

(23)

Analiza stężenia tlenu azotu we krwi obwodowej u osób poddanych suplementacji luteiną w różnych dawkach

Analysis of nitric oxide concentration in peripheral blood in patients with lutein supplementation in different doses

Karolina Jędrzejczak-Pospiech¹, Jan Błaszczak², Anna Bielecka-Kowalska³, Michał Kowalski³, Adam Rafał Poliwczak¹

¹ Zakład Fizjologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: p.o. dr n. med. Adam Rafał Poliwczak

² Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Kaliszu Wydział Rehabilitacji i Sportu
Kierownik: Dziekan dr Arkadiusz Janiak, prof. PWSZ w Kaliszu

³ NZOZ Akoria w Łodzi
Kierownik: dr n. med. Anna Bielecka-Kowalska

Abstrakt:

Cel: Porównanie stężenia tlenu azotu przed i po suplementacji luteiną.

Materiał i metody: W badaniu wzięły udział 54 osoby, w wieku 20-77 lat, które podzielone zostały na 3 grupy. Każda z grup przez okres 3 miesięcy przyjmowała luteinę w innej dawce – 8 mg, 10 mg lub 12 mg/dobę. Materiałem do badań była krew żylna pobrana przed i po suplementacji luteiną. Przed suplementacją oraz po 3-miesięcznym okresie oznaczono stężenie tlenu azotu w osoczu krwi.

Wyniki: Po 3-miesięcznym okresie suplementacji luteiny zaobserwowano nieistotny statystycznie wzrost stężenia tlenu azotu w osoczu we wszystkich badanych grupach. Największy wzrost zaobserwowano w grupie przyjmującej 12 mg luteiny. Najniższy otrzymano w grupie suplementującej 10 mg luteiny.

Wnioski: Badane dawki luteiny nie wykazały istotnego wpływu na stężenie azotynów/azotanów w osoczu w badanych grupach. Odnotowano natomiast tendencję do zwiększenia się stężenia badanych związków po zastosowaniu luteiny w dawce 12 mg.

Słowa kluczowe:

tlenek azotu, AMD, luteina.

Abstract:

Purpose: Comparison of nitric oxide concentration before and after lutein supplementation.

Material and methods: The study involved 54 people, aged 20-77 years, who were divided into 3 groups. Each group was taking lutein in a different dose for 3 months - 8 mg, 10 mg or 12 mg/day. The material for the study was venous blood collected before and after lutein supplementation. The concentration of nitric oxide (NO) in blood plasma was determined before and after 3 months of supplementation.

Results: After 3-month period of lutein supplementation, a statistically insignificant increase of nitric oxide concentration in plasma was observed in all studied groups. The highest increase was observed in the group taking 12 mg of lutein. The lowest was obtained in the supplement group of 10 mg of lutein.

Conclusions: The studied doses of lutein did not show any significant influence on the concentration of nitrites/nitrates in plasma in the studied groups. However, a tendency to increase the concentration of the tested compounds after the use of lutein in the dose of 12 mg was observed.

Key words:

nitric oxide, AMD, lutein.

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów w związku z publikowaną pracą/ The authors declare no conflict of interest

Wprowadzenie

Wytwarzany przez śródbłonek naczyniowy tlenek azotu (NO) zaliczany jest do grupy związków wykazujących działanie rozkurczające na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych (ang. Endothelium-Derived Relaxing Factor – EDRF) (1). Powstaje on z L-argininy, która w obecności tlenu cząsteczkowego oraz fosforanu dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) zostaje przekształcona do L-cytruliny. Reakcję tę katalizuje enzym syntaza tlenu azotu (ang. Nitric Oxide Synthase – NOS), który

posiada trzy izoformy: indukowalną (iNOS, NOS 2, NOS II) oraz neuronalną (nNOS, NOS 1, NOS I) i endotelialną, śródbłonkową (eNOS, NOS 3, NOS III) wytwarzane konstytutywnie (1, 2, 3). Synteza NOS zachodzi w wielu komórkach. Postać neuronalną nNOS wytwarzają neurony centralne i obwodowe, komórki tuczne, a także m.in. retikulum plazmatyczne czy mitochondria kardiomiocytów (2, 3). Indukowalna syntaza produkowana jest przez makrofagi, miocyty na skutek działania czynników bakteryjnych (4). Syntaza śródbłonkowa wytwarzana jest w śród-

blonku naczyniowym, w komórkach erytrocytarnych, trombocytarnych i kardiomiocytach (3). Izoformy NOS różnią się względem siebie nie tylko miejscem syntezy, ale formą aktywacji oraz ilością wytwarzanego NO. Niezbędny do uaktywnienia izoform nNOS i eNOS jest wzrost stężenia jonów wapnia oraz związanie białka kalmoduliny (4, 5). iNOS jest formą na stałe związaną z kalmoduliną i wykazuje działanie przy niewielkich stężeniach jonów wapnia. Działanie iNOS jest bardzo wydajne, inicjowane odpowiedzią immunologiczną organizmu i powoduje powstawanie znacznych ilości tlenu azotu (3, 4, 5).

Tlenek azotu spełnia w organizmie wiele funkcji. W układzie krążenia, uwalniany ze śródbłonka przy udziale eNOS, wywiera wpływ na mięśniówkę gładką naczyń, powodując ich rozszerzenie, co zwiększa przepływ krwi i powoduje spadek oporu obwodowego (6). Do innych funkcji NO zalicza się: hamowanie proliferacji mięśni gładkich (6), hamowanie adhezji leukocytów oraz agregacji płytek krwi, udział w procesie uczenia się i zapamiętywania (7).

Tlenek azotu jest związkiem bardzo reaktywnym, jego działanie antyoksydacyjne opiera się na reakcji z anionem nadadtlenowym, a w konsekwencji na skutek zmniejszenia ilości wolnych rodników tlenowych – hamowaniu peroksydacji lipidów (8). Okres półtrwania wynosi 5 sekund, co powoduje, że związek ten jest bardzo niestabilny chemicznie (9, 10). Dlatego też do oceny tlenu azotu wykorzystuje się pomiar produktów jego przemian: azotynów i azotanów (11).

Luteina, zeaksantyna oraz mezoksantyna należące do hydroksykaretinoidów, gromadzą się w siatkówce oka, gdzie tworzą pigment plamkowy (12).

Luteina posiada właściwości antyoksydacyjne, które opierają się głównie na absorpcji krótkofalowego promieniowania elektromagnetycznego w zakresie długości fali odpowiadającej barwie niebieskiej. Wykazuje funkcję ochronną przed reakcjami utlenienia dla błon oraz lipoproteinowych komponentów i tym samym zapobiega oksydacyjnemu uszkodzeniu siatkówki (12). Wymienione hydroksykaretinoidy mogą także wywierać działanie neuroprotektoryjne i przeciwzapalne w siatkówce (13). Luteina zmniejsza ryzyko wystąpienia procesów zapalnych i immunosupresyjnych (14).

Luteina nie jest wytwarzana w organizmie, dlatego jej stężenie w osoczu zależy od diety lub suplementacji. Dowiedziono, że przyjmowanie luteiny jest bezpieczne i nie powoduje działania teratogennego oraz mutagennego (15). Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority – EFSA) w 2010 roku dopuścił bezpieczne dzienne spożycie luteiny w dawce 1 mg/kg masy ciała (16). Liczne badania naukowe donoszą, że spożycie luteiny wpływa na spowolnienie rozwoju związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej (ang. Age-related Macular Degeneration – AMD) (17).

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie stężenia tlenu azotu (NO) przed i po 3-miesięcznej suplementacji luteiną przyjmowaną w różnych dawkach.

Materiał i metody

W badaniu udział wzięły 54 osoby, w wieku 20-77 lat, po uprzednim badaniu okulistycznym. Wykluczono osoby z jaskrą,

zaciągą, retinopatią cukrzycową, osoby nadużywające alkoholu oraz stosujące inne suplementy diety zawierające w składzie luteinę.

Badani losowo zostali podzieleni do 3 grup, z których każda przez okres 3 miesięcy przyjmowała inną dawkę luteiny. Grupa 1 przyjmowała 8 mg luteiny, grupa 2-10 mg luteiny, natomiast grupa 3-12 mg luteiny. Materiałem do badań była krew żylna pobrana z żyły odłokciowej za pomocą jednorazowego sprzętu w ilości 2 x 5 ml przed i po 3-miesięcznej suplementacji luteiną. Z pobranej krwi po odwirowaniu uzyskano osocze, w którym oznaczono produkty przemian tlenu azotu metodą pośrednią.

Przed suplementacją oraz po 3-miesięcznym okresie suplementacji oznaczono stężenie NO w osoczu krwi przy użyciu zestawu firmy Oxis Research, Bioxytech – Nitric Oxide Assay – Calorimetric Assay for Determination of Total Nitrite.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki UM w Łodzi nr RNN/483/11/KB. Opracowania statystyczne i graficzne sporządzono za pomocą programu Statistica 5.1PL oraz Office 97. Dokonano oznaczenia następujących parametrów statystycznych: minimum, maksimum, mediana, średnia, oraz odchylenie standardowe.

W celu wykorzystania właściwego testu przeprowadzono weryfikację czy próby podlegały rozkładowi normalnemu – test Shapiro – Wilka. W opracowaniu statystycznym wykorzystano następujące testy: test T Studenta, Manna-Whitneya dla niezależnych wykonanych dla porównania średnich uzyskanych między grupami i dla grup zależnych dla porównania średnich uzyskanych wewnątrz grup oraz testu kolejności par Wilcoxon. Dla porównania między grupami użyto testu Kruskala – Willisa H (jednakowa ANOVA na rangach) oraz testu U Manna-Whitneya. Test par Wilcoxon zastosowano dla porównań wewnątrzgrupowych. Dla zastosowanych testów założono poziom istotności $p=0,05$.

Wyniki

Wyniki badania przedstawiono w tabelach I, II oraz na rycinie 1. (tabela I, II, ryc. 1.). Wartości zostały wyrażone w pg/ml.

Przed 3-miesięczną suplementacją, średnie stężenie NO w osoczu w grupie 1, wynosiło $60,09 \pm 13,68$ pg/ml. W grupie 2 średnia wartość NO osiągnęła $63,53 \pm 20,18$ pg/ml, co stanowiło najwyższą wartość ze wszystkich trzech grup. W grupie 3 średnie stężenie NO stanowiło najniższą wartość $57,73 \pm 12,94$ pg/ml. Po 3-miesięcznym okresie suplementacji luteiną zaobserwowano nieistotny statystycznie wzrost stężenia NO w osoczu we wszystkich badanych grupach. Największy wzrost badanego parametru uzyskano w grupie 3, przyjmującej 12 mg luteiny – $62,19 \pm 12,32$ pg/ml. Najniższy wzrost otrzymano w grupie 2, suplementującej 10 mg luteiny – $66,15 \pm 22,37$ pg/ml.

Dyskusja

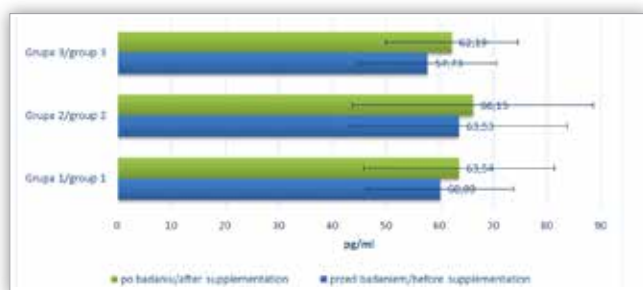
Tlenek azotu jest związkiem o wysokiej aktywności biologicznej. Wywiera bezpośrednio wpływ na naczynia krwionośne powodując ich rozszerzenie. Do jego funkcji zaliczyć można także m.in. neutralizację wolnych rodników tlenowych i w konsekwencji zapobieganie peroksydacji lipidów. Antyoksydacyjne działanie NO może przyczyniać się do ochrony ściany naczyń krwionośnych przed szkodliwym działaniem reaktywnych form

	Przed suplementacją/ Before supplementation			Po suplementacji/ After supplementation		
	Grupa 1/ Group 1	Grupa 2/ Group 2	Grupa 3/ Group 3	Grupa 1/ Group 1	Grupa 2/ Group 2	Grupa 3/ Group 3
Min-max/ Min-max	44,66-84,67	35,07-108,61	36,64-80,50	37,66-91,56	36,78-120,65	42,48-82,57
Mediana/ Median	57,39	66,31	54,2	66,57	61,35	61,21
Średnia arytmetyczna/ Arithmetic mean	60,09	63,53	57,73	63,54	66,15	62,19
Odchylenie standardowe/ Standard deviation	± 13,68	± 20,18	± 12,94	± 17,77	± 22,37	± 12,32
Analiza statystyczna/ Statistical analysis	Analiza wariacji test F=0,491 p>0,05 Porównania między grupami (test T Studenta): U(1:2; 1:3; 2:3) p>0,05/ Variation analysis test F=0.491 p>0.05 Comparisons between groups (Student's T-test): U(1:2; 1:3; 2:3) p>0.05			Analiza wariacji test F=0,188 p>0,05 Porównania między grupami (test T Studenta): U(1:2; 1:3; 2:3) p>0,05/ Variation analysis test F=0.188 p>0.05 Comparisons between groups (Student's T-test): U(1:2; 1:3; 2:3) p>0.05		

Tab. I. Wartości stężenia tlenu azotu (NO) w badanych grupach przed suplementacją i po okresie 3-miesięcznej suplementacji luteiną (w pg/ml).
Tab. I. Values of nitric oxide (NO) concentration in the studied groups before and after 3-month lutein supplementation (in pg/ml).

Porównanie przed-po suplementacji/ Comparison before and after supplementation	Grupa 1/ Group 1	Grupa 2/ Group 2	Grupa 3/ Group 3
Test/ Test	Test t-Studenta/ (Student's T-test): t=-0,71	Test t-Studenta/ (Student's T-test): t=-0,46	Test t-Studenta/ (Student's T-test): t=-1,05
Istotność statystyczna/ Statistical significance	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Tab. II. Porównanie wartości stężenia tlenu azotu (NO) przed suplementacją i po okresie 3-miesięcznej suplementacji luteiną.
Tab. II. Comparison of nitric oxide (NO) concentration values before and after 3-month lutein supplementation.



Ryc. 1. Średnie wartości stężenia tlenu azotu (NO) w badanych grupach przed suplementacją oraz po okresie 3-miesięcznej suplementacji luteiną (w pg/ml).
Fig. 1. Mean values of nitric oxide (NO) concentration in the studied groups before and after 3-month lutein supplementation (in pg/ml).

tlenu i tym samym przed schorzeniami przez nie wywoływany. NO jest kluczowym związkami, który reguluje przepływ krwi w narządzie wzroku (13).

Bhutto i wsp. opisali spadek nNOS i eNOS w naczyniówce z AMD, co powoduje zmiany w mikrokrążeniu oka (18). NO jest związkiem, który neutralizuje wolne rodniki nadtlenkowe, rodniki hydroksylowe oraz przyczynia się do hamowania peroksydacji lipidów *in vitro* (19). Istnieje zależność między luteiną a NO, która została opisana przez Stringham i wsp. W stanach chorobowych niskim stężeniem luteiny towarzyszą duże poziomy NO (19). Odpowiednie stężenia tych związków mogą przyczynić się do polepszenia funkcjonowania narządu wzroku.

W badaniach własnych po zastosowaniu luteiny nie wykazano istotnego wpływu na stężenie azotynów/azotanów w osoczu. Stwierdzono jednakże tendencję do zwiększania się tych związków po najwyższej dawce luteiny. Dla porównania, w badaniach własnych, po zastosowaniu 3-miesięcznej suplementacji luteiną zaobserwowano wzrost całkowitego statusu antyoksydacyjnego, który był zależny od zastosowanej dawki luteiny. Istotny statystycznie wzrost uzyskano po suplementacji 8 mg luteiny (20). Wzrost stężenia azotynów/azotanów w osoczu na skutek suplementacji luteiną może świadczyć o antyoksydacyjnym działaniu tego karotenoidu. Tlenek azotu wpływając bezpośrednio na naczynia krwionośne i powodując ich rozszerzenie może wywierać pozytywny wpływ na siatkówkę oka, a tym samym spowalniać występowanie AMD. Może się to przyczyniać do ochrony narządu wzroku przez zmniejszenie ryzyka powstawania chorób związanych z uszkodzeniami siatkówki, w tym AMD.

Wnioski

Zastosowane dawki luteiny w stężeniu 8, 10, 12 mg/dobę nie wykazały istotnego wpływu na stężenie azotynów/azotanów w osoczu w badanych grupach. Zauważono natomiast tendencję do zwiększenia się stężenia badanych związków po zastosowaniu najwyższej dawki luteiny.

Praca została sfinansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z zadania badawczego Nr 502-03/5-108-01/502-54-053.

Piśmiennictwo:

1. Grzešek E, Grzešek G, Koziński M, Stolarek W, Zieliński M, Kubica J: *Tlenek azotu jako przyczyna i potencjalne miejsce ingerencji terapeutycznej w hiporeaktywności naczyń we wczesnym okresie posocznicy*. Folia Cardiol Excerpta. 2011; 6,1: 36–43.
2. Förstermann U, Sessa WC: *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J. 2012 Apr; 33(7): 829–837, 837a–837d.
3. Paślawska U, Kurzok H, Kiczak L, Bania J: *Rola tlenu azotu w regulacji czynności układu krążenia*. Med. Weter. 2012; 68(6): 349–352.
4. Chelchowska M, Zsimevich A, Gajewska J, Masazur J, Lewandowski L, Ambroszkiewicz J: *Stężenia śródbłonkowej i indukowanej formy syntazy tlenu azotu w surowicy krwi kobiet ciężarnych palących tytoń – badania wstępne*. Przeg Lek. 2017; 74,10: 462–465.
5. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, Błaszczuk J, Fijałkowski P, Kowalski J: *Metabolizm tlenu azotu*. Wiad Lek. 2006; 59: 889–893.
6. Ufnal M, Żera T: *Rola tlenu azotu, siarkowodoru oraz tlenu węgla w regulacji układu krążenia i ich potencjał farmakoterapeutyczny*. Kardiol Pol. 2010; 68, supl. V: 436–440.
7. Bartosz G: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. PWN, Warszawa 2009; wyd. 2: 228–333.
8. Sokołowska M, Włodek L: *Dobre i złe strony tlenu azotu*. Folia Cardiol. 2001; 8(5): 467–477.
9. Dabrowski A, Gabryelewicz A: *Nitric oxide contributes to multiorgan oxidative stress in acute experimental pancreatitis*. Scand J Gastroenterol. 1994; 29: 943–948.
10. Panek J, Zasada J: *Rola tlenu azotu w ostrym zapaleniu trzustki*. Przegląd Lekarski. 2007; 64(7–8): 495–497.
11. Boncler M, Dudzińska D, Rywaniak J, Watała C: *Wykorzystanie metody Griessa do oznaczania azotanów/azotynów w supernatantach komórek śródbłonka stymulowanych agonistami*. J Lab Diag. 2010; 46(3): 307–312.
12. Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT: *Lutein: more than just a filter for blue light*. Prog Retin Eye Res. 2012 Jul; 31(4): 303–315.
13. Neelam K, Goenadi CJ, Lun K, Yip CC, Au Eong KG: *Putative protective role of lutein and zeaxanthin in diabetic retinopathy*. Br J Ophthalmol. 2017 May; 101(5): 551–558
14. Lee EH, Faulhaber D, Hanson KM, Ding W, Peters S, Kodali S, Granstein RD: *Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression*. J Invest Dermatol. 2004 Feb; 122(2): 510–517.
15. Buscemi S, Corleo D, Di Pace F, Petroni ML, Satriano A, Marchesini G: *The Effect of Lutein on Eye and Extra-Eye Health*. Nutrients. 2018 Sep; 10(9): 1321.
16. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the re-evaluation of lutein [e 161b] as a food additive. EFSA J. 2010; 8, 1678.
17. Van der Made SM, Kelly ER, Berendschot TT, Kijlstra A, Lütjohann D: *Consuming a buttermilk drink containing lutein-enriched egg yolk daily for 1 year increased plasma lutein but did not affect serum lipid or lipoprotein concentrations in adults with early signs of age-related macular degeneration*. J Nutr. 2014 Sep; 144(9): 1370–1377.
18. Bhutto IA, Baba T, Merges C, McLeod DS, Luty GA: *Low Nitric Oxide Synthases (NOS) in Eyes with Age-related Macular Degeneration (AMD)*. Exp Eye Res. 2010 Jan; 90(1): 155–167.
19. Stringham JM, Stringham NT, Smith CJ: *Nitric Oxide and Lutein: Function, Performance, and Protection of Neural Tissue*. Foods. 2015 Dec; 4(4): 678–689.
20. Jędrzejczak-Pospiech K, Błaszczuk J: *The effect of lutein on the total antioxidant status in human blood*. Klinika Oczna 2017; 119(4): 220–223.

Praca wpłynęła do Redakcji 13.08.2019 (KO-00210-2019)
Zakwalifikowano do druku 27.09.2019

Autor korespondencyjny (Corresponding author):
dr n. med. Karolina Jędrzejczak-Pospiech
Zakład Fizjologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego
w Łodzi
90-131 Łódź, ul. Narutowicza 60
e-mail: karolina.jedrzejczak-pospiech@umed.lodz.pl