

ZMIANY AKTYWNOŚCI WYKŁADNIKÓW METABOLIZMU TLENOWEGO U DZIECI Z WSTECZNYM ODPŁYWEM ŻOŁĄDKOWO-PRZEŁYKOWYM NA TLE ZMIAN W BŁONIE ŚLIZOWEJ PRZEŁYKU

CHANGES IN OXIDATIVE METABOLISM MARKERS IN CHILDREN WITH GASTROESOPHAGEAL REFLUX WITH CHANGES IN ESOPHAGEAL MUCOSAL MEMBRANE

Małgorzata Modzelewska-Hołyńska, Aneta Krogulska, Krystyna Wąsowska-Królikowska

Klinika Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej
Instytutu Pediatrii UM w Łodzi

Streszczenie: Znaczna częstość występowania patologicznego odpływu żołądkowo-przełykowego u dzieci oraz związane z tym powikłania i problemy terapeutyczne dają podstawę do poszerzenia badań w tej dziedzinie. Celem pracy było zwrócenie uwagi na udział reaktywnych form tlenu oraz zmiany w zakresie wykładników bariery antyoksydacyjnej w patofizjologii rozwoju stanu zapalnego błony śluzowej przełyku w przebiegu choroby refluksowej u dzieci. Do badań włączono 50 dzieci z rozpoznaną chorobą refluksową, które podzielono na: grupę I – bez zapalenia błony śluzowej przełyku i II - z współistnieniem histologicznych wykładników stanu zapalnego w obrębie błony śluzowej przełyku. Wysokie stężenia cytokin prozapalnych potwierdziły istnienie stanu zapalnego przełyku obserwowanego w badaniu endoskopowym i w ocenie histopatologicznej. Stwierdzono, że występowaniu stanu zapalnego błony śluzowej przełyku towarzyszy wyższa aktywność potencjałów oksydacyjnych osocza i obniżenie aktywności wykładników bariery antyoksydacyjnej.

Słowa kluczowe: choroba refluksowa przełyku, wolne rodniki tlenu, bariera antyoksydacyjna

Abstract: Significantly high occurrence of gastroesophageal reflux in children and related complications and therapeutic management problems encourage further investigations. The aim of the study was to present the reactive oxygen species and antioxidative barrier markers in esophageal mucosa inflammation in the course of reflux disease in children. Fifty children with gastroesophageal reflux were included in this study. They were divided into 2 groups: I - without inflammatory changes in the esophageal mucosa and II - with esophagitis. High levels of proinflammatory cytokines confirmed the state of inflammation recorded during endoscopy and by mucosal specimen histopathology. It was concluded that higher activity of oxidative potentials and decrease in antioxidative barrier markers accompany esophageal mucosa inflammation.

Key words: gastroesophageal reflux, oxygen free radicals, antioxidative barrier

Wstęp

Udowodniono, że nadmierna generacja reaktywnych form tlenu oraz niedostateczna aktywność antyoksydacyjnych mechanizmów ustrojowych odgrywa rolę w patologii

coraz większej liczby chorób, a wśród nich z zakresu przewodu pokarmowego. Wsteczny odpływ żołądkowo-przełykowy jest przyczyną wielu dolegliwości u noworodków, niemowląt i dzieci starszych, natomiast skuteczność jego leczenia jest wciąż ograniczona (1-5). Zmusza to do poszukiwa-

nia nowszych metod diagnostycznych i terapeutycznych. U podstaw rozwoju stanu zapalnego w obrębie błony śluzowej przełyku w przebiegu wstępnego odpływu żołądkowo-przełykowego dopatruje się wzmożonej migracji neutrofilów. Granulocyty obojętnochłonne, wzbudzone przez czynniki toksyczne, biorą udział w generowaniu molekularnych mediatorów reakcji zapalnej (6). Wśród nich na szczególną uwagę zasługują cytokiny. Uważa się, że są one wykładnikiem procesów zapalnych na poziomie ultrastrukturalnym i stanowią wczesny element w łańcuchu procesów zachodzących w zapaleniu (7). Powodują one aktywację wybuchu oddechowego w neutrofilach, efektem czego jest generowanie wysoce reaktywnych wolnych rodników tlenowych (WRT). WRT uwalniane w nadmiarze, po przekroczeniu licznych mechanizmów obronnych ustroju, zaburzają istniejącą równowagę antyoksydacyjną i w ten sposób biorą bezpośredni udział w powstawaniu zmian chorobowych w błonie śluzowej przewodu pokarmowego.

Cel pracy

Celem pracy jest próba oceny generowania wolnych rodników tlenu oraz aktywności wybranych parametrów enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej w przebiegu procesów zapalnych przełyku u dzieci z chorobą refluksową (GERD), a także zachowania się stężenia wybranych cytokin prozapalnych.

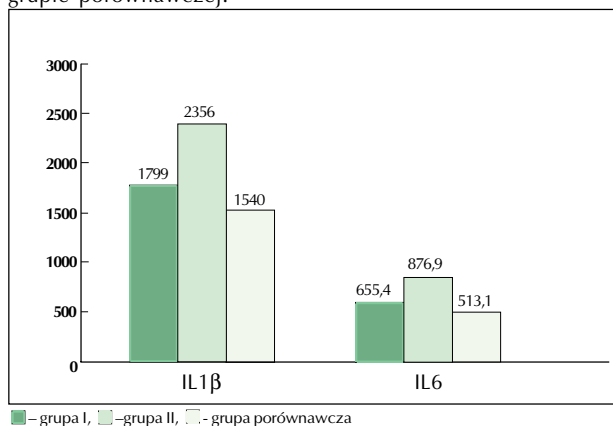
Materiał

Do badań włączono 50 dzieci w wieku od 6 miesiąca do 18 r.ż. (średnia 10 lat 9 miesięcy) z rozpoznaną w Klinice Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi chorobą refluksową, przed rozpoczęciem leczenia farmakologicznego. Wśród badanych dzieci w oparciu o ocenę histopatologiczną wycinków pobranych w trakcie badania endoskopowego wyodrębniono 2 grupy: grupa I - licząca 20 dzieci z patologicznym odpływem żołądkowo-przełykowym bez zapalenia błony śluzowej przełyku, grupa II - licząca 30 dzieci z patologicznym refluksiem żołądkowo-przełykowym ze współistniejącym zapaleniem błony śluzowej przełyku. Grupa porównawcza (P) - 10 zdrowych dzieci, którym krew pobierano w trakcie przeprowadzania innych analiz pracowniowych. U dzieci tych nie wykonywano badań inwazyjnych.

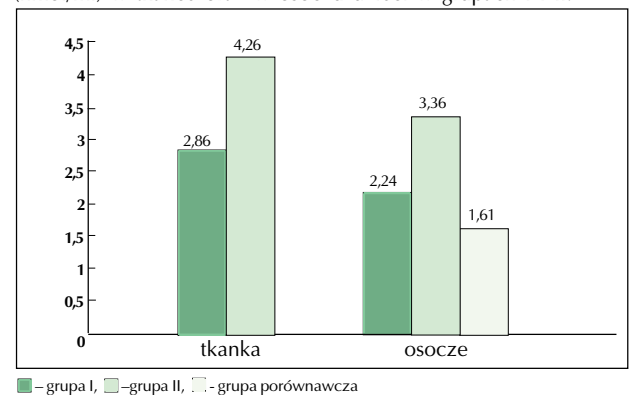
Metody

Podstawą rozpoznania patologicznego refluksu było badanie lekarskie i 24-godzinne monitorowanie pH treści prze-

Rycina 1. Wartość średniego stężenia interleukiny 1 β (pg/ml) i interleukiny 6 (pg/ml) w osoczu dzieci w grupach badanych i grupie porównawczej.



Rycina 2. Porównanie stężenia dialdehydu malonowego MDA (nmol/ml) w tkance oraz w osoczu dzieci w grupach I i II.

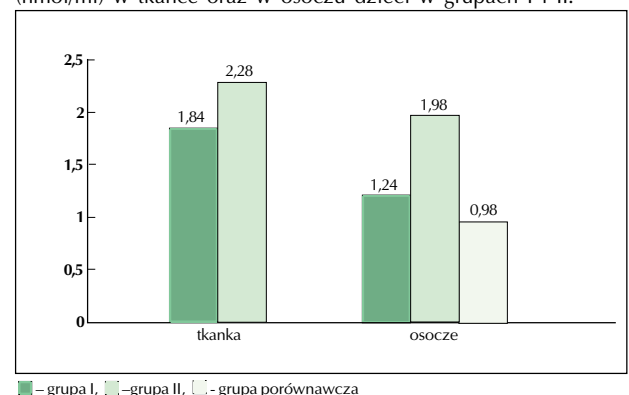


łykowej za pomocą jedno lub dwuodprowadzeniowej sondy oraz rejestratora z analizą komputerową zapisu - Digi-trapper Mk III firmy Synectics Medical. U chorych tych wykonano badanie endoskopowe z oceną nasilenia makroskopowych zmian zapalnych w obrębie błony śluzowej przełyku wg skali Savary'ego-Millera. W czasie endoskopii pobrano wycinki błony śluzowej z okolicy nadwzrostowej do badania histopatologicznego. Z badań wykluczono dzieci ze współistniejącym zakażeniem *Helicobacter pylori*.

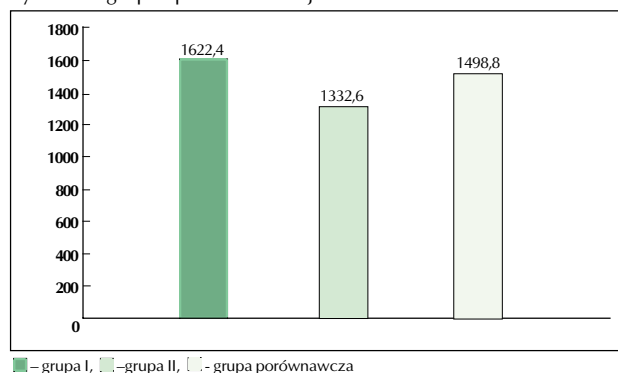
Zaplanowany panel oznaczeń biochemicznych wykonano w surowicy krwi. Aktywność procesu zapalnego oceniano na podstawie stężeń interleukiny 1 β (IL-1 β) i interleukiny 6 (IL-6) metodą ELISA. Pośredniej oceny ilości WRT w osoczu dokonano poprzez badanie stężeń produktów peroksydacji lipidów. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oznaczano w oparciu o reakcję z TBA z wytworzeniem czerwonego barwnika i pomiar absorpcji przy długości fali: $\lambda = 535$ i 580 nm względem próby ślepej, a stężenie dienów sprzężonych (DS) - badając absorpcję fali światła względem czystego n-heptanu przy $\lambda = 233$ nm na spektrofotometrze Spekord. Wyniki wyrażano w jednostkach absorpcji na 0,1 ml surowicy. Wykładniki bariery antyoksydacyjnej osocza oceniono poprzez pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w oparciu o inhibicję autooksydacji pirogallolu oraz peroksydazy glutationowej (GPX) wg zmodyfikowanej met. Rice-Evans. Ponadto przeprowadzono oznaczenia stężeń dialdehydu malonowego i dienów sprzężonych w homogenatach tkankowych z błony śluzowej przełyku. Praca posiadała zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Dla każdego rodzaju badania obliczono medianę, średnią arytmetyczną, standardowe odchylenie i przedział ufności. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z określeniem znamienności różnic w kolejnych przedziałach czasowych. Zastosowano test Studenta i rozkład F-Snedecora.

Rycina 3. Porównanie stężenia dienów sprzężonych DS (nmol/ml) w tkance oraz w osoczu dzieci w grupach I i II.



Rycina 4. Wykres wartości średnich aktywności dysmutazy ponadtlenkowej SOD-1 (U/ml) w osoczu dzieci w grupach badanych i w grupie porównawczej.



Porównania par dokonano przy pomocy nieparametrycznego testu U Manna-Whitney'a. Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą programu Statistica for Windows v. 4.5.

Wyniki badań

U 30 dzieci ze zmianami patomorfologicznymi w obrębie błony śluzowej przełyku (grupa II) obserwowano aktywny, przewlekły proces zapalny z obecnością nacieku utworzonego z komórek limfocytarnych i granulocytów obojętnochłonnych wg klasyfikacji Ismail-Beigi w modyfikacji Heilmanna. U 12 pacjentów (40%) uwidoczniło intensywne nacieki z granulocytów kwasochłonnych. Nasilone zmiany występowały głównie w nabłonku i błaszce właściwej. U 5 (16,7%) badanych dzieci stwierdzono przerost warstwy podstawnej przekraczający 20% grubości nabłonka. W podobnym odsetku występował przerost warstwy brodawkowatej przekraczający 2/3 grubości nabłonka.

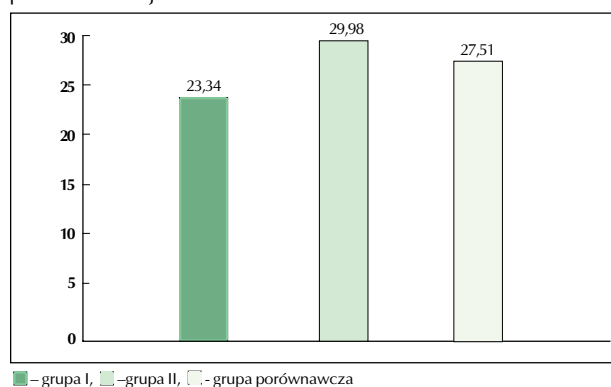
Średnie stężenia IL-1 β (1799 pg/ml) zarówno w grupie dzieci bez zapalenia (grupa I), jak i ze współistniejącym zapaleniem błony śluzowej przełyku (grupa II) (śr. 2356 pg/ml) były wyższe od stężenia cytokiny w grupie porównawczej (śr. 1540 pg/ml). Różnice stężeń pomiędzy grupą porównawczą a grupą I były nieznamienne statystycznie, natomiast w odniesieniu do grupy II były wysoce znamienne ($p < 0,005$). Podobnie średnie stężenie IL-6 w grupie dzieci bez zapalenia (śr. 655,4 pg/ml) było znamienne wyższe ($p < 0,05$) oraz wysoce znamienne wyższe w grupie dzieci ze współistniejącym refluksem zapaleniem przełyku w odniesieniu do grupy porównawczej ($p < 0,005$). Różnice stężeń pomiędzy oboma grupami dzieci z chorobą reflukсовą były statystycznie istotne ($p < 0,05$) (ryc. 1).

W grupie I średnie stężenie MDA we krwi wynosiło 2,24 nmol/ml i odbiegało w sposób znamieny od stężeń w grupie porównawczej (śr. 1,61 nmol/ml, $p < 0,05$). W grupie II stwierdzono szczególnie wysokie stężenia MDA (śr. 3,36 nmol/ml), a wartości te w sposób wysoce znamieny odbiegały od grupy porównawczej ($p < 0,001$). Różnice pomiędzy stężeniami MDA w grupie I i w grupie II były wysoce znamienne statystycznie ($p < 0,005$).

Stężenia MDA w biopsjach błony śluzowej przełyku wykazywały różnice wysoce znamienne pomiędzy wartościami stężeń u dzieci z grupy I i II ($p < 0,001$). W grupie I wynosiło ono średnio 2,86 nmol/ml, a w grupie II- 4,26 nmol/ml. W obu badanych grupach stężenia w tkankach były znamienne wyższe niż oznaczone w osoczu dzieci. W grupie dzieci z refluksem żołądkowo-przełykowym współistniejącym z zapaleniem błony śluzowej przełyku oznaczone wartości różniły się znamienne statystycznie ($p < 0,01$) (ryc. 2).

Stężenie DS w osoczu dzieci w grupie II (śr. 1,98 nmol/ml) odbiegało w sposób znamieny od grupy porównawczej (śr.

Rycina 5. Wykres średnich aktywności peroksydazy glutationowej GPX (U/ml) w osoczu dzieci w grupach badanych i w grupie porównawczej.



0,98 nmol/ml; $p < 0,001$). Natomiast różnice pomiędzy grupą porównawczą a grupą I (dzieci bez zapalenia błony śluzowej przełyku) (śr. 1,24 nmol/ml) były niezamienne statystycznie ($p > 0,05$). Różnice pomiędzy stężeniami DS dzieci w grupie I i w grupie II były wysoce znamienne statystycznie ($p < 0,005$).

Stężenia dzieńów sprzężonych w tkankach wykazywały różnice wysoce znamienne pomiędzy wartościami uzyskanymi u dzieci z zapaleniem (II) i bez zapalenia błony śluzowej przełyku (I) ($p < 0,001$). W grupie I wynosiło ono średnio 1,84 nmol/ml, a w grupie II - 2,28 nmol/ml. W obu grupach stężenia oznaczone w tkankach były wyższe niż w osoczu. Jednakże różnice te były nieznamienne statystycznie w grupie dzieci bez histologicznych wykładników zapalenia błony śluzowej przełyku (IA), a w grupie dzieci ze współistniejącym zapaleniem (IIA) - istotne statystycznie ($p < 0,05$) (ryc. 3).

Aktywność SOD była nieznamienne wyższa w grupie I w odniesieniu do grupy porównawczej ($p > 0,05$). U dzieci bez zapalenia przełyku średnia wartość wynosiła 1622,4 U/ml, a w grupie porównawczej 1498,8 U/ml. Najniższą aktywność 1332,64 U/ml określono w grupie dzieci z zapaleniem błony śluzowej przełyku i były to wartości znamienne statystycznie w odniesieniu do grupy porównawczej ($p < 0,005$). Różnice aktywności dysmutazy ponadtlenkowej pomiędzy dziećmi w grupie I a w grupie II były znamienne statystycznie ($p < 0,005$) (ryc. 4).

Aktywność GPX w osoczu była najniższa w grupie dzieci bez zapalenia błony śluzowej przełyku w stosunku do grupy z histologicznymi wykładnikami reflukсового zapalenia przełyku i grupy porównawczej, a wartości różniły się znamienne statystycznie ($p < 0,05$). Stężenia wynosiły odpowiednio 23,34 U/ml i 27,51 U/ml. W grupie II oznaczono najwyższą średnią wartość w wysokości 29,98 U/ml (ryc. 5).

Dyskusja

Obraz makroskopowy błony śluzowej stwierdzony w badaniu endoskopowym oraz opisane zmiany zapalne w badaniu patomorfologicznym dokumentują istnienie procesów zapalnych w błonie śluzowej (8, 9, 10). Jednak ze względu na niepełne współistnienie zmian makroskopowych opisywanych w badaniu endoskopowym z oceną patomorfologiczną wycinków błony śluzowej przełyku poszukuje się dalszych możliwości pozwalających na weryfikację stanu zapalnego, z ograniczeniem metod inwazyjnych. Uznany markerem zapalenia są cytokiny prozapalne. W licznych pracach udowodniono w patogenezie GERD istnienie związku przyczynowego pomiędzy stresem oksydacyjnym a aktywnością procesu zapalnego (11-15). W piśmiennictwie utworzono nawet określenie "choroba wolnych rodników tlenu" (16). W przedstawianej pracy wyrazem opisywanych zmian jest zależność pomiędzy ilością generowanych

WRT, stężeniem cytokin a obrazem patomorfologicznym błony śluzowej. IL-1 β wraz z TNF α drogą aktywacji fosfolipazy A2 wtórnice wzbudzają peroksydację kwasu arachidonowego z powstawaniem jego aktywnych metabolitów. Wśród nich szczególne znaczenie mają parakrynnie generowane pod wpływem cyklooksygenazy prostaglandyny, a przy współdziałaniu lipooksygenazy - leukotrieny (17). Omawiane metabolity wtórnice generują WRT i prowadzą do przełamania bariery antyoksydacyjnej krwi z uszkodzeniem struktur tkankowych. Procesy te nasilają powstające nadtlaki lipidów i aldehydy. Natomiast IL-6 wspólnie z IL-1 β są uważane za najsilniejszy modulator wydzielania z hepatocytów białek ostrej fazy (7). Stwierdzone wśród dzieci zapalenie błony śluzowej przełyku (grupa II) oraz wysokie stężenia IL-1 β i IL-6 potwierdzają zatem istnienie zaawansowanego procesu zapalnego. Natomiast utrzymywanie się stężeń tych cytokin na niskim poziomie w grupie I oraz u dzieci zdrowych przemawia za brakiem nasilonego stanu zapalnego, co może wskazywać na przydatność tych oznaczeń w monitorowaniu stanu zapalnego błony śluzowej przełyku. Również oznaczone poziomy stężenia IL-1 β i IL-6 potwierdzają istnienie znamienych różnic pomiędzy grupami I a II, i odpowiednią kwalifikację dzieci do poszczególnych grup.

Wykazany w pracy wzrost stężeń MDA i DS w chorobie refluksowej, przebiegającej ze stanem zapalnym błony śluzowej przełyku, dokumentuje narastanie stężenia WRT. O istnieniu związku tych metabolitów z procesem zapalnym w przełyku dowodzą istotne różnice stężeń oznaczanych parametrów obserwowane w osoczu pomiędzy dziećmi w grupie I a dziećmi z grupy II. W badaniach u dzieci z refluksowym zapaleniem błony śluzowej przełyku (grupa II) obserwowano znamienne wyższe stężenia MDA i DS zarówno w odniesieniu do grupy I, jak i do grupy porównawczej. Obserwowany w badaniach własnych wzrost stężenia MDA jest zgodny z doświadczeniami wielu autorów, którzy wyjaśniają podstawy generowania WRT przez neutrofile (18, 19, 20). Podobnie zachowanie się stężeń dienów sprzężonych we krwi dokumentuje wzbudzenie procesów peroksydacyjnych. Naturalnie występujące nienasycone kwasy tłuszczowe nie zawierają sprzężonych wiązań podwójnych. Ich pojawienie się jest oznaką rozpoczęcia peroksydacji i umożliwia śledzenie procesu. W badaniach najwyższe stężenia DS występowały u dzieci z zapaleniem przełyku. Brak istotnych różnic w stężeniach DS u dzieci w grupie I w zestawieniu z grupą porównawczą dokumentują brak zmian zapalnych w tych grupach.

W homogenatach błony śluzowej przełyku obserwowano wyższe wartości produktów peroksydacji lipidów w obu grupach niż w analogicznych oznaczeniach w surowicy. Wzrost stężenia MDA świadczy o głębokim uszkodzeniu komórek w wyniku rozpadu lipidów z ich błon komórkowych (21). Zatem przedstawione badania są wyrazem wzrostu generacji WRT w przestrzeni pozakomórkowej w czasie zapalenia błony śluzowej przełyku. Jest to zrozumiałe biorąc pod uwagę, że miejscem zachodzących procesów są struktury tkankowe (22, 23, 24). Wykonane badanie potwierdza zatem lokalizację toczącego się procesu zapalnego.

Peroksydacja lipidów jest udokumentowanym wynikiem stresu oksydacyjnego (23, 24). Jednocześnie organizm jest wyposażony w złożone mechanizmy antyoksydacyjne zapobiegające uszkodzeniom powodowanym przez nasilone procesy utleniania i redukcji (17, 25). W ich skład wchodzi zarówno mechanizmy enzymatyczne jak i nieenzymatyczne. Obniżenie aktywności enzymów stanowiących barierę antyoksydacyjną może być powodem zachwiania równowagi tych procesów i utraty zdolności unieczynniania aktywnych form tlenu, co sprzyja rozwojowi stanu zapalnego. Tym bardziej, że wzrost stężenia nadtlenu wodoru związa-

ny jest z uaktywnieniem reakcji dysmutacji i cechuje się zdolnością do penetrowania ściany komórkowej. Wychodząc z założenia, że zwiększona generacja anionorodnika ponadtlenu jest podstawowym substratem dla SOD, to wzrost aktywności tego enzymu może świadczyć o odpowiedzi jednego z najważniejszych mechanizmów bariery antyoksydacyjnej na nadprodukcję reaktywnych form tlenu. SOD bowiem rozkładając anionorodniki ponadtlenu zapobiega powstaniu ich pochodnych form oraz uszkodzającemu działaniu, a jednocześnie uniemożliwia zapoczątkowanie przez WRT wyzwolenia kaskady niekorzystnych zjawisk biologicznych. Natomiast zmniejszona aktywność SOD i GPX, będących podstawową częścią systemu antyoksydacyjnego, może być powodem nie zrównoważenia procesów wytwarzania aktywnych postaci tlenu i ich unieczynniania. W przedstawianych badaniach potwierdzono obserwacje innych autorów dokumentujące szczególnie niską aktywność SOD u dzieci z procesem zapalnym (18, 20, 21). Na szczególną uwagę zasługuje zachowanie się GPX. W warunkach fizjologicznych peroksydacja lipidów jest hamowana przez GPX selenozależną, która katalizuje redukcję nadtlenu wodoru (24). Wykazana, wyższa aktywność peroksydazy glutationowej u dzieci ze współistniejącym zapaleniem błony śluzowej przełyku niż w grupie porównawczej może być dowodem świadczącym o głębokim uszkodzeniu komórek błony śluzowej przełyku. Zmniejszenie aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej może powodować nie zrównoważenie procesów wytwarzania aktywnych postaci tlenu i ich unieczynniania. Konsekwencją tego zjawiska może być nagromadzenie dużych ilości biologicznie toksycznych pochodnych tlenu, które mogą być odpowiedzialne za zapalenie błony śluzowej. W badaniach doświadczalnych obserwowano początkowy wzrost, a następnie w miarę postępowania procesu zapalnego - spadek GPX w błonie śluzowej przełyku zwierząt doświadczalnych z kwasnym refluksiem. Stres oksydacyjny, powodujący niski poziom GPX, współwystępował ze wzrostem aktywności SOD, mającej działanie ochronne na błonę śluzową przełyku; nie tylko wzrasta sekrecja WRT, ale pogłębia się niewydolność bariery antyoksydacyjnej.

Przedstawiony wywód dokumentuje ściśle powiązania w jedną całość licznych mechanizmów i zjawisk zachodzących w komórce. Począwszy od rozwoju reakcji zapalnej, poprzez sekrecję cytokin prozapalnych, będących molekularnymi mediatorami wzbudzającymi generowanie WRT i poprzez peroksydację kwasu arachidonowego z powstaniem jego toksycznych metabolitów aż do powstania zmian strukturalnych błony śluzowej, w przypadku niewydolności enzymatycznych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. Natomiast nadal niewiele jest prac klinicznych weryfikujących przedstawione rozważania teoretyczne w chorobie refluksowej u dzieci. Prowadzenie dalszych badań pozwoli być może na wdrożenie ich w praktyce klinicznej i pozwoli na lepsze monitorowanie stanu zapalnego błony śluzowej przełyku oraz ograniczenie badań inwazyjnych.

Wnioski

1. Wolne rodniki tlenowe odgrywają istotną rolę w patogenezie zmian zapalnych błony śluzowej przełyku u dzieci.
2. Aktywność potencjałów oksydacyjnych osocza u dzieci z zapaleniem błony śluzowej przełyku jest wyższa w porównaniu z grupą dzieci bez objawów zapalenia.
3. Aktywność bariery antyoksydacyjnej osocza dzieci z komponentą zapalną jest znamienne niższa w porównaniu z refluksiem żołądkowo-przełykowym bez zapalenia błony śluzowej przełyku.

PIŚMIENNICTWO:

1. Rai A. M., Orlando R. C. Gastroesophageal reflux disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1998, 14, 329-333.
2. Cosgrove M., Dodge J. Gastroesophageal reflux in children. *Eur. J. Gastroenterol. Hepat.* 1999, 2, 2-3.
3. Davies A. E. M., Sandhu B. K. Diagnosis and treatment of gastro-oesophageal reflux. *Arch. Dis. Child.* 1995, 73, 82-86.
4. Korzon M., Brodzicki J. Aspekty kliniczne refluksu żołądkowo-przełykowego u dzieci. *Gastroenterol. Pol.* 1998, 5, 481-485.
5. Vandenplas Y., Hegar B. Diagnosis and treatment of gastro-oesophageal reflux disease in infants and children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15, 593-603.
6. Tobey N. A., Carson J. L., Alkiek R. A., Orlando R. C. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux-damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterol.* 1996, 11, 1200-1205.
7. Cornevali S. Nitric oxide (NO) upregulates synthesis of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 8 (IL-8) by human mononuclear cells. *Eur. Resp. J.* 1997, 10, 38-42.
8. Iwańczak B., Woźniak Z. Ocena histopatologiczna błony śluzowej przełyku w chorobie refluksowej u dzieci. *Ped. Pol.* 2001, 76, 421-427.
9. Pace F., Santalucia F., Bianchi P. G. Natural history of gastroesophageal reflux disease without esophagitis. *Gut* 1991, 32, 845-848.
10. Heine R. G., Cameron D. Js., Chow C. W., Hill D. J., Catto S. A. Esophagitis in distressed infants: poor diagnostic agreement between esophageal pH monitoring and histopathologic findings. *J. Pediatr.* 2002, 140, 14-19.
11. Oh T. Y., Lee J. S., Ahn B. O., Cho H., Kim W. B., Kim Y. B., Surh Y. J., Cho S. W., Hahm K. B. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 905-915.
12. Oh T. Y., Lee J. S., Ahn B. O., Cho H., Kim W. B., Kim Y. B., Surh Y. J., Cho S. W., Lee K. M., Hahm K. B. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats. *Gut* 2001, 49, 364-371.
13. Wetscher G. J., Hinder P. R., Bagchi D., Perdakis G., Redmond E. J., Glaser K., Adrian T. E., Hinder R. A. Free radical scavengers prevent reflux esophagitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 1995, 40, 1292-1296.
14. Wetscher G. J., Hinder P. R., Kingler P. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis. Esophagus.* 1997, 10, 29-32.
15. Wetscher G. J., Perdakis G., Kretschmar D. H. Esophagitis in Sprague-Dawley rats is mediated by free radicals. *Dig. Dis. Sci.* 1995, 40, 1297-1305.
16. Socha P. Zastosowanie zmiataaczy wolnych rodników w leczeniu chorób przewodu pokarmowego i w leczeniu żywieniowym dzieci. *Ped. Wsp. Gastroenterol. Hepatol. Żywnienie Dziecka* 2001, 3, 129-133.
17. Bała G., Czerwionka-Szaflarska M., Drewa G., Mierzwa G. Plasma and erythrocyte malonaldehyde concentrations in children with chronic gastroduodenitis. *Med. Sci. Monit.* 1996, 2, 469-473.
18. Postępski J., Opoka-Winiarska V., Tuskiewicz-Misztal E. Znaczenie reakcji wolnorodnikowych w patogenezie wybranych schorzeń u dzieci. *Ped. Pol.* 2000, 75, 767-777.
19. Bulkley G. B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993, 113, 479-483.
20. Suppan K., Kłopotcka M., Budzyński J., Grad K., Świątkowski M., Drewa G., Marciniak R., Korenkiewicz J. Poziom dialdehydu malonowego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w przebiegu zapalenia błony śluzowej żołądka u pacjentów z chorobą wrzodową. *Gastroenterol. Pol.* 1998, 5, (supl.1), 116.
21. Drake I. M., Mapstone N. P., Schorah C. J. Reactive oxygen species activity and lipid peroxidation in *Helicobacter pylori* associated gastritis; relation to gastric mucosal ascorbic acid concentrations and effect of *H. pylori* eradication. *Gut* 1998, 42, 768-771.
22. Bartnikowska E. Powstawanie wolnych rodników tlenowych w środowisku otaczającym i wewnątrzkomórkowym. *Pneumol. Alergol. Pol.* 1994, 62, 35-40.
23. Czerwionka-Szaflarska M., Bała G., Drewa G., Mierzwa G. Rodniki tlenowe jako mediatory patofizjologii żołądkowo-jelitowej. *Gastroenterol. Pol.* 1997, 4 (3), 303-306.
24. Dąbrowski A., Gabrylewicz A. Rodniki tlenowe w chorobach przewodu pokarmowego. *Medycyna* 2000,1990, 6, 4-7.
25. Korzon M., Renke J., Popadiuk S., Woźniak M., Bugajczyk B. Rola obniżonej wydolności antyoksydacyjnej w patogenezie niektórych przewlekłych chorób zapalnych u dzieci. *Prz. Pediatr.* 1999, (supl. 1) 30-34.

Adres do korespondencji:

Dr med. Małgorzata Modzelewska-Hołyńska
Klinika Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej
Instytutu Pediatrii Uniwersytetu Medycznego
ul. Śporna 36/50
91-738 Łódź
tel./fax (0-42) 656 26 30

