

THE EFFECT OF HYPERBARIC EXPOSURE ON VASCULAR ENDOTHELIUM'S CAPABILITY OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS**WPLYW EKSPOZYCJI HIPERBARYCZNEJ NA ZDOLNOŚĆ ŚRÓDBŁONKA NACZYŃ DO SYNTEZY TLENKU AZOTU**Mariusz Kozakiewicz ¹⁾, Dorota Kaczerska ²⁾, Natalia Ciesielska ³⁾¹⁾ Department and Institute of Biochemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland¹⁾ Katedra i Zakład Biochemii Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu²⁾ Institute of General Dietetics, Department of Clinical Nutrition, Medical University in Gdańsk, Poland²⁾ Zakład Dietetyki Ogólnej, Katedra Żywienia Klinicznego, Gdański Uniwersytet Medyczny³⁾ Department and Clinic of Geriatrics, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland³⁾ Katedra i Klinika Geriatrii Uniwersytet Mikołaja Kopernika Collegium Medicum w Bydgoszczy

ARTICLE INFO

Journal: PolHypRes 2013 Vol. 45 Issue 4 pp. 7 – 18**ISSN:** 1734-7009**eISSN:** 2084-0535**DOI:** HTTP://DX.DOI.ORG/10.13006/PHR.45.1

Pages: 12, figures: 0, tables: 0.

page www of the periodical: www.phr.net.pl**Keywords/Słowa kluczowe:***(in English):* nitric oxide, endothelium, hyperbaric oxygenation.*(in Polish):* tlenek azotu, śródbłonek, hiperbaria.**Polish-English bilingual publication****Publisher**

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

ABSTRACT

(in English)

Introduction: The paper presents an aphonia of the effects of hyperbaric exposures on endothelial capability to generate nitric oxide synthesis, expressed as a measurement of the concentration of nitrates/nitrites in the blood serum of volunteers subjected to a hyperbaric exposure. In addition the method of measurement of total concentration of superoxides was used to assess the impact of antioxidant capacity while being subjected to hyperbaric oxygenation.

Results: A significantly higher concentration of nitrates/nitrites was observed following a hyperbaric exposure. Similarly, an increased concentration of total superoxides in the researched groups was observed.

Conclusions: The obtained results indicate that staying in a hyperbaric environment is not insignificant for endothelial cells. However, the issue that stays open is the one concerning the time and the pressure conditions in which the exposure remains safe.

(in Polish)

Wstęp: Praca przedstawia alalię wpływu ekspozycji hiperbarycznych na zdolność śródbłonka naczyń do syntezy tlenku azotu wyrażoną jako pomiar stężenia azotanów/azotynów w surowicy ochotników poddanych ekspozycji hiperbarycznej. Dodatkowo oceniano za pomocą pomiaru stężenia całkowitego stężenia ponadtlenu jaki wpływ na pojemność antyoksydacyjną ma przebywanie w hiperbarii.

Wyniki: Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie azotanów/azotynów po ekspozycji hiperbarycznej. Podobnie zaobserwowano podwyższone stężenie całkowitego stężenia nadtlenu w badanej grupie.

Wnioski: Uzyskane wyniki pokazują, że przebywanie w środowisku hiperbarycznym nie jest obojętne dla komórek śródbłonka. Otwartym pozostaje jednak problem jaki czas i na jakie warunki ciśnieniowe pozostaje bezpieczny.

WSTĘP

W ostatnich latach pojawiają się doniesienia sugerujące zmiany w śródbłonku naczyń w wyniku przebywania w środowisku hiperbarycznym [1]. Jednym z ważniejszych fizjologicznie zadań śródbłonka jest utrzymywanie odpowiedniego napięcia naczyń krwionośnych. Jednym z czynników dzięki którym jest to możliwe jest wytwarzanie przez śródbłonek tlenu azotu. W warunkach fizjologicznych tlenek azotu wytwarzany jest z argininy przez syntazę tlenu azotu i odgrywa bardzo ważną rolę, zarówno fizjologii jak i patologii, jako cząsteczka regulatorowa między innymi w regulacji ciśnienia krwi. Tlenek azotu wytwarzany jest w reakcji enzymatycznej oksydacji L-argininy. Enzymem katalizującym powstawanie NO jest syntaza tlenu azotu (NOS E.C. 1.5.1.19).

Stwierdzono kilka form tego enzymu różniących się między sobą masą cząsteczkową. Syntazy tlenu azotu można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwsza jest zależna od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny (cNOS) i druga niezależna od jonów wapnia i kalmoduliny (iNOS) [2]. Niezależnie od rodzaju wszystkie syntazy tlenu azotu zawierają FAD i FMN oraz wykorzystują NADPH jako czynnika przy redukcji argininy do cytruliny. NOS to jedyne jak dotąd poznane enzymy, które jednocześnie potrzebują do prawidłowego funkcjonowania pięciu kofaktorów: FAD, FMN, hemu, tetrahydrobiopteryny (BH_4) oraz kalmoduliny [3]. Wysoce reaktywną formą jest połączenie atomu tlenu i azotu w wyniku czego powstaje molekula posiadająca nieparzystą liczbę elektronów. Rodnik tlenu azotu jest zdolny do reagowania z strukturami białkowymi z mioglobina i hemoglobina. Jak podaje Reif uwalnianie żelaza z ferrytyny może być spowodowane przez rodnik tlenu azotu [4].

W obecności tlenu rodnik tlenu azotu przechodzi w dwutlenek azotu, który także posiada charakter wolnorodnikowy. Na atak rodnika dwutlenku azotu narażone są struktury, które posiadają niewysyczone wiązania wielokrotne. W wyniku tej reakcji dochodzi do powstania rodników nadtlenkowych i alkoksylowych.

Anionorodnik ponadtlenkowy może reagować z $NO_2\cdot$ wytwarzając bardzo reaktywny utleniacz, jakim jest anion nadtlenoazotynowy, który jest zdolny w komórce do dyfundowania na znaczne odległości [5,6]. Ze względu na bardzo krótki okres półtrwania NO w pracy postanowiono posłużyć się metodą pośrednią mierzącą poziom azotanów i azotynów [7,8,9,10].

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetyki przy Akademii Medycznej w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu) nr KB/402/2004 przedstawionej w załączniku.

Oznaczono stężenie nadtlenków w surowicy testem OxyStat w celu określenia statusu oksydacyjnego oraz stężenie azotanów/azotynów jako wyraz syntezy tlenu przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu.

Uczestnikami badania było 75 ochotników - doświadczeni nurkowie, którzy posiadali minimum pierwszy stopień nurkowy. Ochotnicy posiadali różny staż w uprawianiu nurkowania, średnio 9 ± 6 lat.

Uczestniczący w ekspozycjach mieli od 18 do 50 lat, średnia wieku 30 ± 7 lat.

Przed i po każdej ekspozycji uczestnicy badania byli poddawani badaniu lekarskiemu.

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 (odpowiednio 0,3 MPa i 0,6 MPa). Badani poddawani byli najpierw ekspozycji 30 m p.p.m. następnie po 24 godzinach przerwy poddani zostali ekspozycji 60 m p.p.m.

INTRODUCTION

The recent years have seen reports suggesting changes in the vascular endothelium as a result of staying in a hyperbaric environment [1]. One of more important physiological tasks of the endothelium consists in the maintenance of proper tone of blood vessels. This constitutes one of the factors making it possible to produce nitric oxide by the endothelium. In physiological conditions nitric oxide is produced from arginine through nitric oxide synthase and plays a crucial role both in physiology and pathology as a regulatory particle, for instance, in blood pressure regulation. Nitric oxide is a product of an enzymatic reaction of L-arginine oxidation. The catalytic enzyme for NO generation is nitric oxide synthase (NOS E.C. 1.5.1.19).

Several forms of this enzyme are known, differing by molecular mass. Nitric oxide synthases may be divided into two groups. The first relies on Ca^{2+} ions and calmodulin (cNOS) whilst the other is independent of calcium ions and calmodulin (iNOS) [2]. Irrespective of their type, all nitric oxide synthases contain FAD and FMN and utilise NADPH as a factor in arginine reduction to citrulline. NOS are thus far the only known enzymes requiring for proper functioning five concomitant co-factors: FAD, FMN, heme, tetrahydrobiopterin (BH_4) and calmodulin [3]. A highly reactive form is the combination of oxygen and nitrogen atoms leading to the production of a molecule possessing an odd number of electrons. A nitric oxide radical has the capability to react with protein structures, myoglobin and hemoglobin. According to Reif, iron release from ferritin may be induced by a nitric oxide radical [4].

In the presence of oxygen the nitric oxide radical is transferred into nitrogen dioxide, also characterised by a free radical nature. The structures exposed to an attack by a nitrogen dioxide radical are those with multiple dangling bonds. As a consequence of such reaction peroxy and alkoxy radicals are generated.

Superoxide radicals may react with $\text{NO}_2\cdot$ thus creating a highly reactive oxidant in the form of peroxyxynitrite anion having a capacity to diffuse to significant distances within a cell [5,6]. Due to a very short biological half life time of NO the work was based on an indirect method measuring the level of nitrates and nitrites [7,8,9,10].

MATERIAL AND METHODS

The research was conducted under the approval of the Bioethics Committee of the Medical Academy in Bydgoszcz (at present Collegium Medicum in Bydgoszcz UMK Toruń) no. KB/402/2004 as shown in the appendix.

Peroxide concentration in the blood serum was marked with OxyStat test with the purpose of determining the oxidative status as well as the concentration of nitrates/nitrites as an expression of oxide synthesis by endothelial nitric oxide synthase.

The subjects were 75 volunteers - experienced divers having at least the first diving degree. The volunteers were characterised by various seniority in diving, reaching on average 9 ± 6 years.

Participants in the exposures were aged from 18 to 50 years, which gives the average age of 30 ± 7 years.

Before and after each exposure the subjects underwent medical examination.

Their parameters were monitored and registered throughout the entire exposure. All of the participants breathed with air and were not subjected to any physical effort. The exposures imitated the pressure conditions while diving to the depths of 30 and 60 metres (0.3 MPa and 0.6 MPa respectively). The subjects were first subjected to the exposure equivalent to 30 m b.s.l. and after a 24-hours interval to the exposure equivalent to 60 m b.s.l.

OZNACZANIE STĘŻENIA AZOTYNÓW/AZOTANÓW W OSOCZU

Do oznaczenia stężenia azotanów/azotynów wykorzystano zestaw firmy DRG International (EIA-3639). Zestaw pozwala na oznaczenie całkowitego tlenu azotu (NO) poprzez enzymatyczną przemianę azotanów do azotynów za pomocą reduktazy azotynowej. Następnie powstałe w reakcji enzymatycznej azotyny reagują z odczynnikiem Griess'a wytwarzając barwny kompleks, którego maksimum absorpcji znajduje się przy $\lambda=540$ nm.

Przed oznaczeniem każdą próbkę surowicy do badań przefiltrowano przez ultrafiltr 10000 MWCO. Przygotowano wszystkie odczynniki potrzebne do oznaczenia. Do 10 ml dostarczonego przez producenta zestawu buforu reakcyjnego dodano 90 ml wody dejonizowanej. Następnie do fiolki zawierającej NADH dodano 1 ml wody. Z tego rozcieńczenia przygotowano ostateczny roztwór NADH do oznaczenia.

Do fiolki z reduktazą azotanową dodano 1 ml dostarczonego przez producenta buforu rekonstruującego enzym. Po intensywnym wymieszaniu inkubowano przez 30 minut. Przygotowano 6 próbek, które posłużyły do sporządzenia krzywej wzorcowej. Do pierwszej próbki dodano 0,9 ml buforu reakcyjnego a do pozostałych pięciu 0,5 ml buforu reakcyjnego. Następnie do pierwszej próbki dodano 0,1 ml 1000 $\mu\text{mol/l}$ standardu, dokładnie wymieszano. Pobrano z próbki pierwszej 0,5 ml roztworu i przeniesiono do próbki drugiej. Następnie 0,5 ml z próbki drugiej przeniesiono do trzeciej i dokładnie wymieszano. Procedurę tę powtarzano dla kolejnych trzech próbek. W ten sposób uzyskano gradient stężeń do krzywej kalibracyjnej. Kolejną czynnością było pobranie z fiolki 960 μl roztworu reduktazy i rozcieńczono 1440 μl buforu reakcyjnego.

Naniesiono standardy w ilości 0,05 ml na płytkę, do dwóch oczek dodano 0,2ml buforu reakcyjnego jako próby ślepe. Następnie do pozostałych oczek dodano po 0,05 próbek badanych. Do wszystkich oczek dodano po 0,025 ml roztworu NADH i taką samą ilość roztworu reduktazy azotanowej. Tak przygotowaną płytkę zaklejono taśmą ochronną i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po inkubacji do wszystkich oczek dodano po 0,05 ml odczynnika Griessa I po czym do wszystkich oczek, oprócz prób ślepych dodano taką samą objętość odczynnika Griessa II. Płytkę przed pomiarem inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut po czym mierzono absorbancję przy 540 nm za pomocą czytnika do mikropłytek. Wyniki wyrażono w $\mu\text{mol/l}$.

OZNACZANIE POZIOMU NADTLENKÓW ZA POMOCĄ TESTU OXYSTAT

Status oksydacyjny oznaczono kolorymetrycznie za pomocą czytnika do płytek Elisa z wykorzystaniem zestawu OxyStat firmy Biomedica. Test mierzył całkowite stężenie nadtlenków w badanej próbce. Stężenie nadtlenków jest oznaczane za pomocą reakcji, w której nadtlenki reagują z peroksydazą wytwarzając barwny addukt z TMB. Wszystkie reagenty przed oznaczeniem były inkubowane w temperaturze pokojowej. Zgodnie z instrukcją zamieszczoną w zestawie na mikropłytkę zostały naniesione w ilości 10 μl roztwory kontroli, rozcieńczenia do krzywej kalibracyjnej oraz próbki surowicy. Następnie została zmierzona absorbancja przy 450 nm. Po czym do wszystkich oczek w płytce dodano 100 μl roztworu reakcyjnego. Płytkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut. Po inkubacji dodano, do wszystkich oczek na płytce, po 50 μl roztworu zatrzymującego reakcje (roztwór kwasu siarkowego) i ponownie zmierzono absorbancję za pomocą czytnika płytek Elisa przy 450 nm. Test jako wartości referencyjne dla pomiaru w surowicy uznaje te, których stężenie jest niższe niż 350 $\mu\text{mol/l}$. Wyniki przedstawiono w $\mu\text{mol/l}$.

Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program Statistica 6.0. Znamienność statystyczną w wartościach oznaczanych parametrów sprawdzano jednoczynnikową analizą wariancji Anova z użyciem test post-hoc Tukeya. Za istotne statystycznie uznano takie różnice między próbkami, których wartość parametru p spełniała zależność $p<0,05$.

MARKING OF NITRATES/NITRITES CONCENTRATION IN THE PLASMA

The marking of nitrates/nitrites concentration in the plasma was performed with a kit produced by DRG International (EIA-3639). The kit enables marking of total nitric oxide (NO) through an enzymatic transformation of nitrates to nitrites with nitrite reductase. Next, the nitrites produced in the enzymatic reaction were subject to a reaction with Griess reagent generating a coloured complex with maximum absorbance at $\lambda=540$ nm.

Before marking, each blood serum sample intended for testing was filtrated with 10000 MWCO ultrafilter. Next, the necessary reagents used for marking were prepared. 10 ml of the reactive buffer supplied by kit manufacturer was mixed with 90 ml of deionized water. Next, 1 ml of water was added to the vial with NADH. Thus obtained dilution was used for the final NADH solution used in the marking.

1 ml of buffer reconstructing the enzyme supplied by manufacturer was added to the vial with nitrite reductase. After an intense stirring the solution was incubated for 30 minutes. 6 vials were prepared to be used in the preparation of an analytical curve. The first vial was provided with 0.9 ml of reactive buffer, whereas the remaining five with 0.5 ml. Next, 0.1 ml 1000 $\mu\text{mol/l}$ standard was added into the first vial and carefully stirred. 0.5 ml of the dilution was sampled from the first vial and inserted in the second vial. Following this, 0.5 ml from the second vial was moved to the third and carefully stirred. The procedure was repeated for the remaining three vials. This allowed to obtain the concentration gradient for the calibration curve. Further activities consisted in drawing from the vial 960 μl of reductase solution and its dilution with 1440 μl of the reactive buffer.

Standards in the quantity of 0.05 ml were placed on each spot plate, two spots were provided with 0.2 ml of reactive buffer as blank samples. Next, the remaining spots were provided with 0.05 ml of the tested samples. All spots were supplied with 0.025 ml of NADH solution and the same quantity of nitrite reductase solution. Thus prepared plate was sealed with protective tape and incubated for 30 minutes in 37°C. Following the incubation all the spots were provided with 0.05 ml of Griess I reagent and next, all the spots with the exception of the blank samples were supplied with the same volume of Griess II reagent. Before the measurement the plate was incubated in room temperature for 10 minutes, after which absorbance was measured at 540 nm with the use of a microplate reader. The results were expressed as $\mu\text{mol/l}$.

MARKING OF PEROXIDE LEVEL WITH OXYSTAT TEST

Oxidative status was marked colorimetrically with the use of Elise plate reader and an OxyStat kit produced by Biomedica company. The test measured total peroxide concentration in the tested sample. Peroxide concentration is marked with a reaction where peroxides react with peroxidase producing a coloured adduct with TMB. Before the marking procedure, all reagents were incubated in room temperature. In accordance with the instruction provided with the kit, 10 μl of control solutions were deposited on a microplate together with the dilutions for the calibration curve and blood serum samples. Next, absorbance measurement was performed at 450 nm. This was followed by adding onto all spots of the plate 100 μl of reactive solution. The plate was incubated in the temperature of 37°C for 15 minutes. After the incubation, 50 μl of a solution impeding the reaction (sulphuric acid solution) was provided to each spot on the plate and another absorbance measurement was conducted with Elisa plate reader at 450 nm. The values regarded in the test as reference values in the blood serum measurement were those for which the concentration was smaller than 350 $\mu\text{mol/l}$. The results were expressed as $\mu\text{mol/l}$.

The results were presented as a mean \pm standard deviation. Statistical calculations were based on Statistica 6.0 software. The statistical significance of the values of the marked parameters was controlled with one-way analysis of variance (Anova) with the use of Tukey's post-hoc test. The differences perceived as statistically significant were those values of p parameter that were in concord with the following relation $p<0.05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Całkowity poziom nadtlenków oznaczony przed ekspozycją 30 m p.p.m. wynosił 252 ± 118 $\mu\text{mol/l}$ i wzrósł po ekspozycji do 330 ± 137 $\mu\text{mol/l}$.

Podobnie w przypadku ekspozycji 60 m p.p.m. stężenie nadtlenków wzrosło z 201 ± 77 $\mu\text{mol/l}$ do 237 ± 108 $\mu\text{mol/l}$.

Poziom azotanów/azotynów przed ekspozycją 30 m p.p.m. w grupie mężczyzn wynosił $1,35 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/l}$ i po ekspozycji wzrósł statystycznie ($p < 0,04$) do $1,94 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/l}$. W przypadku ekspozycji 60 m p.p.m. stężenie azotanów/azotynów wzrosło statystycznie ($p < 0,01$) z poziomu $1,10 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/l}$ do $1,45 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/l}$.

Mikropęcherzyki gazu pojawiające się w krążącej krwi, powstające podczas dekompresji i po nurkowaniu, mogą tworzyć zatory w mikrokrażeniu, doprowadzając do aktywacji płytek krwi i uszkodzenia komórek śródbłonna [11,12]. Brubakk i wsp. donosili o ostrym uszkodzeniu śródbłonna tętnicy płucnej, występującym po nurkowaniu z powietrzem jako czynnikiem oddechowym [13]. Dokładny mechanizm uszkodzenia śródbłonna nie jest znany. Nieliczne dostępne doniesienia wskazują, że oprócz uszkodzenia mechanicznego, istotną rolę może odgrywać wpływ nurkowania na układ odpornościowy z aktywacją leukocytów i uwalnianiem wolnych rodników [14,15,16,17].

Nurkowanie ma też wpływ na stan czynnościowy śródbłonna naczyń [18,19]. Slichter i wsp. postulowali, że uszkodzenie śródbłonna spowodowane obecnością mikropęcherzyków gazu, może być przyczyną martwicy kości u nurków [20].

Tlenek azotu wydzielany przez komórki śródbłonna naczyniowego oprócz zadania jakie pełni przy regulacji ciśnienia krwi [21], odgrywa także istotną rolę jako neuroprzebiegacz [22]. NO jest uznawany za śródbłonkowy czynnik relaksacyjny (EDRF – endothelium - derived relaxing factor) i jest podstawowym czynnikiem rozkurczającym naczyń krwionośnych.

Przebywanie w warunkach podwyższonego ciśnienia może prowadzić, w pewnych warunkach do zaburzeń neurologicznych [23]. Tlenek azotu charakteryzuje się bardzo krótkim okresem półtrwania (2-5 sekund) i szybko przekształca się do stabilnych azotynów i azotanów. Z uwagi na ten fakt, w niniejszej pracy oznaczono stężenie azotanów/azotynów, jako wyraz endogennej syntezy tlenu azotu [24]. Badania na zwierzętach pokazały zmiany w trakcie trwania ekspozycji hiperbarycznej prowadzące do wzrostu stężenia azotanów/azotynów [25,26]. Badania na szczurach wykazały, że ekspozycja hiperbaryczna, w której ciśnienie wynosi 3 atmosfery powoduje podwyższenie poziomu azotanów/azotynów w strukturach hipokampa badanych zwierząt [27]. Jak donosi Chavko M. i wsp. możliwych jest kilka mechanizmów mogących przyczynić się do toksyczności tlenu dla centralnego układu nerwowego. Jednym z potencjalnych mechanizmów jest działanie NO jako czynnika wazodilacyjnego, który przeciwdziała zwężaniu naczyń krwionośnych dzięki czemu zwiększa dotlenienie tkanek, co powoduje zwiększenie ilości RFT i może powodować narastanie stresu oksydacyjnego w tych tkankach [28,29].

Wykazano również, że inhibicja syntazy tlenu azotu ma osłabiający wpływ na konwulsje powstałe na skutek uszkodzeń CNS w warunkach hiperbarycznych [30,31].

W niniejszej pracy zaobserwowano statystycznie wzrost poziomu azotanów/azotynów w obu badanych grupach, co potwierdza wyniki uzyskane przez Lemaitre i wsp., Labrousse S i wsp. oraz Sureda A i wsp. [29,32,33]. Zostało to także potwierdzone przez autorów prowadzących badania na nurkach, u których porównuje się układ oksydacyjny podczas ekspozycji w komorze hiperbarycznej i podczas nurkowania na 40 m p.p.m. W badaniach tych oprócz nasilenia syntezy NO zaobserwowano podobnie jak w niniejszej pracy, wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co może świadczyć o generacji przez warunki hiperbaryczne stresu oksydacyjnego [34].

Znajduje to także głębsze potwierdzenie w badaniach Ito i wsp., w których analizowano metabolizm Arg po ekspozycji hiperbarycznej. Według Ito możliwa jest wzmożona synteza NO, ponieważ w trakcie ekspozycji hiperbarycznych zachodzi wzmożony metabolizm Arg przez arginazę [35].

RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

The total level of peroxides marked before the 30 m b.s.l. exposure reached 252 ± 118 $\mu\text{mol/l}$ and increased after the exposure to 330 ± 137 $\mu\text{mol/l}$.

Similarly in the case of the 60 m b.s.l. exposure the concentration of peroxides was elevated from 201 ± 77 $\mu\text{mol/l}$ to 237 ± 108 $\mu\text{mol/l}$.

The level of nitrates/nitrites before the 30 m b.s.l. exposure in the researched group of men amounted to 1.35 ± 0.5 $\mu\text{mol/l}$ and after the exposure indicated a statistically significant ($p < 0.04$) increase to 1.94 ± 0.8 $\mu\text{mol/l}$. In the case of the exposure equivalent to 60 m b.s.l. the concentration of nitrates/nitrites showed a statistically significant growth ($p < 0.01$) from the level of 1.10 ± 0.4 $\mu\text{mol/l}$ to 1.45 ± 0.4 $\mu\text{mol/l}$.

Gas microbubbles in circulating blood produced during decompression and after diving may create emboli in microcirculation, thus leading to an activation of blood platelets and causing damage to the cells of endothelium [11,12]. Brubakk and others reported acute damage of the endothelium of pulmonary artery occurring after a performed dive with air as a breathing mix [13]. A precise mechanism behind the damage is not known. The available reports indicate that apart from mechanical damage, a significant role may be attributed to the effect of diving on immunological system accompanied with an activation of leucocytes and a release of free radicals [14,15,16,17].

Diving also has an impact on the functional state of vascular endothelium [18,19]. Slichter and others postulated that the endothelial damage induced by the presence of gas microbubbles may be the reason for bone necrosis in divers [20].

Besides its role in the blood pressure regulation [21], the nitric oxide released by the cells of vascular endothelium also has an important function as a neurotransmitter [22]. NO is believed to be an endothelial relaxant (EDRF - endothelium - derived relaxing factor) and constitutes a fundamental factor in vasodilation.

Remaining in the conditions of an increased pressure may, in certain conditions, lead to neurological disorders [23]. Nitric oxide is characterised by a very short biological half life time (2-5 seconds) and is quickly transformed into stable nitrates and nitrites. Due to this fact, the described research aimed at marking the concentration of nitrates/nitrites as an expression of endogenous nitric oxide synthesis [24]. Research on animals indicated changes in the course of a hyperbaric exposure leading to an increase in the concentration of nitrates/nitrites [25,26]. Studies conducted on rats revealed that a hyperbaric exposure with the pressure of 3 atmospheres generates an increased level of nitrates/nitrites in hippocampus structures of the researched animals [27]. As Chavko M. and others report, several mechanisms that may contribute to oxygen toxicity on the central nervous system are possible. One of the potential mechanisms relies on the activity of NO as a vasodilating factor counteracting the narrowing of blood vessels thus increasing tissue oxygenation, which, on the other hand, leads to an increased number of ROS and may cause an accumulation of oxidative stress in such tissues [28,29].

Moreover, it was indicated that nitric oxide synthase inhibition has a weakening effect on the convulsions emerging as a result of CNS damage in hyperbaric conditions [30,31].

In the discussed study, a statistically significant increase in the level of nitrates/nitrites in both researched groups was noted, which confirms the results obtained by Lemaitre and others, Labrousse S and others, and Sured A and others [29,32,33]. This fact was also confirmed by authors conducting research on divers, in whom the oxidative system is compared during an exposure in a hyperbaric chamber and in the course of performing a dive to 40 m b.s.l. The above research, besides an intensification of NO synthesis, showed a similar increase in the activity of antioxidant enzymes as that observed in the discussed work, which may prove oxidative stress generation induced by hyperbaric conditions [34]. This is further confirmed by a research conducted by Ito and others, analysing Arg metabolism following a hyperbaric exposure. According to Ito, an increased NO synthesis is possible as in the course of hyperbaric exposures an intensified Arg metabolism by arginase is noted [35].

Uzyskane wyniki potwierdzają narastanie stresu oksydacyjnego w warunkach hiperbarycznych. Dowodem tego jest wzrost markerów stresu oksydacyjnego. W niniejszej pracy badano także całkowite stężenie ponadtlenków organicznych w surowicy. W literaturze nie spotkano artykułu, w którym zastosowano podobny test. Jednak ukazało się kilka prac, w których innymi metodami próbowano ocenić status oksydacyjny. Fabrice i wsp. stan oksydacyjny ocenia badając stężenie TBARS oraz koncentrację w osoczu zredukowanego kwasu askorbinowego [36]. Badania te wskazują na różnicę pomiędzy doświadczonymi nurkami a amatorami w zakresie zdolności organizmów na stres oksydacyjny. W innej pracy Benedetti mierzy poziom reaktywnych metabolitów tlenowych za pomocą „testu d-ROM”. Wyniki tych badań wskazują na nasiloną generację RFT, jako konsekwencję przebywania w środowisku hiperbarycznym.

Pomiary potencjału antyoksydacyjnej testem FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) przez Dennog nie dały jednoznacznych rezultatów, jednak wartości testu FRAP po ekspozycji wzrosły bez znamienności statystycznej.

Labrousse i wsp. zaobserwowali wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej, mierzonej testem Randox, jako efekt przebywania organizmu w środowisku hiperbarycznym [32]. Przeprowadzone badania potwierdzają, że przebywanie w środowisku hiperbarycznym nie jest obojętne dla komórek śródbłonna. Otwartym pozostaje jednak problem jaki czas i na jakie warunki ciśnieniowe pozostaje bezpieczny i jakie będą odległe następstwa częstego przebywania w środowisku hiperbarycznym. W celu dokładniejszego określenia granicy pomiędzy bezpiecznym przebywaniem w hiperbarii a patologicznymi skutkami tego typu ekspozycji wymaga dalszych bardziej precyzyjnych badań.

The obtained results confirm an escalation of oxidative stress in hyperbaric conditions proved by an increase in the number of oxidative stress markers. The described study also provided an analysis of total concentration of organic peroxides in the blood serum. The available literature lacks articles where a similar test was applied. However, several papers have been published describing attempts to assess oxidative status with other methods. Fabrice and others measured oxidative status by examining TBARS concentration as well as the concentration of reduced ascorbic acid in the plasma [36]. The above research indicated a difference between experienced and amateur divers within their organisms' capacities regarding oxidative stress. In a different work, Benedetti measured the level of reactive oxygen metabolites with the use of the "d-ROMs test". Its results pointed to an increased ROS generation as a consequence of a time spent in a hyperbaric environment.

The measurement of antioxidant potential with FRAP test (Ferric Reducing Ability of Plasma) carried out by Dennog did not provide unambiguous results, however the FRAP test values following an exposure expressed a statistically insignificant increase.

Labrousse and others observed a growth in the total antioxidant capacity measured by Randox test as a result of being subject to a stay in a hyperbaric environment [32]. The conducted research confirmed that remaining in a hyperbaric environment is not insignificant for endothelial cells. Nonetheless, the issue regarding the time and pressure conditions which are safe and the remoteness of effects related to frequent stays in a hyperbaric environment remains open. In order to provide a more precise determination of the boundary between the safety of hyperbaric oxygenation and the pathological effects of this type of exposure a further and more accurate research is required.

BIBLIOGRAPHY

1. Tjarnstrom, J., et al., Effects of hyperbaric oxygen on expression of fibrinolytic factors of human endothelium in a simulated ischaemia/reperfusion situation. *Scand J Clin Lab Invest*, 2001. 61(7): p. 539-45.
2. Snyder, S.H. and D.S. Bredt, Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*, 1992. 266(5): p. 68-71, 74-7.
3. Agil, A., C.J. Fuller, and I. Jialal, Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. *Clin Chem*, 1995. 41(2): p. 220-5.
4. Reif, D.W., Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 1992. 12(5): p. 417-27.
5. Lu, N., et al., Peroxynitrite and heme protein--mediated nitrative/oxidative modification of human plasma protein: the role of free radical scavenging vs. complex forming. *Toxicol In Vitro*, 2009. 23(7): p. 1227-33. doi: 10.1016/j.tiv.2009.07.034.
6. Gatti, R.M., R. Radi, and O. Augusto, Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett*, 1994. 348(3): p. 287-90.
7. Giustarini, D., et al., Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol*, 2008. 440: p. 361-80. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00823-3.
8. Guevara, I., et al., Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*, 1998. 274(2): p. 177-88.
9. Giovannoni, G., et al., Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem*, 1997. 34 (Pt 2): p. 193-8.
10. Granger, D.L., et al., Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*, 1996. 268: p. 142-51.
11. Havnes, M.B., A. Mollerlokken, and A.O. Brubakk, The effect of two consecutive dives on bubble formation and endothelial function in rats. *Diving Hyperb Med*, 2008. 38(1): p. 29-32.

12. Pontier, J.M., F. Guerrero, and O. Castagna, Bubble formation and endothelial function before and after 3 months of dive training. *Aviat Space Environ Med*, 2009. 80(1): p. 15-9.
13. Brubakk, A.O., et al., A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol*, 2005. 566(Pt 3): p. 901-6.
14. Sacks, T., et al., Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest*, 1978. 61(5): p. 1161-7.
15. Shimamiya, T., et al., Effects of 30-m nitrox saturation dive on the immune system in man. *Undersea Hyperb Med*, 2006. 33(1): p. 63-8.
16. Stewart, G.J., W.G. Ritchie, and P.R. Lynch, Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Pathol*, 1974. 74(3): p. 507-32.
17. Sureda, A., et al., Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Res*, 2004. 38(9): p. 1003-9.
18. Lund, V., et al., Effect of hyperbaric conditions on plasma stress hormone levels and endothelin-1. *Undersea Hyperb Med*, 1999. 26(2): p. 87-92.
19. Torii, R., et al., Mechanism for changes in vasopressin during acute exposure at 3 atm abs air. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 2): p. R259-64.
20. Slichter, S.J., et al., Dysbaric osteonecrosis: a consequence of intravascular bubble formation, endothelial damage, and platelet thrombosis. *J Lab Clin Med*, 1981. 98(4): p. 568-90.
21. Anggard, E., Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 1994. 343(8907): p. 1199-206.
22. Bryan, N.S., Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med*, 2006. 41(5): p. 691-701.
23. Cordes, P., et al., Neurologic outcome of controlled compressed-air diving. *Neurology*, 2000. 55(11): p. 1743-5.
24. Dejam, A., et al., Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. 32(3): p. 423-9.
25. Demchenko, I.T. and C.A. Piantadosi, Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. *Undersea Hyperb Med*, 2006. 33(3): p. 169-74.
26. Sato, T., et al., Changes in nitric oxide production and cerebral blood flow before development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. *Brain Res*, 2001. 918(1-2): p. 131-40.
27. Elayan, I.M., et al., Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain. *J Neurophysiol*, 2000. 83(4): p. 2022-9.
28. Chavko, M., G. Xing, and D.O. Keyser, Increased sensitivity to seizures in repeated exposures to hyperbaric oxygen: role of NOS activation. *Brain Res*, 2001. 900(2): p. 227-33.
29. Sureda, A., et al., Vitamin C supplementation influences the antioxidant response and nitric oxide handling of erythrocytes and lymphocytes to diving apnea. *Eur J Clin Nutr*, 2006. 60(7): p. 838-46.
30. Bitterman, N. and H. Bitterman, L-arginine-NO pathway and CNS oxygen toxicity. *J Appl Physiol* (1985), 1998. 84(5): p. 1633-8.
31. Wang, W.J., et al., Intrasyntosomal free calcium and nitric oxide metabolism in central nervous system oxygen toxicity. *Aviat Space Environ Med*, 1998. 69(6): p. 551-5.
32. Labrousse, S., et al., Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb Res*, 1999. 96(4): p. 309-15.
33. Lemaitre, F., N. Meunier, and M. Bedu, Effect of air diving exposure generally encountered by recreational divers: oxidative stress? *Undersea Hyperb Med*, 2002. 29(1): p. 39-49.
34. Ferrer, M.D., et al., Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res*, 2007. 41(3): p. 274-81.

35. Ito, T., et al., Oxidative stress alters arginine metabolism in rat brain: effect of sub-convulsive hyperbaric oxygen exposure. *Neurochem Int*, 1996. 29(2): p. 187-95.
36. Joulia, F., et al., Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol*, 2002. 133(1-2): p. 121-30.

dr Mariusz Kozakiewicz
Katedra i Zakład Biochemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. Karłowicza 24 85-829 Bydgoszcz
tel. 52/5853759 markoz@cm.umk.p

mgr inż. Dorota Kaczerska
Zakład Dietetyki Ogólnej,
Katedra Żywienia Klinicznego,
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdańsk
tel./fax. 58/3492723
dorotakaczerska@gumed.edu.pl

mgr Natalia Ciesielska
Katedra i Klinika Geriatrii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Collegium Medicum w Bydgoszczy
nataliaciesielska1986@gmail.com

Влияние экспозиции гипербарической на способность эндотелий сосудов к синтезу оксида азота

Введение: В статье представлены алалии влияния экспозиции гипербарической на способность эндотелий сосудов к синтезу оксида азота, выраженной в измерении концентрации нитрата / нитрита в сыворотке крови добровольцев подвергающихся экспозиции гипербарической. Дополнительно оценивалось путем измерения концентрации общей концентрации супероксидов, какое влияние она имеет на антиоксидантную способность в настоящее время в гипербарии.

Результаты: Было замечено значительно более высокие уровни нитратов / нитритов после экспозиции гипербарической. Аналогично, наблюдалось повышение концентрации общей концентрации перекиси в исследуемой группе.

Выводы: Результаты показывают, что нахождение в гипербарической среде не безразлично для эндотелиальных клеток. Тем не менее, проблема остается открытой, как долго и в каких условиях давления остаются в безопасности.

Ключевые слова: оксид азота, эндотелий, гипербария.

