

Zachowanie się stężenia tlenku azotu oraz cząsteczek adhezyjnych w przebiegu powysiłkowego skurczu oskrzeli u chorych na alergiczną astmę oskrzelową

Nitric oxide and adhesion molecules in exercise-induced bronchoconstriction

ZIEMOWIT ZIĘTKOWSKI ^{1/}, ANNA BODZENTA-ŁUKASZYK ^{1/}, MARIAN TOMASIAK ^{2/}, JAKUB GIERGIEL ^{3/}

^{1/} Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych AM, ul. Skłodowskiej 24A, 15-276 Białystok

^{2/} Zakład Chemii Fizycznej AM w Białymstoku

^{3/} AstraZeneca Sp. o.o.

Cel: Celem pracy była ocena udziału tlenku azotu (NO) oraz cząsteczek adhezyjnych (sE-selektyny i sP-selektyny) w patogenezie PSO.

Metody: Badania przeprowadzono w grupie 30 pacjentów (16 – astma alergiczna z komponentem wysiłkowym, 8 – astma alergiczna bez komponentu wysiłkowego oraz 6 – zdrowi ochotnicy). Każdy pacjent miał wykonywany test prowokacyjny z histaminą oraz test wysiłkowy na cykloergometrze rowerowym. Krew w celu wykonania oznaczeń pobierano przed testami prowokacyjnymi, 15 i 60 min. po ich zakończeniu.

Wyniki: W grupie chorych z powysiłkowym skurczem oskrzeli spoczynkowe stężenie NO wzrastało znamienne statystycznie 15 min. po wysiłku, po czym 60 min. po wysiłku obserwowano jego normalizację. Stężenie sE-selektyny również wzrastało znamienne statystycznie 15 min. po wysiłku i pozostawało na takim poziomie 60 min. po zakończeniu próby. Stężenie sP-selektyny wzrastało 15 min. po wysiłku fizycznym i powracało do poziomu wyjściowego 60 min. po zakończeniu próby. U osób z pozostałych dwóch grup nie obserwowano zmian w stężeniach NO ani selektyn, a także w czasie nieswoistego testu prowokacyjnego z histaminą.

Wnioski: Wyniki badań wskazują, że NO, sE-selektyna i sP-selektyna mogą pełnić istotną rolę w mechanizmie powysiłkowego skurczu oskrzeli u chorych na alergiczną astmę oskrzelową.

Alergia Astma Immunologia, 2002, 8(2), 110-114

Słowa kluczowe: powysiłkowy skurcz oskrzeli, tlenek azotu, sE-selektyna, sP-selektyna

Aims: The study was aimed to determine the role of nitric oxide and adhesion molecules (sE-selectin and sP-selectin) in the pathogenesis of EIB.

Methods: In total 30 patients were included (16 asthmatics with EIB, 8 asthmatics without EIB and 6 healthy volunteers). In all subjects a non-specific bronchial provocation test with histamine and exercise test using a bicycle ergometer were performed. The study parameters were measured before and then 15 and 60 min. after the exercise test.

Results: In the group of patients with EIB the NO concentration was significantly increased 15 min. after the test as compared to pre-test level, and returned to the norm 60 min. after the test was done. sE-selectin concentration also increased significantly 15 min. after performing the test, and remained unchanged on the 60th min. of observation, whereas sP-selectin concentration was raised 15 min. and returned to normal 60 min. after the exercise test was done. In neither asthmatics without EIB nor healthy volunteers group changes of this kind were observed.

Conclusions: The results of the study suggest that the changes in concentrations of NO, sE-selectin and sP-selectin are connected to the mechanisms of exercise-induced bronchoconstriction.

Alergia Astma Immunologia, 2002, 8(2), 110-114

Key words: exercise-induced bronchoconstriction, nitric oxide, sE-selectin, sP-selectin

Proces zapalny toczący się w drzewie oskrzelowym, charakterystyczny dla astmy oskrzelowej, związany jest z obecnością aktywowanych komórek tucznych, makrofagów, limfocytów i eozynofików [4]. Śródbłonek naczyniowy pod wpływem cytokin prozapalnych, ulega zmianom, które umożliwiają współuczestnictwo w reakcji zapalnej [17,27]. Cząsteczki adhezyjne obecne na komórkach śródbłonna, płytkach krwi i leukocytach są niezbęd-

ne dla zapoczątkowania migracji komórek do miejsca reakcji zapalnej [1]. Cytokiny zwiększają ekspresję cząsteczek adhezyjnych w naczyniach mikrokrążenia płucnego chorych na astmę oskrzelową. Obecność podwyższonych stężeń rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych świadczy o nasileniu procesu zapalnego związanego z zaostreniem astmy oskrzelowej [16].

Tlenek azotu (NO) odgrywa ważną rolę w astmie oskrzelowej. U chorych na astmę wykazano zwiększoną ekspresję indukowalnej formy syntazy NO (iNOS) oraz wzrost stężenia NO w powietrzu wydychanym, zwłaszcza w czasie zaostrzeń. Wielu badaczy uważa, że pomiary wydychanego NO mogą być wskaźnikiem procesu zapalnego oraz przebudowy oskrzeli u chorych na astmę oskrzelową [18].

Wpływ wysiłku fizycznego oraz występującego po nim skurczu oskrzeli na nasilenie alergicznego procesu zapalnego toczącego się na terenie drzewa oskrzelowego budzi nadal wiele kontrowersji [26]. Część autorów obserwowała, występowanie późnej fazy zapalnej (LAR) ze wzrostem stężenia eozynofilowego białka kationowego (ECP) w przebiegu dodatniego testu wysiłkowego [2,19].

Celem pracy była ocena udziału tlenu azotu (NO) oraz rozpuszczalnych form wybranych cząsteczek adhezyjnych (sE-selektyny i sP-selektyny) w patogenezie powysiłkowego skurczu oskrzeli u chorych na alergiczną astmę oskrzelową.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Badane grupy obejmowały:

- 16 chorych na alergiczną astmę oskrzelową z komponentą wysiłkową – grupa A;
- 8 pacjentów z alergiczną astmą oskrzelową bez komponenty wysiłkowej – grupa B;
- 6 zdrowych ochotników – grupa C.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Białymstoku (nr zgody: R-I-003/71/2000).

Do badań kwalifikowano chorych na astmę alergiczną przewlekłą lekką lub umiarkowaną, u których w wyjściowym badaniu spirometrycznym uzyskano FEV1 >70% wartości należnej. Jedynym lekiem, który chory mógł przyjmować doraźnie w 14-dniowym okresie poprzedzającym badania był salbutamol. Chorzy nie przyjmowali leków przeciwzapalnych. Alergiczne podłoże astmy oskrzelowej potwierdzono dodatkimi testami skórnymi z alergenami całorocznymi (*Dermatophagoides pteronyssinus* i/lub *farinae*). Do badania nie kwalifikowano chorych uczulonych na alergeny sezonowe. Badania zaplanowano na 2 dni.

Nieswoisty test prowokacyjny drzewa oskrzelowego z histaminą (BPT) przeprowadzano pierwszego dnia metodą Ryan'a i wsp. [24]. Do prowokacji użyto nebulizatora De Villbiss 646 napędzanego sprężonym powietrzem o ciśnieniu 0,15 MPa połączonego z dozymetrem Rosenthal-French'a. Wynik podawano jako PC20 FEV1 – stężenie histaminy (mg/ml), które powoduje spadek FEV1 o 20% w stosunku do wartości wyjściowej. Krew na oznaczenia pobierano przed prowokacją, 15 min po podaniu

maksymalnego dla danego pacjenta stężenia histaminy oraz 60 minut po zakończeniu próby. Drugiego dnia wykonano spirometryczny test wysiłkowy na cykloergometrze rowerowym, rozpoczynając od obciążenia 50 WAT, a następnie zwiększając co 3 min aktualne obciążenie, aż do osiągnięcia limitu tętna (85% wartości tętna maksymalnego) przewidzianego dla submaksymalnego wysiłku. Test wysiłkowy trwał 8-9 minut [11]. Podstawowe parametry spirometryczne oznaczano przed, bezpośrednio po teście wysiłkowym oraz 5, 10, 15, 20 i 60 minut po wykonanym wysiłku.

Krew pobierano przed badaniem, 15 i 60 minut po wykonanym wysiłku z żyły zgięcia łokciowego do probówek zawierających 0,05 M EDTA. Po odwirowaniu (3000 g w temp. 4°C przez 30 min) osocze było przechowywane w temperaturze -80°C do czasu wykonania zaplanowanych oznaczeń.

Metody

Stężenie NO w osoczu badano przy użyciu zestawu RSD Systems Total Nitric Oxide Assay. Oznaczenie całkowitego NO oparto na enzymatycznej przemianie azotanów w azotyny przy udziale enzymu reduktazy azotanów. Reakcja oparta jest na kolorymetrycznej detekcji barwnego produktu reakcji Griess'a (1-[4-sulfamoiłobenzenoazo]-4-[2-amonoetylamino]-naftalen), którego absorpcję oznacza się przy 540 nm.

Stężenie sE-selektyny oraz stężenie sP-selektyny w osoczu oznaczono za pomocą immunoenzymatycznych testów dla ilościowego oznaczania tych selektyn (Bender Med. System).

Analiza statystyczna

Do opisu statystycznego uzyskanych wyników zastosowano: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD) oraz istotność statystyczną różnic dla dwóch średnich. Obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego „Statistica 5.0”. Poziom istotności przyjęto dla $p < 0,05$. Porównanie stężeń badanych parametrów dokonano używając nieparametrycznego testu Wilcozona dla próbek sparowanych o tej samej liczbie obserwowanych wartości. Do analizy korelacji pomiędzy badanymi parametrami użyto współczynnika korelacji liniowej Pearsona.

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono charakterystykę badanych pacjentów. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w nieswoistej nadreaktywności oskrzeli ocenianej w nieswoistym teście prowokacyjnym z histaminą pomiędzy grupami A i B. Nadreaktywność oskrzeli w grupach A i B była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami z grupy C. Wszyscy chorzy w grupie A mieli dodatni test wysiłkowy – spadek FEV1 o co najmniej

20% w stosunku do wartości wyjściowej. U chorych w grupie B oraz u zdrowych ochotników z grupy C nie obserwowano dodatniego testu wysiłkowego.

Tabela I. Charakterystyka badanych pacjentów

	Zdrowi ochotnicy (C)	Chorzy na astmę z komponentą wysiłkową (A)	bez komponenty wysiłkowej (B)
Liczba badanych	6	16	8
Płeć (M/F)	4/2	8/8	3/5
Wiek (lata)	30,1±10,24	29,5±7,74	34,1±12,8
FEV1 % wartości należnej	107,3±4,2	80,2±16,7 *	87,9±24,2*
MEF50 % wartości należnej	131,2±21,9	77,2±19,8*	76,6±28,2*
PC ₂₀ histaminy (mg/ml)	32,0±0,0	1,29±1,42 *	3,17±3,12*

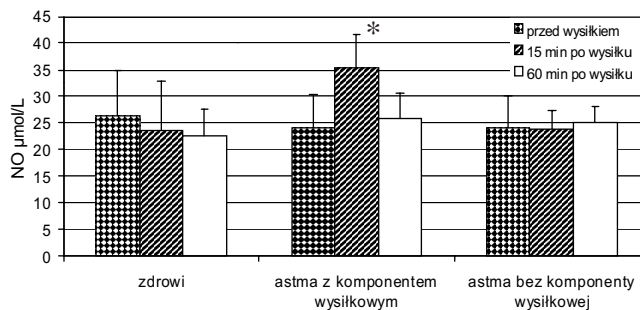
* p<0,05

Porównanie spoczynkowego stężenia NO w osoczu, pomiędzy badanymi grupami, nie wykazało istotnych różnic (A: 24,0µmol/L ± 6,48; B: 24,0µmol/L ± 6,2; C: 26,3µmol/L ± 8,5). W grupie chorych z powysiłkowym skurczem oskrzeli 15min po wysiłku stężenie NO wzrosło statystycznie do 35,3µmol/l ± 6,37 (p<0,01). 60 minut po wysiłku obserwowano normalizację stężenia NO.

Spoczynkowe stężenie sE-selektyny w poszczególnych badanych grupach nie wykazało istotnych statystycznie różnic (A: 28,4±7,9ng/ml v. B: 21,86±2,8; p>0,05; A: 28,4±7,9ng/ml v. C: 26,5±7,7; p>0,05). 15 minut po wysiłku w grupie A obserwowano istotny wzrost stężenia sE-selektyny (przed wysiłkiem: 28,4±7,9ng/ml; 15 minut po wysiłku 32,03±10,06; p<0,01), który utrzymywał się 60 minut po wysiłku (30,96±9,1).

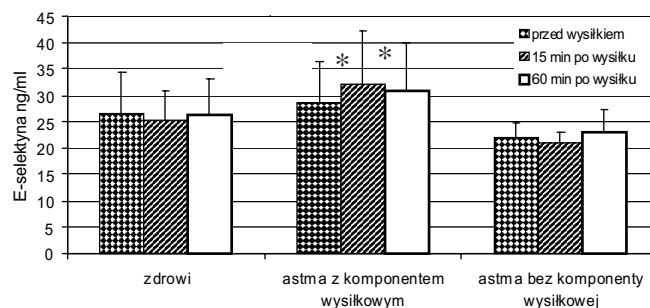
Spoczynkowe stężenie sP-selektyny w poszczególnych badanych grupach nie wykazało istotnych statystycznie różnic (A: 91,65±34,39ng/ml v. B: 81,50±36,30; p>0,05; A: 91,65±34,39ng/ml v. C: 61,89±13,01; p>0,05) (ryc. 3). 15 minut po wysiłku stężenie sP-selektyny wzrosło statystycznie w grupie chorych z powysiłkowym skurczem oskrzeli (przed wysiłkiem: 91,61 ± 34,39ng/ml; 15 minut po wysiłku 117,95±45,58; p<0,01). 60 min. po wysiłku stężenie sP-selektyny wynosiło 106,68 ± 37,86ng/ml

Nie obserwowano istotnych statystycznie zmian w stężeniach NO oraz selektywności w pozostałych grupach pacjentów oraz w czasie nieswoistej próby prowokacyjnej z histaminą.



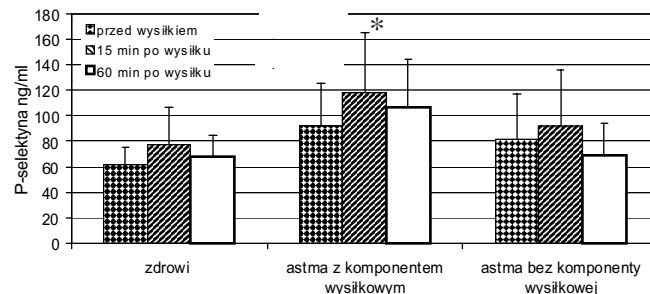
Ryc. 1. Stężenie NO w badanych grupach pacjentów w czasie testu wysiłkowego

* p<0,01 w porównaniu ze stężeniem wyjściowym



Ryc. 2. Stężenie sE-selektyny w badanych grupach pacjentów w czasie testu wysiłkowego

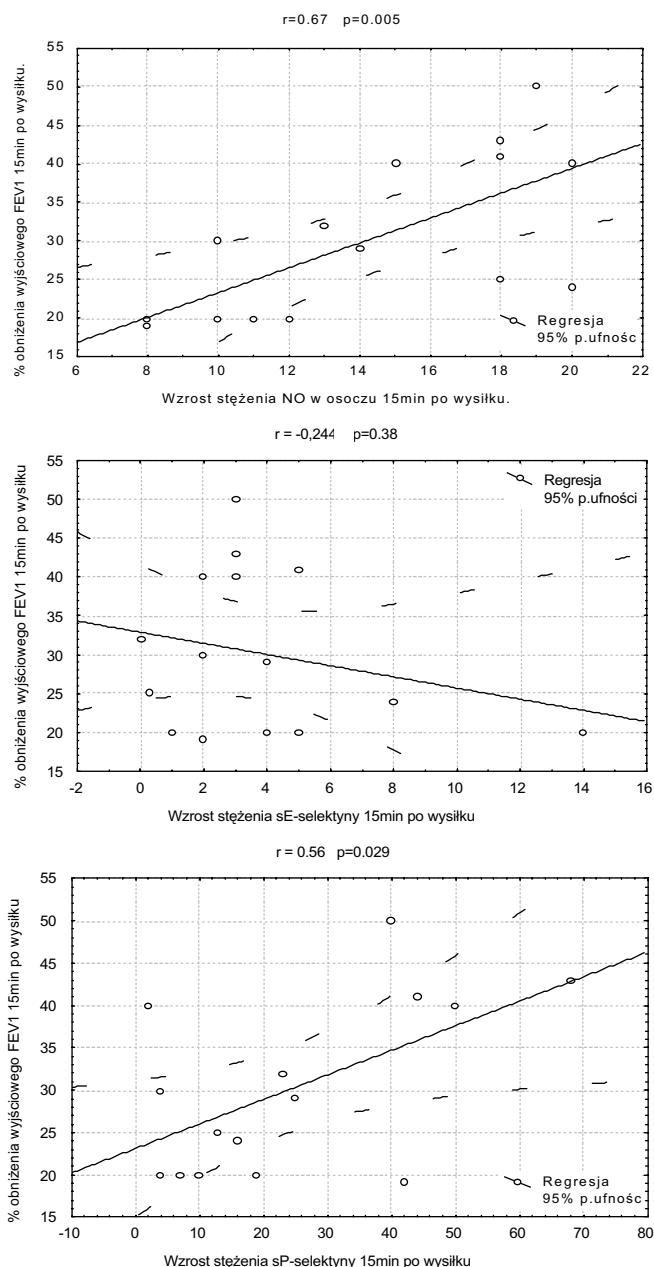
* p<0,01 w porównaniu ze stężeniem wyjściowym



Ryc. 3. Stężenie sP-selektyny w badanych grupach pacjentów w czasie testu wysiłkowego

* p<0,01 w porównaniu ze stężeniem wyjściowym

W grupie chorych na alergiczną astmę oskrzelową z komponentem wysiłkowym wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy wielkością powysiłkowego skurczu oskrzeli (spadkiem FEV1) a wzrostem stężenia NO w osoczu 15min po wysiłku (r=0,67, p=0,005) oraz wzrostem stężenia sP-selektyny 15min po wysiłku (r=0,56, p=0,029). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wielkością powysiłkowego skurczu oskrzeli a wzrostem stężenia sE-selektyny 15min po wysiłku (r= - 0,24, p=0,38).



Ryc. 4. Analiza korelacji pomiędzy wielkością powysiłkowego skurczu oskrzeli a wzrostem stężenia w osoczu badanych parametrów 15 min. po wysiłku (NO, sE-selektyny i sP-selektyny) w grupie chorych na alergiczną astmę oskrzelową z komponentą wysiłkową

DYSKUSJA

Astma oskrzelowa charakteryzuje się procesem zapalnym toczącym się w drzewie oskrzelowym, w który zaangażowane są aktywowane komórki tuczne, makrofagi, limfocyty i eozynofile [4]. Na podstawie opublikowanych w latach 90. badań, śródbłonek naczyniowy uznaje się nie za bierną wyściółkę naczyń krwionośnych, ale za wysoce wyspecjalizowaną, czynną metabolicznie tkankę stanowiącą pomost pomiędzy krwią a otaczającymi tkankami. Zapewnia ona wybiórczą przepuszczalność dla komórek i białek. Pod wpływem pobudzenia takimi czynni-

kami jak interleukina-1 śródbłonek ulega zmianom, umożliwiającym współuczestnictwo w reakcji zapalnej [17,27]. Cząsteczki adhezyjne obecne na komórkach śródbłonek, płytkach krwi i leukocytach spełniają rolę w fizycznych kontaktach między komórkami a śródbłonkiem [25]. W wyniku aktywacji cząstek adhezyjnych eozynofile, neutrofile i komórki T opuszczają naczynia krwionośne i migrują do tkanek [6]. W naczyniach mikrokrążenia objętych zapaleniem cytokiny zwiększają ekspresję cząstek adhezyjnych, co powoduje, że przepływające leukocyty stają się bardziej „lepkie”. Wolno krążące leukocyty zaczynają przylegać do komórek śródbłonek naczyniowego, toczą się wzdłuż nich, spłaszczają się i przenikają między komórkami [5,7,22]. P-selektyna, obecna na komórkach śródbłonek i płytkach krwi, odpowiedzialna jest za przyleganie neutrofilów do komórek śródbłonek. E-selektyna, obecna na komórkach śródbłonek, bierze udział w migracji neutrofilów, eozynofilów oraz komórek T [8,22]. Obecność podwyższonych stężeń rozpuszczalnych form cząstek adhezyjnych świadczy o obecności procesu zapalnego [13]. Podwyższone stężenia rozpuszczalnych form E i P selektyny stwierdzono w BAL-u u chorych poddanych swoistemu testowi prowokacji alergenowej, w przypadku wystąpienia późnej fazy zapalnej [14]. Wykazano podwyższone stężenia E i P selektyny we krwi obwodowej u chorych z zaostrzeniem astmy w porównaniu z osobami zdrowymi [21]. Badania z użyciem biopsji oskrzelowej potwierdziły zwiększoną ekspresję cząstek adhezyjnych w naczyniach mikrokrążenia drzewa oskrzelowego chorych na astmę oskrzelową [14,15,23].

Tlenek azotu (NO) jest biologicznie aktywną cząsteczką odgrywającą istotną rolę w fizjologii i patologii organizmu. NO pełni kluczową rolę w fizjologicznej regulacji czynności układu oddechowego oraz w patogenezie astmy oskrzelowej [9,20]. Stężenie tego związku znacznie wzrasta w powietrzu wydychanym przez chorych na astmę oskrzelową [3,18]. Frieri i wsp. uważają, że NO może być ważnym wskaźnikiem w monitorowaniu leczenia przeciwapalnego [12]. Van den Toorn [28] traktuje pomiary wydychanego tlenu azotu za wskaźnik procesu zapalnego oraz przebudowy oskrzeli u chorych na astmę oskrzelową, cenny zarówno w okresie objawowym jak i bezobjawowym choroby. De Gouw u chorych na astmę oskrzelową obserwował ograniczenie powysiłkowego skurczu oskrzeli po inhalacji L-NMMA – inhibitora syntazy NO [10].

Celem pracy była ocena udziału NO i cząstek adhezyjnych (sE-selektyny i sP-selektyny) w mechanizmie powysiłkowego skurczu oskrzeli u chorych na alergiczną astmę oskrzelową. Przeprowadzone badania wykazały istotny statystycznie wzrost stężenia NO w surowicy chorych z astmą wysiłkową 15 minut po zakończeniu wysiłku oraz jego normalizację po 60 minutach. Analiza zachowania się rozpuszczalnych form selektyn E i P wykazała

również istotny statystycznie wzrost stężenia tych cząstek 15 minut po wysiłku w grupie chorych z powysiłkowym skurczem oskrzeli. 60 minut po zakończeniu testu wysiłkowego nadal obserwowano podwyższone stężenia omawianych cząstek adhezyjnych. U chorych na alergiczną astmę oskrzelową bez komponenty wysiłkowej oraz w grupie zdrowych ochotników nie obserwowano istotnych zmian w stężeniach NO, sE-selektyny i sP-selektyny.

Kanazawa i wsp. [17] wykazali statystycznie znaczący wzrost stężenia trombomoduliny (TM), uznanego wskaźnika uszkodzenia śródbłonka naczyniowego, w oso-

zu pacjentów z astmą w czasie dodatkowego testu wysiłkowego. Autorzy znaleźli korelację pomiędzy nasileniem skurczu oskrzeli w następstwie wysiłku fizycznego, a wzrostem stężenia TM w surowicy. Na podstawie tych obserwacji sugerują oni, iż uszkodzenie śródbłonka naczyniowego układu oddechowego może być jednym z ważnych mechanizmów PSO [17].

Przedstawione wyniki wskazują na istotną rolę NO, sE-selektyny i sP-selektyny oraz zmiany czynności śródbłonka naczyniowego w patomechanizmie powysiłkowego skurczu oskrzeli u chorych na alergiczną astmę oskrzelową.

Piśmiennictwo

- Albelda SM. The role of cell adhesion molecules in asthma – an overview. *New Drugs in Allergy and Asthma* 1993; 43: 141-150.
- Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise – induced asthma is... *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 453-459.
- Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 1995; 27: 91-97.
- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 1988; 40: 49-85.
- Bloemen PGM, Henricks PAJ, Nijkamp FP. Cell adhesion molecules and asthma. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 128-141.
- Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 427-438.
- Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ. Cytokines in symptomatic asthma airways. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 958-967.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.
- Curran AD. The role of nitric oxide in the development of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111: 1-4.
- De Gouw HW i wsp.: Role of nitric oxide in the airway response to exercise in healthy and asthmatic subjects. *J. Appl. Physiol.* 2001; 90(2): 586-589
- Eggleston PA. Methods of exercise challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 666-669.
- Fieri M. Nitric oxide in allergic rhinitis and asthma. *Allergy and Asthma Proc* 1998; 19: 349-351.
- Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14: 506-512.
- Georas SN, Liu MC, Newman W. Altered adhesion molecule expression and endothelial activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 261-269.
- Gosset P, Tillie-Leblond I, Janin A. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 69-77.
- Hosselet JJ. Role of adhesion molecules in bronchial inflammation and bronchial hyperreactivity. *Allerg Immunol* 1994; 26: 278-282.
- Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K i wsp. Thrombomodulin in exercise – induced asthma. *Int Med* 1995; 34: 158-162.
- Kharitonov SA, Yates D, Robbom RA. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-135.
- Mahler DA. Exercise-induced asthma. *Medicine and science in sports and exercise* 1993; 554-561.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 48: 109-141.
- Montefort S, Lai CKW, Kapahi P. Circulating adhesion molecules in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1149-1152.
- Nourshargh S. Mechanisms of neutrophil and eosinophil accumulation in vivo. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 60-64.
- Pilewski JM, Albelda SM. Cell adhesion molecules in asthma: homing, activation and airway remodelling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 12: 1-3.
- Ryan G, Dolovich MB, Roberts RS i wsp. Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 195-199.
- Smith CR, Barker JN, Lee TH. Adhesion molecules in allergic inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 75-78.
- Tan RA, Spector SL. Exercise – induced asthma. *Sports Med* 1998; 25: 1-6.
- Tonnel AB, Gosset PH, Molet S. i wsp. Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammation. *Annals New York Academy of Sciences* 1996; 9-20.
- Van den Toorn LM, Prins J, Overbeek S i wsp. Adolescents in clinical remission of atopic asthma have elevated exhaled nitric oxide levels and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 953-957.