

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Egzersize Bağlı Bronkokonstriksiyonda Yoganın Terapotik Etkisi
ve
Lipoxin A4 Düzeyleri

Proje No:

Proje Türü
Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Fulya Tahan
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD
Çocuk Allerji BD

Aralık 2012

KAYSERİ

ÖZET

Amaç: Yoga, kişinin bedeni, zihni ve ruhunu birleştirmesine yaradığı düşünülen eski bir bilimdir. Yoga yapmanın, astım ve havayolu aşırı duyarlılığı üzerine olumlu etkileri olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızın amacı yoga yapmanın egzersize bağlı bronkokonstriksiyon üzerine etkisinin belirlenmesidir.

Yöntem: Çalışmaya egzersiz yanıtı pozitif olan (n=13) ve egzersiz yanıtı negatif olan (n=11) astımlı hastalar alındı. Her iki grup haftada iki saat olmak üzere toplam üç ay yoga programına dahil edildi. Yoga programı aynı yoga eğitmeni tarafından yaptırıldı. Egzersiz yanıtı pozitif hastaların üçü, egzersiz yanıtı negatif hastaların biri yoga yapmaya devam edemediğinden çalışma dışı kaldı. Çalışmayı 10 egzersiz yanıtı pozitif olan ve 10 egzersiz yanıtı negatif olan astımlı hasta tamamladı. Üç aylık yoga programı sonunda hastalar yeniden değerlendirilerek, egzersiz testleri tekrarlandı.

Bulgular: Egzersiz öncesi solunum fonksiyon testlerinde her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test). Yine, yoga öncesi ve sonrası solunum fonksiyon testlerinde, her iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$, Willcoxon test). Üç aylık yoga uygulaması sonrasında, egzersiz testi pozitif olan grupta egzersiz yanıtında belirgin düzelme olduğu görüldü ($p < 0.05$, Willcoxon test).

Sonuç: Çalışmamız, yoga yapmanın egzersize bağlı bronkokonstriksiyon üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bu durum, astımlı hastaların ilaç tedavisine ek olarak yoga yapmasının hastalık kontrolüne ilave katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Astım, egzersize bağlı bronkokonstriksiyon, yoga.

Is Yoga Training Beneficial for Exercise Induced Bronchoconstriction?

Background: Yoga is a scientific system of physical and mental practices. Preliminary studies investigating yoga for treating airway hiperreactivity have been promising. This study was undertaken to assess the beneficial effect of yoga in the exercise induced bronchoconstriction.

Methods: Two groups of children were enrolled in the study: asthmatic children with positive ($n = 10$) and negative ($n = 10$) responses to exercise. Both groups attended one-hour sessions of yoga training twice a week for three months. After three months, all children participated in another exercise challenge.

Results: No significant difference was observed in the pre-exercise spirometric measurements among the groups ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test). Likewise, there was no difference in spirometric measurements between before and after yoga training for both groups ($p > 0.05$, Willcoxon test.). After yoga training, we observed significant improvement in maximum FEV1 % fall following the exercise challenge ($p < 0.05$, Willcoxon test). All exercise response positive asthmatics became exercise response negative asthmatics after yoga training.

Conclusion: This study has shown that practise of yoga training has beneficial effects on exercise induced bronchoconstriction. It is our opinion that yoga training can supplement drug therapy in order to obtain better control of asthma.

Key words: Asthma, Exercise induced bronchoconstriction, Yoga training,

GİRİŞ ve AMAÇ

Astma çok sayıda inflamatuvar hücre ve mediatörün katılımı sonucu ortaya çıkan, havayolu obstrüksiyonu ile karakterize bir sendromdur (1). İnflamasyon, genetik yapı ile çevresel faktörler arasındaki son derece karmaşık bir ilişki sonrası ortaya çıkar. Astmalı hastaların % 70-80'inde egzersizle beraber astma semptomları ortaya çıkabilir (2). Egzersizle beraber astma bulgularının ortaya çıkmasının bronş hiperreaktivitesinin kliniğe yansması olduğu ileri sürülmektedir. Yoga, kişinin bedeni, zihni ve ruhunu birleştirmesine yarayan eski bir bilimdir. Yoganın astım ve havayolu aşırı duyarlılığı üzerine olumlu etkileri olduğuna dair pek çok çalışma yayınlanmıştır (9-11). Join ve ark. Yoga uygulamasının astımlı hastalarda semptomları azalttığı, solunum fonksiyon testini düzelttiği, egzersiz toleransını artırdığını saptamışlardır (14). Daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilen olumlu bulgular, bronşial hiperreaktivitenin kliniğe yansması olarak kabul edilen EBB'da yoga uygulamasının olumlu etkilerinin olacağını düşündürmektedir. Bu çalışmanın amacı yoga uygulamasının egzersize bağlı bronkokonstriksiyon üzerine etkisinin belirlenmesidir.

GENEL BİLGİLER

Astma çok sayıda inflamatuvar hücre ve mediatörün katılımı sonucu ortaya çıkan, havayolu obstrüksiyonu ile karakterize bir sendromdur (1). İnflamasyon, genetik yapı ile çevresel faktörler arasındaki son derece karmaşık bir ilişki sonrası ortaya çıkar. Astmalı hastaların % 70-80'inde egzersizle beraber astma semptomları ortaya çıkabilir (2). Egzersizle beraber astma bulgularının ortaya çıkmasının bronş hiperreaktivitesinin kliniğe yansması olduğu ileri sürülmektedir. Egzersize bağlı bronkokonstriksiyonda (EBB) hava yollarının soğuması ve kuruması önemli rol oynar. Egzersiz esnasında soğuk ve kuru hava EBB için güçlü bir uyarıcıdır. Mukozal kuruma ve artmış ozmolarite mast hücrelerinden mediatör salınımını uyarır. Egzersiz sonrası hava yollarının hızla ısınması vasküler konjesyon, permeabilite artışı ve ödeme sebep olarak bronkokonstriksiyon gelişimine yol açar (3-5). İnflamatuvar mediatörler (histamin, lökotrienler, nitrik oksit, nöropeptidler, nötrofil kemotaktik faktör gibi) EBB'da anahtar rolü oynarlar (4-7).

Yoga bir Din değildir, kişinin bedeni, zihni ve ruhunu birleştirmesine yarayan eski bir bilimdir; yoga sözcüğü de zaten birlik anlamına gelir. Batılılar birlik kavramının yerine bütünlük sözcüğünü kullanabilirler. Yoga duruşları bedeni iyileştirmek ve gençleştirmek, güçlü duyguları sakinleştirmek ve zihni berak bir hale getirmek için geliştirilmiştir, duruşlar yalnızca bu amaçla yapılabilir. Farklı yoga türlerinin amaçları hemen hemen birbirinin aynıdır: İnsanı "esir" eden duygu ve düşüncelerden kurtararak yücelmesine yardımcı olmak. Yoga uygulaması, nefes egzersizleri, fiziksel egzersizleri ve meditasyonu içerir. Yoga 50 yıldan uzun süredir astımlı hastalarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır (8). Yoganın astım ve havayolu aşırı duyarlılığı üzerine olumlu etkileri olduğuna dair pek çok çalışma yayınlanmıştır (9-11). Yoga ile astımlı hastalarda semptomların azaldığı, beta agonist ihtiyacında belirgin bir düşme gözlemlendiği belirtilmiştir (10). Yoga uygulamasının önemli bir kısmını kontrollü nefes tekniği oluşturur.

Yoga nefes egzersizlerinin astımlı hastalarda hava yolu aşırı duyarlılığını azalttığı saptanmıştır (12, 13). Yoga ile nefes paternindeki değişikliğin hava yolu düz kasını direkt etkileyerek hava yolu aşırı duyarlılığını azaltmış olabileceği öne sürülmüştür (13). Join ve ark. Yoga uygulamasının astımlı hastalarda semptomları azalttığı, solunum fonksiyon testini düzelttiği, egzersiz toleransını artırdığını saptamışlardır (14). Yine başka bir çalışmada astımlı hastalarda yoganın solunum fonksiyon testlerini düzelttiği, atak sıklığını azalttığı saptanmıştır (13). Yoga ile kardiyopulmoner düzelme arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (15, 16).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışmaya yaşları 6-17 arasında olan astımlı çocuklar alındı. Astım tanısı GİNA rehberine göre konuldu. ÜSYE geçiren ve son 6 hafta içinde astım atağı geçiren çocuklar ve inhale steroid alan çocuklar çalışmaya alınmadı. Çalışmaya dahil edilen 24 astımlı hastaya ATS protokolüne uygun olarak egzersiz testi yapıldı. Egzersiz testinde FEV₁% değerinde %10 ve daha fazla düşüş gösteren 13 hasta egzersiz yanıtı pozitif, FEV₁% değerinde %10'un altında düşüş olan 11 hasta egzersiz yanıtı negatif olarak değerlendirildi. Tüm çocuklar 3 aylık haftada 2 saat olmak üzere yoga programına alındı. Yoga programına devam ve çalışma dışı kalan hastalar Şekil 1'de görülmektedir.

Kısa etkili beta 2 agonistler en az 12 saat önce, uzun etkili bronkodilatörleri 48 saat önce, lökotrien reseptör antagonistlerini 48 saat önce kesmeleri önerildi (8). Hiçbir hasta antihistaminic kullanmıyordu. Total IgE düzeyleri UniCap tekniği ile ölçüldü (Pharmacia, Kalamazoo, Michigan, USA). Eozinofil sayıları Coulter Counter ile belirlendi. Deri prik testi 15 aeroallerjen, 8 besin allerjeni olacak şekilde 23 parametrelili yapıldı. 3 mm ve üzeri endurasyon pozitif olarak değerlendirildi.

Yoga programı

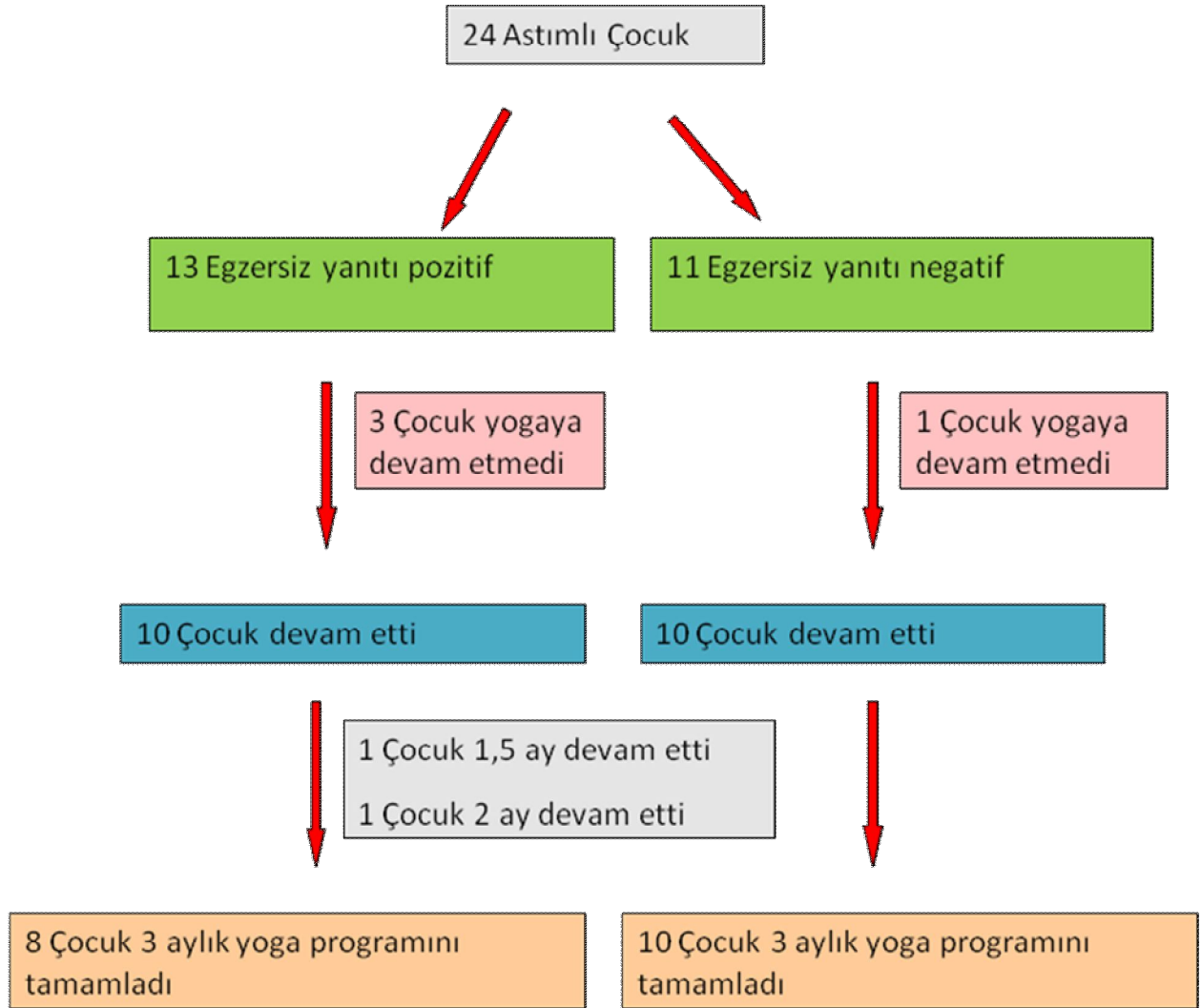
Yoga program aynı eğitmen tarafından haftada 2 gün 1'er saat olacak şekilde 3 ay boyunca uygulandı. Her yoga seansında nefes egzersizleri (10 dakika), fiziksel egzersiz (asanas) (40 dakika), and gevşeme (10 dakika).

İstatistiksel İnceleme

Yaş, cins, IgE düzeyleri, eozinofil sayıları, FEV₁, FEF 25-75, FVC, PEF yüzdeleri Mann-Whitney U ve Wilcoxon test kullanılarak değerlendirildi. Korelasyon analizi Pearson veya Spearman yöntemi kullanılarak yapıldı. P<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hastaların özellikleri Şekil 1 ve Tablo 1’de görülmektedir.



Şekil 1. Çalışmaya alınan çocukların devam durumları

Bütün hastaların atopi durumları cilt testi yapılarak değerlendirildi. Besin allerjenleri ve inhalan allerjenleri içeren 23 adet antijenle test yapıldı. Egzersiz yanıtı pozitif ve negatif olan her iki grubun atopi durumları istatistiksel olarak farksızdı (Tablo.1).

Tablo 1. Çalışmaya alınan hastaların özellikleri

	Egzersiz Yanıtı Pozitif Hastalar n=10	Egzersiz Yanıtı Negatif Hastalar n=10	P değeri
Yaş (Yıl) *	7.5 (5.5-13)	9.5 (6-15.5)	>0.05†
Cins	5 (50)	4 (40)	>0.05‡
Erkek (%)	5 (50)	6 (60)	
Kız (%)			
FEV₁% *	118.9 (107.6-155.1)	112.8 (98.9-150.7)	>0.05†
Egzersiz Sonrası Maksimum FEV1 % Düşüş *	19 (15-35.6)	9 (0-14)	<0.05†
Atopi %	50	30	>0.05‡
Eozinofil Sayısı/mm³ *	200 (60-410)	135 (60-690)	>0.05 †
IgE (ku/L) *	49 (4.9-394)	52.5 (6.6-128)	>0.05†

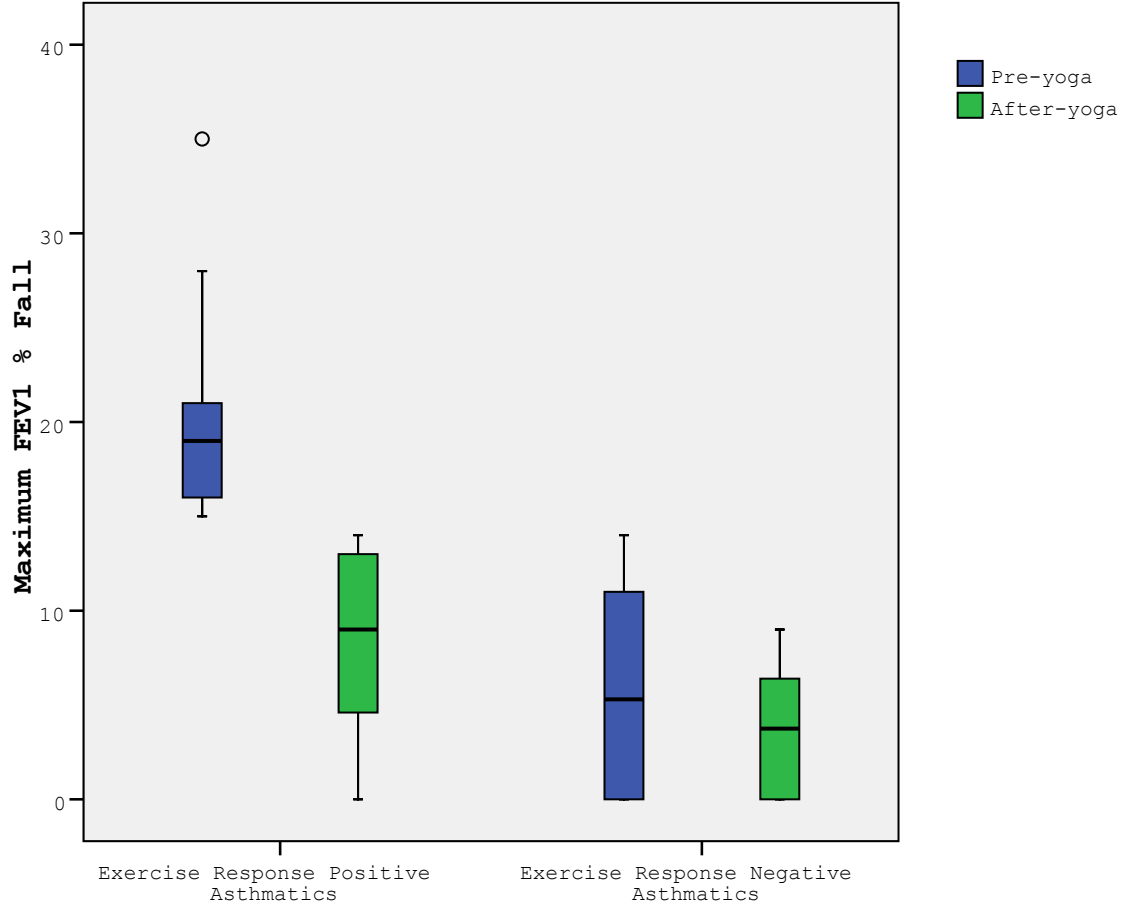
** Ortanca (Çeyrekler arası aralık)*

† Mann Whitney U test

‡Ki-kare test

Egzersiz testi öncesi solunum fonksiyon testlerinde her iki grup arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test). Forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in the first second of expiration (FEV₁), the ratio FEV₁/FVC, peak expiratory flow rate (PEFR), veya FEF_{25–75%} değerlerine bakıldığında yoga eğitimi öncesi ve sonrasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$, Willcoxon test). Üç aylık yoga eğitimi sonrasında egzersiz testlerinde belirgin

düzelme gözlemlendi ($p < 0.05$, Willcoxon test) (Şekil 2). Egzersiz yanıtı pozitif olan tüm hastalar 3 aylık yoga eğitimi sonrasında egzersiz yanıtı negatif olmuştur.



Şekil 2. Yoga Eğitimi Öncesi ve Sonrasında Egzersiz Testi

TARTIşMA

Çalışmamız, astımlı çocuklarda 3 aylık yoga eğitiminin egzersize bağlı bronkokonstrüksiyon üzerine olan etkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Yoga yapmanın egzersiz yanıtını değiştirebileceğini göstermektedir.

Astımlı hastalarda yoga yapmanın solunum fonksiyon testlerini etkilediği, bronşiyal hiperreaktiviteyi azalttığı, bronkodilatör kullanımını azalttığı ve egzersiz toleransını artırdığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır.

Yoga yapmak nasıl bu etkilere sebep olabilir? Tam olarak sebebi bilinmemekle beraber değişik açıklamalar yapılmaktadır. Bunların başında yogada yapılan nefes egzersizleri gelir. Nefes egzersizlerinde; solunumun yavaşlaması, inspirasyon/ekspirasyon oranının 1:2 olması, inspirasyon ve ekspirasyon arasında boşluklar bulunması sayılabilir. Solunum paternindeki değişiklikler hava yolu aşırı duyarlılığını azaltabilir. Hava yolu aşırı duyarlılığı hava yolu inflamasyonunun bir göstergesidir ve egzersiz yanıtında pozitifliğe sebep olur.

Yine solunum paterninin değişmesi hava yolu düz kasının dinamiklerini etkileyebilir. Hava yolu düz kaslarının kılma hızı hava yolu aşırı duyarlılığının önemli göstergelerindendir. Ve hava yolu düz kas kılma hızı tidal volümden etkilenir. Tidal volüm azaldıkça hava yolu düz kas kılma hızı artar. Yogadaki derin ve yavaş nefes egzersizleri tidal volümü artırarak hava yolu düz kas kılma hızını yavaşlatabilir.

Emosyonel stresin astım ataklarını tetikledikleri bilinmektedir. Yoga yapmak emosyonel stresi azaltmakta, aynı zamanda kaslardaki gevşeme solunum fonksiyonlarında düzelmeye neden olmaktadır.

Yine yogada yavaş ve zorlamadan yapılan solunum egzersizleri sürtünmeyi azaltmakta ve dolayısı ile mast hücre degranülasyonunu önlemektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız yoga yapmanın egzersize bağlı bronkokonstrüksiyon üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bu durum astımlı hastaların ilaç tedavisine ek olarak yoga yapmasının hastalık kontrolüne ilave katkı sağlayacağını düşündürmektedir. Bu konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Bowler SD, Gren A, Mitchell CA. Buteyko breathing techniques in asthma: a blinded randomised controlled trial. *Med J Aust* 1998;169:575-578.
2. Singh V, Wisniewski A, Britton J et al. Effect of yoga breathing exercises (pranayama) on airway reactivity in subjects with asthma. *Lancet* 1990;335:1381-1383.
3. Cooper S, Osborne J, Newton S, Harrison V, Thompson Coon J, Lewis S, Tattersfield A. Effect of two breathing exercises (Buteyko and pranayama) in asthma: a randomised controlled trial. *Thorax* 2003;58:674-679.
4. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical, and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 16:53-83.
5. Lotvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax* 1998;53:419-424.
6. Solway J, Fredberg J. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:144-146.
7. Duguet A, Biyah K, Minshall E et al. Bronchial responsiveness among inbred Mouse strains. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:839-848.
8. Fredberg J, Inouye D, Mijailovich S et al. Perturbed equilibrium of myosin binding in airway smooth muscle and its implication in bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:959-967.
9. Huntley A, White AR, Ernst E. Relaxation therapies for asthma: a systematic review. *Thorax* 2002;57:127-131.

10. Chowdhary R, Singh V, Tattersfield AE, Sharma SD, Kar S, Gupta AB: Relationship of flow and cross-sectional area to frictional stress in airway models of asthma. *J Asthma* 1999, 36:419-426.
11. Singh V, Chowdhary R, Chowdhary N: The role of cough and hyperventilation in perpetuating airway inflammation in asthma. *J Assoc Physicians India* 2000, 48:343-345.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Egzersize Bağlı Bronkokonstriksiyonda Nefes Havası Lipoxin A4 Düzeyleri

Proje No:

Proje Türü
Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Fulya Tahan
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD
Çocuk Allerji BD

Aralık 2012

KAYSERİ

EGZERSİZE BAĞLI BRONKOKONSTRİKSİYONDA NEFES HAVASI LİPOKSİN A4 DÜZEYLERİ

ÖZET

Amaç: Astımlı hastaların neden yalnızca bir bölümünün egzersize bronkokonstriktör yanıt verdikleri bilinmemektedir. Lipoksin A4 anti-inflammatuvar özelliği olduğu bilinen bir mediyatördür. Astımlı hastalarda lipoksin A4 düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmalar olmakla beraber, egzersiz yanıtına nefes havası lipoksin A4'ün etkisi araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, astımlı hastalarda egzersize verilen yanıtta değişkenliğe lipoksin A4'ün katkısını araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmaya egzersize bronkokonstriktör yanıt veren (n=17) ve vermeyen (n=28) astımlı çocuk alındı. Egzersizden önce ve egzersizden hemen sonra nefes havası lipoksin A4 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: Egzersiz öncesi ve egzersiz sonrası nefes havası lipoksin A4 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Egzersize pozitif yanıt veren hastalarda, egzersiz sonrası nefes havası lipoksin A4 düzeylerinde belirgin artış olduğu saptandı ($p=0.05$). Egzersize negatif yanıt veren hastalarda ise belirgin bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Egzersiz sonrası FEV1 % değerleri ve nefes havası lipoksin A4 düzeyleri arasında ters korelasyon saptandı ($p = 0.055$, $r = -0.505$).

Sonuç: Çalışmamız egzersize bağlı bronkokonstriksiyonda, egzersiz sonrası nefes havası lipoksin A4 düzeylerinde belirgin artış olduğunu göstermektedir. Hava yolu lipoksin A4 düzeyleri bronkokonstriksiyona yanıt olarak artıyor olabilir. Lipoksin analogları ve benzer ürünler egzersize bağlı bronkokonstriksiyon tedavisine yeni bir yaklaşım getirebilir.

Anahtar Sözcükler: Astım, bronkokonstriksiyon, egzersiz, lipoksin A4

Exhaled breath condensate Lipoxin A4 in Exercise-Induced Bronchoconstriction in Asthma

ABSTRACT

Background. The pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction in asthma is incompletely understood, and the role of exhaled breath condensate lipoxin A4 has not been investigated.

Objective. To investigate the involvement of exhaled breath condensate lipoxin A4 in exercise-induced bronchoconstriction.

Methods. Two groups of children were enrolled in the study: asthmatic children with positive ($n = 17$) and negative ($n = 28$) responses to exercise. Levels of lipoxin A4 were determined in exhaled breath condensate before and immediately after exercise challenge using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. No significant difference was observed in the pre and post exercise exhaled breath condensate lipoxin A4 levels among the groups ($p > 0.05$). We observed significant increases in exhaled breath condensate lipoxin A4 levels immediately after exercise challenge in asthmatic children with positive responses to exercise ($p = 0.05$). But we could not find any statistically significant difference in negative responses to exercise ($p > 0.05$). There was an inverse correlation between lipoxin A4 levels and a reduction in forced expiratory volume at one second percent after exercise in positive responses to exercise ($p = 0.055$, $r = -0.505$).

Conclusion. We suggested that exhaled breath condensate lipoxin A4 levels immediately increase after exercise induced bronchoconstriction. We hypothesize that airway lipoxin A4 levels increases to compensate the bronchoconstriction. Spontaneous bronchodilatation after exercise induced bronchoconstriction may be due to lipoxin A4. Lipoxin mimetics and related compounds could provide novel therapeutic approaches to the treatment of exercise-induced bronchoconstriction in asthma.

Key words: Exhaled breath condensate, exercise induced bronchoconstriction, lipoxin A4

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airway inflammation (1). Chronic inflammation observed in asthma leads to airway hyper-responsiveness that is defined as an abnormal increase in airflow limitation following exposure to a stimulus, such as exercise (2, 3). Exercise-induced bronchoconstriction can be demonstrated in up to 70% of patients with asthma (4). However, the reasons exercise induces bronchoconstriction in only a subgroup of asthmatic children are not clear (5).

Lipoxins are lipid mediators that promote inflammation resolution. They are produced endogenously and might be potential mediators or modulators of inflammation within the lung (6, 7). Lipoxin and their stable analogs could promote resolution of inflammation via multiple mechanisms. They inhibit (1) leukocyte recruitment and activation (8); (2) cytokine and chemokine production; (3) biosynthesis of proinflammatory lipid mediators; (4) stimulating the clearance of apoptotic leukocytes (9); and (5) blocking edema formation (10). The actions of lipoxins contrast with those of most other lipid mediators that are primarily proinflammatory, such as leukotrienes.

Release of inflammatory mediators can be observed during strenuous exercise (11-14). Gangemi et al. observed a significant increase in lipoxin A4 urinary excretion after strenuous exercise in nine healthy volunteers (15). Because lipoxins are potently anti-inflammatory and because release of lipoxins increases during strenuous exercise, we evaluated exhaled breath condensate Lipoxin A4 levels before and after exercise challenge in asthmatic children.

Material and Methods

Study population

Children with asthma aged 5 to 17 years were recruited from the Allergy and Asthma Unit of Erciyes University, School of Medicine, Kayseri, Turkey. Asthma was diagnosed according to

the published GINA guidelines (16). In an attempt to prevent the severity of disease from being a confounding factor, only children who strictly fulfilled the criteria for mild asthma (16) were enrolled and those with moderate to severe asthma were excluded from the study. Children who had an upper or lower airway infection or had an asthma exacerbation within the last six weeks were excluded from the study.

Starting from January 2011, children with stable asthma were subjected to a standard exercise challenge test and blood samples were obtained according to the study protocol when they presented for their regular follow-up. Every child with a positive response to exercise was entered in the study. All children underwent a standard exercise challenge. Before and immediately after the exercise challenge exhaled breath condensate was collected. Spirometric measurements, total IgE, and eosinophil counts were obtained and skin testing was done with a battery of 23 antigens including 15 aero-allergens and eight food allergens with appropriate positive and negative controls on the upper back of the children at presentation. Reactions with an induration >3 mm that of the negative control were considered positive.

Collection of EBC

Exhaled breath condensate was collected using a commercial device (R tube; Respiratory Research, Inc, Charlottesville, VA) as previously described (17, 18) and following the guidelines of the American Thoracic Society/European Respiratory Society (18). Subjects were instructed to breathe tidally for 10 mins through the mouthpiece of the R tube with a one-way valve, which was connected to a condenser. Subjects were also instructed to temporarily discontinue EBC collection if they needed to swallow saliva or had an urge to cough. The EBC samples were transferred into sterile containers and immediately stored at -70°C until analysis.

Study Measurements

Exercise testing was conducted according to a previously described protocol (19), with the child on a treadmill at submaximal workload for 6 min while breathing dry air. Short-acting bronchodilators were discontinued for at least 12 hours, long-acting bronchodilators for at least 48 hours, and leukotriene modifiers for at least 72 hours, in accordance with American Thoracic Society guidelines (20). None of the patients had taken antihistamines during the week before exercise challenge. Children who have used inhaled corticosteroids within the last two weeks were generally excluded from the study.

Children with asthma increased their exercise effort until their heart rate reached 90 % of the maximum for their predicted age group within 1 minute of starting the test and maintained it during 6 minute of exercise. FEV1 was then measured in duplicate immediately (0 minute) and then at 5, 10, 15, and 20 minute after exercise was stopped. A reduction in FEV1 of at least 15 % of the pre-exercise value was considered positive (21).

IgE levels were measured with Uni-Cap technology in accordance with the specifications of the manufacturer (Pharmacia, Kalamazoo, MI). Eosinophil counts were determined from Coulter Counter leukocyte measurements.

Lipoxin A4 measurements

The ELISA kits used to detect Lipoxin A4 levels were obtained from *Biosource (Camarillo, CA, USA)*.

All study procedures were done in accordance with a protocol previously approved by the Institutional review Board of Erciyes University. Written inform consent was obtained from all patients and control subjects before the procedure and all children gave assent.

Statistical Analyses

Lipoxin A4 levels in exhaled breath condensate were compared by Mann Whitney U test, depending upon the distribution of the data. A p value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Patients Characteristics

A total of 45 children with asthma were screened for exercise response. 17 children with a positive exercise response (exercise response positive asthmatics) and 28 children with a negative response (exercise response negative asthmatics) were included in the study. There were no significant differences among the groups with respect to age, gender, IgE levels, eosinophil numbers, atopy status, and FEV1 percent ($p > 0.05$, Table 1).

EBC Lipoxin A4 Levels

No significant difference was observed in the pre-exercise lipoxin A4 levels among the groups ($p > 0.05$, Mann-Whitney U test, Table 2). We observed significant increases in exhaled breath condensate lipoxin A4 levels immediately after exercise challenge in asthmatic children with positive responses ($p = 0.05$, Wilcoxon, Table 3). But we could not find any statistically important difference in negative responses to exercise ($p > 0.05$). No significant difference was observed in the lipoxin A4 levels between atopic and nonatopic asthmatics ($p > 0.05$, Mann-Whitney U test).

Correlation Analyses

Correlation analyses were performed between pre-exercise lipoxin A4 levels and the available asthma phenotypes, such as total IgE levels, eosinophil counts, and FEV1 values. We could not find any significant correlation between plasma lipoxin A4 levels and eosinophil counts, total IgE levels, and atopy (>0.05 , Spearman). There was an inverse correlation between

lipoxin A4 levels and a reduction in FEV1 percent after exercise ($p = 0.055$, $r = -0.505$, Spearman test).

Table 1. Patients characteristics

	Exercise-response positive asthma n=17	Exercise-response negative asthma n=28	P value
Age (year) *	11 (5-16.5)	10 (6-17)	>0.05†
Gender			>0.05‡
Male (%)	9 (52.9)	16 (57.1)	
Female (%)	8 (47.1)	12 (42.9)	
FEV ₁ % predicted	114.6 (83.7-163.9)	115.2 (86.8-205)	>0.05†
Maximum % fall after exercise *	18 (15-50)	7 (1-13)	<0.05†
Skin test positivity %	52.9	50	>0.05‡
Eosinophil count *	200 (30-1630)	175 (40-1360)	>0.05 †
IgE (ku/L) *	53.8 (4.93-568)	70.5 (2.1-1193)	>0.05†

* Median (Interquartile range)

† Mann Whithney U

‡ Chi-square test

Table 2. EBC Lipoxin A4 Levels (pg/ml)

	Exercise-response positive asthma n=17	Exercise-response negative asthma n=28	P value
Pre-exercise EBC-Lipoxin A4	109 (55-200)	118 (41-190)	>0.05†
Post-exercise EBC-Lipoxin A4	131 (68-210)	126 (25-220)	>0.05†

† Mann Whithney U

Table 3. EBC Lipoxin A4 Levels (pg/ml)

	Pre-exercise EBC-Lipoxin A4	Post-exercise EBC-Lipoxin A4	P value
Exercise-response positive asthma n=17	109 (55-200)	131 (68-210)	=0.05 §
Exercise-response negative asthma n=28	118 (41-190)	126 (25-220)	=0.879 §

§ Wilcoxon

Discussion

To our knowledge, this is the first study that investigates the role of EBC lipoxin A4 in the bronchoconstrictor response observed in asthma. Our results suggested that the EBC levels of lipoxin A4 after exercise immediately increased in children who had a positive response to exercise.

Airway hyper-responsiveness is defined as an abnormal increase in airflow limitation following exposure to a stimulus, such as exercise (6, 7). Airway hyperresponsiveness appears to be one manifestation of airway inflammation (22). Some studies showed that inhaled lipoxin A4 significantly reduced leukotriene-C4-evoked airway obstruction in asthmatic subjects, with no significant side effects (23). The effect of lipoxin on airway responsiveness and inflammation was recently investigated using a lipoxin analog (24). Intravenous administration of a lipoxin A4 analog to ovalbumin sensitized mice significantly reduced methacholine-induced bronchoconstriction (25). This analog also reduced lung infiltration by eosinophils and lymphocytes. The postchallenge concentration of Th2 cytokines and of proinflammatory lipid mediators was significantly lower in lipoxin A4 analog-treated mice. Patients with exercise-induced bronchoconstriction have significantly higher levels of eosinophils and eosinophil cationic protein in their sputum. Eosinophil recruitment to the lung in asthma is primarily a consequence of Th2 lymphocyte activation, which was reduced by lipoxin A4 (24). Lipoxin A4 inhibits eosinophil chemotaxis and block eotaxin formation *in vivo* parasite animal models (26, 27). Pulmonary eosinophilia was also reduced in mice given lipoxin A4 (24). Lipoxin A4 mimetics can significantly inhibit allergic pulmonary inflammation (25).

We showed that EBC levels of lipoxin A4 after exercise immediately increased in children who had a positive response to exercise. This result is different our previous investigation results (28). Because our earlier study showed that lower plasma levels of lipoxin A4 was associated with exercise induced bronchoconstriction. We had considered that the development of

exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children might be in relation with a reduced endogenous lipoxin biosynthetic capability. But present study results showed us that airway lipoxin A4 levels were different from plasma levels (28).

It is already known that strenuous exercise may induce lipoxin biosynthesis and further metabolism in healthy volunteers (15). Lipoxins are autacoids and are formed on cell stimulation, act locally, and are metabolized and inactivated (11). Lipoxin A4-derived material appears in urine immediately at the end of strenuous exercise (15). Lipoxin A4 formation can be very rapid, because it can be observed within 10 seconds from angioplasty (29). Most of Lipoxin A4 (>60%) is metabolized by peripheral blood monocytes within 30 seconds (30). An increase in lipoxin biosynthesis during exercise may have relevant pathophysiological implications.

We know lipoxins play important role in the resolution of the inflammatory response (7). Their production in the course of physical exercise may suppress the action of exercise-induced proinflammatory mediators. And lipoxin A levels may increase to be able to compensate the inflammation and bronchoconstriction.

Conclusion

We suggested that exhaled breath condensate lipoxin A4 levels immediately increased after exercise induced bronchoconstriction. We hypothesize that airway lipoxin A4 levels increase to compensate the bronchoconstriction. Spontaneous bronchodilatation after exercise induced bronchoconstriction may be due to lipoxin A4. Lipoxin mimetics and related compounds could provide novel therapeutic approaches to the treatment of exercise-induced bronchoconstriction in asthma.

References

1. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344:350–362.
2. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical, and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;16:53–83.
3. Lotvall J, Inman M, O’Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax* 1998; 53:419–424.
4. Van Schoor J, Joos GF, Pauwels RA. Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology, and implications for clinical research. *Eur Respir J* 2000; 16:514–533.
5. Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:453–459.
6. Serhan CN. Lipoxins: biosynthesis and evidence for their involvement in respiratory disease. In: Robinson C, ed. *Lipid Mediators in Allergic Diseases of the Respiratory Tract*. Boca Raton: CRC Press, 1994, 65–78.
7. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001; 2:612–619.
8. Banderia-Melo C. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis* infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J Immunol* 2000; 164:1029–1036.
9. Vachier I, Chanez P, Bonnans C, Godard P, Bousquet J, Chavis C. Endogenous antiinflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290:219–224.

10. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 1997; 53:107–137.
11. Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation* 1999; 100:1374–1379.
12. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84:244–245.
13. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Ostrowski K, Schjerling P. Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exer Immunol Rev* 2001; 536:18–31.
14. Todd MK, Goldfarb AH, Boyer BT. Effect of exercise intensity on 6-keto-PGF1 α , TXB2, and 6-keto-PGF1 α /TXB2 ratios. *Thromb Res* 1992; 65:487–493.
15. Gangemi S, Lucioti G, D'Urbano E, Mallamace A, Santoro D, Bellinghieri G, Davi G, Romano M. Physical exercise increases urinary excretion of lipoxin A4 and related compounds. *J Appl Physiol* 2003; 94:2237–2240.
16. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. National Institutes of Health. National Heart Lung and Blood Institute. Revised, 2002.
17. Hasan RA, Thomas J, Davidson B, et al: 8-Isoprostane in the exhaled breath condensate of children hospitalized for status asthmaticus. *Pediatr Crit Care Med* 2010;12:e25–28.
18. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ: Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unanswered questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523–548.
19. Cropp GJ. The exercise bronchoprovocation test: standardization of procedures and evaluation of response. *J Allergy Clin Immunol* 1979;64:627–633.
20. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing—1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:309–329.

21. Joos GF, O'Connor B, Anderson SD, et al. Indirect airway challenges. *Eur Respir J* 2003; 21:1050–1068.
22. Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, Delp-Archer C, Madara JL. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1993; 92:75–82.
23. Christie PE, Spur BW, Lee TH. The effects of lipoxin A4 on airway responses in asthmatic subjects. *Am Rev Resp Dis* 1992; 145:1281–1284.
24. Leff AR. Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:125–132.
25. Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR, Kim E, Ackerman K, Schmidt BA. Multipronged inhibition of airway hyperresponsiveness and inflammation by lipoxin A4. *Nat Med* 2002; 8:1018–1023.
26. Clish CB. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999; 96:8247–8252.
27. Godson C. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte derived macrophages. *J Immunol* 2000; 164:1663–1667.
28. Tahan F, Saraymen R, Gumus H. The Role of Lipoxin A4 in Exercise-Induced Bronchoconstriction in Asthma. *J Asthma* 2008;45:161-164.
29. Brezinski DA, Nistro RW, Serhan CN. Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A4: impact of aspirin therapy. *Circulation* 1992; 86:56–63.