

Równowaga antyoksydacyjno-prooksydacyjna u dzieci z astmą leczonych kortykosteroidami wziewnymi i długo działającymi β_2 -mimetykami.

The antioxidative-prooxidative balance in children with asthma treated with inhaled corticosteroids and long acting β_2 -agonists

Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz¹, Maria Korzon¹, Teresa Małaczyńska², Joanna Renke¹, Stefan Popadiuk¹, Michał Woźniak³

¹ Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej AM. w Gdańsku. Kierownik: prof. dr hab. med. M. Korzon

² Oddział Chorób Przewlekłych Płuc i Astmy, Szpitala Dziecięcego w Gdańsku. Ordynator: dr med. T. Małaczyńska

³ Zakład Chemii Medycznej A M w Gdańsku. Kierownik: prof. dr hab. M. Woźniak

Summary: The aim of study was to analyze the effect of treatment with inhaled corticosteroids and long acting β_2 -agonists on antioxidative-prooxidative balance in children with asthma.

Material and methods: Twenty children with newly diagnosed asthma before treatment (group I), fourteen children with diagnosed asthma treated with inhaled corticosteroids and long acting β_2 -agonists and 57 healthy children were included in the study. In all cases plasma protein carbonyls and activity of erythrocyte SOD was assayed.

Results: Plasma protein carbonyls in both group I (1,01 nmol/g of protein, SD=0,30) and group II (0,94; SD=0,15) was significantly higher than in group III (0,85; SD=0,24) (I vs III p<0,033; II vs III p<0,031). The highest SOD activity was found in group II (3156,4 U/gHb; SD=976,1) (II vs I p<0,02; II vs III p<0,0001). SOD activity in group I (2435,8, SD=730,2) was higher than in group III (1533,1, SD=703,8) (p<0,0001).

Conclusions: The increase in SOD activity in children with asthma seems to be a response to intensification of oxidative stress. Treatment of asthma with inhaled corticosteroids and long acting β_2 -agonists augments antioxidative defense by increase in superoxide dismutase activity.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2005, 73, 178:181

Key words: asthma, oxidative stress, antioxidative barrier, treatment

Wstęp:

Pomimo intensywnej badań, patogeneza astmy nie jest wciąż w pełni wyjaśniona. W licznych doniesieniach sugeruje się udział m. in. stresu oksydacyjnego w przewlekłym procesie zapalnym jaki ma miejsce w astmie [3,6,15,23,27,28]. Przez stres oksydacyjny rozumie się przesunięcie równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej ustroju w kierunku reakcji utleniania [24]. Za reakcje utleniania odpowiedzialne są reaktywne formy tlenu (RFT), charakteryzujące się wysoką aktywnością chemiczną. Źródłem reaktywnych form tlenu w procesie zapalnym w przebiegu astmy są liczne komórki, głównie eozynofile [12,21] i neutrofile [15]. W wyniku reakcji utleniania dochodzi do uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Stężenie produktów powstających w wyniku utleniania (m.in. grup karbonylowych) odzwierciedla natężenie reakcji, w których biorą udział RFT. Bariera antyoksydacyjna stanowi ochronę ustroju przed niekorzystnym działaniem RFT. W jej skład wchodzi liczne elementy, m. in. enzymy. Dysmutaza nadtlenkowa (SOD) jest jednym z głównych

enzymów antyoksydacyjnych. W astmie stwierdza się zmiany w funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej, w tym również w aktywności dysmutazy nadnadtlenkowej [8,11,15,23,26,28].

Celem pracy była ocena wpływu na równowagę antyoksydacyjno-prooksydacyjnej skojarzonego leczenia β_2 -mimetykami długo działającymi i wziewnymi kortykosteroidami dzieci chorych na astmę.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 34 dzieci w wieku od 3 do 16 lat (średni wiek 9,4 lat, SD=3,2), leczonych w Oddziale Chorób Przewlekłych Płuc i Astmy, Szpitala Dziecięcego w Gdańsku oraz Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej A M w Gdańsku, w latach 2000-2003 z rozpoznaną astmą zgodnie z kryteriami ustalonymi w 1988 r. przez NHLB/WHO (Światowa Inicjatywa dla Astmy) [16]. U pacjentów zakwalifikowanych do badania nie stwierdzano żadnych innych chorób ostrych i przewlekłych. Grupę I stanowiło 20 dzieci, z nowo rozpoznaną astmą, przed włączeniem leczenia. Wśród nich było 10 chłopców i 10 dziewczynek w wieku od 4 do 16 lat (średnia wieku wynosiła 9,6 lat, SD=3,8). Grupę II stanowiło 14 pacjentów z rozpoznaną astmą.

Wśród nich było 7 chłopców, 7 dziewcząt w wieku od 3 do 15 lat (średnia wieku 9,1 lat, SD=2,2. Dzieci te były leczone od co najmniej 3 miesiące kortykosteroidami wziewnymi (w dawce 100-400 µg) i długo działającymi β₂-mimetykami i nie obserwowano u nich zaostrzenia choroby w ciągu ostatniego miesiąca przed włączeniem do badania. Dzieci nie przyjmowały też żadnych innych leków w ciągu miesiąca poprzedzającego włączenie do badania. Grupę III stanowiło 54 dzieci zdrowych. Pacjenci do grupy III zostali dobrani na zasadzie kwotowości płci (27 chłopców i 27 dziewcząt) w wieku od 3 do 17 lat o średniej wieku 9,8 lat, SD=4. U wszystkich pacjentów przeprowadzono szczegółową analizę dokumentacji medycznej, wywiad i badanie pediatryczne. Próbkę krwi pobierano za zgodą dzieci i ich opiekunów przy okazji pobierania krwi do rutynowo wykonywanych analiz laboratoryjnych. Badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej AM w Gdańsku.

Oznaczenia zawartości grup karbonylowych dokonano metodą Levine'a [10]. Krew odwirowywana była z szybkością 200 obrotów na minutę przez 20 minut następnie osocze bogatopłytkowe zbierano z nad krwinek. 100 µl tego osocza inkubowano przez 60 minut ze 100 µl 20 mM roztworu 2,4-dwunitrofenylohydrazyny (DNPH). Następnie wytrącano białko z roztworu przy użyciu 20% kwasu trójchlorooctowego. Po trzykrotnym przepłukaniu mieszaniną etanolu i octanu etylowego osad rozpuszczano w 1 ml 6 M roztworu chlorowodoru guaniny w temperaturze 60 st.C. Zawartość grup karbonylowych oznaczano spektrofotometrycznie, wobec próby ślepej, przy długości fali 360 nm. Każda próbka była dwukrotnie badana. Zawartość grup karbonylowych wyrażono w nmol/mg białka.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) określana była za pomocą metody Minami i Yoshikawa [14], w której SOD hamuje wytwarzanie czerwonego barwnika fromazanowego w reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z chlorkiem 2-(4-jodofenilo)-3(4-nitrofenolo)-5-fenylotetrazolium. Do tego oznaczenia używana była krew heparynizowana, po czterokrotnym płukaniu erytrocytów w roztworze soli fizjologicznej.

Oznaczenia zawartości grup karbonylowych i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej rozpoczynano nie później niż w 2 godziny po pobraniu. Warunki techniczne pobierania krwi i wykonywania kolejnych oznaczeń były jednakowe.

Obliczenia statystyczne wykonano w programie STATISTICA 6,0 z wykorzystaniem nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a.

Wyniki:

Średnia zawartość grup karbonylowych w białkach surowicy u pacjentów z grupy I była istotnie wyższa niż u pacjentów z grupy III (test U; U=329,0; p<0,033). Stwierdzono również wyższą zawartość grup karbonylowych w białkach surowicy u pacjentów z grupy II w porównaniu z grupą III (test U; U=212,5; p<0,031). Średnia zawartość grup karbonylowych w białkach surowicy u pacjentów z grupy I była wyższa niż u pacjentów z grupy II, ale różnica nie była istotna statystycznie. (Tab.1)

Tab.1. Średnia zawartość grup karbonylowych w białkach surowicy i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach w grupach badanych.

Tab.1. Plasma protein carbonyls and superoxide dismutase (SOD) activity in studied groups.

Badane substancje Examined products	Grupa I (n=20)	Grupa II (n=14)	Grupa III (n=54)
Grupy karbonylowe /protein carbonyls [nmol/g białka]	1,01 SD=0,30	0,94 SD=0,15	0,85 SD=0,24
Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej /Activity of SOD [U/gHb]	2435,8 SD=730,2	3156,4 SD=976,1	1533,1 SD=703,8

Średnia aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach krwi u pacjentów w grupie I była wyższa niż w grupie III (test U; U= 93,0; p<0,0001). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w grupie II była istotnie wyższa niż w grupie III (test U; U=42,0; p<0,0001). Stwierdzono również, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była istotnie wyższa w grupie II niż w grupie I (test U; U=61,5; p<0,02). (Ryc.1)

Dyskusja: Najistotniejszym źródłem reaktywnych form tlenu w alergicznym procesie zapalnym są komórki zaangażowane w ten proces [15,21], spośród nich eozynofile charakteryzują się najwyższym potencjałem wytwarzania RFT [12]. Wskutek nasilonej produkcji RFT w obszarze zapalenia dochodzi do intensyfikacji reakcji utleniania, świadectwem czego jest wzrost stężenia markerów nasilenia stresu oksydacyjnego w organizmie. Zawartość grup karbonylowych w białkach jest czułym markerem stopnia ich uszkodzenia w wyniku reakcji utleniania [4]. Podwyższone stężenia markerów nasilenia stresu oksydacyjnego u chorych na astmę stwierdzane są nie tylko w układzie oddechowym – tzn. w płynie pochodzącym z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego (BALF) [6,22] i wydychanym powietrzu [2,30], ale również w su-

rowicy [3,8,15,27,28]. W prezentowanym badaniu oceniono stężenie grup karbonylowych jako miernika uszkodzenia przez RFT białek surowicy krwi. Zawartość grup karbonylowych w białkach surowicy stanowić może marker aktywności przewlekłych chorób zapalnych. Ich stężenie wzrasta wraz z nasileniem procesu zapalnego w takich chorobach jak samoistne zapalenie stawów [20] czy chorobie Behçet'a [29]. Najwyższe stężenie grup karbonylowych w białkach surowicy stwierdzono u dzieci, chorych na astmę, przed włączeniem leczenia. U dzieci leczonych wziewnymi kortykosteroidami i β_2 -mimetykami długo działającymi stężenie grup karbonylowych było istotnie wyższe niż u dzieci zdrowych, ale niższe niż u dzieci przed włączeniem leczenia. Chociaż różnica w tym ostatnim przypadku nie była istotna statystycznie, być może z powodu niewystarczającej liczebności grup, to zaobserwować można tendencję do niższej zawartości grup karbonylowych w białkach surowicy u dzieci w trakcie leczenia w porównaniu z dziećmi przed włączeniem terapii. Podobne obserwacje poczynił Ozaras i wsp., zaobserwował bowiem obniżenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w BALF u chorych na astmę po miesiącu leczenia skojarzonego wziewnymi kortykosteroidami i długo działającymi β_2 -mimetykami. Jednak stężenie produktów peroksydacji lipidów po miesiącu leczenia było wciąż wyższe niż w grupie kontrolnej [18]. Terapia samymi kortykosteroidami wziewnymi wydaje się nie wpływać na stężenie produktów peroksydacji lipidów w powietrzu wydychanym [2], jakkolwiek Zanconato i wsp. wykazali znamienne niższą ich zawartość u pacjentów leczonych kortykosteroidami wziewnymi niż u pacjentów nie stosujących tych leków [30]. Wiadomo również, że zawartość RFT w powietrzu wydychanym u pacjentów po zastoso-

waniu kortykosteroidów istotnie obniża się [1,9]. Zaobserwowana w badaniu tendencja do niższej zawartości grup karbonylowych w białkach surowicy krwi u pacjentów w trakcie leczenia w porównaniu do zawartości u dzieci chorych na astmę przed włączeniem leczenia, wydają się być skutkiem działania przeciwzapalnego i zmniejszonej produkcji RFT przez komórki zapalne [13]. Stwierdzono, że długo działające β_2 -mimetyki bezpośrednio wpływają na zmniejszenie produkcji RFT przez eozynofile [7].

Dysmutaza ponadtlenkowa jest kluczowym enzymem bariery antyoksydacyjnej, ponieważ reakcje których jest katalizatorem zabezpieczają przed powstawaniem najaktywniejszego spośród RFT – rodnika hydroksylowego. Wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach u pacjentów z astmą zarówno przed jak i w trakcie leczenia, jest najprawdopodobniej odpowiedzią organizmu na nasilenie stresu oksydacyjnego. Erytrocyty, bogato wyposażone w enzymy antyoksydacyjne odgrywają istotną rolę w ochronie układu oddechowego przed niekorzystnym działaniem RFT, wspomagając lokalną ochronę antyoksydacyjną. W literaturze dostępne są doniesienia o wzroście aktywności enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na zwiększoną obecność RFT [19]. Co ciekawe, u dzieci przyrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest bardziej dynamiczny niż u dorosłych [17]. Wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej u chorych na astmę zaobserwowali również inni autorzy [8,11,15], jakkolwiek w niektórych badaniach stwierdzono spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej u chorych na astmę [23,26,28].

Najwyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej stwierdzono u pacjentów w trakcie leczenia skojarzonego wziewnymi kortykosteroidami

- Ryc.1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach dzieci z grup badanych.
Ryc. 1. Activity of superoxide dismutase in studied groups.

i długo działającymi β_2 -mimetykami. Wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej w erytrocytach w trakcie leczenia wynika po części ze zmniejszonej produkcji RFT w wyniku terapii [13], ponieważ RFT inaktywują dysmutazę nadtlenkową [5]. W badaniach *in vitro* wykazano 72% wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej pod wpływem kortykosteroidów [25].

Wiedza o nasileniu stresu oksydacyjnego w przebiegu astmy z jednej strony i korzystnym wpływie terapii na wydolność bariery antyoksydacyjnej orga-

nizmu z drugiej strony, ukierunkowuje z pewnością dalsze badania nad możliwościami terapeutycznego stosowania antyoksydantów u chorych z astmą.

Wnioski: Wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej w erytrocytach u chorych na astmę jest odpowiedzią organizmu na nasilony stres oksydacyjny. Leczenie skojarzone astmy wziewnymi kortykosteroidami i długo działającymi β_2 -mimetykami, wpływa na zwiększenie aktywności bariery antyoksydacyjnej ustroju poprzez wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej

Piśmiennictwo:

1. Antczak A. i wsp.: Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir. Med.* 2000, 94, 416-21.
2. Baraldi E. i wsp.: Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest* 2003, 124, 25-31.
3. Ceylan E. i wsp.: Evaluation of oxidative-antioxidative status and the l-arginine-nitric oxide pathway in asthmatic patients. *Respir. Med.* 2005, 99, 871-6.
4. Chevion M., Bereshtein E., Stadtman E.: Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Rad. Res.* 2000, 33, 99-108.
5. DeRaeve H.R. i wsp.: Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium correction by inhaled corticosteroid *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 1997, 272, L148-154.
6. Dorski R. i wsp.: Allergen-induced synthesis of F(2)-isoprostanes in atopic asthmatics. Evidence for oxidant stress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 160, 1947-51.
7. Ezeamuzie C.I., Al-Hage M.: Effects of some anti-asthma drugs on human eosinophil superoxide anions release and degranulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998, 115, 162-168.
8. Hanta I. i wsp.: The oxidant-antioxidant balance in mild asthmatic patients. *Lung* 2003, 181, 347-52.
9. Horvath I. i wsp.: Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 1998, 158, 1042-6.
10. Levine R.L. i wsp.: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 1990, 186, 464-478.
11. Liao M.F., Chen C.C., Hsu M.H.: Evaluation of the serum antioxidant status in asthmatic children. *Acta Paediatr. Taiwan.* 2004, 45, 213-7.
12. Mac Pherson J.C. i wsp.: Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J. Immunol.* 2001, 166, 5763-72.
13. Majori M. i wsp.: Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 1998, 11, 133-138.
14. Minami M, Yoshikawa H 1979 A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 92:337-42
15. Nadeem A. i wsp.: Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, 111, 72-8.
16. National Heart, Lung, Blood Institute, National Institute of Health: Global Strategy for Asthma Management and Prevention 1995, 95-3659, 6.
17. Niwa Y., Ishimoto K., Kanoh T.: Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood* 1990, 76, 835-41.
18. Ozaras R. i wsp.: Changes in malondialdehyde levels in bronchoalveolar fluid and serum by the treatment of asthma with inhaled steroid and beta2-agonist. *Respirology* 2000, 5, 289-92.
19. Rahman I., Clerch R.C., Massaro D.: Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am. J. Physiol.* 1991, 260 (6Pt1), L412-8.
20. Renke J. i wsp.: Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 29, 101-4.
21. Sannohe S. i wsp.: Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis. *Eur. Respir. J.* 2003, 21, 925-31.
22. Schock B.C. i wsp.: Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children. *Pediatr. Res.* 2003, 53, 375-81.
23. Shanmugasundaram K.R., Kumar S.S., Rajajee S.: Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma. *Clin. Chim. Acta* 2001, 305, 107-114.
24. Sies H.: Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 1991, 91 (suppl 3C), 3C-31S - 3C-38S.
25. Tanswell A.K., Tzaki M.G., Byrne P.J.: Hormonal and local factors influence antioxidant enzyme activity of rat fetal lung cells *in vitro*. *Exp. Lung Res.* 1986, 11, 49-59.
26. Tekin D. i wsp.: The antioxidant defense in asthma. *J Asthma*, 2000, 37, 59-63.
27. Tsukagoshi H. i wsp.: Evidence of oxidative stress in asthma and COPD: potential inhibitory effect of theophylline. *Respir. Med.* 2000, 94, 584-8.
28. Wood L.G. i wsp.: Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000, 35, 967-974.
29. Yazici C. i wsp.: Increased advanced oxidation protein products in Behcet's disease: a new activity marker? *Br. J. Dermatol.* 2004, 151, 105-11.
30. Zanconato S. i wsp.: Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113, 257-63.

Wpłynęła: 28.07.2005 r.

Adres: Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Onkologii Dziecięcej AMG, Ul. Nowe Ogrody 1-6, 80-803 Gdańsk,
e-mail: agal@amg.gda.pl