

Wpływ leczenia dietą hypoalergiczną na składniki bariery antyoksydacyjnej i produkty peroksydacji lipidów u dzieci z alergią pokarmową

KALINA POKUSZYŃSKA ^{1/}, HENRYKA BRÓZIK ^{2/}, JANUSZ PIOTR SIKORA ^{3/}

^{1/} Klinika Kardiologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Łodzi

^{2/} Instytut Pediatrii Akademii Medycznej w Łodzi

^{3/} Klinika Propedeutyki Pediatrii Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej, ul. Sporna 36/50, 91-738 Łódź

Celem pracy była ocena wybranych składników bariery antyoksydacyjnej i produktów peroksydacji lipidów u dzieci z alergią pokarmową przed wprowadzeniem diety hypoalergiczną oraz po 3 miesiącach jej stosowania. Badania przeprowadzono w dwóch grupach liczących po 21 dzieci w wieku od 2 do 25 miesięcy. W pierwszej grupie dzieci metodami fluorymetrycznymi i fotometrycznymi oznaczono we krwi selen (Se) i witaminę E (Vit. E), aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px), w drugiej – stężenie sprzężonych dienów, dialdehydu malonowego (MDA) oraz zasad Schiffa. Przed wprowadzeniem diety u ponad połowy dzieci obserwowano niedobory Se i obniżoną aktywność GSH-Px, natomiast u około 1/3 – niedobory Vit. E. Po 3 miesiącach stosowania diety hypoalergiczną częstość występowania i stopień niedoborów zmniejszały się. Najwyższe stężenie MDA i sprzężenie dienów stwierdzono w I badaniu, obniżały się w kolejnym. Natomiast stężenie zasad Schiffa wzrastało w II badaniu. Po 3 miesiącach stosowania diety hypoalergiczną, pomimo poprawy klinicznej, nadal występowały zaburzenia metaboliczne.

Nasze badania wykazały, że niedobory składników bariery oksydacyjnej obecne u dzieci z alergią pokarmową ulegają częściowemu wyrównaniu po skutecznym leczeniu dietą hypoalergiczną.

Słowa kluczowe: alergia na białka mleka krowiego, selen, peroksydaza glutationowa, witamina E, produkty peroksydacji lipidów

Alergia pokarmowa stanowi ważny i aktualny problem kliniczny w medycynie wieku rozwojowego. Nadwrażliwość na białka mleka krowiego jest czynnikiem przyczynowym zróżnicowanych dolegliwości klinicznych, zwłaszcza u niemowląt i małych dzieci.

Objawy alergii na białka mleka krowiego mogą dotyczyć zarówno przewodu pokarmowego (wymioty, ulewania, biegunki, zespół złego wchłaniania, mikrokrwawienia z przewodu pokarmowego z wtórną niedokrwistością niedobarwliwą, bóle brzucha, zapalenie jelita grubego), jak i układu oddechowego (kichanie, katar, upośledzenie drożności nosa, świszczący oddech, kaszel, duszność o charakterze astmatycznym). Występują również objawy skórne (świąd, wysypki, pokrzywka, atopowe zapalenie skóry) oraz ze strony ośrodkowego układu nerwowego, a także inne ogólnoustrojowe.

Częstość występowania alergii pokarmowej ocenia się wg różnych autorów na 1,8-7,5% ogółu populacji dziecięcej [1,2]. Patomechanizm alergii na pokarmy nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Reakcje immunologiczne osób nadwrażliwych na spożywane produkty zachodzą wg różnych mechanizmów (wg Gella i Coombsa) [3]. Obecność nacieków z takich komórek,

jak mastocyty, eozynofile, neutrofile w miejscu alergicznego zapalenia jelit może dowodzić ich udziału w patogenezie tego schorzenia. Wzajemne oddziaływanie wymienionych komórek oraz wydzielanych w czasie odczynu alergicznego cytokin prozapalnych i reaktywnych związków tlenu (RZT) prowadzić może do postępującego uszkodzenia nabłonka kosmków jelitowych [4,5]. Te złożone patomechanizmy odpowiedzi alergiczno-immunologicznej uczulonych dzieci sprawiają, że symptomatologia kliniczna jest bardzo bogata i dotyczy nie tylko przewodu pokarmowego, lecz również innych narządów.

Na szczególną uwagę zasługuje rola reaktywnych związków tlenu w patogenezie uszkodzeń narządowych. Efekt cytotoksycznego działania RZT polega m.in. na peroksydacji lipidów błon komórkowych i mitochondrialnych, prowadzącej do uszkodzenia komórek i tkanek [6-8]. Na zapoczątkowanie procesu wystarcza ich niewielka ilość, gdyż proces rozprzestrzeniania się peroksydacji lipidów ma charakter samopodtrzymujący się. Końcowe produkty tego procesu, zwłaszcza aldehydy, są mniej reaktywne niż wolne rodniki, dzięki czemu mogą dyfundować na znaczne odległości, pełniąc funkcje

przebiegu uszkodzenia komórek przez RZT. Wolne rodniki tlenowe zaburzają naturalne procesy antyoksydacyjne z udziałem enzymów: np. dysmutazy nadadtlenkowej, katalazy lub peroksydazy glutationowej, które w przebiegu alergii pokarmowej wydają się być uszkodzone. O zwiększonej peroksydacji lipidów i zmniejszonej wydolności bariery antyoksydacyjnej u dzieci z chorobami alergicznymi donosili niektórzy autorzy [7,9-12]. W alergii pokarmowej mogą ulegać zubożeniu także nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne, do których należą m.in. witamina C, E, β -karoten [13].

Celem pracy była ocena wybranych składników bariery antyoksydacyjnej i produktów peroksydacji lipidów u dzieci z alergią pokarmową oraz prześledzenie zmian w obrębie tych składników i produktów pod wpływem stosowania diety hypoalergicznego, prowadzącej do poprawy klinicznej.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Badania przeprowadzono w dwóch grupach, liczących po 21 dzieci, obu płci, w wieku 1-25 miesięcy, u których rozpoznano alergię pokarmową. Do badań zakwalifikowano dzieci, dla których opracowano ankietę uwzględniającą informacje dotyczące: karmienia naturalnego lub sztucznego, objawów alergicznego ze strony układu pokarmowego, oddechowego, skóry, OUN, czasu pojawienia się pierwszych objawów alergii u dziecka oraz alergii w rodzinie. Po uzyskaniu danych z wywiadów i badaniu klinicznym oznaczono całkowite IgE oraz swoiste IgE na białka mleka krowiego, co pozwoliło postawić rozpoznanie. Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli I.

W pierwszej grupie śledzono dynamikę zmian w obrębie bariery antyoksydacyjnej, w drugiej – przemian wolnorodnikowych, które zachodziły w miarę stosowania diety hypoalergicznego. Grupę porównawczą dla oceny „bariery antyoksydacyjnej” stanowiło 42 zdrowych dzieci w odpowiednio dobranym wieku.

Metodyka badań

Spośród składników bariery antyoksydacyjnej oznaczono:

- stężenie selenu (Se) w osoczu, krwinkach czerwonych i pełnej krwi,
- stężenie witaminy E w osoczu i krwinkach czerwonych metodami fluorymetrycznymi,
- aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w osoczu i krwinkach czerwonych – metodą fotometryczną.

Zmiany peroksydacji lipidów w wyniku przemian wolnorodnikowych oceniano poprzez oznaczenie:

- stężenia nadtlenu lipidowych w osoczu, wyrażone w ilości nmoli dialdehydu malonowego w 1 ml (MDA),
- stężenia zasad Schiffa w osoczu – metodami fluorymetrycznymi,
- stężenia sprzężonych dienów w osoczu – metodą fotometryczną.

Badania przeprowadzono dwukrotnie: I – przed wprowadzeniem diety hypoalergicznego oraz II – po 3 miesiącach jej stosowania, w okresie poprawy klinicznej.

Wyniki oznaczeń składników bariery antyoksydacyjnej, uzyskane w I badaniu porównywano z wynikami II badania oraz odnoszono do grupy porównawczej. Natomiast produkty peroksydacji lipidów analizowano tylko w grupie dzieci z alergią pokarmową, odnosząc wyniki z I badania do wyników z badania II.

Metody statystyczne

W celu opisanego badanych dzieci obliczono średnie arytmetyczne (\bar{x}), odchylenie standardowe (SD). Dla porównania wartości przeciętnych w dwóch grupach zastosowano test Manna-Whitney'a, test dla dwóch średnich z małych prób lub test Cochran-Coxa, bądź test rang, test Wilcocon rang różnic dla par, w przypadku oceny różnic wartości przeciętnych analizowanego parametru w tej samej grupie, w dwóch różnych okresach czasu. Oceniając zależność pomiędzy cechami wykorzystano współczynnik korelacji Spearman'a, a istotność związku przy pomocy testu dla współczynnika korelacji Spearman'a.

Tabela I. Charakterystyka badanych grup

Grupa	Średni wiek badanych	Objawy kliniczne ze strony układu				Niedobór masy ciała	Alergia w rodzinie	IgE zależne	Karmienie		
		pokarmowego	skóry	oddechowego	OUN				naturalne	sztuczne	
I	7,5 m-cy	n	17	14	11	2	7	6	8	1	20
		%	81	66	52	9,5	33	28	38	4,8	95,2
II	3 m-ce	n	18	19	15	3	2	13	8	8	13
		%	86	90	71	14	9,5	62	38	38	62

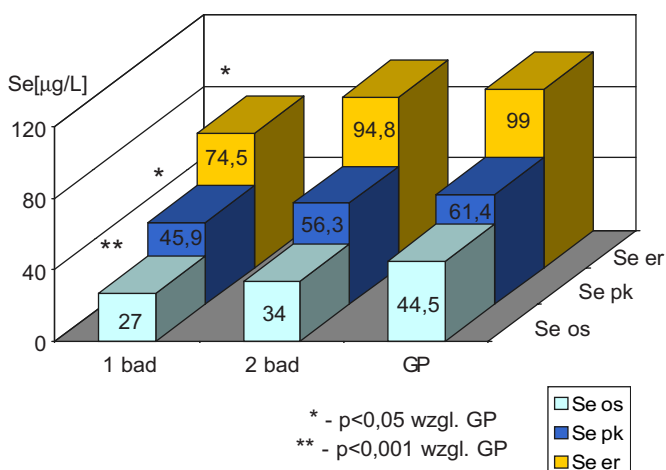
WYNIKI

U wszystkich dzieci, zarówno w grupie I jak i w II, zastosowano dietę hypoalergiczną, u 9 niemowląt kontynuowano karmienie naturalne, zalecając matkom picie Nutramigenu, u karmionych sztucznie wprowadzono mieszanki mlekozastępcze, głównie Nutramigen, w pojedynczych przypadkach – preparaty sojowe (Prosobee, Humanę SL).

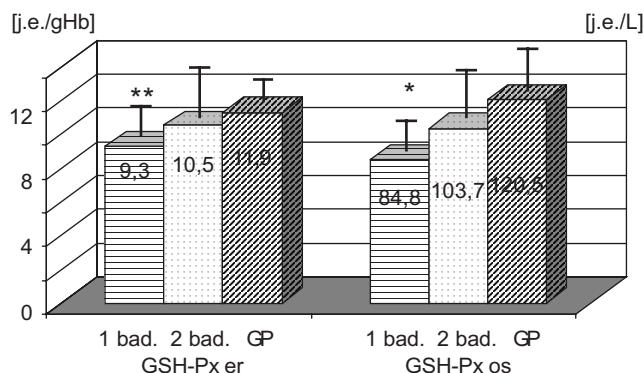
Klinicznym efektem stosowanej diety było stopniowe ustępowanie objawów oraz poprawa stanu odżywienia. Przed wprowadzeniem diety u 9 dzieci stwierdzono niedobór masy ciała wynoszący 11-32%, który już po 6 tygodniach zmniejszył się, a po 3 miesiącach ustąpił całkowicie. Po 3 miesiącach leczenia dietą całkowicie ustąpiły dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, a tylko u ok. 30% dzieci okresowo występowały przemijające zmiany skórne lub objawy ze strony układu oddechowego.

Składniki bariery antyoksydacyjnej

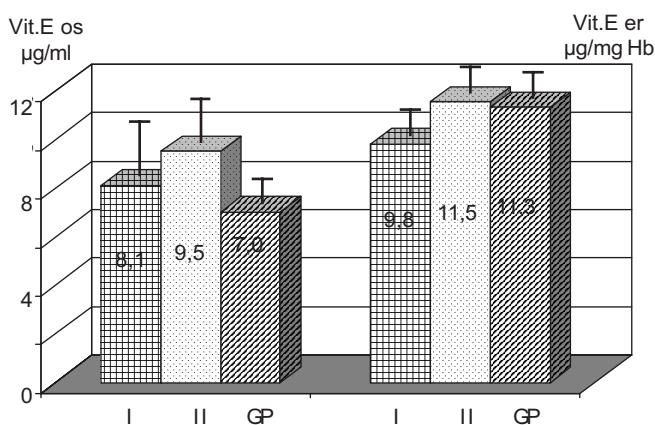
U dzieci z alergią pokarmową w I badaniu, tj. przed wprowadzeniem diety hypoalergicznego, średnie stężenie selenu w pełnej krwi, osoczu i krwinkach czerwonych, było znacznie niższe niż u dzieci z grupy porównawczej. W II badaniu, tj. po 3 miesiącach stosowania diety, stężenia tego pierwiastka były wyższe, nie osiągały one jednak wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych (ryc. 1). Analogiczne zjawisko obserwowano w odniesieniu do selenoenzymu – peroksydazy glutationowej (GSH-Px). Przed wprowadzeniem diety średnia aktywność tego enzymu w krwinkach czerwonych i osoczu była znacznie niższa niż u dzieci zdrowych, zaś w II badaniu wzrastała, ale nadal była niższa niż w grupie porównawczej (ryc. 2).



Ryc. 1. Stężenie selenu w osoczu (os), pełnej krwi (pk) i krwinkach czerwonych (er) u dzieci z alergią pokarmową



Ryc. 2. Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu (os) i krwinkach czerwonych (er) u dzieci z alergią pokarmową

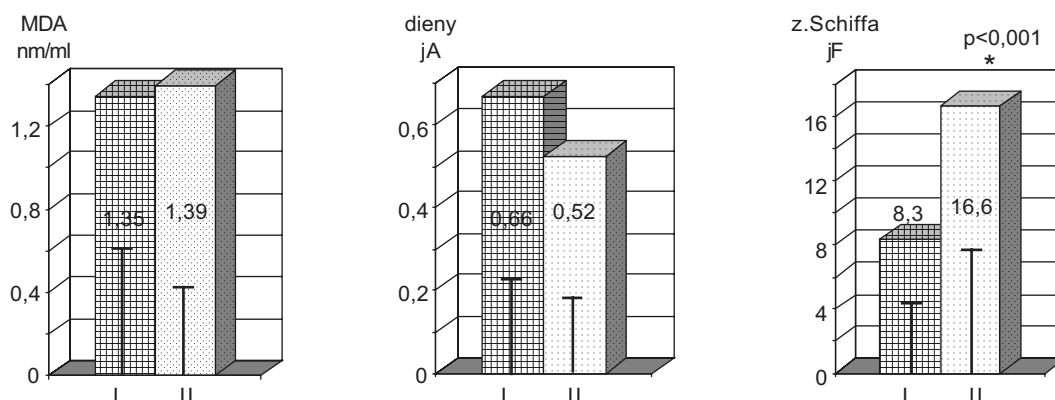


Ryc. 3. Stężenie i odchylenie standardowe witaminy E w osoczu (os) i krwinkach czerwonych (er) u dzieci z alergią pokarmową

Stężenie witaminy E (jednej z kilku witamin antyoksydacyjnych) wykazywało tendencję do niższych wartości tylko w krwinkach czerwonych przed wprowadzeniem diety hypoalergicznego, osiągając po 3 miesiącach wartości podobne jak u dzieci zdrowych (ryc. 3). Indywidualna analiza wyników wykazała, że przed wprowadzeniem diety hypoalergicznego u ponad 60% dzieci chorych, w porównaniu z dziećmi zdrowymi, stwierdzono niskie stężenie selenu oraz obniżoną aktywność GSH-Px w osoczu. Rzadziej (u ponad 40%) niedobory dotyczyły stężenia selenu i obniżonej aktywności GSH-Px w krwinkach czerwonych. Obserwowano również niedobory stężenia witaminy E, częściej w krwinkach czerwonych (u około 30%), mniejsze w osoczu (u 15% dzieci).

Produkty peroksydacji lipidów

Badane stężenia produktów peroksydacji lipidów zachowywały się niejednolicie. Stężenie MDA nie różniły się w I i II badaniu, natomiast sprzężone dieny były wyższe przed wprowadzeniem diety hypoalergicznego i obniżały się pod wpływem jej stosowania. Różnice te nie były istotne statystycznie. Odmienne obserwacje dotyczyły zasad Schiffa, których stężenie wzrastało w miarę stosowania diety i w II badaniu były dwukrotnie wyższe niż w I (różnica istotna statystycznie) (ryc. 4).



Ryc. 4. Wartości stężeń i odchylenia standardowe MDA, sprzężonych dienów i zasad Schiffa u dzieci z alergią pokarmową

W pracy oceniono również zależność pomiędzy badanymi składnikami bariery antyoksydacyjnej: Se, GSH-Px, Vit. E, a produktami peroksydacji lipidów: MDA, sprzężonymi dienami, zasadami Schiffa. Na podkreślenie zasługuje zależność pomiędzy Se a GSH-Px, zarówno w badaniu I, jak i w II badaniu. Niskim stężeniom Se towarzyszyła obniżona aktywność GSH-Px, a przy wzrostach stężenia pierwiastka występowała większa aktywność selenoenzymu. Wśród produktów peroksydacji lipidów znaleziono zależność pomiędzy MDA i sprzężonymi dienami, która uwidoczniła się przed wprowadzeniem diety eliminacyjnej: wysokim stężeniem MDA towarzyszył wzrost stężenia dienów. Wyniki przedstawia tabela II.

Tabela II. Korelacja składników bariery antyoksydacyjnej i produktów peroksydacji lipidów

Parametry analizowane	ρ	Istotność statystyczna
Se I Se II	0,530	P<0,05
Se I GSH-Px I	0,659	P<0,001
Se II GSH-Px II	0,505	P<0,05
GSH-Px I GSH-Px II	0,523	P<0,05
MDA I Dieny I	0,502	P<0,05
Vit. E II z. Schiffa II	0,723	P<0,001
Se II MDA II	0,480	P<0,05

OMÓWIENIE

Reaktywne związki tlenu (RZT), powstające w procesie niepełnej redukcji tlenu stanowią wysoce reaktywne cząsteczki, które, uszkadzając makromolekuły komórkowe, zmieniają ich strukturę i funkcję [4]. Jednakże zasięg uszkodzenia tlenowego zależy od równowagi między ilością wolnych rodników, a wydajnością systemów przeciwutleniających obecnych w komórkach i płynach ustrojowych [14].

Uzyskane przez nas wyniki badań wskazują na zaburzenia bariery antyoksydacyjnej u dzieci z alergią pokarmową, wyrażające się niskim stężeniem selenu oraz

obniżoną aktywnością peroksydazy glutationowej (GSH-Px). Selen jest związany z peroksydazą glutationową, tak więc jego niedobór może być przyczyną obniżonej aktywności enzymu. Podobne spostrzeżenia mieli inni autorzy [15].

Mechanizmy enzymatyczne należą do istotnych wewnątrzkomórkowych mechanizmów ochronnych przeciwko aktywnym związkom tlenu, powstającym w przebiegu reakcji wolnorodnikowych [15]. GSH-Px rozkłada nadtlenek wodoru i przeprowadza nadtlenki lipidów do nieszkodliwych cząsteczek, tj. do wody i odpowiednich alkoholi. Obniżona jej aktywność powoduje, że zdolność organizmu do obrony przed uszkodzeniem komórek przez RZT u dzieci z alergią może być mniejsza w porównaniu z dziećmi zdrowymi.

Witamina E jest ważnym antyoksydantem wewnątrzkomórkowym działającym poprzez hamowanie peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zawartych w fosfolipidach błon komórkowych i organelli komórkowych, które stabilizuje [16]. Niedobór Vit. E powoduje wzrost procesów peroksydacyjnych, natomiast obniżona aktywność GSH-Px jest przyczyną zaburzeń metabolizmu tlenu w komórkach, a szczególnie w krwinkach czerwonych, selen i witamina E wykazują zbliżone działania antyoksydacyjne, choć na innym szlaku metabolizmu.

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że u dzieci z alergią pokarmową występowały niedobory witaminy E w krwinkach czerwonych, które wyrównywały się po wprowadzeniu diety hypoalergicznnej i poprawie odżywienia. Niskie stężenie witaminy E w krwinkach czerwonych może świadczyć o jej przewlekłym niedoborze. Natomiast dysproporcja pomiędzy wysokim (podobnym jak u dzieci zdrowych) stężeniem w osoczu przy niższych zawartościach w krwinkach czerwonych sugeruje także zaburzenie w dystrybucji tej ważnej dla procesów antyoksydacyjnych witaminy. Niedobory tego składnika bariery antyoksydacyjnej wykazywano również przy okazji badań nad patogenezą innych jednostek chorobowych o podłożu immunologiczno-zapalnym [14].

Oceniając znaczenie stosowania diety hypoalergicznego należy podkreślić, że miała ona korzystny wpływ na poprawę odżywienia i zmniejszenie się niedoborów badanych składników bariery antyoksydacyjnej.

Wyniki naszych badań wydają się potwierdzać istnienie zaburzeń równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników tlenowych a wydolnością bariery antyoksydacyjnej w przebiegu objawowej i niekontrolowanej alergii pokarmowej u dzieci. Poza niedoborami omawianych Se, GSH-Px i witaminy E świadczy o tym również stężenie sprzężonych dienów, które były wysokie w I badaniu, a obniżyły się po 3 miesiącach od chwili wprowadzenia diety, tj. w okresie kiedy niedobory składników bariery antyoksydacyjnej wykazywały tendencje wyrównawcze. Trudne do wyjaśnienia jest narastanie stężenia zasad Schiffa. Być może, po 3 miesiącach stosowania diety, mimo ustąpienia objawów klinicznych, zmiany naprawcze w błonie śluzowej jelita

nie są jeszcze zakończone i trwa samopodtrzymujący się proces peroksydacji lipidów. Podobne zachowanie się stężenia zasad Schiffa u dzieci z chorobą oparzeniową obserwował Jabłoński; wartości wzrastały w czasie gojenia się ran [17].

Nasze badania wykazały, że u dzieci z alergią pokarmową w okresie objawowym występują niedobory enzymatycznych i nieenzymatycznych składników bariery antyoksydacyjnej. Dieta hypoalergiczna, prowadząca do poprawy odżywienia dzieci wpływa na zmniejszanie się tych niedoborów. Po 3 miesiącach stosowania diety u dzieci z alergią pokarmową obserwowano poprawę kliniczną, natomiast występowały nadal zaburzenia metaboliczne. Stężenia sprzężonych dienów zmniejszyły się pod wpływem diety, natomiast odwrotną tendencję obserwowano w zachowaniu się zasad Schiffa, których stężenia wzrastały.

Piśmiennictwo

1. Polska Grupa Ekspertów ds. Alergii i nietolerancji pokarmowej PTA. Med Czasop Zjazd Unimed 1997: 1.
2. Kaczmarek M, Korol D, Cudowska B. Terapia 1998; 5: 3-6.
3. Burks AW, Sampson HA. Diagnostic approaches to the patient with suspected food allergies. J Pediatr 1992; 121: 46-71.
4. Demling R i wsp. Multiple-organ dysfunction in the surgical patient: pathophysiology, prevention and treatment. Curr Probl Surg 1993; 30: 374-413.
5. Sokol RJ, Hoffenberg BJ. Antioxidants in pediatric gastrointestinal disease. Pediatr Clin North Am 1996; 43: 471-88.
6. Zapalski S, Chęciński P. Kliniczne aspekty niedokrwienia i reperfuzyji o-medica press. Bielsko Biała 1998: 24-30.
7. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. Surgery 1983; 94: 415-422.
8. Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1996; 31 (suppl.216): 149-159.
9. 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: 1235-1241.
10. Halliwell B, Chirico S i wsp. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57 (suppl.5): 715-724.
11. Shvedova AA, Kisin ER, Kagan VE i wsp. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidants in lungs of guinea pigs following an allergic pulmonary response. Toxicol Appl Pharmacol 1995; 132: 72-81.
12. Mates JM, Segura JM, Perez-Gomez C i wsp. Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. Blood Cells Mol Dis 1999; 25: 103-109.
13. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* antioxidant. Ann NY Acad Sci 1989; 7: 570-573.
14. Skłodowska M. Antyoksydacyjna obrona organizmu na podstawie enzymatycznych i nieenzymatycznych składników krwi. Łódź, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego 1977: 15-213.
15. Malewski W, Krauss H, Ignyś J, Krawczyński M. Stres oksydacyjny i czynniki antyoksydacyjne w patologii gastroenterologicznej. Ped Prak 1995; 33: 253-258.
16. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. Am J Clin Nutr 1991; 53: 1050-1055.
17. Jabłoński J. Zmiany stężenia produktów peroksydacji lipidów w surowicy krwi u dzieci w przebiegu choroby oparzeniowej – Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych. Łódź, 1997.

The influence of treatment with hypoallergic diet on antioxidative barrier and lipid peroxidation products in children with cow's milk allergy

KALINA POKUSZYŃSKA, HENRYKA BRÓZIK, JANUSZ PIOTR SIKORA

Summary

The aim of the study was the evaluation of selected components of antioxidative barrier and lipid peroxidation products in children with cow's milk protein allergy before hypoallergic diet and after three months of its application. Two groups of 21 children aged 2-25 months were studied. In the first group the serum concentrations of selenium (Se), vitamin E (vit. E) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity were evaluated with spectrofluorimetric and spectrophotometric methods. The concentrations of conjugated dienes, malonic dialdehyde (MDA) and Schiff bases were determined in the second group. Before the hypoallergic diet, deficiencies of Se and the decreased activity of GSH-Px were observed in more than a half of children while in approximately one-third of patients we noticed deficiency of Vit. E. The incidence and the degree of deficiencies decreased after 3 months of hypoallergic diet. The highest concentrations of MDA and conjugated dienes were observed before introducing the diet, they decreased after diet application. However, the concentration of Schiff bases after the study period was increased. In spite of the clinical improvement metabolic abnormalities were still observed after 3 months of application of hypoallergic diet. Our study demonstrated that successful treatment of food allergy with hypoallergic diet is associated with normalization of abnormal parameters of antioxidative barrier in allergic children.

Alergia Astma Immunol 2000; 5(1): 68-73

Key words: cow's milk protein allergy, hypoallergic diet, selenium, glutathione peroxidase, vitamin E, lipid peroxidation products