

# Substancja P i neuropeptyd Y nie są uwalniane do krążenia w czasie powysiłkowego skurczu oskrzeli

## Substance P and neuropeptide Y are not released into circulation during exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic patients

ANNA DOR, JERZY LIEBHART, EWA LIEBHART, ALINA ORDA, JÓZEF MAŁOLEPSZY

Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

Mimo, że astma oskrzelowa definiowana jest jako choroba o podłożu zapalnym, mechanizmy neuronalne uważane są za ważny element w patogenezie tej choroby. Neuropeptydy uwalniane z neuronów czuciowych, takie, jak substancja P wywołują wiele prozapalnych efektów takich, jak: zwiększone wydzielanie śluzu, przesiek i skurcz mięśni gładkich. Przeciwnie, zwężenie naczyń jest wywoływane przez neuropeptyd Y uwalniany z nerwów sympatycznego układu nerwowego.

W celu określenia roli niecholinergicznego i nieadrenergicznego układu nerwowego w patogenezie powysiłkowego bronchospazmu przebadaliśmy 39 chorych na astmę oskrzelową. Wykonaliśmy u tych osób test wysiłkowy zgodnie z zalecanym standardem (8 min wysiłku na cykloergometrze rowerowym z submaksymalną akcją serca). Za dodatnią próbę wysiłkową uznano taką, w której parametr  $FEV_1$  zmniejszył się o więcej niż 15%. Na podstawie tego kryterium u 17 osób stwierdzono bronchospazm po wysiłku. Obie grupy nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku i podstawowych parametrów spirometrycznych. W celu oznaczenia stężenia neuropeptydu Y (NPY) i substancji P (SP) pobierano krew przed wysiłkiem, bezpośrednio po oraz po 15 i 30 minutach po wysiłku.

W grupie chorych z astmą wysiłkową i bez komponentu wysiłkowego nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniach SP i NPY przed wysiłkiem (odpowiednio  $p=0,57$  i  $0,12$ ). Również nie obserwowano żadnych różnic istotnych statystycznie w stężeniach tych neuropeptydów po wysiłku. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) przeprowadzona dla stężeń SP i NPY wykazała, że nie ulegają one zmianie pod wpływem wysiłku zarówno w grupie z dodatnim ( $p=0,70$ ;  $0,53$  odpowiednio), jak i ujemnym ( $p=0,51$ ;  $0,68$  odpowiednio) wynikiem testu prowokacyjnego.

Wydaje się na podstawie przeprowadzonego badania, że substancja P i neuropeptyd Y nie uczestniczą w patomechanizmie powysiłkowego bronchospazmu.

*Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(4), 201-204*

**Słowa kluczowe:** *astma oskrzelowa, neuromediatory, powysiłkowy bronchospazm*

Although bronchial asthma is commonly accepted as an inflammatory disease of the airways, neural mechanisms seem to contribute to its symptomatology. Neuropeptides such as substance P (SP) released from sensory nerves have proinflammatory properties and induce smooth muscle contraction, as well as microvascular leakage and increased mucus production. Conversely, vasoconstrictor response is mediated by the release of neuropeptide Y (NPY) from sympathetic nerves.

To investigate the role of nonadrenergic, noncholinergic pathway in the pathogenesis of exercise induced bronchoconstriction, we performed exercise test in 39 subjects with bronchial asthma. The patients were examined according to a standardised protocol with 8 minutes of cycling at 80% of the  $VO_2$  max. A postexercise bronchospasm was considered to have occurred if  $FEV_1$  fell  $\geq 15\%$  with reference to baseline value. Based on the applied criteria, exercise-induced asthma (EIA) was diagnosed in 17 patients; the results of the test were negative in the remaining 22 asthmatics. Both groups were homogeneous with regard to age and baseline spirometric values. Plasma concentrations of SP and NPY were determined by radioimmunoassay (DRG, Germany) in blood samples taken before and at 1, 15 and 30 minutes after completion of the exercise.

Preexercise SP as well as NPY plasma concentrations did not differ significantly between groups of patients with and without exercise – induced bronchoconstriction ( $p=0.57$  and  $0.12$  respectively). Further, no significant post exercise variability, tested by use of analysis of variance (ANOVA), was found for both neuropeptides examined in the group of patients with ( $p=0.70$  and  $0.53$  respectively) as well as in those without exercise induced bronchoconstriction ( $p=0.51$  and  $0.68$  respectively).

These results may suggest that substance P and neuropeptide Y do not contribute to exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic patients.

*Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(4), 201-204*

**Key words:** *bronchial asthma, neuropeptides, exercised-induced asthma*

Bronchospazm po wysiłku obserwowany jest u 36-79% chorych na astmę oskrzelową [1,2,3,4]. Wystąpienie tego zjawiska uważane jest za bardzo swoistą, ale mało czułą cechę astmy. Pomimo tego, że od dawna wykonanie testu wysiłkowego znajduje się w standardzie postępowania dia-

gnostycznego, do tej pory nie są jasne mechanizmy tego zjawiska. Powszechnie uznane są dwie teorie: jedna podkreślająca rolę wzrostu osmolarności dróg oddechowych podczas wysiłku fizycznego, będącego bodźcem do wyzwolania mediatorów z komórek tucznych; druga –

akcentująca znaczenie gry naczyniowej w powstawaniu zwiężenia oskrzeli. Występujące po wysiłku fizycznym przekrwienie oraz obrzęk błony śluzowej mogłoby być odpowiedzialne za przejściowe zaburzenia wentylacji. Każda z tych teorii ma swoich zwolenników, ale nie tłumaczy wszystkich obserwowanych zjawisk [5,4].

Bardzo interesujący i dotychczas niezbadany jest potencjalny udział nieadrenergicznego, niecholinergicznego układu nerwowego w powstawaniu powysiłkowego bronchospazmu. Od kilkunastu lat znana jest hipoteza tzw. „zapalenia neurogennego”. Tachykininy (neurokinina A, substancja P, oraz peptyd zależny od genu kalcytoniny – CGRP), uwalniane po pobudzeniu czuciowych bezmielinowych włókien C, wywołują wiele zjawisk charakterystycznych dla procesu zapalnego: powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych i wydzielanie śluzu, aktywują komórki zapalne. Włókna C są stymulowane przez wiele bodźców fizycznych i chemicznych. Stwierdzono pobudzenie ich pod wpływem dymu tytoniowego, kapsaicyny, formaliny, eteru, neurotoksyn, bradykininy [6,7]. Wzrost osmolarności wydzieliny w drzewie oskrzelowym jest wystarczającym bodźcem do pobudzenia tych włókien. Wykazano, że włókna C szczura pobudzane są przez wzrost osmolarności, a nie przez obniżenie temperatury podczas szybkiego oddychania powietrzem o niskiej wilgotności [8].

Szczególą uwagę zwróciliśmy na substancję P (SP), której najważniejszym efektem działania jest rozszerzenie naczyń oraz zwiększenie ich przepuszczalności. SP powoduje również skurcz oskrzeli (działa słabiej niż histamina czy acetylocholina). Neuropeptyd Y (NPY) z kolei powoduje skurcz naczyń oraz redukuje przesiek wywołany przez SP. Jego działanie na oskrzela przejawia się skurczem mięśniówki, jednakże efekt ten jest słabo zaznaczony i przebiega prawdopodobnie za pośrednictwem  $PGF_{2\alpha}$ . Neuropeptyd Y uwalniany jest z zakończeń układu adrenergicznego. Pobudzenie układu sympatycznego podczas wysiłku fizycznego może sprzyjać także wzmożonemu uwalnianiu tego neuromediatora [6,7].

Celem pracy była próba oceny, czy SP i NPY uczestniczą w mechanizmie powysiłkowego bronchospazmu. Ocena stężenia neuromediatorów w układzie oddechowym, a zwłaszcza dynamiki ich zmian podczas wysiłku fizycznego poprzez badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, jest zadaniem trudnym i wątpliwym etycznie. Poddawanie chorego bronchoskopii dla pobrania materiału do badań kilkakrotnie i to także po wysiłku fizycznym wydaje się być niemożliwe do przeprowadzenia. Również wykorzystanie indukowanej plwociny uzyskiwanej po inhalacji hipertonicznego roztworu NaCl (dodatkowa prowokacja) nie jest w tym przypadku możliwe. Z tego powodu zdecydowaliśmy się na mniej inwazyjną metodę oznaczania stężenia neuromediatorów – w osoczu krwi obwodowej.

## PACJENCI I METODY

Do badania kwalifikowano pacjentów z rozpoznaną astmą oskrzelową. Chorzy mieli odstawić kortykosteroidy oraz kromony na 2 tygodnie przed spodziewanym testem wysiłkowym. Podczas wykonywania prowokacji chorzy nie byli pod wpływem działania leków rozszerzających oskrzela, zgodnie z ogólnie stosowanymi zaleceniami. Każdy chory miał przeprowadzoną próbę wysiłkową. Test wysiłkowy wykonywano na cykloergometrycznym rowerowym. Chorzy byli obciążani tak, by uzyskać przez 8 min stabilną submaksymalną akcję serca na poziomie  $80\% V_{O_{2max}}$ . Kontrola spirometryczna przeprowadzana była przed, bezpośrednio po oraz po 5, 10, 20 i 30 minutach po jego zakończeniu. Do badań tych wykorzystano spirometr firmy Vitalograf oznaczając natężoną pojemność życiową (FVC) oraz natężoną objętość wydechową pierwszosekundową ( $FEV_1$ ). Wynik próby prowokacyjnej uznawano za dodatni, gdy  $\Delta FEV_1$  była  $\leq -15\%$  wartości wyjściowej.

Krew (do oznaczenia neuropeptydów) pobierano przed, bezpośrednio po wysiłku oraz po 15 i 30 min od zakończenia testu z żyły odłokciowej. Pobraną krew (20 ml) wraz z 500 mcl EDTA oraz 200 mcl traskolanu wirowano w temperaturze  $4^{\circ}C$  z prędkością 1600 xg przez 15 minut. Osocze było zamrażane ( $-70$  st.C) do czasu oznaczeń (nie dłużej niż 4 miesiące). Stężenie NPY było oznaczane testem radioimmunometrycznym firmy Peninsula- RIK 7180, a SP – RIK 7451 tej samej firmy. Surovice były ekstrahowane w SEP-Column-C18 buforami: 1% kwasem trójfluorooctowym oraz 60% acetonitrylem w 1% kwasie trójfluorooctowym. Zmienność wewnątrzseryjna RIK 7180 wynosiła 3,8%, międzyseryjna 7,4%. RIK 7451 cechował się zmiennością wewnątrzseryjną  $-3,6\%$ , międzyseryjną  $-6,9\%$ .

## Analiza statystyczna

Chorych podzielono na dwie grupy – z dodatnim i ujemnym wynikiem testu wysiłkowego. Zmienne o rozkładzie zbliżonym do normalnego (wiek i wyjściowe wartości spirometryczne) opisano przez parametry tego rozkładu tj. średnią arytmetyczną (X) i odchylenie standardowe (SD). Do porównania wartości pomiędzy tymi parametrami w poszczególnych grupach posłużono się testem t-Studenta. Pozostałe zmienne, nie spełniające kryteriów rozkładu normalnego, opisano za pomocą mediany (Me), oraz kwartyli (Qrt): górnego i dolnego. Porównania zmiennych w obu grupach w tych przypadkach przeprowadzono za pomocą testu Manna-Whitney'a. Zmiany wartości SP oraz NPY pod wpływem prowokacji wysiłkiem oceniano analizą wariancji dla jednej zmiennej (ANOVA). Przyjęto poziom istotności  $\alpha = 0,05$ .

## WYNIKI

Do badania zakwalifikowano 39 osób z astmą oskrzelową. Test uznano za dodatni u 17 (9 kobiet), a ujemny

u 22 (12 kobiet) chorych. Obie grupy nie różniły się istotnie statystycznie (tab. I) pod względem wieku i wyjściowych wartości podstawowych parametrów spirometrycznych (FVC, FEV<sub>1</sub>).

Tab. I. Charakterystyka chorych

Parametr	Dodatni wynik testu n=17 (X ± SD)	Ujemny wynik testu n=22 (X ± SD)	Test t-Studenta (p)
Wiek (lata)	30,5±11,6	32,0±12,6	0,71
FEV <sub>1</sub> % normy	95,8±13,3	102,2±14,2	0,16
FVC% normy	104,3±15,6	105,5±13,1	0,79

X – średnia arytmetyczna

SD – odchylenie standardowe

Przed obciążeniem wysiłkiem stężenia obu badanych neuropeptydów nie różniły się istotnie statystycznie w obu badanych grupach (tab. II).

Tab. II. Porównanie stężeń SP i NPY przed obciążeniem wysiłkiem w grupach z dodatnim (n=17) i ujemnym (n=22) wynikiem testu

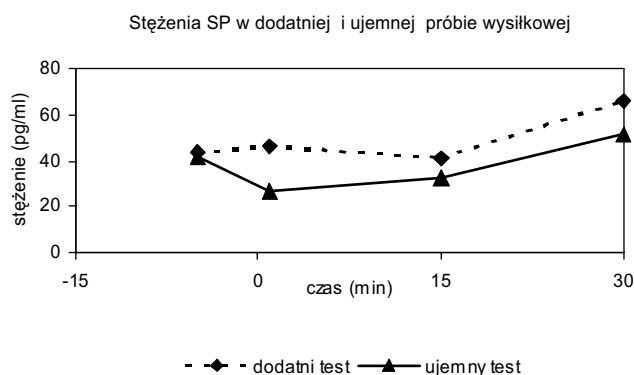
Parametr	Me	LQrt	UQrt	Test Manna-Whitney'a (p)
Stężenie SP (pg/ml) (dodatni wynik testu)	28,7	17,4	54,2	0,57
Stężenie SP (pg/ml) (ujemny wynik testu)	23,4	18,1	32,6	0,57
Stężenie NPY (pg/ml) (dodatni wynik testu)	8,64	7,2	13,4	0,12
Stężenie NPY (pg/ml) (ujemny wynik testu)	6,06	4,1	10,0	0,12

Me – mediana; p – prawdopodobieństwo; LQrt – dolny kwartył; Uqrt – górny kwartył

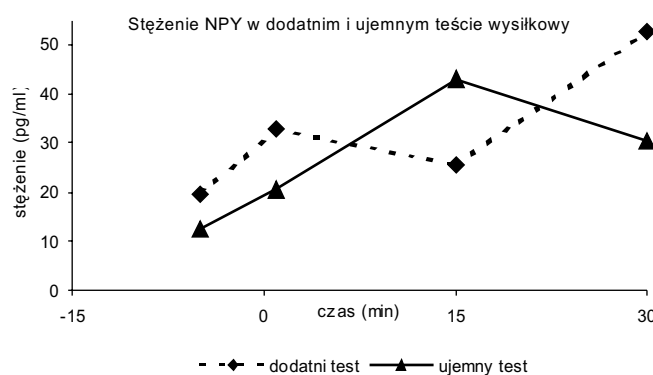
Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) przeprowadzona dla stężeń SP wykazała, że nie ulegają one zmianie pod wpływem wysiłku, zarówno w grupie z dodatnim (F=0,47; p=0,70), jak i ujemnym (F=0,78; p=0,51) wynikiem testu prowokacyjnego. Identyczne wyniki uzyskano dla NPY (odpowiednio F=0,75; p=0,53 oraz F=0,50; p=0,68). Dynamikę zmian obu neuropeptydów zilustrowano na rycinach (ryc. 1 i 2).

## DYSKUSJA

Pomimo tego, że astma oskrzelowa definiowana jest jako choroba o podłożu zapalnym, mechanizmy neuronalne uważane są za ważny element w jej patogenezie. Na czynność układu oddechowego wpływa nie tylko adrenergiczny



Ryc. 1. Stężenia (pg/ml) SP w surowicy krwi wyrażone w postaci średnich u osób z astmą oskrzelową wysiłkową (n=17) i u osób z astmą oskrzelową bez komponentu wysiłkowego (n=22) przed testem wysiłkowym i po 1, 15 i 30 min po jego zakończeniu



Ryc. 2. Stężenia (pg/ml) NPY w surowicy krwi wyrażone w postaci średnich u osób z astmą oskrzelową wysiłkową (n=17) i u osób z astmą wysiłkową bez komponentu wysiłkowego (n=22) przed testem wysiłkowym i po 5, 15 i 30 min po jego zakończeniu

ny i cholinergiczny, lecz także nieadrenergiczny i niecholinergiczny układ nerwowy. Mediatorami tego układu są neuropeptydy obecne w czuciowych, parasympatycznych i sympatycznych neuronach. Neuropeptydy uwalniane z włókien czuciowych (tachykininy, do których należą SP, NKA, CGRP) powodują zwężenie oskrzeli, rozszerzenie naczyń i wzrost ich przepuszczalności. VIP oraz tlenek azotu, wyzwalane przez włókna parasympatyczne, powodują rozszerzenie oskrzeli oraz naczyń. Zakończenia włókien układu sympatycznego uwalniają neuropeptyd Y, który zwęża naczynia oskrzeli oraz powoduje skurcz mięśniówki gładkiej [6,7]. Jeszcze niedawno traktowano zaburzenia regulacji neurohumoralnej za jeden z głównych powodów występowania nadreaktywności oskrzeli w astmie. Sądzono, że zmniejszona ilość VIP-ergicznych włókien jest charakterystyczna dla ciężkiej astmy oskrzelowej [9].

W ostatnio przeprowadzonych badaniach autorzy, porównując zawartość włókien nerwowych u chorych na astmę oskrzelową z osobami zdrowymi, nie wykazali zmniejszonej zawartości włókien zawierających VIP [10]. Stwierdzili jednak mniejszą niż u osób zdrowych ilość włókien zawierających NPY. Nie obserwowano natomiast

zależności między ilością włókien nerwowych i ciężkością astmy [11].

Ze względu na wpływ nieadrenergicznego, niecholinergicznego autonomicznego układu nerwowego na grę naczyniową oraz mięśniówkę oskrzeli w narządzie oddechowym próbowano wyjaśnić spadek wentylacji po wysiłku aktywacją tego układu. Ukazało się kilka prac doświadczalnych sugerujących istotną rolę neuromediatorów w astmie wysiłkowej. Wykazano u świń morskich, że tachykininy są odpowiedzialne za bronchospazm związany z oddychaniem powietrzem o niskiej wilgotności [12,13]. Wcześniej wykonane badania polegające na zablokowaniu receptorów dla tachykinin NK<sub>1</sub> za pomocą FK-888 wykazały szybszy powrót parametrów spirometrycznych do wartości wyjściowych u chorych na astmę oskrzelową. Nie miało to jednak wpływu na sam spadek wentylacji po wysiłku [14]. U świń morskich selektywny antagonist NK<sub>1</sub>-CP-96,345 redukował o 50% opór dróg oddechowych wywołany suchym powietrzem. Wykazano także addycyjny wpływ zablokowania receptora NK<sub>2</sub> na przeciwdziałanie spadkowi wentylacji po wysiłku [15]. W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy publikacji dotyczących zachowania się neuromediatorów u ludzi po obciążeniu wysiłkiem

W naszej pracy oznaczaliśmy stężenia SP oraz NPY w krwi żyłnej przed, bezpośrednio po oraz po 15 i 30 minutach po teście wysiłkowym u chorych na astmę oskrzelową. Nie obserwowaliśmy różnicy stężeń ani w wartościach wyjściowych, ani po wysiłku w obu badanych grupach (astma oskrzelowa z komponentem wysiłkowym i bez komponentu wysiłkowego). Przyjmując, że stężenia

neuromediatorów we krwi obwodowej odzwierciedlają zmiany ich koncentracji w układzie oddechowym sądziemy, że nie odgrywają one istotnej roli w patogenezie wysiłkowej astmy oskrzelowej. Pośrednim potwierdzeniem dla tej tezy może być praca, w której u osób chorych na łagodną astmę oskrzelową podanie blokera receptora NK<sub>1</sub> (CP-99,994) dożylnie nie wywoływało zniesienia bronchospazmu po prowokacji roztworem hipertonicznej soli [16]. Nie pozwala to jednak na wykluczenie współdziałania nieadrenergicznego, niecholinergicznego autonomicznego układu nerwowego w patomechanizmie powysiłkowego bronchospazmu. Ze względu na istnienie licznych przesłanek teoretycznych, wydaje się celowe przeprowadzenie dalszych badań u ludzi z analizą innych niż SP i NPY neuromediatorów. Nawet wtedy nadal pozostanie wątpliwość, czy zmiany ewentualnie zachodzące w mikrośrodkowisku oskrzeli znajdują w pełni swoje odzwierciedlenie w stężeniach neuropeptydów w osoczu krwi, a w jakiej mierze wywodzą się z innych narządów. Tym niemniej, w tym drugim przypadku, można rozważać możliwość odpowiedzi układu oddechowego jako składowej działania ogólnoustrojowego tych neuromediatorów.

W przedstawionej pracy nie stwierdzono różnicy w wyjściowych stężeniach SP i NPY w osoczu krwi obwodowej u chorych na astmę oskrzelową z komponentem wysiłkowym w porównaniu z chorymi na astmę oskrzelową bez komponentu wysiłkowego. Obciążenie wysiłkiem w obu badanych grupach nie powodowało zmian stężeń SP i NPY w osoczu krwi.

## Piśmiennictwo

1. Foresi A, Mattoli S, Carbo GM i wsp. A comparison of bronchial responses to ultrasonically nebulized distilled water, exercise, and methacholine in asthma. *Chest* 1986; 90: 822-826.
2. Karjalainen J. Exercise response in 404 young men with asthma: no evidence for late asthmatic reaction. *Thorax* 1991; 46: 100-104.
3. Killian KJ, Summers E, Watson RM i wsp. Factors contributing to dyspnea during bronchoconstriction and exercise in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1993; 6: 1004-1010.
4. Liebhart J, Liebhart E, Dor A. Astma wysiłkowa, Choroby alergiczne i astma, Volumed, Wrocław 1996.
5. Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise – induced asthma is .... *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 453-459.
6. Dong-Chull Choi, O Jung Kwon, Neuropeptides and asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1998; 4: 16-24C.
7. Liebhart J, Dor A. Neuropeptydy dróg oddechowych, Choroby alergiczne i astma, Volumed, Wrocław 1996.
8. Garland A, Jordan JE, Necheles J i wsp. Hypertonicity, but not hypothermia, elicits substance P release from rat C-fiber neurons in primary culture. *J Clin Invest* 1995; 95: 2359-2366.
9. Ollerenshaw SL, Jarvis D, Sullivan CE i wsp. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur Respir J* 1991; 4: 673-682.
10. Lilly CM, Bai TR, Shore SA i wsp. Neuropeptide content of lung from asthmatic and nonasthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 548-553.
11. Chanez P, Springall D, Vignola AM i wsp. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 985-990.
12. Garland A, Ray DW, Doerschuk CM i wsp. Role of tachykinins in hyperpnea-induced bronchovascular hypermeability in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1991; 70: 27-35.
13. Ray DW, Hernandez C, Leff AR i wsp. Tachykinins mediate bronchoconstriction elicited by isocapnic hyperpnea in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1108-1112.
14. Ichinose M, Miura M, Yamauchi H i wsp. A neurokinin 1-receptor antagonist improves exercise-induced airway narrowing in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 936-941.
15. Solway J, Kao BM, Jordan JE i wsp. Tachykinin receptor antagonists inhibit hyperpnea-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *J Clin Invest* 1993; 92: 315-323.
16. Fahy JH, Wong HH, Geppetti P i wsp. Effect of an NK1 receptor antagonist (CP-99,994) on hypertonic saline – induced bronchoconstriction and cough in male asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 879-884.