

Astma wywołana przez aldehyd glutarowy

Asthma due to glutaraldehyde

WALDEMAR LUTZ ^{1/}, CEZARY PAŁCZYŃSKI ^{2/}

^{1/} Zakład Immunotoksykologii, Instytut Medycyny Pracy im. Nofera w Łodzi, ul. Św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 90-950 Łódź

^{2/} Klinika Chorób Zawodowych, Ośrodek Alergii Zawodowej i Środowiskowej, Instytut Medycyny Pracy im. Nofera w Łodzi, ul. Św. Teresy od Dzieciątka Jezus 8, 90-950 Łódź

Aldehyd glutarowy jest jednym z najczęściej używanych środków odkażających. W ostatnich latach zanotowano wzrost liczby przypadków chorób alergicznych dróg oddechowych o podłożu zawodowym wywołanych przez ten związek w USA i Unii Europejskiej, a także w Polsce. Według niektórych autorów narażenie na glutaraldehyd jest najczęstszą przyczyną astmy zawodowej u pracowników ochrony zdrowia. Aldehyd ten jest głównie stosowany do zimnej dezynfekcji instrumentów medycznych i endoskopów oraz jako środek hartujący emulsję zdjęć rentgenowskich, stąd też grupę najwyższego ryzyka tworzą osoby zatrudnione w pracowniach endoskopowych i technicy rentgenowscy. Istotne narażenie na ten związek spotykane jest także w rolnictwie, rybołówstwie i przemyśle chemicznym. Astma alergiczna z nadwrażliwości na aldehyd glutarowy może rozwinąć się u osób ekspozowanych na stężenia niższe od przyjętych normatywów higienicznych. Nie wiadomo, czy u jej podstaw leży mechanizm IgE-zależny. W patogenezie uczulenia dróg oddechowych na aldehyd glutarowy szczególnie istotną rolę odgrywają metabolizm komórkowy tego związku i reakcje glutaralu z białkami bogatymi w lizynę, które to procesy prowadzą do tworzenia ważnych determinant antygenowych. Reakcja astmatyczna u osób uczulonych ma charakter dwufazowy lub izolowany późny i z reguły towarzyszą jej objawy nieżyty nosa. Diagnostyka uczulenia dróg oddechowych na glutaraldehyd opiera się głównie na standaryzowanych inhalacyjnych swoistych próbach prowokacyjnych.

Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 9-18

Glutaraldehyde (GA) is commonly used as a disinfectant and a steriliser in the health care settings. The principal health effects of GA are irritation of the skin, eye and respiratory tract, skin sensitization and occupational asthma. Over the last several years the incidence of occupational respiratory allergies from GA exposure has increased in the US, European Union as well as Poland. GA has been regarded by several authors as the main cause of occupational asthma among medical personnel. GA is used for cold sterilization of medical instruments and endoscopic equipment as well as hardening agent in x-ray film processing. Thus, the highest risk group are workers at the endoscopy and radiology units. Significant GA exposure can also be encountered in agriculture, fishery and chemical industry. Allergic asthma related to hypersensitivity to GA can develop in workers exposed to concentrations lower than the occupational exposure limits value. It remains to be seen whether its mechanism is IgE-dependent. The pathogenesis of GA-induced airway sensitisation is associated mainly with intracellular metabolism of GA and chemical reactions between glutaral and lysin-rich proteins leading to generation of important antigen determinants. In sensitized subjects the asthmatic reaction is either biphasic or late isolated, commonly accompanied with rhinitis symptoms. The diagnostics of airway allergy to GA is based mainly on standardized specific inhalatory challenge tests.

Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 9-18

Key words: glutaraldehyde, occupational asthma, pathogenesis

W grupie niskocząsteczkowych substancji chemicznych obecnych w środowisku pracy i bytowania człowieka, którym przypisuje się szkodliwe oddziaływania na organizm, szczególną pozycję zajmują aldehydy stosowane do produkcji środków odkażających. Najczęściej używa się tu aldehydu glutarowego (syn. glutaraldehyd, glutaral) i aldehydu glioksalowego (syn. glioksal, diformal), rzadziej aldehydu mrówkowego (syn. formaldehyd) i aldehydu bursztynowego (syn. butandial). Wymienione aldehydy różnią się od siebie długością łańcucha wodoro-węglowego oraz liczbą grup aldehydowych. W wyższych

stężeniach drażnią skórę, spojówkę i śluzówkę dróg oddechowych. Mogą również działać uczulająco. Niektóre z aldehydów wykazują działanie drażniące i uczulające, gdy inne, tylko drażniące. Dotychczas nie udało się wyjaśnić przyczyn tego zróżnicowania. Najczęstszą przyczyną powstawania kontaktowego zapalenia skóry oraz astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa wywołanych przez aldehydy jest narażenie na aldehyd glutarowy [12]. Zwraca uwagę rosnąca liczba odnotowanych przypadków alergii dróg oddechowych wywołanych przez ten związek w USA, Wielkiej Brytanii i Finlandii, a według niektórych

autorów narażenie na glutaraldehyd jest najczęstszą przyczyną astmy zawodowej u pracowników służby zdrowia [3]. W Wielkiej Brytanii aldehyd glutarowy znalazł się na liście astmogenów zawodowych [4].

Populacje szczególnego ryzyka wystąpienia alergii i źródła narażenia

Liczebność populacji ekspozycji na glutaraldehyd w Polsce jest nieznana. W USA 318 000 osób jest narażonych na ten związek w środowisku pracy. Do grupy szczególnego ryzyka wystąpienia alergii na aldehyd glutarowy należą pracownicy służby zdrowia, zwłaszcza pielęgniarki i lekarze specjalności zabiegowych oraz niższy personel medyczny. Aldehyd ten jest w chwili obecnej jednym z najczęściej używanych środków odkażających. W placówkach służby zdrowia stosowany jest głównie do zimnej dezynfekcji instrumentów medycznych i endoskopów oraz jako środek hartujący emulsję zdjęć rentgenowskich, stąd też grupę najwyższego ryzyka tworzą osoby zatrudnione w pracowniach endoskopowych i technicy rentgenowscy. Glutaraldehyd można też spotkać w lekach stosowanych w stanach zapalnych błon śluzowych, do leczenia miejscowego nadpotliwości, grzybicy paznokci, brodawek. Używany jest przy przygotowaniu szczepionek, przeszczepów i bioprotez. Ze względu na swoje silne właściwości bakteriobójcze jest on również stosowany w wielu działach gospodarki - rolnictwie, rybołówstwie, przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, chemicznym i wielu innych, dlatego też odnotowuje się przypadki uczulenia na glutaraldehyd wśród przedstawicieli różnych zawodów np. fryzjerów czy rolników [wg 5,6].

Patogeneza alergii na aldehyd glutarowy

Rozpatrując mechanizmy oddziaływania aldehydów na układ odpornościowy należy uwzględnić fakt, że immunotoksyczne właściwości aldehydów zależą w istotny sposób od ich stężenia w komórkach docelowych. W wysokich stężeniach ujawnia się ich działanie cytotoksyczne i immunosupresyjne, natomiast przy niskich stężeniach może wystąpić immunostymulacja, prowadząca do rozwinięcia się nadwrażliwości alergicznej [7]. Nie stwierdzono, aby występowała zależność między tymi cechami struktury chemicznej a siłą działania uczulającego [8]. Zaobserwowano, że aldehydy działając w mieszaninie wywołują silniejsze reakcje uczuleniowe. Reakcje alergiczne u zwierząt doświadczalnych uczulonych tylko jednym aldehydem są bardziej nasilone i utrzymują się znacznie dłużej w obecności innych aldehydów.

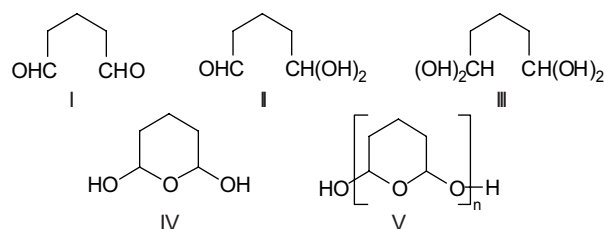
Astma oskrzelowa z nadwrażliwości alergicznej na aldehyd glutarowy może rozwinąć się u osób ekspozowanych na stężenia niższe od przyjętych normatywów

higienicznych [4]. Nie zostało rozstrzygnięte, dlaczego tylko u części osób narażonych na aldehydy dochodzi do wystąpienia reakcji nadwrażliwości alergicznej i jakie są osobnicze czynniki predysponujące do wystąpienia takiej reakcji. Mechanizm powstawania uczulenia na aldehyd glutarowy także pozostaje nie w pełni wyjaśniony. W surowicy osób narażonych na ten aldehyd wykryto antygenowo swoiste przeciwciała IgE, ale nie udowodniono ich roli patogenetycznej w wywoływaniu uczulenia [9]. Nie zostało ustalone, czy wykrywane antygenowo swoiste przeciwciała IgE są tylko markerem narażenia, czy też świadczą o nadwrażliwości alergicznej na aldehyd glutarowy. Badania na zwierzętach udowodniły, że aldehyd glutarowy wywołuje wzmożoną sekrecję interleukiny 4, co jest zjawiskiem typowym dla selektywnej aktywacji limfocytów Th2 i rozwinięcia się odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego [10]. Te obserwacje potwierdzają, że w rozwoju uczulenia na aldehyd glutarowy biorą udział limfocyty oraz wskazują na potencjalną rolę tego aldehydu w reakcji uczulenia dróg oddechowych.

Celem zrozumienia bardzo złożonej patogenezy astmy alergicznej wywołanej ekspozycją na glutaraldehyd konieczne jest prześledzenie metabolizmu komórkowego tego związku oraz jego reakcji z białkami, które to procesy prowadzą do tworzenia ważnych determinant antygenowych i indukcji reakcji immunologicznej.

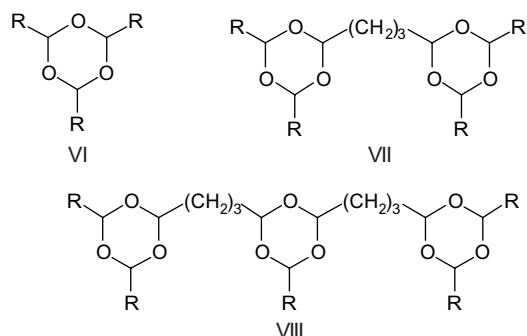
Zachowanie się aldehydu glutarowego w roztworach wodnych

Aldehyd glutarowy jest pięciowęglowym dialdehydem o ciężarze 100,13 daltonów. Odznacza się wysoką reaktywnością chemiczną, która wynika z występowania w jego cząsteczce dwóch grup aldehydowych oddzielonych mostkiem propylenowym (wzór I, ryc. 1). Cząsteczki aldehydu glutarowego łatwo reagują ze sobą oraz cząsteczkami innych związków chemicznych, zwłaszcza tych zawierających grupy aldehydowe i/lub aminowe. Aldehyd glutarowy przechowywany w roztworach wodnych (w takich roztworach występuje aldehyd glutarowy w preparatach odkażających) tworzy formy hydratowe (wzory II i III, ryc. 1), piranowe (wzór IV, ryc. 1) oraz polimeryczne (wzór V, ryc. 1).



Ryc. 1. Struktury chemiczne aldehydu glutarowego w roztworach wodnych

Występujące w roztworach wodnych cząsteczki aldehydu glutarowego reagując ze sobą mogą również tworzyć oligomery. W największej ilości tworzony jest będący trimerem para-glutaraldehyd (wzór VI, ryc. 2). W mniejszej ilości powstają pentamer (wzór VII, ryc. 2) i heptamer (wzór VIII, ryc. 2).



Ryc. 2. Oligomery tworzone przez cząsteczki aldehydu glutarowego w roztworach wodnych

W 2% roztworach wodnych aldehydu glutarowego o pH 7,5 - 8,5, przygotowanych jako roztwory stosowane do sterylizacji, występuje on głównie jako oligomer trioksanowy (wzór VI, ryc. 2). W roztworach o pH zasadowym aldehyd glutarowy może występować także w formie dimeru pozostającej w równowadze z formą hemiacetalową. Powstają one w wyniku reakcji kondensacji aldolowej między dwoma cząsteczkami tego aldehydu.

Metabolizm komórkowy aldehydu glutarowego

Wielofunkcyjna reaktywność aldehydu glutarowego wynikająca z obecności w jego strukturze chemicznej dwóch reaktywnych grup aldehydowych jest podobna do innych niskocząsteczkowych związków chemicznych wywołujących reakcje nadwrażliwości alergicznej w drogach oddechowych, takich jak diizocyjaniany, diaminy alifatyczne i cykliczne, czy bezwodniki kwasów polikarboksylowych [11,12]. Wysoka reaktywność grup aldehydowych powoduje, że dla ujawnienia swojego potencjału immunotoksycznego nie musi on ulegać aktywacji metabolicznej. To odróżnia ten aldehyd od wielu innych alergenów niskocząsteczkowych.

Potencjał toksyczny i uczulający aldehydu glutarowego zależy w znaczącym stopniu od szybkości jego metabolizmu komórkowego. Osoby w komórkach których aldehyd glutarowy jest szybko metabolizowany są bardziej odporne na jego działania toksyczne. Natomiast osoby wolno metabolizujące aldehyd glutarowy mogą ujawniać skutki toksyczne nawet przy stosunkowo niskich stężeniach tego dialdehydu. Do komórek przenika tylko niewielki odsetek aldehydu glutarowego, z jakim ma kontakt osoba ekspozowana. Dawka ta może ulec zwiększeniu w przypadku uszkodzenia barier ochronnych organizmu tworzonych przez skórę oraz błony śluzowe dróg

oddechowych i przewodu pokarmowego lub równoczesnej ekspozycji na inne związki, zwiększające przepuszczalność tych barier. Po przeniknięciu przez bariery ochronne organizmu, aldehyd glutarowy ulega w komórkach degradacji oksydacyjnej do ditlenku węgla. Reakcją zaczynającą szlak przemian oksydacyjnych aldehydu glutarowego w komórce jest reakcja jego oksydacji do γ -semialdehydu glutarowego. Reakcja ta jest katalizowana przez enzym dehydrogenazę aldehydową (ALDH). ALDH odgrywa kluczową rolę w określaniu szybkości metabolizmu aldehydów pochodzenia endogennego i egzogenego, w tym również aldehydu glutarowego [8]. W komórkach człowieka wykazano występowanie siedmiu klas izoenzymów ALDH. Kodowane są one przez odmienne geny i różnią się między sobą specyficznością substratową. Dla wielu klas ALDH wykazano występowanie polimorfizmów w populacji ludzkiej [13]. Jednak, jak dotychczas, brak jest danych w jakim stopniu te polimorfizmy mogą wpływać na szybkość metabolizmu aldehydu glutarowego oraz na jego immunosupresyjne lub immunostymulujące oddziaływania na komórki układu odpornościowego.

Produkt reakcji katalizowanej przez ALDH, γ -semialdehyd glutarowy, jest dalej utleniany do kwasu glutarowego przez dehydrogenazę 1-pirilino-5-karboksylową. Kwas glutarowy ulega dalszej przemianie po utworzeniu glutarylo-CoA. Zachodzi to albo na drodze reakcji tiokinazowej albo przez przeniesienie CoA z bursztynylo-CoA w reakcji katalizowanej przez tioforazę. Glutarylo-CoA jest następnie redukowany do glutakonylo-CoA a ten po dekarboksylacji tworzy krotonylo-CoA. Obie reakcje (redukcji i dekarboksylacji) są katalizowane przez dehydrogenazę glutarylo-CoA. Krotonylo-CoA zostaje przekształcony w β -hydroksybutyrylo-CoA, który jest wykorzystany przez komórki do syntezy acetoctanu lub może być degradowany do octanu i następnie do ditlenku węgla.

Reakcje z białkami

Skuteczność działania aldehydu glutarowego jako środka odkażającego wynika z jego zdolności do reagowania z białkami i tworzenia wiązań krzyżowych między ich łańcuchami polipeptydowymi. Aldehyd glutarowy reaguje zarówno z grupami aminowymi aminokwasów zasadowych wolnych (lizyna i arginina) oraz tych, które tworzą struktury peptydowe i białkowe. Reaguje również z grupami sulfhydrylowymi obecnymi w cysteinie wolnej oraz związanej w peptydach i białkach. Aldehyd glutarowy może reagować także z grupą hydroksylową tyrozyny oraz azotem imidazolowym histydyny. W oddziaływaniach aldehydu glutarowego z białkami, podobnie jak w przypadku innych aldehydów, dominuje reakcja z grupami ϵ -aminowymi lizyny, która przebiega szybko i jest zależna od pH [8,14]. Identyfikacja i charakterystyka białek tworzących kowalencyjne wiązania z aldehydem glutarowym ma kluczowe znaczenie w zrozumieniu

patomechanizmu powstawania i rozwoju nadwrażliwości alergicznej indukowanej przez ten aldehyd. Tak jak to wykazano w przypadku innych niskocząsteczkowych alergenów astmogennych, liczba białek które są dominującym celem dla aldehydu glutarowego i tworzenia z nimi nowych determinant antygenowych jest raczej ograniczona [15]. Docelowymi białkami komórkowymi i pozakomórkowymi dla aldehydu glutarowego są głównie białka zawierające większą liczbę reszt aminokwasów zasadowych, głównie lizyny. Dotychczas ustalono, że aldehyd glutarowy może reagować z takimi białkami jak keratyna i kolagen [16, 17]. Inne cele białkowe dla aldehydu glutarowego nie zostały dotychczas ustalone.

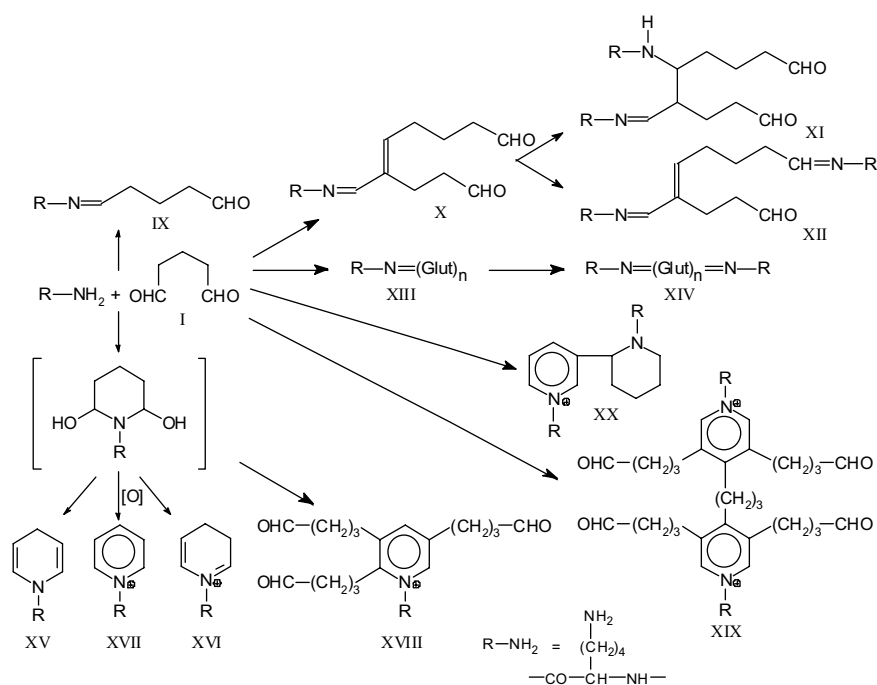
Złożoność reakcji jaka zachodzi między aldehydem glutarowym a grupami ϵ -aminowymi lizyny w znaczący sposób utrudnia poznanie mechanizmów tej reakcji [18]. Złożoność ta ma swoje uwarunkowanie w wielości pochodnych, jakie powstają w czasie reakcji grupy ϵ -aminowej lizyny z różnymi formami aldehydu glutarowego tworzonymi przez ten aldehyd w roztworach wodnych (ryc. 1 i 2). Przyjmuje się, że w reakcji z grupami ϵ -aminowymi lizyny uczestniczą zarówno nienasycone polimery aldehydu glutarowego, tworzone w wyniku kondensacji aldolowej, jak również pojedyncze cząsteczki tego aldehydu (ryc. 3).

Przebieg reakcji aldehydu glutarowego z wolną lizyną oraz tą obecną w białku jest w zasadzie taki sam [8]. Reakcja z białkiem zaczyna się od utworzenia zasady Schiffa między grupą aldehydową i grupą ϵ -aminową lizyny obecnej w łańcuchu polipeptydowym białka. Skutkiem reakcji jest powstanie zarówno pochodnych liniowych jak i cyklicznych. Np. w wyniku reakcji jednej cząs-

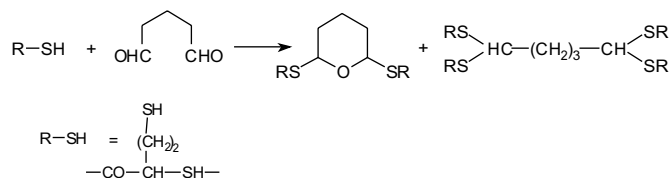
teczki aldehydu glutarowego z jedną cząsteczką lizyny może powstać cykliczna pochodna dihydropirydynowa (wzory XV i XVI, ryc. 3). Po oksydacji tworzy ona pochodną pirydynową (wzór XVII, ryc. 3). W reakcję może wchodzić więcej cząsteczek zarówno lizyny (pochodzących z tego samego łańcucha polipeptydowego lub innych) jak i aldehydu glutarowego. Po utworzeniu zasad Schiffa, w wyniku reakcji grupy aldehydowej i aminowej, zostają do nich dołączone kolejne cząsteczki aldehydu i powstają sprzęgnięte zasady Schiffa. Mogą one reagować z cząsteczkami lizyny na drodze addycji Michaela albo z wolnymi grupami aldehydowymi. Skutkiem tych reakcji jest utworzenie krzyżowych wiązań wewnątrz łańcuchami polipeptydowego tego samego białka lub między łańcuchami polipeptydowymi różnych białek (wzory XII, XIV, XIX i XX, ryc. 3).

Wysoka reaktywność grup aldehydowych powoduje, że aldehyd glutarowy może również tworzyć wiązania krzyżowe w białkach reagując z grupami SH tych białek. Przykład tworzenia takich wiązań krzyżowych przedstawiono na ryc. 4. W normalnych warunkach tworzenie wiązań krzyżowych w białkach wydaje się mieć raczej charakter ograniczony. Wynika to z tego, że aldehyd glutarowy w pierwszej kolejności wchodzi w reakcje z tiolami niskocząsteczkowymi jakimi są cysteina i zredukowany glutation [19].

Powstałe trudno rozpuszczalne lub nierozpuszczalne agregaty białkowe utworzone w wyniku reakcji aldehydu glutarowego z grupami ϵ -aminowymi lizyny i w mniejszym stopniu z grupami SH cysteiny, mogą ulec fagocytocie przez komórki dendrytyczne lub makrofagi.



Ryc. 3. Możliwe reakcje aldehydu glutarowego z grupą ϵ -aminową lizyny związanej peptydowo w łańcuchach polipeptydowym białka [wg 18]



Ryc. 4. Tworzenie wiązań krzyżowych w białkach w reakcji aldehydu glutarowego z grupami sulfhydrylowymi cysteiny związanej peptydowo w łańcuchach polipeptydowych tych białek [wg 2]

Tworzenie amoniowych determinant antygenowych

Aldehyd glutarowy reagując z białkami powoduje nie tylko zmianę ich właściwości fizykochemicznych ale również zmianę właściwości antygenowych. Może powodować zniknięcie jednych epitopów i pojawienie się innych, dotychczas nie występujących. Szczególnie ważne wydaje się być pojawienie w zmienionym strukturalnie białku kowalencyjnie związanych trzecio- i czwartorzędowych ugrupowań amoniowych. Występują one w pierścieniu dihydropirydiny (wzór XV i XVI, ryc. 3) oraz pirydiny (wzory XVII, XVIII, XIX i XX, ryc. 3). Ugrupowania te mogą być ważnymi determinantami antygenowymi dla syntezy przeciwciał IgE specyficznych dla trzecio- i czwartorzędowych związków amoniowych. Zwraca uwagę to, że niektóre pochodne powstające w wyniku reakcji aldehydu glutarowego z lizyną (wolną i związaną w białkach) również mają dwa, liniowo ułożone atomy azotu czwartorzędowe. W odróżnieniu od kuraro-podobnych leków zwiotczających, zawierających w strukturze swojej cząsteczki dwa ułożone liniowo atomy azotu trzecio- lub czwartorzędowe, nie mają grupy metylowej przyłączonej do azotu aminowego. Obecna jest tylko grupa propylenowa pochodząca z cząsteczki lizyny (wzór XIX). Ważność determinanty amoniowej w odpowiedzi immunologicznej potwierdzają obserwacje, że trzeciorzędowa grupa amoniowa występująca np. w cząsteczce morfiny nie tylko przyczynia się do syntezy specyficznych IgE, ale jest również silnym inhibitorem wiązania środków zwiotczających mięśnie ze specyficznymi dla nich przeciwciałami IgE [20].

Wystąpienie anafilaksji alergicznej po podaniu środków zwiotczających, zawierających w swojej strukturze chemicznej grupy aminowe trzecio- i czwartorzędowe, nie jest spowodowane wcześniejszą ekspozycją na te środki [21,22]. Uważa się, że obecność swoistych przeciwciał IgE jest wynikiem uczulenia wywołanego przez związki zawierające trzecio- i czwartorzędowe grupy amoniowe obecne w lekach, kosmetykach, składnikach pokarmowych lub zanieczyszczeniach przemysłowych [21,23,24]. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że trzecio- lub czwartorzędowe związki amoniowe mogą głównie tworzyć z białkami tylko nietrwałe wiązania typu jonowego za pośrednictwem grup karboksylowych glutaminianu i asparaginianu lub wiązania π , oddziałując z pier-

ścieniami aromatycznymi tyrozyny czy tryptofanu [24]. Takie oddziaływania o charakterze odwracalnym występują np. podczas reakcji lizofosfocholiny czy sfingozylofosfocholiny (zawierających ugrupowanie czwartorzędowej soli amoniowej) ze specyficznymi dla nich receptorami błonowymi [25]. Czwartorzędowe związki amoniowe nie tworzą trwałych wiązań kowalencyjnych z białkami. Ponieważ jest to jedna z podstawowych cech haptenu, sama obecność ugrupowania amoniowego w strukturze chemicznej potencjalnego haptenu nie może się przyczynić do uruchomienia syntezy specyficznych przeciwciał [7].

Ważną rolę w mechanizmie powstawania nadwrażliwości alergicznej na trzecio- i czwartorzędowe związki amoniowe mogą mieć reakcje związane z tworzeniem w białkach kowalencyjnie związanych ugrupowań amoniowych w sposób podobny do tego jaki został wcześniej przedstawiony dla reakcji aldehydu glutarowego z grupami aminowymi lizyny [8]. Dotychczas nie zaobserwowano jednak aby wcześniejsza ekspozycja na aldehyd glutarowy mogła przyczynić się do wystąpienia reakcji nadwrażliwości na czwartorzędowe związki amoniowe. Inna możliwość trwałego wprowadzenia grupy amoniowej do białka łączy się z jej występowaniem w związkach, które w swojej strukturze chemicznej zawierają również ugrupowania mogące tworzyć wiązania kowalencyjne z białkiem lub uzyskują takie ugrupowania po aktywacji metabolicznej [26].

Białka zmodyfikowane przez aldehyd glutarowy i prezentacja neoantygenów przez komórki dendrytyczne

Aldehyd glutarowy, który wniknął do dróg oddechowych w postaci aerozolu lub cząstek pyłowych zawartych we wdychanym powietrzu, reaguje głównie z białkami znajdującymi się w przestrzeniach pozakomórkowych oraz z białkami związanymi z błonami komórkowymi. Tylko niewielkie ilości aldehydu glutarowego przenikają do wnętrza komórek i wiążą się z białkami wewnątrzkomórkowymi. Ilość ta może ulec istotnemu zwiększeniu kiedy w preparatach zawierających ten aldehyd znajdują się związki powierzchniowo czynne, np. czwartorzędowe związki amoniowe. Obecność w cząsteczce aldehydu glutarowego dwóch wysoce reaktywnych grup aldehydowych powoduje, że reagując z białkami tworzy on duże agregaty białkowe. Powstają one w wyniku tworzenia z udziałem aldehydu glutarowego wiązań krzyżowych głównie w wyniku reakcji z resztami lizyny, w mniejszym stopniu z resztami cysteiny, występującymi w łańcuchach polipeptydowych białek [8].

Mimo znaczącego postępu w zrozumieniu mechanizmów immunologicznych związanych z wystąpieniem reakcji nadwrażliwości alergicznej w drogach oddechowych wiedza o znaczeniu neoantygenów białkowych tworzonych przez aldehyd glutarowy w zapoczątkowaniu i utrzymywaniu się stanu zapalnego oraz nadreaktywności oskrzelowej jest jeszcze nadal daleka od wyjaśnienia.

Podstawowym elementem komórkowym układu odpornościowego, w którym zostaje zapoczątkowana reakcja immunologiczna w odpowiedzi na aldehyd glutarowy pojawiający się w drogach oddechowych, są komórki prezentujące antygen. W płucach są to głównie komórki dendrytyczne i w znacznie mniejszym stopniu makrofagi. Komórki dendrytyczne mają zdolność pochłaniania antygenów, ich przetwarzania a następnie prezentacji określonych epitopów antygenowych limfocytom T. Komórki te spełniają nie tylko krytycznie ważną funkcję w indukcji pierwotnej odpowiedzi immunologicznej ale odgrywają również ważną rolę w procesie powstawania tolerancji immunologicznej oraz w regulacji odpowiedzi immunologicznej pośredniczonej przez limfocyty T [27].

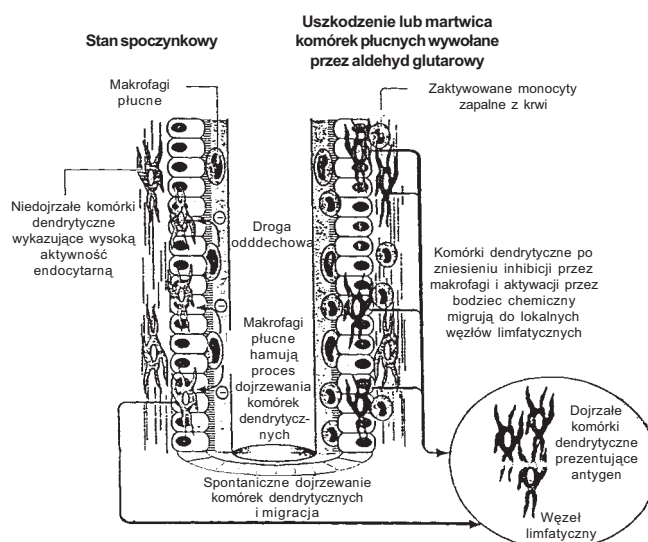
Pozakomórkowe agregaty białkowe, utworzone w wyniku reakcji aldehydu glutarowego z ϵ -aminowymi grupami lizyny lub grupami SH cysteiny, zostają wchłonięte przez komórki dendrytyczne na drodze endocytozy i zostają poddane obróbce polegającej na enzymatycznej degradacji na fragmenty peptydowe w endosomach. Powstałe peptydy, w tym również peptydy zawierające ugrupowania powstałe z połączenia cząsteczek aldehydu glutarowego z grupami aminowymi lizyny (lub grupami SH cysteiny), jeśli mają odpowiednie rozmiary, zostają ulokowane w miejscach wiązania antygenów w cząsteczkach MHC. W endosomach powstaje większość peptydów prezentowanych następnie w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Są one rozpoznawane przez limfocyty T CD4+ [28,29].

Aldehyd glutarowy, który przeniknął do wnętrza komórek dendrytycznych może reagować z białkami wewnątrzkomórkowymi. Czynnikiem wpływającym na ten proces jest szybkość metabolizmu aldehydu glutarowego, określana głównie przez aktywność dehydrogenazy aldehydowej oraz skuteczność wiązania aldehydu glutarowego przez niskocząsteczkowe związki zawierające grupy SH, takie jak cysteina lub glutation [13,20]. Te cząsteczki aldehydu glutarowego, które nie uległy degradacji do CO₂ lub nie zostały związane z niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi, wiążą się z grupami ϵ -aminowymi lizyny obecnymi w białkach wewnątrzkomórkowych. Ta reakcja doprowadza do zmiany właściwości biologicznych oraz fizyko-chemicznych białek i najczęściej do ich denaturacji. Zmodyfikowane przez aldehyd glutarowy białka, po związaniu z ubikwityną, zostają poddane procesowi hydrolizy przez enzymy proteolityczne obecne w proteasomach. Peptydy powstające w wyniku hydrolizy zmodyfikowanych białek, w tym również peptydy zawierające nowe ugrupowania chemiczne powstałe w wyniku reakcji lizyny z aldehydem glutarowym, są prezentowane na powierzchni komórek dendrytycznych przez kompleksy MHC klasy I i rozpoznawane przez limfocyty T CD8+ [28, 30].

Procesy dojrzewania komórek dendrytycznych z udziałem makrofagów płucnych oraz komórek nabłonkowych

Komórki dendrytyczne obecne w płucach nie dotkniętych procesem chorobowym są formami niedojrzałymi i znajdują się w stanie spoczynkowym. W tym stanie zachowują jednak wysoką zdolność do endocytozy antygenów białkowych i ich prezentacji w kompleksach MHC. Komórki te nie migrują i nie aktywują limfocytów T [31]. Utrzymywanie się komórek dendrytycznych w stanie niedojrzałym jest spowodowane oddziaływaniem makrofagów płucnych. Makrofagi płucne wydzielają tlenek azotu, który zdaniem Holta i wsp. hamuje procesy związane z przekształceniem komórek dendrytycznych w postać migrującą i aktywującą limfocyty T [32]. Takie oddziaływanie makrofagów na komórki dendrytyczne ma dwójakie znaczenie. Z jednej strony służy jako mechanizm ograniczający aktywację limfocytów T w częściach obwodowych tkanki płucnej a z drugiej strony umożliwia zatrzymanie w części nabłonkowej, najbardziej narażonej na kontakt z obcymi antygenami, jak największej liczby niedojrzałych komórek dendrytycznych odznaczających się największą zdolnością do endocytozy tych antygenów.

Pobudzenie komórek dendrytycznych i ich przekształcenie w formy dojrzałe może zostać wywołane przez toksyczne oddziaływania aldehydu glutarowego na tkankę płucną. Powstające zmiany o charakterze zapalnym i/lub martwiczym przyczyniają się napływu do uszkodzonej tkanki płucnej, pochodzących z krwi, niedojrzałych zapalnych monocytów, które zastępując makrofagi, w tym i te zniszczone bezpośrednim działaniem toksycznym aldehydu glutarowego, znoszą ich działanie inhibitorowe na komórki dendrytyczne (ryc. 5).



Ryc. 5. Interakcje zachodzące w drogach oddechowych między komórkami dendrytycznymi, makrofagami i monocytami

Przemiana niedojrzałych komórek dendrytycznych w formy dojrzałe w wyniku zadziałania bodźca chemicznego, jakim są pobrane drogą endocytozy białka zmienione przez aldehyd glutarowy, obejmuje dwie fazy [33]. W pierwszej fazie następuje zmniejszenie zdolności wychwytu antygenów z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji antygenów połączonych z kompleksem MHC klasy II i cząsteczek współdziałających oraz zwiększenie wytwarzania i uwalniania TNF- α /GM-CSF i IL-1 β . Te cytokiny są silnymi czynnikami przyczyniającymi się do przyspieszenia procesu dojrzewania komórek dendrytycznych. Występuje bardzo ściśle wzajemne powiązanie czynnościowe między cytokinami wydzielanymi przez komórki nabłonkowe płuc a komórkami dendrytycznymi [34]. Wychwycenie przez komórki dendrytyczne białek zmodyfikowanych przez aldehyd glutarowy i prezentacja antygenów peptydowych przez MHC II na powierzchni tych komórek łączy się ze zwiększoną syntezą IL-1 β . Ta cytokina oddziałując na komórki nabłonkowe stymuluje w nich produkcję i wydzielanie TNF- α i/lub GM-CSF, a także IL-1 α . Komórki nabłonkowe mogą również same produkować TNF- α i GM-CSF na drodze ich aktywacji przez aldehyd glutarowy pojawiający się w drogach oddechowych.

Migracja komórek dendrytycznych z błony śluzowej dróg oddechowych do regionalnych węzłów limfatycznych, po zniesieniu blokującego działania makrofagów płucnych, zostaje zapoczątkowana przez bezpośrednie zadziałanie TNF- α na receptory TNF-R2 obecne w komórkach dendrytycznych. Rozważany jest także udział GM-CSF. Migracji komórek dendrytycznych z błony śluzowej dróg oddechowych do regionalnych węzłów chłonnych sprzyja synteza powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, VCAM-1 oraz ELAM-1 przez komórki nabłonkowe tej błony poddane działaniu bodźca chemicznego [35, 36].

W drugiej fazie, po kontakcie komórek dendrytycznych z dziewiczymi limfocytami T, dochodzi do utraty zdolności do pochłaniania antygenów i dalsze zwiększenie ekspresji przetworzonych antygenów oraz produkcji i uwalniania TNF- α , IL-1 β i IL-12. Te zależne od dziewiczych limfocytów T przemiany są wynikiem oddziaływania między cząsteczkami powierzchniowymi limfocytów T i komórek dendrytycznych oraz działania na te ostatnie IFN- γ wytwarzanego przez limfocyty T. W pełni dojrzałe komórki dendrytyczne wykazują nie tylko wysoką ekspresję powierzchniowych cząsteczek MHC ale również cząsteczek kostymulujących CD40, CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2). Zwiększa się także stężenie CD83, będącego specyficznym markerem dla dojrzałych komórek dendrytycznych.

Mechanizm aktywacji limfocytów T przez komórki dendrytyczne po ich ekspozycji na aldehyd glutarowy

Molekularne mechanizmy działania aldehydu glutarowego na komórki dendrytyczne oraz komórki nabłonkowe dróg oddechowych, które mają decydujący wpływ na rodzaj cytokin produkowanych przez te komórki oraz na rodzaj odpowiedzi immunologicznej, komórkowej lub humoralnej, są mało poznane. Można przypuszczać, że aldehyd glutarowy nie tylko indukuje migrację i ostateczne dojrzewanie komórek dendrytycznych ale określa także ich fenotyp funkcjonalny związany z produkcją cytokin określających następnie polaryzację limfocytów w kierunku Th1 i Th2 lub przejście w formę immunologicznie nieaktywną (Th3). Ta ostatnia forma zachowuje tylko zdolność do syntezy cząsteczek MHC i prezentacji antygenów ale nie syntetyzuje cząsteczek kostymulujących B7.

Aktywacja limfocytów T przez komórki dendrytyczne prezentujące peptydy, zawierające reszty lizyny zmodyfikowane przez aldehyd glutarowy, może być opisana analogicznie jak w przypadku diizocyjanianów przy pomocy tzw. modelu trój sygnałowego [37].

Aldehyd glutarowy, który pojawił się w drogach oddechowych, ujawnia swoje silne właściwości cytotoksyczne reagując m.in. z białkami błonowymi komórek nabłonkowych. Tworzenie wiązań krzyżowych w białkach i między białkami oraz związana z tym zmiana właściwości fizykochemicznych tych białek doprowadza do wystąpienia dezintegracji błon komórkowych i zwiększenia ich przepuszczalności. Substancje, które normalnie nie przechodzą z komórek do środowiska zewnątrz komórkowego, lub przechodzą tylko w niewielkim stopniu, zostają nagle uwolnione w dużych ilościach. To powoduje, że w miejscach uszkodzenia nabłonka płucnego przez aldehyd glutarowy pojawiają się lokalnie wysokie ich stężenia. Do tych substancji należą m.in. adenozyne, ADP i ATP. Dwa ostatnie nukleotydy są szybko przekształcane w adenozyne z udziałem ekto-ATP/ADP-az, w tym CD39 (NTPDazę 1 - ekto-nukleozydotrifosforano difosfohydrolazę), oraz ekto-5' nukleotydyazy, w tym CD73). Deaminaza adenozyne (ADA) katalizuje nieodwracalną deaminację adenozyne do inozyne [38]. Nukleotydy purynowe spełniają bardzo ważną funkcję jako cząsteczki sygnalingu między- i wewnątrzkomórkowego [39]. Pierwsze kliniczne obserwacje łączące adenozyne z funkcjonowaniem układu odpornościowego zostały dokonane u osób cierpiących na chorobę złożonego braku odporności (SCID - *severe combined immunodeficiency disease*). U osób tych nie występuje deaminaza adenozyne i nie mogą one przeprowadzać reakcji deaminacji adenozyne [40]. Prowadzi to do wzrostu jej stężenia w płynach

pozakomórkowych. W wysokich stężeniach adenozyne ujawnia swoje działanie limfotoksyczne oraz hamujące na pośredniczoną przez TCR proliferację limfocytów. Adenozyne w wysokich stężeniach powoduje za pośrednictwem receptorów A2 hamowanie funkcji efektorowych limfocytów oraz wykazuje działanie przeciwzapalne [41]. Ostatnio wykazano, że wysokie stężenia adenozyne oddziałujące na receptory A2a w monocytach powodują zahamowanie syntezy IL-12 przy jednoczesnej stymulacji syntezy IL-10 [42]. Przez ten mechanizm wysokie stężenia adenozyne, pojawiające się w płynie śródkomórkowym tkanki płucnej w wyniku toksycznego działania aldehydu glutarowego na błony komórek nabłonkowych, mogą powodować również supresję przekształcenia limfocytów Th0 w Th1 i ukierunkować to przekształcenie w formę Th2. Przymuszczenie heterozygotyczni nosiciele defektywnego genu deamianazy adenozyne rozkładają adenozyne znacznie wolniej niż homozygotyczni nosiciele dzikiej formy tego genu i w warunkach ekspozycji na substancje chemiczne mające właściwości haptenu oraz właściwości cytotoksyczne, np. aldehyd glutarowy, powinni rozwijać odpowiedź immunologiczną typu humoralnego (Th2). Na ukierunkowanie odpowiedzi immunologicznej na aldehyd glutarowy mogą również oddziaływać genetycznie uwarunkowane zmiany w aktywności enzymów biorących udział w przekształceniu ATP i ADP w adenozyne [43].

Białko komórek Clara (CC16) a astma wywołana przez aldehyd glutarowy

Płuca w odpowiedzi na działanie oksydantów środowiskowych wykształciły mechanizmy obronne, w których istotną rolę spełniają komórki Clara. Nieurzęsione komórki Clara rozmieszczone są wśród komórek nabłonkowych oskrzelików i z racji zdolności syntetyzowania cytochromu P-450-naturalnego generatora rodników ponadtlenkowych w błonach siateczki endoplazmatycznej gładkiej są głównym obiektem oddziaływania związków toksycznych występujących w powietrzu. Jednym z produktów wydzielniczych komórek Clara jest niskocząsteczkowe białko CC16 (synonim CC10) stanowiące 5-10% białka całkowitego obecnego w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych. Białko to uważane jest za natywny, silnie działający czynnik immunosupresyjny i przeciwzapalny. Hamuje *in vitro* chemotaksję neutrofilów i monocytów oraz fagocytozę. Jest inhibitorem aktywności fosfolipazy A2 zarówno wydzielonej jak i wewnątrzkomórkowej, w ten sposób bezpośrednio wpływając m.in. na syntezę leukotrienów. Hamuje także wytwarzanie i aktywność IFN- γ , a także aktywację integryn (np. $\alpha 5\beta 1$). *In vivo* niedobór CC16 u myszy powoduje wzrost produkcji TNF- α i IL-1 β oraz ekspresji mRNA chemokin MIP i MCP-1 w tkance płucnej w przebiegu ostrego wirusowego zapalenia płuc. Gen CC16 jest zlokalizowany w obrębie chromosomu 11, w którym znajduje się wiele

genów regulujących zapalenie w tym gen podjednostki β IgE R1. Polimorfizm regionu końca 5' nie podlegającego translacji exonu 1 genu CC16 jest związany według niektórych autorów ze znacznym wzrostem ryzyka astmy dziecięcej, a jego mutacja wiąże się z niskimi poziomami białka CC16 w surowicy [wg 44]. Ekspozycja inhalacyjna na stosunkowo niskie, zbliżone do przyjętych normatywów higienicznych stężenia aldehydu glutarowego wywołuje znaczny spadek poziomu białka CC16 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych szczurów [45]. Obniżone poziomy białka Clara w surowicy zaobserwowano zarówno u zdrowych osób ekspozowanych na glutaraldehyd na stanowisku pracy, jak i u osób z astmą wywołaną przez ten związek chemiczny [46, 47]. W przypadkach astmy wywołanej przez aldehyd glutarowy stwierdzono także niskie poziomy CC16 i spadek stężenia CC16 w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych uzyskanych po próbie prowokacyjnej wziewnej z tym alergenem [47]. Trudno jest w chwili obecnej wnioskować o rzeczywistej roli toksycznego wpływu aldehydu glutarowego na komórki Clara w patogenezie astmy wywołanej przez ten związek chemiczny, ale przedstawione dane sugerują istnienie dodatkowego, promującego zapalenie mechanizmu będącego wynikiem takiej ekspozycji.

Klinika i postępowanie diagnostyczne

Reakcja astmatyczna u osób uczulonych na aldehyd glutarowy ma charakter dwufazowy lub izolowany późny i z reguły towarzyszą jej objawy nieżyty nosa. Jakkolwiek nie uzyskano przekonujących dowodów wskazujących na występowanie krzyżowych reakcji nadwrażliwości alergicznej na aldehydy to często stwierdza się dodatnie wyniki prób prowokacyjnych z formaldehydem u osób z astmą wywołaną przez aldehyd glutarowy [4]. Spotyka się również współistnienie równoczesnego uczulenia dróg oddechowych na aldehyd glutarowy i inne związki niskocząsteczkowe, nie będące aldehydami, np. chloraminę T [48]. W niektórych przypadkach astmy z uczulenia na aldehydy występuje współistnienie kontaktowego zapalenia skóry, które z reguły poprzedza wystąpienie astmy. Aktualnie nie można rozstrzygnąć, czy schorzenia te występują niezależnie od siebie, czy też ma miejsce bliżej nieokreślona współzależność patogenetyczna [5].

Diagnostyka uczulenia dróg oddechowych na aldehyd glutarowy opiera się w pierwszym rzędzie na próbach prowokacyjnych na stanowisku pracy. Składają się na nią: monitorowanie PEFR lub, co wydaje się w tym przypadku bardziej wskazane, próba z szybko działającym lekiem $\beta 2$ -sympatykomimetycznym i placebo. Wynik ujemny próby zwalnia od konieczności prowadzenia dalszych badań i wyklucza astmę zawodową. Wynik dodatni nakazuje przeprowadzenie dalszych prób kontrolowanych w warunkach laboratoryjnych. Samo wystąpienie zaburzeń

wentylacji w kontakcie z glutaraldehydem nie może być podstawą rozpoznania astmy, ponieważ zjawisko to zaobserwowano również u zdrowych osób. Charakterystyczny zapach glutaraldehydu, który może być łatwo zidentyfikowany przez badanego, z jednej strony uniemożliwia dobór właściwego placebo a z drugiej rodzi potrzebę obiektywizacji metod oceny wyniku prób prowokacyjnych poprzez pomiary parametrów cytologicznych i biochemicznych popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych lub nosowych czy też płwociny indukowanej. Testy punktowe z glutaraldehydem z reguły dają wyniki ujemne i podobnie jak oznaczanie alergenowo swoistych IgE w surowicy nie mają znaczenia diagnostycznego [wg 5].

Uwagi końcowe

Narażenie na związki chemiczne o małej masie cząsteczkowej jest powszechnie spotykane zarówno w miejscu pracy jak i w środowisku komunalnym. Tylko nieliczne z tej ogromnej licznie grupy substancji chemicznych są w chwili obecnej uważane za potencjalne lub pewne astmogeny. Trudności związane z identyfikacją

związków o małej masie cząsteczkowej jako alergenów układu oddechowego czy też czynników promujących alergizację związane są w dużej mierze związane z występowaniem wyjątkowo złożonych, bezpośrednich jak i pośrednich oddziaływań na układ immunologiczny. Wchodzą tu w grę zarówno efekty wywierane przez związki chemiczne *per se*, ich metabolity, a także interwencja oddziaływań o charakterze toksycznym w tym immunotoksycznym oraz immunologicznym. Szczególnie zagadnienia dotyczące metabolizmu alergenów niskocząsteczkowych w patogenezie uczuleń dróg oddechowych jest stosunkowo mało poznane. Niedostatek danych o patogenezie skutkuje brakiem odpowiednich metod diagnostycznych i obniża trafność rozpoznań klinicznych. Rola aldehydu glutarowego jako czynnika wywołującego astmę oskrzelową przez długi okres poddawana była w wątpliwość. W chwili obecnej jest on uważany za bardzo istotny astmogen, szczególnie dla pracowników ochrony zdrowia. Warto tu zauważyć, że wartości przyjętych normatywów higienicznych dla tego związku są często przekraczane na stanowiskach pracy personelu medycznego w Polsce, a liczba rozpoznanych przypadków uczuleń na glutaraldehyd uległa znacznemu wzrostowi [49].

Piśmiennictwo

1. Kieć-Świerczyńska M, Kręcisz B, Krysiak B i wsp. Occupational allergy to aldehydes in health care workers. Clinical observations. Experiments. *Int J Occup Med Environ Health* 1998; 11: 349-358.
2. Pałczyński C, Walusiak J, Wittczak T i wsp. Respiratory allergy to disinfectants. Cross sectional study in nurses. *Eur Resp J* 1998; 121: 39s.
3. Di Stefano P, Siriruttanapruk S, McCoach JS, Burge P.S. Occupational asthma due to glutaraldehyde. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53: 50-55.
4. Gannon PFG, Bright P, Campbell M i wsp. Occupational asthma due to glutaraldehyde and formaldehyde in endoscopy and x ray departments. *Thorax* 1995; 50: 156-159.
5. Pałczyński C. Alergia natychmiastowa na środki odkażające. w: Alergia zawodowa u pracowników służby zdrowia. red.: C. Pałczyński. wyd. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 2000; 123-144.
6. Kieć-Świerczyńska M, Kręcisz B, Pałczyński C i wsp. Allergic contact dermatitis from disinfectants in farmers. *Contact Dermatitis* 2001; 45: 168-169.
7. Griem P, Gleichmann E. Chemically induced allergy and autoimmunity: What do T cells react against? w: *Comprehensive Toxicology*. Vol. 5. Toxicology of the Immune System, wyd. D.A. Lawrence. Pergamon. New York 1997; 323-351.
8. Beauchamp RO, St.Clair MBG, Fennell TR i wsp. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22: 143-174.
9. Curran AG, Burge PS, Wiley E. Clinical and immunologic evaluation of workers exposed to glutaraldehyde. *Allergy* 1996; 51: 826-832.
10. Dearman RJ, Basketter DA, Evans P, Kimber I. Comparison of cytokine secretion profiles provoked in mice by glutaraldehyde and formaldehyde. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 124-132.
11. Agius RM. Why are some low-molecular-weight agents asthmagenic. *Occup Med* 2000; 15: 369-384.
12. Wisniewski AV, Lamus R, Karol MH, Redlich CA. Isocyanate-conjugated human lung epithelial cell proteins: A link between exposure and asthma? *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 341-347.
13. Petersen D, Lindahl R. Aldehyde dehydrogenase. w: *Comprehensive Toxicology*. Vol. 3. Biotransformation. wyd. F.P. Guengerich. Pergamon New York 1997; 97-118.
14. Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 10017-10026.
15. Wisniewski AV, Redlich CA. Recent developments in diisocyanate asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 169-175.
16. Gordon HH. Pitted keratolysis, forme fruste: a review and new therapies. *Cutis* 1975; 15: 54-67.
17. Nimni ME, Cheung D, Strates B i wsp. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 741-745.
18. Cheung DT, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I; reaction with model compounds. *Connect Tiss Res* 1982; 10: 187-198.
19. Winiarska K. Glutation: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu. *Post Biochem* 2000; 46: 318-326.
20. Fisher MM, Baldo BA. Immunoassays in the diagnosis of anaphylaxis to neuromuscular blocking drugs: the value of morphine for the detection of IgE antibodies in allergic subjects. *Anaesth Intens Care* 2000; 28: 167-170.
21. Baldo BA, Pham NH. Structure activity studies on drug-induced anaphylactic reactions. *Chem Res Toxicol* 1994; 7: 703-721.
22. Baldo BA, Pham NH, Zhao Z. Chemistry of drug allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 327-335.

23. Seed MJ, Evan PW. Anaphylaxis caused by neostigmine. *Anaesthesia* 2000; 55: 574-575.
24. Scrutton NS, Raine ARC. Cation-p binding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. *Biochem J* 1996; 319: 1-8.
25. Fukushima N, Ishii I, Contos JJA i wsp. Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 507-534.
26. Naisbitt DJ, Williams DP, Pirmhamed M i wsp. Reactive metabolites and their role in drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001 1: 317-325.
27. Banchereau J, Briere F, Caux Ch i wsp. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
28. Pieter SJ. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 89-96.
29. Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi C i wsp. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* 1997; 64: 1-38.
30. Smith WB, Holt PG. Professional antigen-presenting cells. w: *Asthma and Rhinitis*. wyd. W. Busse, S. Holgate, Blackwell Science Ltd. Oxford 2000; 650-670.
31. Holt PG, Oliver J, Bilyk N. Downregulation of the antigen presenting cell function (S) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; 177: 397-407.
32. Kimber I., Dearman RJ. Immunobiology of chemical respiratory sensitization. w: *Toxicology of chemical respiratory hypersensitivity*. wyd.: I. Kimber, R.J. Dearman. Taylor & Francis. London 1997; 73-106.
33. Pawankar R. Epithelial cells as immunoregulators in allergic airway diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:1-5.
34. Goebeler MG, Meinardus-Hager J, Roth J i wsp. Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers, directly induce expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) by endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 759-765.
35. Wagner M, Klein CL, van Kooten TG, Kirkpatrick CJ. Mechanisms of cell activation by heavy metal ions. *J Biomed Mat Res* 1998; 42: 443-452.
36. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A i wsp. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 162: 3256-3262.
37. Lutz W, Pałczyński C. Molekularne i immunologiczne uwarunkowania astmy wywołanej przez izocyjaniiny: obecny stan wiedzy. *Alergia Astma Immunologia* 2002; 7: 131-139.
38. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 166: 3837-3845.
39. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1127-1146.
40. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F i wsp. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; 2: 1067.
41. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkowsky M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signalling in adenosine-mediated inhibition of T cell activation and expansion. *Blood* 1997; 90: 1600-1608.
42. Link AA, Tomoshige K, Worth JA i wsp. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000; 164: 436-442.
43. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC i wsp. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nature Med* 2002; 8: 358-365.
44. Broeckaert F, Bernard A. Clara cell protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 469-475.
45. Hałatek T, Opalska B, Pałczyński C i wsp. Glutaraldehyde inhalation exposure of rats: effects on lung morphology, Clara cell protein and hyaluronic acid levels in BALF. *Inhal Toxicol* 2003; 15: 85-97.
46. Pałczyński C, Walusiak J, Hałatek T i wsp. The effect of occupational exposure to glutaraldehyde on serum Clara cell protein. *Eur Resp J* 2002; 20: 603s.
47. Pałczyński C, Hałatek T, Walusiak J i wsp. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage in occupational asthma due to glutaraldehyde. *Eur Resp J* 2001; 18: 281s.
48. Pałczyński C, Walusiak J, Ruta U, Górski P. Occupational asthma and rhinitis due to glutaraldehyde: changes in nasal lavage fluid after specific inhalatory challenge test. *Allergy* 2001; 56: 1186-1191.
49. Małaszuk J, Andrzejak R, Przybylski M i wsp. Wstępna ocena narażenia na aldehyd glutarowy w wybranych pracowniach endoskopowych. *Med Pracy* 2000; 51: 365-371.