

Ocena wartości aktywności peroksydazy glutationowej (GPX) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w diagnostyce rozszianych zmian miąższowych płuc



Measurement of activity of glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) in diagnosis of diffuse lung diseases

Edyta Santorek-Strumiłło, Łukasz Piskorz, Szymon Wcisło, Marian Brocki, Sławomir Jabłoński, Jacek Kordiak

Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 2, Łódź

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2008; 5 (3): 296–300

Streszczenie

Wstęp: Do najczęstszych przyczyn uogólnionego wysiewu nowotworowego zaliczamy zaawansowaną postać raka płuca i zmiany przerzutowe, co związane jest ze stresem oksydacyjnym. Prowadzi on do powstania wolnych rodników tlenowych, które mogą uszkadzać strukturę kwasów nukleinowych, prowadząc do pęknięcia chromosomów. W wyniku takiego procesu dochodzi do powstania mutacji, zainicjowania procesu nowotworowego, a także do apoptozy.

Cel: Celem pracy było określenie zależności aktywności GPX i SOD w hemolizacie erytrocytarnym i ekstrakcie z miąższu płuca a etiologią rozszianych zmian miąższowych płuc.

Materiał i metody: Materiał stanowiło 40 osób ze zmianami rozszianymi miąższu płuc (rak płuca, sarkoidoza) oraz 40 osób grupy odniesienia. Grupę badaną stanowili chorzy z rozszianymi zmianami miąższowymi płuc, u których w innych ośrodkach nie można było ustalić etiopatogenezy zmian na podstawie mało inwazyjnych badań. U badanych oznaczano aktywność GPX i SOD w hemolizacie erytrocytarnym i ekstrakcie z miąższu płuca. Materiał do badań stanowiła krew żylna pobierana jednorazowo z żył okolicy dołu łokciowego w ilości 5,4 ml, a także fragment miąższu płuca pozyskanego w trakcie wideotorakoskopii.

Wyniki: Wykazano istotnie statystycznie niższe wartości GPX w hemolizacie erytrocytarnym i ekstrakcie z miąższu płuca w grupie badanej w porównaniu z grupą odniesienia, a także odwrotną zależność w aktywności SOD.

Wnioski: Oznaczanie aktywności GPX i SOD w hemolizacie erytrocytarnym jest dobrym dodatkowym badaniem laboratoryjnym pomocnym w określeniu etiologii zmian rozszianych miąższu płuc mało obciążającym pacjenta.

Słowa kluczowe: peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa.

Abstract

Background: The most common causes of diffuse lung diseases are: advanced forms of cancer and cancer metastasis – both connected with oxidative stress. The oxidative stress leads to the creation of oxygen free radicals which can damage the structure of nucleic acids, in consequence rupturing chromosomes. A consequence of this process is mutation and initiation of the neoplastic process.

Aim: The aim of the work was to define the dependence of GPX and SOD activity in blood and lung tissues for aetiology of diffuse lung diseases.

Material and Methods: Research material involved a group of 40 persons with diffuse lung diseases (lung cancer, sarcoidosis) and 40 persons constituting a control group. The investigated group consisted of patients with diffuse lung diseases, which was diagnosed in different hospitals based on examination of material collected by traditional, small invasive method; however, aetio-pathogenesis had not been discovered. Activity of GPX and SOD was measured in blood and lung tissues. Research material was 5.4 ml of venous blood collected once from veins of the cubital hole region and also a fragment of the lung tissues gained during videotoracoscopy.

Results: The research showed statistically significantly lower values of GPX in blood and lung tissues in the investigated group compared to the control group and also inverse dependence in the activity of SOD.

Conclusions: Measurement of activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in the blood is a good, minimally invasive, additional laboratory test, helpful in the qualification of the aetiology of diffuse lung diseases.

Key words: glutathione peroxidase, superoxide dismutase.

Adres do korespondencji: dr n. med. Edyta Santorek-Strumiłło, ul. Zamenhofa 1/3 m. 23, 90-431 Łódź, tel. +48 604 687 900, e-mail: edysiaj@wp.pl

Wstęp

We współczesnej pulmonologii rozlane zmiany mięszowe płuc (RZMP) stanowią istotny problem zarówno diagnostyczny, jak i leczniczy. Uogólniony wysiew prosowaty towarzyszy wielu chorobom płuc. Według piśmiennictwa istnieje ponad 150 przyczyn zmian rozsianych płuc. Do najczęstszych przyczyn RZMP zaliczamy: sarkoidozę, gruźlicę płuc, samoistne włóknienie płuc, eozynofilowe zapalenie płuc, ziarniniakowatość Langerhansa, pylicę płuc, ziarnicę złośliwą, zaawansowaną postać raka płuca, zmiany przerzutowe, kolagenozy i wiele innych. Schorzenia te wiążą się ze stresem oksydacyjnym, który prowadzi do powstania wolnych rodników tlenowych (WRT), mogących powodować wiele zaburzeń na poziomie komórkowym [1, 2].

Wolne rodniki tlenowe są cząsteczkami nietrwałymi i wysoko reaktywnymi, w związku z tym mogą pełnić rolę reduktorów lub utleniaczy. Najbardziej reaktywne są rodniki hydroksylowe (OH⁻), prowadzą one do modyfikacji DNA jądrowego i mitochondrialnego. WRT w organizmie pochodzą zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i tworzą się w wyniku reakcji endogennych. Do reakcji endogennych prowadzących do powstania WRT zaliczamy m.in. reakcję redukcji tlenu cząsteczkowego, a do czynników egzogennych: dym papierosowy, metale ciężkie, azbest, promieniowanie jonizujące, leki i wiele innych substancji [3–5].

Antyoksydanty to substancje, które w znaczącym stopniu hamują lub zatrzymują oksydację utlenowanego substratu. Organizm ludzki funkcjonuje sprawnie jedynie wtedy, gdy mechanizmy obronne, jakimi są antyoksydanty, są sprawne. Antyoksydanty działają wielokierunkowo. Na pierwszy plan wysuwa się działanie antyoksydantów prewencyjnych, polegające na zapobieganiu powstawaniu WRT oraz niedopuszczeniu do ich oddziaływania na związki biologiczne. Zaliczamy do nich enzymy antyoksydacyjne (np. peroksydaza glutationowa i dysmutaza ponadtlenkowa) i białka, które łączą się z jonami pierwiastków przejściowych. Peroksydaza glutationowa (GPX) powoduje, iż dochodzi do redukcji nadtlenu wodoru przy jednoczesnym przekształceniu w postać utlenioną zredukowanego glutationu. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) z kolei jest katalizatorem dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru [5, 6].

Cel pracy

Celem pracy było określenie zależności między aktywnością peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej w hemolizacie erytrocytarnym i ekstrakcie z mięszu płuca a etiologią rozsianych zmian mięszowych płuc.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowili pacjenci (40 osób) z RZMP zakwalifikowani do wideotorakoskopii (VTS) w celu uzyskania materiału do badania histopatologicznego. Średni wiek badanych wyniósł 57,9 lat, kobiety stanowiły 55% (22 osoby), mężczyźni 45% (18 osób). Wywiad rodzinny w kierunku występowania choroby nowotworowej był dodatni u 20 osób. Grupę odniesienia stanowili zdrowi klinicznie ochotnicy (40 osób). Średni wiek badanych wyniósł 57,75 lat, kobiety stanowiły

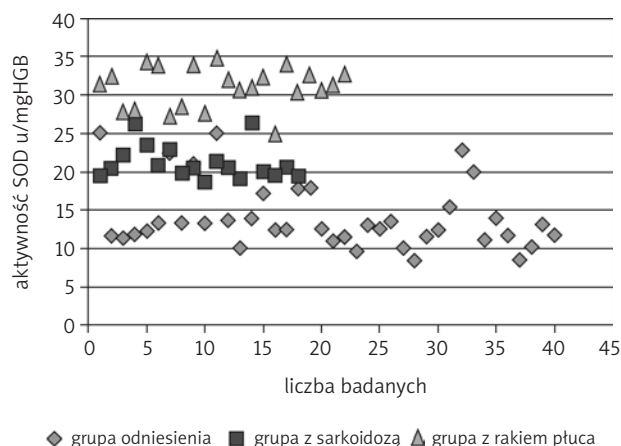
60% (24 osoby), mężczyźni 40% (16 osób). Wywiad rodzinny w kierunku występowania choroby nowotworowej był dodatni u 13 osób. Przeprowadzono oznaczenia aktywności SOD i GPX w hemolizacie erytrocytarnym i ekstrakcie z mięszu płuca (tylko grupa badana). Krew żyłą pobierano jednorazowo w ilości 5,4 ml do dwóch probówek 2,7 ml z EDTA, a następnie poddawano obróbce laboratoryjnej. Oceniano również aktywność SOD i GPX we fragmencie mięszu płuca pobranego w trakcie VTS przeznaczonego do badania histopatologicznego. W przypadku potwierdzenia rozrostu nowotworowego wykonywano dodatkowo pulmonektomię lub lobektomię. Z materiału uzyskanego w ten sposób pobierano dodatkowo fragment klinicznie zdrowego mięszu płuca.

Obliczenia wykonano z wykorzystaniem licencjonowanej wersji pakietu statystycznego STATISTICA PL 7.0.

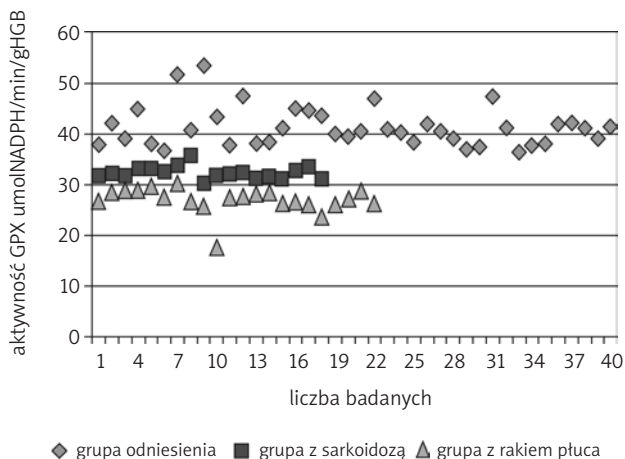
Wyniki

W grupie badanej uzyskano następujące wyniki badania histopatologicznego: rak płuca 22 osoby, sarkoidoza 18 osób.

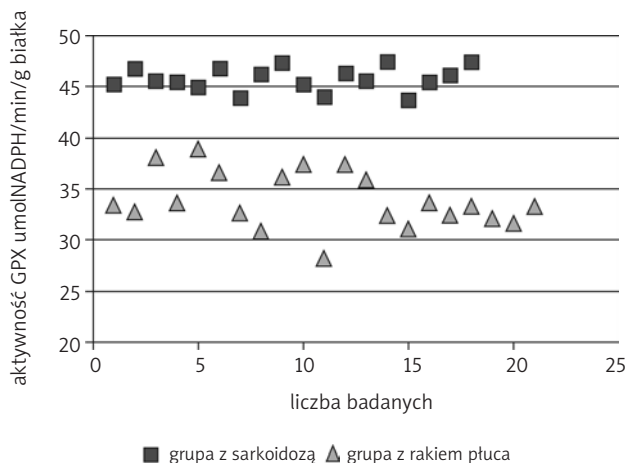
Analizując grupę odniesienia i badaną ze względu na aktywność SOD w hemolizacie erytrocytarnym, uzyskano następujące wyniki. Wśród osób zdrowych niższe wartości SOD (średnia = 13,936 z odchyleniem standardowym = 4,298) niż w grupie z rakiem płuca (średnia = 30,951 z odchyleniem standardowym = 2,696). W grupie z rakiem płuca w stosunku do osób zdrowych obserwujemy dwukrotny wzrost SOD (o 122,09%). Zaobserwowano również, iż wśród osób zdrowych niższe wartości SOD (średnia = 13,936 z odchyleniem standardowym = 4,298) niż w grupie z sarkoidozą (średnia = 21,134 z odchyleniem standardowym = 2,245). W grupie z sarkoidozą w stosunku do osób zdrowych obserwujemy wzrost SOD o 51,65%. Wśród osób z rakiem płuca uzyskujemy wyższe wartości SOD (średnia = 30,951 z odchyleniem standardowym = 2,696) niż w grupie z sarkoidozą (średnia = 21,134 z odchyleniem standardowym = 2,245). W grupie z rakiem w stosunku do osób z sarkoidozą obserwujemy wzrost SOD o 46,45%. Powyższe wartości przedstawia rycina 1.



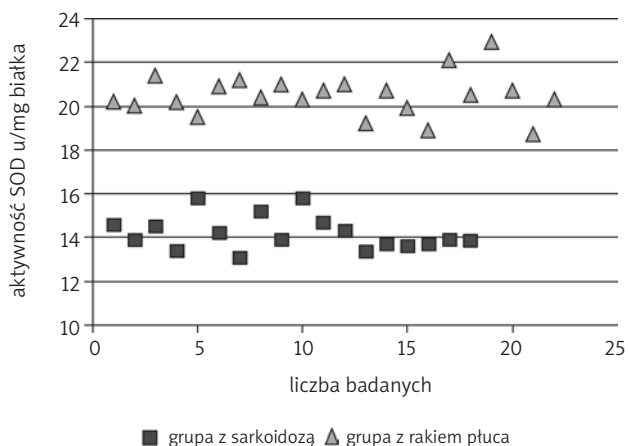
Ryc. 1. Aktywność SOD w hemolizacie erytrocytarnym w grupie odniesienia i badanej z podziałem na pacjentów z rakiem płuca i z sarkoidozą



Ryc. 2. Aktywność GPX w hemolizacie erytrocytarnym w grupie odniesienia i badanej z podziałem na pacjentów z rakiem płuca i z sarkoidozą



Ryc. 3. Aktywność GPX w ekstrakcie mięszszu płuca w grupie badanej z podziałem na pacjentów z rakiem płuca i z sarkoidozą



Ryc. 4. Aktywność SOD w ekstrakcie mięszszu płuca w grupie badanej z podziałem na pacjentów z rakiem płuca i z sarkoidozą

Analizując grupę odniesienia i badaną ze względu na aktywność GPX w hemolizacie erytrocytarnym, uzyskano następujące wyniki. Wśród osób zdrowych wyższe wartości GPX (średnia = 41,232 z odchyleniem standardowym = 3,909) niż w grupie z rakiem płuca (średnia = 26,868 z odchyleniem standardowym = 2,567). W grupie z rakiem płuca w stosunku do osób zdrowych obserwujemy spadek GPX o 34,84%. Wśród osób zdrowych uzyskujemy wyższe wartości GPX (średnia = 41,232 z odchyleniem standardowym = 3,909) niż w grupie z sarkoidozą (średnia = 32,341 z odchyleniem standardowym = 1,221). W grupie z sarkoidozą w stosunku do osób zdrowych obserwujemy spadek GPX o 21,56%. Wśród osób z rakiem płuca uzyskujemy niższe wartości GPX (średnia = 26,868 z odchyleniem standardowym = 2,567) niż w grupie z sarkoidozą (średnia = 32,341 z odchyleniem standardowym = 1,221). W grupie z rakiem w stosunku do osób z sarkoidozą obserwujemy spadek GPX o 16,92%. Powyższe wartości przedstawia rycina 2.

Różnice wykazano również w aktywności SOD w ekstrakcie mięszszu płuca. Analizując wartości średnie, stwierdzamy, że w grupie z rakiem występują istotnie wyższe wartości SOD w porównaniu z grupą z sarkoidozą (w grupie z rakiem średnia wartość = 20,482 z odchyleniem 0,980, a w grupie z sarkoidozą średnia wartość = 14,202 z odchyleniem 0,781). W grupie z rakiem w stosunku do grupy z sarkoidozą obserwujemy wzrost SOD o 44,22%. Powyższe wartości przedstawia rycina 3.

W mięszszu zdrowym klinicznie uzyskano istotnie niższe wartości SOD niż w tkance chorej. Wartości w tkance chorej są o dwa razy wyższe od wartości kontrolnych.

Grupy z rakiem płuca i z sarkoidozą różnią się również istotnie statystycznie ze względu na wartości GPX w ekstrakcie mięszszu płuca. Analizując wartości średnie, stwierdzamy, że w grupie z rakiem uzyskujemy niższe wartości GPX w porównaniu z grupą z sarkoidozą (w grupie z rakiem średnia wartość = 33,659 z odchyleniem 2,745, a w grupie z sarkoidozą średnia wartość = 45,488 z odchyleniem 1,198). W grupie z rakiem w stosunku do grupy z sarkoidozą obserwujemy spadek GPX o 26%. Powyższe wartości przedstawia rycina 4.

W mięszszu zdrowym klinicznie uzyskano istotnie wyższe wartości GPX niż w tkance chorej. Wartości w tkance chorej są o 40,17% niższe od wartości kontrolnych.

Dyskusja

Problem diagnostyki zmian rozszianych płuc był przedmiotem licznych prac naukowych. Jednak badania nad wykorzystaniem VTS, aktywności SOD i GPX w celu postawienia właściwego rozpoznania RZMP są jednymi z mniej poznanych zagadnień. Przeglądając piśmiennictwo ogólnosiwiatowe, nie spotkamy się z wieloma doniesieniami traktującymi łącznie o tych zagadnieniach. RZP ze względu na podobny obraz kliniczny i radiologiczny stanowią istotny problem w ich różnicowaniu, diagnostyce i leczeniu. Bez ostatecznej weryfikacji histopatologicznej nie jest możliwe postawienie prawidłowe-

go rozpoznania, a co za tym idzie, wdrożenie właściwego leczenia.

Miąśsz płuca chroniony jest przed WRT przez system antyoksydacyjny, między innymi SOD, która eliminuje O_2^- , a w konsekwencji zapobiega powstaniu kolejnych WRT, a więc wpływa również na proces transformacji nowotworowej [3, 5]. W swojej pracy Ho [6] przedstawia istotny wzrost aktywności SOD w ekstrakcie miąższu płuca pacjentów z rakiem płuca – w stosunku do zdrowej tkanki szacowany jest on na około 200%. Analizy *Northern* i *Western blotting* wykazały, że zależność ta zależna jest głównie od MnSOD, której aktywność znacząco wzrasta u pacjentów z rakiem płuca. Grupę badaną stanowiło 16 osób z rakiem płuca, grupę kontrolną 24 osoby, od których pobrano miąższ płuca z innych względów (np. rozedma). Ho tłumaczy wyniki swoich badań, wiążąc je z WRT. W przypadku działania na tkankę płucną zwiększonych ilości WRT aktywność naturalnej pierwszej bariery antyoksydacyjnej -SOD wzrasta. Wiąże się to ze zwiększoną liczbą powstających cząsteczek nadtlenu wodoru, które ze względu na brak wzrostu aktywności GPX nie są redukowane do cząsteczek wody. Prowadzi to do uszkodzeń DNA komórek lub jej śmierci.

Lakari [7] wykazuje wzrost aktywności MnSOD w przewlekłych chorobach miąższu płuca (sarkoidoza) i u osób palących papierosy w porównaniu ze zdrowymi tkankami. Różnice dotyczą przede wszystkim pneumocytów II, makrofażów pęcherzykowych i ziarniniaków. Zaznacza równocześnie, że większość pacjentów z RZMP jest nałogowymi palaczami papierosów. Sugeruje, że wysoka aktywność MnSOD odgrywa istotną rolę w protekcji płuc, w szczególności pneumocytów II przed progresją zmian śródmiąższowych płuc.

W innej pracy Lakari [8] potwierdza wzrost aktywności MnSOD w miąższu płuc i surowicy u pacjentów z sarkoidozą. Zależności te wykazał nie tylko w ziarniniakach, ale również w węzłach chłonnych. Wysoka aktywność MnSOD była też zauważona w próbkach pochodzących z BAL. Odwrotną zależność wykazano przy oznaczaniu CuZnSOD – aktywność była niższa w grupie badanej (sarkoidoza) w porównaniu z grupą kontrolną.

W badanym materiale porównywano aktywność SOD w miąższu płuca. W grupie z rakiem płuc uzyskano wyższe wartości SOD (o 44,22%) w porównaniu z grupą z sarkoidozą. Nie pobierano miąższu zdrowego klinicznie płuca od pacjentów z sarkoidozą. Wartości w tkance z rakiem są o dwa razy wyższe od wartości kontrolnych. W hemolizacie erytrocytarnym w grupie z rakiem płuca w stosunku do osób zdrowych obserwujemy dwukrotny wzrost SOD. W grupie z sarkoidozą w stosunku do osób zdrowych obserwujemy wzrost SOD o 51,65%. Uzyskane wyniki są zgodne z dostępnym piśmiennictwem.

Kolejnym enzymem antyoksydacyjnym badanym w pracy była aktywność GPX, również w piśmiennictwie znajdujemy liczne doniesienia na ten temat. Badania dotyczące aktywności GPX w hemolizacie erytrocytarnym u pacjentów z rakiem płuc i w grupie kontrolnej przedstawił szczegółowo Zachara [9]. Zaobserwował on istotne statystycznie obniżenie (o około 20%) aktywności GPX w grupie badanej w porównaniu z gru-

pą kontrolną. Badania przeprowadzał również na wycinkach z miąższu płuc: z guzem i klinicznie zdrowej tkance. Uzyskał 49-proc. wzrost aktywności GPX w tkance z rozrostem nowotworowym w porównaniu z tkanką niezmienną.

Kolejnym badaczem zajmującym się aktywnością GPX w chorobach nowotworowych jest Oberley [10]. Uzyskał on wyniki świadczące o zależności pomiędzy typem nowotworu a wartością GPX. Właściwie we wszystkich rodzajach nowotworów oprócz gruczolaka nerki odnotował istotny spadek aktywności GPX.

Czczot [11] przeprowadził badania dotyczące aktywności GPX w tkance guza i surowicy krwi w grupie pacjentów z rakiem żołądka. Krew do badania pobierano dwukrotnie (dobę przed zabiegiem operacyjnym i tydzień po), uzyskując w obu próbkach spadek aktywności GPX w stosunku do grupy kontrolnej. W badaniach z użyciem tkanki guza zaobserwowano wzrost aktywności GPX w porównaniu ze zdrową tkanką.

W przeprowadzonym przez nas badaniu określano aktywność GPX w ekstrakcie z miąższu płuca i hemolizacie erytrocytarnym, uzyskując istotne statystycznie różnice. Uwidoczniono wyższe wartości GPX w hemolizacie erytrocytarnym w grupie odniesienia w porównaniu z grupą z rakiem płuc (o 34,8%) i z sarkoidozą (o 21,5%). W ekstrakcie miąższu płuc zaobserwowano niższe wartości GPX w grupie z rakiem płuc w porównaniu z grupą z sarkoidozą (o 26%). Porównując wartość GPX w ekstrakcie z miąższu płuca zdrowego i z rozrostem nowotworowym, uzyskano wyższe wartości (o 40,1%) w tkance zdrowej.

W piśmiennictwie możemy odnaleźć doniesienia zarówno potwierdzające, jak i zaprzeczające istotnemu spadkowi aktywności GPX w ekstrakcie z miąższu płuca w tkance z guzem w porównaniu ze zdrową tkanką. Wszyscy natomiast potwierdzają spadek aktywności GPX w homogenacie erytrocytarnym, co jest zgodne z naszymi badaniami. Badania na materiale własnym potwierdzają słuszność tezy o potrzebie dalszych badań dotyczących aktywności SOD i GPX. W przyszłości badania te mogą stać się istotne w zastosowaniu oznaczeń ww. enzymów jako markera występowania nowotworów płuc. Badania te w sposób mało inwazyjny dla pacjenta (jednorazowa próbka krwi) dawałyby odpowiedź na pytanie, czy występuje zwiększone ryzyko zachorowania danego pacjenta na raka płuc lub ich wyniki świadczyłyby o toczącym się już procesie nowotworzenia.

Wnioski

Oznaczanie aktywności GPX i SOD w hemolizacie erytrocytarnym jest dobrym dodatkowym badaniem laboratoryjnym pomocnym w określeniu etiologii RZMP mało obciążającym pacjenta.

Praca przedstawiona i wyróżniona podczas IV Kongresu Polskiego Towarzystwa Kardio-Torakochirurgów, Warszawa, 12–14 czerwca 2008 r.

Piśmiennictwo

1. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 967-972.

2. Sheffield EA. Pathology of sarcoidosis. *Clin Chest Med* 1997; 18: 741-754.
3. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-147.
4. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14S-22S.
5. Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. *Bioessays* 1999; 21: 238-246.
6. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8578-8585.
7. Lakari E, Paakko P, Pietarinen-Runtti P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase and catalase are coordinately expressed in the alveolar region in chronic interstitial pneumonias and granulomatous diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 615-621.
8. Lakari E, Paakko P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase, but not CuZn superoxide dismutase, is highly expressed in the granulomas of pulmonary sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 589-596.
9. Zachara BA, Marchaluk-Wisniewska E, Maciag A, Peplinski J, Skokowski J, Lambrecht W. Decreased selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood and increase of these parameters in malignant tissue of lung cancer patients. *Lung* 1997; 175: 321-332.
10. Oberley TD. Oxidative damage and cancer. *Am J Pathol* 2002; 160: 403-408.
11. Czechoł H, Ścibior D, Skrzycki M, Podsiad M, Porembska Z. Poziom glutationu i aktywność GSH-zależnych enzymów u chorych na raka żołądka – badania wstępne. *Gastroenterologia* 2005; 12: 107-111.