

**Mariusz Kozakiewicz, Romuald Olszański, Piotr Siermontowski,  
Zbigniew Dąbrowiecki, Józef Kędziora**

Mariusz Kozakiewicz Department of Biochemistry, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, 24 Karłowicza Str. 85-092 Bydgoszcz, Poland  
+48 52 585 3755 markoz@cm.umk.pl

Romuald Olszański Military Institute of Medicine, Department of Maritime Medicine  
4 Grudzińskiego Str 81-103 Gdynia 3 box 18, Poland  
+48/58/6262405 zmmit@mw.mil.pl

Piotr Siermontowski Military Institute of Medicine, Department of Maritime Medicine  
4 Grudzińskiego Str 81-103 Gdynia 3 box 18, Poland  
+48/58/6262405 zmmit@mw.mil.pl

Zbigniew Dąbrowiecki Military Institute of Medicine, Department of Maritime Medicine  
4 Grudzińskiego Str 81-103 Gdynia 3 box 18, Poland  
+48/58/6262405 zmmit@mw.mil.pl

Józef Kędziora Department of Biochemistry, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, 24 Karłowicza Str. 85-092 Bydgoszcz, Poland  
+48 52 585 3755 kizbioch@cm.umk.pl

**PROCESY PRO – I ANTYOKSYDACYJNE  
W WARUNKACH HIPERBARII**

*Ekspozycja hiperbaryczna prowadzi do wzrostu rozpuszczalności gazów (w tym również tlenu) we krwi. Ta właściwość znalazła zastosowanie kliniczne w leczeniu takich stanów patologicznych jak choroba dekompresyjna, zatrucie tlenkiem węgla, zatorów gazowych, zakażeń tkanek miękkich, oparzeń popromiennych oraz leczeniu trudno gojących się ran. Nurkowanie stało się bardzo popularne więc częściej spotyka się osoby, które bądź to rekreacyjnie bądź wyczynowo nurkują narażając organizm na przebywanie w środowisku hiperbarycznym.*

*Nieodłącznym aspektem tlenowego metabolizmu komórki jest generowanie reaktywnych form tlenowych (RFT). W momencie zachwiania równowagi pomiędzy reakcjami pro- i antyoksydacyjnymi, gdy procesy tworzenia wolnych rodników przewyższają zdolność organizmu do ich wygaszania dochodzi do patologii komórki. U podłoża tych patologii znajdujemy uszkodzenia struktur lipidowych, białkowych i kwasów nukleinowych przez RFT.*

**Słowa kluczowe:** stres oksydacyjny, enzymy antyoksydacyjne

## PRO- AND ANTIOXIDANT PROCESSES UNDER HYPERBARIC CONDITIONS

Hyperbaric exposure leads to increased solubility of gases (including oxygen) in the blood. This property was applied to clinical treatment in the pathological conditions such as decompression sickness, carbon monoxide poisoning, gas embolism, soft tissue infections, burns as a treatment of poorly healing wounds.

Diving has become very popular so often you can meet people who either professionally or recreationally expose themselves to stay in the hyperbaric environment.

Inherent aspect of oxygen metabolism of cells is the generation of reactive oxygen species (ROS). The imbalance between pro- and antioxidant reactions may contribute to the formation of many pathological states. The beginning of many pathological states can be initiated by the damage of lipids and proteins structures and oxidation of nucleic acids by ROS.

**Keywords:** *oxidative stress, antioxidant enzymes*

### CEL BADAŃ

Celem badań była ocena oddziaływania tlenu zawartego w powietrzu na procesy związane ze stresem oksydacyjnym, a także wpływu hiperbarii na zdolność antyoksydacyjną erytrocytów, zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn podczas ekspozycji w komorze hiperbarycznej imitującej nurkowanie na głębokość 30 i 60 m p.p.m. (odpowiednio 0,4 MPa i 0,7 MPa) z powietrzem, jako czynnikiem oddechowym.

### MATERIAŁ DO BADAŃ

Krew pobierana na antykoagulant oraz na skrzep w celu pozyskania surowicy, przez wykwalifikowany personel medyczny. Z pełnej krwi pozyskiwane było osocze oraz izolowano erytrocyty, z których przygotowano hemolizat.

Dokonano porównania parametrów układu pro- i antyoksydacyjnego w grupie kobiet i mężczyzn (doświadczonych nurków) przed i po ekspozycji hiperbarycznej. Oznaczono aktywność enzymów antyoksydacyjnych dysmutazy nadadtlenkowej w erytrocytach (SOD), katalazy w erytrocytach (CAT), peroksydazy glutationowej w erytrocytach (GPx), aktywność transferazy glutationowej w erytrocytach (GST), aktywność oksydazową ceruloplazminy (Cp). Ponadto oznaczono stężenia dialdehydu malonowego w erytrocytach (MDA), stężenie grup karbonylowych w surowicy, stężenie nadadtlenków testem OxyStat w surowicy, stężenie azotanów/azotynów w osoczu.

Porównano aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GPx, GST, Cp) oraz stężenie najczęściej prezentowanych w literaturze markerów peroksydacji lipidów (MDA) i białek (grupy karbonylowe) przed i po każdej ekspozycji. Oznaczono także stężenie nadadtlenków w surowicy testem OxyStat w celu określenia statusu oksydacyjnego oraz stężenie azotanów/azotynów jako wyraz syntezy tlenu przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu.

Ekspozycje przeprowadzane były przez wykwalifikowany personel. Zastosowanie komory hiperbarycznej pozwoliło stworzyć porównywalne warunki ekspozycji dla wszystkich badanych osób biorąc pod uwagę, takie czynniki jak stosowaną mieszaninę oddechową, wysiłek fizyczny, temperaturę i wilgotność otoczenia. Parametry te były przez cały czas ekspozycji monitorowane i rejestrowane. Wszystkie osoby, które wzięły udział w badaniu oddychały powietrzem i nie były poddawane wysiłkowi fizycznemu. Ekspozycje imitowały warunki ciśnieniowe panujące podczas nurkowania na 30 i 60 metrów. Badani poddawani byli najpierw ekspozycji 30 m. następnie po 24 godzinach przerwy poddani zostali ekspozycji 60 m.

Uczestnikami badania było 26 kobiet i 49 mężczyzn - doświadczeni nurkowie, którzy posiadali minimum pierwszy stopień nurkowy.

Kobiety biorące udział w badaniu były w wieku od 19 do 38 lat, średnia wieku  $27 \pm 6$  lat. Mężczyźni uczestniczący w ekspozycjach mieli od 18 do 50 lat, średnia wieku  $30 \pm 7$  lat. Dodatkowo przed i po ekspozycji pobierano krew w celu standardowego badania morfologicznego krwi oraz ilościowe oznaczenie poszczególnych elementów układu białokrwinkowego.

## **WYNIKI BADAŃ**

W wyniku przeprowadzonych ekspozycji w grupie mężczyzn odnotowano następujące zmiany w aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych.

Przeprowadzone na grupie mężczyzn ekspozycje 30 m p.p.m. i 60 m p.p.m. wpłynęły znamienne statystycznie na aktywność SOD-1.

W przypadku CAT, GST oraz GPx nie odnotowano znamienych statystycznie różnic w aktywności w wyniku przeprowadzenia ekspozycji hiperbarycznej. Aktywność oksydazowa Cp wzrosła, jednak wzrost nie był istotny statystycznie.

Nie odnotowano istotnych różnic w aktywności CAT, GPx odpowiednio przed i po ekspozycji. Aktywność transferazy po przeprowadzonej ekspozycji nieznacznie zmniejszyła się. Odnotowano znamienne statystycznie wzrost aktywności Cp po przeprowadzonej ekspozycji 60 m p.p.m. Przeprowadzone ekspozycje hiperbaryczne w grupie mężczyzn spowodowały wzrost stężenia badanych markerów stresu oksydacyjnego (MDA, grupy karbonylowe). Wzrost całkowitego poziomu nadtlenu oznaczony za pomocą zestawu OxyStat nie był istotny statystycznie. Poziom azotanów/azotynów wzrósł znamienne statystycznie w przypadku obu ekspozycji.

Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczebności krwinek białych po obu ekspozycjach hiperbarycznych. W przypadku ekspozycji 30 m p.p.m. wzrost znamienne statystycznie był w frakcji neutrocytów. Po ekspozycji 60 m p.p.m. znamienne statystycznie wzrost liczebności wystąpił w frakcji limfocytów oraz neutrocytów. Zmiany te pozostawały w granicach normy. Pozostałe parametry nie uległy zmianie w wyniku przeprowadzonych ekspozycji hiperbarycznych.

W przypadku kobiet, które uczestniczyły w ekspozycjach hiperbarycznych imitujących warunki panujące podczas nurkowania na 30 oraz 60 m p.p.m. zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost aktywności GPx, CAT, GST oraz SOD. Aktywność Cp nieznamienne statystycznie wzrosła w przypadku obu ekspozycji.

W przypadku oceny nasilenia peroksydacji struktur lipidowych w grupie kobiet po ekspozycji, badano stężenie MDA, które wzrosło nieistotnie statystycznie po 30 m p.p.m. oraz znamienne statystycznie po 60 m p.p.m. Stężenie grup karbonylowych w przypadku obu ekspozycji wzrosło znamienne statystycznie. Koncentracja azotanów/azotynów wzrosła bez znamienności statystycznej po ekspozycji 30 m p.p.m. Oznaczenie stężenia wszystkich nadtlenu w surowicy po ekspozycji 30 m p.p.m wzrosło nieznamienne statystycznie.

Stężenie azotanów/azotynów po przeprowadzeniu ekspozycji 60 m p.p.m. wzrosło znamienne statystycznie. Stężenia nadtlenu w surowicy badane testem OxyStat wzrosło nie istotnie statystycznie.

Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczebności krwinek białych po obu ekspozycjach hiperbarycznych. W przypadku ekspozycji 30 m p.p.m. wzrost znamieny statystycznie był w frakcji neutrocytów. Po ekspozycji 60 m p.p.m. znamieny statystycznie wzrost liczebności wystąpił w frakcji limfocytów oraz neutrocytów. Wzrost liczebności układu białokrwinkowego pozostawał w granicach normy. Pozostałe parametry nie uległy zmianie w wyniku przeprowadzonych ekspozycji hiperbarycznych.

## WNIOSKI

1. Ekspozycje hiperbaryczne odpowiadające nurkowaniom na głębokość 30 i 60 m p.p.m. wraz z następującą po nich dekompresją przeprowadzane zgodnie z obowiązującymi standardami bezpieczeństwa, powodują zwiększoną generację reaktywnych form tlenowych, o czym świadczy wzrost oznaczonych enzymów antyoksydacyjnych.
2. Wzrost stężenia produktu peroksydacji lipidów, jakim jest MDA przemawia za nasiloną peroksydacją lipidów, która nasila się ze wzrostem ciśnienia zewnętrznego podczas ekspozycji.
3. Środowisko hiperbaryczne przyczynia się do zmian w zakresie struktur białkowych, prowadząc do wzrostu stężenia grup karbonylowych następujących po ekspozycjach w środowisku hiperbarycznym.
4. Pojawiający się stres oksydacyjny wydaje się wpływać w różny sposób na kobiety i mężczyzn, za czym przemawia różna aktywność enzymów antyoksydacyjnych w badanych grupach.
5. Jednym ze źródeł reaktywnych form tlenowych może być układ immunologiczny, który w wyniku ekspozycji hiperbarycznych ulega aktywacji.

## PIŚMIENNICTWO

1. Benedetti S., Lamorgese A., Piersantelli M., Pagliarani S., Benvenuto F., Canestrari F.: Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 312–317
2. Brubakk A.O., Duplancic D., Valic Z., Palada I., Obad A., Bakovic D., Wisloff U., Djucic Z.: A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol.* 2005; 566: 901-906
3. Dalle-Donne I., Giustarini D., Kolombo R., Ranieri R., Milzani A.: Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9: 169-176
4. Fabrice J., Steinberg J.G., Wolff F., Gavarry O., Jammes Y.: Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers *Resp Physiol. Nurlobiol.* 2002; 133:121-130
5. Ferrer M.D., Sureda A., Batle J.M., Tauler P., Tur J.A., Pons A.: Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic. Res.* 2007; 41(3): 274-281

6. Kozakiewicz M, Kędziora J, Kędziora-Kornatowska K, Pawluk h, Olszański R, Dąbrowiecki Z, Kornatowski T.: Analysis of oxidase activity of ceruloplasmin and processes of lipid peroxidation in blood in hyperbaric conditions.  
- Pol. J. Environ. Stud. 2006 Vol. 15 nr 2B s. 1284-1286.
7. Freiburger J., Coulombe K., Suliman H., Carraway M., Piantadosi C.: Superoxide dismutase responds to hyperoxia in rat hippocampus. Undersea Hyperb Med. 2004; 31(2): 2227-232
8. Handy R.D., Bryson P., Moody A.J., Handy L.M., Sneyd J.R.: Oxidative metabolism in platelets, platelet aggregation, and hematology in patients undergoing multiple hyperbaric oxygen exposures. Undersea Hyperbaric Medicine; 2005; 32(5);. 327-339
9. Lemaitre F, Meunier N, Bedu M. Effect of air diving exposure generally encountered by recreational divers: oxidative stress? Undersea Hyperb Med. 2002;29(1):39-49.
10. Matsuo H., Shinomiya N., Suzuki S.: Hyperbaric stress during saturation diving induces lymphocyte subset changes and heat shock protein expression Undersea Hyperbaric Medicine. 2000; 27(1): 37-41

### **Praca naukowa finansowana z projektu badawczego nr N N404 468534**

#### Autorzy:

##### **Dr inż. Mariusz Kozakiewicz**

adiunkt Katedry i Zakładu Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medium w Bydgoszczy. Chemik, biochemik autor kilkudziesięciu publikacji dotyczących reakcji wolnorodnikowych, stresu oksydacyjnego

##### **kmdr rez. dr hab. med. Romuald Olszański prof. WIM**

Jest kierownikiem Zakładu Medycyny Morskiej Wojskowego Instytutu Medycznego. Absolwent Wydziału Lekarskiego Wojskowej Akademii Medycznej. Specjalista medycyny morskiej i tropikalnej. Prezes Zarządu Polskiego Towarzystwa Medycyny i Techniki Hiperbarycznej w latach 2001-2004. Członek European Underwater and Baromedical Society [EUBS]. Viceprzewodniczący Komisji Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Oddziału PAN. Wieloletni konsultant Wojska Polskiego w zakresie medycyny morskiej i tropikalnej. Autor i współautor 5 podręczników oraz ponad 100 publikacji naukowych.

##### **kmdr por. dr med. Piotr Siermontowski**

Pracownik Zakładu Medycyny Morskiej Wojskowego Instytutu Medycznego. Absolwent Wydziału Lekarskiego Wojskowej Akademii Medycznej. Specjalista medycyny morskiej i tropikalnej, medycyny transportu, patomorfolog. Urzędujący od 2007 Prezes Zarządu Polskiego Towarzystwa Medycyny i Techniki Hiperbarycznej. Członek Undersea & Hyperbaric Medical Society [UHMS] i European Underwater and Baromedical Society [EUBS]. Współautor 4 podręczników oraz kilkudziesięciu publikacji naukowych.

##### **dr n. biol. Zbigniew Dąbrowiecki**

Adiunkt Zakładu Medycyny Morskiej Wojskowego Instytutu Medycznego, biochemik, specjalizuje się w zaawansowanych technikach analitycznych oraz w systemach rozpoznania epidemiologicznego.

**Prof. dr hab. Józef Kędziora**

Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medium w Bydgoszczy. Wiodącym tematem naukowym jest analiza wybranych parametrów antyoksydacyjnych w etiologii różnych chorób. Zakres zainteresowań obejmuje problemy związane z generacją reaktywnych form tlenowych oraz procesy wolnorodnikowe w ekstremalnych stanach biochemiczno-fizjologicznych oraz w wybranych stanach patologii człowieka.