

Leptyna i neuropeptyd Y w surowicy dzieci chorych na astmę oskrzelową o lekkim przebiegu

Serum level of leptine and neuropeptide Y in children with mild asthma

¹⁾ Zbigniew Doniec, Krystyna Pierzchała – Koziec, ²⁾ Waldemar Tomalak, Ryszard Kurzawa

Z Kliniki Alergologii i Pneumonologii, Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Oddział w Rabce-Zdroju,

Kierownik: prof.dr hab.med. R. Kurzawa

¹⁾ Z Katedry Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. J. Rząsa

²⁾ Z Zakładu Fizjologii i Patologii Układu Oddechowego, Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Oddział w Rabce-Zdroju

Kierownik: doc. dr hab.n.techn. W. Tomalak

Summary: Leptin (LEP) and neuropeptide Y (NPY) are involved in the maintenance of energy balance and create regulatory loops on central and peripheral stage between neuropeptides and hormones, additionally regulated by other physiological stimuli. According to data confirming tendency to overweight and obesity in asthmatic children we have examined the influence of mild asthma on neurohormonal balance. 43 children, aged 7-17 years, including 27 steroid naive mild asthmatic children aged (mean±SD)12.3±2.6 years and 16 age matched healthy children participated in the study. Serum LEP and NPY levels were measured radioimmunologically (RIA). Serum leptin level in asthmatic children was 2.84±2.1ng/ml and did not differ to that of healthy children -3.49±1.65 ng/ml, both in boys (p=0,85) and girls (0,49). Similarly, we did not observe any differences between NPY levels in asthmatic (113,5±31,1 μmol/ml) and healthy (98.5±21.9 μmol/ml (p=0,17)), irrespective to sex. Significant correlations between leptin levels and body mass index (BMI) in asthmatics (r=0,62, p=0,01) and healthy children (r=0,56, p=0,02) were observed. We conclude, that mild asthma in children seems not to affect neurohormonal regulation of energy balance.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72, 9-13

Key words: asthma, children, leptin, neuropeptide Y

Wstęp

Astma dziecięca jest przewlekłą chorobą zapalną układu oddechowego w przebiegu której występują okresy zaostrzenia objawów oraz remisji klinicznej o różnym czasie trwania (24). W ostatnich latach uwagę zwracają doniesienia wskazujące na wzrost częstości występowania nadwagi i otyłości wśród chorujących na astmę, również wśród dzieci (16,18). Nie są znane przyczyny tego zjawiska, a szczególnie zachowanie się mechanizmów regulujących równowagę energetyczną. W warunkach fizjologicznych bilans energetyczny i masa tkanki tłuszczowej utrzymywane są na stałym poziomie dzięki integracji mechanizmów kontroli opartej na współdziałaniu układu nerwowego i hormonalnego (11,20). Neuropeptyd Y (NPY), syntetyzowany przez neurony wielu obszarów mózgu a szczególnie podwzgórze zwiększa przyjmowanie pokarmów, zwłaszcza bogatych w węglowodany (15). Leptyna, białko kodowane przez obese gen (ob) i wytwarzane przez tkankę tłuszczową jest integralną częścią sprzężenia zwrotnego informującego ośrodkowy układ nerwowy (OUN) o stanie zasobów tłuszczowych (28). Hormon ten docierając do receptorów

podwzgórze hamuje syntezę i uwalnianie NPY, zmniejszając spożycie pokarmów (20,26). Leptyna zwiększa również wydatek energetyczny i procesy termogenezy a jej stężenie w surowicy krwi koreluje z ilością tkanki tłuszczowej w organizmie oraz wskaźnikiem wagowo-wzrostowym (Body Mass Index – BMI) (16,26). W ostatnich latach zwraca się również uwagę na możliwy udział leptyny w procesie zapalnym, wykazano m.in., że TNF-α zwiększa jej wytwarzanie w tkance tłuszczowej (12,21). Jak dotychczas ocena wskaźników regulacji neurohormonalnej bilansu energetycznego w astmie oskrzelowej u dzieci nie była przedmiotem szczegółowych badań, dlatego też istotne wydawało się podjęcie tego zagadnienia.

Cel pracy:

Celem pracy była ocena zachowania się leptyny i neuropeptydu Y w surowicy krwi u dzieci z astmą oskrzelową przewlekłą o lekkim przebiegu.

Material i metody

Badaniem objęto 43 dzieci w wieku 7-17 lat, w tym 27 (średnia \pm SD 12.3 \pm 2.6 lat) chorujących na astmę oskrzelową o lekkim przebiegu, oraz 16 (11,9 \pm 2,9 lat, $p=0,27$) dzieci zdrowych. Astmę oskrzelową i jej stopień ciężkości rozpoznano zgodnie z kryteriami GINA 2002 a dzieci były leczone preparatami kromoglikanów i doraźnie beta-2-mietykami (24). Próbkę krwi pobierano rano o tej samej porze (pomiędzy 8.00 a 9.00, dopuszczalna 1 godzina różnicy), u dziewcząt miesiączkujących w pierwszej połowie cyklu. Po odwirowaniu przez 10 minut, 4000 rpm próbki surowicy były zamrażane i przechowywane do czasu oznaczenia w temp. – 80°C. Stężenia leptyny i neuropeptydu Y oznaczano metodą radioimmunologiczną z użyciem gotowych zestawów odczynników (Linco Research Inc., St.Louis, MO, U.S.A., Euro-Diagnostica AB, Malmö, Sweden) (25, 29). Do pomiarów czynności układu oddechowego u dzieci zastosowano spirometr LungTest 1000 (Mes Sp.z o.o., Polska) a uzyskane wartości wyrażano jako procent wartości należnej (27). Pomiarów wskaźników antropometrycznych (wzrost, masa ciała) były podstawą do obliczania wskaźników wzrostowo – wagowych (BMI) badanych dzieci (10). Charakterystykę kliniczną oraz wartości spirometryczne badanych dzieci przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka badanej grupy
Table I. Characteristics of study group

	Astmą / Asthma	Zdrowe / Healthy	p
Liczba / Number	27	16	
Chłopcy/dziewczynki / Boys/girls	17/10	7/9	
Wiek /Age (lata / years)	11.9 \pm 2.9	12.7 \pm 4.4	$p=0.27$
Wzrost / Heigh (cm)	145 \pm 16	148 \pm 16	$p=0.30$
Masa / Weight (kg)	38.3 \pm 13.3	43.6 \pm 14.8	$p=0.12$
BMI (razem/total) (kg / m ²)	17,6 \pm 2,9	19,4 \pm 3,8	$p=0,06$
Chłopcy/dziewczeta / Boys/girls	18,2 \pm 2,9/ 16,4 \pm 2,7	18,4 \pm 3,2/ 20 \pm 4,2	$p=0,32$ / $p=0,01$
FVC	94 \pm 8	99 \pm 6	$p=0.04$
FEV ₁	90 \pm 8	100 \pm 8	$p=0,001$
MEF ₅₀	85 \pm 18	115 \pm 16	$p=0.012$

Wartości średnie \pm SD; FEV₁, FVC, MEF₅₀ wyrażone jako % wartości należnej (27).

Values : mean \pm SD.

FEV₁, FVC, MEF₅₀ expressed as % of reference values (27).

p – statistical significance of differences between groups by t-test for unpaired samples.

Do analizy danych stosowano test t- studenta dla prób niepowiązanych. Dla oceny zależności pomiędzy zmiennymi używano zastosowano regresję liniową. Wszystkie obliczenia wykonano z użyciem pakietu kalkulacyjnego Statistica® v5.1.

Protokół badania uzyskał akceptację lokalnej komisji etycznej, badanie przeprowadzono po uzyskaniu pisemnej zgody rodziców /opiekunów dziecka, oraz o ile było to możliwe również samego dziecka.

Wyniki

Stężenie leptyny w surowicy dzieci chorujących na astmę wynosiło (średnia \pm SD) 2,84 \pm 2,1 ng/ml i nie różniło się istotnie od wartości u dzieci zdrowych – 3,49 \pm 1,65 ng/ml ($p=0,16$), nie wykazano różnic u chłopców ($p=0,85$) a także między dziewczętami ($p=0,49$). Chociaż średnia wartość stężenia leptyny u dziewcząt była prawie 1,5 razy wyższa w porównaniu z chłopcami (3,53 ng/ml vs 2,5 ng/ml u chorych i 4,12 ng/ml vs 2,68 ng/ml u zdrowych) różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej ($p=0,26$, $p=0,08$). Wartość stężenia NPY nie różniła się istotnie między badanymi grupami i wynosiły u dzieci chorych 113,5 \pm 31,1 μ mol/ml, zaś w grupie zdrowych 98.5 \pm 21.9 μ mol/ml ($p=0,17$), różnic nie wykazano zarówno wśród chłopców ($p=0,31$) jak i wśród dziewcząt ($p=0,85$). Różnice stężeń NPY pomiędzy chłopcami i dziewczętami zarówno u chorych na astmę ($p=0,32$) jak i u dzieci zdrowych ($p=0,71$) nie były istotne (tab. II).

Stężenie leptyny nie wykazywało zależności od wieku dziecka zarówno u chłopców ($r=0,13$, $p=0,6$) jak i dziewcząt ($r=0,44$, $p=0,23$) chorych na astmę, podobnie jak u dzieci zdrowych (chłopcy $r=0,37$, $p=0,41$; dziewczęta $r=0,25$, $p=0,5$). Nie stwierdzono również istotnych korelacji z wartościami wskaźników czynności układu oddechowego u chorych (FEV₁: $r=0,32$; FVC: $r=0,11$ i MEF₅₀ : $r=0,18$), ($p>0,05$) i dzieci zdrowych (FEV₁: $r=0,13$; FVC: $r=0,06$ i MEF₅₀ : $r=0,22$) ($p>0,05$). Stężenie leptyny było istotnie skorelowane z BMI i to zarówno w grupie dzieci z astmą oskrzelową ($r=0,62$, $p=0,01$). jak i dzieci zdrowych ($r=0,56$, $p=0,02$), a zależność ta występowała u obu płci (ryc. 1).

Nie stwierdzono zależności pomiędzy NPY a wiekiem badanych (astma: chłopcy- $r=0,43$, $p=0,19$, dziewczęta $r=0,34$, $p=0,28$, dzieci zdrowe: chłopcy $r=0,39$, $p=0,52$, dziewczęta $r=0,21$, $p=0,35$). Stężenie NPY nie wykazywało zależności od wskaźników czynności układu oddechowego (astma: FEV₁ $r=0,14$, FVC $r=0,43$, MEF₅₀ $r=0,35$; zdrowi: FEV₁ $r=0,21$, FVC $r=0,07$, MEF₅₀ $r=0,14$),

Tabela II. Stężenia leptyny i NPY u dzieci chorych na astmę i dzieci zdrowych
Table II. Leptin and NPY levels in asthmatic and healthy children

Badane grupy Examined groups		Astma Asthma	Zdrowi Healthy	p (astma vs zdrowi) (asthma vs healthy)
Leptyna / Leptin	Razem / Total	2,84±2,1	3,49±1,65	p=0,16
	Chłopcy/Boys	2,5±2,25	2,68±1,53	p=0,85
	Dziewczeta/Girls	3,53±1,9 p=0,26*	4,12±1,52 p=0,08*	p=0,49
NPY	Razem / Total	113,5±31,1	98,5±21,9	p=0,17
	Chłopcy/Boys	119,4±29,9	92,9±37,2	p=0,31
	Dziewczeta/Girls	97,7±34,4 p=0,32*	102,2±14,7 p=0,71*	p=0,85

Wartości: średnie ±SD. leptyna: ng/ml; NPY: μmol/ml; p- różnice między grupami, *istotność różnic pomiędzy chłopcami a dziewczętami.

Values: mean ± SD. Leptin : ng/ml; NPY: μmol/ml; p- statistical significance of differences between groups by t-test for unpaired samples. *significance of differences between boys and girls.

Rycina 1. Zależność między stężeniem leptyny a BMI

Figure 1. Relation between leptine concentration and BMI

($p > 0,05$). Podobnie, niezależnie od płci, nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem NPY a BMI, zarówno u dzieci z astmą oskrzelową ($r = 0,03$, $p = 0,12$), jak i dzieci zdrowych ($r = 0,30$, $p = 0,63$). Nie stwierdzono również zależności pomiędzy stężeniami leptyny a NPY ($r = -0,12$, $p = 0,56$).

Dyskusja

Średnie stężenia leptyny w surowicy krwi u dzieci chorujących na astmę o lekkim przebiegu ($2,84 \pm 2,1$ ng/ml) i dzieci zdrowych ($3,49 \pm 1,65$ ng/ml) nie różniły się istotnie między sobą a ich wartości mieściły się w zakresie normy (poniżej 5ng/ml) dla dzieci z BMI < 23 kg/m² (10). Podobne stężenia leptyny u dzieci chorych na astmę o łagodnym i umiarko-

wanym przebiegu wykazali Heuck i Wolthers (6). Również stężenie leptyny u dzieci zdrowych nie odbiegało od wartości stwierdzonych przez innych autorów, którzy wskazują również na ich zależność od wieku badanych (1,7). Demerath i wsp. analizując poziomy surowiczej leptyny u dziewcząt i chłopców stwierdził ponadto, że już od 8 roku życia poziom leptyny był wyższy u dziewcząt w porównaniu z chłopcami (2). Nagy i wsp. w badaniach przekrojowych u dzieci przed i po okresie dojrzewania nie potwierdzili omawianych wyżej zależności (17). Podobne wyniki uzyskaliśmy w badaniu własnym, chociaż wykazane wyższe wartości leptyny u dziewcząt nie osiągnęły istotności statystycznej prawdopodobnie z powodu wysokiej międzyosobniczej zmienności poziomów leptyny. Widoczna u dziewcząt tendencja do wyższych wartości leptyny występowała niezależnie od tego, iż u dziewcząt chorych na astmę stwierdzono istotnie niższy BMI w porównaniu z dziewczętami zdrowymi ($16,4 \pm 2,7$ vs $20 \pm 4,2$, $p = 0,01$).

Dodatnią korelację pomiędzy stężeniem leptyny w surowicy krwi a BMI stwierdza się zarówno u dzieci z normalną wagą jak i dzieci otyłych (5,7). W badaniu własnym również wykazano podobną korelację u obu płci,

i to zarówno w grupie dzieci chorujących na astmę jak i u dzieci zdrowych.

Na stężenie leptyny mogą wpływać również inne czynniki. U kobiet poziom leptyny zmienia się również w czasie cyklu miesięcznego i jest niższy w fazie folikularnej cyklu, wzrasta zaś w jego fazie lutealnej (14) Potwierdzono również dobową zmienność hormonu wykazując wyższe wartości pomiędzy północą a wczesnym porankiem a najniższe pomiędzy wczesnym popołudniem i północą (19). Aby uniknąć wpływu omawianych czynników w naszym badaniu próbki krwi pobierano w godzinach porannych, ponadto u dziewczynek miesiączkujących pobierano badania pomiędzy 1-14 dniem cyklu.

Rola leptyny w patofizjologii astmy nie jest poznana, podobnie jak jej związek z przewlekłym

zapaleniem (12,16) Badania doświadczalne potwierdziły, że leptyna reguluje proliferację limfocytów T, zwiększając produkcję IL-2, IFN-gamma i TNF-alfa, hamując wytwarzanie IL-4, IL-5 i IL-10 (13). Badania epidemiologiczne Sin'a i Man'a przeprowadzone w grupie 2808 kobiet i mężczyzn wskazały, że upośledzenie czynności układu oddechowego wiąże się z podwyższeniem stężenia leptyny w surowicy krwi (22). W przedstawianym badaniu nie wykazaliśmy związku pomiędzy czynnością układu oddechowego, istotnie obniżoną u dzieci chorych na astmę w porównaniu ze zdrowymi, a stężeniem leptyny w surowicy krwi. Może to wynikać zarówno z ograniczonej liczby dzieci uczestniczących w badaniu a także z faktu, że chorzy na astmę nie wykazywali głębokich i utrwalonych zaburzeń czynności układu oddechowego.

Innym czynnikiem mogącym wpływać na zachowanie się leptyny jest stosowane leczenie. Badania przeprowadzone na hodowanych dojrzałych adipocytach wskazują, że glikokortykosteroidy bezpośrednio stymulują syntezę i uwalnianie leptyny z tkanki tłuszczowej, wykazano także podwyższony poziom leptyny u chorych z zespołem Cushinga (9,23). Lekki przebieg choroby i fakt, że dzieci nie stosowały preparatów glikokortykosteroidów wziewnych (GKSw) i/lub systemowych pozwolił na eliminację potencjalnego wpływu leczenia GKS na wytwarzanie i surowicze stężenie leptyny. W naszych poprzednich badaniach nie potwierdziliśmy wpływu GKSw na stężenie leptyny w surowicy krwi, trzeba jednak zaznaczyć, że pojedyncze dotychczas badania nie obejmują szerokiego zakresu preparatów i ich dawek spotykanych w praktyce klinicznej (3,6).

Badania regulacji bilansu energetycznego wskazują na obecność sprzężeń zwrotnych między neu-

ropeptydami i hormonami na poziomie ośrodkowym i obwodowym, a neurony jąder podwzgórza integrują te aktywności (11,15). W naszym badaniu poziom NPY w grupie dzieci z astmą był porównywalny z poziomem u dzieci zdrowych. W piśmiennictwie nie znajdujemy odniesienia do poziomów NPY u dzieci z astmą oskrzelową podobnie jak jego udziału w procesie zapalnym. Należy jednak pokreślić, że uzyskane wartości NPY u dzieci zdrowych nie różniły się istotnie od wartości znajdujących przez innych autorów (4,26). Kogner i wsp. w grupie 112 zdrowych dzieci wykazali spadek stężenie NPY zależny od wieku, wyniki badań własnych nie potwierdzają podobnej tendencji (8).

Podsumowując, wydaje się, że lekki przebieg astmy oskrzelowej nie wiąże się z zaburzeniami regulacji bilansu energetycznego u dzieci. Biorąc jednak pod uwagę możliwy udział leptyny w regulacji procesu zapalnego, a także wpływ stosowanego leczenia p-zapalnego, interesujące wydaje się określenie tych zależności w astmie o cięższym przebiegu, a szczególnie w tych postaciach astmy, w których dochodzi do częstego stosowania glikokortykosteroidów systemowych.

Wnioski

1. Stężenia leptyny i neuropeptydu Y w surowicy dzieci chorujących na astmę nie różnią się istotnie od wartości u dzieci zdrowych.
2. Astma o lekkim przebiegu nie wydaje się wykazywać istotnego wpływu na neurohormonalną regulację równowagi energetycznej u dzieci.

Piśmiennictwo:

1. Arslanian S, Suprasongsin C, Kalhan SC, i wsp.: Plasma leptin in children: relationship to puberty, gender, body composition, insulin sensitivity, and energy expenditure. *Metabolism* 1998 47:309-12
2. Demerath M, Di Vetta V, Giusti V i wsp.: Serum leptin concentration, body composition and gonadal hormones during puberty. *Int J Obes* 1999;23:678-685.
3. Doniec Z, Pierzchała- Koziec K, Tomalak W, Kurzawa R.: The influence of powder budesonide (Pulmicort Turbuhaler®) on serum leptin level and lipid profile in asthmatic children. *Intern Rev Allergol Clin Immunol*, 2004; 1: 10-14.
4. Dryden S, Frankish H, Wang Q, Williams G.: Neuropeptide Y and energy balance: one way ahead for the treatment of obesity? *Eur J Clin Invest* 1994 24:293-308
5. Ellis KJ, Nicolson M: Leptin levels and body fatness in children: effects of gender, ethnicity, and sexual development. *Pediatr Res* 1997 42:484-8
6. Heuck C, Wolthers OD.: Serum leptin in children with asthma treated with inhaled budesonide. *Respir Med*. 1999; 93 :268-271.
7. Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, i wsp.: Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85:2509-2518.
8. Kogner P, Björk O, Theodorsson E.: Plasma neuropeptide Y in healthy children: influence of age, anaesthesia and the establishment of an age-adjusted reference interval. *Acta Paediatr* 1994, 83:423-7
9. Leal – Cerro A, Considine RV, Peino R, i wsp.: Serum immunoreactive – leptin levels are increased in patients with Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* 1996;28:711-713.
10. Lewrey GH.: Growth and development of children (eight edit) Year Book Publ.; Chicago 1996.
11. Levin BE, Routh VH.: Role of brain in energy balance and obesity. *Am J Physiol* 1996;271: 491- 500.

12. Lofreda S., Yang A.Q., Lin H.Z. i wsp.: Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998, 12, 57-65.
13. Lord GM, Matareses G, Howard JK i wsp.: Leptin modulates the T- cell immune response and reverse starvation induced immunosuppression. *Nature* 1998;394:897-910.
14. Lukaszuk K, Liss J, Kusiak F.: Serum leptin concentration increase during luteal phase in healthy pre- menopausal women. *Horm Metab Res* 1998;30: 172-174.
15. Magni P.: Hormonal control of the neuropeptide Y system. *Curr Protein Peptide Sci* 2003;4:45-57.
16. von Mutius E, Schwartz J, Neas LM, Dockery D, Weiss ST: Relation of body mass index to asthma and atopy in children: the National Health and Nutrition Examination Study III. *Thorax* 2001 ; 56:835-838.
17. Nagy TR, Gover BA, Trowbridge CA, i wsp.: Effects of gender, ethnicity, body composition, and fat distribution on serum leptin concentrations in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2148-2152
18. Nathell L, Jensen I, Larsson K.: High prevalence of obesity in asthmatic patients on sick leave. *Respir Med* 2002; 96: 642-650.
19. Pambo M, Herrera – Justiniani E, Considine RV i wsp.: Nocturnal rise of leptin in normal prepubertal and pubertal children and in patients with perinatal stalk transection syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2751-2754.
20. Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H.: Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:623-637.
21. Schols A.M., Creutzberg E.C., Buurman W.A.: Plasma leptin is related to proinflammatory status and dietary intake in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1220-1226.
22. Sin D.D., Man S.F.P.: Impaired lung function and serum leptin in men and women with normal body weight : a population based study. *Thorax* 2003;58:695-698.
23. Sliker LJ , Sloop KW, Surface PL i wsp.: Regulation of expression of ob. mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996;271:5304-5310.
24. Światowa strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy. Raport NHLBI/WHO. *Med. Prakt. , Wyd. specj.* 2002/6, 1-181.
25. Theodorsson –Nerheim E, Hemse'n A Lundberg JM.: Radioimmunoassay for neuropeptide Y (NPY): chromatographic characterization of immunoreactivity in plasma and tissue extracts. *Sand J Clin Lab Invest* 1985;45:355-361.
26. Thornburn AW, Peoietto J.: Neuropeptides, the hypothalamus and obesity : insights into the central control of body weight . *Pathology* 1998;30:229-236.
27. Willim G., Hałuszka J., Tomalak W., Kapustianyk I.: Komputerowo wspomaganą oceną stanu czynności układu oddechowego. Instytut Matki i Dziecka, Rabka 1990, 1-31.
28. Zhang Y, Proenca R, Maffei M i wsp.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue . *Nature* 1994; 372: 425–431.
29. Zhouguin M, Gingerich RL, Santiago JV i wsp.: Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 1996;42: 942-946.

Data wysłania pracy: 29.10.2003,
Klinika Alergologii i Pneumonologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Oddział w Rabce- Zdroju
34-700 Rabka- Zdrój, ul. Prof. Jana Rudnika 3b
zdoniec@zpigichp.edu.pl