

---

Sisältöluettelot saatavana ScienceDirect-tietokannasta

## Toxicology and Applied Pharmacology

lehden kotisivut: [www.elsevier.com/locate/ytaap](http://www.elsevier.com/locate/ytaap)

---

### Monikemikaaliherkkyyden biologinen määrittely hapetus-pelkistystilan ja sytokiinin profiloinnin eikä vierasaineita metaboloivien entsyymien polymorfismin kautta

Chiara De Luca <sup>a</sup>, Maria G. Scordo <sup>b</sup>, Eleonora Cesareo <sup>a</sup>, Saveria Pastore <sup>a</sup>, Serena Mariani <sup>a</sup>, Gianluca Maiani <sup>a</sup>, Andrea Stancato <sup>a</sup>, Beatrice Loreti <sup>c</sup>, Giuseppe Valacchi <sup>d,e</sup>, Carla Lubrano <sup>c</sup>, Desanka Raskovic <sup>f</sup>, Luigia De Padova <sup>c</sup>, Giuseppe Genovesi <sup>c</sup>, Liudmila G. Korkina <sup>a,\*</sup>

*a* Kudosteknologian ja ihon patofysiologian laboratorio, Ihotauti-instituutti (IDI IRCCS), Rooma, Italia

*b* Lääketieteen yksikkö, Kliininen farmakologia, Uppsalan yliopistollinen sairaala, Ruotsi

*c* Lääketieteellisen patofysiologian yksikkö, Rooman Sapienza-yliopisto, Policlinico Umberto I, Rooma, Italia

*d* Biolääketieteen yksikkö, Sienan yliopisto, Italia

*e* Ravitsemustieteen yksikkö, Kyung Hee -yliopisto, Soul, Korea

*f* Dermatologian 2. jaos, Ihotauti-instituutti (IDI IRCCS), Rooma, Italia

---

#### ARTIKKELIN TIEDOT

##### Artikkelin julkaisutiedot:

Vastaanotettu 9. maaliskuuta  
2010

Tarkistettu 18. huhtikuuta 2010

Hyväksytty 20. huhtikuuta 2010

Saatavana Internetistä xxxxx

##### Avainsanat:

Katalaasi

CYP

Sytokiini

Rasvahappo

Geneettinen polymorfismi

GST

#### TIIVISTELMÄ

**Taustaa:** Monikemikaaliherkkyys (MCS) on sekä kliiniseltä että biologiselta kannalta huonosti määritelty ympäristöoireyhtymä. Hypoteeseja on esitetty sekä vierasaineita metaboloivien vaiheen I/vaiheen II entsyymien toimintahäiriöistä että hapetus-pelkistysepätasapainosta, mutta niihin liittyviä geneettisiä ja metabolisia parametreja ei ole MCS:n kohdalla systemaattisesti tutkittu.

**Tavoitteet:** Tutkimusryhmämme etsi MCS-potilailta geneettisiä, immunologisia ja metabolisia merkkiaineita.

**Menetelmät:** Genotyypitimme potilaita, joilla oli joko diagnosoitu MCS tai joilla sitä epäiltiin, ja terveitä italialaisia verrokkeja seuraavien alleelivarianttien määrittämiseksi: sytokromi P450 -isoformit (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ja CYP3A5), UDP-glukuronosyylitransferaasi (UGT1A1) ja glutationi-S-transferaasit (GSTP1, GSTM1 ja GSTT1). Näiltä ryhmiltä määritettiin myös punasolujen solukalvon rasvahapot, antioksidanttientsyymit (katalaasi, superoksididismutaasi [SOD]) ja glutationia metaboloivat entsyymit (GST, glutationiperoksidaasi [Gpx]), kokoveren kemiluminesenssi, kokonaisantioksidanttikapasiteetti, nitriitti-

/nitraattiarvot, glutationi, HNE-proteiinisitoutumistuotteet ja useita eri plasman sytokiineja.

*Tulokset:* CYP-entsyymien, UGT:n, GSTM:n, GSTT:n ja GSTP:n alleeli- ja genotyyppifrekvenssit olivat samankaltaisia sekä italialaisilla MCS-potilailla että verrokeilla. Punasolujen katalaasi- ja GST-aktiivisuus oli vähäisempää mutta Gpx-aktiivisuus normaalia kiivaampaa. MCS-ryhmissä oli vähemmän sekä pelkistynyttä että hapettunutta glutationia, kun taas nitriittien/nitraattien pitoisuudet olivat kasvaneet. MCS-potilaiden rasvahappoprofiilissa todettiin siirtymää tyydyttyneiden rasvahappojen suuntaan, ja gammainterferonin, IL-8:n, IL-10:n, MCP-1:n, PDGFbb:n ja VEGF:n pitoisuudet olivat kasvaneet.

*Päätelmät:* Hapetus-pelkistystasapainon ja sytokiiniprofiilin muutokset viittaavat metaboloivien entsyymien ja antioksidantientsyymien ilmentymisen/aktiivisuuden estoon MCS-oireyhtymässä. Kiihtyneeseen lipidien hapettumiseen, lisääntyneeseen typpioksidituotantoon, glutationivarastojen ehtymiseen sekä tulehdusta aiheuttavien plasman sytokiinien lisääntymiseen viittaavat aineenvaihduntaparametrit tulisi ottaa huomioon MCS:n biologisessa määrittelyssä ja diagnosoinnissa.

© 2010 Elsevier Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

*Lyhenteet:* CL, kemiluminesenssi; CYP, sytokromi P450; DHA, dokosaheksaenihappo; Gpx, glutationiperoksidaasi; GSH ja GSSG, glutationin pelkistyneet ja hapettuneet muodot; GST, glutationi-S-transferaasi; HNE, 4-hydroksi-2-nonenaali; IFN-gamma, gammainterferoni; IL, interleukiini; MCP, makrofagin kemotaktinen proteiini; MCS, monikemikaaliherkkyys; PDGF, verihitulekasvutekijä; PMA, forboli-12-myristaatti-13-asetaatti; PUFA, monitydyttymättömät rasvahapot; RT PCR, käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktio; CuZnSOD, kupari-sinkki-superoksididismutaasi; UGT, UDP-glukuronosyylitransferaasi; VEGF, verisuonen endoteelin kasvutekijä.

\* Vastaava kirjoittaja. Laboratory of Tissue Engineering & Skin Pathophysiology, Istituto Dermopatico dell'Immacolata, Via Monti di Creta 104, Rome 00167, Italy. Fax: +39 06 66464254.  
Sähköpostiosoite: l.korkina@idi.it (L.G. Korkina).

0041-008X/\$ – ks. kansi © 2010 Elsevier Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.  
doi:10.1016/j.taap.2010.04.017

## Johdanto

Kysymykseen, ovatko monikemikaaliherkkyys (MCS) ja muut oireyhtymät, joita ei pystytä lääketieteen keinoin selittämään (kuten fibromyalgia, krooninen väsymysoireyhtymä, Persianlahden oireyhtymä, sairas rakennus - oireyhtymä ja muut häiriötilat, joista käytetään myös yläkäsitettä ”ympäristöyliherkkyys”) kliinisesti määriteltävissä, ei ole toistaiseksi löytynyt selkeää vastausta. Tämä johdattaa potilailla esiintyvien oireiden moninaisuudesta ja laaja-alaisuudesta, selkeiden diagnostisten kriteerien puutteesta, kliinisten oireiden annosriippuvuudesta altistuksen yhteydessä ja taudinaiheuttajamekanismien heikosta tuntemuksesta (Bolt & Kiesswetter, 2002; Bornschein et al., 2001; Kipen & Fiedler, 2002). Kehittyneissä maissa MCS-potilaiden määrä on ollut tasaisessa kasvussa, ja Yhdysvaltain väestöstä jo jopa 15 % sairastaa tätä tautia (Caress & Steinemann, 2003). Uudet levottomuutta herättävät määritelmät kuten ”kemikaali-AIDS”, ”kemikaali-allergia” ja ”ympäristöallergia” kuvaavat tavallisten kansalaisten kasvavaa huolta tilanteesta. Itensä monikemikaaliherkiksi luokittelevat potilaat kärsivät uusiutuvista monielinoireista, jotka vaikuttavat hermostoon, sydämeen ja verisuonistoon, ruoansulatuselimistöön, hen-

gitysteihin, tuki- ja liikuntaelimestöön, ihoon ja silmän epiteeliin (Kipen & Fiedler, 2002). Yhdysvalloissa ja Kanadassa tehtyjen epidemiologisten kyselytutkimusten mukaan patologisesti lisääntyneen kemikaaliherkkyyden oireet ovat tavallisessa väestössä suhteellisen yleisiä. Keuhkoastmaa sairastavilla ne ovat kuitenkin vielä yleisempiä ja vaikeasteisempia (Kipen & Fiedler, 2002; Kreutzer et al., 1999). Useimpien MCS-potilaiden ensioireet kehittyvät heidän altistuttuaan voimakkaasti jollekin tuoksuvalle orgaaniselle aineelle (oireet laukaiseva ensisijainen altiste). Samat oireet palaavat ja/tai uusia oireita ilmaantuu henkilön altistuessa myöhemmin erittäin matalille, joskus jopa häviävän pienille pitoisuuksille tavallisia arkielämän tuoksua, joita voivat olla esimerkiksi hajuvedet, tuore maali, puhdistusaineiden kemikaalit, painomuste, uudet lattiapäällysteet ja monet muut orgaaniset kemialliset tuotteet (matalasteiset altisteet) (Caress & Steinemann, 2003; Mattson & Cheng, 2006; Willette et al., 2007; Yadav et al., 2007). Joidenkin julkaisujen mukaan MCS-oireyhtymä kuuluu somatoformisten eli elimellisoireisten sairauksien tai muiden psykiatristen häiriöiden ryhmään (Bailer et al., 2005). Toisissa taas on pyritty todistamaan, että MCS:lle tyypillinen äärimmäisen voimakas yksilöllinen herkkyys saattaa johtua vaiheen I entsyymien (McKeown-Eyssen et al., 2004) ja vaiheen II entsyymien (Schnakenberg et al., 2007) kautta välittyvästä perinnöllisestä häiriöstä vierasaineden/endobioottien aineenvaihdunnassa. Tämän hypoteesin paikkansapitävyyttä ei kuitenkaan ole osoitettu läheskään vakuuttavasti (Berg et al., 2010). Erään hypoteesin mukaan kyseessä on noidankehä (Pall, 2001), johon liittyy peroksinitriitin ylituotanto, lipidien peroksidaatio ja proinflammatorisen tilan kehittyminen, mikä puolestaan johtaa typpioksidin (NO) tuotannon lisääntymisen ja superoksidien muodostumisen kautta peroksinitriittituotannon kiihtymiseen entisestään. Käytettävissä olevista tietokannoista ei ole saatu muita

tietoja MCS-potilailla esiintyvistä geneettisistä, immuunipuolustuksen tai aineenvaihdunnan häiriöistä.

Meidän tavoitteenamme oli todistaa työhypoteesi, jonka mukaan MCS:n molekulaarisena perustana on elimistön kemikaalipuolustuksen perinnöllinen ja/tai hankinnainen toimintahäiriö (Korkina et al., 2009). Tämä jokapaikan puolustusverkosto (vierasaineita metaboloivat vaiheen I–II entsyymit ja antioksidanttientsyymit) kehittyi evoluutiossa hyvin varhain ja huolehtii pienimolekyylisten epäorgaanisten ja orgaanisten vierasaineden, endogeenisten, muusta kuin proteiinista koostuvien signaalimolekyylien, tulehdusvälittäjäaineden, hajoamistuotteiden ja solujen myrkyllisten aineenvaihduntatuotteiden metaboliasta (Goldstone et al., 2006). Ottaen huomioon elimistön kemikaalipuolustuksen ja immuunijärjestelmän vastavuoroisen säätelyn, joka tapahtuu pääasiassa sytokiinivälitteisten yhteisvaikutusten kautta (Crawford et al., 1997; Haarmann-Stemann et al., 2009; Kerkvliet, 2009), keskityimme sekä MCS-potilaiden kemikaalipuolustuksen toimintahäiriöiden että sytokiinien säätelyhäiriöiden mahdollisiin geneettisiin ja metaboliisiin merkkiaineisiin. Tämän hypoteesin arvioimiseksi vertasimme lääkkeitä/vierasaineita metaboloivia entsyymejä (sytokromi P450 -isoformit [CYP], UDP-glukuronosyylitransferaasi [UDT] ja glutationi-S-transferaasi [GST]) koodaavien geenien geneettistä polymorfismia ja hapetuspelkistystilaan, rasvahappoprofiiliin ja sytokiiniprofiiliin liittyviä parametreja tutkittavien verinäytteistä. Tutkimuspopulaatio koostui italialaisista potilaista, joilla oli joko diagnosoitu MCS tai joilla sitä epäiltiin, ja terveistä, iän ja sukupuolen suhteen vastaavista italialaisista verrokeista. Saatujen tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että MCS-potilaiden kemikaalipuolustuksen toiminnassa saattaa olla useita vakavia häiriöitä. Nämä

toimintahäiriöt eivät välttämättä johdukaan ensisijaisesti geenivirheistä vaan metaboloivien entsyymien/antioksidanttientsyymien ilmentymisen ja/tai aktiivisuuden ei-geneettisistä muutoksista, jotka välittyvät hapetus- ja pelkistysreaktioihin osallistuvien aineiden kuten typpioksidin (NO) ja tulehdusta aiheuttavien sytokiinien, esimerkiksi gammainterferonin ja IL-10:n kautta.

## Aineisto ja menetelmät

*Reagenssit ja vasta-aineet.* Suurin osa kemiallisista reagensseista, HPLC-standardeista, kasvatusaineista, käänteiskopiointi-polymeraasiketjureaktion (RT PCR) GST-alukkeista ja fluorogeenisistä koettimista hankittiin Sigma Chemical Co. -yhtiöltä (St. Louis, Missouri, Yhdysvallat). Gpx- ja  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -tarvikkeet hankittiin Cayman Chem. Co. -yhtiöltä (Ann Arbor, Michigan, Yhdysvallat). Fluoresoivalla koettimella leimatut sytokiiniivasta-aineet hankittiin Bio-Rad Laboratories Inc. -laboratoriolta (Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat), DNA:n eristystarvikkeet Qiagen-yhtiöltä (Hilden, Saksa) ja CYP-entsyymeille ja UGT:lle soveltuvat PCR-tarvikkeet Applied Biosystems Inc. -yhtiöltä (Foster City, Kalifornia, Yhdysvallat).

*Potilaat.* Tutkimukseen otettiin 133 italialaista potilasta, joilla oli diagnosoitu Cullenin kriteerit (Cullen, 1987) ja mukautetut QEESI-kriteerit (Quick Environmental Exposure and Sensitivity Inventory) (Fabig, 2000; Miller & Prihoda, 1999) täyttävä MCS, 93 potilasta, joiden epäiltiin sairastavan MCS:ää (SMCS) ja jotka täyttivät edellä mainitut diagnostiset kriteerit osittain, sekä 218 tervettä italialaista verrokkia (C). Cullenin kriteerit täyttävä tauti on hankinnainen monielinsyndrooma, jota mikään tunnettu orgaaninen aiheuttaja ei pysty selittämään, ja joka puhkeaa potilaan altistuttua vakavasti ja dokumentoidusti hengitysilmassa oleville ympäristön haitta-aineille, joilla on määriteltävissä oleva kemiallinen rakenne. Oireita esiintyy säännöllisesti ja ennakoitavasti potilaan altistuessa ärsytysrajan

alapuolelle jääville pitoisuuksille (alle 1 % annoksesta, joka normaalisti saisi aikaan toksikologisen vasteen) yhtä tai useampaa kemiallisesti toisiinsa liittymätöntä altistetta, ja ne lievittyvät huomattavasti tai häviävät täysin, kun altiste poistetaan (Cullen, 1987).

QUEESI on referenssivalidoitu kysely, jolla voidaan määrittää potilaan herkistymisaste ympäristön kemiallisille altisteille (ilmateitse tai muuten leviävälle) ja pisteyttää altistusta seuraavien oireiden tyyppi, esiintymispaikka, vaikeusaste ja vaikutus potilaan elämään. Yleisimpiä aineita, joiden epäillänsä voivan aiheuttaa potilaille oireita, ovat muun muassa öljytuotteet ja -huurut, asfaltti, tuore terva, tupakansavu, hyönteismyrkyt, muovit, syntetiset kankaat, kosmetiikka, desinfiointiaineet ja pesuaineet, hajustetut tuotteet ja maalit. Mukautetun QEESI-kyselyn 10 yleisen ympäristöaltisteen ja 10 merkittävän oireen pisteytys mahdollisti MCS:n ( $20 < \text{pisteet} \leq 30$ ) tai SMCS:n ( $10 < \text{pisteet} \leq 20$ ) diagnosoimisen. Kaikki tutkittavat antoivat kirjallisen tietoisuuden suostumuksen. Paikallinen eettinen toimikunta hyväksyi tutkimussuunnitelman (IDI IRCCS-IDI San Carlo, Rooma, Italia; 11. joulukuuta 2008). Tutkittavien demografiset tiedot on esitetty taulukossa 1. Verrokkit valittiin seuraavien vakiintuneiden kriteerien perusteella: (i) heillä ei saanut olla mitään kliinisesti diagnosoituja sairauksia, etenkin allergioita tai immunologisia häiriöitä, ja (ii) verinäytteen ottamishetkellä he eivät olleet saaneet käyttää mitään lääkkeitä tai ravintolisiä vähintään kuuteen viikkoon. Potilasryhmässä tupakoimattomia oli 81,4 %, tupakoitsijoita 11,3 % ja 7,3 %:n tupakointistatuksesta ei ollut tietoa. Yleisessä verrokkiryhmässä ( $n = 218$ ) tupakoimattomia oli 85,2 % ja metaboliin analyysiin käytetyssä verrokkien alaryhmässä 83,7 %. Potilas- tai verrokkiryhmässä ei ollut alkoholin tai muiden päihteiden väärinkäyttäjää.

Kliinisen hoitohistorian arvioinnilla selvitetty muiden samanaikaisten sairauksien jakauma tapausryhmissä (MCS + SMCS,  $n = 226$ ) on esitetty kuvassa 1. Kilpirauhasen sairauksista

yleisin oli autoimmuunireoidiitti (11,8 %). Keuhkoastma (3,9 %) oli merkittävin hengitystiesairaus. Ruokatorven refluktiauti (8,7 %) oli yleisin ja ärtyvän suolen oireyhtymä (2,6 %) toiseksi yleisin ruoansulatuskanavan oire. Steatoosi (3,1 %) oli merkittävin maksan

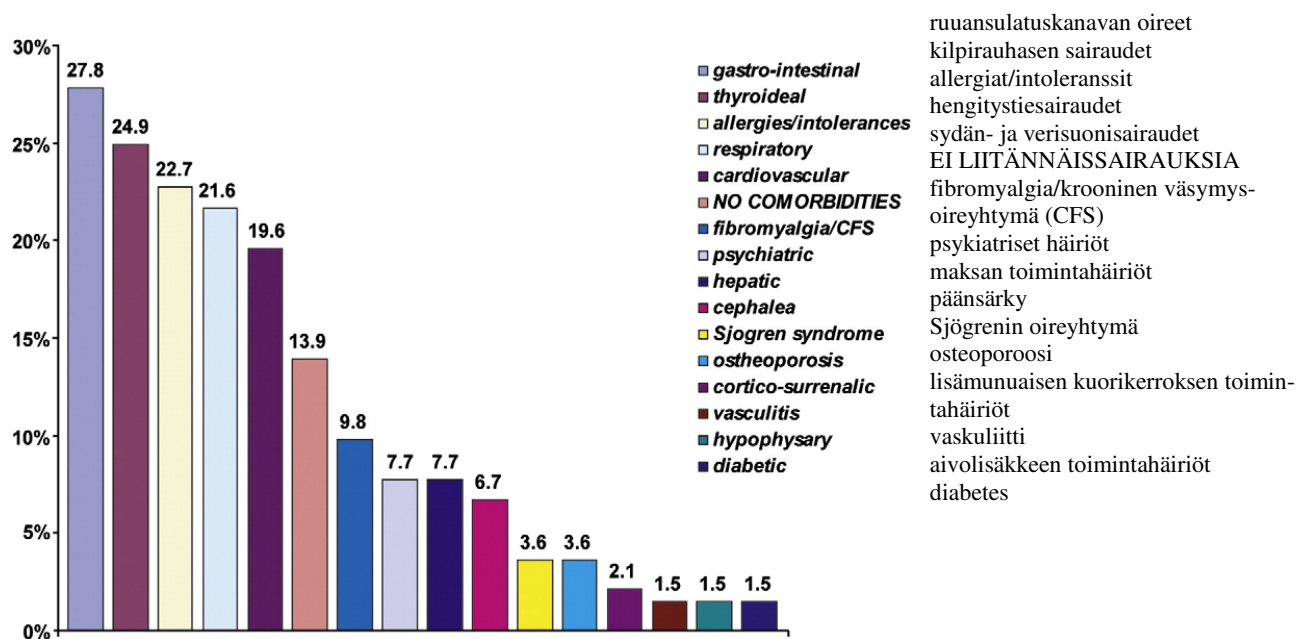
toimintahäiriö, ja 1,3 %:lla potilaista oli fibroosiin viittaavia oireita. Niistä potilaista, joilla oli jokin psykiatrinen häiriö (7,7 %), 5,2 %:lla oli ahdistuneisuutta ja masennusta, 2,6 %:lla paniikkikohtauksia ja 1,0 %:lla jokin pakko-oireinen häiriö.

### Taulukko 1

Verrokkien ja potilaiden demografiset tiedot \*

Ryhmä	Lukumäärä	Sukupuoli, F naiset/M miehet	Ikä vuosissa, ka.±keskihajonta (vaihteluväli. vuodet)
Kontrollit (kaikki)	218	105F/113 M	36±9 (23–72 vuotta)
Kontrollit (alaryhmä metabolisia analyysejä varten)	52	35 F/17 M	48±10 (22–68 vuotta)
MCS (kaikki potilaat)	226	197 F/29 M	49±11 (20–74 vuotta)
MCS (diagnostisoidut potilaat)	133	119 F/14 M	49±11 (20–74 vuotta)
SMCS (osittain diagnosoidut potilaat)	93	78 F/15 M	49±12 (25–73 vuotta)

\* Potilaat rekrytoitiin Rooman Sapienza-yliopiston lääketieteellisen patofysiologian yksiköstä, Policlinico Umberto I -sairaalaista ja Istituto Dermopatico dell'Immacolata -ihotautisairaalaista (IDI IRCCS). Verrokkit olivat molempien sairaaloiden terveitä työntekijöitä ja Sapienza-yliopiston opiskelijoita.



ruoansulatuskanavan oireet  
kilpirauhasen sairaudet  
allergiat/intoleranssit  
hengitystiesairaudet  
sydän- ja verisuonisairaudet  
EI LIITÄNNÄISSAIRAUKSIA  
fibromyalgia/krooninen väsymys-  
oireyhtymä (CFS)  
psykiatriset häiriöt  
maksan toimintahäiriöt  
päänsärky  
Sjögrenin oireyhtymä  
osteoporoosi  
lisämunuaisen kuorikerroksen toimin-  
tahäiriöt  
vaskuliitti  
aivolisäkkeen toimintahäiriöt  
diabetes

**Kuva 1.** MCS-ryhmän potilaiden (n = 226) liitännäissairaudet hoitohistorian perusteella. Tiedot on esitetty kunkin yksittäisen elinjärjestelmän sairauksia sairastaneiden potilaiden prosentiosuuksina. Lyhenne: CFS (krooninen väsymysoireyhtymä).



*Genotyyppitys.* CYP2C9-, CYP2C19- ja CYP2D6-genotyyppitys tehtiin aiemmin kuvatulla tavalla (Scordo et al., 2004). CYP3A5\*3 tunnistettiin Mirghani et al.:n (2006) reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja CYP3A5\*6 reaaliaikaisella PCR-menetelmällä, jossa käytetyt TaqMan-kitit hankittiin Applied Biosystems -yhtiöltä ja niitä käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (määrityksen tunniste: C\_30203950\_10). UGT1A1\*28-polymorfismia tutkittiin polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla. Määritykseen sovellettiin Monaghan et al.:n (1996) menetelmää pienin muutoksin. Tämän jälkeen geenien sekvensointi tehtiin CEQ 800 -DNA-analyysimenetelmällä (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Kalifornia, Yhdysvallat). GSTP1-polymorfismit, joiden seurauksena isoleusiini (villityyppi) korvautuu valiinilla (mutantti) aminohappotähteen 104 kohdalla eksonissa 5 ja alaniini (villityyppi) korvautuu valiinilla (mutantti) aminohappotähteen 113 kohdalla eksonissa 6, määritettiin reaaliaikaisella PCR-menetelmällä, jossa villityypille ja mutantille käytettiin kahta eri fluorogeenistä koetinta. Alleelien järjestys saatiin määritettyä yhdistämällä eksonin 5 ja eksonin 6 analyysitulokset. GSTM1- ja GSTT1-geenien polymorfismi määritettiin samanaikaisesti yhdellä määrityksellä, jossa käytettiin multiplex-PCR-menetelmää ja GSTM1- ja GSTT1-geenien amplifikaatiota genomisesta DNA:sta. Sisäisenä kontrollina käytettiin  $\beta$ -globiinia (Prima-vera et al., 2008).

*Hapetus-pelkistystutkimukset.* Kokoveren luminolista riippuvan kemiluminesenssin (CL) vaste forboli-12-myristaatti-13-asetaatille (PMA) (Brown et al., 1999) ja  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -pitoisuudet määritettiin Griessin reagenssilla (Giovannoni et al., 1997). Pelkistyneen ja hapettuneen glutationin (GSH ja GSSG) pitoisuudet punasoluissa kvantifioitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) (Reed et al., 1980). Kupari-sinkki-superoksididismutaasin (CuZnSOD) (Sun et al., 1988), katalaasin (Aebi, 1984), glutationi-S-transferaasin (GST) (Habig et al., 1974) ja glutationiperoksidaasin (Gpx) (Paglia and

Valentine, 1967) aktiivisuus punasoluissa mitattiin spektrofotometrillä. Kokonaisantioksidanttikapasiteetti (AOA) (Miller et al., 1993) ja 4-hydroksi-2-nonenali (HNE) -proteiinisitoutumistuotteet (Kostyuk et al., 2010) määritettiin plasmasta edellä kuvatulla tavalla.

*Punasolujen solukalvon rasvahappojen ja plasman sytokiinien profilointi.* Punasolujen solukalvon rasvahappoprofiili analysoitiin kaasukromatografilla ja massaspektrometrillä (De Luca et al., 1999). Tulokset ilmoitettiin prosentiosuuksina rasvahappojen kokonaisuudesta. 27 sytokiinin, kemokiinin ja kasvutekijän (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaksiini, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, PDGFbb, TNF $\alpha$  ja VEGF) pitoisuudet plasmassa mitattiin samanaikaisesti Bio-Rad-multiplex-menetelmällä (Deeva et al., 2009).

*Tilastollinen analyysi.* Potilaiden ja verrokki-alleeli- ja genotyyppifrekvenssien vertailuun käytettiin khiin neliö -testiä. Tilastollinen analyysi suoritettiin GraphPad Prism 4 -ohjelmistolla (San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat). P-arvoa 0,05 (tai pienempi) pidettiin tilastollisesti merkitseväenä. Hapetus-pelkistysparametrien tilastollinen analyysi suoritettiin STATISTICA 6.0 -ohjelmalla (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, Yhdysvallat). Aineiston normalisuus tarkistettiin Shapiro-Wilk-testillä. Ei-parametrisia tilastollisia testejä käytettiin, koska tietojen jakautuminen kolmessa tutkimusryhmässä poikkesi merkittävästi normaalista. Arvot esitettiin mediaaneina, alemmina ja ylempinä kvartiileina sekä minimi- ja maksimiarvoina. Riippumattomien otosten Mann-Whitneyn U-testiä käytettiin tapausryhmien ja verokkien vertailuun. Kaikki raportoidut P-arvot saatiin kaksisuuntaisista testeistä, ja alle 0,01:n suuruisten P-arvojen katsottiin osoittavan tilastollista merkitsevyyttä. Tarvittaessa P-arvoja mukautettiin monivertailujen suhteen Bonferronin korjausmenetelmällä.

## Tulokset

*CYP-entsyymien ja UGT:n alleeli- ja genotyypifrekvenssit.*

CYP-entsyymien (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ja CYP3A5) ja UGT:n alleeli- ja genotyypifrekvenssit MCS-potilaiden alaryhmässä (n = 110) ja terveiden verrokkien

ryhmässä (n = 218) on esitetty taulukoissa 2 ja 3. Potilaiden ja verrokkien genotyypifrekvenssit noudattivat Hardy-Weinbergin tasapainolakia, ja myös potilaiden ja verrokkien alleelifrekvenssit pysyivät terveillä verrokeilla todettuihin yleisyyksiin perustuvien 95 %:n luottamusvälien sisällä. Potilas- ja verrokkiryhmien välillä ei todettu tilastollisesti merkitseviä eroja.

### Taulukko 2

CYP2C9-, CYP2C19-, CYP2D6-, CYP3A5- ja UGT-alleelifrekvenssit MCS-potilailla ja terveillä verrokeilla.

Alleelivariantti	Potilaat (n=110)	Kontrollit (n=218)	$\chi^2$	95 % CI*
CYP2C9*1	0,795	0,787	ns	(0,749–0,825)
CYP2C9*2	0,123	0,133		(0,101–0,165)
CYP2C9*3	0,082	0,080		(0,055–0,105)
CYP2C19*1	0,85	0,894	ns	(0,865–0,923)
CYP2C19*2	0,15	0,106		(0,077–0,135)
CYP2C19*3	0	0		
CYP2D6*1	0,686	0,683	ns	(0,639–0,727)
CYP2D6*3	0,032	0,009		(0,000–0,018)
CYP2D6*4	0,177	0,161		(0,127–0,195)
CYP2D6*5	0	0,018		(0,006–0,030)
CYP2D6*6	0,009	0,009		(0,000–0,018)
CYP2D6*41	0,095	0,119		(0,067–0,123)
CYP3A5*1	0,095	0,059	ns	(0,037–0,081)
CYP3A5*3	0,905	0,933		(0,910–0,956)
CYP3A5*6	0	0,007		(–0,001 – 0,015)
UGT1A1*1	0,632	0,672	ns	(0,628–0,716)
UGT1A1*28	0,368	0,328		(0,284–0,372)

Lyhenteet: CI (luottamusväli), ns (ei merkitsevä).

\* Perustuu terveillä verrokeilla todettuihin yleisyyksiin.

### Taulukko 4

GST-genotyypifrekvenssit MCS-potilailla.

Genotyytit	MCS potilaat (n=144)	Terveet vapaaehtoiset <sup>a</sup>
GSTP1		
A/A, A/B, A/D	117 (81,3 %)	83 %
B/B, B/C, C/C, C/D, D/D	15 (10,4 %)	8 %
A/C tai B/D	12 (8,3 %)	9 %
GSTM1		
nolla	75 (52,1 %)	53,1 %
GSTT1		
nolla	18 (12,5 %)	19,7 %
GSTT1 nolla+GSTM1 nolla	9 (6,3 %)	10,4 %
Alleelit		
GSTP1*A	0,639	0,685
GSTP1*B	0,285	0,262
GSTP1*C	0,076	0,069
GSTM1 nolla	0,521	0,520
GSTT1 nolla	0,125	0,183

<sup>a</sup> Tiedot julkaisusta Garte et al. (2001).

Tätä artikkelia tulee lainata seuraavasti: De Luca, C., et al., Biological definition of multiple chemical sensitivity from redox state and cytokine profiling and not from polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes, Toxicol. Appl. Pharmacol. (2010), doi:10.1016/j.taap.2010.04.017

*GST-alleeli- ja genotyypifrekvenssit*  
GST-isoentsyymien (GSTP1, GSTM1 ja GSTT1) alleeli- ja genotyypifrekvenssit MCS-potilailla (n = 144) on esitetty taulukossa 4. GST-polymorfismia ei voitu analysoida verrokkiryhmässä, joten vertasimme tuloksia suuresta valkoihoisesta tutkimuspopulaatiosta julkaistuihin tuloksiin (Garte et al., 2001). Nyt saatujen ja aiemmin julkaistujen tietojen välillä ei todettu merkitseviä eroja (taulukko 4).

*Metaboliset hapetus- ja pelkistysparametrit*  
226 potilaan ja 52 terveen verrokin (C) verestä mitattiin yhteensä kymmenen metabolista hapetus- ja pelkistysparametria. Kuvasta 2 näkyy, että kuuden entsyymattisen ja ei-entsyymattisen parametrin arvoissa todettiin tilastollisesti merkitseviä muutoksia sekä MCS- että SMCS-alaryhmissä verrokeilta mitattuihin arvoihin verrattuna. Punasolujen katalaasiaktiivisuus oli merkitsevästi (P < 0,001) vähäisempää MCS- ja SMCS-potilailla kuin verrokeilla. SMCS-potilaiden arvot olivat MCS-potilaiden arvoja korkeampia (P < 0,001). Myös punasolujen GST-aktiivisuus oli MCS- ja SMCS-ryhmillä rajusti alentunut

verrokkiryhmään nähden (P < 0,001), mutta potilasalaryhmien välillä ei todettu merkitseviä eroja. MCS-ryhmässä todettiin punasolujen Gpx:n aktiivisuuden huomattavaa lisääntymistä verrattuna sekä SMCS-ryhmään (P < 0,001) että verrokkeihin (P < 0,001). SMCS-ryhmän ja verrokkiryhmän välillä ei kuitenkaan todettu eroja tämän parametrin suhteen. Sekä pelkistyneen että hapettuneen glutationin pitoisuudet olivat potilasryhmissä merkitsevästi pienempiä kuin verrokkiryhmässä (P < 0,001). SMCS-alaryhmän arvoissa oli enemmän hajontaa. MCS-potilaiden (P < 0,001) ja SMCS-potilaiden (P < 0,05) plasman NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-pitoisuudet olivat huomattavasti korkeammat kuin verrokeilla, mutta potilasryhmien välillä ei ollut eroja. Vaikka kokoveren kemiluminesenssi (CL) ja 4-HNE-proteiinisitoutumistuotteiden pitoisuuksissa oli havaittavissa nouseva ja plasman antioksidanttikapasiteetissa (AOA) laskeva trendi molemmissa potilasalaryhmissä verrokkeihin nähden, erot eivät saavuttaneet tilastollista merkitsevyyttä (kuva 2). CuZnSOD-aktiivisuus oli samaa luokkaa kaikissa tutkimusryhmissä (tietoja ei kuvassa).

### Taulukko 3

CYP2C-, CYP2C19-, CYP2D6-, CYP3A5- ja UGT-genotyypifrekvenssit MCS-potilailla ja terveillä verrokeilla.

Genotyyppi	Potilaat (n=110)	Kontrollit (n=218)	χ <sup>2</sup>	Ennuste- frekvenssit <sup>a,b</sup> (%)
CYP2C9*1/*1	72 (65,4 %)	138 (63,3 %)	ns	63,0
CYP2C9*1/*2 or *1/*3	31 (28,2 %)	67 (30,75)		32,7
CYP2C9*2/*2, *2/*3, *3/*3	7 (6,4 %)	13 (6,0 %)		4,3
CYP2C19*1/*1	80 (72,7 %)	177 (81,2 %)	ns	81,0
CYP2C19*1/*2	27 (24,6 %)	36 (16,5 %)		18,0
CYP2C19*2/*2	3 (2,7 %)	5 (2,3 %)		1,0
CYP2D6*1/*1	50 (45,4 %)	104 (47,7 %)	ns	48,0
CYP2D6*1/*3, *1/*4, *1/*5, *1/*6,*1/*41	51 (46,4 %)	90 (41,3 %)		42,6
CYP2D6*3/*4, *4/*4, *4/*5	9 (8,2 %)	24 (11,0 %)		9,4
CYP3A5*1/*1	1 (0,9 %)	2 (0,9 %)	ns	0,3
CYP3A5*1/*3	19 (17,3 %)	22 (10,1 %)		10,7
CYP3A5*3/*3, *3/*6	90 (81,8 %)	194 (89,0 %)		89,0
UGT1A1*1/*1	41 (37,3%)	104 (47,7 %)	ns	48,0
UGT1A1*1/*28	56 (50,9 %)	85 (39,0 %)		42,6
UGT1A1*28/*28	13 (11,8 %)	29 (13,3 %)		9,4

<sup>a</sup> Hardy-Weinbergin kaavalla lasketut ennustefrekvenssit.

<sup>b</sup> Perustuu terveillä verrokeilla todettuihin yleisyyksiin.

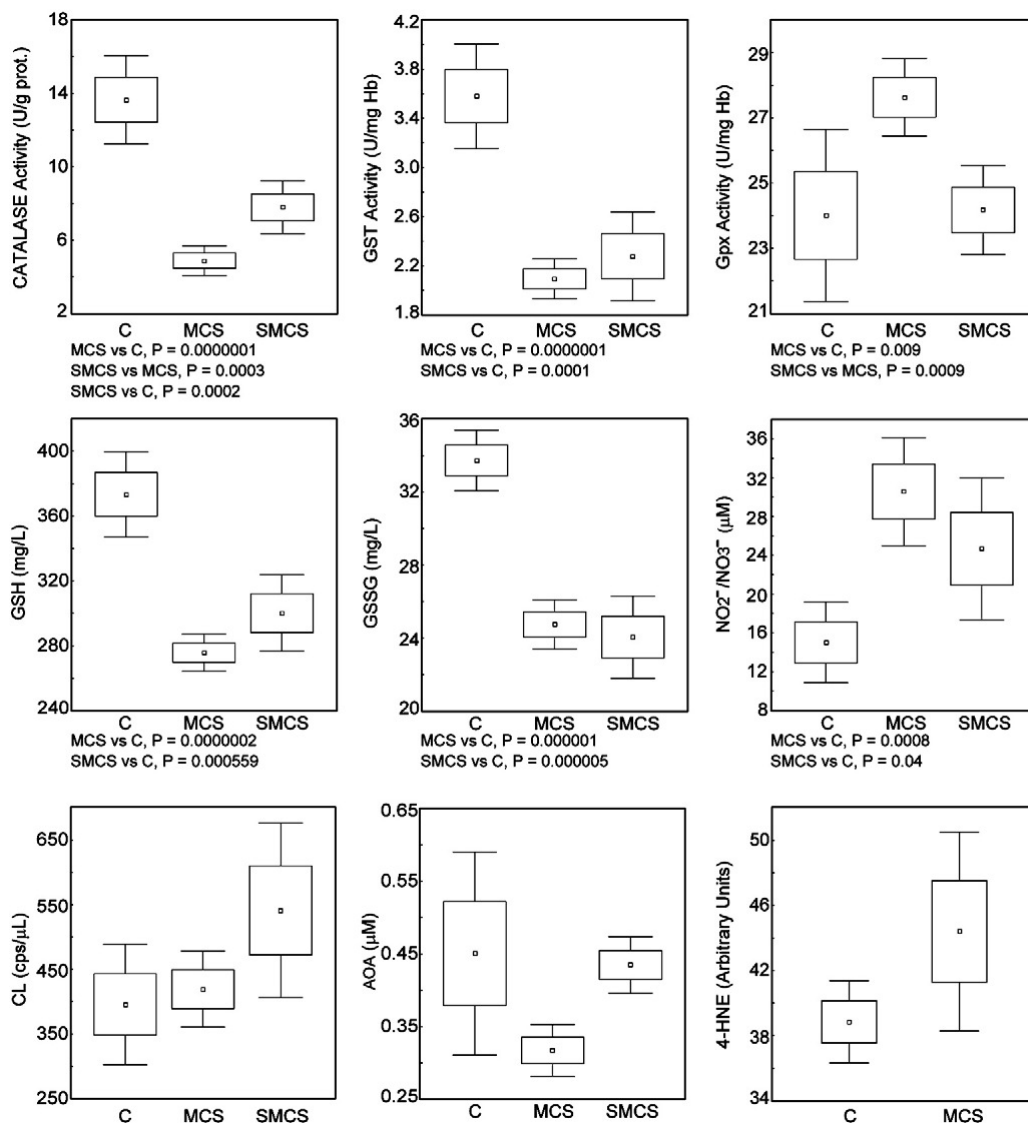


**Punasolujen solukalvon rasvahappoprofiili**  
Koska edellä mainitut aineenvaihduntatiedot olivat valtaosin samanlaisia sekä MCS- että SMCS-alaryhmissä, kalliit ja aikaavievät rasvahappo- ja sytokiiniprofiilianalyysit tehtiin vain niille MCS-potilaille, jotka täyttivät kaikki MCS:n diagnostiset kriteerit. Punasolujen solukalvon rasvahappoprofiilin vertaileva analyysi paljasti, että monitydyttymättömien rasvahappojen (PUFA) kokonaismäärä ja omega-6-linoleenihapon (18:2 w6), alfa-linoleenihapon (18:3 w6), arakidonihapon (C20:4 w6) ja omega-3-dokosaheksaeenihapon (C22:6 w3) pitoisuudet olivat MCS-potilailla merkitsevästi pienemmät ( $P < 0,001$  kaikkien parametrien kohdalla) kuin verrokeilla ja kaikkien tyydyt-

tyneiden ja kertatydyttymättömien rasvahappojen (SFA) pitoisuudet olivat vastaavasti kohonneet (kuva 3).

#### Plasman laaja sytokiiniprofiili

Verrokki- ja MCS-ryhmän potilaiden plasmapista analysoitiin peräti 27 sytokiinin, kemokiinin ja kasvutekijän pitoisuudet. Tuloksissa havaittiin merkitseviä eroja, jotka on esitetty kuvassa 4. MCS-potilailla kahden sytokiinin (gammainterferoni [IFN-gamma] ja interleukiini 10 [IL-10]), kahden kemokiinin (IL-8 ja makrofagin kemotaktinen proteiini 1 [MCP-1]) sekä verisuonen endoteelin kasvutekijän (VEGF) ja verihitalekasvutekijän (PDGF) pitoisuudet olivat kohonneet huomattavasti.



Tätä artikkelia tulee lainata seuraavasti: De Luca, C., et al., Biological definition of multiple chemical sensitivity from redox state and cytokine profiling and not from polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes, Toxicol. Appl. Pharmacol. (2010), doi:10.1016/j.taap.2010.04.017

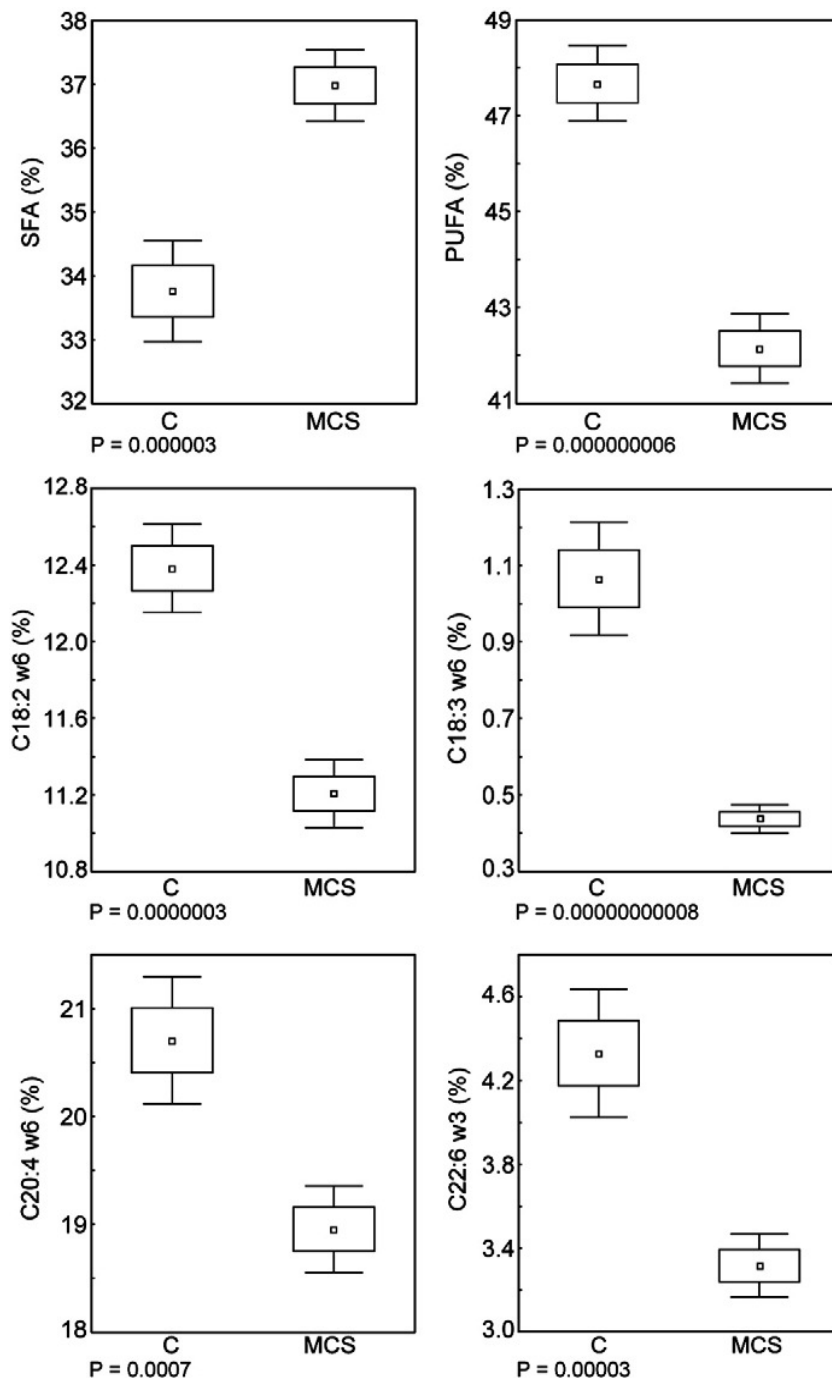
**Kuva 2.** Metaboliset hapetus- ja pelkistysparametrit verrokkien (C, n = 52), MCS-diagnoosin saaneiden potilaiden (MCS, n = 133) ja mahdollisesti MCS:ää sairastavien potilaiden (SMCS, n = 93) veren komponenteissa. Arvot on esitetty keskiarvona ( $\square$ ), keskiarvon keskivirheenä (laatikon ylä- ja alarajat) ja 1,96× keskivirheenä (ylempi ja alempi jana). Ryhmien väliset merkitsevät erot ( $P < 0,05$  tai  $0,01$ ) on ilmoitettu kunkin paneelin alapuolella. Lyhenteet: CL (kokoveren luminolista riippuva kemiluminesenssi), GSH (glutationin pelkistynyt muoto), Gpx (glutationiperoksidaasi), GSSG (glutationin hapettunut muoto), CL (kokoveren luminolista riippuva kemiluminesenssi), AOA (antioksidanttiaktiivisuus), HNE (4-hydroksi-2-nonenali), C (verrokit), MCS (monikemikaaliherkkyys), SMCS (osittain diagnosoitu monikemikaaliherkkyys), cpm (laskua minuutissa).

## Pohdinta

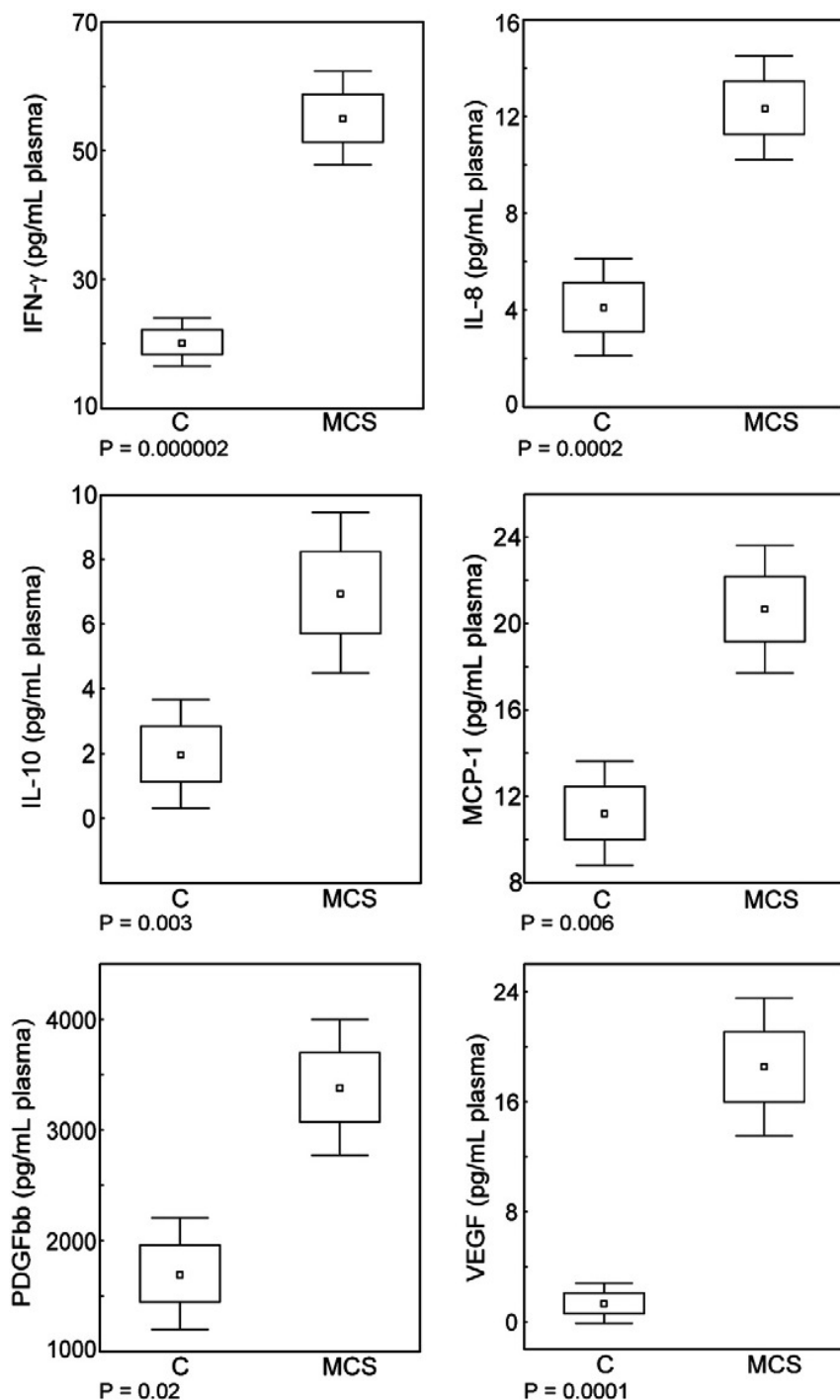
Sekä metaboloivia entsyymejä että niiden ilmentymistä sääteleviä reseptoreja ja transkriptiotekijöitä koodaavien geenien polymorfismi saattaa olla vastuussa vierasaineita metaboloivien entsyymien aktiivisuudessa todetusta yksilöiden välisestä vaihtelusta, ja sen on epäilty voivan olla yksi monikemikaaliherkyyden taustamekanismeista. Toisaalta myös yksilökohtainen adaptiivinen vaste kemiallisille sressitekijöille epigeneettisellä tasolla voi vaikuttaa taudin patogeneesiin merkittävästi näiden aineiden ja niiden metaboliittien sekä biologisesti tärkeiden molekyylien ja solukalvojen suorien yhteisvaikutusten kautta.

Tutkimme useiden CYP-entsyymien (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ja CYP3A5) ja UGT1A1:n polymorfismia MCS-potilailla ja terveillä verrokeilla selvittääksemme, ovatko metaboloivia entsyymejä koodaavien geenien polymorfismi ja MCS:n kehittymisriski yhteydessä toisiinsa. Aiemmin on esitetty, että MCS:n kehittymisriski saattaa olla suurempi henkilöillä, joiden CYP2D6-aktiivisuus on tavallista korkeampi (homotsygoottiset nopeat CYP2D6-metaboloijat) kuin henkilöillä, joilla on kaksi toimimatonta alleelia (hitaat metaboloijat) (McKeown-Eyssen et al., 2004). Meidän tutkimuksemme ei vahvistanut tätä olettamusta, sillä CYP2D6-alleelien ja genotyyppien frekvenssit olivat samaa luokkaa sekä MCS-potilailla että terveillä vapaaehtoisilla (taulukko 2). Muidenkaan tässä tutkimuksessa arvioitujen lääkkeitä metaboloivien entsyymien (CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5, UGT1A1) alleeli- ja genotyyppifrekvenssit eivät olleet

MCS-potilailla merkitsevästi erilaisia verrattuna terveisiin verrokkeihin tai tietoihin, jotka oli saatu aiemmasta CYP2D6-, CYP2C9- ja CYP2C19-entsyymejä koskeneesta, suuremmalla italialaisella potilasjoukolla tehdystä tutkimuksesta (Scordo et al., 2004). McKeown-Eyssen et al. (2004) arvelivat myös, että CYP2D6:n ja N-asetyyli transferaasi 2:n (NAT2) välillä saattaa olla geenien yhteisvaikutus, jolloin MCS:n kehittymisriski olisi huomattavasti suurempi henkilöillä, jotka ovat molempien entsyymien suhteen nopeita metaboloijia. Pelkkää NAT2:ta tai sekä NAT2:ta että CYP-entsyymejä koskevia tuloksia ei ole vahvistettu myöhemmissä tutkimuksissa (Schnakenberg et al., 2007; Wiesmüller et al., 2008; Berg et al., 2010). Schnakenberg et al. (2007) päinvastoin arvelivat, että sekä hitaat NAT2-asetyloijat että henkilöt, joilla on GSTM1- ja GSTT1-geenien homotsygoottinen deleetio, ovat merkitsevästi suuremmassa vaarassa sairastua MCS-oireyhtymään. Me emme vahvistaneet Schnakenbergin löydöksiä, sillä emme havainneet potilaiden välillä mitään merkitseviä eroja GST-alleelien tai genotyyppien jakaumassa verrattuna terveistä vapaaehtoisista aiemmin julkaistuihin tietoihin (taulukko 4) (Garte et al., 2001). GST:t ovat joukko konjugoivia entsyymejä, joilla on ratkaisevan tärkeä rooli orgaanisten vierasaineiden vaiheen II biotransformaatioissa, endogeenisten elektrofiilien kuten HNE:n metaboliassa ja solujen tulehdusprosesseihin ja degeneratiivisten tautien kehittymiseen osallistuvien reaktiivisten happilajien deaktivaatioissa (Bolt & Their, 2006; Hayes et al., 2005; Yang et al., 2008).



**Kuva 3.** Punasolujen solukalvon rasvahappoprofiili verrokeilla (C, n = 52) ja potilailla, joilla on diagnosoitu MCS tai joiden epäillään sairastavan MCS:ää (MCS, n = 226). Tyydyttyneiden, kertatyydyttymättömien ja monitydyttymättömien rasvahappojen ja tärkeimpien omega-6- ja omega-3-rasvahappojen kokonaisprosenttiosuuksista on ilmoitettu keskiarvo ( $\square$ ), keskiarvon keskivirhe (laatikon ylä- ja alarajat) ja 1,96 $\times$  keskivirhe (ylempi ja alempi jana). Ryhmien väliset merkitsevät erot ( $P < 0,05$  tai  $0,01$ ) on ilmoitettu kunkin paneelin alapuolella. Lyhenteet: SFA, tyydyttyneet ja kertatyydyttymättömät rasvahapot; PUFA, monitydyttymättömät rasvahapot; 18:2w6 (linoleenihappo), 18:3w6 (alfalinoleenihappo), 20:4w6 (arakidonihappo), 22:6w3 (dokosaheksaenihappo); C—verrokki; MCS—monikemikaaliherkkyys.



**Kuva 4.** Veriplasman sytokiinipitoisuudet verrokeilla (C, n = 52) ja potilailla, joilla on diagnosoitu MCS (MCS, n = 77). Arvot (pg/ml plasmaa) on esitetty keskiarvona (□), keskiarvon keskivirheenä (laatikon ylä- ja alarajat) ja 1,96× keskivirheenä (ylempi ja alempi jana). Ryhmien väliset merkitsevät erot (P < 0,05 tai 0,01) on ilmoitettu kunkin paneelin alapuolella. Lyhenteet: C (verrokkit), IFN-gamma (gammainterferoni), IL-8 (interleukiini 8), IL-10 (interleukiini 10), MCP-1 (makrofagin kemotaktinen proteiini 1), MCS (monikemikaaliherkkyys), PDGF (verihytalekasvutekijä), VEGF (verisuonen endoteelin kasvutekijä).

On myös esitetty GST-isoentsyymien polymorfismin olevan yhteydessä ympäristötekijöihin liittyvien kasvainten kehittymisriskiin (Strange & Fryer, 1999) ja muiden ihmisellä tavattaviin, ympäristötekijöihin liittyviin sairauksiin kuten systeemiseen lupus erythematosukseen, vitiligoon ja MCS:ään (Korkina et al., 2009). Vaikka GST-polymorfismin ja MCS:n ei olekaan todistettu liittyvän toisiinsa, GST-aktiivisuus oli molemmissa potilasryhmissä merkittävästi ja samankaltaisesti alentunut (kuva 2). MCS- ja SMCS-ryhmien potilailla pelkistyneen ja hapettuneen glutathionin varastot olivat huomattavasti pienemmät kuin terveillä verrokeilla (kuva 2). Katalaasiaktiivisuuden merkittävä suppressio oli selkeämmin nähtävissä MCS-potilailla kuin SMCS-potilailla (kuva 2). On merkille pantavaa, että GST, katalaasi ja glutathionisynteesiin osallistuvat entsyymit kuuluvat stressiproteiinien ryhmään. Stressi, kuten esimerkiksi kemikaalstressi, käynnistää näiden proteiinien ilmentymisen. Näiden ja muiden stressiproteiinien heikentyneellä induktiolla on arveltu olevan patogeenistä merkitystä monissa ihmisen sairauksissa, esimerkiksi kystisessä fibroosissa (Chen et al., 2008) ja vitiligossa (Kostyuk et al., 2010).

Kahden tärkeän antioksidanttientsyymin toimintahäiriö ja glutathionivarastojen ehtyminen johtavat väistämättä vaikeaan oksidatiiviseen stressiin ja heikentyneeseen vaiheen I hapettumismetaboliittien eliminaatioon. Katalaasin puutoksesta johtuva vetyperoksidin määrän lisääntyminen käynnistää ei-entsyymattisen, vapaiden radikaalien säätelemän ketjureaktion. Se johtaa lipidien peroksidaatioon, joka on osallisena monissa ihmisen sairauksissa. Yksi lipidien peroksidaation tärkeimmistä kemiallisista piirteistä on monityydyttymättömien rasvahappojen hajoaminen useiksi eri aldehydeiksi, kuten malonidialdehydiksi ja 4-hydroksi-2-nonenaaliksi (4-HNE) (Uchida et al., 1999). 4-HNE on vakaa elektrofiili, jota muodostuu  $\omega$ -6-monityydyttymättömien rasvahappojen ja nimenomaan linoleeni- ja arakidonihapon härskiintyessä (Marantos et al., 2008). Se reagoi herkästi proteiinien ja DNA:n kanssa (Pizzimenti et al., 2009) ja

vaikuttaa siten entsyymejä koodaavien geenien ilmentymiseen, entsyymitoimintaan ja autoantigeenien muodostukseen (Kostyuk et al., 2010).

Me havaitsimme, että MCS-potilaiden punasolujen solukalvon monityydyttymättömät rasvahapot, etenkin fysiologisesti tärkeät  $\omega$ -6-linoleeni-, alfa-linoleeni- ja arakidonihappo, olivat dramaattisesti vähentyneet (kuva 3). Lisäksi MCS-potilaiden plasman HNE-proteiiniarvot pyrkivät nousemaan (kuva 2), mikä viittaa kiihtyneeseen lipidien peroksidaatioon. Myös solukalvon arakidonihappo saattaa hapettua nopeasti syklo-oksigenaasitai lipoksigenaasientsyymien vaikutuksesta, jolloin muodostuu prostaglandiinien ja leukotrieenien kaltaisia tulehdusvälittäjäaineita. Sytokiinien aiheuttama verisolujen proinflammatorinen stimulaatio saattaisi hyvinkin johtaa tämän kaltaiseen entsyymattiseen hapettumisreaktioon (Serhan et al., 2008). Tulehdusta aiheuttavien gammainterferonin, IL-8:n ja MCP-1:n pitoisuudet olivatkin huomattavasti korkeampia MCS-potilaiden kuin terveiden verokkien plasmassa (kuva 4). Lisäksi MCS-potilailla todettiin normaalia korkeampia plasman IL-10-, PDGF- ja VEGF-pitoisuuksia (kuva 4). On mielenkiintoista, että kemokiinit IL-8 ja MCP-1, kuten myös kasvutekijät (PDGF ja VEGF), ovat hapettumis- ja pelkistymisreaktioista riippuvia sytokiineja, sillä niiden ilmentyminen ja toiminta on vetyperoksidi- ja typpioksidivälitteistä (Roy et al., 2006). Saamamme tulokset MCS-potilaiden kohonneista nitriitti-/nitraattipitoisuuksista ja alhaisesta katalaasiaktiivisuudesta (kuva 2) saattaisivat siis selittää ainakin osittain hapettumis- ja pelkistymisreaktioista riippuvaisten proinflammatoristen sytokiinien normaalista poikkeavat pitoisuudet MCS-potilaiden plasmassa. Korkeat gammainterferonin pitoisuudet viittaavat siihen, että MCS-potilaiden veressä on aktivoituneita Th1-lymfosyyttejä. IL-10-aktiivisuuden lisääntyminen taas voi viitata siihen, että säätelijä-T-solut (Treg) pyrkivät sinnikkäästi kumoamaan Th1-aktivaation vaikutuksia. Auttaja-T-solujen erilaistuminen Th1- ja Treg-alaryhmiksi on autoim-



muunivasteelle tyypillinen piirre (Wilson et al., 2009). On tärkeää ottaa huomioon, että gammainterferoni on kemokiinien ja kasvutekijöiden (esimerkiksi IL-8, MCP-1, PDGF ja VEGF) ilmentymisen ja vapautumisen voimakas primaarinen indusori, mutta nämä sekundaariset välittäjäaineet voivat puolestaan voimistaa gammainterferonin ilmentymistä (Basu et al., 2010). Gammainterferonin pitoisuuksien huomattava nousu MCS-diagnoosin saaneilla potilailla on lupaava mahdollinen yhteys näiden potilaiden immuuni- ja kemikaalipuolustuksen heikkenemisen välillä. Nykytiedon mukaan kasvutekijät, sytokiinit ja niiden reseptorit saattavat olla aryylihiilivetyreseptoriin (AhR) liittyvien signalointireittien merkittäviä kohteita (Haarmann-Stemann et al., 2009). Ligandeihin sitouduttuaan AhR laukaisee organismissa soluvälitteisen ja humoraalisen immuunivasteen pääasiassa sytokiinien geeniekspressiota säätelemällä (Kerkvliet, 2009). Riippumattomat ryhmät ovatkin raportoineet AhR:n aiheuttamaa gammainterferonin ja IL-12:n ilmentymisen vähenemistä (Rodriguez-Sosa et al., 2005) ja siitä johtuvaa säätelijä-T-solupopulaatioiden kehittymistä (Funatake et al., 2005). AhR:n ilmentymisen ja/tai aktivoitumisen primaarisen eston voidaankin epäillä häiritsevän gammainterferonin tuotantoa ja heikentävän lipidipohjaisten välittäjäaineiden säätelemää tulehdusvastetta (Jenkins et al. 2009; Zhou et al., 2006) MCS-potilailla.

Vaikka MCS-potilailla ei todettukaan CYP-geenivirheitä, tuoreiden tutkimusten tulokset viittaavat yhä voimakkaammin siihen, että useat eri tulehdusärsykkeet ja etenkin tulehdusta aiheuttavat sytokiinit (Chun et al., 2002; Nadin et al., 1995; Tapner et al., 1996; Tinel et al., 1999) saavat aikaan muutoksia CYP-entsyymien toiminnassa ja ilmentymisessä typpioksidin välityksellä tapahtuvan signaalin kautta (Chun et al., 2002; Stadler et al., 1994). Gammainterferoni ja IL-2 estävät merkittävässä määrin esimerkiksi lääkkeitä metaboloivia CYP-entsyymejä kuten CYP3A4:ää ja CYP2B6:ta, joita tuotetaan

jatkuvasti ihmisen ääreisveren yksitumaisissa soluissa (Liptrott et al., 2009).

Saamamme tulokset viittaavat siihen, että MCS-potilaiden kemikaalipuolustuksen vakaavat ja lukuisat toimintahäiriöt eivät välttämättä johdukaan pääasiallisesti geenivirheistä vaan mahdollisesti metaboloivien entsyymien ja antioksidantientsyymien ilmentymisen ja/tai toiminnan ei-geneettisistä muutoksista, joiden välittäjinä toimivat hapetus- ja pelkistysreaktioihin osallistuvat aineet, kuten typpioksiidi ja tulehdusta aiheuttavat sytokiinit (gammainterferoni ja IL-10). Tällä perusteella teimme seuraavat johtopäätökset: (i) MCS-oireyhtymälle tyypillisiä piirteitä ovat lukuisat biokemialliset ja immunologiset häiriöt, jotka viittaavat antioksidanttipuolustuksen suppresioon, kiihtyneeseen peroksinitriittien muodostukseen, nopeutuneeseen lipidien peroksidointiin ja matala-asteiseen systeemiseen tulehdukseen, johon liittyy autoimmuunireaktio; (ii) vaikka MCS-potilailla ei olekaan geenivirheitä, mistä on todisteena tärkeimpien vierasaineita/endobiootteja metaboloivien vaiheen I ja II entsyymien alleeli- ja genotyyppifrekvenssien normaali jakauma, näiden potilaiden sytokiiniprofiilit ja hapetus/pelkistysprofiilit suurentavat ei-geneettisen sytokiinivälitteisen CYP-eston ja/tai AhR-eston mahdollisuutta, mikä puolestaan saattaa heikentää heidän metabolista kapasiteettiaan; (iii) nämä metaboliset ja immunologiset parametrit tulisi ottaa huomioon laadittaessa MCS:n biologista määritelmää ja diagnosoitaessa tätä sairautta kliinisissä perusteilla ja laboratoriotulosten pohjalta.

## Kiitokset

Italian terveystieteiden ministeriö (IDI IRCCS-RC2008), Italian yliopisto- ja tutkimusministeriö (MIUR-UNISI-2008), Ruotsin lääkärisseura ja Ruotsin tiedeakademia ovat myöntäneet apurahoja tälle tutkimukselle. Arvostamme suuresti myös Luciano Innocenzilta saamaamme teknistä apua.

## Lähteet

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Bailer, J., Witthöft, M., Paul, C., Bayerl, C., Rist, F., 2005. Evidence for overlap between idiopathic environmental intolerance and somatoform disorders. *Psychosom. Med.* 67, 921–929.
- Basu, A., Hoerning, A., Datta, D., Edelbauer, M., Stack, M.P., Calzadilla, K., Pal, S., Briscoe, D.M., 2010. Cutting edge: vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO+CD4+ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. *J. Immunol.* 184, 545–549.
- Berg, N.D., Rasmussen, H.B., Linneberg, A., Brasch-Andersen, C., Fenger, M., Dirksen, A., Vesterhauge, S., Werge, T., Elberling, J., 2010. Genetic susceptibility factors for multiple chemical sensitivity revisited. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 131–139.
- Bolt, H.M., Kiesswetter, E., 2002. Is multiple chemical sensitivity a clinically defined entity? *Toxicol. Lett.* 128, 99–106.
- Bolt, H.M., Their, R., 2006. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr. Drug Metab.* 7, 613–628.
- Bornschein, S., Förstl, H., Zilker, T., 2001. Idiopathic environmental intolerances (formerly multiple chemical sensitivity) psychiatric perspectives. *J. Intern. Med.* 250, 309–321.
- Brown, G.E., Silver, G.M., Reiff, J., Allen, R.C., Fink, M.P., 1999. Polymorphonuclear neutrophil chemiluminescence in whole blood from blunt trauma patients with multiple injuries. *J. Trauma* 46, 297–305.
- Caress, S.M., Steinemann, A.C., 2003. A review of a two-phase population study of multiple chemical sensitivities. *Environ. Health Perspect.* 111, 1490–1497.
- Chen, J., Kinter, M., Shank, S., Cotton, C., Kelley, T.J., Ziady, A.G., 2008. Dysfunction of Nrf-2 in CF epithelia leads to excess intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inflammatory cytokine production. *PLoS ONE* 3, e3367.
- Chun, Y.J., Lee, S., Yang, S.A., Park, S., Kim, M.Y., 2002. Modulation of CYP3A4 expression by ceramide in human colon carcinoma HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 687–692.
- Crawford, R.B., Holsapple, M.P., Kaminski, N.E., 1997. Leukocyte activation induces aryl hydrocarbon receptor up-regulation, DNA binding, and increased Cyp1a1 expression in the absence of exogenous ligand. *Mol. Pharmacol.* 52, 921–927.
- Cullen, M.R., 1987. Multiple chemical sensitivities: summary and directions for future investigators. *Occup. Med.* 2, 801–804.
- Deeva, I., Mariani, S., De Luca, C., Pacifico, V., Leoni, L., Raskovic, D., Kharaeva, Z., Korkina, L., Pastore, S., 2009. Wide-spectrum profile of inflammatory mediators in the plasma and scales of patients with psoriatic disease. *Cytokine* 49, 163–170.
- De Luca, C., Filosa, A., Grandinetti, M., Maggio, F., Lamba, M., Passi, S., 1999. Blood antioxidant status and urinary levels of catecholamine metabolites in  $\beta$ -thalassemia. *Free Radic. Res.* 30, 453–462.
- Fabig, K.R., 2000. Das Multiple Chemikalien-Sensitivität-Syndrom (MCS). Können Fragebögen, IgE und SPECT zur Diagnostik beitragen? *Hamburger Ärzteblatt* 12, 600–603.
- Funatake, C.J., Marshall, N.B., Stepan, L.B., Mourich, D.V., Kerkvliet, N.I., 2005. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol.* 175, 4184–4188.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J.L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar, K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clapper, M.L., Coutelle, C., Daly, A., Dell’Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C.M., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D.W., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L.L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M.C., van Lieshout, E.M., London, S., Manni, J.J., Maugard, C.M., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F.F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W.H., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P.G., Sim, E., Sinnet, D., Strange, R.C., Stucker, I., Sugimura, H., To-Figuera, J., Vineis, P., Yu, M.C., Taioli, E., 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 1239–1248.
- Giovannoni, G., Land, J.M., Keir, G., Thompson, E.J., Heales, S.J., 1997. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann. Clin. Biochem.* 34, 193–198.
- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 2006. The chemical defenseome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev. Biol.* 300, 366–384.
- Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Abel, J., 2009. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of aryl hydrocarbon receptor (AhR) signalling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 508–520.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.

Tätä artikkelia tulee lainata seuraavasti: De Luca, C., et al., Biological definition of multiple chemical sensitivity from redox state and cytokine profiling and not from polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2010), doi:10.1016/j.taap.2010.04.017

- Jenkins, C.M., Cedars, A., Gross, R.W., 2009. Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovasc. Res.* 82, 240–249.
- Kerkvliet, N.I., 2009. AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* 77, 746–760.
- Kipen, H.M., Fiedler, N., 2002. Environmental factors in medically unexplained symptoms and related syndromes: the evidence and the challenge. *Environ. Health Perspect.* 110, 597–599.
- Korkina, L., Scordo, M.G., Deeva, I., Cesareo, E., De Luca, C., 2009. The chemical defensive system in the pathobiology of idiopathic environment-associated diseases. *Curr. Drug Metab.* 10, 914–931.
- Kostyuk, V., Potapovich, A., Cesareo, E., Brescia, S., Guerra, L., Valacchi, G., Pecorelli, A., Deeva, I.B., Raskovic, D., De Luca, C., Pastore, S., Korkina, L.G., 2010. Dysfunction of glutathione S-transferase leads to excess 4-hydroxy-2-nonenal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and impaired cytokine pattern in cultured keratinocytes and blood of vitiligo patients. *Antioxid. Redox Signal.* doi:10.1089/ars.2009.2977 [Online January 13, 2010].
- Kreutzer, R., Neutra, R.R., Lashuay, N., 1999. Prevalence of people reporting sensitivities to chemicals in a population-based survey. *Am. J. Epidemiol.* 150, 1–12.
- Liptrott, N.J., Penny, M., Bray, P.G., Sathish, J., Khoo, S.H., Back, D.J., Owen, A., 2009. The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC. *Br. J. Pharmacol.* 156, 497–508.
- Marantos, C., Mukaro, V., Ferrante, J., Hii, C., Ferrante, A., 2008. Inhibition of the lipopolysaccharide-induced stimulation of the members of the MAPK family in human monocytes/macrophages by 4-hydroxynonenal, a product of oxidized omega-6 fatty acids. *Am. J. Pathol.* 173 (4), 1057–1066.
- Mattson, M.P., Cheng, A., 2006. Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.* 29, 632–639.
- McKeown-Eyssen, G., Baines, C., Cole, D.E.C., Riley, N., Tyndale, R.F., Marshall, L., Jazmaji, V., 2004. Case-control study of genotypes in multiple chemical sensitivity: CYP2D6, NAT1, NAT2, PON1, PON2 and MTHFR. *Int. J. Epidemiol.* 33, 971–978.
- Mirghani, R.A., Sayi, J., Aklillu, E., Allqvist, A., Jande, M., Wennerholm, A., Eriksen, J., Herben, V.M., Jones, B.C., Gustafsson, L.L., Bertilsson, L., 2006. CYP3A5 genotype has significant effect on quintine 3-hydroxylation in Tanzanians, who have lower total CYP3A activity compared to a Swedish population. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 637–645.
- Miller, C.S., Prihoda, T.J., 1999. The Environmental Exposure and Sensitivity Inventory (EESI): a standardized approach for measuring chemical intolerances for research and clinical applications. *Toxicol. Ind. Health* 15, 370–385.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., 1993. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 95S.
- Monaghan, G., Ryan, M., Seddon, R., Hume, R., Burchell, B., 1996. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 347, 578–581.
- Nadin, L., Butler, A.M., Farrell, G.C., Murray, M., 1995. Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* 109, 198–205.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Pall, M.L., 2001. Common etiology of posttraumatic stress disorder, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and multiple chemical sensitivity via elevated nitric oxide/peroxynitrite. *Med. Hypotheses* 57, 139–145.
- Pizzimenti, S., Ferracin, M., Sabbioni, S., Toaldo, C., Pettazoni, P., Dianzani, M.U., Negrini, M., Barrera, G., 2009. MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 282–288.
- Primavera, A., Fustinoni, S., Biroccio, A., Ballerini, S., Urbani, A., Bernardini, S., Federici, G., Capucci, E., Manno, M., Lo Bello, M., 2008. Glutathione transferases and glutathionylated hemoglobin in workers exposed to low doses of 1, 3-butadiene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 3004–3012.
- Reed, D.J., Babson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W., Potter, D.W., 1980. Korkea performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione disulphide and related thiols and disulphides. *Anal. Biochem.* 106, 55–62.
- Rodriguez-Sosa, M., Elizondo, G., Lopez-Duran, R.M., Rivera, I., Gonzalez, F.J., Vega, L., 2005. Overproduction of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice. *FEBS Lett.* 579, 6403–6410.
- Roy, S., Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T.K., Sen, C.K., 2006. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.* 13, 211–220.
- Schnakenberg, E., Fabig, K.-R., Stanulla, M., Strobl, N., Lustig, M., Fabig, N., Schloot, W., 2007. A cross-sectional study of self-reported chemical-related sensitivity is associated with gene variants of drug-metabolizing enzymes. *Environ. Health* 6, 6. doi:10.1186/1476-069X-6-6 [Online 10 Feb. 2007 <http://www.ehjournal.net/content/6/1/6>].
- Scordo, M.G., Caputi, A.P., D'Arrigo, C., Fava, G., Spina, E., 2004. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharm. Res.* 50, 195–200.
- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361.

Tätä artikkelia tulee lainata seuraavasti: De Luca, C., et al., Biological definition of multiple chemical sensitivity from redox state and cytokine profiling and not from polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2010), doi:10.1016/j.taap.2010.04.017

- Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W.A., Brill, T., Siewert, J.R., Greim, H., Doehmer, J., 1994. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3559–3563.
- Strange, R.C., Fryer, A.A., 1999. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci. Publ.* 148, 231–249.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497–500.
- Tapner, M., Liddle, C., Goodwin, B., George, J., Farrell, G.C., 1996. Interferon gamma downregulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology* 24, 367–373.
- Tinel, M., Elkahwaji, J., Robin, M.A., Fardel, N., Descatoire, V., Haouzi, D., Berson, A., Pessayre, D., 1999. Interleukin-2 overexpresses c-myc and downregulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J. Pharm. Exp. Ther.* 289, 649–655.
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T.A., 1999. Activation of stress signalling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 274, 2234–2242.
- Wiesmüller, G.A., Niggemann, H., Weissbach, W., Riley, F., Maarouf, Z., Dott, W., Kunert, H.J., Zerres, K., Eggermann, T., Blömeke, B., 2008. Sequence variations in subjects with self-reported multiple chemical sensitivity (sMCS): a case-control study. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71, 786–794.
- Willette, A.A., Lubach, G.R., Coe, C.L., 2007. Environmental context differentially affects behavioral, leukocyte, cortisol, and interleukin-6 responses to low-doses of endotoxin in the rhesus monkey. *Brain Behav. Immun.* 21, 807–815.
- Wilson, C.B., Rowell, E., Sekimata, M., 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 91–115.
- Yadav, S., Zajac, E., Singhal, S.S., Awasthi, S., 2007. Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 59–69.
- Yang, Y., Yang, Y., Xu, Y., Lick, S.D., Awasthi, Y.C., Boor, P.J., 2008. Endothelial glutathione-S-transferase A4-4 protects against oxidative stress and modulates iNOS expression through NF-kappa B translocation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 187–196.
- Zhou, C., Tabb, M.M., Nelson, E.L., Grün, F., Verma, S., Sadatrafiei, A., Lin, M., Mallick, S., Forman, B.M., Thummel, K.E., Blumberg, B., 2006. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 2280–2289.