

Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych i nasilenia peroksydacji lipidów u chorych na astmę

Assesment of antioxidative enzymes activity and intensification of lipids peroxidation in asthmatic patients.

Barbara Rogala, Renata Polaniak, Alicja Grzanka, Nelly Ciesielska-Kopacz, Ewa Birkner

ze Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej w Zabrze,
Kierownik: Prof. dr hab. n. med. B. Rogala
Katedra i Zakład Biochemii Ogólnej w Zabrze, Kierownik: Dr hab. n. med. E. Birkner

Summary: Chronic immunoallergic inflammatory reaction plays a key role in pathogenesis of asthma. Importance of free oxygen radicals in mechanism of chronic inflammatory process has been proved. Activity of two antioxidative enzymes: isoenzymes of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (POX), and concentration of malondialdehyde (MDA) in serum and erythrocytes in asthmatics during exacerbation and improvement of disease were assessed. Disturbances in oxidative system in asthmatic patients have been observed. Lack of significant differences in antioxidative indexes between a period of exacerbation, not complicated by infection and a period of improvement indicates a pathophysiological role of chronic oxygenic stress in asthma. It has been also shown that bacterial infection disturbs efficiency of antioxidative mechanisms.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72, 472-476

Key words: bronchial asthma, free oxygen radicals, enzymatic antioxidants, malondialdehyde

Wytwarzane w nadmiarze wolne rodniki tlenowe odgrywają istotną rolę w mechanizmie przewlekłego odczynu zapalnego prowadzącego w konsekwencji do uszkodzenia tkankowego. Ma to bezpośrednie odniesienie do patofizjologii astmy oskrzelowej.

Wolne rodniki powstają w ustroju podczas reakcji utleniania i redukcji zachodzących w czasie enzymatycznych przemian łańcucha oddechowego w mitochondrium [1, 2]. Źródłem reaktywnych form tlenu są zarówno komórki strukturalne układu oddechowego, tj. komórki nabłonka, mięśni gładkich oskrzeli, śródbłonna naczyń płucnych jak i komórki wchodzące w skład nacieku zapalnego oskrzeli u chorych na astmę, tj. eozynofile, neutrofile oraz makrofagi. Rodniki tlenowe mają działanie cytotoksyczne, powodują hipersekrecję śluzu przez gruczoły kubkowe, zaburzają klirens rzęskowo-śluzówkowy, stymulują skurcz mięśni gładkich oskrzeli, zwiększają przepuszczalność naczyń włosowatych, uszkodzają błony komórkowe poprzez peroksydację lipidów oraz unieczynnienie ochronnej „antyproteazy”. Nagromadzenie się wolnych rodników mobilizuje aktywność systemów protekcyjnych. W zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych krytyczną rolę odgrywają enzymy, do których należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i peroksydaza glutationowa (POX) oraz powstający w wyniku wyczerpania układów antyoksydacyjnych dialdehyd malonowy (MDA).

Astmę usposabia do przewlekłego stresu tlenowego, który, jak można z dużym prawdopodobieństwem założyć, zaburza procesy oksydoredukcyjne ustroju. Uzasadnia to cel pracy, którym była ocena zachowania się aktywności enzymów antyoksydacyjnych i stężenia MDA jako wskaźnika uszkodzenia komórkowego u chorych na astmę w okresie zaostżenia i poprawy przebiegu choroby.

Materiał i metoda

Badanie przeprowadzono u 36 chorych na astmę o umiarkowanym stopniu ciężkości (16 mężczyzn i 20 kobiet; w wieku od 22 do 40, średnio 31 lat) przyjętych do Kliniki Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej z powodu ciężkiego zaostżenia choroby. Rozpoznanie astmy i jej stopnia ciężkości przed hospitalizacją oraz ocena ciężkości zaostżenia i odpowiedzi na leczenie były określane na podstawie kryteriów przedstawionych przez *Global Strategy for asthma Management and Prevention – NHLBI/WHO Workshop Report* [3]. Wszyscy chorzy byli leczeni w sposób typowy zgodnie z wytycznymi wymienionego raportu, z uwzględnieniem antybiotykoterapii u osób z klinicznymi objawami zakażenia bakteryjnego dróg oddechowych (15 chorych). Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych ochotników (6 mężczyzn 4 kobiety; w wieku od 20 do 25, średnio 22,5 lat).

U wszystkich badanych wykluczono zaburzenia gospodarki lipidowej, palenie tytoniu oraz współistniejące inne choroby w oparciu o badanie przedmiotowe, podstawowe badania laboratoryjne i radiologiczne.

U chorych na astmę badania wykonywano dwukrotnie, pierwsze (I faza) – po rozpoznaniu objawów pogorszenia choroby, wymagających leczenia szpitalnego oraz drugie, po około 10 dniach (II faza) – po uzyskaniu klinicznej poprawy i powrotu wskaźników czynności płuc (FEV_1) do wartości bliskich prawidłowych lub najlepszych dla danego chorego. Ponadto w grupie chorych uwzględniono podział na dwie podgrupy – podgrupę wykazującą objawy zakażenia dróg oddechowych oraz podgrupę bez tych objawów.

Stężenie MDA oznaczano w osoczu i w krwinkach czerwonych w reakcji z kwasem tiobarbiturowym wg Ohkawy [4]. Aktywność POX była badana w erytrocytach metodą Paglia si Valentine'a [5] wykorzystującą sprzężenie enzymatyczne z reduktazą glutationu z użyciem H_2O_2 jako substratu. Oznaczeń SOD przeprowadzono metodą Oyanagui [6]. W erytrocytach oznaczano aktywność izoenzymu CuZnSOD, zaś w osoczu SOD całkowity i izoenzym MnSOD.

Analizę statystyczną przeprowadzono testem U Manna Whitney'a i testem kolejności par Wilcoxon. Związki korelacyjne oceniano stosując test rang Spearmana.

Wyniki

U wszystkich chorych na astmę w okresie zaostżenia wykazano istotnie wyższą aktywność POX w porównaniu z grupą osób zdrowych (tab. I), która w tej fazie badania wykazywała silny związek z wartościami FEV_1 ($r=0,76$; $p=0,002$). Podwyższona aktywność POX utrzymywała się również w okresie klinicznej poprawy przebiegu choroby. Zaobserwowano też występowanie różnic aktywności POX zależnych od współistnienia infekcji. W podgrupie z objawami zakażenia bakteryjnego wartości aktywności POX były znamienne niższe w stosunku do pozostałych chorych, ale istotnie wyższe niż u osób zdrowych (tab. I, II). Natomiast wszyscy chorzy w obu fazach badania i w obu podgrupach (z infekcją i bez) mieli istotnie upośledzoną aktywność SOD, z tym, że główny spadek aktywności dotyczył izoenzymu MnSOD. Aktywność CuZnSOD nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej (tab. I, II).

Tabela I. Stężenie aldehydu malonowego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych u chorych na astmę i u osób zdrowych
Table I. Concentration of malondialdehyde and activity of antioxidative enzymes in asthmatic patients and control group

		Chorzy na astmę / Asthmatic pts		p I:II	(III) kontrola X±SD	p I:II	p II:II
		(I) zaostżenie / exacerbation	(II) poprawa / remission				
POX $\mu\text{molNADPH}_2/\text{gHb}/\text{min}$		28,6±23,1	27,4±23,6	0,4	6,3±2,95	0	0,0002
SOD JN/ml	CuZn	93,6±4,5	115,6±4,1	0,5	123,7±17,06	0,2	0,6
	Mn	3,4±2,8	3,0±3,56	0,9	9,7±1,7	0,0000	0,0004
MDA	Osocze /Serum ($\mu\text{molMDA}/\text{ml}/\text{min}$)	5,0±2,2	4,8±1,65	0,3	2,3±0,6	0,0001	0,0004
	Krwinki / Red cells ($\mu\text{molMDA}/\text{gHb}/\text{min}$)	0,4±0,1	0,36±0,14	0,9	0,24±0,02	0,0003	0,03

Tabela II. Wpływ zakażenia dróg oddechowych na układ oksydacyjno-antyoksydacyjny.
Table II. Influence of respiratory tract infection on oxidative – antioxidative system.

		Chorzy na astmę / Asthmatic pts		p
		Zakażenie / infection		
		tak / yes	nie / no	
POX $\mu\text{molNADPH}_2/\text{gHb}/\text{min}$		24,1±14,96	51,03± 14,96	0,0022
SOD JN/ml	całkowite / total	7,23 ±4,74	7,19 ±4,74	0,6507
	CuZn	105,08 ±3,67	104,85±39,75	0,8043
	Mn	2,99±3,02	4,20 ± 2,76	0,4150
MDA	Osocze / (Serum $\mu\text{molMDA}/\text{ml}/\text{min}$)	4,57 ±2,37	6,59±3,18	0,1594
	Krwinki / Red cells ($\mu\text{molMDA}/\text{gHb}/\text{min}$)	0,34 ±0,12	0,40 ± 0,06	0,0652

W okresie zaostrzenia stwierdzono istotny wzrost stężenia MDA zarówno w osoczu jak i w krwinkach czerwonych w porównaniu z grupą osób zdrowych (tab.I). Wartości stężeń tego parametru zależały od nasilenia obturacji mierzonej FEV₁ w I fazie badania ($r=0,85$; $p=0,04$) i nie ulegały znamiennej zmianie mimo osiągnięcia poprawy w zakresie objawów i wskaźników czynności płuc (tab.I). Na stężenie MDA nie miała również wpływu obecność zakażenia bakteryjnego w drogach oddechowych (tab.II).

Omówienie wyników

Uzyskane wyniki badań wskazują, że u chorych na astmę dochodzi do zachwiania równowagi systemu oksydacyjno – antyoksydacyjnego. Jest to o tyle ważne, że nagromadzenie się reaktywnych form tlenu w obrębie drzewa oskrzelowego to jedna z wielu postulowanych przyczyn uszkodzenia tkankowego w astmie oskrzelowej.

Największe znaczenie w antyoksydacyjnym układzie enzymatycznym, pełniącym ważne funkcje w obronie ustroju przed szkodliwymi skutkami reakcji zapalnej, ma dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza glutationu. Enzymy te odgrywają krytyczną rolę w zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych.

Peroksydaza glutationu wyizolowana po raz pierwszy w 1973 roku, należy do najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za degradację nadtlenu wodoru w wielu komórkach i tkankach. Enzym ten występuje głównie w cytozolu, w śladowych ilościach w mitochondrium. Należy do tzw. zmiataczy wolnych rodników, jego rola polega na ochronie błon komórkowych przed działaniem nadtlenu i wodorotlenków oraz regulacji stężenia H₂O₂. W latach 90. ubiegłego stulecia zwrócono uwagę na obniżoną aktywność peroksydazy u chorych na astmę aspirynową [7]. Badania Flatta [8] udowodniły związek pomiędzy obniżoną aktywnością peroksydazy glutationu, a częstością występowania astmy w populacji chorych w Nowej Zelandii, kraju o wysokim stopniu zapadalności na astmę. Wykazano również, że niska aktywność peroksydazy glutationu sześciokrotnie zwiększa ryzyko ujawnienia się tej choroby.

Obserwowany w niniejszym badaniu wzrost aktywności POX w okresie zaostrzenia choroby można tłumaczyć aktywacją układu antyoksydacyjnego w odpowiedzi organizmu na wytwarzanie dużych ilości wolnych rodników tlenowych w warunkach stresu tlenowego. Z kolei wyższe wartości aktywności POX w grupie chorych z zaostrzeniem cho-

roby, bez cech infekcji bakteryjnej, w porównaniu z grupą chorych wykazujących cechy infekcji mogą świadczyć na rzecz upośledzenia mechanizmów antyoksydacyjnych lub też szybszego wyczerpania się ich funkcji w przebiegu infekcji.

Są również dane przeciwnie wskazujące na brak różnic pomiędzy aktywnością POX u chorych na astmę i grupą osób zdrowych [10]. Co więcej w badaniach tych [9,10] obserwowano wręcz niskie wartości stężeń POX u chorych na astmę w okresie zaostrzenia i brak normalizacji wartości tego parametru w miarę poprawy klinicznej [9]. Interpretacja tego zjawiska jest niejednoznaczna. Być może, że cechą astmy jest zaburzenie funkcji POX. Nie można również wykluczyć, że zmienność zachowania się tego parametru jest odzwierciedleniem aktywności obronnej mechanizmów antyoksydacyjnych.

W skład układu oksydoredukcyjnego inaktywowanego wolne rodniki tlenowe wchodzi również dysmutaza ponadtlenkowa, manganowa (MnSOD), występująca głównie w mitochondriach jak i miedziowo-cynkowa, cytoplazmatyczna (CuZnSOD) odpowiedzialna za usuwanie anionu ponadtlenkowego. Jest to o tyle ważne, że aniony ponadtlenkowe są głównym źródłem substancji o dużej sile działania cytotoksycznego. W wyniku działania dysmutazy z anionów ponadtlenkowych powstają cząsteczki nadtlenu wodoru, które rozkłada peroksydaza glutationu.

W niniejszym badaniu zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej odnotowano tylko w zakresie manganowej izoformy tego enzymu, którego stężenie było istotnie niższe. Natomiast aktywność cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej wykazywała porównywalne wartości u chorych na astmę i w grupie osób zdrowych. Wyniki te mogą przemawiać za upośledzeniem funkcji ochronnych układu oksydoredukcyjnego w zakresie aktywności tego enzymu w zaostrzeniu. De Raeve [11] również obserwował w swoich badaniach spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej u chorych na astmę, ale w odróżnieniu od uzyskanych przez nas wyników, głównie frakcji cytoplazmatycznej. W badaniach tych zastosował ilościową ocenę aktywności tego białka w komórkach nabłonka oddechowego.

Inni [12] zwracając uwagę na znaczenie reakcji wolnorodnikowej w patogenezie astmy oskrzelowej i antyoksydacyjnego systemu obronnego ocenili aktywność enzymów tego układu w komórkach uzyskanych w czasie płukania oskrzelowo-pęcherzykowego i komórkach nabłonka uzyskanych metodą szczoteczki. W materiale pobranym u chorych na astmę obserwowano istotnie mniejszą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w porównaniu

z grupa osób zdrowych (odpowiednio 25% i 50% w komórkach uzyskanych z BAL-u i komórkach nabłonka). Co więcej, udowodniono bezpośredni związek pomiędzy reaktywnością oskrzeli na metacholinę ($PC_{20}FEV_1$) i aktywnością SOD w komórkach nabłonka, wykazując tym samym, że aktywność tego enzymu jest nie tylko markerem zapalenia w astmie, ale również może być wskaźnikiem stopnia ciężkości choroby. Dane te są w pewnym stopniu porównywalne z uzyskanymi przez nas wynikami badań. Obserwowana rozbieżność (spadek stężenia Mn SOD w okresie poprawy przebiegu choroby) wynikać może z braku korespondencji pomiędzy zachowaniem się badanych parametrów w krwi obwodowej i w drzewie oskrzelowym.

W niniejszym badaniu, zarówno w osoczu jak i w krwinkach czerwonych stwierdzono wzrost stężenia MDA u chorych na astmę niezależnie od klinicznej fazy przebiegu choroby. Są badania, które wskazują, że poprawa stanu chorych na astmę wiąże się z normalizacją stężenia MDA [13,14]. Stężenie dwualdehydu malonowego będąc wskaźnikiem aktywności procesu peroksydacji lipidów odzwierciedla stopień uszkodzenia komórkowego. Tak więc wzrost stężenia MDA u chorych na astmę, szczególnie zaznaczony w okresie zaostrzenia choroby świadczy na rzecz aktywacji komórek immunoalergicznego odczynu zapalnego, które w stanie pobudzenia wytwarzają reaktywne formy tlenu. Związki te uszkadzają błony fosfolipidowe powodują wzrost peroksydacji lipidów. Tłumaczy to równoległy do wzrostu MDA wzrost aktywności POX u badanych przez nas chorych na astmę. Nie można również wykluczyć wpływu steroidów na zmiany aktywności oznaczonych enzymów układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego i stężenia kwasu malonowego, tym bardziej, że zwiększenie dawki tych leków, w tym również podawanych systemowo, stosowano w okresie zaostrzenia objawów choroby. Istnieją bowiem dowody badawcze, że leki te zwiększają aktywność enzymów antyoksydacyjnych [11, 15]. Zagadnienie te wymaga dalszych badań, gdyż jak odnotowano również terapeutyczne dawki hydrokortyzonu nie wpływają bezpośrednio na aktywność tego enzymu.

U badanych przez nas chorych, pomimo istotnej poprawy w zakresie objawów klinicznych i wskaź-

ników czynności płuc nie uzyskano normalizacji stężenia MDA, co może być konsekwencją utrzymującego się przewlekłe u chorych na astmę stanu zapalnego w drogach oddechowych trwającego niezależnie od klinicznego obrazu choroby. Zmiana zachowanie się wskaźników systemu oksydacyjno – antyoksydacyjnego może również wymagać dłuższego czasu niż zastosowany w pracy 10-dniowy okres obserwacji. Świadczy o tym również analiza zachowania się aktywności POX oraz wykazanie tylko w fazie zaostrzenia silnego związku pomiędzy aktywnością tego enzymu i stężeniem MDA a wartościami FEV_1 .

Logiczną konsekwencją sekwencyjnego uruchomienia łańcucha reakcji zapalnej jest zaostrzenie astmy, niezależnie od czynnika sprawczego. Proces ten wiąże się z aktywacją szeregu komórek i uwalnianych przez nie mediatorów zapalenia, cytokin, chemokin. Uwalniane w konsekwencji uszkodzenia komórkowego reaktywne formy tlenu mają działanie proastmatyczne. W warunkach fizjologii funkcję ograniczania tego procesu pełni układ antyoksydacyjny. Upośledzenie sprawności tego układu jest przyczyną przewleknięcia się procesu chorobowego.

Wnioski

1. U chorych na astmę w okresie zaostrzenia występują nasilone procesy peroksydacyjne, które stanowią bodziec do uruchomienia mechanizmów antyoksydacyjnych.
2. W zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych najbardziej sprawny jest system peroksydazy glutationu przy ograniczonej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Zakażenie bakteryjne upośledza wydolność mechanizmów antyoksydacyjnych.
3. Brak istotnych różnic w zachowaniu się wskaźników antyoksydacyjnych pomiędzy okresem zaostrzenia i poprawy przebiegu choroby może świadczyć o przewlekłym stresie tlenowym w astmie lub dłuższym niż 10 dni okresem normalizacji wskaźników systemu oksydacyjno – antyoksydacyjnego.

Piśmiennictwo

1. Pawliczak R.: Rola wolnych rodników tlenowych w zapaleniu. *Pol.Mer.Lek.* 2003; 84, 493-496.
2. Pratico D., Fitzgerald G.A.: Generation of 8-epiprostaglandin F-2? by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Biol.Chem.*1996; 271, 8919-8924.
3. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute: Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. Publication 2002, no. 02-3569.
4. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.Biochem.* 1979; 95, 351-358.
5. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab.Clin.Med.* 1997; 70, 158-169.
6. Oyanagui Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal.Biochem.* 1984; 142, 290-296.
7. Pearson D. J., Suarez-Merdez V.J., Day J.P., Miller P.T.: Selenium status in relation to reduced glutathione peroxidase activity in aspirin- sensitive asthma. *Clin.Exp.Allergy* 1991; 21: 203-208.
8. Flatt A., Pearce N., Thommson C.D., Sears M.R., Robinson M.F., Beasley R.: Reduced selenium in asthmatic subjects in New Zealand. *Thorax* 1990; 45(7), 95-99.
9. Postępski J.: Ocena wybranych parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w zaostrzeniach astmy oskrzelowej u dzieci. *Pol.Mer.Lek.* 2001;11, 385-388.
10. Bibi H., Schlesinger M., Tabachnik E., Schwartz Y., Iscovitz H., Iaina A.: Erythrocyte glutathione peroxidase activity in asthmatic children. *Ann.Allergy*,1988; 61, 339-340.
11. De Raeve H.R. i wsp.: Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. *Am.J.Physiol.*1997; 272, 148-154.
12. Smith L.J.i wsp.: Reduced superoxide dismutase in lung cells in patients with asthma.*Free Radic.Biol. Med.*1997; 22,1301-1307.
13. Daniliak I.G., Kogan A.,Bolevich S.: The generation of active forms of oxygen by blood leukocytes, lipid peroxidation and antiperioxide protection in bronchial asthma patients. *Ter.Arkh.* 1992; 64, 54-57.
14. Rahman I., Morrison D., Donaldson K., MacNee W.: Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am.J.Physiol.*,1997; 272, 148-154.
15. Fenech A.G., Ellul-Micallef R.: Selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in maltese asthmatic patients: effect of glucocorticoid administration. *Pulm. Pharmacol. Ther.*
16. Passowicz- Muszyńska E., Jankowska R.,Marcinkowska A. i wsp. Wpływ hydrokortyzonu na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) granulocytów krwi obwodowej ludzi zdrowych i chorych na astmę oskrzelową. *Adv.Clin.Exp.Med.* 1998; (4), 415

Wpłynęła: 27.09.04

Adres: Klinika Chorób Wewnętrznych Alergologii i Immunologii Klinicznej w Zabrze, ŚAM w Katowicach