

Mariusz Kozakiewicz, Józef Kędziora, Kornelia Kędziora-Kornatowska, Hanna Pawluk,
Romuald Olszański, Zbigniew Dąbrowiecki, Tomasz Kornatowski

WPLYW HIPERBARII NA WYBRANE PARAMETRY STRESU OKSYDACYJNEGO WE KRWI NURKÓW.

EFFECT OF HYPERBARY ON CHOSEN PRAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN DIVERS` BLOOD.

Streszczenie Wprowadzenie: Celem badań była ocena wpływu ekspozycji w komorze hiperbarycznej na wybrane parametry stresu oksydacyjnego we krwi nurków.

Materiał i metody: W badaniach wzięło udział 10 zdrowych mężczyzn (niepalących, z doświadczeniem w nurkowaniu na duże głębokości) w wieku od 18 do 40 lat (średnia wieku 27 lat), którzy zostali poddani ekspozycji hiperbarycznej symulującej warunki ciśnieniowe panujące podczas nurkowania na głębokość 30 m. Grupę kontrolną stanowiło 16 zdrowych mężczyzn, którzy nigdy nie nurkowali. Osoby te nie były wcześniej poddawane ekspozycji hiperbarycznej. Krew do badań pobierano na czczo, z żyły odłokciowej. Oznaczano aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1) i stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w krwinkach czerwonych, stężenie grup karbonylowych w białku oraz stężenia azotanów/azotynów w osoczu.

Wyniki: Stwierdzono, że w grupie osób nurkujących stężenie MDA w erytrocytach różniło się istotnie statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu grup karbonylowych między grupą kontrolną a grupą nurków. W osoczu nurków stwierdzono znamienne niższe stężenie azotanów/azotynów, a w krwinkach czerwonych istotnie niższą aktywność SOD-1 w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Po ekspozycji hiperbarycznej grupy nurków stwierdzono w erytrocytach znamienne wzrost stężenia MDA i istotny wzrost aktywności SOD-1, a w osoczu istotny wzrost stężenia azotanów/azotynów oraz znamienne podwyższone stężenie grup karbonylowych w białku.

Wnioski: W krwinkach czerwonych osób narażonych na działanie hiperbarii stwierdzono osłabioną enzymatyczną obronę antyoksydacyjną, w porównaniu z osobami przebywającymi w normobarii. We krwi nurków warunkach ekspozycji hiperbarycznej dochodzi do nasilenia stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, hiperbaria, dialdehyd malonowy, grupy karbonylowe, dysmutaza ponadtlenkowa, azotany\azotyny.

Abstract Introduction: The purpose of the study was to evaluate influence of hyperbaric expositions in chambers on chosen parameters of oxidative stress in divers' blood.

Materials and methods: 10 healthy men (non-smoking, with experience in diving on large depths) in age from 18 till 40 years (mean age 27 years) took part in the investigations. Subjects were submitted on hyperbaric conditions. Expositions simulated conditions dominant at 30 m depth. Control group consisted of 16 healthy men, which have never dived nor have been exposed on hyperbaric conditions. Blood was taken after overnight fasting from cubital vein. Superoxide dismutase (SOD-1) activity and concentration of malondialdehyde (MDA) were marked in red blood cells, concentration of carbonyl groups in serum proteins, and concentration of nitrate/nitrite were estimated in plasma.

Results: In group of divers MDA concentration in erythrocytes differed statistically in comparison with control group. Not statistically significant differences were estimated in carbonyl groups concentrations between divers group and control group. Concentration of

nitrite/nitrate in plasma, as well as activity of SOD-1 in red blood cells decreased significantly, in comparison with control group.

After hyperbaric expositions in test group MDA concentration in erythrocytes considerably increased, and also significant increase in SOD-1 activity was observed. In plasma significant increase in concentration of nitrite/nitrate was estimated, as well as increase in carbonyl groups in serum proteins.

Conclusion: In red blood cells of persons exposed to hyperbary considerably weak enzymatic antioxidant defense in comparison with persons in normobary was observed. The intensification of oxidative stress takes place in blood of divers in hyperbaric conditions.

Keywords: Oxidative stress, hyperbaric, malondialdehyde, carbonyl groups, superoxide dismutase, nitrate/nitrite

Wstęp

Z wielu doniesień literaturowych wynika, że terapia hiperbaryczna ma coraz większe zastosowanie w leczeniu różnych schorzeń. Metodę tą stosuje się w chorobie dekompresyjnej czy zatruciu tlenkiem węgla (1,2) coraz częściej terapię hiperbaryczną wykorzystuje się w leczeniu zgorzeli gazowej (3), trudno gojących się ran powstałych w wyniku oparzeń czy po zabiegach chirurgicznych (4). Prowadzone są badania nad możliwościami zastosowania tego typu terapii, jako leczenia wspomagającego po radio- lub chemioterapii (5)

Z drugiej jednak strony wiadomo, że w wyniku metabolizmu tlenowego, nawet w warunkach fizjologicznych, powstają reaktywne formy tlenowe (RFT), które stanowią zagrożenie dla wielu struktur komórkowych. Według niektórych autorów u zdrowego człowieka dochodzi do przekształcenia od 3 do 10 % tlenu cząsteczkowego w jego reaktywne formy (6). Ekspozycja hiperbaryczna może prowadzić do wzmożonego generowania RFT (7), które przyczyniają się do uszkodzeń struktur białkowych (8), lipidów (9), kwasów nukleinowych (10,11). Przeprowadzone badania własne miały na celu ocenę wybranych parametrów stresu oksydacyjnego we krwi osób nurkujących oraz wpływu ekspozycji w komorze hiperbarycznej na procesy pro- i antyoksydacyjne.

Materiały i metody

W badaniu wzięło udział 10 zdrowych, niepalących mężczyzn, w wieku od 18 do 40 lat (średnia wieku 27 lat). Ochotnicy, którzy wyrazili dobrowolnie zgodę na udział w eksperymencie, byli nurkami z różnym stażem (średni staż 7 lat). Zostali poddani ekspozycji hiperbarycznej w komorze imitującej warunki ciśnieniowe panujące podczas nurkowania na głębokości 30 metrów (3 ata). Czas ekspozycji wynosił 3,5 h natomiast plateau ekspozycji wynosiło 30 minut. Ekspozycja hiperbaryczna była zorganizowana przy współpracy z Zakładem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Wojskowego Instytutu Medycznego w Gdyni. Ekspozycja została przeprowadzona przez wykwalifikowany personel medyczny i techniczny. Grupę kontrolną stanowiło 16 zdrowych mężczyzn w wieku 21-48 lat (średnia wieku 39 lat.), którzy nigdy nie nurkowali, ani wcześniej nie byli poddawani ekspozycji hiperbarycznej. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu (KB/402/2004). W grupie nurków krew pobierana była przed ekspozycją i po jej zakończeniu do próbek z heparyną jako antykoagulantem, w celu pozyskania osocza i hemolizatu oraz na skrzep, w celu uzyskania surowicy. W hemolizacie oznaczono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1 E.C.1.15.1.1) metodą Misra, Fridovich (12), która polega na wytwarzaniu anionorodnika ponadtlenkowego z tlenu cząsteczkowego w

obecności EDTA, merkaptetanolu i chlorku manganu. Aktywność SOD-1 wyrażono w U/gHb.

Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) jako markera procesów peroksydacji lipidów oznaczono według metody Placera i wsp. (13), w której wykorzystuje się reakcję kwasu tiobarbiturowego z MDA, w wyniku której powstaje barwny addukt. Stężenie adduktu oznaczano kolorymetrycznie przy długości fali $\lambda=532$ nm. I wyrażono w $\mu\text{mol/gHb}$.

W surowicy oznaczono stężenie grup karbonylowych w białkach według metody Levina i wsp. (14). Stężenie tlenu azotu oznaczono metodą pośrednią według Marletta (15) oznaczając stężenie azotanów/azotynów w osoczu. Metoda ta wykorzystuje reakcję pomiędzy anionem azotanowym i azotynowym z N-(1-naftylo)etylenodiaminą, w środowisku kwasu sulfanilowego (reakcja Griessa), w wyniku czego powstaje barwny kompleks, którego absorbancja przy długości fali $\lambda=545$ nm jest wprost proporcjonalna do stężenia azotanów i azotynów w badanej próbce. Stężenie azotanów/azotynów wyrażono w $\mu\text{mol/l}$. Stężenie białka oznaczono według metody Gornall'a i wsp. (16) wykorzystującej reakcję biuretową. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono używając testu t-Studenta. Za różnicę istotną statystycznie uznano prawdopodobieństwo $p<0,05$.

Wyniki

Wyniki przedstawiono w tabeli 1. W krwinkach czerwonych nurków w warunkach podstawowych stwierdzono istotne statystycznie różnice w stężeniu MDA w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio $0,208\pm 0,04$ $\mu\text{mol/g Hb}$; $0,215 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g Hb}$ $p<0,01$). Ekspozycja hiperbaryczna w badanej grupie nurków wpływała na znamienne statystycznie zwiększenie stężenia MDA w erytrocytach ($0,255\pm 0,03$ $\mu\text{mol/g Hb}$ $p<0,05$)

Stężenie grup karbonylowych w białkach w grupie nurków nie różniło się znamienne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio $0,083\pm 0,02$; $0,078\pm 0,02$ nmol/mg białka). W grupie nurków ekspozycja hiperbaryczna wpłynęła na istotny wzrost stężenia grup karbonylowych ($0,118\pm 0,03$ nmol/mg białka $p<0,05$).

Stężenie tlenu azotu w osoczu (mierzone pośrednio na podstawie stężenia azotanów/azotynów) w grupie nurków było statystycznie znamienne niższe w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio $1,11\pm 0,5$ $\mu\text{mol/l}$; $3,81\pm 0,72$ $\mu\text{mol/l}$, $p<0,0001$). Po ekspozycji hiperbarycznej zaobserwowano w grupie nurków statystycznie znamienne wzrost stężenia azotanów/azotynów ($2,00\pm 0,5$ $\mu\text{mol/l}$, $p<0,01$).

Aktywność SOD-1 w erytrocytach w grupie nurków była statystycznie znamienne niższa w odniesieniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: $2687,78\pm 363,16$ U/g Hb; $3248,8\pm 348,22$ U/g Hb, $p<0,0001$). Po ekspozycji hiperbarycznej zaobserwowano istotny wzrost aktywności tego enzymu ($3115,55\pm 363,12$ U/g Hb, $p<0,01$).

Dyskusja

Podczas ekspozycji hiperbarycznej może dochodzić do wzmożonego generowania RFT, które mogą powodować efekty toksyczne. W wyniku czego może dochodzić do uszkodzenia komórek i tkanek. Ekspozycja hiperbaryczna powodować może nasilenie procesów peroksydacji lipidów, o czym świadczy zaobserwowany w badaniach własnych wzrost stężenia MDA. MDA jest jednym z markerów nasilenia procesów prooksydacyjnych, w których lipidy reagują ze związkami posiadającymi własności utleniające m.in. wolnymi rodnikami. Zaatakowane przez wolne rodniki struktury lipidowe same nabierają charakteru rodnikowego, zapoczątkowując reakcję łańcuchową skutkiem, której jest destrukcja błony komórkowej (17). Wynikiem uszkodzenia błony komórkowej krwinek czerwonych jest uwalnianie żelaza hemowego Fe^{2+} , które jest katalizatorem reakcji generującej RFT (18). W reakcji katalizowanej przez wolne jony Fe^{2+} powstaje bardzo toksyczny rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}). Na

działanie OH[•] są szczególnie narażone białka, w miejscu występowania reszt prolinowych, histydynowych i argininowych (8), którym często towarzyszą jony metali przejściowych (19). Kolejnym argumentem potwierdzającym udział hiperbarii w oksydacyjnym uszkodzeniu struktur białkowych jest stwierdzony w badaniach własnych wzrost stężenia grup karbonylowych. Grupy karbonylowe są lepszym markerem stresu oksydacyjnego w porównaniu z produktami peroksydacji lipidów ponieważ krążą w krwiobiegu przez dłuższy okres czasu a ich stężenie w surowicy jest stabilne przez co najmniej cztery godziny (8,20).

O nasileniu stresu oksydacyjnego, w warunkach narażenia na zwiększone ciśnienie atmosferyczne, może także świadczyć, zaobserwowany wzrost aktywności SOD-1 w grupie nurków. Może to być efekt kompensacyjny związany ze wzmożonym generowaniem RFT w tej grupie.

Porównując badane parametry grupy kontrolnej i grupy nurków można zauważyć, że u osób narażonych na działanie środowiska hiperbarycznego obrona antyoksydacyjna jest osłabiona w porównaniu do osób stale przebywających w warunkach normobarii. Przemawiać może za tym fakt, że stężenie tlenu azotu, który jak wiadomo ma duże znaczenie w regulacji napięcia ściany naczyniowej (20, 21) jest istotnie niższe w badanej grupie nurków w porównaniu z grupą kontrolną. Poziom azotanów/azotynów badanej grupy nurków, nawet po ekspozycji hiperbarycznej, mimo istotnego wzrostu w stosunku do wartości podstawowej, nie przekroczył wartości obserwowanej w grupie kontrolnej. Może to być związane z antyoksydacyjnymi właściwościami tlenu azotu, który będąc sam wolnym rodnikiem może reagować z innymi wolnymi rodnikami biorąc udział w procesie peroksydacji lipidów i terminować tą reakcję (22). Niższy poziom azotanów/azotynów w grupie badanej może także wynikać z faktu, że tlenek azotu może reagować z anionorodnikiem ponadtlenu, w wyniku której powstaje nadtlenuazotyn (20). Za faktem tym przemawia to, że reakcja pomiędzy anionorodnikiem tlenowym a tlenkiem azotu zachodzi prawie trzykrotnie szybciej, niż reakcja dysmutacji katalizowana przez SOD. Powstały nadtlenuazotyn jest związkiem, który jest zdolny w organizmie do dyfundowania na znaczne odległości i posiada silne właściwości utleniające (19). Jest bardzo reaktywny w stosunku do grup tiolowych białek (8) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach, i może inicjować peroksydację lipidów.

O zaburzonej barierze antyoksydacyjnej we krwi nurków świadczyć może także obserwowana aktywność SOD-1, która jest kluczowym komórkowym enzymem antyoksydacyjnym. Aktywność tego enzymu przed ekspozycją w grupie nurków była znacznie niższa, w porównaniu do grupy kontrolnej. Można przypuszczać, że obserwowane różnice w zakresie stanu antyoksydacyjnego organizmu pomiędzy grupą kontrolną a badaną grupą nurków, są wynikiem adaptacji fizjologicznej, wynikającej z przystosowania organizmu do warunków środowiska. Nie można jednak wykluczyć trwałego uszkodzenia bariery antyoksydacyjnej organizmu, przez działanie podwyższonego ciśnienia atmosferycznego na struktury komórkowe odpowiedzialne za ochronę antyoksydacyjną organizmu. W celu dokładnego wyjaśnienia, wpływu hiperbarii na procesy wolnorodnikowe zachodzące w organizmie, konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań na większej grupie ochotników.

Wnioski

W krwinkach czerwonych osób narażonych na działanie hiperbarii stwierdzono istotnie osłabioną enzymatyczną obronę antyoksydacyjną, w porównaniu z osobami przebywającymi stale w warunkach normobarii.

W warunkach hiperbarycznych następuje nasilenie procesów proksydacyjnych, które są źródłem wolnych rodników. Dowodem na to, jest wzrost stężenia i aktywności głównych markerów stresu oksydacyjnego we krwi osób, które poddały się ekspozycji hiperbarycznej.

Tabela 1. Parametry stresu oksydacyjnego przed i po ekspozycji hiperbarycznej.

Parametr	Grupa kontrolna n=16	Grupa nurków n=10	
		przed ekspozycją	po ekspozycji
MDA ($\mu\text{mol/g}$ Hb)	0,215 \pm 0,03 ^a	0,208 \pm 0,04 ^b	0,255 \pm 0,03
Grupy karbonylowe (nmol/mg białka)	0,078 \pm 0,02	0,083 \pm 0,02 ^b	0,118 \pm 0,03
Azotany/azotyny ($\mu\text{mol/l}$)	3,81 \pm 0,72 ^a	1,11 \pm 0,5 ^b	2,00 \pm 0,5
SOD-1 (U/g Hb)	3284,80 \pm 348,22 ^a	2687,78 \pm 363,16 ^b	3115,55 \pm 363,12

^a $p < 0,05$ grupa kontrolna vs grupa nurków przed ekspozycją

^b $p < 0,05$ grupa nurków przed ekspozycją vs grupa nurków po ekspozycji

Piśmiennictwo

- Hampson N.B, Zmaeff J.L. "Outcome of patients experiencing cardiac arrest with carbon monoxide poisoning treated with hyperbaric oxygen" *Ann of Emerg Med.* July 2001;38:36-41
- Hampson NB, Dunford RG, Norkool DM. Treatment of carbon monoxide poisoning in multiplace hyperbaric chambers. *J Hyperbaric Med.* 1992;7:165-171
- Filden MP, Martinovic E, Ells AL. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of orbital gas gangrene. *J AAPOS* 2002; 6:252-4
- Carl UM, Feldmeier JJ, Schmitt G. Hyperbaric oxygen therapy for late sequelae in women receiving radiation after breast-conserving surgery. *J Radiation Oncology Biol. Phys.* 2001;4:1029-1031
- Petre PM, Baciewicz FA, Tigan, Spears JR. Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of metastatic lung tumors in a rat model *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:85-95
- Inoue M.: Protective mechanism against reactive oxygen species. *Biology and Pathobiology.* Third ed., Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jakoby W.B., Schachter D. A., Shafritz D. A. (red), Raven Press, New York, 1994, 443-459
- Jamieson D, Chance B, Candenias E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 1986;48:703-719
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Kolombo R, Rossi Ranieni, Milzani A. Protein carbonylation In human diseases, *Trends in Molecular Medicine* 2003 9:169-176
- Pasaogu H, Sanck B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients in diabetic pregnancy. *Br. J Nutr* 1997; 78:523-532

10. Dennog C., Gedik C., Sharon Wood S, Speit G Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment, *Mutat. Res.* 431 1999 351–359
11. Lundby C, Pilegaard H, van Hall G, Sander M, Calbet J, Loft S, Møller P, Oxidative DNA damage and repair in skeletal muscle of humans exposed to high-altitude hypoxia, *Toxicology* 192 (2003) 229–236
12. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170-3175
13. Placer Z. Suchman L., Johson B.: Estimation of product of lipid peroxidation malondialdehyde in biochemical systems. *Anal.Bioch.*1966, 16,359-364
14. Levine RL, Garland D, Oliver CN i wsp.Determination of carbonyl content of oxidatively modified protens. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478
15. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaft CD, Wishok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate. Nitric oxide is an intermediate. *biochemistry* 1998;27:8706-8711
16. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB* 1987;358-364
17. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction. *Clin Chem* 1995; 41:220-225
18. Wantke, U. i wsp. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary hart burglary. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27:1080-1086
19. Byung PY. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species *Physiological Reviews* 1994; 74:139-159
20. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage In hypertension. *Current Hypertension Reports* 2000, 2:98-105
21. Martin M, Leopold J, Loscazo J. Oxidant Stress in the Vasculature. *Current Atherosclerosis Reports* 1999, 1:156-164
22. O'Donnel VB., Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Cric. Res.* 2001; 88: 12-21

Recenzent: prof. dr. hab. med. Kazimierz Dęga

Autorzy

Mariusz Kozakiewicz, Józef Kędziora, Hanna Pawluk - Katedra i Zakład Biochemii UMK w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy

Romuald Olszański, Zbigniew Dąbrowiecki - Zakład Medycyny Morskiej i Tropikalnej WIM w Gdyni

Kornelia Kędziora-Kornatowska - Katedra i Klinika Geriatrii UMK w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy

Tomasz Kornatowski - Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii UMK w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy

Mariusz Kozakiewicz
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Katedra i Zakład Biochemii
ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
tel.(052)585-37-55 fax.:(052)5853753
e-mail: markozx@wp.pl