

Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie astmy oskrzelowej

The role of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma

IZABELA SADOWSKA-WODA I EDYTA BIESZCZAD-BEDREJCZUK

Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie

Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych. Wspólna odpowiedź immunologiczna zarówno limfocytów pomocniczych Th1, jak i Th2 wywołuje ciężkie zapalenia dróg oddechowych, co sugeruje, że ważny w patofizjologii astmy jest udział cytokin produkowanych przez obydwie subpopulacje limfocytów Th, a także aktywacja czynników transkrypcyjnych w komórkach nabłonka oddechowego, tj. czynnik jądrowy κ B. Wzmocniona aktywność układu immunologicznego w astmie prowadzi do nasilenia przesunięcia równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej w ustroju w kierunku utleniania (tzw. stres oksydacyjny), co może inicjować czy też zaostrzać stan zapalny.

Z jednej strony, w astmie obserwuje się nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, natomiast z drugiej zaburzenia w funkcjonowaniu obrony antyoksydacyjnej, w której ważną rolę pełnią enzymy (dysmutaza nadadtlenkowa, peroksydaza glutationowa oraz katalaza), a także czynniki nieenzymatyczne (glutation, witamina A, C i E czy β -karoten). Zaburzenie równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej u chorych na astmę może wpływać na zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, skurcz mięśni gładkich oskrzeli czy zwiększoną produkcję śluzu przez gruczoły układu oddechowego. Proponowano wiele strategii terapeutycznych w celu zmniejszenia stresu oksydacyjnego i wzmocnienia bariery antyoksydacyjnej w przebiegu astmy. Dalsze badania dotyczące biomarkerów stresu oksydacyjnego i skuteczności wybranych antyoksydantów w terapii wspomagającej leczenie astmy są konieczne w celu ustalenia optymalnej kontroli tej choroby.

Słowa kluczowe: *astma, stres oksydacyjny, antyoksydanty*

Summary

Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. Common immune response of both T-helper type 1 and T-helper type 2 cells causes severe airway inflammation. This suggests the importance of the participation of cytokines produced by both subpopulations of Th lymphocytes and the activation of transcription factors in respiratory epithelial cells, as well as the activation of the nuclear factor κ B in the pathophysiology of asthma. Increased activity of the immune system in asthma leads to increased shifting of the antioxidative-prooxidative balance in human organism in the direction of oxidation (oxidative stress) that may initiate or exacerbate inflammation.

On the one hand, the production of reactive oxygen and nitrogen species is related to the severity of asthma, while on the other hand, the enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase) and nonenzymatic factors (glutathione, vitamin A, C and E and β -carotene) play an important role in the changes in the functioning of antioxidant defense. The antioxidative-prooxidative imbalance in asthmatics may lead to increase of the permeability of blood vessels, bronchial smooth muscle contraction, and increased mucus production by the glands of the respiratory system. Several therapeutic strategies to reduce oxidative stress and enhance antioxidant barrier in asthma have been proposed. Further studies on biomarkers of oxidative stress and the effectiveness of selected antioxidants in adjuvant therapy of asthma are needed to determine the optimum control of this disease.

Keywords: *asthma, oxidative stress, antioxidants*

© Alergia Astma Immunologia 2011, 16 (2): 80-89

www.alergia-astma-immunologia.eu

Przyjęto do druku: 27.02.2011

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr Izabela Sadowska-Woda

Katedra Biochemii i Biologii Komórki, Uniwersytet Rzeszowski

ul. Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów

tel.: +48 17 785 54 08

e-mail: isadowska@poczta.fm

Wykaz skrótów

BAL (ang. *bronchoalveolar lavage*) – płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe

CAT – katalaza

CD (ang. *cluster determinants*) – molekuly współuczestniczące

Cu/Zn-SOD – cytoplazmatyczna miedziowo-cynkowa dysmutaza nadadtlenkowa

DC (ang. *dendritic cells*) – komórki dendrytyczne

EC – numer międzynarodowej klasyfikacji enzymów

EPO – peroksydaza eozynofilowa

foxP3 (ang. *forkhead box P3*) – białko regulatorowe

GINA (ang. *Global Initiative for Asthma*) – Światowa Inicjatywa Zwalczania Astmy

GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik symulujący tworzenie się kolonii granulocytów i makrofagów

GSHPx – peroksydaza glutationowa

GSH – glutation

GSSG – disulfid glutationu

HLA (ang. *human leucocyte antigen system*) – układ zgodności tkankowej

H_2O_2 – nadtlenek wodoru	$O_2^{\cdot-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy
HOB _r – kwas podbromawy	OH [·] – rodnik hydroksylowy
HOCl – kwas podchlorawy	ONOO ⁻ – nadtenoazotyn
ICAM-1 (ang. <i>inter-cellular adhesion molecule</i>) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1	PUFA (ang. <i>polyunsaturated fatty acids</i>) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe
IFN γ (ang. <i>interferon</i> γ) – interferon γ	RNS (ang. <i>reactive nitrogen species</i>) – reaktywne formy azotu
Ig – immunoglobulina	ROS (ang. <i>reactive oxygen species</i>) – reaktywne formy tlenu
IKK- β – kinaza inhibitora czynnika jądrowego κ B	-SH – grupy tiolowe
IL – interleukina	SOD – dysmutaza ponadtlenkowa
IsoPs – izoprostany	-S-S – wiązania disiarczkowe
MDA (ang. <i>malondialdehyde</i>) – dialdehyd malonowy	STAT (ang. <i>signal transducer and activator of transcription</i>) – czynnik transdukcji i transkrypcji
MPO – mieloperoksydaza	TCR (ang. <i>T-cell receptor</i>) – receptor limfocytów T
NADP ⁺ – utleniony fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego	TGF- β (ang. <i>transforming growth factor</i> β) – transformujący czynnik wzrostu β
NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego	Th (ang. <i>T-helper</i>) – limfocyty pomocnicze
NF- κ B (ang. <i>nuclear factor kappa enhancer binding protein</i>) – czynnik jądrowy κ B	TNF- β (ang. <i>tumor necrosis factor</i> β) – czynnik martwicy nowotworu β
NO – tlenek azotu	Treg (ang. <i>regulatory T-cells</i>) – limfocyty regulatorowe
NO ⁺ – kation nitrozonowy	
NO ⁻ – anion nitroksylowy	

1. Astma oskrzelowa – przewlekła choroba zapalna dróg oddechowych

Astma oskrzelowa (łac. *asthma bronchiale*) to choroba charakteryzująca się nadmierną reaktywnością oskrzeli na wiele czynników, takich jak alergen, wysiłek fizyczny, zimne powietrze, dym tytoniowy. Do typowych objawów klinicznych astmy zalicza się duszność, kaszel, świszczący oddech oraz ucisk w klatce piersiowej. Przyczyną nadmiernej reaktywności oskrzeli jest przewlekły stan zapalny, w którym uczestniczą komórki układu immunologicznego (m.in. eozynofile, limfocyty T, makrofagi, mastocyty) i substancje przez nie uwalniane (tj. histamina, czy leukotrieny) [1].

Stosowane są różne systemy klasyfikacji astmy. Ich podstawę mogą stanowić zjawiska leżące u podłoża choroby, czynniki wyzwalające, stopień nasilenia objawów i wiele innych. Podział astmy na alergiczną i niealergiczną uwzględnia mechanizmy chorobowe. Mechanizmy alergiczne są przyczyną rozwoju astmy u 80% pacjentów w wieku dziecięcym i u 40-50% dorosłych [2]. Jeśli została potwierdzona rola immunoglobuliny (Ig) klasy E w rozwoju choroby, astmę alergiczną klasyfikuje się jako IgE-zależną. W astmie alergicznej IgE-zależnej proces zapalny zapoczątkowany jest przez reakcję alergenu z IgE, połączonymi z receptorami bazofilów i mastocytów. Komórki te wydzielają liczne, zdeponowane i tworzone de novo, mediatory zapalenia kurczące oskrzela, a także cytokiny o właściwościach prozapalnych i pobudzających migrację innych komórek, w tym eozynofili i limfocytów, do miejsca zapalenia. W astmie alergicznej IgE-niezależnej alergiczne testy skórne są ujemne, stężenie IgE w surowicy jest prawidłowe, a przeciwciała mogą należeć do izotypu IgG. Wyróżnia się różne typy astmy niealergicznej, np.: astmę infekcyjną (z nietolerancją niesteroidowych leków przeciwzapalnych), wysiłkową i o innej etiologii. Astma niealergiczna z reguły występuje u dorosłych bez „obciążenia” alergią

w wywiadzie. Czynnikiem wywołującym ten typ astmy jest przewlekłe drażnienie układu oddechowego kolejnymi infekcjami bakteryjnymi lub wirusowymi. W rezultacie pojawia się zjawisko nadreaktywności oskrzeli. Oba rodzaje astmy mają liczne cechy wspólne, takie jak udział eozynofili, limfocytów T, cytokin czy nadreaktywność oskrzeli [2,3].

W 2006 roku na zlecenie Komitetu Wykonawczego Światowej Inicjatywy Zwalczenia Astmy (GINA) został przedstawiony raport, który wprowadził zasadniczą zmianę strategii leczenia astmy, polegającą na kierowaniu się w wyborze sposobu leczenia stopniem kontroli choroby, a nie stopniem jej ciężkości [4]. Na podstawie kryteriów takich jak: występowanie objawów astmy w ciągu dnia oraz nocy (w tym przebudzeń), ograniczenie aktywności życiowej, potrzeba stosowania leków doraźnych w celu opanowania objawów astmy, a także ograniczenie czynności płuc, wyróżniono astmę: kontrolowaną, częściowo kontrolowaną oraz niekontrolowaną (tabela I). Taki podział astmy pozwala na dokonanie wyboru stopnia intensywności leczenia.

2. Stres oksydacyjny w astmie oskrzelowej

Kontakt z zanieczyszczeniami powietrza oraz wzmożona aktywność systemu immunologicznego w przebiegu astmy oskrzelowej prowadzi do stresu oksydacyjnego, który odgrywa ważną rolę w patofizjologii tej choroby [5,6]. Stres oksydacyjny to zaburzenie równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej w kierunku utleniania. Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie, w jaki sposób ekspozycja na różne czynniki (np. alergen, leki, zanieczyszczenia gazowe powietrza atmosferycznego, bakterie, wirusy) może prowadzić do aktywacji komórek układu odpornościowego, takich jak: eozynofile, neutrofile, limfocyty, makrofagi czy mastocyty w drogach oddechowych w przebiegu astmy oskrzelowej.

Komórki dendrytyczne (DC) stanowią pomost pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą. Komunikacja DC z limfocytami T odbywa się poprzez dwa równoczesne sygnały. Pierwszy, przekazywany przez DC, polega na kontakcie z receptorem limfocytów T (TCR). Dochodzi wówczas do prezentacji białek układu zgodności tkankowej (HLA) klasy I i II. Drugim sygnałem koniecznym do aktywacji limfocytów T są molekuly współuczestniczące (CD), takie jak: CD80, CD86 oraz cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1),

które są obecne na powierzchni komórki prezentującej. Inne konieczne sygnały uczestniczące w aktywacji limfocytów T to cytokiny należące do rodziny interleukiny (IL) 1 (tj. IL-18), czy IL-10 i -12 [7]. Do niedawna uważano, że na zmiany patofizjologiczne w przebiegu astmy ma wpływ przesunięcie równowagi odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów pomocniczych (Th) typu 2. Wyniki ostatnich badań wykazały jednak, że obecność limfocytów Th1 nasila objawy astmy oskrzelowej [8,9]. Ponadto limfocyty Th1 nie prze-

Tabela I. Stopnie kontroli astmy według raportu Światowej Inicjatywy Zwalczenia Astmy (GINA), który ukazał się w 2006 roku

Kryterium/ Stopień kontroli astmy	Astma kontrolowana (muszą być spełnione wszystkie kryteria)	Astma częściowo kontrolowana (musi być spełnione jakiegokolwiek z podanych kryteriów w danym tygodniu)	Astma niekontrolowana
Objawy w ciągu dnia	Co najwyżej 2 lub mniej razy w tygodniu	Występują częściej niż 2 razy w tygodniu	
Ograniczenie aktywności życiowej	Nie występuje	Jakiegokolwiek	Występowanie trzech lub więcej kryteriów astmy częściowo kontrolowanej w którymkolwiek tygodniu
Objawy w nocy (w tym przebudzenia)	Nie występują	Jakiegokolwiek	
Potrzeba stosowania leków doraźnych	Co najwyżej 2 lub mniej razy w tygodniu	Częściej niż 2 razy w tygodniu	
Czynność płuc ^a (PEF ¹ lub FEV ₁ ²)	Prawidłowa	< 80% wartości należnej lub wartości maksymalnej u pacjenta (jeśli jest znana)	
Zaostrzenia	Nie występują	Występują częściej niż raz w roku ^b	Jeden, w którymkolwiek tygodniu ^b

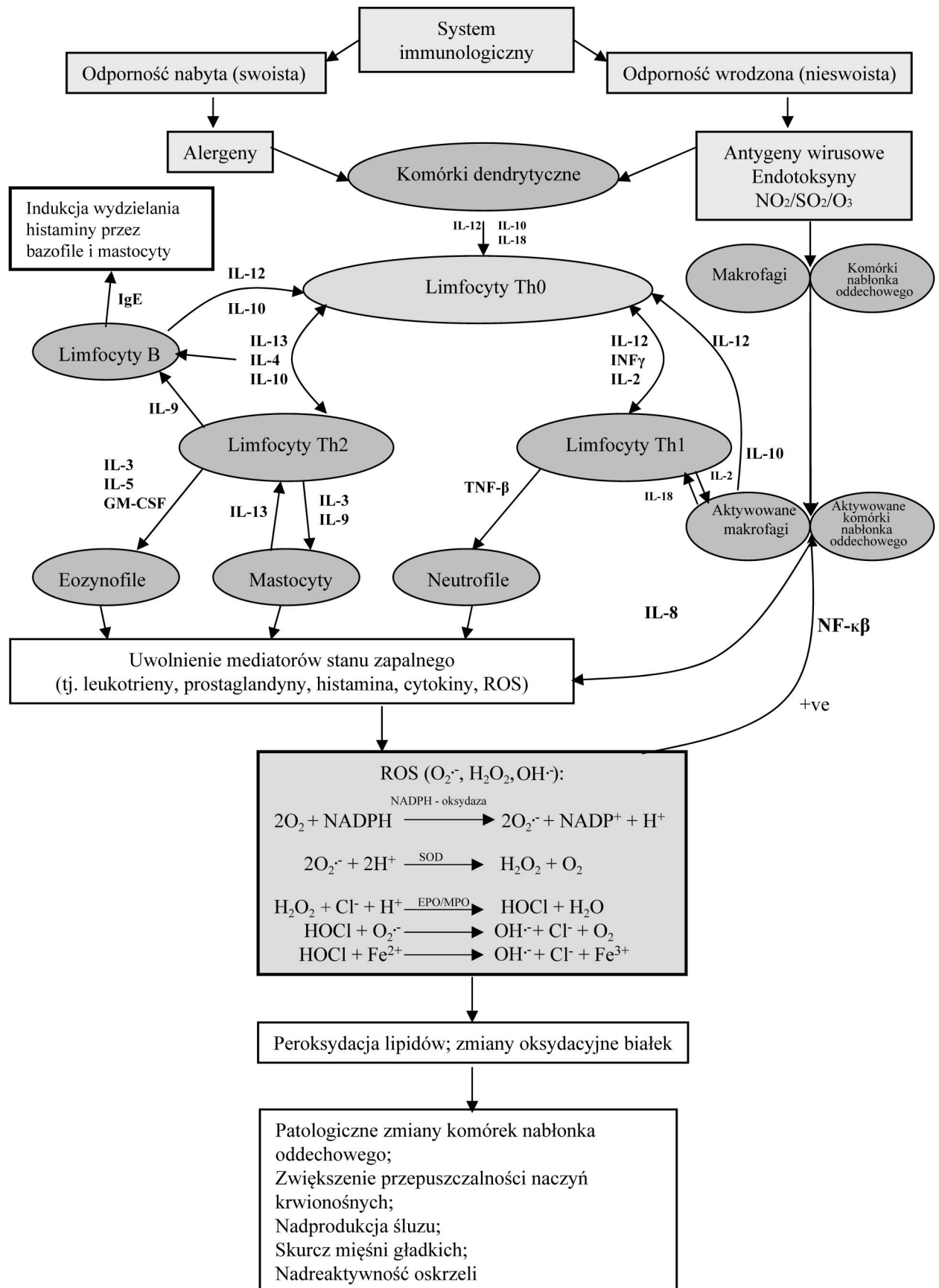
^a Badanie czynności płuc nie daje wiarygodnych wyników u dzieci 5-letnich i młodszych.

^b W przypadku jakiegokolwiek zaostrzenia należy niezwłocznie wprowadzić adekwatne leczenie.

^c Każdy tydzień z zaostrzeniem astmy uznaje się za tydzień z astmą niekontrolowaną.

¹ szczytowy przepływ wydechowy (ang. *peak expiratory flow*)

² nasiloną objętość wydechowa pierwszosekundowa (ang. *forced expiratory volume in the first second*)



Ryc. 1. Schemat przedstawiający, w jaki sposób wzmożona aktywność układu immunologicznego w przebiegu astmy oskrzelowej prowadzi do peroksydacji lipidów i zmian oksydacyjnych białek

ciwdziałającą nadreaktywności dróg oddechowych zależnej od limfocytów Th2 [10]. Obecnie przyjmuje się, że wspólna odpowiedź immunologiczna zarówno limfocytów Th1, jak i Th2 wywołuje ciężkie zapalenia dróg oddechowych. Sugeruje to, że w patofizjologii astmy ważny jest udział cytokin produkowanych przez obydwie subpopulacje limfocytów Th. Wykazano też, że u pacjentów chorych na astmę oskrzelową, szczególnie u tych z długą historią objawów choroby, w obrębie dróg oddechowych występują limfocyty Th1 i Th2 [11]. Biorąc pod uwagę fakt, że kluczowa w patomechanizmie chorób alergicznych jest zrównoważona aktywność limfocytów Th1 i Th2, astmę oskrzelową można podzielić na: zależną od limfocytów Th2, zależną od limfocytów Th1 i Th2 oraz zależną od limfocytów Th1. Rozpoczęto poszukiwania czynników, które mają wpływ na regulację Th1/Th2. Należą do nich niewątpliwie limfocyty regulatorowe, wykazujące ekspresję specyficznych markerów, Treg, CD 4+, CD25+high, które poprzez białko regulatorowe foxP3 i transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) wpływają hamująco na limfocyty Th1 i Th2 [12,13]. W czasie zaostrzenia astmy stwierdzono obniżony poziom Treg [13].

Przykładem czynnika wpływającego na różnicowanie (pobudzonych kontaktem z antygenem) limfocytów dziewiczych Th (Th0) w kierunku Th1 jest IL-12, wytwarzana głównie przez DC, makrofagi, limfocyty B, Th0 i Th1 oraz histamina wydzielana przede wszystkim przez mastocyty. IL-12 pobudza różnicowanie limfocytów Th0 w kierunku Th1, podczas gdy jej niedobór sprzyja generowaniu większej liczby limfocytów Th2. Natomiast histamina hamuje uwolnienie IL-12 i nasila uwalnianie IL-10 przez DC, aktywowane makrofagi, limfocyty B, Th0 i Th2, kierując odpowiedź immunologiczną w stronę Th2. Co więcej, subpopulacje Th1 i Th2 limfocytów oddziałują na siebie wzajemnie hamująco. Nasiloną odpowiedź jednego typu limfocytów Th uniemożliwia właściwą odpowiedź drugiego typu, dlatego równowaga między tymi dwiema subpopulacjami jest koniecznym warunkiem prawidłowej odpowiedzi immunologicznej [14]. U zdrowych ludzi większość limfocytów Th różnicuje się w kierunku subpopulacji Th1, zaś niewielka liczba – do komórek Th2. Limfocyty Th2 w odpowiedzi systemu immunologicznego odporności nabytej (swoistej) na specyficzny alergen (np. *Dermatophagoides pteronyssinus*, sierść i naskórek zwierząt czy pyłki traw) wydzielają czynniki odgrywające istotną rolę w zapaleniu eozynofilowym w astmie: dimeryczną cytokinę IL-5, a także IL-3 i czynnik symulujący tworzenie się kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) [6,14,15]. W płynie uzyskanym z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) oraz w biopatach oskrzeli chorych na astmę stwierdzono nasiloną ekspresję IL-5 [16], a jej poziom korelował ze stopniem nasilenia choroby [17]. Ponadto limfocyty Th2 wydzielają IL-4, -9 i -13, które stymulują nadmierne wytwarzanie IgE oraz migrację szeregu komórek alergicznego zapalenia [7]. Limfocyty Th1 wydzielają natomiast m.in. IL-2, interferon γ (IFN γ) oraz czynnik martwicy nowotworu β (TNF- β). Czynniki te są związane z aktywacją mechanizmów obronnych skierowanych przeciwko wirusom i bakteriom [15].

Z kolei w aktywowanym systemie odporności nabytej (nieswoistej) komórki nabłonka oddechowego i makrofagi produkują IL-8 o silnym działaniu chemotaktycznym dla neu-

trofilów i limfocytów. Stwierdzono, że transkrypcja mRNA dla IL-8 jest hamowana przez kortykosteroidy, co stanowi uzasadnienie stosowania tych leków zarówno w astmie, jak i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc [6].

Aktywowane eozynofile, neutrofile, monocyty i makrofagi mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu (ROS), które są produktami wzbudzenia lub redukcji tlenu cząsteczkowego. Powstają one m.in. w wyniku przyłączenia do cząsteczki tlenu mniejszej niż cztery liczby elektronów. Do ROS należą zarówno rodniki tlenowe, które mają niesparowane elektrony na atomie tlenu, np. rodnik hydroksylowy (\cdot OH), jak i te pochodne tlenowe, które niesparowanych elektronów nie mają, np. nad-tlenek wodoru (H_2O_2). Związki te są bardziej aktywne niż tlen w stanie podstawowym. ROS mają różnorodne właściwości biologiczne, m.in.: są wewnątrzkomórkowymi przekąźnikami sygnałów w procesie transdukcji, mediatorami apoptozy i fizjologicznej proteolizy, regulatorami produkcji cytokin i napięcia naczyń w mikrokrążeniu, oraz z uwagi na właściwości bakteriobójcze, głównymi efektorami komórek fagocytarnych. W sytuacji nadmiernej ich generacji i upośledzonej degradacji dochodzi do stresu oksydacyjnego, w którym ROS uszkadzają inne cząsteczki poprzez ich utlenianie [18,19].

Wytwarzanie wolnych rodników w układzie oddechowym może odbywać się na drodze następujących reakcji chemicznych:

$2\text{O}_2 + \text{NADPH} \Rightarrow 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$ – reakcja katalizowana przez oksydazę NADPH;

$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \Rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ – katalizatorem jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD);

$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{O}_2 + 2\text{OH}^{\cdot}$;

anion halogenku (np. Cl $^-$ /Br $^-$) + $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \Rightarrow (\text{HOCl}/\text{HOBr}) + \text{H}_2\text{O}$ – reakcja katalizowana przez mieloperoksydazę (MPO) w neutrofilach/peroksydazę eozynofilową (EPO) w eozynofalach.

Anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i nad-tlenek wodoru (H_2O_2) nie są silnymi czynnikami bakteriobójczymi, lecz substratami do dalszych przemian z udziałem metali i układu MPO, które doprowadzają do powstawania toksycznych halogenków i rodników hydroksylowych (OH^{\cdot}). H_2O_2 pod wpływem MPO w obecności jonów halogenkowych (np. Cl $^-$) generuje powstawanie bardzo aktywnych, utleniających związków, takich jak kwas podchlorawy (HOCl) i inne. HOCl jest jednym z najsilniejszych fizjologicznych, nierodnikowych utleniaczy i jednocześnie związkiem działającym antybakteryjnie. Ponadto w wyniku reakcji HOCl z tauryną powstają chlo-roaminy, które mogą inaktywować elastazę i inne proteazy neutrofilii [6]. Natomiast w wyniku reakcji HOCl z $\text{O}_2^{\cdot-}$ lub Fe $^{2+}$ powstają rodniki OH^{\cdot} , które działają niewybiórczo i reagują z pierwszą napotkaną cząsteczką. Rodniki te m.in. uszkadzają struktury łącznotkankowe, błony podstawowe naczyń, zaburzają transport błonowy, a także uszkadzają komórki śródbłonna naczyń.

Przeprowadzono wiele badań klinicznych pod kątem obecności markerów stresu oksydacyjnego w powietrzu wydechowym, płwocinie, płynie BAL i w innych materiałach biologicznych pobranych od pacjentów chorych na astmę oskrzelową (tabela II).

Tabela II. Markery stresu oksydacyjnego w astmie

Wybrane markery stresu oksydacyjnego	Materiał biologiczny	Wartość w odniesieniu do wyznaczonej dla osób zdrowych	Piśmiennictwo
stężenie H ₂ O ₂	kondensat powietrza wydechowego	↑	[20,21]
stężenie NO	powietrze wydechowe	↑	[23,24]
stężenie MDA	surowica kondensat powietrza wydechowego	↑ ↑	[21,28] [20]
stężenie F2t-IsoP-M	mocz	↑	[29,30]
aktywność SOD	komórki nabłonka oddechowego komórki BAL erytrocyty	↓ ↓ ↓ ↑ -	[31] [31] [28,32-35] [36,37] [38,39]
stężenie całkowitego glutationu (GSH + GSSG)	komórki nabłonka oddechowego komórki BAL plwocina erytrocyty	- ↑ ↑	[31] [42,43] [37]
aktywność GSHPx	komórki nabłonka oddechowego komórki BAL erytrocyty	- - ↓ ↑ -	[31] [31] [34,37,38] [39] [35,40]
aktywność CAT	komórki nabłonka oddechowego komórki BAL erytrocyty	- - ↓ -	[31] [31] [34] [35,37]
stężenie witaminy C	osocze surowica płyn BAL	- ↓ ↓ ↓	[28,38,46] [34] [45,47] [46]
stężenie witaminy A	osocze surowica	↓ - ↓	[34] [38] [51]
stężenie witaminy E	osocze surowica krew pełna żylna płyn BAL popłuczyny oskrzelowe	↓ ↑ - - ↓ ↓ ↓ ↓	[28,34,42] [46] [38] [45] [42] [46] [46] [46]

↑ i – zwiększenie, ↓ – zmniejszenie, – brak zmian

U pacjentów chorych na astmę stwierdzono m.in. podwyższony poziom H_2O_2 w kondensacie powietrza wydechowego [20,21]. Wzrost stężenia nadtlenu jest prawdopodobnie wynikiem występowania stanu zapalnego, któremu często towarzyszą infekcje bakteryjne.

MPO uwalniana przez neutrofile i EPO eozynofili mogą wykorzystywać H_2O_2 i azotyny (główny końcowy produkt metabolizmu tlenu azotu – NO) jako substraty do tworzenia pośredników reaktywnych form azotu (RNS). Do RNS należą: kation nitrozonowy (NO^+), anion nitroksylowy (NO^-) i nad-tlenoazotyn ($ONOO^-$) [22]. W powietrzu wydychanym przez chorych na astmę stwierdzono zwiększone stężenie NO, który działa jako międzykomórkowy przekaźnik regulujący napięcie naczyń krwionośnych, aktywujący płytki krwi oraz uczestniczący w kontroli odpowiedzi immunologicznej [23,24]. Pomimo iż NO znalazł zastosowanie w praktyce klinicznej w diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia astmy, jego rola w tej chorobie nie została do końca wyjaśniona. Znaczenie NO w astmie nie sprowadza się jedynie do jego nadmiernego wytwarzania, ale wiąże się także z zaburzeniem mechanizmów regulujących jego powstawanie i działanie. Tlenek azotu powstaje z L-argininy podczas jej przemiany w L-cytrulinę w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu i w ciągu 5-30 sekund ulega przekształceniu w trwałe metabolity, tj. azotyny i azotany [25]. W drogach oddechowych w astmie dochodzi do zaburzeń metabolizmu argininy. Składa się na nie defektywny transport argininy do komórek, zwiększona ekspresja arginazy oraz izoformy indukowanej syntazy tlenu azotu. Powoduje to niedobór substratu dla dwóch konstytutywnych izoform syntazy NO-neuronalnej i śródbłonkowej, które wytwarzają NO o właściwościach bronchoprotekcyjnych. Tlenek azotu wykrywany w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę, wytwarzany przy udziale indukowanej izoformy jego syntazy, koreluje z nasileniem zapalenia i za pośrednictwem różnych mechanizmów uszkadza drogi oddechowe nasilając objawy choroby. Z kolei metabolity argininy powstające na szlaku arginazy przyczyniają się do nieodwracalnych zmian strukturalnych oskrzeli, do jakich dochodzi w przebiegu astmy [26].

W stanie zapalnym układu oddechowego u chorych na astmę i przebudowie dróg oddechowych znaczną rolę może odgrywać aktywacja czynników transkrypcyjnych w komórkach nabłonka oddechowego, tj. białka z rodziny STAT, czy czynnik jądrowy κB (NF- κB), modulacja zależnego od glikokortykosteroidów sygnału transdukcji, stymulacja syntezy fosfolipazy i eikozanoidów, indukcja czynników wzrostu i cytokin oraz modyfikacja komórkowych mechanizmów transportu jonów. W następstwie utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) takich jak kwas dokozaheksaenowy czy kwas eikozapentaenowy, które wchodzą w skład lipidów błon komórkowych, powstają nadtlenuki tych związków (tzw. proces peroksydacji lipidów) [18]. Jednym z wielu związków wytwarzanych w procesie peroksydacji PUFA jest dialdehyd malonowy (MDA; $COH-CH_2-COH$). MDA może powstawać na drodze nieenzymatycznej autooksydacji PUFA lub być ubocznym produktem ich utleniania enzymatycznego, co zachodzi np. w szlaku przemian eikozanoidów. Z miejsc,

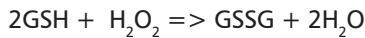
w których powstaje MDA może zostać przetransportowany do odległych tkanek i tam, dzięki możliwości tworzenia wiązań kowalencyjnych z cząsteczkami, może modyfikować ich strukturę, a w konsekwencji zmieniać ich właściwości [27]. Stężenie MDA, który jest niespecyficznym markerem stresu oksydacyjnego, jest podwyższone, zarówno w surowicy [21,28], jak i w kondensacie powietrza wydechowego [20] u chorych na astmę.

Niedawno opisanymi markerami nieenzymatycznej peroksydacji lipidów są izoprostany (IsoPs). Pomiar F2-IsoPs, podobnych do prostaglandyny stabilnych produktów arachidonowych, wytwarzanych w błonie fosfolipidowej pod wpływem ROS, uznano za czułą i nieinwazyjną metodę pozwalającą ocenić stres oksydacyjny *in vivo*. Dodatkowo związki te mogą być wykorzystywane jako selektywne wskaźniki ostrych stanów zapalnych i chorób degeneracyjnych będących następstwem stresu oksydacyjnego. Wytworzenie F2-IsoPs jest swoistą odpowiedzią na alergen, ponieważ nieswoisty czynnik powodujący skurcz oskrzeli – metacholina – nie powoduje zwiększenia wydzielania tych związków. Wykazano, że wziewna prowokacja alergenem powoduje zwiększenie wydzielania 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-IsoP (F2t-IsoP-M) – głównego metabolitu 15-F2t-IsoP (8-iso-PGF 2α) w moczu [29]. Pomiar metabolitu F2-IsoPs jest rzeczywistym wskaźnikiem systemowej produkcji IsoPs, ponieważ w przeciwieństwie do niemetalizowanego F2-IsoPs, metabolit ten nie może być wytwarzany w nerkach lub generowany przypadkowo przez autooksydację kwasu arachidonowego podczas przechowywania próbek. Wydaje się, że określenie stężenia F2-IsoP-M w moczu może służyć jako metoda ustalania skutecznej dawki i składu leków przeciwutleniających, stosowanych w celu hamowania stresu oksydacyjnego u chorych na astmę [29,30].

3. Obrona antyoksydacyjna w astmie

Z jednej strony, w astmie obserwuje się nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, natomiast z drugiej zaburzenia w funkcjonowaniu obrony antyoksydacyjnej, w której ważną rolę pełnią enzymy, a także czynniki nieenzymatyczne. Wśród enzymów wykazujących właściwości antyoksydacyjne można wyróżnić m.in. SOD, peroksydazę glutationową i katalazę. W astmie oskrzelowej stwierdzono niską aktywność SOD w komórkach nabłonka oddechowego i BAL [31]. Natomiast w erytrocytach pacjentów chorych na astmę zanotowano spadek [28,32-35], wzrost [36,37], bądź brak zmian [38,39] aktywności SOD (EC 1.15.1.1) w porównaniu do oznaczonej u osób zdrowych. Stwierdzono również niższe lub w normie stężenie cynku (kofaktora cytoplazmatyczna miedziowo-cynkowej dysmutazy nadadtlenkowej; Cu/Zn-SOD) w osoczu i surowicy u chorych na astmę [6]. Spadek aktywności SOD w warunkach stresu oksydacyjnego może być spowodowany modyfikacją aminokwasów tego enzymu, na skutek utleniania grup tiolowych (-SH) do wiązań disiarczkowych (-S-S-), czy też upośledzoną syntezą enzymu w warunkach przewlekłego stanu zapalnego. Podobnie rozbieżne wyniki badań dotyczą aktywności peroksydazy glutationowej (EC 1.11.1.9, GSHPx). U chorych na astmę opisuje się niższą [34,37,38], wyższą [39]

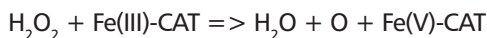
lub niezmienioną [35,40] aktywność tego enzymu we krwi w odniesieniu do osób zdrowych. GSHPx katalizuje reakcje między zredukowanym glutationem (GSH), tripetydem zbudowany z glutaminianu, cysteiny i glicyny, a nadtlenkiem wodoru w wyniku której powstaje utleniona forma glutationu (disulfid glutationu, GSSG), a nadtlenek zostaje zredukowany do wody:



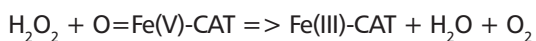
Utlenczenie glutationu do disulfidu może zachodzić również nieenzymatycznie. Disulfid glutationu powstały w procesie redukcji związków utleniających może zostać ponownie bezpośrednio zredukowany przez dihydroliponian lub pod wpływem reduktazy glutationowej z udziałem NADPH jako koenzymu [41]. Niezbędny w tej reakcji NADPH powstaje w wyniku działania dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej lub dehydrogenazy izocytrynianowej. Potencjał redoksyowy glutationu umożliwia również reakcje między GSH a utlenionymi innymi, nietiolowymi antyoksydantami (np. askorbinian, witamina E).

Ostatnie badania wykazały znacznie podwyższony poziom całkowitego glutationu (GSH wraz z GSSH) w płwocinie [42,43] oraz erytrocytach [37] chorych na astmę. Wzrost stężenia całkowitego glutationu może być reakcją adaptacyjną organizmu na nadmierną produkcję ROS w drogach oddechowych w przebiegu astmy.

Katalaza (EC 1.11.1.6, CAT) to kolejny enzym uczestniczący w enzymatycznej obronie organizmu przed wolnymi rodnikami. Katalizuje ona reakcje dysproporcjonowania nadtlenu wodoru (będącego m.in. produktem reakcji przeprowadzanej przez SOD), przebiegającą w dwóch etapach, prowadzących do powstania tlenu cząsteczkowego i wody. Etap pierwszy to redukcja nadtlenu wodoru do wody, w której uczestniczy jon żelaza Fe(III) układu hemowego. W wyniku tej reakcji powstaje związek Fe(V)-CAT:



Drugi etap to reakcja utleniania z udziałem Fe(V)-CAT kolejnej cząsteczki nadtlenu wodoru, w wyniku której powstaje tlen cząsteczkowy i woda:



W astmie oskrzelowej aktywność tego enzymu w komórkach nabłonka oddechowego i BAL [31], a także w erytrocytach [35,37] nie ulega zmianie. Jedynie nieliczne wyniki badań klinicznych wskazują na spadek aktywności CAT we krwi pacjentów z astmą [34]. Możliwe, że H_2O_2 może być dysproporcjonowany przez CAT przy równoczesnej redukcji prowadzonej przez zredukowany glutation.

W ślinie dzieci chorych astmą wykazano także niską aktywność peroksydazy ślinowej i SOD [44].

Na podstawie badań epidemiologicznych można stwierdzić, że istotną przyczyną częstszego występowania astmy w ostatnich latach jest niska zawartość antyoksydantów (np. witaminy A, C, E) w diecie. Ostatnie badania wykazały, że dietę chorych na astmę cechował niedobór witaminy A i C, natomiast zawartość witaminy E w pożywieniu nie miała wpływu na nasilenie objawów choroby [45]. U chorych na astmę stwierdzono niezmienione [28,38,46], bądź istotnie

obniżone stężenie witaminy C w osoczu [34]. Obniżone stężenie witaminy C u pacjentów z astmą wykazano także w surowicy (dorosłych [45] i dzieci w przedziale wiekowym 6-17 lat [47]) oraz płynie BAL [46]. Witamina C, zarówno w postaci utlenionej, jak i zredukowanej, może wpływać na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, którego aktywacja w komórkach nabłonka oddechowego odgrywa znaczną rolę w przebudowie dróg oddechowych w astmie. Askorbinian jako antyoksydant zmiata wolne rodniki, przez co blokuje uruchamianą przez ROS aktywację kinazy IKK- β , jednocześnie ulegając utlenieniu do dehydroaskorbinianu [48]. Ponadto kwas askorbinowy powoduje obniżenie ekspresji cyklooksygenazy-2, której promotor ma miejsce wiązania dla NF- κ B [49].

Właściwości antyoksydacyjne witaminy A ujawniają się przy fizjologicznym ciśnieniu parcjalnemu tlenu. Retinol może reagować z rodnikami nadtlenkowymi, dzięki czemu przerywa reakcję łańcuchowej peroksydacji lipidów tworząc wodoronadtlenki. Witamina A jest zdolna do bezpośredniego reagowania z ROS, tworząc 5,6-epoksyd retinoidowy [50]. Karotenoidy również wykazują szerokie właściwości antyoksydacyjne. Oprócz zmiatania rodników nadtlenkowych są efektywnymi wygaszaczami tlenu singletowego. Z kolei przy wysokim, porównywalnym z atmosferycznym, ciśnieniu tlenu, witamina A i jej cząsteczki prekursorowe, głównie β -karoten, mogą wykazywać działanie prooksydacyjne. Ciśnienie takie jest osiąganego na ogół tylko w nabłonku dróg oddechowych. W takich warunkach karotenoidy i retinoidy mogą ulegać autooksydacji, a następnie rozpoczynać reakcje łańcuchowej peroksydacji. Na podstawie wyników badań klinicznych ustalono, że w astmie oskrzelowej stężenie witaminy A w osoczu jest niezmienione [38], bądź istotnie obniżone [34]. Obniżone stężenie witaminy A wykazano także w surowicy dzieci chorych na astmę [51].

Witamina E obejmuje 8 różnych postaci, które są zbudowane z układu pierścieniowego 6-chromanolu i szesnastowęglowego łańcucha bocznego. W zależności od tego, czy łańcuch boczny jest nasycony, czy zawiera trzy wiązania podwójne, nazywane są one odpowiednio tokoferolami i tokotrienolami. Aktywność antyoksydacyjna tokoferoli wiąże się z ich zdolnością do przerywania łańcuchowej peroksydacji lipidów. Tokoferole reagują z rodnikami nadtlenkowymi tworzącymi się w błonach biologicznych i lipoproteinach wytwarzając względnie stabilne rodniki tokoferylowe. Tokoferole mogą być metabolizowane do związków, które wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi i niektórymi enzymami lub modulują ich aktywność. Stwierdzono, że metabolit γ -tokoferolu – γ -karboksyetylo-hydroksychromian, hamuje syntezę cyklooksygenazy-2 i prostaglandyny E w aktywowanych makrofagach i komórkach nabłonka [52]. Co więcej, badania Berdnikovs i wsp. wykazały, że izoforma D- γ -tokoferolu, nasila proces zapalny i moduluje przeciwzapalne działanie D- α -tokoferolu w modelu doświadczalnym astmy [53]. Należy także zaznaczyć, że witamina E dozowana w wysokich dawkach dorosłym chorym na astmę wykazuje działanie prooksydacyjne [54]. U pacjentów z astmą wykazano niskie stężenie witaminy E w porównaniu z osobami zdrowymi w płynie BAL i w popłu-

czynach oskrzelowych [46], a także w krwi pełnej żyłnej [42]. Natomiast wyniki oznaczeń witaminy E w osoczu chorych na astmę są rozbieżne, gdyż wskazują na wzrost [46], spadek [28,34,42], bądź brak zmiany [38] jej stężenia.

Dalsze badania dotyczące markerów stresu oksydacyjnego i skuteczności wybranych antyoksydantów w terapii wspomagającej leczenie astmy są konieczne w celu ustalenia optymalnej kontroli tej choroby.

Piśmiennictwo

- Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2006; 111 (2): 476-494.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J i wsp. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56 (9): 813-824.
- Handoyo S, Rosenwasser LJ. Asthma phenotypes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2009; 9 (6): 439-445.
- Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI); 2006. Available from: www.ginasthma.com.
- Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000; 55 (supl. 2): S51-S53.
- Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J* 2003; 21 (1): 177-186.
- Pałgan K, Bartuzi Z, Żbikowska-Götz M. Komórki dendrytyczne a alergię. *Pneumonol Alergol Pol* 2009; 77: 528-532.
- Siwiec J, Zaborowski T, Jankowska O i wsp. Ocena równowagi limfocytów Th1/Th2 oraz ekspresji receptorów dla lipopolisacharydu u chorych na astmę. *Pneumonol Alergol Pol* 2009; 77 (2): 123-130.
- Shalaby KH, Martin JG. Overview of asthma; the place of the T cell. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10 (3): 218-225.
- von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R i wsp. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30 (9): 1230-1234.
- Loza MJ, Foster S, Bleecker ER i wsp. Asthma and gender impact accumulation of T cell subtypes. *Respir Res* 2010; 11 (1): 103.
- McGuirk P, Higgins SC, Mills KH. The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10 (1): 21-28.
- Provoost S, Maes T, van Durme YM i wsp. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy* 2009; 64: 1539-1546.
- Asquith KL, Ramshaw HS, Hansbro PM i wsp. The IL-3/IL-5/GM-CSF common receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. *J Immunol* 2008; 180 (2): 1199-1206.
- Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol* 2003; 3 (7): 909-920.
- Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R i wsp. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991; 87: 1541-1546.
- Robinson D, Hamid Q, Bentley A i wsp. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 313-324.
- Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa, 2004; 358-359.
- Rutkowski R, Panciewicz SA, Rutkowski K i wsp. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 131-136.
- Antczak A, Nowak D, Shariati B i wsp. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997; 10 (6): 1235-1241.
- Al Obaidi AH, Al Samarai AM. Biochemical markers as a response guide for steroid therapy in asthma. *Asthma* 2008; 45 (5): 425-428.
- Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F i wsp. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* 2006; 533 (1-3): 240-252.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (7): 1693-1722.
- Ozier A, Girodet PO, Bara I i wsp. Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring in asthmatic patients. *Respir Med* 2011; doi:10.1016/j.rmed.2011.01.006.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988 (6174); 333: 664-666.
- Lewandowicz AM, Pawliczak R. Znaczenie metabolizmu argininy w astmie oskrzelowej. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; 61: 156-166.
- Gawęł S, Wardas M, Niedworok E i wsp. Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie. *Wiad Lek* 2004; 57 (9-10): 453-455.
- Rai RR, Phadke MS. Plasma oxidant-antioxidant status in different respiratory disorders. *Indian J Clin Biochem* 2006; 21: 161-164.
- Dworski R, Roberts LJ, Murray JJ i wsp. Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F2-isoprostane, 15-F2t-IsoP (8-iso-PGF2alpha). *Clin Exp Allergy* 2001; 31 (3): 355-356.
- Kurzawa R, Doniec Z, Gawęł J. Pneumonologia i alergologia. *Medycyna Praktyczna - Pediatria* 2001; 2: 43-51.
- Smith LJ, Shamsuddin M, Sporn PHS. Reduced superoxide dismutase in lung cells in patients with asthma. *Free Radic Biol Med* 1997 (7); 22: 1301-1307.
- Comhair SAA, Bhatena PR, Dweik RA i wsp. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet* 2000; 355 (9204): 624.
- Comhair SA, Ricci KS, Arroliga M i wsp. Correlation of Systemic Superoxide Dismutase Deficiency to Airflow Obstruction in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 (3): 306-313.
- Shanmugasundaram KR, Kumar SS, Rajasee S. Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma. *Clin Chim Acta* 2001; 305 (1-2): 107-114.
- Tekin D, Ayse SB, Mungan D i wsp. The antioxidant defense in asthma. *J Asthma* 2000; 37 (1): 59-63.
- Kurosawa M, Kobayashi H, Nakano M. CuZn superoxide dismutase activities in platelets from stable bronchial asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 101 (1): 61-65.

37. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A i wsp. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (1): 72-78.
38. Powell CVE, Nash AA, Powers HJ i wsp. Antioxidant status in asthma. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18 (1): 34-38.
39. Tho LL, Candlish JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease: a survey of one hundred cases. *Biochem Med Metab Biol* 1987; 38 (1): 74-80.
40. Wood LG, Garg ML, Blake RJ i wsp. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000; 35 (9): 967-974.
41. Bilska A, Włodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 2005; 57 (5): 570-577.
42. Wood LG, Garg ML, Blake RJ i wsp. Oxidized vitamin E and glutathione as markers of clinical status in asthma. *Clin Nutr* 2008; 27 (4): 579-586.
43. Beier J, Beeh KM, Semmler D i wsp. Increased concentrations of glutathione in induced sputum of patients with mild or moderate allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92 (4): 459-463.
44. Bentur L, Mansour Y, Brik R i wsp. Salivary oxidative stress in children during acute asthmatic attack and during remission. *Respir Med* 2006; 100 (7): 1195-1201.
45. Allen S, Britton JR, Leonardi-Bee JA. Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2009; 64 (7): 610-619.
46. Kelly FJ, Mudway I, Blomberg A i wsp. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 1999; 354 (9177): 482-483.
47. Harik-Khan RI, Muller DC, Wise RA. Serum vitamin levels and the risk of asthma in children. *Am J Epidemiol* 2004; 159 (4): 351-357.
48. Carcamo JM, Pedraza A, Borquez-Ojeda O i wsp. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I κ B kinase beta. *Mol Cell Biol* 2004; 24 (15): 6645-6652.
49. Han SS, Kim K, Hahm ER i wsp. L-ascorbic acid represses constitutive activation of NF- κ B and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60. *J Cell Biochem* 2004 (2); 93: 257-270.
50. Palace VP, Khaper N, Qin Q i wsp. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 1999 (5-6); 26: 746-761.
51. Al Senaidy AM. Serum vitamin A and beta-carotene levels in children with asthma. *J Asthma* 2009; 46 (7): 699-702.
52. Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C i wsp. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (21): 11494-11499.
53. Berdnikovs S, Abdala-Valencia H, McCary C i wsp. Isoforms of vitamin E have opposing immunoregulatory functions during inflammation by regulating leukocyte recruitment. *J Immunol* 2009; 182 (7): 4395-4405.
54. Pearson P, Lewis SA, Britton J i wsp. The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. *BioDrugs* 2006; 20 (5): 271-273.