNIKI

Przeprowadzono genotypowania w kierunku *GSTP1* i *GSTM1* u 665 osób, w tym 113 chorych na astmę z nadwrażliwością na aspirynę (AIA), 286 chorych na astmę tolerujących aspirynę (ATA), 56 chorych na POCHP. Zdrową kontrolę stanowiło 210 osób. Liczebności występowania poszczególnych genotypów *GSTP1* i *GSTM1* u chorych na astmę oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc oraz u osób zdrowych przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Liczebności występowania polimorfizmów *GSTP1* i *GSTM1* w badanych grupach, w nawiasach podano procentowy udział poszczególnych genotypów.

	GSTP1	GSTM1		
		norma	delecja null/null	Razem
ATA	AA	72 (52,6%)	65 (47,4%)	137 (47,9%)
	AG	61 (49,6%)	62 (50,4%)	123 (43,0%)
	GG	14 (53,8%)	12 (46,2%)	26 (9,1%)
AIA	AA	27 (42,2%)	37 (57,8%)	64 (56,6%)
	AG	22 (53,7%)	19 (46,3%)	41 (36,3%)
	GG	4 (50%)	4 (50%)	8 (7,1%)
POCHP	AA	10 (37%)	17 (63%)	27 (48,2%)
	AG	7 (36,8%)	12 (63,2%)	19 (33,9%)
	GG	3 (30%)	7 (70%)	10 (17,9%)
KONT	AA	44 (46,8%)	50 (53,2%)	94 (44,8%)
	AG	42 (44,2%)	53 (55,8%)	95 (45,2%)
	GG	12 9 (57,2%)	9 (42,8%)	21 (10%)

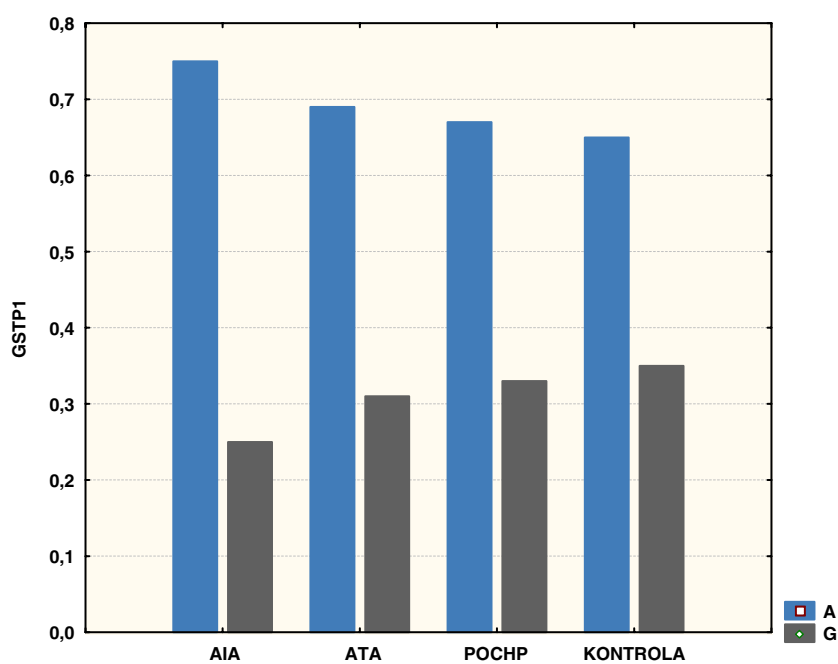
U 294 osób, w tym 96 chorych na AIA, 98 chorych na ATA oraz 100 osób zdrowych, zbadano polimorfizm *MDR1* 3435C>T. U 103 osób (AIA=39, ATA=35, kontrola=29), oznaczano również polimorfizm syntazy leukotrienu C₄. Dla wszystkich badanych polimorfizmów obliczono częstości genotypowe i alleliczne w poszczególnych grupach.

a) POLIMORFIZM S-TRANSFERAZY GLUTATIONU P1

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między częstościami obserwowanymi a oczekiwanymi genotypów tranzykcji 313A>G w żadnej z badanych grup. Wyniki testów odchylenia od prawa Hardy'ego-Weinberga były niezamienne i wynosiły: w grupie AIA ($\chi^2=0,218$, df=2, p=0,89), ATA ($\chi^2=0,09$, df=2, p=0,95), POCHP ($\chi^2=3,57$, df=2, p=0,17) oraz u kontroli ($\chi^2=0,2$, df=2, p=0,90) (Tabela 7). Częstość allelu zmutowanego 313G była podobna we wszystkich grupach i wynosiła dla: ATA q=0,31, POCHP q=0,35, kontrola q=0,33. Wyjątkiem była grupa AIA, w której q=0,25 i było niższe w porównaniu do kontroli, jednakże różnica miała jedynie charakter trendu statystycznego. Dokładny rozkład częstości alleli A i G dla *GSTP1* w poszczególnych grupach obrazuje Wykres 1. Przeprowadzono porównania częstości genotypów między chorymi a grupą zdrowych (AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola, POCHP vs. kontrola i Astma vs. kontrola). Nie obserwowano istotnych różnic w częstościach genotypowych (Tabela 8).

Tabela 7 Częstości obserwowane genotypów *GSTP1* w poszczególnych grupach. W nawiasach podano wartości oczekiwane i częstość genotypową w %

	N	AA	AG	GG	częstość allelu G	wynik testu dla prawa Hardy'ego-Weinberga (p)
AIA	113	64 (61,8; 56%)	41 (41,8; 37%)	8 (7,06; 7%)	0,25	p=0,89
ATA	286	137 (136,1; 47,9%)	123 (122,3; 43%)	26 (27,5; 9,1%)	0,31	p=0,95
KONT	210	94 (94,3; 44,8%)	95 (92,8; 45,2%)	21 (22,8; 10%)	0,33	p=0,90
POCHP	56	27 (23,6; 48,2%)	19 (25,48; 33,9%)	10 (6,86; 17,9%)	0,35	p=0,17



Wykres 1 Wykres przedstawiający częstości alleli A i G w *GSTP1* w badanych grupach

Tabela 8 Porównanie częstości genotypowych dla grup AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola, POChP vs. kontrola oraz Astma vs. kontrola.

Porównanie	χ^2	p
AIA vs. kontrola	4,215	0,12
ATA vs. kontrola	0,49	0,77
POChP vs. kontrola	3,77	0,15
Astma vs. kontrola	1,8	0,41

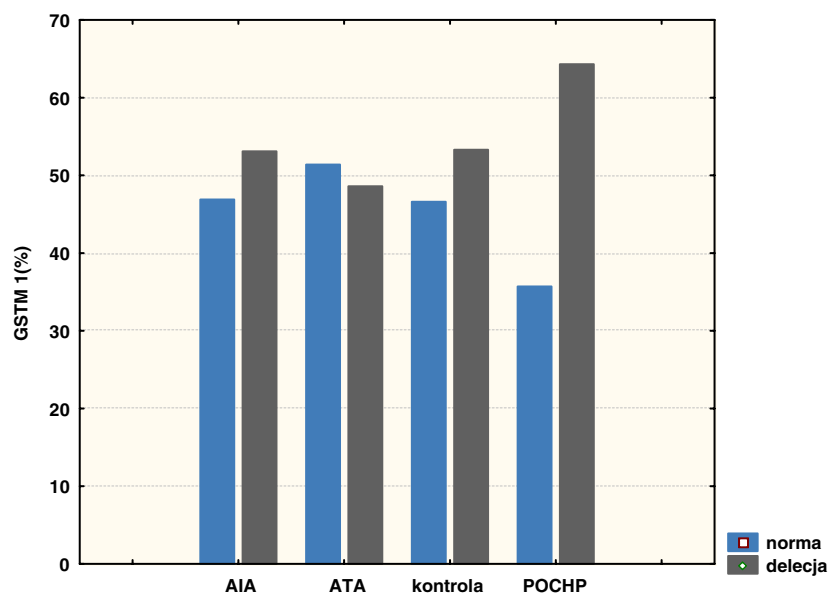
b) POLIMORFIZM S-TRANSFERAZY GLUTATIONU M1

Nie obserwowano istotnych różnic w częstości genotypów typu dzikiego (norma) *GSTM1* i delekcji *GSTM1null/null* w badanych grupach (Tabela 9 i Wykres 2). Polimorfizm ten okazał się jednak częstszy w grupie POChP, w której wariant delecyjny *GSTM1* osiągnął najwyższą częstość 64,3% *GSTM1null/null* w porównaniu z kontrolą ($\chi^2=2,15$, $df=1$, $p=0,14$).

Podobnie, jak dla *GSTP1*, porównano częstości genotypowe *GSTM1* między grupą chorych a grupą osób zdrowych (AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola, POChP vs. kontrola i Astma vs. kontrola). Nie obserwowano istotnych różnic między grupami (Tabela 10).

Tabela 9 Częstość genotypów *GSTM1*: formy dzikiej (norma) oraz delekcji *null/null*.

	Norma	Delecja	N
ATA	147 (51,40%)	139 (48,60%)	286
AIA	53 (46,90%)	60 (53,10%)	113
KONT	98 (46,60%)	112 (53,30%)	210
POChP	20 (35,70%)	36 (64,30%)	56



Wykres 2 Wykres przedstawiający częstości występowania delecji i genotypów dzikich GSTM1 w poszczególnych grupach

Tabela 10 Testy istotności różnic dla częstości genotypowych *GSTM1*. Porównania grup AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola, POCHP vs. kontrola oraz Astma vs. kontrola.

Porównanie	χ^2	p
AIA vs. kontrola	0,002	0,9
ATA vs. kontrola	1,08	0,3
POCHP vs. kontrola	2,149	0,14
Astma vs. kontrola	0,659	0,42

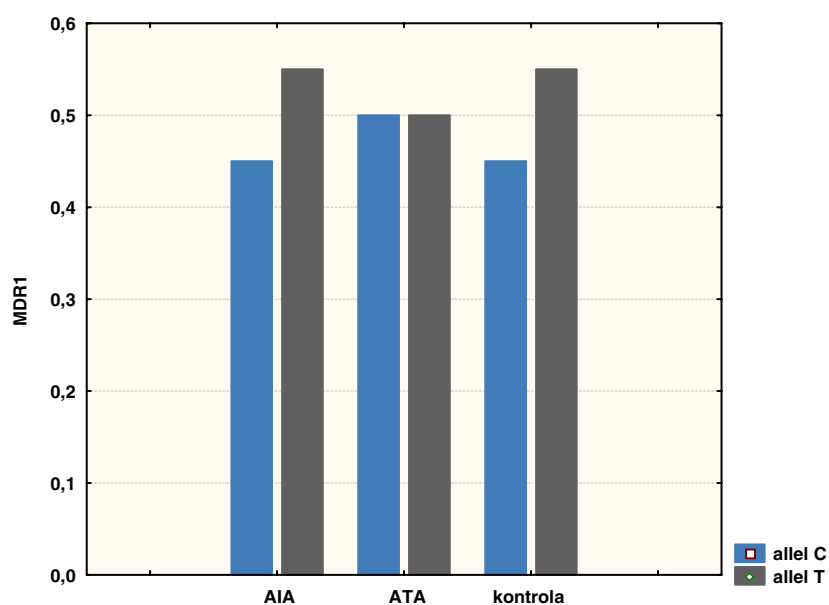
c) POLIMORFIZM *MDR1*

Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między częstością obserwowaną a oczekiwaną dla tranzykcji 3435C>T w poszczególnych grupach badanych (AIA $\chi^2=0,66$, $df=2$, $p=0,72$; ATA $\chi^2=0,59$, $df=2$, $p=0,74$; kontrola

$\chi^2=1,72$, $df=2$, $p=0,42$). Rozkład częstości genotypów (CC, CT i TT) tranzycji był zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga (Tabela 11). Wykazano, że częstość allelu T we wszystkich badanych grupach była podobna i wynosiła: AIA $q=0,55$, ATA $q=0,5$ i kontrola $q=0,55$ (Wykres 3). Porównano także częstości genotypowe między grupą chorych a zdrowymi (AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola, Astma vs. kontrola). Nie obserwowano istotnych różnic między częstościami genotypowymi w grupach (Tabela 12).

Tabela 11 Częstości obserwowane genotypów *MDR1* w poszczególnych grupach. W nawiasach podano wartości oczekiwane i częstość genotypu w %

	N	CC	CT	TT	częstość allelu T	wynik testu dla prawa Hardy'ego-Weinberga (p)
AIA	96	22 (19,8; 22,4%)	45 (48,7; 45,9%)	31 (29,6; 31,6%)	0,55	0,72
ATA	96	22 (24; 22,9%)	52 (48; 54,2%)	22 (24; 22,9%)	0,5	0,74
KONT	100	17 (20,25; 17%)	56 (49,5; 56%)	27 (30,25; 27%)	0,55	0,42



Wykres 3 Wykres przedstawiający częstości alleli C i T genu *MDR1* w badanych grupach

Tabela 12 Testy istotności różnic dla częstości genotypowych polimorfizmu 3435C>T genu MDR1. Porównanie grup AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola oraz Astma vs. kontrola.

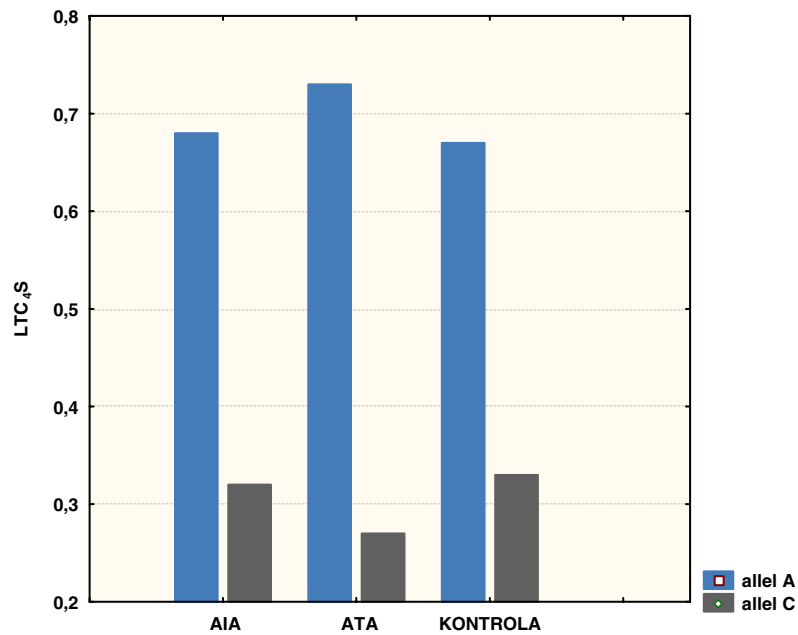
Porównanie	χ^2	p
AIA vs. kontrola	1,21	0,54
ATA vs. kontrola	2,09	0,35
Astma vs. kontrola	1,48	0,5

d) POLIMORFIZM SYNTAZY LEUKOTRIENU C₄

Porównanie częstości genotypowych i allelicznych w poszczególnych grupach nie wykazało różnic istotnych statystycznie między częstościami obserwowanymi a oczekiwanymi dla tranzycji -444 A>C (AIA $\chi^2=0,12$, df=2, p=0,95; ATA $\chi^2=1,52$, df=2, p=0,47; kontrola $\chi^2=0,88$, df=2, p=0,64) (Tabela 13). Świadczy to o braku odchyleń od prawa Hardy'ego-Weinberga. Stwierdzono, że częstość allelu zmutowanego -444C jest zbliżona w poszczególnych grupach i wynosi: AIA q=0,32, ATA q=0,27 i kontrola q=0,33 (Wykres 4). Najmniejszą częstość allelu C stwierdzono w grupie ATA, jednak różnice nie były istotne statystycznie (ATA vs. kontrola $\chi^2=2,05$; df=2; p=0,36, Tabela 14)

Tabela 13 Częstości genotypów LTC₄S w poszczególnych grupach. W nawiasach podano wartości oczekiwane i częstość genotypu w %

	N	AA	AG	CC	częstość allelu C	test prawa Hardy'ego-Weinberga (p)
ATA	35	20 (18,1; 57,1%)	11 (13,6; 31,4%)	4 (2,55; 11,4%)	0,27	0,47
AIA	39	19 (18; 48,7%)	16 (16,9; 41%)	4 (3,9; 10,3%)	0,32	0,95
KONT	29	12 (13; 41,4%)	15 (12,8; 51,7)	2 (3,16; 6,9%)	0,33	0,64



Wykres 4 Wykres przedstawiający częstości alleli A i C w LTC_4S w badanych grupach

Tabela 14 Porównania częstości genotypowych polimorfizmu -444 A>C syntazy leukotrienu C_4 dla grup: AIA vs. kontrola, ATA vs. kontrola oraz Astma vs. kontrola.

Porównanie	χ^2	p
AIA vs. kontrola	0,83	0,66
ATA vs. kontrola	2,74	0,25
Astma vs. kontrola	2,05	0,36

4.1 ASOCJACJE GENETYCZNE BADANYCH POLIMORFIZMÓW; ILORAZ SZANS WYSTĄPIENIA ASTMY

Obliczono iloraz szans (OR) wystąpienia astmy lub przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POCHP) oddzielnie dla każdego polimorfizmu w modelu dominującym i recesywnym, w odniesieniu do grupy kontrolnej (dla

GSTP1, *GSTM1* liczącej 210 osób oraz dla *LTC₄S* liczącej 29 osób)(Tabela 15). W żadnym z porównań nie stwierdzono istotnego statystycznie ryzyka związanego z dziedziczonym wariantem genotypu

Tabela 15 Ryzyko względne wystąpienia astmy lub POCHP dla polimorfizmu *GSTP1*, *GSTM1* i *LTC₄S*:

		Astma vs. kontrola	AIA vs. ATA	POCHP vs. Kontrola
GSTP1	OR* (CI 95%)	0,84 (0,47-1,48)	0,76 (0,33-1,73)	1,95 (0,86-4,44)
	OR** (CI 95%)	0,79 (0,57-1,12)	0,70 (0,45-1,09)	0,87 (0,48-1,57)
LTC₄S	OR* (CI 95%)	1,63 (0,33-8,21)	0,89 (0,20-3,84)	—
	OR** (CI 95%)	0,63 (0,26-1,51)	1,50 (0,59-3,83)	—
GSTM1	OR (CI 95%)	0,87 (0,62-1,22)	—	1,57 (0,85-2,89)

GSTP1 OR* dla modelu recesywnego GG vs AG+AA,
GSTP1 OR** dla modelu dominującego GG+ AG vs AA,
LTC₄S OR* dla modelu recesywnego CC vs AC+AA,
LTC₄S OR** dla modelu dominującego CC + AC vs AA,
GSTM1 OR

4.1.1 *GSTP1*

Obliczony iloraz szans wystąpienia astmy dla polimorfizmu *GSTP1* w modelu recesywnym (GG vs AG+AA) i dominującym (GG+AG vs AA) nie potwierdził protekcyjnego efektu allelu 313G (¹⁰⁵ Val).

d) **ASTMA vs. KONTROLA**

W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu recesywnym iloraz szans wyniósł 0,84 [95%CI: 0,47-1,48], co oznacza mniejsze o 16% ryzyko wystąpienia astmy u homozygot GG. Wynik ten nie jest istotny statystycznie. W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu dominującym iloraz szans wyniósł 0,79 [95%CI: 0,57-1,12], co oznacza iż obecność przynajmniej jednego allelu G (GG lub AG) zmniejsza o 21% ryzyko wystąpienia astmy. Wynik ten także nie jest istotny statystycznie.

e) AIA vs. ATA (ATA JAKO KONTROLA)

W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu recesywnym iloraz szans wyniósł 0,76 [95%CI: 0,33-1,73], co oznacza iż obecność homozygot GG zmniejsza o 24% ryzyko wystąpienia nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne (AIA) w porównaniu do ATA. Wynik ten nie jest istotny statystycznie. W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu dominującym iloraz szans wyniósł 0,70 [95%CI: 0,45-1,09], co oznacza iż obecność przynajmniej jednego allelu G (GG lub AG) zmniejsza o 30% ryzyko wystąpienia nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne u chorych na AIA. Wynik ten także nie jest istotny statystycznie.

f) POCHP vs. KONTROLA

W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu recesywnym iloraz szans wyniósł 1,95 [95%CI: 0,86-4,43], co oznacza większe u homozygot GG o 95% ryzyko wystąpienia POCHP. Wynik ten nie jest istotny statystycznie. W przypadku analizy polimorfizmu 313 A>G w modelu dominującym iloraz szans wyniósł 0,87 [95%CI: 0,48-1,57], co oznacza iż obecność przynajmniej jednego allelu G (GG lub AG) zmniejsza o 13% ryzyko wystąpienia POCHP. Wynik ten nie jest istotny statystycznie.

4.1.2 GSTM1

Obliczono iloraz szans wystąpienia astmy albo POCHP dla polimorfizmu *GSTM1* u osób z delecją (*GSTM1 null*).

a) ASTMA vs. KONTROLA

Iloraz szans wyniósł 0,87 [95%CI: 0,62-1,22], co oznacza, że genotyp *GSTM1 null* zmniejsza o 13% ryzyko wystąpienia astmy. Wynik ten nie jest istotny statystycznie.

b) POCHP vs. KONTROLA

W przypadku analizy polimorfizmu *GSTM1* iloraz szans 1,57 [95%CI: 0,85-2,89] oznacza iż genotyp *GSTM1 null* zwiększa o 57% ryzyko wystąpienia POCHP. Wynik ten jednak nie jest istotny statystycznie.

4.1.3 LTC₄S

Obliczono iloraz szans wystąpienia astmy dla polimorfizmu *LTC₄S* w modelu recesywnym (CC vs. AC+AA) i dominującym (CC+AC vs. AA)

a) ASTMA vs. KONTROLA

Dla analizy polimorfizmu -444 A>C w modelu recesywnym iloraz szans wyniósł 1,64 [95%CI: 0,33-8,21], co oznacza większe o 64% ryzyko wystąpienia astmy u homozygot CC. Wynik ten nie jest istotny statystycznie. W przypadku analizy w modelu dominującym iloraz szans wyniósł 0,63 [95%CI: 0,27-1,51], zatem obecność przynajmniej jednego allelu C (CC lub AC) zmniejsza o 37% ryzyko wystąpienia astmy. Wynik ten jednak także nie jest istotny statystycznie.

b) AIA vs. ATA

W analizie polimorfizmu -444 A>C w modelu recesywnym iloraz szans wyniósł 0,89 [95%CI: 0,20-3,84], co oznacza u homozygot CC mniejsze 11% spadek ryzyka nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne (AIA) w porównaniu do ATA. Wynik ten nie jest istotny statystycznie. W przypadku modelu dominującego iloraz szans wynosi 1,50 [95%CI: 0,59-3,80], co oznacza iż obecność przynajmniej jednego allelu C (CC lub AC) zwiększa o 50% ryzyko nadwrażliwości na niesteroidowe leki przeciwzapalne u chorych na AIA. Wynik ten nie jest istotny statystycznie.

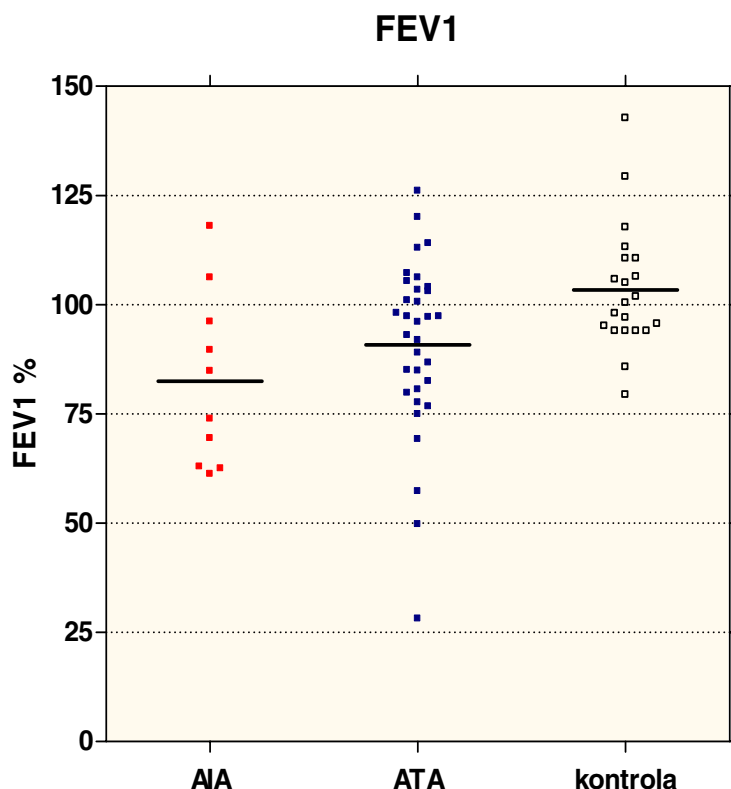
4.2 CZYNNOŚCIOWE BADANIE PŁUC I CECHY ATOPII W BADANYCH GRUPACH

4.2.1 FEV₁%

U wszystkich 74 osób, u których badano produkcję leukotrienów cysteinylowych, wykonywano spirometrię. Średnie wartości FEV₁ w poszczególnych grupach i odchylenia standardowe przedstawia Tabela 16. Wykazano analizą wariancji, że istnieją różnice w średnich wartościach FEV₁ między grupami ($p=0,008$). Istotnie statystycznie różnice w średnich wartościach FEV₁ dotyczyły porównań ATA vs. kontrola ($p=0,04$) i AIA vs. kontrola ($p=0,009$). W obu przypadkach wyższe wartości FEV₁ obserwowano u osób zdrowych (Wykres 5).

Tabela 16 Średnie wartości FEV₁ i odchylenia standardowe w poszczególnych grupach.

GRUPA	FEV ₁
AIA	82,5±20 %
ATA	90,8±20 %
KONT	103,3±14 %



Wykres 5 Wartości FEV₁ osób badanych w poszczególnych grupach.

Sprawdzono, czy w poszczególnych grupach (AIA, ATA, kontrola) obecne są zależności między wartościami FEV₁ a genotypem *GSTP1*. Różnice wartości FEV₁ w poszczególnych grupach, w zależności od wariantu polimorficznego *GSTP1* nie występowały.

4.2.4 TESTY SKÓRNE

O atopii świadczą również pozytywne wyniki testów skórnych ze swoistymi alergenami. Wykonano je u 25 osób, tych samych, u których izolowano leukocyty do badań *in vitro*. Wśród nich 20 było chorych na ATA i 5 na AIA. W grupie ATA były: 3 osoby z negatywnymi testami skórnym, 16 z pozytywnym i jedna ze słabo pozytywnym. W grupie AIA były 2 osoby z testami negatywnymi i 3 osoby z testami pozytywnymi. Analizą wariancji nie wykazano różnic między grupą ATA i AIA w wynikach testów skórnych. Nie obserwowano związku, testem Mann-Whitney'a, między polimorfizmem

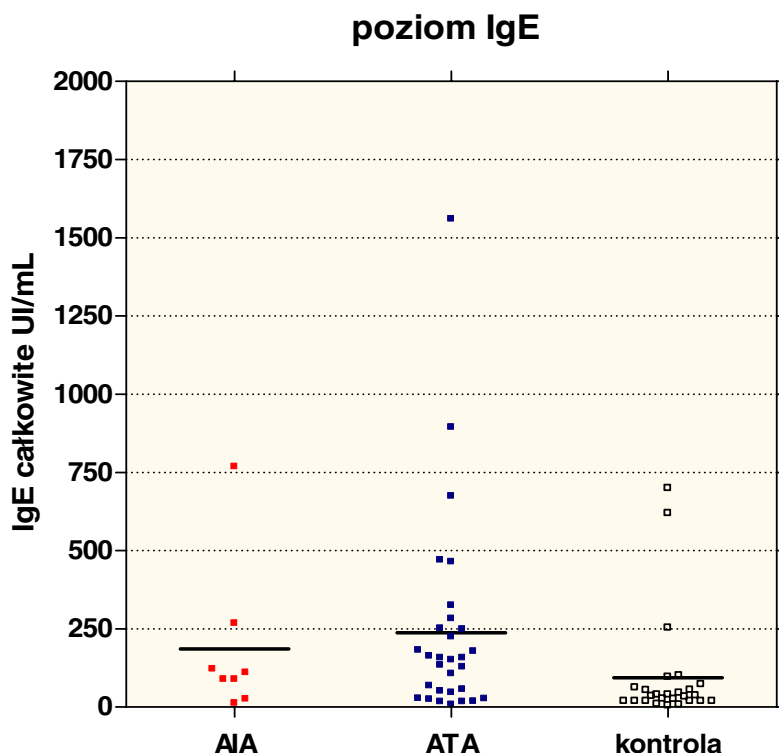
GSTP1 a wynikami testów skórnych w poszczególnych grupach. W tym przypadku wynik może być spowodowany małą liczbą przeprowadzonych testów skórnych.

4.2.3 POZIOMY CAŁKOWITE IgE

W grupie 74 osób (10 AIA, 35 ATA, 29 osób kontroli), u których przeprowadzano stymulację leukocytów *in vitro*, zmierzono poziomy IgE całkowite w surowicy. Średnie poziomy i odchylenia standardowe dla poszczególnych grup przedstawia Tabela 17. Testem Mann-Whitney'a wykazano znamienne większe poziomy IgE w grupie ATA ($p=0,004$), a także u chorych na astmę (AIA+ATA) łącznie ($p=0,03$) niż u kontroli (Wykres 6).

Tabela 17 Średnie poziomy IgE całkowitego i odchylenia standardowe w poszczególnych grupach.

ROZP	IgE całkowite (UI/mL)
AIA	186,7±248
ATA	237,3±328
KONT	93,7±174



Wykres 6 Poziomy całkowite IgE(UI/mL) u badanych w poszczególnych grupach.

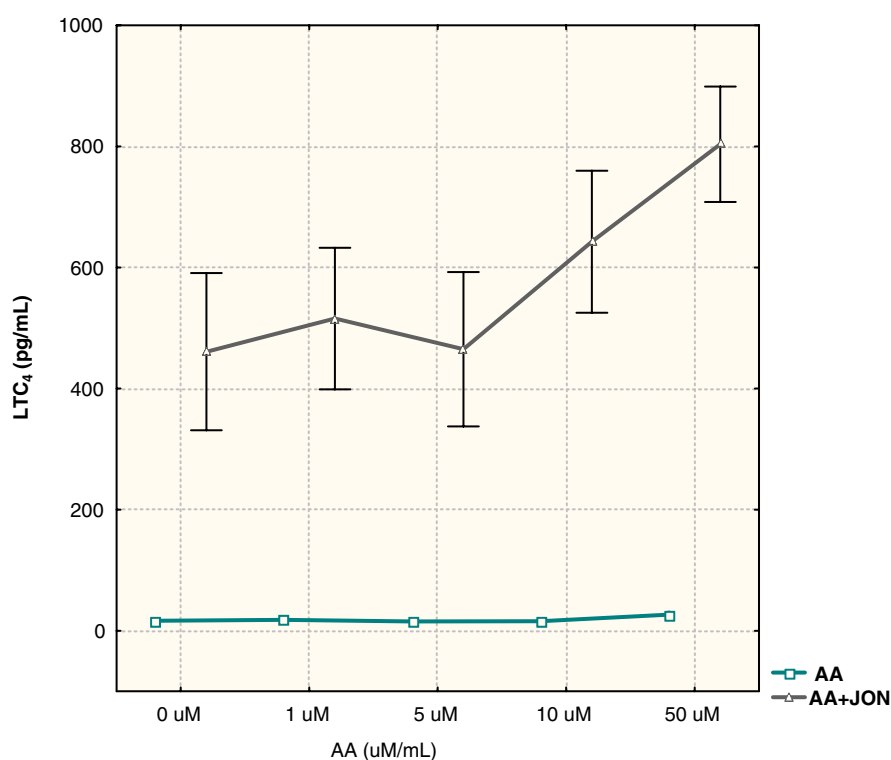
Sprawdzono testem Manna-Whitney'a, czy różnice dla IgE całkowitego w obrębie grup zależą od genotypu *GSTP1* (AA, AG, GG). W żadnym z porównań nie stwierdzono zależności między poziomami IgE a genotypami *GSTP1*.

4.3 PRODUKCJA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH

4.3.1 USTALENIE STĘŻENIA KWASU ARACHIDONOWEGO PRZY STYMULACJI LEUKOCYTÓW

Do badań użyto kwasu arachidonowego w stężeniu 5 μ M. Wybór takiego stężenia był nieprzypadkowy. Na podstawie wstępnych eksperymentów okazało się, że stężenie to jest optymalne w hodowli leukocytów, nie jest ono dla nich bowiem toksyczne. Jak wynika z przeprowadzonych hodowli stężenie powyżej 5 μ M (hodowla powyżej 24 godz.) może być toksyczne dla tych komórek. Stężenie 10-400 μ M indukuje apoptozę, zaś powyżej 400 μ M wywołuje nekrozę [70,85,122]. Na podstawie

doświadczeń własnych z różnymi stężeniami AA w hodowlach leukocytów od osób zdrowych stwierdzono, że stężenie 5 μM nie powoduje istotnej produkcji leukotrienu C_4 , w przeciwieństwie do stężenia AA 50 μM (Wykres 7). Celem stymulacji było co prawda uzyskanie maksymalnej produkcji LTC_4 przez leukocyty, lecz dopiero po zastosowaniu jonomycyny i po dostarczeniu do układu eksperymentalnego egzogenego substratu (AA) w stałym optymalnym stężeniu.



Wykres 7. Produkcja leukotrienu LTC_4 w zależności od stężenia kwasu arachidonowego dodawanego do hodowli leukocytów izolowanych od osób zdrowych. Linia zielona przedstawia stężenia LTC_4 w hodowlach bez stymulacji jonomycyną (AA, tylko kwas arachidonowy) i linia czarna po stymulacji (AA+ JON) (średnie wartości i odchylenia standardowe)

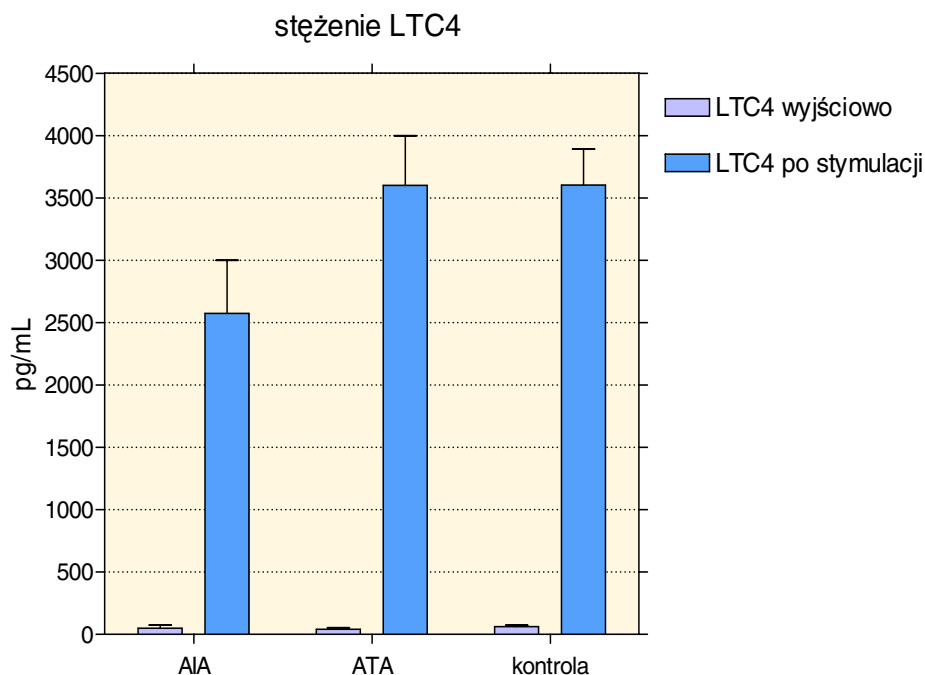
4.3.2 PRODUKCJA CysLTs MIERZONA METODĄ EIA I STĘŻENIA GSH

a) STĘŻENIA LEUKOTRIENU C₄

W badanej 74 osobowej grupie, w której 10 osób było chorych na AIA, 29 na ATA oraz 29 zdrowych, zbadano stężenie leukotrienu cysteinyłowego C₄ (LTC₄ w pg/mL) wyjściowo i po stymulacji jonomycyną. Pomiarów dokonano w nadsączach hodowlanych leukocytów izolowanych z pełnej krwi obwodowej i stymulowanych *in vitro*. Obliczono średnie i odchylenia standardowe dla poszczególnych grup (AIA, ATA, kontrola) co obrazuje poniższa Tabela 18 oraz Wykres 8.

Tabela 18 Średnie i odchylenia standardowe stężeń leukotrienu LTC₄ wyjściowo i po stymulacji w poszczególnych badanych grupach (pg/mL nadsączu)

GRUPA	LTC ₄ w	LTC ₄ s
AIA	50,1±77	2574,6±1341
ATA	41,6±70	3599,8±2365
KONT	61,8±63	3602,6±1549



Wykres 8 Stężenia LTC₄ (pg/mL) w poszczególnych grupach wyjściowo i po stymulacji jonomycyną. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej.

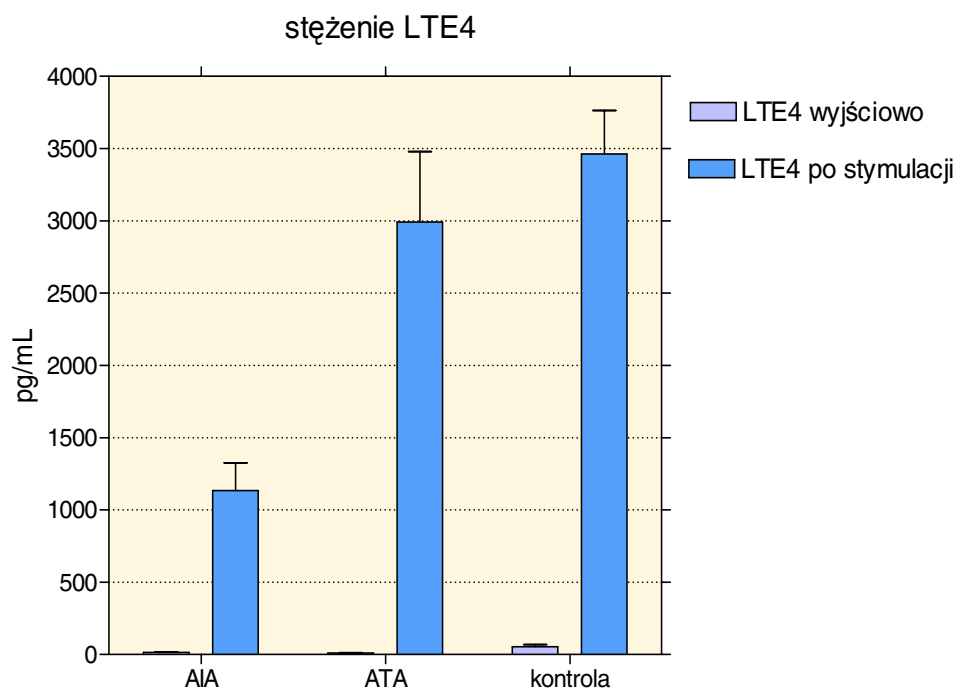
Sprawdzono testem nieparametrycznym Mann-Whitney'a czy istnieją różnice pomiędzy stężeniami LTC₄ wyjściowo i po stymulacji między poszczególnymi grupami. Obserwowano istotne statystycznie różnice w produkcji LTC₄ po stymulacji porównując AIA z kontrolą ($p=0,041$) (Tabela 20). Większe stężenia obserwowano w grupie kontrolnej.

b) STĘŻENIA LEUKOTRIENU E₄

W grupie 74 osób, u których przeprowadzano stymulacje leukocytów oprócz stężenia LTC₄ oznaczano poziomy leukotrienu E₄ wyjściowo i po stymulacji jonomycyną. W Tabeli 19 umieszczono średnie i odchylenia standardowe w poszczególnych grupach (Wykres 9).

Tabela 19 Średnie i odchylenia standardowe stężeń leukotrienu LTE_4 wyjściowo i po stymulacji w poszczególnych badanych grupach (pg/mL nadsączu).

GRUPA	$\text{LTE}_4 \text{ w}$	$\text{LTE}_4 \text{ s}$
AIA	14,1±13	1135,0±602
ATA	10,3±13	2992,0±2883
KONT	53,8±82	3462,3±1625



Wykres 9 Stężenia LTE_4 (pg/mL nadsączu) w poszczególnych grupach wyjściowo i po stymulacji jonomycyną. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej.

Podobnie, jak w przypadku LTC_4 , sprawdzono testem nieparametrycznym Mann-Whitney'a czy istnieją różnice między grupami w produkcji LTE_4 wyjściowo i po stymulacji. Obserwowano istotne statystycznie różnice w stężeniach LTE_4 po stymulacji w grupie ATA porównując do kontroli ($p=0,038$), oraz po stymulacji u AIA porównując do kontroli ($p<0,01$). Po stymulacji, LTE_4

istotnie różniło się u chorych na astmę porównując do kontroli ($p=0,02$), przy czym najwyższe stężenia LTE_4 stwierdzono u osób zdrowych (Tabela 20).

Tabela 20 Znamienności różnic między grupami stężeń CysLTs wyjściowo (w) i po stymulacji (s).

Porównanie		p		p
ATA vs. AIA	LTC_4 w	NS	LTE_4 w	NS
	LTC_4 s	NS	LTE_4 s	NS
ATA vs. kontrola	LTC_4 w	NS	LTE_4 w	NS
	LTC_4 s	NS	LTE_4 s	0,038
AIA vs. kontrola	LTC_4 w	NS	LTE_4 w	NS
	LTC_4 s	0,041	LTE_4 s	<0,001
Astma vs. kontrola	LTC_4 w	NS	LTE_4 w	NS
	LTC_4 s	NS	LTE_4 s	0,02

c) STĘŻENIA GLUTATIONU

U 58 osób w badanych grupach (AIA, ATA, Kontrola) sprawdzono czy istnieją różnice między stężeniami GSH wyjściowo i po stymulacji. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach glutationu niezależnie w żadnej z grup (Tabela 21).

Tabela 21 Średnie i odchylenia standardowe stężeń glutationu w grupach wyjściowo, po stymulacji oraz w surowicy ($\mu\text{M/L}$).

	ATA	AIA	Kontrola
GSH w	$2,56 \pm 1,78$	3,5	$3,35 \pm 1,83$
GSH s	$3,18 \pm 1,87$	$2,55 \pm 2,75$	$4,28 \pm 0,8$
GSH sur.	$2,8 \pm 1,67$	$4,6 \pm 0,14$	2,7

4.3.3 KORELACJE MIĘDZY STĘŻENIAMI LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH (EIA) A GLUTATIONEM

Zbadano czy istnieją korelacje między produkcją leukotrienów cysteinylowych (C_4 i E_4), wyjściowo, czyli przed stymulacją oraz po stymulacji leukocytów jonomycyną dla każdej z badanych grup chorych (AIA i ATA) i osób zdrowych. Korelacje szacowano metodą nieparametryczną rang Spearmana. Jak przedstawiono w Tabeli 22 korelacja między produkcją LTC_4 a produkcją LTE_4 wyjściowo oraz tymi samymi leukotrienami cysteinyłowymi po stymulacji we wszystkich badanych grupach była znamienna statystycznie. Wyjątkiem stanowiła jedynie grupa AIA, w której nie obserwowano korelacji stężeń badanych CysLTs po stymulacji. Obserwowano korelację stężeń GSH przed i po stymulacji. Jedynie w grupie AIA korelacja pomiędzy GSH przed i po stymulacji była nieistotna statystycznie.

Zbadano zależności między stężeniem GSH w surowicy a produkcją LTC_4 i LTE_4 przed stymulacją oraz po stymulacji. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy stężeniami GSH w surowicy a produkcją CysLTs przed i po stymulacji jonomycyną (Tabela 22).

Tabela 22 Korelacja produkcji między LTC₄, LTE₄ oraz GSH; wyjściowo (oznaczone jako w) i po stymulacji jonomycyną (oznaczone jako s) w każdej z grup. Zamieszczono również korelacje GSH w surowicy z produkcją CysLTs przed i po stymulacji

Grupa	Porównanie	R Spearmana	p
ATA	LTC ₄ w vs LTE ₄ w	0,7	<0,01
	LTC ₄ vs LTE ₄ s	0,8	<0,01
	GSH w vs GSH s	0,73	<0,01
	LTC ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
	LTE ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
AIA	LTC ₄ w vs LTE ₄ w	0,78	0,007
	LTC ₄ s vs LTE ₄ s	NS	NS
	GSH w vs GSH s	NS	NS
	LTC ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
	LTE ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
ASTMA	LTC ₄ w vs LTE ₄ w	0,68	<0,01
	LTC ₄ s vs LTE ₄ s	0,77	<0,01
	GSH w vs GSH s	0,6	<0,01
	LTC ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
	LTE ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
KONTROLA	LTC ₄ w vs LTE ₄ w	0,73	<0,01
	LTC ₄ s vs LTE ₄ s	0,52	0,003
	GSH w vs GSH s	0,8	<0,01
	LTC ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS
	LTE ₄ w, s vs GSH sur	NS	NS

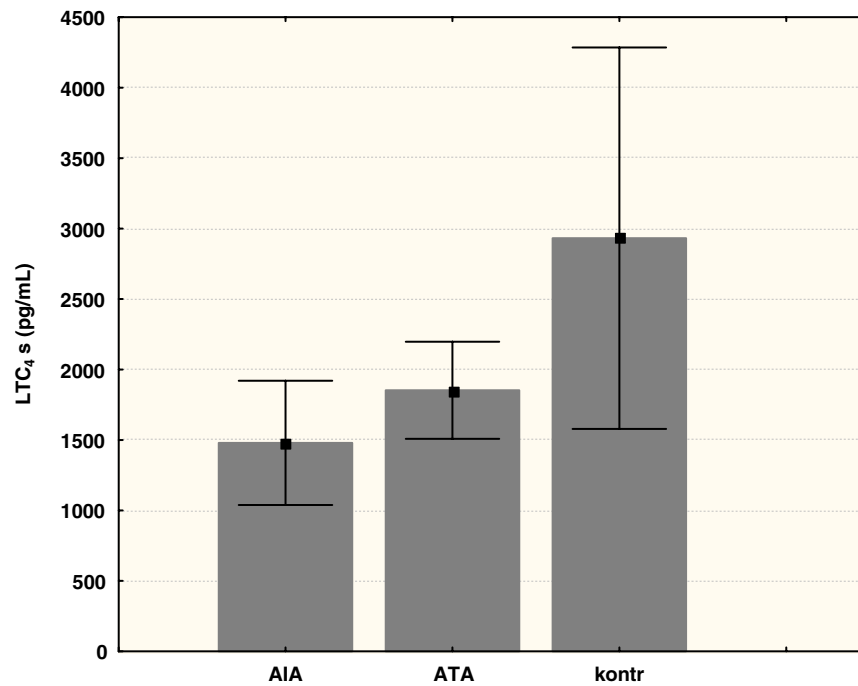
4.3.4 PRODUKCJA CysLTs MIERZONA METODĄ HPLC W POŁĄCZENIU ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (LC-MS)

U 12 pacjentów z badanej 74 osobowej grupy, weryfikowano obecność leukotrienów cysteinylowych C₄, D₄ i E₄ (pg/mL nadsączu hodowli) po stymulacji jonomycyną, metodą LC-MS. Starano się w ten sposób potwierdzić czy związki mierzone metodą EIA są rzeczywiście leukotrienami cysteinyłowymi. W badaniach oznaczano jedynie stężenia leukotrienów cysteinyłowe powstałych, w nadsącach, po stymulacji jonomycyną. Nie oznaczano niskich stężeń leukotrienów w próbkach przed stymulacją. Związane to było z ograniczoną czułością metody, która wynosiła około 200 pg/1mL.

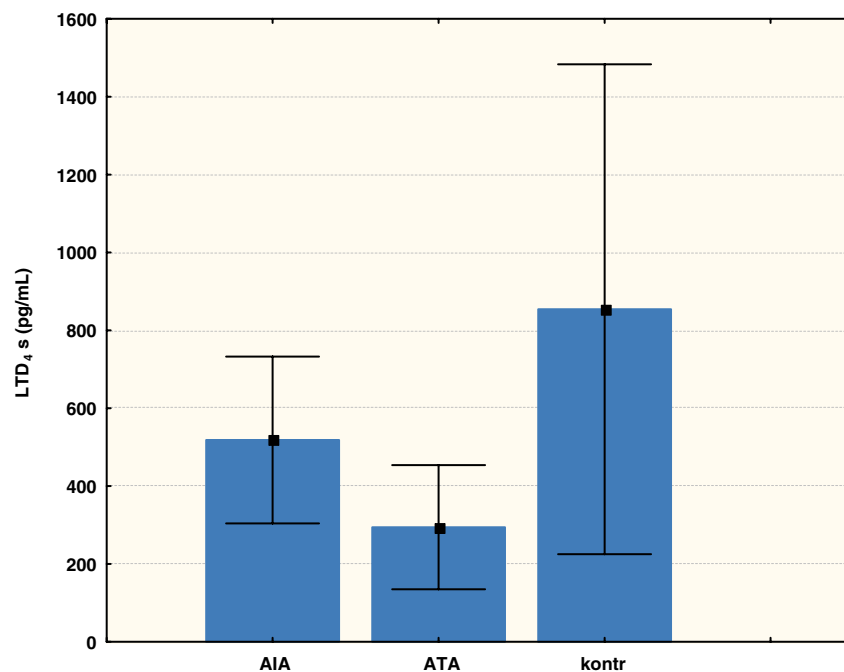
Wyliczone średnie i odchylenia standardowe dla poszczególnych grup (AIA, ATA, kontrola) zestawiono w Tabeli 23 oraz na Wykresach 10,11,12.

Tabela 23 Średnie stężenia i odchylenia standardowe leukotrienów cysteinylowych (LC-MS) po stymulacji w poszczególnych badanych grupach (pg/ mL nadsaczu)

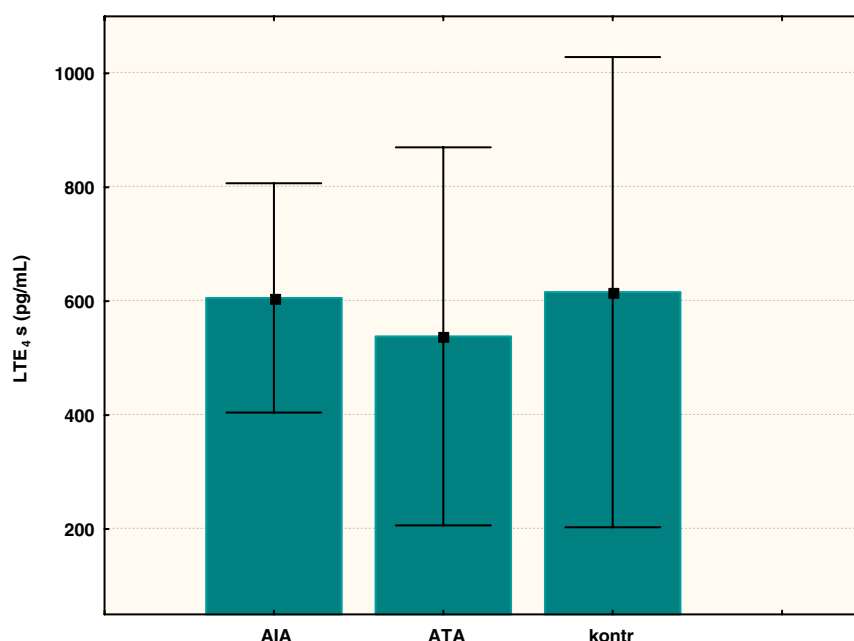
	AIA	ATA	Kontrola
LTC4 s	1479,4±985,8	1853,1±689,6	2931,9±2344,3
LTD4 s	518,4±479,1	294,3±318,9	854,2±1089,6
LTE4 s	605,8±450,1	538,2±663,8	615,9±715,0



Wykres 10 Stężenia LTC₄ (LC-MS, pg/mL nadsączu) w poszczególnych badanych grupach po stymulacji jonomycyną. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej



Wykres 11 Stężenia LTD₄ (LC-MS, pg/mL nadsączu) w poszczególnych grupach po stymulacji jonomycyną. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej.



Wykres 12 Stężenia LTE₄ (LC-MS, pg/mL nadszczu) w poszczególnych grupach po stymulacji jonomycyną. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej.

Sprawdzono testem nieparametrycznym Mann-Whitney'a czy istnieją różnice między grupami w produkcji LTC₄, LTD₄ i LTE₄ po stymulacji. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach leukotrienów cysteinylowych po stymulacji w poszczególnych grupach. Przyczyną była prawdopodobnie mała liczebność grupy badana techniką LC-MS.

4.3.5 CysLTs W GRUPACH W ZALEŻNOŚCI OD WARIANTÓW GENETYCZNYCH ZBADANYCH GENÓW

a) *GSTP1*

Analizowano 74 osoby, w tym 10 chorych na AIA, 35 ATA i 29 osób kontroli, genotypowane dla tranżycji 313 A>G *GSTP1*. Zależności między stężeniami wyjściowymi i po stymulacji LTC₄ i LTE₄ poszukiwano w relacji do poszczególnych genotypów: AA, AG, GG.

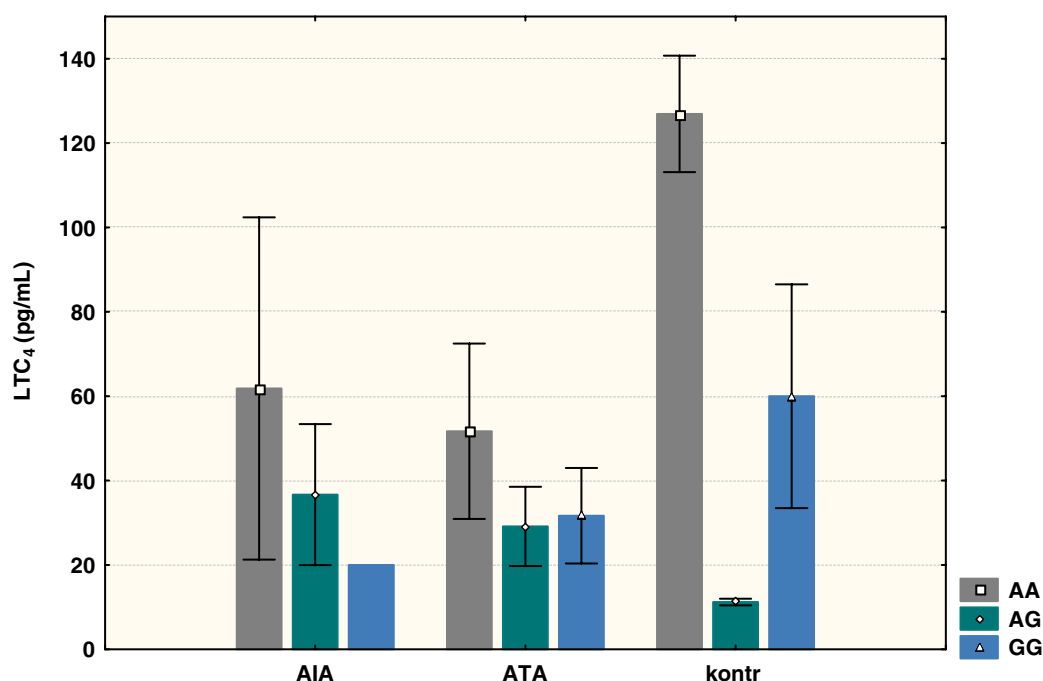
W grupie kontrolnej zaobserwowano istotne statystycznie różnice w produkcji LTC₄, LTE₄ wyjściowo ($p=0,0005$; $p<0,01$) i LTC₄ po stymulacji ($p=0,012$) przy

porównaniu genotypów AA z AG. Wyższe stężenia leukotrienów obserwowano u osób będących homozygotami dzikimi AA. Podobne różnice obserwowano przeciwstawiając homozygoty AA z GG w grupie kontrolnej, przy czym stężenia LTC₄ wyjściowo były wyższe u homozygot AA ($p=0,02$). Natomiast przy porównaniu genotypów AG z GG obserwowano wyższe stężenia LTE₄ wyjściowo u homozygot GG ($p=0,003$).

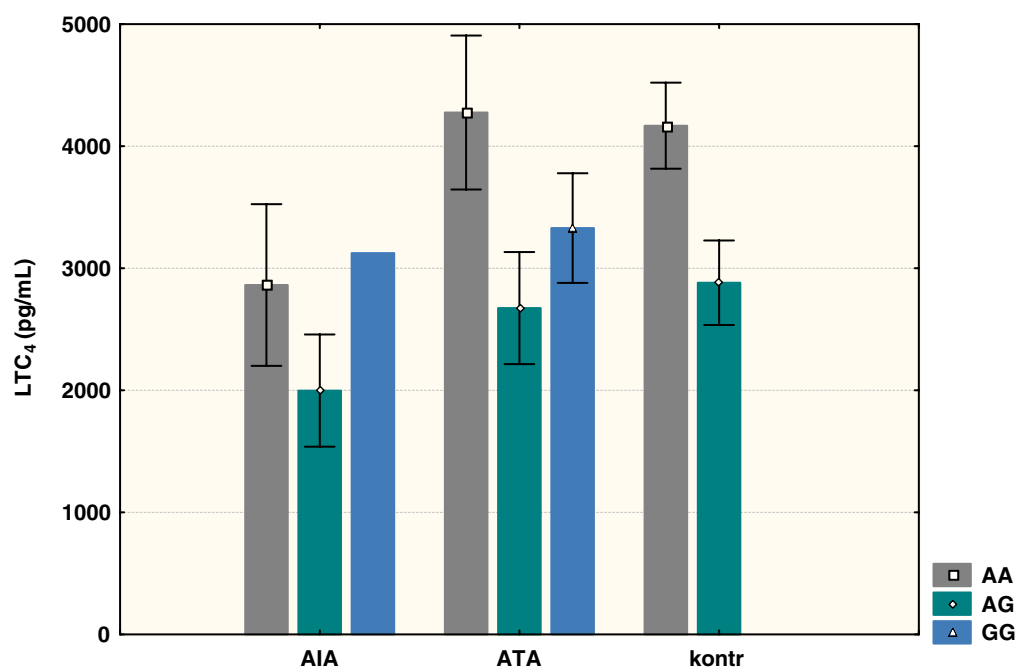
W grupie chorych na ATA obserwowano różnice w stężeniach LTC₄ po stymulacji przy porównaniu genotypów AA z AG, większa produkcja leukotrienu C₄ była u homozygot AA ($p=0,048$).

U chorych na AIA nie obserwowano istotnych różnic w stężeniach LTC₄ i LTE₄ wyjściowo i po stymulacji, przy porównaniach genotypów *GSTP1*.

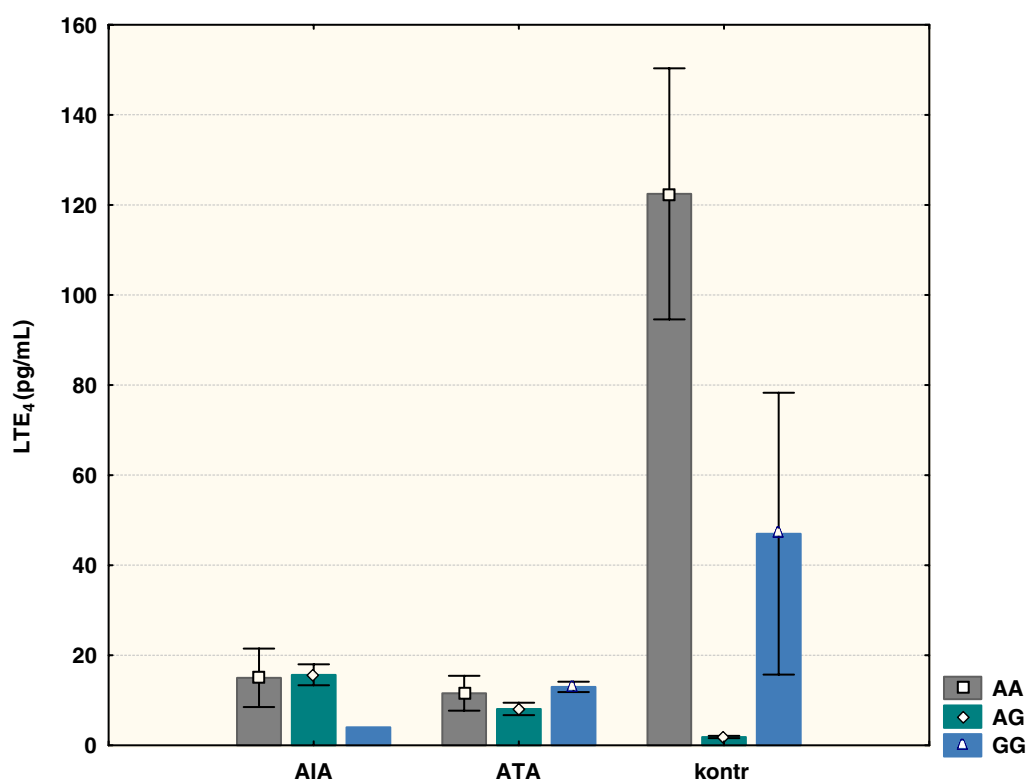
Biorąc po uwagę astmę jako całość, zauważono wzrost stężenia LTC₄ po stymulacji u homozygot AA ($p=0,037$) w porównaniu AA z AG (Wykresy 13-16).



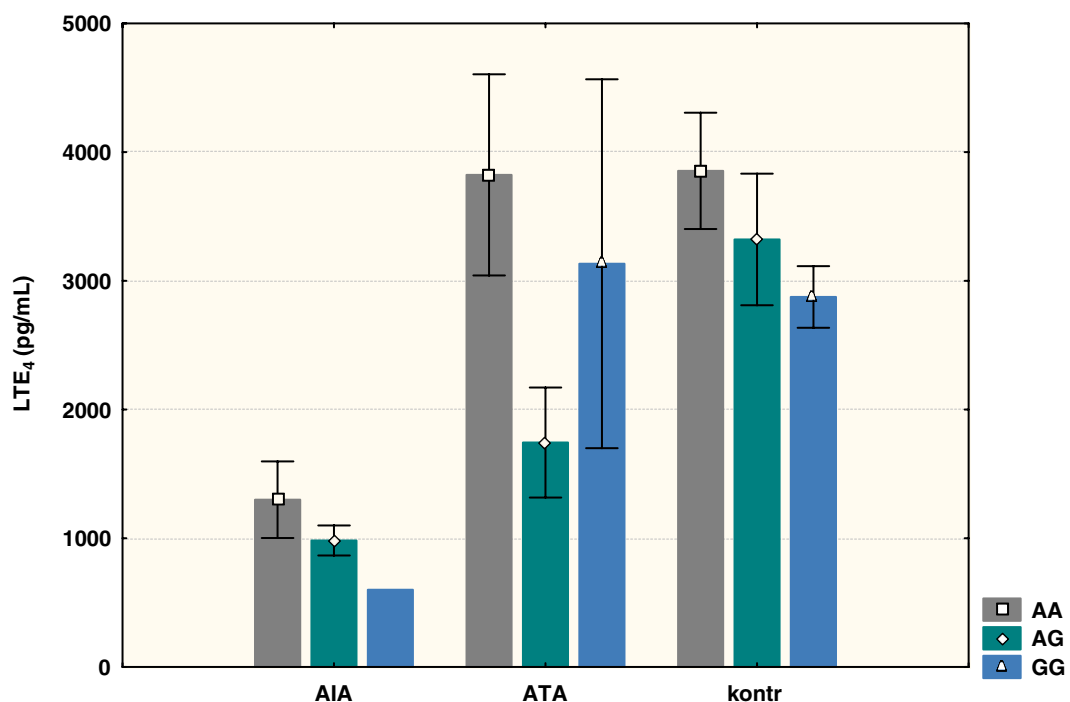
Wykres 13 Stężenia leukotrienu C₄ wyjściowo w zależności od rozpoznania i genotypu *GSTP1*. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej



Wykres 14 Stężenia leukotrienu C₄ po stymulacji w zależności od rozpoznania i genotypu *GSTP1*. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej



Wykres 15 Stężenia leukotrienu E₄ wyjściowo w zależności od rozpoznania i genotypu *GSTP1*. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej



Wykres 16 Stężenia leukotrienu E_4 po stymulacji w zależności od rozpoznania i genotypu *GSTP1*. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej

b) *GSTM1*

Porównywano zbadane 74 osoby, w tym 35 ATA, 10 AIA i 29 osób zdrowych, pod względem delecji genu kodującego *GSTM1*. Porównania kontrastowały genotyp dziki *GSTM1* (norma) z genotypem zmutowanym *GSTM1 null* (delecja). Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach leukotrienów C_4 i E_4 wyjściowo i po stymulacji w poszczególnych grupach.

c) *MDR1*

W porównaniach genotypów polimorfizmu *MDR1* 3435C>T uwzględniono 74 osoby, w tym 10 chorych na AIA, 35 na ATA i 29 osób zdrowych. Dla każdej z badanych grup poszukiwano różnicy w produkcji leukotrienu C_4 i E_4 przed i po stymulacji, w zależności od genotypu *MDR1* (CC, CT, TT). Zarówno w grupie kontrolnej, jak i wśród chorych nie zaobserwowano istotnych różnic w produkcji leukotrienów charakteryzujących dla analizowanych genotypów *MDR1*. Wyjątek stanowiła grupa chorych na ATA, w której stwierdzono, porównując genotypy CT z TT, różnice stężeń LTC_4 i LTE_4 po stymulacji

jonomycyną (odpowiednio $p=0,028$ i $p=0,036$). W obu przypadkach, przy obecności genotypu CT obserwowano większe stężenia LTC₄ i LTE₄.

d) SYNTAZA LEUKOTRIENU C₄

Zestawiono wyniki genotypów 74 osób (35 ATA, 10 AIA i 29 zdrowych) polimorfizmu *LTC₄S* -444 A>C z oznaczeniami leukotrienów C₄ i E₄ przed i po stymulacją. Porównania testem Mann'a–Whitneya poszczególnych genotypów LTC₄S (AA, AC, CC), w każdej z badanych grup, z poziomami LTC₄ i LTE₄ przed i po stymulacji nie wykazały istotnych różnic w produkcji leukotrienów cysteinylowych.

4.4 PRODUKCJA CysLTs A CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA

4.4.1 LICZBA LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ A STĘŻENIA LEUKOTRIENÓW C₄ I E₄

Przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) sprawdzającą różnice w leukocytozie (WBC) między grupami. Nie stwierdzono różnic w liczbie leukocytów między grupami, która mogłaby wpływać na syntezę leukotrienów cysteinylowych. Zbadano również korelację w poszczególnych badanych grupach, między stężeniami LTC₄ i LTE₄ wyjściowo i po stymulacji a liczbą leukocytów krwi obwodowej. Jedynie w grupie kontrolnej, obserwowano istotnie statystycznie korelacje w produkcji LTC₄ i LTE₄ po stymulacji ($R=0,56$ $p=0,002$; $R=0,43$, $p=0,03$) z liczbą leukocytów.

4.4.2 EOZYNOFILIA BEZWZGLĘDNA A STĘŻENIA LEUKOTRIENÓW C₄ I E₄

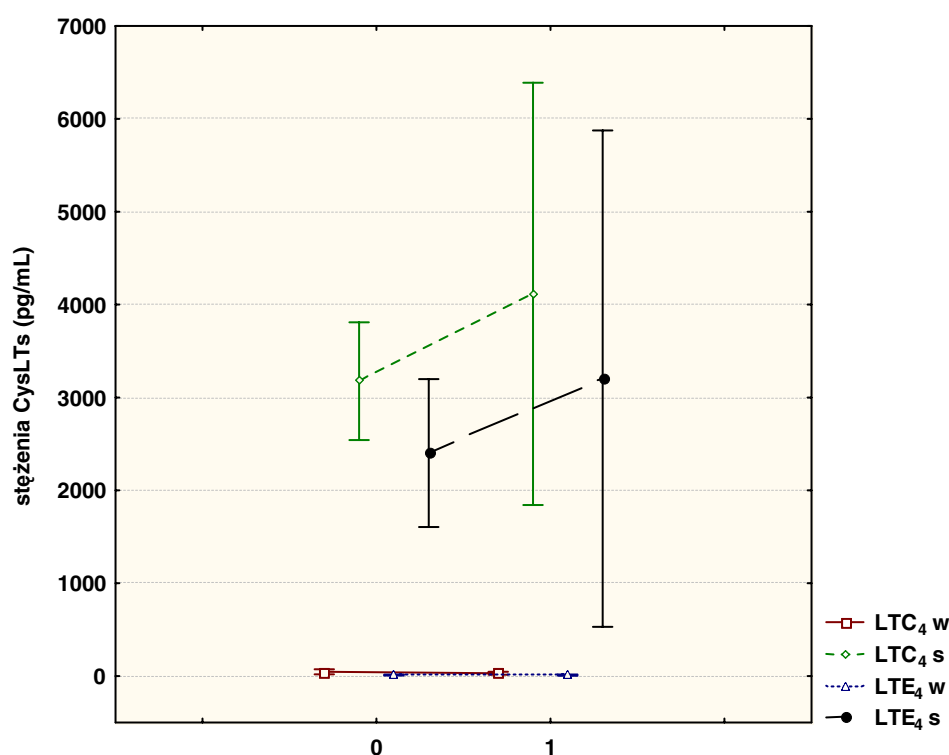
Stosując analizę wariancji (ANOVA), nie wykazano różnic w eozynofilii bezwzględnej między grupami. Zbadano korelację w poszczególnych grupach między eozynofilią bezwzględną krwi obwodowej a stężeniami leukotrienów cysteinylowych. U zdrowych po stymulacji stężenia LTC₄ korelowały ($R=0,51$, $p=0,005$) z eozynofilią bezwzględną. Znamienne korelacje stwierdzono także

w grupie chorych na AIA, u których LTE_4 przed stymulacją było silnie odwrotnie zależne od liczby eozynofii ($R=-0,76$, $p=0,016$).

4.4.3 LECZENIE ASTMY STEROIDAMI A STĘŻENIA LEUKOTRIENÓW C_4 I E_4

Analizą wariancji poszukiwano wpływu steroidów doustnych i wziewnych na stężenia LTC_4 i LTE_4 wyjściowo i po stymulacji u chorych na astmę. W grupie tej nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu przyjmowanych steroidów doustnych na obniżenie produkcji LTC_4 i LTE_4 zarówno przed jak i po stymulacji (Wykres 17).

Podobnie, analiza leczenia steroidami wziewnymi nie wykazała ich wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych wyjściowo i po stymulacji.



Wykres 17 Zależności stężeń CysLTs wyjściowo i po stymulacji u pacjentów chorych na astmę w zależności od dawki steroidów przyjmowanych doustnie. 0 - chorzy nie leczeni steroidami, 1 – chory leczeni dawką dobową 4 mg prednizonu lub więcej. Wykres przedstawia średnie i błąd standardowy średniej.

5. DYSKUSJA

5.1 BIOSYNTeza LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH W KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ

Udział leukotrienów cysteinylowych, jako mediatorów prozapalnych o działaniu chemotaktycznym na komórki zapalne, zaburzającym szczelność naczyń krwionośnych i limfatycznych, zwiększających wydzielanie śluzu w drogach oddechowych i obkurczających oskrzela został udokumentowany w wielu badaniach klinicznych i zaowocował wprowadzeniem leków antyleukotrienowych do leczenia astmy oskrzelowej. Jednakże w rozwoju atopii, czy fenotypu astmy aspirynowej podkreśla się ogólnoustrojowe zmiany, w pierwszym przypadku prowadzące do nieprawidłowej odpowiedzi humoralnej w klasie immunoglobulin E, a w drugim do systemowej nadprodukcji pochodnych szlaku 5-lipoksygenazy. W szczególności limfocyty, będące źródłem wielu cytokin w astmie, odpowiadają na stymulację leukotrienami cysteinyłowymi pobudzeniem i proliferacją. Krew obwodowa może być bogatym źródłem produktów 5-lipoksygenacji kwasu arachidonowego ze względu na obecność tego enzymu w neutrofilach. Pozostające w bliskim sąsiedztwie granulocytów płytki krwi, potrafią wykorzystywać produkowany w komórkach jednojądrzastych krwi leukotrien A_4 ze względu na jego swobodną dyfuzję przez błony komórkowe. Płytki krwi mają syntazę leukotrienu C₄ jako tzw. enzym sierocy, pozbawione są bowiem 5-lipoksygenazy. Istnieją dowody produkcji międzykomórkowej CysLTs wskazujące, że LTA₄ produkowany przez neutrofile może być wychwytywany przez płytki, komórki śródbłona naczyń krwionośnych lub mięśnie gładkie. Może to prowadzić do zwiększonej produkcji leukotrienów cysteinylowych w tych komórkach. Zwiększona zaś produkcja leukotrienów cysteinylowych w wymienionych komórkach może prowadzić do zaostrzenia objawów stanu zapalnego. Może mieć to duże znaczenie zwłaszcza w astmie wrażliwej na aspirynę [35]. Eksperymentalnie wykazano, że w przypadku niepobudzonych eozynofików bądź PMNL produkcja przez nie leukotrienów cysteinylowych jest niska. Dopiero po pobudzeniu uzyskują one pełną zdolność aktywacji szlaku

5-lipoksygenazy. Sprawdzono, że eozynofile hodowane z ludzkimi komórkami epitelalnymi (BEAS-2B) lub śródbłónka znacznie nasilają produkcję CysLTs. Tłumaczone jest to regulacją parakrynną mediatorami uwalnianymi z komórek nabłonkowych, lub transportem LTA₄ z PMNL do komórek śródbłónka. Zjawisko to mogłyby wyjaśniać interakcje komórek nabłonkowych z PMNL w płucach, gdzie leukotrieny cysteinyłowe odpowiedzialne są między innymi za skurcz oskrzeli, wydzielanie śluzu czy przebudowę ich ściany [17,55,56]. W wybranym modelu *in vitro* wykorzystano zdolność IL-3 do wstępnej aktywacji szlaku 5-lipoksygenazy, czyli tzw. *primingu* granulocytów. Podobne właściwości mają też inne cytokiny, np. IL-5 oraz GM-CSF.

5.2 WPŁYW POLIMORFIZMÓW *GSTP1*, *GSTM1* NA ROZWÓJ ASTMY

Większość badań genetycznych dotyczących astmy koncentruje się na badaniu polimorfizmów w genach regionów chromosomowych 11q i 5q, powiązanych w badaniach rodzinnych z cechami fenotypowymi astmy, takimi jak nadreaktywność oskrzeli czy atopia. Na chromosomie 11q13 zlokalizowany jest gen kodujący receptor IgE o wysokim powinowactwie oraz białko sekrecyjne komórek Clara (CC16), zaś na chromosomie 5q31-33 geny kodujące β_2 –adrenoreceptor, liczne cytokiny, np. IL-4 i ich receptory. Uważa się, że geny zlokalizowane na chromosomie 11 mogą mieć wpływ na rozwój astmy [31,39]. Na chromosomie tym znajduje się też gen kodujący enzym S-transferazę glutationu P1, stąd zainteresowanie tym enzymem. GSTP1 odpowiedzialny jest za detoksyfikację ksenobiotyków w organizmie poprzez ich sprzęganie z glutationem. Enzym ten obecny jest głównie w wątrobie, ale jego lokalizację potwierdzono też w płucach, gdzie usuwa on m.in. reaktywne formy tlenu (ROS) powstałe wskutek drażniącego działania np. ozonu na górne drogi oddechowe. Większość badań na ten temat związana była z wpływem polimorfizmu *GSTP1* na fenotyp astmy. Dotychczas nie brano pod uwagę w tych badaniach nadreaktywności na niesteroidowe leki przeciwzapalne, a opublikowane prace nie rozróżniały chorych na astmę tolerujących aspirynę (ATA) od chorych nadwrażliwych na aspirynę (AIA). Dotychczas wiadomo było, że polimorfizm *GSTP1*, polegający na

podstawieniu w pozycji 313 łańcucha nukleotydowego cDNA adeniny guaniną (313A>G), która powoduje zamianę izoleucyny 105 na walinę, zmienia podatność substratową tego enzymu [125]. Okazuje się, że homozygoty GG (¹⁰⁵Val/¹⁰⁵Val) znacznie częściej wstępują wśród osób zdrowych niż w astmie. Zauważono związek z występowaniem większej nadreaktywności oskrzeli i atopii mierzonej poziomami IgE oraz testami skórnymi z alergenami, u chorych będących homozygotami AA (¹⁰⁵Ile/¹⁰⁵Ile) niż homozygotami GG. U homozygot GG rzadziej obserwowano dodatnie testy skórne i poziomy IgE powyżej 100IU/ml, aniżeli u homozygot AA [31, 39,108]. W przedstawionej pracy wyniki nie potwierdzają związku polimorfizmu *GSTP1* z cechami atopii i nadreaktywnością oskrzeli. Stwierdzone różnice poziomów całkowitych IgE, niższych u kontroli w porównaniu do grupy chorych, wskazują jedynie na poprawny dobór grup badanych, lecz nie na reakcję chorych z polimorfizmem *GSTP1*. Podobnie parametr czynności płuc (FEV₁) był niższy w grupie chorych w porównaniu do zdrowych, bez związku z tym polimorfizmem. Brak związku polimorfizmu *GSTP1* z cechami atopii i nadreaktywnością oskrzeli mógł być spowodowany małą liczebnością badanej grupy. W naszym przypadku były to tylko 74 osoby, zaś w przypadku badania Fryer i wsp. liczebność przekraczała 100 osób [31]. W naszych badaniach, podobnie jak w pracy Fryer i wsp., potwierdziliśmy rzadsze występowania allelu protekcyjnego ¹⁰⁵Val w grupie astmy w porównaniu do zdrowej kontroli. Różnica ta była silniej widoczna u chorych na astmę aspirynową (AIA). Jednak wyniki te nie były istotne statystycznie.

Obliczenia wykazują, że u homozygot *GSTP1* GG iloraz szans wystąpienia astmy jest niższy niż u homozygot AA [1,31,92]. Podobne zależności zauważono u chorych AIA w porównaniu do ATA (ATA traktowano jako kontrolę). Ponownie, z powodu niedostatecznej mocy badania wyniki te jednak nie były istotne statystycznie.

Na związek polimorfizmu *GSTP1* z rozwojem astmy wskazują liczne badania epidemiologiczne, zwłaszcza w astmie zawodowej, wyzwolonej ekspozycją na ksenobiotyki [34].

Badanie polimorfizmu *GSTP1* może mieć znaczenie w określeniu ryzyka astmy u dzieci, kwalifikowanych do grupy. Wśród dzieci z rejonów południowego Tajwanu, zróżnicowanych pod względem nasilenia

zanieczyszczenia powietrza, zauważono związek gen-środowisko. Polegał on na interakcji między polimorfizmem *GSTP1* a nasileniem zanieczyszczenia powietrza i kształtował ryzyko rozwoju astmy. U dzieci będących homozygotami AA, w rejonach silnie uprzemysłowionych, ryzyko rozwoju astmy było bardzo wysokie w porównaniu do homozygot GG [63]. Jak się okazuje nie tylko środowisko może mieć wpływ na rozwój astmy u dzieci, lecz także palenie papierosów i cechy atopii u matki podczas ciąży. Genotyp *GSTP1* matki (ale nie ojca) może modulować fenotyp astmy u dziecka. Zauważono, że genotyp matki będącej homozygotą GG może być związany ze spadkiem ryzyka wystąpienia nadreaktywności oskrzeli i atopii u dzieci we wczesnym dzieciństwie [12,15].

W wyniku przeprowadzonego badania nie stwierdzono istotnego wpływu polimorfizmu *GSTM1* na podatność rozwoju astmy. Interesujące jest natomiast stwierdzenie związku genotypu delecyjnego *GSTM1* z POCHP. Częstość występowania genotypu zmutowanego *GSTM1 null/null* (delecja) była największa w tej grupie, zbadanej genetycznie ze względu na możliwość asocjacji z polimorfizmami szlaku usuwania reaktywnych form tlenu. Interesująca jest także obserwacja nieco mniejszej częstości genotypu delecyjnego w grupie ATA, niż u zdrowych lub AIA (48,6% vs. 53,1%, 53,3%). Nowsze doniesienia na temat *GSTM1* sugerują raczej istnienie odwrotnego związku genotypu *GSTM1 null* z patogenezą astmy, zwłaszcza z rozwojem astmy atopowej [5,117]. Ryzyko wystąpienia astmy mogłoby wzrosnąć nawet około trzykrotnie, zwłaszcza w połączeniu genotypu *GSTM1 null* z polimorfizmem w obrębie genu *GSTT1* [52]. Badania takie przeprowadzono tylko na populacjach rosyjskiej i tureckiej.

Podobnie jak w przypadku genu *GSTP1*, istnieje asocjacja genetyczna polimorfizmu *GSTM1* z nadreaktywnością oskrzeli i astmą, zwłaszcza w tych przypadkach gdzie ujawnienie choroby powiązane było z ekspozycją na ksenobiotyki [34].

5.3 WPŁYW POLIMORFIZMÓW *GSTP1*, *GSTM1* NA ROZWÓJ POCHP

Jak wynika z naszych badań, częstość allelu A dla polimorfizmu genu *GSTP1* u chorych na POCHP była wyższa niż allelu G. Jednak w porównaniu do kontroli nie było to istotne statystycznie. Wyniki te potwierdzałyby wcześniejsze doniesienia, o częstszym występowaniu allelu 313A u chorych na POCHP w populacji japońskiej, ale nie koreańskiej [50,100,128]. Homozygoty dzikie *GSTP1* (AA) mają mniejszą zdolność do rozkładania kancerogennych aromatycznych epoksydów obecnych w dymie papierosowym niż homozygoty zmutowane, co ma swoje uzasadnienie w zwiększonym ryzyku rozwoju POCHP. Okazuje się jednak, że większe znaczenie w rozwoju POCHP ma kombinacja polimorfizmów: genu *mEPHX* (mikrosomalna hydrolaza epoksydów), delecji genu *GSTM1* i występowania homozygot dzikich *GSTP1* [14]. Znalazło to potwierdzenie w przeprowadzonym badaniu w przypadku *GSTM1*, obserwowano bowiem większy odsetek chorych na POCHP z genotypem *GSTM1null/null* w porównaniu do kontroli.

5.4 WPŁYW POLIMORFIZMÓW *LTC₄S* I *MDR1* NA ROZWÓJ ASTMY

Syntaza leukotrienu C₄ jest enzymem bezpośrednio zaangażowanym w produkcję leukotrienu C₄. Polimorfizm w obrębie genu kodującego *LTC₄S* może mieć kluczowe znaczenie w nadprodukcji leukotrienów cysteinylowych w astmie, zwłaszcza w jej odmianie z nadreaktywnością na niesteroidowe leki przeciwzapalne. Zostało to wykazane na podstawie badania bioptatów oskrzeli u chorych na astmę aspirynową, gdzie zauważono nadekspresję *LTC₄S* w badanych próbkach korelującą z nasileniem wrażliwości na aspirynę w próbach prowokacyjnych [96,114]. Dlatego też celem naszym było sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy polimorfizmem -444A>C a występowaniem nadprodukcji leukotrienów. Chcieliśmy też sprawdzić czy, jak to opisano wcześniej, w populacji polskiej allel -444C jest częstszy u chorych na astmę wrażliwych na aspirynę (AIA). Częstości allelu C okazały się prawie równe w grupach (AIA, q=0,32; ATA, q=0,27; kontrola q=0,33). Nieco mniejszą

częstość wykazywała grupa ATA w porównaniu do kontroli, jednak nie były to znaczące różnice. Chorzy na astmę wrażliwi na aspirynę nie mieli zwiększonej częstością allelu C. Mogło to być spowodowane najprawdopodobniej lekkim przebiegiem choroby u tych pacjentów. Wiadomo, że jedynie chorzy na astmę, którzy nie tolerują NLPZ, charakteryzują się zwiększoną częstością występowania allelu -444C przy cięższym przebiegu choroby [99]. Wyniki nasze podobne są do badań grupy amerykańskiej, która dowiodła, że w populacji amerykańskiej polimorfizm *LTC₄S* -444A>C nie kojarzy się z specyficznym fenotypem astmy. Częstości allelu -444C nie różniły się w tej populacji między grupami AIA i ATA. Jednak, żeby być pewnym tych wniosków, należałoby zwiększyć liczbę osób w grupach. Trzeba brać także pod uwagę odmienności etniczne, które w niejednorodnej populacji amerykańskiej mogą mieć wpływ na wyznaczane częstości alleliczne [121].

Genem, który ma duże znaczenie w transporcie leukotrienów cysteinylowych na zewnątrz komórki jest gen odporności wielolekowej *MDR1*. Gen ten koduje białko integralne błony - transporter ATP-zależny, zwany także P-glikoproteina. Białko to, odpowiedzialne jest za transport CysLTs z komórek je produkujących do przestrzeni międzykomórkowej [16]. Udowodniono, że wiązanie LTC₄ przez P-glikoproteinę, może być łatwo zahamowane poprzez dodanie antagonisty receptora leukotrienu MK 571 do hodowli komórkowych [62, 116].

Naszym głównym celem było sprawdzenie czy polimorfizm 3435C>T genu *MDR1* może wpływać na większe wydzielanie CysLTs na zewnątrz komórki, a przez to nasilać objawy stanu zapalnego w astmie. Zgodnie z uprzednimi badaniami, w których homozygoty CC charakteryzowały się większą ekspresją P-glikoproteiny, sądziliśmy że osoby z tym allelem powinny uwalniać więcej leukotrienów cysteinylowych. Stąd też założenie, że astmatycy, zwłaszcza chorzy na AIA, powinni mieć większą częstość występowania allelu C. Okazało się jednak, że genotyp CC nie jest częstszy w astmie (AIA lub ATA) w porównaniu do kontroli (22,4%, 22,9% vs 17%). Wyniki genotypowania populacji polskiej, zwłaszcza kontroli, nie odbiegają od częstości genotypowych wśród różnych populacji europejskich [54]. Do tej pory nikt badań tego genu nie prowadził u chorych na astmę.

Przeprowadzone *in vitro* eksperymenty nad produkcją leukotrienów cysteinylowych częściowo potwierdziły wstępne założenia pracy. Zaobserwowano bowiem w grupie ATA o genotypie *MDR1* CT wyższe stężenia LTC₄ i LTE₄ po stymulacji jonomycyną w porównaniu do genotypu TT ($p=0,028$; $p=0,036$). Można to tłumaczyć na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych nad wchłanianiem leku digoksyny. Zauważono, że u homozygot TT była mniejsza ekspresja P-glikoproteiny w ścianie jelit, zaś większe stężenie leku w surowicy. Świadczyłoby to o związku mniejszej ekspresji genu *MDR1* z mniejszą ilością leku transportowanego do komórki [123]. Sytuację tę można przełożyć na produkcję CysLTs w komórce. Homozygoty TT mające mniejszą ekspresję P-glikoproteiny charakteryzuje ograniczony transport leukotrienów cysteinylowych do przestrzeni międzykomórkowych, a więc mniejsze stężenie CysLTs w nadsączach hodowlanych.

5.5 PRODUKCJA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH

Leukotrieny cysteinyłowe odgrywają, jako mediator prozapalny, ważną rolę w zaostrzeniu objawów astmy. Dotyczy to szczególnie astmy wrażliwej na aspirynę (AIA). Wiadomo, że inkubacja wstępna leukocytów izolowanych od pacjentów z astmą aspirynową z IL-3 powoduje wzrost biosyntezy leukotrienów cysteinylowych [73,119]. Doniesienia okazały się niestety niezgodne z przedstawionymi badaniami własnymi. W wykonanych eksperymentach stężenia zarówno LTC₄ jak i LTE₄ przed i po stymulacji jonomycyną nie były zwiększone w grupie astmatyków (zwłaszcza AIA) w porównaniu do kontroli, co obrazuje Tabela 18,19. Paradoksem jest to, że najwyższe stężenia obu leukotrienów obserwowano w grupie kontrolnej. Stężenia LTC₄ w grupach przed stymulacją były podobne. Po stymulacji stężenia leukotrienu C₄ w grupie ATA i u kontroli były na podobnym poziomie, jedynie u AIA były one niższe w porównaniu do kontroli ($p=0,041$). Wyższe stężenia LTE₄ były widoczne w grupie kontrolnej, zwłaszcza po stymulacji, w porównaniu do ATA czy AIA ($p=0,038$, $p<0,001$).

Podobną sytuację obserwował w swoim doniesieniu Ćelik i wsp., wyjściowo nie stwierdzając różnic w poziomach leukotrienów cysteinylowych u AIA, ATA i

kontroli. Jednak w odmiennym modelu, w pracy tej wykazano wzrosty stężeń leukotrienów po stymulacji aspiryną w grupie AIA. W grupie ATA i u kontroli nie zanotowano wzrostu stężeń i były one na podobnym poziomie. Wzrosty poziomów leukotrienów, uwalnianych z leukocytów, obserwowano także po stymulacji komórek krwi peptydem fMLP i cytochalazyną –B (Cyt-B). Oba te związki znane są z tego, że indukują niespecyficzną produkcję CysLTs. Dodanie PGE₂ do hodowli leukocytów stymulowanych: ASA, fMLP oraz Cyt-B, powodowało obniżenie syntezy leukotrienów cysteinylowych we wszystkich grupach, zwłaszcza jeśli stosowano najwyższe stężenie PGE₂ [13].

Biorąc pod uwagę tylko grupy AIA i ATA, nie obserwowano znaczących różnic w poziomach CysLTs między nimi. Stężenia LTC₄ i LTE₄ były nieco niższe w grupie AIA aniżeli w grupie ATA. Potwierdziłoby to wcześniejsze doniesienia, że pomiar uwalnianych CysLTs przez leukocyty krwi obwodowej stymulowanych aspiryną nie jest dobrym testem diagnostycznym w rozróżnianiu ATA od AIA [83]. W pracy tej nie obserwowano różnic między stężeniami CysLTs pomiędzy AIA i ATA. Obserwowano za to wyższe stężenia LTE₄ w moczu u AIA w porównaniu do ATA. Jak wspomniano wcześniej, w naszym badaniu stężenia LTE₄ były niższe w grupie AIA w porównaniu do ATA.

Stosując metodę HPLC w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS), mającą na celu potwierdzenie, że związki mierzone metodą EIA były rzeczywiście leukotrienami cysteinyłowymi, otrzymano podobne wyniki jak, przy pomiarach techniką EIA. Ze względu na mniejszą czułość metody LC-MS, około 100pg/0,5mL płynu hodowlanego, do oznaczeń posłużyły tylko próbki po stymulacji jonomycyną. Okazuje się, że stężenia leukotrienu C₄ mierzone tą metodą były także wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu do astmy. Nie obserwowano różnic między AIA i ATA. Biorąc pod uwagę LTD₄ i LTE₄ zauważono, że stężenia tych leukotrienów są na podobnym poziomie. Porównując te dane z wynikami otrzymanymi metodą EIA zauważono, że stężenia leukotrienów cysteinylowych mierzonych tą metodą są prawie dwukrotnie wyższe (w dwóch przypadkach nawet 5-krotnie wyższe) od stężeń otrzymanych metodą LC-MS. Świadczyłoby to o tym, że metoda EIA, choć charakteryzuje się większą czułością, a więc bardziej nadaje się do pomiarów leukotrienów cysteinylowych w niestymulowanych próbkach; jest także mniej

swoista i zawyża wyniki w obecności materiału krzyżowo reagującego z używanym przeciwciałem.

Nieco odmienne wyniki, niż publikowane wcześniej, mogą wynikać też z faktu, że pacjenci w dniu pobrania krwi do izolacji leukocytów pozostawali pod wpływem leków przeciwastmatycznych.

Wyższe stężenia leukotrienów cysteinylowych w grupie kontrolnej po stymulacji, były skorelowane z liczbą leukocytów we krwi (WBC). Jest to logiczne, jako że komórki te są głównie zaangażowane w produkcję CysLTs (LTC_4 : $R=0,56$ $p=0,002$; LTE_4 : $R=0,43$, $p=0,03$). Podobnie obserwowano korelację eozynofilii ze stężeniami leukotrienów. W grupie AIA korelacja stężenia LTE_4 po stymulacji była ujemna i wynosiła $R=-0,76$, $p=0,016$. Mogłoby to świadczyć o defekcie przemiany leukotrienu C_4 do E_4 w tej grupie. Jako ostatni produkt przemiany szlaku 5-lipoksygenazy, LTE_4 wykazuje najslabszą aktywność agonisty receptorów CysLT1 i CysLT2. Być może najniższe poziomy LTE_4 obserwowane po stymulacji u chorych na AIA mają związek z często u nich stwierdzaną zwiększoną eozynofilią, a samo hamowanie przemiany LTC_4 do LTE_4 jest odpowiedzialne za występujące niekiedy u tych chorych objawy uogólnione, z wstrząsem włącznie. Najwyższe stężenie LTE_4 są bowiem oznaczane w moczu.

W grupie chorych na astmę nie obserwowano istotnego statystycznie wpływu przyjmowanych steroidów doustnych na produkcję LTC_4 i LTE_4 , zarówno przed jak i po stymulacji. Również leczenie steroidami wziewnymi nie miało wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych wyjściowo i po stymulacji, w badanych grupach chorych.

Głównym celem pracy było sprawdzenie, czy istnieje wpływ polimorfizmu *GSTP1* na produkcję LTC_4 i LTE_4 wyjściowo i po stymulacji jonomycyną. Jak wspomniano, w grupie AIA wykazano nieco niższą częstość allelu protekcyjnego ¹⁰⁵ Val w porównaniu do kontroli. Jak się okazało polimorfizm genu *GSTP1* może mieć wpływ na produkcję CysLTs. Zarówno w grupie ATA jak i u kontroli zauważono, że wzrosty stężeń leukotrienów cysteinylowych są większe u homozygot dzikich AA *GSTP1* aniżeli u homozygot GG. Zakładając, że enzym GSTP1 może uczestniczyć w produkcji leukotrienów cysteinylowych, logicznym wytłumaczeniem tego zjawiska jest łatwiejsze sprzęganie zredukowanego glutationu z LTA_4 przez enzym w formie

nie zmutowanej. Konsekwencją tego może być powstawanie większej ilości LTC₄. Gdy dziedziczony jest zmutowany genotyp *GSTP1*, ma to działanie ochronne, w postaci zmniejszonej produkcji leukotrienu C₄.

Biorąc pod uwagę polimorfizm *LTC₄S*, zastanawiające jest to, że nie było istotnych różnic w grupach w produkcji LTC₄ i LTE₄ przed i po stymulacji w powiązaniu z różnymi wariantami allelicznymi. Można więc zasugerować możliwość, że enzymy *GSTP1* i *LTC₄S* uzupełniają się nawzajem w warunkach przezkomórkowej biosyntezy leukotrienów cysteinylowych.

Większość badań nad przezkomórkową produkcją leukotrienów cysteinylowych dotyczy przede wszystkim formy mikrosomalnej GST (MGST2,3). Może to być związane ze specyfiką jej występowania w organizmie. Enzym GSTP1 występuje przede wszystkim w wątrobie, nie mniej jednak obecność jego udowodniono także w komórkach nabłonkowych płuc. Jednak w obu przypadkach główną jego funkcją jest przede wszystkim biotransformacja ksenobiotyków. Rozpatrując produkcję CysLTs w astmie częściej bierze się pod uwagę syntazę leukotrienu C₄. Przeprowadzone badania na szczurach, którym dootrzewnowo wstrzykiwano lipopolisacharyd (LPS), wykazały zdolność indukcji tej swoistej syntazy. LPS odpowiedzialny jest za aktywację komórek systemu immunologicznego, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej produkcji prozapalnych cytokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Cytokiny te z kolei powodują nasilenie reakcji zapalnej mogącej objawiać się gorączką, tachykardią czy ogólnym zmęczeniem. Stwierdzono, że po wstrzyknięciu szczurom LPS, poziomy mRNA dla *LTC₄S* wzrastały już po 1 godzinie w sercu, mózgu, wątrobie i nadnerczach. Po 6 godzinach wracały one jednak do normy. Jak się okazało poziomy mRNA MGST2 nie podnosiły się po podaniu LPS. Może to dowodzić braku zaangażowania MGST2 w indukowaną produkcję LTC₄ w tych narządach, podczas reakcji obronnych gospodarza, jakkolwiek nie wyklucza biosyntezy leukotrienów cysteinylowych na poziomie podstawowym. W organizmie człowieka nie ma na ten temat zbyt wielu doniesień [103].

Enzymy: syntaza leukotrienu C₄ oraz MGST2 kolokalizują, mogąc ze sobą współdziałać. Udowodniono, że enzymy te w komórkach ludzkich są zlokalizowane w błonie otoczki jądrowej oraz w błonach retikulum endoplazmatycznego (zwłaszcza MGST2). Wstępują one zarówno w płucach,

łożysku, jelicie, mięśniach szkieletowych, macicy oraz mózgu. Jednak ekspresja tych enzymów nie zawsze jest taka sama [103, 112]. Oba enzymy nie działają w tym samym momencie i np.: LTC₄, produkt działania syntazy leukotrienu C₄, może być silnym inhibitorem MGST2. Może to świadczyć o interakcji enzymów mogących nawzajem zmieniać swoje aktywności katalityczne, co może powodować regulację produkcji leukotrienu C₄. Istnieje zatem interakcja między białkoma między tymi dwoma enzymami [112].

Przykładem komórek, w których właśnie MGST2 odgrywa główną, jeśli nie jedyną, rolę w produkcji leukotrienów cysteinylowych na drodze sprzęgania glutationu z leukotrienem A₄, są ludzkie komórki śródbłonkowe izolowane z żyły pępowinowej (HUVEC). Odkrycie to mogłoby świadczyć o tym, że enzym MGST2 jest jedynym enzymem odpowiedzialnym za produkcję LTC₄ w ścianie naczyń. Na powierzchni tych komórek odkryto także ekspresję receptora dla leukotrienów cysteinylowych - CysLT₁. Przez receptory te może odbywać się regulacja para- i autokrynną śródbłonka. Dowiedziono także, że MGST2 może przyłączać zarówno metylowany ester LTA₄ jak i wolny LTA₄. Syntaza leukotrienu C₄ preferuje zaś tylko formę metylovaną LTA₄ do sprzęgania z GSH i produkcji LTC₄ [107].

Dotychczas nie ma jednoznacznych doniesień o roli polimorfizmu *GSTP1* w produkcji leukotrienów cysteinylowych, zwłaszcza w powiązaniu z astmą aspirynową. Wiadomo, że polimorfizm ten może mieć wpływ na atopię lub nadreaktywność oskrzeli w astmie. Tak więc enzym ten nie musi być dobrym markerem biochemicznym przydatnym w celu diagnostyki astmy. Większa produkcja leukotrienów cysteinylowych może być związana z innymi szlakami biosyntezy, np. przez formę mikrosomalną GST (MGST2). Warto jednak rozważyć, czy rzeczywiście tylko *LTC₄S* ma wpływ na produkcję CysLTs, zwłaszcza w świetle otrzymanych przez nas wyników, w których wykazano asocjację polimorfizmu *GSTP1* z produkcją leukotrienów cysteinylowych w astmie oskrzelowej.

6. WNIOSKI KOŃCOWE

- 1) Genotyp *GSTP1* wpływa na stymulowaną produkcję leukotrienów cysteinylowych. Jest ona zwiększona u homozygot AA (Ile¹⁰⁵/Ile¹⁰⁵) w grupie ATA i u kontroli.
- 2) Produkcja leukotrienów cysteinylowych C₄ i E₄ *in vitro*, wyjściowo i po stymulacji, jest wyższa w grupie kontrolnej niż w grupie AIA czy ATA, przy czym stężenie glutationu nie ma na nią wpływu.
- 3) Leukocytoza koreluje ze stymulowaną produkcją CysLTs u zdrowych. Eozynofilia w grupie AIA ujemnie koreluje ze stężeniem LTE₄ po stymulacji. Biosyntezie LTC₄ *in vitro* towarzyszy wydajna przemiana tego leukotrienu do jego pochodnych D₄ i E₄, jakkolwiek zjawisko to przypisywano dotychczas peptydazom osoczym.
- 4) Polimorfizmy *GSTM1* i *LTC₄S* nie mają wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych. Polimorfizm genu *MDR1* w grupie ATA kojarzy się z wyższym stężeniem leukotrienów cysteinylowych C₄ i E₄ po stymulacji u heterozygot CT w porównaniu do homozygot TT.
- 5) Nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach wariantów allelicznych zbadanych genów *GSTP1*, *GSTM1*, *MDR1* i *LTC₄S* między grupami chorych na AIA, ATA i POCHP a zdrową kontrolą. Nie stwierdzono też związku polimorfizmów *GSTP1* i *GSTM1* z cechami atopii oraz parametrami czynności płuc w poszczególnych grupach.
- 6) Leczenie doustne steroidami nie ma wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych C₄ i E₄ *in vitro*.

7. STRESZCZENIE

WSTĘP

S-transferazy glutationu (GSTs) należą do grupy enzymów sprzęgających substancje elektrofilne ze zredukowanym glutationem. Głównym zadaniem GSTs jest detoksyfikacja różnych ksenobiotyków np.: 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu. Wśród licznych izoform istnieją geny, które kodują mitochondrialne, mikrosomalne formy tego enzymu (MGST-I, MGST-II i MGST-III) oraz 8 genów, zlokalizowanych na różnych chromosomach, kodujących cytoplazmatyczną formę tego enzymu. W skład tych ostatnich wchodzi klasy: alfa, mu, theta, pi, zeta, sigma, kappa i omega. Największe zainteresowanie budzą polimorfizmy w genach kodujących klasy: mu (*GSTM*), pi (*GSTP*) i theta (*GSTT*). Mogą one być powiązane ze zwiększeniem ryzyka zachorowania na tak różne choroby jak np.: astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc (POCHP) czy nowotwory. Enzym GSTP1 obecny jest zarówno w wątrobie jak i płucach. W płucach usuwa on m.in. reaktywne formy tlenu (ROS), powstałe w wyniku działania różnych substancji drażniących (np. ozonu) na górne drogi oddechowe. Niedobór aktywności (np. u chorych z atopią) enzymu GSTP1 powoduje, że ROS mogą swobodnie działać, poprzez swoje produkty, na kwas arachidonowy, który ulega przemianom do izoprostanów. Te zaś jako mediatory zapalne mogą nasilać objawy zapalenia górnych dróg oddechowych. Geny klasy GST Pi mogą mieć wpływ na podatność zachorowania na astmę. GSTs mogą sprzęgać leukotrien A₄ ze zredukowanym glutationem, a więc mogą brać udział w produkcji leukotrienów cysteinylowych (CysLTs) w astmie. CysLTs są dobrze znanymi mediatorami biorącymi udział w patogenezie astmy. U astmatyków wrażliwych na aspirynę wykazano nadprodukcję leukotrienów cysteinylowych w drogach oddechowych.

ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Podstawienie izoleucyny w pozycji 105 enzymu GSTP1 walina powoduje zwiększenie aktywności tego enzymu. Wykazano, że u chorych na astmę alergiczną i z nadreaktywnością oskrzeli (BHR) częstość występowania homozygot Val¹⁰⁵/Val¹⁰⁵ jest znamienne mniejsza w porównaniu do kontroli. Wysłunięto przypuszczenie, że zarówno atopia jak i BHR są powiązane z polimorfizmem genu *GSTP1*. U ludzi, u których enzym GSTP1 ma Val w pozycji 105 miałyby występować efektywniejsze usuwanie wolnych rodników tlenowych. Polimorfizm innej transferazy, *GSTM1 null* (brak enzymu) nie jest powiązany z atopią, nadreaktywnością oskrzeli (BHR) i astmą ale może sprzyjać wystąpieniu POCHP. Gen *MDR1* koduje białko P-glikoproteinę, która odpowiedzialna jest za transport leukotrienów poza komórkę. Polimorfizm w obrębie tego genu może mieć wpływ na ilość leukotrienów uwalnianych z komórki. Syntaza *LTC₄* i jej polimorfizm ma znaczenie w rozwoju astmy ze względu na kontrolę szlaku syntezy leukotrienów cysteinylowych. Dlatego też celami pracy było:

- 1) Ustalenie częstości występowania wybranych wariantów allelicznych dla genów kodujących:
 - d) S- transferazę glutationu (GST) P1 i M1,
 - e) P-glikoproteinę 1 (transporter odpowiadający za wielolekową oporność - MDR1),
 - f) syntazę leukotrienu C₄u chorych na astmę oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POCHP) i u osób zdrowych oraz zbadanie czy polimorfizmy te znajdują się w równowadze genetycznej.
- 2) Porównanie częstości występowania funkcjonalnych wariantów Val¹⁰⁵ dla *GSTP1* i null dla *GSTM1* u chorych na astmę tolerujących aspirynę (ATA), wrażliwych na aspirynę (AIA) oraz u chorych na POCHP.
- 3) Zbadanie korelacji polimorfizmów *GSTP1*, *GSTM1* z atopią i parametrami czynności płuc.
- 4) Zbadanie wpływu polimorfizmów *GSTP1*, *GSTM1*, *MDR1* i *LTC₄S* na biosyntezę leukotrienów cysteinylowych (LTC₄, LTE₄) u chorych na

astmę oskrzelową, w zawiesinie leukocytów izolowanych z pełnej krwi obwodowej.

METODY

Badanie przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie genotypowano polimorfizmy *GSTP1* i *GSTM1* u 665 osób, w tym 210 kontroli, 286 osób chorych na astmę tolerujących aspirynę (ATA), 210 chorych na astmę wrażliwych na aspirynę (AIA) i 56 chorych na POCHP. Dodatkowo, u 304 osób (ATA=96, AIA=98, kontrola=100) zbadano polimorfizm 3435C>T w genie *MDR1* oraz u 103 osób (ATA=35, AIA=39, kontrola=29) zbadano polimorfizm -444A>C w genie kodującym enzym syntazę leukotrienu C₄.

W drugim etapie, na podstawie polimorfizmu *GSTP1*, wylosowano 74 osoby różniące się genotypami *GSTP1*. Pacjentom tym pobierano krew i przeprowadzono badanie w celu sprawdzenia produkcji leukotrienów cysteinylowych (LTC₄ i LTE₄ w pg/mL) w zawiesinie leukocytów krwi obwodowej. Produkcja CysLTs mierzona była w nadsączach metodą ELISA. Dodatkowo, w celu weryfikacji swoistości pomiarów immunoenzymatycznych, rzeczywistą obecność leukotrienów C₄ i E₄ w próbkach po stymulacji potwierdzano przy użyciu spektrometru mas, po ich rozdziale chromatograficznym (LC-MS). Oznaczono również poziom glutationu (GSH μM/L) w nadsączach hodowlanych (u niektórych pacjentów także w surowicy) metodą HPLC z detektorem UV. U wszystkich tych pacjentów przeprowadzono genotypowanie w kierunku polimorfizmu genu kodującego syntazę leukotrienu C₄ (LTC₄S), w celu sprawdzenia jej ewentualnego wpływu na produkcję leukotrienów cysteinylowych.

WYNIKI

Wyniki genotypowania genu *GSTP1* nie ujawniły istotnych różnic między grupami, z wyjątkiem AIA, w której częstość allelu protekcyjnego ¹⁰⁵Val była mniejsza niż u zdrowych (AIA q=0,25; ATA q=0,31; POCHP q=0,35; kontrola q=0,33). Nie obserwowano różnic w częstości delekcji genu *GSTM1*, jedynie u chorych na POCHP genotyp *GSTM1null/null* był częstszy niż u

kontroli (64%). Częstość allelu 3435T genu *MDR1* była podobna w grupach (q=0,5). Częstość allelu -444C genu *LTC₄S* w grupie AIA była na poziomie kontroli (AIA q=32; ATA q= 0,27; kontrola q=0,33). U chorych na astmę rzadziej stwierdzano genotyp GG (Va¹⁰⁵/Va¹⁰⁵) *GSTP1* (OR=0,84; 95%CI: 0,47-1,48). Nie wykazano związku polimorfizmów *GSTP1* i *GSTM1* z FEV₁%, całkowitym IgE w surowicy i testami skórnymi. Produkcja leukotrienów cysteinylowych C₄ i E₄ była niższa w grupie astmatyków w porównaniu do kontroli. Zaobserwowano związek polimorfizmu *GSTP1* ze stężeniem LTC₄ po stymulacji jonomycyna w grupie ATA i u kontroli. Homozygoty *GSTP1* AA (Ile¹⁰⁵/Ile¹⁰⁵) charakteryzowały się wyższymi stężeniami leukotrienu cysteinylowego C₄ po stymulacji. Pozostałe polimorfizmy nie miały wpływu na stężenia LTC₄ i LTE₄ w zastosowanym modelu ich produkcji.

PODSUMOWANIE

Nie stwierdzono związku polimorfizmów *GSTP1*, *GSTM1* z atopią i czynnościowym stanem układu oddechowego u chorych na astmę. Nie mają one też wpływu na występowanie nadwrażliwości na aspirynę. Najczęstszy wariant alleliczny *GSTP1* kojarzy się z największą produkcją CysLTs przez leukocyty krwi obwodowej, jednakże taki marker biochemiczny nie jest przydatny w diagnostyce astmy.

8. SUMMARY

BACKGROUND

Glutathione S-transferase P1 and M1, which belongs to a superfamily of enzymes involved in detoxification cells from xenobiotics by conjugation with reduced glutathione, were studied in search for susceptibility to bronchial asthma. Cysteinyl leukotrienes (CysLTs) play an important role in the pathogenesis of asthma and especially aspirin-induced asthma (AIA) is a clinical syndrome related to cys-LTs overproduction in airways. Association between polymorphisms of GSTs and overproduction of cysteinyl leukotrienes were suggested in patients with asthma.

METHODS

We compared genetic polymorphisms of: glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*), M1 (*GSTM1*), *LTC₄S* and *MDR1* in subjects with asthma and COPD (ATA= 286; AIA=113, COPD=56) and healthy controls (n=210). Genomic DNA was genotyped for *GSTP1* polymorphism Ile¹⁰⁵/Val¹⁰⁵ (SNP 313A>G), *LTC₄S* polymorphism -444A>T, *MDR1* polymorphism 3435C>T by PCR-RFLP method and for deletion of *GSTM1* gene by multiplex PCR (*GSTM4* reference). *In vitro* production of LTC₄ and LTE₄ by peripheral blood leukocytes was measured with ELISA and LC-MS methods in 74 patients (AIA=10, ATA=29, Con=29).

RESULTS

There were no differences frequency of allele ¹⁰⁵ Val between groups, only AIA had lower frequency compared to healthy controls (AIA q=0.25, ATA q=0.31, COPD q=0.35, con q=0.33). Deletion of *GSTM1* gene was equally frequent in the groups, except COPD, in which the deletion was more common than in controls (64%). No differences in allele 3434T was observed between groups (q=0.5). The frequency of allele -444C was lower in ATA than in controls

(AIA $q=0.32$, ATA $q=0.27$, con $q=0.33$). In asthmatic patients GG homozygotes of *GSTP1* were less frequent as compared to controls (OR=0.84; 95%CI: 0.47-1.48). There was no relationship between genotypes of *GSTP1*, *GSTM1* and FEV₁% or total serum IgE and skin prick tests. The biosynthesis of CysLTs (LTC₄ and LTE₄) was higher in controls as compared to AIA or ATA, but there was a correlation between genotype *GSTP1* and activated production of LTC₄ after stimulation in ATA and control group. A wild type homozygotes AA had a moderate overproduction of LTC₄. The other polymorphisms did not modify biosynthesis of LTC₄ and LTE₄ by peripheral blood leukocytes.

CONCLUSIONS

The polymorphisms of *GSTP1* and *GSTM1* are not associated with atopy or respiratory functional parameters. Only *GSTP1* genetic variants affects cysteinyl leukotrienes biosynthesis, while *GSTM1*, *LTC₄S* and *MDR1* polymorphisms had no impact in the tested in vitro model. Capacity for biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in vitro is not a sensitive diagnostic marker for asthma.

9. ZAŁĄCZNIKI

I. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AA	kwask arachidonowy (<i>arachidonic acid</i>)
AchE	acetylocholinesteraza
AIA	astma aspirynowa (<i>aspirin-induced-asthma</i>)
ALF	<i>automated laser fluorimetry</i>
AP-1	czynnik transkrypcyjny (<i>activating protein-1</i>)
ASA	kwask acetylosalicylowy
ATA	astma bez nadwrażliwości na aspirynę (<i>aspirin-tolerant-asthma</i>)
BLT	receptor leukotrienu B ₄
BSA	albumina wołowa (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	komplementarny DNA
CI	przedział ufności (<i>confidence interval</i>)
COX	cyklooksygenaza
CysLT	leukotrieny cysteinyłowe
CysLT1	receptor leukotrienów cysteinyłowych-1
CysLT2	receptor leukotrienów cysteinyłowych-2
Da	dalton
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNTP	mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów (<i>deoxynucleotide triphosphate-dCTP, dATP, dGTP, dTTP</i>)
DTE	ditioerytrytol
EDTA	wersenian dwusodowy
EIA	<i>enzyme immunoassay</i>
ELISA	oznaczenie metodą enzymatyczną immunoadsorbpcji (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FEV ₁	pierwszosekundowa natężona objętość wydechowa (<i>forced expiratory volume</i>)
FLAP	białko aktywujące 5-lipooxygenazę (<i>5-lipooxygenase associated protein</i>)
GSH	glutation zredukowany

GSSG	glutation utleniony
GST	S-transferaza glutationu
GSTM1	S-transferaza glutationu M1
GSTP1	S-transferaza glutationu P1
HBr	bromowodór
HBSS	płyn hodowlany Hanksa (<i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HCLO ₄	kwask nadchlorowy
HPETE	wodoronadtlenek kwasu arachidonowego
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IgE	immunoglobulina E
IL	interleukina
Jon	jonomycyna
K	kobiety
LC-MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas
LTA ₄	leukotrien cysteinylowy A ₄
LTC ₄	leukotrien cysteinylowy C ₄
LTC ₄ w	poziom LTC ₄ wyjściowo
LTC ₄ s	poziom LTC ₄ po stymulacji (<i>stimulated</i>)
LTC ₄ S	syntaza leukotrienu C ₄
LTD ₄	leukotrien cysteinylowy D ₄
LTE ₄	leukotrien cysteinylowy E ₄
LTE ₄ w	poziom LTE ₄ wyjściowo
LTE ₄ s	poziom LTE ₄ po stymulacji
LTE ₄ -d3	leukotrien LTE ₄ deuterowany
LTs	Leukotrieny
M	mężczyźni
MAPEG	rodzina białek metabolizujących arachidonian szlakiem lipoksygenacji - <i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
mBrB	monobromobimane
MDR1	gen oporności wielolekowej-1 (<i>multidrug resistance 1</i>)
mGST	izoforma mikrosomalna GST
NaBH ₂	borowodorek sodu

NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
NF-kappaB	Jądrowy czynnik transkrypcyjny kappaB
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
NS	brak znamienności statystycznej
OD	iloraz szans (<i>odds ratio</i>)
PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	polimerazowa reakcja łańcuchowa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGE ₂ S	syntaza prostaglandyny E ₂
PGP	p-glikoproteina – produkt genu MDR1
PLA ₂	fosfolipaza A ₂
POCHP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
pz	para zasad nukleotydowych
RFLP	zmienność długości fragmentów restrykcyjnych (<i>restriction fragments length polymorphism</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	czas retencji (<i>retention time</i>)
SD	odchylenie standardowe (<i>standard deviation</i>)
SRS-A	wolno działająca substancja anafilaksji -A
TAE	bufor TRIS-octan-EDTA
TBE	bufor TRIS-boran-EDTA
TEMED	czterometyloetylenodiamina
UV	ultrafiolet

II. ODCZYNNIKI

1. IZOLACJA DNA:

Dekstran 6% (High Molecular Wright Dextrane, 500 000, Pharmacia)

DNAzol Reagent (Invitrogen)

alkohol etylowy 95%

alkohol etylowy 75%

2. REAKCJA PCR:

bufor reakcyjny 10x (Finnzymes): 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 w 25°C, 15
mM MgCl₂,
500 mM KCl,
0,1% Triton X-100

startery:	GSTP1 5	20 μM	}	TIB Molbiol, Poznań
	GSTP1 3	20 μM		
	MDR1 5	20 μM		
	MDR1 3	20 μM		
	LTC ₄ S 5	20 μM		
	LTC ₄ S 3	20 μM		
	GSTM1 3	20 μM		
	GSTM1 5	20 μM		
	GSTM4 5	20 μM		

dNTPs 10 mM (MBI Fermentas)

DMSO (Sigma)

polimeraza DNA 2 U/mikroL (Finnzymes)

3. TRAWIENIE RESTRYKCYJNE PRODUKTÓW AMPLIFIKACJI:

GSTP1:

enzym restrykcyjny *A/w26I* 2,5 U/ μ l

bufor Y^+ / Tango™ z BSA 10x

MDR1:

enzym restrykcyjny *Bsp143I* 2,5 U/ μ l

bufor *Bsp143I*⁺ z BSA 10x

LTC₄S:

enzym restrykcyjny *MspI* 2,5 U/ μ l

bufor Y^+ / Tango™ z BSA 10x

MBI Fermentas

4. GENOTYPOWANIE:

żel agarozowy:

agaroz (SFR, Amresco)

bufor TAE 50x :

242 g Tris

57,1 ml kwas octowy (0,04 M Tris-acetate)

37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O (0,002 M EDTA)

pH 8,5

bromek etydyny 0,5 mg/ml (Sigma)

pBR 322 DNA/*A*/*ul* 0,4mg/ml (MBI Fermentas)

bufor obciążający 6x GLP (MBI Fermentas):

glicerol 60%

błękit bromofenolowy 0,09%

ksylen cyjanolowy 0,09%

EDTA 60 mM

żel poliakrylamidowy:

akrylamide PAGE 40%	}	(Pharmacia Biotech)
methylenebisacrylamide 2%		
TEMED –n (N,N,N',N',-		
Tetramethyl-ethylenediamine)		
ammonium persulphate 10%		

bufor TBE 10x:

121,1 g Tris

51,32 g boric acid

3,72 g EDTA

barwnik fluorescencyjny YOYO – 3 ($\lambda=612$ nm/631 nm) (Molecular Probes)

pBR 322 DNA/ A/ul 0,4 mg/ml (BMI Fermentas)

5. STYMULACJA LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ:

płyn hodowlany Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma)

interleukina 3 (IL-3, 20 ng/ml) (Sigma)

jonomycyna (0,2mM) (Sigma)

albumina (0,1% BSA) (Sigma)

kwas arachidonowy (5 μ M) (Sigma)

6. POMIAR PRODUKCJI LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH (CysLTs) *IN VITRO*:

Zestaw EIA do oznaczania poziomu leukotrienów cysteinylowych C₄ i E₄ (Leukotriene C₄, E₄ EIA Kit, Cayman)

7. . POMIAR STĘŻENIA GLUTATIONU (GSH) METODĄ HPLC:

Standardy:

Glutation zredukowany (GSH, 5mg/ml) (Sigma)

Glutation utleniony (GSSG, 10 mg/ml) (Sigma)

Przygotowanie próbek:

NaBH₂ (2 M, 1,4 M w 0,05 M NaOH) (Sigma)

kw. sulfosalicylowy (20% zawierający 100μM DTE)(Sigma)

DMSO (Fluka)

HBr (Baker)

NaCl (POCh)

N-etylmorfolina (1 M) (Sigma)

mBrB (20 mM w 100% acetonitrylu) (Sigma)

HClO₄ (Chempur)

NaOH (POCh)

Faza mobilna do HPLC

Bufor A:

1,65% wodorotlenek czterobutyloamoniowy (Fluka)	} pH=3,85
0,8% kwas ortofosforowy (Riedel-de Haën)	
0,25% kwas octowy lodowaty (Chempur)	

Bufor B:

1,65% wodorotlenek czterobutyloamoniowy (Fluka)	} pH=3,85
0,8% kwas ortofosforowy (Riedel-de Haën)	
20% acetonitryl (Baker)	
0,25% kwas octowy lodowaty (Chempur)	

8. IDENTYFIKACJA LEUKOTRIENÓW CYSTEINYLOWYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W POŁĄCZENIU ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (LC-MS)

Standard:

[20,20,20-²H₃] leukotrien E₄ (5 ng) (Biomol Research Laboratories)

Przygotowanie próbek:

Metanol czystości HPLC (Merck)

EDTA (0,01%) (Sigma)

n- Heptan (Riedel-de Haën)

50% metanol (Merck)

Faza mobilna:

Bufor : acetonitryl (Baker)	}	pH=5,6
Methanol (Merck)		
Kwas octowy (POCh)		
Amoniak (POCh)		

10. PIŚMIENNICTWO

1. Aynacioglu AS, Nacak M, Filiz A, Ekinçi E, Roots I. Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol*, 2003; 57(2): 213-217
2. Bandeira-Melo Ch, Weller PF. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003; 69 : 135-143
3. Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vahakangas KH, Castren K, Welsh JA, Bowman ED, Khan MA, Flieder DB, Harris CC. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91(23): 2009-14
4. Bianchini F, Vainio H. Isothiocyanates in cancer prevention. *Drug Metab Rev*, 2004; 36: 655-668
5. Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat.*, 2004; 24(3): 208-14
6. Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun T-H, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson P-J, Morgenstern R. Bioinformatic and enzymatic characterization of MAPEG superfamily. *FEBS Journal*, 2005; 272: 1688-1703
7. Busse W, Kraft M. Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation. Strategic target for therapy. *Chest*, 2005; 127: 1312-1326
8. Busse W. The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis. *Clin Exper Allergy*, 1996; 26: 868-879
9. Butkiewicz D, Cole KJ, Phillips DH, Harris CC, Chorazy M. GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from an environmentally polluted region of Poland: correlation with lung DNA adduct levels. *Eur J Cancer Prev*, 1999; 8(4): 315-23

10. Cantlay AM, Smith CA, Wallace WA, Yap PL, Lamb D, Harrison DJ. Heterogeneous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung. *Thotax*, 1994; 49(10):1010-1014
11. Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacological Research*, 2004; 50: 1-11
12. Carroll WD, Lenney W, Child F, Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Maternal glutathione S-transferase GSTP1 genotype is specific predictor of phenotype in children with asthma. *Ped Allergy Immunol*, 2005; 16(1):32-9
13. Çelik G, Bavbek S, Misirligil Z, Melli M. Release of cysteinyl leukotrienes with aspirin stimulation and effect of prostaglandin E2 on this release from peripheral blood leucocytes in aspirin-induced asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*, 2001; 31: 1615-1622
14. Cheng S-L, Yu C-J, Chen C-J, Yang P-C. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J*, 2004; 23: 818-824
15. Child F, Lenney W, Clayton S, Davies S, Jones PW, Aldersea JE, Strange RC, Fryer AA. The association of maternal but not paternal genetic variation in GSTP1 with asthma phenotypes in children. *Respiratory Medicine*, 2003; 97: 1247-1256
16. Christmas P, Weber BM, McKee M, Brown D, Soberman RJ. Membrane localization and topology of leukotriene C4 synthase. *J Biol Chem*, 2002; 277(32,9): 28902-28908
17. Claesson H-E, Haeggström JZ. Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A4 into leukotrienes B4, C4, D4 and E4. *Eur J Biochem*, 1988; 173: 93-100
18. Coughlin SS, Hall Ij. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: a HuGE review. *Genet Med.*, 2002; 4(4): 250-7
19. Davis ED, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodelling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111: 215-25
20. Dialyna IA, Miyakis S, Georgatou N, Spandidos DA. Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk. *Oncol Rep*, 2003; 10(6): 1829-35

21. Diamant Z, Sampson AP. Anti-inflammatory mechanisms of leukotriene modulators. Clin Exper Allergy, 1999; 29: 1449-1453
22. Dickinson DA, Forman HJ, Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem Pharmacol, 2002; 64: 1019-1026
23. Droszcz W. Astma. Zarys patofizjologii, zasady diagnostyki i leczenia. Wydawnictwo lekarskie PZWL. Warszawa, 2002
24. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? J Cell Mol Med., 2005; 9(1_): 208-221
25. Dworski R. Oxidative stress in asthma. Thorax, 2000; 55: S51-S55
26. Feldman R. Astma oskrzelowa. Res Medica, 2000
27. Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. Allergy Asthma Proc, 2003; 24(2):79-83
28. Fokert P-G, D'Costa D, El-Mestrah M. Expression and inducibility of alpha, pi and mu glutathione S-transferase protein and mRNA in murine lung. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999; 20: 143-152
29. Fromm MF. Importance of p-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends in Pharmacological Sciences. 2004; 25(8): 423-429
30. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002; 54: 1295-1310
31. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Spiteri MA. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. Am J Respir Crit Care Med., 2000; 161: 1437-1442
32. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science, 2001; 294(30): 1871-1875

33. Garcia-Closas M, Kelsey KT, Hankinson SE, Spiegelman D, Springer K, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. Glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms and breast cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91(22): 1960-4
34. Gilliland FD, Li Y-F, Saxton A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomized, placebo-controlled crossover study. *Lancet*, 2004; 363: 119-25
35. Gryglewski RJ. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pol J Pharmacol*, 1999; 51: 113-117
36. Grzanka A, Rogala B. Znaczenie elastazy granulocytów obojętnochłonnych w patofizjologii obturacyjnych chorób płuc. *Postępy Hig Med Dośw*, 2000;54: 213-23
37. Haddous M, Siest G, Herbeth B, Vincent-Viry M, Visvikis S. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and human diseases: overview of epidemiological studies. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2004; 62(1): 15-24
38. Haeggström JZ, Wetterholm A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 742-753
39. Hammingsen A, Fryer AA, Hepple M, Strange RC, Spiteri M. Simultaneous identification of GSTP1 Ile 105→Val 105 and Ala 114→Val 114 substitution using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma. *Respir Res*, 2001; 2: 255-260
40. Hayes DJ, Flanagan JU, Jowsey IR, Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005; 45: 51-88
41. He J-Q, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2004; 170: 388-394
42. He J-Q, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2002; 166: 323-328
43. Heagerty AH, Fitzgerald D, Smith A, Bowers B, Jones P, Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, Strange PC. Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumors. *Lancet*, 1994; 343(8892): 266-8

44. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2001; 14: 409-421
45. Ho G-T, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (p-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut*, 2003; 52: 759-766
46. Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WRJr. Roles of Cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111(1S): S18-34
47. Holgate ST. The history of leukotrienes and leukotriene modifying drugs. *Clinical and Experimental Allergy Reviews*, 2001; 1: 193-195
48. Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Kasuga M, Okumura K. Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharmaceutical Res*, 2002; 19(10): 1581-1585
49. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 2004; 43(9): 553-576
50. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 1999; 54: 693-696
51. Ishikawa T, Hirano H, Onishi Y, Sakurai A, Tarui S. Functional evaluation of ABCB1 (P-glicoprotein) polymorphisms: High-speed screening and structure activity relationship analyses. *Drug Metab Pharmacokin*, 2004; 19(1): 1-14
52. Ivaschenko TE, Sidelev OG, Baranov VS. Glutathione-S-transferase μ and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma. *J Mol Med*, 2002; 80:39-43
53. Jakobsson P-J, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). *Am J Respir Crit Care Med.*, 2000; 161: S20-S24

54. Jamroziak K, Balcerzak E, Młynarski W, Mirowski M, Robak T. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of polish population. *Pol J Pharmacol*, 2002;54: 495-500
55. Jawień J, Chłopicki S, Olszanecki R, Lorkowska B, Gryglewski RJ. Eosinophil-epithelial cell interaction augments cysteinyl leukotrienes synthesis. *J Physio Pharm* 2002; 53(1): 127-132
56. Jawień J, Olszanecki R, Lorkowska B, Korbut R. Effect of aspirin on cysteinyl leukotrienes production by eosinophils co-cultured with epithelial cells. *J Phys Pharm*, 2004; 55(4): 765-775
57. Jones TR, Rodger IW. Role of leukotrienes and leukotriene receptor antagonists in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 1999; 12: 107-110
58. Joos L, Paré PD, Sandford AJ. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Swiss Med Wkly*, 2002; 132: 27-37
59. Kim RB. Perspective- Drug transporters in HIV therapy. *International AIDS Society-USA course in Atlanta*, 2003; 11(4):136-139
60. Knapen MFCM, Wilbert HMP, Mulder TPJ, Steegers EAP. A marker for hepatocellular damage. *Lancet*, 2000; 355: 1463-1464
61. Lam BK, Austen KF, Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 2002; 68-69: 511-520
62. Lee SH, Altenberg GA. Transport of leukotriene c4 by a cysteine-less multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Biochem J*, 2003; 370: 357-360
63. Lee Y-L, Lin, Y-C, Lee Y-C, Wang J-Y, Hsiue T-R, Guo YL. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin Exp Allergy*, 2004; 34: 1707-1713
64. Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, Riedinger J-M, Fargeot P, Brunet-Lecomte P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumor characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research*, 1999; 1(1): 81-87

65. London SJ, Yuan J-M, Chung F-L, Gao Y-T, Coetzee GA, Ross GA, Yu MC. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, 2000; 356: 724-29
66. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet*, 2005; 46(1): 93-104
67. Maltby NH, Taylor GW, Ritter JM, Moore K, Fuller RW, Dollery CT. Leukotriene C4 elimination and metabolism in man. *J Allergy Clin Immunol*, 1990;85: 3-9
68. Małolepszy J. Choroby alergiczne i astma. 1996
69. Mansoor M A, Svardal AM, , Ueland PM. Determination of the *in vitro* redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma . *Anal Biochem*, 1992; 200: 218-229
70. Mansour MA, Al.-Shabanah OA. Enhanced generation of leukotriene B4 from calcium ionophore- stimulated rat peritoneal inflammatory cells: a possible Clinical relevance. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 2003; 2: 47-52
71. Mapp CE, Fryer AA, De Marzo N, Pozzato V, Padoan M, Boschetto P, Strange RC, Hemmingsen A, Spiteri M. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 109: 867-72
72. Matthey DL, Hassell AB, Plant M, Dawes PT, Ollier WR, Jones PW, Fryer AA, Aldersea JE, Strange RC. Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Am Rheum Dis*, 1999; 58: 164-168
73. Mewes T, Riechelmann H, Klimek I. Increased *in vitro* cysteinyl leukotriene release from blood leukocytes in patients with asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance. *Allergy*, 1996; 51: 506-510
74. Mohr LC, Rodgers JK, Silvestri GA. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anticancer Res*, 2003; 23(3A): 211-24
75. Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochemical Pharmacology*, 2003; 65: 1843-1852

76. Morwood K, Gillis D, Smith W, Kette F. Aspirin-sensitive asthma. *Intern Med J*, 2005; 35(4): 240-6
77. Murphy RC, Zarini S. Glutathione adducts of oxyeicosanoids. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 2002;68-69: 471-482
78. Nazar Stewart V, Vaughan TL, Stapleton P, Van Loo J., Nicol-Blades B, Eaton DL. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. *Lung Cancer*, 2003; 40: 247-258
79. Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione s-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 2004; 1(6): 460-464
80. Nizankowska E, Bochenek G, Szczeklik A. The international symposium "Eicosanoids, aspirin and asthma". *European Network on Aspirin-induced Asthma (AIANE)*, 1996;2:1-5
81. Park H-S, Frew AJ. Genetic markers for occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 109: 744-6
82. Peters-Golden M. Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. *European Network on Aspirin-induced Asthma (AIANE)*, 1998;January:1-5
83. Pierzchalska M, Mastalerz L, Sanak M, Zazula M, Szczeklik A. A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leukocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clinical and experimental Allergy*, 2000; 30: 1785-1791
84. Plopper CG, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Malburg SRC, Nishio SJ, Chang A, Bucpitt AR. Early events in naphthalene -induced acute clara cell toxicity. II Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001; 24: 272-281
85. Pompeia C, Freitas JJS, Kim JS, Zyngier SB, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implication of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biology of the cell*, 2002; 94: 251-256

86. Primiano T. Preclinical and clinical investigations of the expression of glutathione S-transferase isoenzymes. [www. Oxfordbiomed.com](http://www.Oxfordbiomed.com)
87. Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002; 1(3): 291-315
88. Rahman Q, Abidi P, Afag F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. Glutathione redox system in oxydative lung injury. *Crit Rev Toxicology*, 1999; 29(6): 543-568
89. Rodrigez-Frias F, Gonzalez C, Costa X., Campos F, Cotrina M, Jordi R, MiraVittles M, Vidal R. Screening for polymorphisms in exon 5 of glutathione S-transferase P1 gene. *Thorax*, 2000; 55(6): 535
90. Rybarczyk H, Sanak M, Szczeklik A. Enzymy sprzęgające z glutationem i ich znaczenie w medycynie. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 2001; 6(6): 517-523
91. Rymarczyk B, Rogala B. Genetyczne uwarunkowania chorób atopowych. *Postępy Hig Med Dośw*, 2000; 54:657-67
92. Safronova OG, Vavilin VA, Lyapunova AA, Makarova SI, Lyakhovich VV, Kaznacheeva LF, Manankin NA, Batychko OA, Gavalov SM. Relationship between glutathione S-transferase P1 polymorphism and bronchial asthma and atopic dermatitis *Bull Exper Biol Medic*, 2003; 136: 73-75
93. Sanak M, Levy BD, Clish CB, Chiang N, Gronert K, Mastalerz L, Serhan CN, Szczeklik A. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin –intolerant asthmatics. *Eur Respir J*, 2000; 16: 44-49
94. Sanak M, Sampson AP. Biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes in aspirin-intolerant asthma. *Clin Exper Allergy*, 1999; 29: 306-313
95. Sanak M, Simon H-U, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk factor of aspirin-induced asthma. *Lancet*, 1997; 350(9091): 1599-1600
96. Sanak M, Szczeklik A. Genetics of aspirin induced asthma. *Thorax*, 2000; 55(S2): S45-S47

97. Sanak M. Genetic control of eicosanoid biosynthesis.
Alergia Asthma Immunologia, 2004; 9(3S): 20-22
98. Sanak M. Genetic variance of 5-lipoxygenase metabolic pathway in bronchial asthma.
International Review of Asthma, 2002; 4(1): 71-80
99. Sanak M. Zmienność genetyczna syntazy leukotrienu C4 w astmie oskrzelowej.
Rozprawa habilitacyjna. Kraków , UJ 2001
100. Sandford AJ, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease.
Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. Thorax, 2003; 57: 736-741
101. Sayers I, Barton S, Rorkr S, Beghé B, Hayward B, Van Eedewegh P,
Keith T, Clough JB, Ye S, Holloway JW., Sampson AP, Holgate ST.
Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in leukotriene
C4 synthase gene (LTC4S) in asthma. Thorax, 2003; 58: 417-424.
102. Schnakenberg E, Breuer R, Werdin R, Dreikorn K, Schloot W. Susceptibility genes:
GSTM1 and GSTM3 as genetic risk factors in bladder cancer.
Cytogenet Cell Genet, 2000; 91: 234-238
103. Schröder O, Sjöström M, Qui H, Jakobsson P-J, Haeggström JZ.
Microsomal glutathione S-transferases: selective up-regulation of leukotriene
C4 synthase during lipopolisacharyde-induced pyresis. Cell Mol Life Sci, 2005; 62: 87-94
104. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1
drug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003; 43: 285-307
105. Scoggan KA, Jakobsson P-J, Frod-Hutchinson AW. Production of leukotriene C4 in
different human tissues is attributable to distinct membrane bound biosynthetic enzymes.
J Biol Chem, 1997; 272(15): 10182-10187
106. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione
transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient
enzyme superfamily. Biochem J, 2001; 360: 1-16
107. Sjöström M, Jakobsson P-J, Heimbürger M, Palmblad J, Haeggström JZ.
Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C4 via microsomal
glutathione S-transferase type 2 express the CysLT1 receptor.
Eur J Biochem, 2001; 268: 2578-2586

108. Spiteri MA, Bianco A, Strange RC, Fryer AA. Polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTP1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation. *Allergy*, 2000; 55, S61: 15-20
109. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*, 1999; 148: 231-49
110. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mut Res*, 2001; 482: 21-26
111. Stüker I, Hirvonen A, de Waziers I, Cabelguenne A, Mitrinen K, Céné, Koum-Besson E, Hémon D, Beaune P, Lorient M-A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 2002; 23(9): 1475-1481
112. Surapureddi S, Svartz J, Magnusson KE, Hammarström, Söderström M. Colocalization of leukotriene C synthase and microsomal glutathione S-transferase elucidated by indirect immunofluorescence analysis. *FEBS Letters*, 2000; 480: 239-243
113. Szczeklik A, Niżankowska E, Sanak M, Świerczyńska M. Aspirin-induced rhinitis and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2001; 1: 27-33
114. Szczeklik A, Sanak M. Molecular mechanisms in aspirin-induced asthma. *ACI International*, 2000; 12(4): 171-176
115. Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin induced asthma. *Eur Respir J*, 1990; 3: 588-93
116. Tabas LB, Dantzig AH. A high-throughput assay for measurement of multidrug resistance protein-mediated transport of leukotriene C4 into membrane vesicles. *Anal Biochem*, 2002; 310: 61-66
117. Tamer L, Calikoglu M, Ates NA, Yildirim H, Ercan B, Saritas E, Unlu A, Atik U. Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factor for asthma. *Respirology*, 2004; 9(4): 493-8

118. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of p-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharm Exper Therap*, 2001; 297: 1137-1143
119. Terashima T, Amakawa K, Matsumaru A, Yamaguchi K. Correlation between cysteinyl leukotriene release from leukocytes and clinical response to a leukotriene inhibitor. *Chest*, 2002; 122: 1566-1570
120. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 2003; 22: 7369-7375
121. Van Sambeek R, Stevenson DD, Bladasaro M, Lam BK, Zhao JL, Yoshida S, Yandora C, Drazen JM, Penrose JF. 5' Flanking region polymorphism of the gene encoding leukotriene C4 synthase does not correlate with aspirin-intolerant asthma phenotype in the United State. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106: 72-6
122. Verlengia R, Gorjao R, Kanunfre CC, Bordin S, Lima TM, Curi R. Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells-A comparison with oleic acid. *Life Sciences*, 2003; 73: 2939-2951
123. Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Jaillon P, Funck-Brentano C, Becquemont L. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003; 58: 809-812
124. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates : occurrence and biological functions. *Pharm Rev*, 1998; 50(3): 335-355
125. Watson MA, Steward RK, Smith GSJ, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 1998; 19(2): 275-280
126. Wenzel SE. The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003; 69: 154-155
127. West JAA, Chichester CH, Bukpitt AR, Tyler NK, Brennan P, Helton C, Plopper CG. Heterogeneity of clara cell glutathione , a possible basis for differences in cellular responses to pulmonary cytotoxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000; 23: 27-36

128. Yim JJ, Yoo CG, Lee C-T, Kim YW, Han SK, Shim YS. Lack of association between glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans. *Lung*, 2002; 180: 119-125