

Wpływ suplementacji donorem cysteiny na zwężenie oskrzeli wywołane ćwiczeniami fizycznymi

JENNIFER M. BAUMANN, KENNETH W. RUNDELL, TINA M. EVANS i ALAN M. LEVINE
Human Performance Laboratory, Marywood University, Scranton, PA

STRESZCZENIE

BAUMANN, J. M., K. W. RUNDELL, T. M. EVANS i A.M. LEVINE. Wpływ suplementacji donorem cysteiny na zwężenie oskrzeli wywołane ćwiczeniami fizycznymi. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Tom 37, Nr 9, str. 1468–1473, 2005.

Cel: Reaktywne formy tlenu/reaktywne formy azotu (ROS/RNS) w komórkach dróg oddechowych mogą być ważne w zwężeniu oskrzeli następującym po ćwiczeniach fizycznych. Glutation (GSH) jest głównym antyoksydantem płuc i może wpływać na patologiczne odpowiedzi u osób ze zwężeniem oskrzeli wywołanym ćwiczeniami fizycznymi (EIB – ang. *exercise-induced bronchoconstriction*). W tej pracy zbadano wpływ suplementacji niezdenaturowanym białkiem serwatki (UWP – ang. *undenatured whey protein*) u osób wykazujących zwężenie dróg oddechowych w następstwie samorzutnej hiperwentylacji w warunkach prawidłowego stężenia dwutlenku węgla we krwi (EVH – ang. *eucapnic voluntary hyperventilation*), zastępczego testu prowokacji stosowanego w celu zdiagnozowania EIB. UWP jest donorem cysteiny, który wzmacnia produkcję GSH.

Metody: W badaniach prowadzonych losowo, metodą ślepej próby, z uwzględnieniem grupy otrzymującej placebo, 18 osób ze zdiagnozowanym EIB (wiek: $25,2 \pm 9,01$ lat; waga: $77,3 \pm 18,92$ kg; wzrost: $1,7 \pm 0,09$ m) o spadkach FEV₁ (natężonej objętości oddechowej, ang. *forced expiratory volume*) $\geq 10\%$ otrzymywało dziennie 30 g UWP (TX) lub kazeiny jako placebo (PL). Osoby te poddano 6-min próbom EVH przed oraz w 4. i 8. tygodniu suplementacji. Wydechany tlenek azotu (eNO – ang. *exhaled nitric oxide*) mierzono seryjnie przed spirometrią oraz w tygodniowych odstępach. Spirometrię wykonywano przed oraz 5, 10 i 15 min po próbach.

Wyniki: Osoby poddane badaniu wykazywały znaczącą średnią poprawę spadku FEV₁ po teście prowokacji między tygodniem 0 ($-22,6 \pm 12,22\%$) a 4. ($-18,9 \pm 12,89\%$, $P < 0,05$) i 8. tygodniem przyjmowania TX ($-16,98 \pm 11,61\%$, $P < 0,05$) i znaczące średnie zmniejszenie spadków szczytu FEF₂₅₋₇₅ między tygodniem 0 ($-40,6 \pm 15,28\%$) a 4. ($-33,1 \pm 17,11\%$, $P < 0,01$) i 8. tygodniem przyjmowania TX ($-29,7 \pm 17,42\%$, $P < 0,05$). W żadnym czasie nie obserwowano zmian FEV₁ lub FEF₂₅₋₇₅ u grupy przyjmującej placebo. Średni poziom eNO nie różnił się u grup PL i TX w 0., 4., i 8. tygodniu (odpowiednio: $46,8 \pm 31,33$, $46,5 \pm 35,73$, $49,3 \pm 37,12$ vs $35,2 \pm 26,87$, $29,1 \pm 17,26$, $34,7 \pm 21,11$ ppb).

Wnioski: UWP może wzmacniać zdolność antyoksydacyjną płuc i być dobroczynnie terapeutycznie u osób wykazujących EIB, gdyż suplementacja nim poprawia funkcje płuc po teście prowokacji. Brak znaczących zmian poziomu eNO sugeruje, że poprawa funkcjonowania płuc spowodowana suplementacją UWP jest niezależna od eNO.

Słowa kluczowe: ASTMA, ZAPALENIE, FUNKCJE PŁUC, BIAŁKO SERWATKI, GLUTATION.

Stres oksydacyjny w astmie jest najprawdopodobniej wynikiem zarówno zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu / reaktywnych form azotu (ROS/RNS) jak i spadku stężenia przeciwutleniaczy w drogach oddechowych, występuje zatem niedobór rozmaitych antyoksydantów (16,28). W drogach oddechowych astmatyków wysoki jest także stopień peroksydacji lipidów (30). Lipidowe leukotrieny, które powstają w wyniku metabolizmu kwasu arachidonowego, są silnymi czynnikami skurczowymi w nadwrażliwości dróg oddechowych (14). Wykazano, że aktywność 5-lipoksygenazy jest zwiększana przez endogenne ROS (29). Glutation (GSH), zawierający siarkę związek tiolowy, jest komórkowym przeciwutleniaczem, który efektywnie usuwa ROS oraz wzmacnia antyoksydacyjną aktywność witamin C i E, uczestnicząc w regeneracji aktywnych zredukowanych form tych witamin z form rodnikowych. Związki podnoszące poziom GSH (4,6) i sam GSH (9) wykazują zdolność do dobroczynnego wpływu na funkcje dróg oddechowych zarówno u ludzi jak i u zwierząt.

Wysokie stężenia GSH stwierdzono w komórkach nabłonka płuc (24) oraz cieczy wyściełającej nabłonek pęcherzyków płucnych (8,13). Obniżony poziom GSH w komórkach dróg oddechowych (10) i

erytrocytach (28) oraz zwiększony poziom utlenionego glutationu (GSSG) w płynie po płukaniu oskrzelowo-pecherzykowym (16) są wskaźnikami stresu oksydacyjnego u astmatyków. GSH jest substratem enzymu - peroksydazy glutationowej (GSH-Px), która katalizuje redukcję ROS. Sugerowano, że niski poziom GSH w płucach może potęgować stan zapalny i nadwrażliwość (24), a GSH może być opcją terapeutyczną w chorobach płuc związanych ze skurczem oskrzeli (9). Stres oksydacyjny zaburza działanie oksydoredukcyjnego buforu GSH/GSSG i bezpośrednio wpływa na aktywację czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) (7), pobudzając w ten sposób ekspresję cytokin pozapalnych.

N-acetylocysteina (NAC) i nacystelina (NAL), donory cysteiny i prekursorzy glutationu, były z obiecującymi wynikami używane w celach terapeutycznych aby złagodzić stan zapalny w różnych chorobach płuc. Po suplementacji NAC obserwowano znaczący wzrost stężenia GSH w płynie po płukaniu oskrzelowo-pecherzykowym (22), poprawę funkcji płuc (5) oraz osłabienie wywołowanego przez oksydanty skurczu mięśni oskrzelowych (11). NAC zmniejsza peroksydację lipidów, zdolność NF- κ B do wiązania się z DNA oraz ekspresję indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) (6). Wykazano, że NAL zwiększa poziom GSH w komórkach nabłonka płuc oraz ogranicza wytwarzanie ROS (4, 15); podobnie jak NAC, NAL hamuje NF- κ B (4). Niezdenaturowane białko serwatki (UWP – ang. *undenatured whey protein*), bogate w glutamylcysteinę i cystynę, podnosi poziom GSH w limfocytach (18). UWP poprawiało także funkcje płuc i zwiększało stężenie GSH w surowicy w badaniach przeprowadzonych na jednym pacjencie z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (21).

Nie są znane korzyści ze stosowania UWP celem wzmocnienia płucnego statusu oksydoredukcyjnego i terapii stanu zapalnego w astmie. Obecne badania sprawdzały skuteczność suplementacji UWP w przeciwdziałaniu zwężeniu dróg oddechowych po samorzutnej hiperwentylacji w warunkach prawidłowego stężenia dwutlenku węgla we krwi (EVH), zastępczym teście prowokacji przeprowadzonym w celu zidentyfikowania EIB (26). Wyszliśmy hipotezę, że ośmiotygodniowe podawanie UWP będzie łagodzić objawy zwężenia oskrzeli w odpowiedzi na EVH i będzie zmniejszało poziom wydychanego tlenu azotu.

METODY

Osoby uczestniczące w badaniu. W badaniu uczestniczyło osiemnaście zdrowych osób (7 mężczyzn, 11 kobiet). Uśredniona charakterystyka tych osób została przedstawiona w Tabeli 1. Wszystkie procedury badawcze zostały zaaprobowane przez komisję etyczną Marywood University, a osoby uczestniczące w badaniu podpisały pisemną zgodę na udział. Nabór uczestników badania odbył się za pomocą lokalnego ogłoszenia. Następnie osoby te poproszono o wypełnienie kwestionariuszy medycznych. Osoby, u których na podstawie spadku $FEV_1 \geq 10\%$ po 6. minutach testu prowokacji EVH zdiagnozowano EIB, zaproszono do udziału w dalszych badaniach. Pięć osób przyznało, że przyjmuje wziewny agon-beta2 przed ćwiczeniami fizycznymi, jedna – fluticazon w połączeniu z wziewnym agonem-beta2; jedna – formoterol w połączeniu z wziewnym agonem-beta2; jedna – montelukast w połączeniu z wziewnym agonem-beta2; a dwie – fluticazon/salmeterol, montelukast i wziewny agon-beta2. Historię atopowej odpowiedzi na czynniki środowiskowe stwierdzono u 14 osób, zdiagnozowaną alergię – u 12.

Schemat badań. Badania prowadzono w sposób losowy, metodą podwójnej ślepej próby, z uwzględnieniem grupy kontrolnej otrzymującej placebo, równolegle. Uczestnicy badania zostali losowo przydzieleni do jednej z dwóch grup: otrzymującej UPW lub placebo (kazeinę) w ilości 30 g / dobę przez 8 tygodni. Zarówno UPW (TX) jak i placebo (PL) zostały dostarczone przez Immunotec Research Corporation Ltd. (Vaudreuil-Dorion, Quebec, Kanada). Uczestnicy badania otrzymali pojemniki z 10-dniowym zapasem przyjmowanej substancji i każdego tygodnia zgłaszali się po nowy pojemnik. Waga pojemnika była stosowana jako wskaźnik wykorzystania.

Uczestnicy badania z przepisanyimi lekami na astmę zostali poproszeni o ich czasowe odstawienie. Leki i ramy czasowe zawieszenia ich przyjmowania były następujące: krótko działające leki rozszerzające oskrzela, kromoglikan sodowy, nedocromil sodowy i bromek ipratropium - 4 godziny przed badaniem; leki rozszerzające oskrzela o przedłużonym działaniu lub przedłużonym uwalnianiu, leki przeciwhistaminowe - 48 godzin przed badaniem; antagoni leukotrienów i leki rozszerzające oskrzela stosowane w terapii łączonej - 4 dni przed badaniem (3). Dodatkowo, uczestnicy badania zostali poproszeni o powstrzymanie się od używania kofeiny i intensywnego wysiłku fizycznego w dniu badania i nieprzyjmowanie suplementów diety na dwa tygodnie przed badaniem i w trakcie jego trwania.

Pomiary antropometryczne. Wzrost uczestników badania mierzono bez butów, a wagę w lekkiej odzieży. Używano wykalibrowanej wagi belkowej (Healthometer, Sunbeam Products, Inc., Purvis, MS). Skład ciała oceniano za pomocą dwuwiązkowej absorpcjometrii rentgenowskiej (DEXA – ang. *dual energy x-ray absorptiometry*) (Lunar Prodigy Axial DEXA, General Electric Medical Systems, Waukesha, WI; enCORE Software, Version 6.60).

Test funkcji płuc. Funkcje płuc były badane za pomocą spirometrii, z zastosowaniem skomputeryzowanego pneumotachografu (Jaeger Masterscope PC, Hoechberg, Germany; LAB Manager

Software version 4.53.2, 2002). Maksymalną pojemność życiową (FVC – ang. *forced vital capacity*), FEV₁, stosunek FEV₁/FVC, przepływ w czasie natężonego wydechu na poziomie 25-75% maksymalnej pojemności życiowej (FEF₂₅₋₇₅) oraz szczytowy przepływ wydechowy (PEF – ang. *peak expiratory flow*) mierzono tuż przed oraz 15 min po EVH. Wszystkie operacje w ramach pomiaru funkcji płuc były prowadzone zgodnie z kryteriami ATS (2). Procedura wszystkich testów funkcji płuc obejmowała: 1) trzy oddechy o normalnej spoczynkowej objętości płuc, następnie 2) wdech do maksymalnej objętości płuc i 3) maksymalny wydech trwający przynajmniej 6 s z 4) końcowym maksymalnym wdechem. Funkcje płuc po teście prowokacji mierzono 5, 10 i 15 min po zakończeniu 6-minutowego testu prowokacji EVH. Jeśli jakkolwiek pomiar po teście prowokacji budził wątpliwości techniczne, był powtarzany.

Procedura EVH. Uczestnicy badania byli oceniani pod względem występowania EIB na podstawie EVH podczas badania przesiewowego, na poziomie wyjściowym oraz w 4. i 8. tygodniu. Warunki środowiskowe w laboratorium wynosiły 22°C oraz 50% RH (VWR Digital Hygrometer/ Thermometer, VWR International, Inc.). Test prowokacji EVH wymagał od każdego uczestnika oddychania suchym (< 3 mg H₂O / l) sprężonym gazem o temperaturze pokojowej składającym się z 21% tlenu, 5% dwutlenku węgla i pozostałej części azotu przez 6 min przy minutowej wentylacji (V_E) równej 30 x FEV₁, szacunkowo 85% maksymalnej wentylacji samorzutnej (MVV – ang. *maximal voluntary ventilation*) (3). Sprężony gaz przepływał z butli przez kalibrowany rotometr (Model 1110DK41XMGAA, Brooks Instrument Division, Emerson Electric Co., Hatfield, PA) do 300-g balonu meteorologicznego przez wysokociśnieniową rurkę i był dostarczany uczestnikom badania poprzez 35-mm rurkę oddechową, zastawkę zapobiegającą powtórnemu wdychaniu tego samego gazu oraz ustnik (Hans Rudolf, Kansas City, MO). Wydychany gaz przepływał przez czujnik przepływu powietrza, mierzono V_E i odnotowywano ją celem zweryfikowania intensywności oddychania (Vmax Spectra Metabolic Measurement Cart, SensorMedics, Yorba Linda, CA; CPX2 Software version 10-1a, czerwiec 2002).

Procedura pomiaru wydychanego tlenu azotu (eNO). Prowadzony w trybie online pomiar spoczynkowego eNO z wykorzystaniem procedury ograniczonego wydechu (REB – ang. *restricted exhaled breath*) (NOA 280i Nitric Oxide Analyzer, Accurate NO Breath Kit, Thermal Mass Flowmeter, NO Analysis software Version 3.21, Sievers Instruments, Boulder, CO) był stosowany seryjnie z tygodniowymi przerwami; eNO był mierzony przed spirometrią i EVH w tygodniach 0, 4 i 8 oraz podczas osobnych pobytów w laboratorium w 1., 3., 5., i 7. tygodniu. Techniki pomiarowe stosowano zgodnie z wytycznymi American Thoracic Society (1). Trzy wydechy były wykonywane bez zacisku na nosie, z przynajmniej 30 s przerwami między wydechami. Procedura obejmowała: 1) maksymalny wdech na całkowitą pojemność płuc przez 2-3 s i 2) natychmiastowy wydech wobec wzrastającego oporu wydechowego przez przynajmniej 6 s aż do uzyskania plateau NO trwającego przynajmniej 3 s. Uczestnicy badania byli poinstruowani aby podczas wydechu monitorować odczyt komputera i utrzymywać szybkość przepływu 50 ml /s ± 10%.

Analiza statystyczna. Dane analizowano za pomocą testu ANOVA, a następnie *post hoc* sparowanych testów t dla znaczących wartości F (SPSS version 11.5). Do określenia różnic między grupami zastosowano testy t dla prób niezależnych. Zależności między pomiarami spoczynkowymi a otrzymanym po teście prowokacji spadkiem FVC, FEV₁ i FEF₂₅₋₇₅ oceniano za pomocą współczynników korelacji Pearsona dla momentów mieszanych. W przypadku wszystkich porównań statystycznych poziom alfa ustalono jako P ≤ 0.05.

WYNIKI

Dwadzieścia jeden osób zakwalifikowano do badania, trzy z nich wycofały się przed jego rozpoczęciem. Wszystkie pozostałe osoby zakończyły 8-tygodniowe badanie. Między osobami z grup PL i TX nie stwierdzono żadnych różnic we wzroście, wadze lub wieku (Tabela 1). W ciągu 8 tygodni badania nie zaobserwowano zmian wagi, BMI lub procentowego udziału tkanki tłuszczowej. Dla żadnej zmiennej nie zaobserwowano różnic zależnych od płci.

Funkcje płuc. Średnie spoczynkowe funkcje płuc w tygodniu 0 przedstawiono w Tabeli 2. Nie odnotowano żadnych różnic w spoczynkowych parametrach funkcjonowania płuc u grup PL i TX na początku badania, w 4. i 8. tygodniu. Nie obserwowano żadnych różnic w spoczynkowych funkcjach płuc wewnątrz grup w ciągu całego czasu trwania badania. Średnie FEV₁ i FVC mieściły się w zakresie normy. Żaden z uczestników badania nie miał poniżej 85% przewidywanej wartości FEV₁ ani poniżej 90% przewidywanej wartości FVC. Dwie osoby z grupy TX i cztery osoby z grupy PL wykazywały poniżej 70% przewidywanych wartości FEF₂₅₋₇₅, co sugerowało łagodną astmę. W ani jednym przypadku nie zauważono żadnej znaczącej korelacji między spoczynkowymi funkcjami płuc a spadkami FVC, FEV₁ lub FEF₂₅₋₇₅ po teście prowokacji. Nie zaobserwowano żadnych różnic między grupami lub w obrębie grup w średniej V_E w ciągu 6 min EVH. W 0., 4. i 8. tygodniu średnia V_E wynosiła 111,4 ± 29,85, 115,1 ± 34,20 i 114,2 ± 28,03 l/min dla grupy TX i 123,3 ± 26,87, 120,8 ± 29,66, 119,7 ± 31,98 l/min dla grupy PL. Średni spadek szczytu FEV₁ po EVH był znacząco złagodzony w grupie TX w 4. tygodniu (P < 0,05); ta poprawa funkcji płuc utrzymywała się w ciągu 8-tygodniowego okresu suplementacji (Rys. 1A) (P < 0.05), aczkolwiek nie ujawniły się żadne istotne różnice między 4. a 8. tygodniem.

U grupy PL nie odnotowano żadnej różnicy między spadkami FEV₁ po EVH w 0., 4. i 8. tygodniu. Znacząca poprawa FEV₁ po EVH, wyrażona jako procentowa zmiana spadku FEV₁ po EVH na początku badania, została zaobserwowana u grupy TX w 4. (18,5 ± 23,52%) i 8. (27,6 ± 20,81%) tygodniu (Rys.1 i 2B) (odpowiednio: $P < 0,05$ i $P = 0,001$); żadnej poprawy nie stwierdzono u grupy PL ani w 4. (- 5,9 ± 36,76%), ani w 8. (- 18,9 ± 58,47%) tygodniu. Poszczególne zmiany FEV₁ przedstawiono w Tabeli 2. Grupa TX wykazywała znaczące obniżenie średniego spadku szczytu FEF₂₅₋₇₅ po EVH w 4. i 8. tygodniu w porównaniu z początkiem badania (Rys. 3, odpowiednio: $P < 0,05$ i $P < 0,01$; - 40,6 ± 15,28%, - 33,1 ± 17,11% i - 29,7 ± 17,41% odpowiednio dla 0., 4. i 8. tygodnia). Znaczące zmniejszenie spadku szczytu FEF₂₅₋₇₅ po EVH było także obserwowane między 4. a 8. tygodniem w grupie TX ($P < 0,05$). Nie odnotowano żadnych zmian spadku szczytu FEF₂₅₋₇₅ po EVH w grupie PL w żadnym czasie (- 30,6 ± 10,29%, - 32,4 ± 13,95%, i - 31,7 ± 19,17%, odpowiednio dla 0., 4. i 8. tygodnia).

Wydychany tlenek azotu. Nie stwierdzono żadnych znaczących różnic w średnich wartościach eNO w 0., 4., i 8. tygodniu zarówno u grupy PL (46,8 ± 31,33, 46,5 ± 35,73 i 49,3 ± 37,12 ppb) jak i TX (35,2 ± 26,87, 29,1 ± 17,26 i 34,7 ± 21,11 ppb). W porównaniu z poziomem bazowym, średni eNO w 4. tygodniu spadł o 0,5% w grupie PL i o 17,5% w grupie TX; w 8. tygodniu średni eNO wzrósł o 5,4% w grupie PL i spadł o 1,4% w grupie TX (Rys. 4A). Jednakże, średnia procentowa zmiana eNO w porównaniu z poziomem bazowym nie była istotna w żadnym czasie dla żadnej z grup (Rys. 4B).

DYSKUSJA

W obecnej pracy badaliśmy wpływ suplementacji UWP na funkcjonowanie dróg oddechowych po EVH. Procentowa zmiana FEV₁ po EVH była wykorzystywana jako miara niewłaściwej odpowiedzi funkcjonalnej płuc. U osiemnastu osób uczestniczących w badaniu wykryto EIB na podstawie spadku FEV₁ po EVH ≥ 10%; to kryterium użyte do zdefiniowania EIB jest zgodne z sugerowanym przez innych badaczy (12). Głównym odkryciem poczynionym w ramach obecnej pracy jest stwierdzenie, że suplementacja UWP prowadzi do znaczącego złagodzenia spadku FEV₁ i FEF₂₅₋₇₅ w 4. i 8. tygodniu. Co ciekawe, następowało to bez równoczesnego obniżenia poziomu eNOS, pośredniego markera stanu zapalnego dróg oddechowych.

Wykazano, że FEF₂₅₋₇₅ jest czułym wskaźnikiem niedrożności dróg oddechowych (20). Jednakże, konwencjonalne trapie wziewne są bardziej użyteczne i skuteczniejsze w terapii szerszych górnych dróg oddechowych niż węższych dolnych dróg oddechowych, ze względu na duży rozmiar cząsteczek wydychanej substancji (27). Suplementacja UWP prowadziła do znaczącego złagodzenia średniego spadku FEV₁ i FEF₂₅₋₇₅ po EVH w 4. i 8. tygodniu. Podczas gdy nie obserwowano żadnych znaczących różnic między średnim spadkiem FEV₁ między 4. a 8. tygodniem, stwierdzono dodatkową poprawę FEF₂₅₋₇₅, co sugeruje, że długotrwała suplementacja UWP może stanowić dodatkową ochronę dla głębiej położonych odcinków dróg oddechowych. Zatem długoterminowa suplementacja UWP, powyżej 4 tygodni, może okazać się użyteczna jako terapia wspomagająca. Suplementacja UWP dostarczyła ochrony przed spadkiem FEV₁ u 10 osób na 11 badanych. Osiem tygodni suplementacji UWP doprowadziło średnio do około 28% poprawy spadku FEV₁ po teście prowokacji. Chociaż jest to jednak mniej niż około 44% poprawy spadku FEV₁ po EVH osiąganej w wyniku zastosowania antagonisty receptora leukotrienowego - montelukastu (25), termin obecnych badań pokrywał się z początkiem sezonu alergii wiosennych, co mogło wpłynąć na nasze wyniki. Historię objawów alergicznych stwierdzono u 78% osób uczestniczących w naszym badaniu. Chociaż statystycznie nieistotnie, u grupy placebo średnia procentowa zmiana FEV₁ po EVH wykazywała tendencję do pogarszania się między 4. a 8. tygodniem (Porównaj: Rys. 1B), a w tym samym czasie eNO wzrastało u obu grup (Porównaj: Rys. 4), potwierdzając przypuszczenie, że początek sezonu alergii miał wpływ na drogi oddechowe osób uczestniczących w naszym badaniu.

Rekrutacja i aktywacja komórek pozapalnych w drogach oddechowych prowadzi do produkcji ROS/RNS. Nadmiar ROS/RNS może pokonać obronę antyoksydacyjną, wywołując stres oksydacyjny i w następstwie indukując mediatory prowadzące do EIB. Tripeptyd GSH jest uznany za kluczowy antyoksydant chroniący drogi oddechowe (8,13,24). Obniżenie zdolności antyoksydacyjnej w wyniku wzrostu ROS i RNS może powodować utlenienie GSH do GSSG bez możliwości odtworzenia GSH. Stwierdzono, że astmatycy mają zwiększony poziom GSSG w płynie po płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym (16). Produkty szlaku AA 5-lipoksygenazy są aktywowane przez ROS (29) i są silnymi stymulatorami nadwrażliwości dróg oddechowych (14). Dodatkowo, zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnego buforu GSH/GSSG aktywują NF-κB (7), czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za aktywację genów remodelujących i prozapalnych. Chociaż w obecnej pracy nie mierzono poziomu GSH, sugerujemy, że obserwowana poprawa funkcji płuc następuje najprawdopodobniej dzięki zwiększeniu stężenia GSH w płucach i jednoczesnemu obniżeniu aktywności czynników prozapalnych indukowanych przez stres oksydacyjny. Biorąc pod uwagę wpływ ROS/RNS na rozwój astmy, wzmocnienie zdolności antyoksydacyjnej w płucach mogłoby być użyteczne terapeutycznie. W rzeczywistości, w kilku pracach sugerowano, że podawanie prekursorów GSH mogłoby być dobroczynne w chorobach płuc charakteryzujących się występowaniem stanu zapalnego (4,5,6,15,21). Badania dowiodły, że prekursor GSH – NAC (22) i NAL

(15) zwiększając stężenie GSH w BALF i komórkach nabłonkowych płuc. Co więcej, inne badania wykazały poprawę funkcji płuc (5) i dobroczynny wpływ NAC na procesy zapalne w płucach (6,11). UWP zawiera wysokie stężenia glutamylcysteiny i cystyny, prekursorów GSH, o których wcześniej stwierdzono, że wzmacniają poziom GSH w całej krwi (21) i w limfocytach (18), co może odzwierciedlać status GSH w płucach (24).

Brak obniżenia średniego eNO u grupy przyjmującej UWP TX w ciągu 8-tygodniowej suplementacji jest trudny do wyjaśnienia. Wyższy poziom NO w wydychanym powietrzu u osób cierpiących na astmę jest uważany za wtórny skutek zwiększonej ekspresji iNOS w drogach oddechowych (23). Wykazano, że czynnik podnoszący poziom GSH, NAC, obniża ekspresję iNOS u szczurów (6). Opierając się na tej obserwacji, sformułowaliśmy hipotezę, że suplementacja UWP mogłaby obniżyć ekspresję iNOS i eNO u uczestników badania, którzy wykazywali zwężenie oskrzeli po EVH. Początek sezonu alergii między 4. a 8. tygodniem mógł interferować z detekcją znaczących zmian eNO (Porównaj: Rys. 4). Najnowsze dane sugerują, że osoby z alergią atopową wykazują podwyższony poziom eNO (19). Jednakże, nieznaczące statystycznie zmiany w eNO obserwowane przy suplementacji UWP po 8 tygodniach traktowania u grupy TX mogły być wynikiem zwiększonego antyoksydacyjnego działania GSH, zapobiegającego reakcji NO z ROS, prowadzącej do powstawania nadtlenoazotynu (ONOO⁻). NO został zidentyfikowany jako zmiatacz ROS, a suplementacja NAC łagodzi uszkodzenia tkanki płucnej spowodowane przez ONOO⁻, najprawdopodobniej poprzez zahamowanie łączenia się NO z anionorodnikami ponadtlenkowymi (O₂⁻) lub/i aktywację układów antyoksydacyjnych (17). Podobnie jak NAC, UWP może hamować tworzenie ONOO⁻ poprzez wzmocnienie statusu antyoksydacyjnego. Podsumowując, nasze wyniki wykazują, że UWP może chronić przed EIB, niezależnie od eNO. Chociaż w przypadku UWP ochrona przed spadkami FEV₁ po EVH była słabsza niż obserwowana w przypadku leczenia farmakologicznego za pomocą montelukastu, UWP może przynosić korzyści terapeutyczne poprzez wzmocnienie GSH w płucach u osób z EIB i może być wykorzystywane jako terapia wspomagająca. Ponieważ w tym badaniu nie przeprowadzono pomiarów biochemicznych, wyjaśnienie dokładnego mechanizmu działania UWP jest oparte na domysłach. Obserwacje poczynione w ramach obecnego badania dostarczają podstaw do stosowania UWP jako niefarmakologicznej strategii terapeutycznej w przypadku dysfunkcji dróg oddechowych. Konieczne są dodatkowe badania i wyjaśnienie mechanizmu, za pomocą którego UWP łagodzi zaburzenia funkcji płuc po EVH.

Badania były finansowane z grantu otrzymanego od Immunotec Research Corporation Ltd., Vaudreuil-Dorion, Quebec, Canada, oraz od Marywood University, Scranton, PA. W publikacji przedstawiono własne poglądy, opinie i obserwacje autorów i nie powinny być one uważane za oficjalne stanowisko Marywood University. Autorzy wyrażają wdzięczność sportowcom, którzy uczestniczyli w tym badaniu.

PIŚMIENNICTWO

1. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:2104–2117, 1999.
2. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Standardization of spirometry. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1107–1136, 1995.
3. ANDERSON, S. D., G. J. ARGYROS, H. MAGNUSSEN, and K. HOLZER. Provocation by eucapnic voluntary hyperpnoea to identify exercise induced bronchoconstriction. *Br. J. Sports Med.* 35:344–347, 2001.
4. ANTONICELLI, F., M. PARMENTIER, E. M. DROST, N. HIRANI, I. RAHMAN, K. DONALDSON, and W. MACNEE. Nacystelyn inhibits oxidant-mediated interleukin-8 expression and NF-kappaB nuclear binding in alveolar epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32:492–502, 2002.
5. BEHR, J., K. MAIER, B. DEGENKOLB, C. KROMBACK, and C. VOGELMEIER. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis: adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 1897–1901, 1997.
6. BLESÁ, S., J. CORTIJO, M. MATA, A. SERRANO, D. CLOSA, F. SANTANGELO, J. M. ESTRELA, J. SUCHANKOVA, and E. J. MORCILLO. Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammation response to antigen. *Eur. Respir. J.* 21:394–400, 2003.
7. BOWIE, N. P., N. and MOYNAGH, L. A. J. O'NEILL. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumour necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *J. Biol. Chem.* 272:25941–25950, 1997.
8. CANTIN, A. M., S. L. NORTH, R. C. HUBBARD, and R. G. CRYSTAL. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J. Appl. Physiol.* 63:152, 1987.

9. CASONI, G. L., P. CHITANO, S. PINAMONTI, M. CHICCA, A. CIACCIA, L. FABBRI, and A. PAPI. Reducing agents inhibit the contractile response of isolated guinea-pig main bronchi. *Clin. Exp. Allergy*. 33:999–1004, 2003.
10. CORRADI, M., G. FOLESANI, R. ANDREOLI, et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:395–399, 2003.
11. CORTIJO, J., M. MARTI-CABRERA, J. G. DE LA ASUNCION, et al. Contraction of human airways by oxidative stress protection by N-acetylcysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 27:392–400, 1999.
12. CRAPO, R. O., R. CASABURI, A. L. COATES, P. L. ENRIGHT, J. L. HANKINSON, and C. G. IRVIN. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:309–29, 2000.
13. DAULETBAEV, N., J. RICKMANN, K. VIEL, R. BUHL, T. O. WAGNER, and J. BARGON. Glutathione in induced sputum of healthy individuals and patients with asthma. *Thorax*. 56:13–18, 2001.
14. DRAZEN, J. M. Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:S193–200, 1998.
15. GILLISSEN, and A. D. NOWAK. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in antioxidant therapy. *Respir. Med.* 92:609–623, 1998.
16. KELLY, F. J., I. MUDWAY, A. BLOMBERG, A. FREW, and T. SANDSTROM. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 354:482–483, 1999.
17. KOKSEL, O., I. CINEL, et al. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 17:263–70, 2004.
18. LANDS, L. C., V. L. GREY, A. A. SMOUNTAS. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J. Appl. Physiol.* 87:1381–1385, 1999.
19. LANGLEY, S. J., S. GOLDTHORPE, M. CRAVEN, J. MORRIS, A. WOODCOCK, and A. CUSTOVIC. Exposure and sensitization to indoor allergens: association with lung function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide measures in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:362–368, 2003.
20. LEBECQUE, P., P. KIAKULAND, and A. L. COATES. Spirometry in the asthmatic child: is FEF25-75 a more sensitive test than FEV1/FVC? *Pediatr. Pulmonol.* 16:19–22, 1993.
21. LOTHIAN, B., V. GREY, R. J. KIMOFF, and L. C. LANDS. Treatment of obstructive airway disease with a cysteine donor protein supplement: a case report. *Chest*. 117:914–916, 2000.
22. MEYER, A., R. BUHL, and H. MAGNUSSON. The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 7:431–436, 1994.
23. MULRENNAN, and S. A., A. E. REDINGTON. Nitric oxide synthase inhibition: therapeutic potential in asthma. *Treat. Respir. Med.* 3:79–88, 2004.
24. RAHMAN, and I. W. MACNEE. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16:534–554, 2000.
25. RUNDELL, K.W., B. A. SPIERING, J. M. and BAUMANN, T. M. EVANS. A single dose montelukast attenuates airway hyperresponsiveness during cold air exercise and eucapnic voluntary hyperventilation. *Br. J. Sports Med.* 2004.
26. RUNDELL, K. W., S. D. ANDERSON, B. A. SPIERING, and D. A. JUDELSON. Field exercise vs laboratory eucapnic voluntary hyperventilation to identify airway hyperresponsiveness in elite cold weather athletes. *Chest*. 125:909–15, 2004.
27. TASHKIN, DP. The role of small airway inflammation in asthma. *Allergy Asthma Proc.* 23:233–42, 2002.
28. VURAL, H. and K. UZUN. Serum and red blood cell antioxidant status in patients with bronchial asthma. *Can. Respir. J.* 7:476–480, 2000.
29. WERZ, O., D. SZELLAS, and D. STEINHILBER. Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line. *Eur. J. Biochem.* 267:1263–9, 2000.
30. WOOD, L. G., P. G. GIBSON, and M. L. GARG. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur. Respir. J.* 21:177–186, 2003.

Adres do korespondencji: Kenneth W. Rundell, Ph.D., Professor of Health Sciences, Human Performance Laboratory, Marywood University, 2300 Adams Avenue, Scranton, PA 18509-1598; E-mail: rundell@es.marywood.edu.

Zgłoszone do publikacji w styczniu 2005.

Zaakceptowane do publikacji w kwietniu 2005.