

WPLYW HIPEROKSJI I HIPERBARII NA EKSPRESJĘ BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO I AKTYWNOŚĆ SYNTAZY TLENKU AZOTU – PRZEGLĄD BADAŃ

Jakub Szyller¹⁾, Mariusz Kozakiewicz²⁾, Piotr Siermontowski³⁾

¹⁾ DiaLab Laboratoria Medyczne, Wrocław

²⁾ Katedra i Zakład Chemii Środków Spożywczych, Collegium Medicum im. L. Rydygiera, Bydgoszcz

³⁾ Wojskowy Instytut Medyczny, Zakład Medycyny Morskiej i Hiperbarycznej, Gdynia

STRESZCZENIE

Przebywanie w środowisku o zwiększonej zawartości tlenu (wyższym ciśnieniu parcjalnemu tlenu, pO_2) i pod zwiększonym ciśnieniem (hiperbaria) prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego. Reaktywne formy tlenu (ROS) uszkadzają cząsteczki białek, kwasów nukleinowych, powodują oksydację lipidów i zaangażowane są w rozwój wielu chorób m.in. układu krążenia, chorób neurodegeneracyjnych i in. Istnieją mechanizmy ochrony przed niekorzystnymi skutkami stresu oksydacyjnego. Należą do nich układy enzymatyczne i nieenzymatyczne. Do tych ostatnich zaliczają się m.in. białka szoku cieplnego (HSP). Dokładna ich rola i mechanizm działania są intensywnie badane w ostatnich latach. Hiperoksja i hiperbaria wpływa także na ekspresję i aktywność syntazy tlenku azotu (NOS). Jej produkt – tlenek azotu (NO) może reagować z reaktywnymi formami tlenu i przyczyniać się do rozwoju stresu nitrozacyjnego. NOS występuje w postaci izoform w różnych tkankach i w różny sposób reagujących na omawiane czynniki. Autorzy dokonali krótkiego przeglądu badań określających wpływ hiperoksji i hiperbarii na ekspresję HSP i aktywność NOS.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, hiperoksja, hiperbaria, białka szoku cieplnego, syntaza tlenku azotu.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2017 Vol. 57 Issue 1 pp. 41 - 50

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.1515/phr-2017-0003

Strony: 10, rysunki:0, tabele:0

page **www of the periodical:** www.phr.net.pl

Typ artykułu: przeglądowy

Termin nadesłania: 29.11.2016r.

Termin zatwierdzenia do druku: 08.03.2017r.

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society



WSTĘP

Atmosfera tlenowa towarzyszy od milionów lat większości organizmów żyjących na Ziemi, umożliwiając im prawidłowy rozwój i przetrwanie. Tlen jednak nie zawsze był obecny w atmosferze w takim stężeniu jak obecnie (20,95%).

W okresie paleoproterozoiku wzrost jego zawartości był przyczyną tzw. „wielkiej katastrofy tlenowej” prowadzącej m.in. do masowego obumierania organizmów nieprzystosowanych do wykorzystywania tego pierwiastka w procesach metabolicznych [1]. Obecnie oprócz ogromnej, pozytywnej roli jaką spełnia tlen i jego związki w procesach biochemicznych (np. oddychanie komórkowe [2], sygnalizacja komórkowa [3], odpowiedź immunologiczna [4]) przyczyniać się może do rozwoju stresu oksydacyjnego, szczególnie w warunkach zwiększonego stężenia tlenu (hiperoksji).

Stan ten jest wynikiem zaburzonej równowagi pomiędzy układami pro- i antyoksydacyjnymi tj. procesami wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) a zdolnościami organizmu do ich usuwania. Przez ostatnie dwie dekady był (i nadal jest) jednym z najbardziej interesujących (a zarazem problematycznych) tematów badawczych naukowców na całym świecie. ROS wchodzi w reakcje ze wszystkimi składnikami komórek: lipidami, białkami, węglowodanami, kwasami nukleinowymi [5]. Skutkuje to powstawaniem istotnych zmian w strukturze i biologicznej funkcji cząsteczek.

W przypadku białek uszkodzenia oksydacyjne często prowadzą do utraty aktywności biologicznej [6]. W ostatnich latach sporą uwagę przykładają się do roli białek szoku cieplnego (HSPs, ang. *heat shock proteins*) w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Białka te nazywane „opiekuńcami” syntezowane są głównie pod wpływem stresu środowiskowego (stres oksydacyjny, urazy, hipertermia, wpływ toksyn), ale też w warunkach fizjologicznych i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej [7]. Chronią inne białka m.in. przed agregacją i biorą udział w przyjmowaniu przez nie właściwej struktury.

Ze względu na masę cząsteczkową HSPs dzielą się na rodziny: small HSP (sHSP, 16-30 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP110 (large HSP) [8]. Rodzina białek HSP70 odgrywa kluczową rolę w sortowaniu białek, kontroli ich jakości i kierowaniu uszkodzonych białek do lizosomów lub proteasomów [9]. Zawiera formy syntezowane ciągle i pod wpływem czynników stresowych (indukowalne). HSP70 wykazują też działanie przeciwzapalne i antyapoptotyczne [10]. Small HSP, HSP70 i HSP90 zlokalizowane są w cytoplazmie, HSP42 w mitochondriach, gdzie uczestniczy w przenoszeniu specyficznych białek do tych organelli [11], znajdują się tam również HSP10, HSP60 i HSP75 [12].

Ze stresem oksydacyjnym wiąże się nierozzerwalnie stres nitrozacyjny, w którym główną rolę odgrywa tlenek azotu (NO). Syntezowany jest przez syntazę tlenku azotu (NOS) w wyniku konwersji L-argininy do L-cytruliny. Zidentyfikowano trzy izoformy syntazy: neuronalną (nNOS, NOS1), indukowalną (iNOS, NOS2) i endotelialną (eNOS, NOS3) [13]. Reakcja anionorodnika nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) z tlenkiem azotu prowadzi do utworzenia nadtlenoazotynu (ONOO $^-$) – jednego z ważniejszych czynników nitrujących i wpływających na funkcję białek.

W pracy dokonano przeglądu badań dotyczących wpływu stresu oksydacyjnego na ekspresję HSP i NOS w warunkach hiperoksji, nie tylko w surowicy krwi, ale także w komórkach i tkankach.

WPLYW HIPEROKSJI I HIPERBARII NA EKSPRESJĘ HSPs I NOS

Istnieje ograniczona liczba dostępnych prac dotyczących wpływu hiperoksji/hiperbarii na ekspresję białek szoku cieplnego i NOS. Zdecydowanie więcej badań odnosi się do stresu oksydacyjnego, który można obserwować m.in. we wspomnianych warunkach.

WPLYW NA BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO

W jednym z badań na grupie zdrowych wolontariuszy (w wieku 20-39 lat, niepalących) poddanych ekspozycjom hiperbarycznego tlenu (HBO) (100% tlen, 2,5 ATA, 3x20 min) wykazano istotny wzrost syntezy ($p < 0,01$, *paired t-test*) indukowalnej formy HSP72 w limfocytach 1 dzień po ekspozycji [14].

Ueng i wsp. badali wpływ HBO na apoptozę chondrocytów indukowaną tlenkiem azotu (NO) i znaczenie białka HSP70 w tym procesie [15]. W badaniu oceniano ekspresję HSP70, iNOS i kaspazy 3. W niniejszym opracowaniu autorzy przedstawiają tylko wyniki dotyczące HSP70 i iNOS. Chondrocyty chrząstki stawowej królików zostały wyizolowane i poddane hodowli. Apoptozę indukowano przy pomocy IL-1 β generującej syntezę NO.

Po 36 godzinach komórki podzielono na grupy: kontrolną (C, 5% CO $_2$, 95% powietrza), poddaną działaniu 100% tlenu pod ciśnieniem normalnym (O, 25 min 100% tlen, następnie 5 min. 5% CO $_2$, 95% powietrza), poddaną działaniu powietrza hiperbarycznego (HBA, 90 min. 5% CO $_2$, 95% powietrza, 2,5 ATA), poddaną działaniu tlenu hiperbarycznego (HBO, 25 min. 100% tlen, następnie 5 min. 5% CO $_2$, 95% powietrza, 2,5 ATA).

Stwierdzono zwiększoną ekspresję białka HSP70 w grupie O, HBA, HBO (odpowiednio stosunek HSP70/ β -aktyna: 45,4%, 49,5%, 65,6% w stosunku do grupy kontrolnej – 29,8%) i mRNA dla HSP70. Wzrost ekspresji białka obserwowany był również po 12 i 24 godzinach, a także w chondrocytach zwierząt poddanych działaniu tlenu hiperbarycznego (100% tlen, 2,5 ATA, 1,5 godz. dziennie przez 5 dni w tygodniu). Wykazano istotny spadek ekspresji iNOS (stosunek iNOS/ β -aktyna) w chondrocytach zaraz po ekspozycjach we wszystkich grupach (O, HBA, HBO odpowiednio: 53,1%, 48,3%, 18,8%) w stosunku do grupy kontrolnej (64,0%). Występował także spadek ekspresji mRNA dla iNOS. Podobne zależności obserwowano po 12 i 24 godzinach [15].

Dostępne publikacje dotyczące roli HBO w chorobie dekompresyjnej (DCS) także wskazują na wpływ hiperbarii na HSP70. Xiao-Xiao i wsp. wykazali istotny wzrost ekspresji HSP70 w komórkach rdzenia kręgowego (głównie neuronach) i tkanki płucnej (komórki nabłonka pęcherzyków płucnych i śródbłonka) szczurów ze szczytem po 18 godzinach od ekspozycji hiperbarycznych (wyrażony jako stosunek HSP70/ β -aktyna); nieistotny statystycznie ($p > 0,05$) wzrost ekspresji wykazywały HSP27 i HSP90 [16].

Przedział oznaczeń wynosił 6 godz. i najwyższy pik przypada prawdopodobnie na 20 godzinę. Zastosowanie kwercetyny – inhibitora HSPs, znacząco redukowało efekt wpływu HBO. Kwercetyna uczestniczy w zmianie struktury trzeciorzędowej HSF-1 [17]. Autorzy wskazują, że wzrost ekspresji HSP70 zależy od NO (w doświadczeniach wykorzystano inhibitor iNOS). Jednocześnie na funkcję NOS wpływa istotnie HSP90 [18].

Interesującą pracę przedstawił Huang i wsp. na temat wpływu HBO na ekspresję HSP32 [19]. Jest to enzym – oksygenaza hemu-1, biorący udział w degradacji hemu do biliwerdyny, tlenku węgla (CO) i jonów żelaza [20]. Poddawali oni neurony rdzeniowe działaniu tlenu hiperbarycznego przez 60 min (280 kPa, mieszanina z 1,79% CO₂ dla utrzymania ciśnienia parcjalnego CO₂ 5 kPa i jednocześnie pH kultur komórkowych).

Stwierdzono zależny od HBO wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych ROS i NO (już bezpośrednio po ekspozycji hiperbarycznej) jak również ekspresję HSP32. Zastosowanie zmiatacza ROS (NAC, N-acetylo-L-cysteina) istotnie zmniejszyło ekspresję HSP32. Wykazano jednocześnie, że w indukcję ekspresji HSP32 zaangażowane są szlaki ROS/p38 MAPK/Nrf2 (p38 mitogen activated protein kinase/Nuclear factor-E2-related factor-2) i MEK1/2/Bach1 (mitogen-activated and extracellular signal-regulated kinase 1/2/BTB and CNC homology 1 as a negative regulation pathway) [19].

Autorzy badania zauważają, że ROS (jednak nie NO) są ważnym czynnikiem indukującym HSP32. Produkty rozpadu hemu mogą wykazywać działanie cytoprotekcyjne i antyoksydacyjne. Wiadomo również, że system HSP32/CO może działać przeciwwzapalnie i antyapoptotycznie [21].

Podobne wyniki dotyczące HSP32 otrzymali autorzy w swoim wcześniejszym badaniu (ze szczytem w 12 godzinie), gdzie stwierdzono też istotny statystycznie wzrost ekspresji HSP27, HSP70 i HSP90 [22].

WPLYW NA SYNTAZĘ TLENKU AZOTU

[23] przedstawili wpływ HBO na ekspresję różnych izoform NOS w komórkach ślimaka guinea pigs, gdzie nNOS i eNOS występują fizjologicznie, a iNOS ekspresjonowana jest pod wpływem toksyn, niedokrwienia czy urazu akustycznego. Wykazano, że poszczególne formy NOS ekspresjonowane są w różnym stopniu w różnych częściach ślimaka. Zaobserwowano, że po 20 ekspozycjach HBO tylko niektóre rejony charakteryzują się istotnym wzrostem ekspresji nNOS i eNOS (przy pomocy barwienia immunohistochemicznego). iNOS nie wykazywała różnic w ekspresji przed i po zastosowaniu HBO.

[24] Cabigas i wsp. przedstawili wyniki interesującej pracy dotyczącej mechanizmów kardioprotekcyjnych indukowanych hiperoksją, hiperbarią i aktywujących NOS. Badania przeprowadzono na szczurach w warunkach: hiperoksji (100% tlenu) i normobarii (1 ATM), normoksji (21% tlenu) i hiperbarii (2 ATM), hiperoksji (100% tlenu) i hiperbarii (2 ATM) przez 1 godzinę. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta eksponowane (również przez 1 godzinę) na warunki normoksji (21% tlenu) i normobarii (1 ATM).

Oporność tkanki mięśnia sercowego na niedokrwienie badana była na izolowanym modelu serca wypreparowanego drogą sternotomii. Aby stwierdzić, czy mechanizm kardioprotekcyjny indukowany jest przez NOS, zastosowano inhibitor NOS – L-NAME. Dla oceny ekspresji eNOS i HSP90 zastosowano metodę Western blot z użyciem homogenatu tkanki mięśnia sercowego.

Serca szczurów poddanych działaniu hiperoksji i hiperbarii charakteryzowały się większą ekspresją eNOS. Jednocześnie hiperoksja i hiperbaria zwiększa istotnie, 4-krotnie, oddziaływanie HSP90 i eNOS (białko-białko) w stosunku do grupy kontrolnej, nie zwiększając całkowitej zawartości HSP90. Analiza pod kątem zawartości azotanów (NO₂⁻) i azotanów (NO₃⁻) w tkance mięśnia sercowego wykazała istotny ich wzrost w warunkach normoksji i hiperbarii jak również hiperoksji i hiperbarii (odpowiednio 2,2 i 2,3 razy, p<0,05). Koreluje to ze wzrostem ekspresji NOS. Serca perfundowane przez L-NAME charakteryzowały się większym obszarem martwicy po niedokrwieniu (nie dotyczyło to tylko grupy normoksji i normobarii) w stosunku do grupy kontrolnej.

Podobnie przedstawia się ekspresja NOS w tkance mózgowej. Chavko i wsp. opisują badanie dotyczące nitrowania i oksydacji białek w warunkach hiperoksji [25]. Poddawali oni szczury ekspozycjom hiperbarycznym (5 ATM, czas od 2 do 13 min lub pojawienia się charakterystycznych zmian w zapisie EEG spowodowanych toksycznością tlenową).

Metodą Western blot mierzono zawartość nitrotyrozyny w homogenacie tkanki mózgowej po ekspozycjach hiperbarycznych. Nitrotyrozyna (NT) jest markerem powstawania OONO⁻ (nadtlenoazotynu, istotnego czynnika nitrującego). OONO⁻ powstaje w reakcji NO[•] (który z kolei produkowany jest przez NOS) z anionorodnikiem nadotlenkowym (O₂^{•-}), będącym reaktywną formą tlenu (ROS). Zawartość NT wzrastała w każdej minucie ekspozycji i pozostawała podwyższona po jej zakończeniu.

Zastosowanie 7-NI jako swoistego inhibitora nNOS prowadziło do istotnego zmniejszenia syntezy NO i powstawania NT (p<0,05). Jednocześnie autorzy podają, że reakcja NO[•] z O₂^{•-} jest jedną z najszybszych, w których udział bierze NO[•] i prowadzi do utworzenia ekstremalnie reaktywnego nadtlenoazotynu [25]. Podczas ekspozycji HBO wzrasta więc aktywność NOS, wytwarzanie NO[•] i w efekcie wzrost zawartości NT w mózgu.

Baynosa i wsp. przedstawili wyniki interesujących badań na zwierzętach dotyczących łagodzącego wpływu HBO na efekty niedokrwienno-reperfuzyjne z udziałem NO i zależne od NOS [26]. Autorzy wyszczególnili w badaniu następujące grupy: fazy wczesnej (early-phase group): grupa kontrolna bez niedokrwienia (non ischemic control, NIC), grupa niedokrwienie-reperfuzja (4 godz. niedokrwienie, 30 min reperfuzja, IR), grupa niedokrwienie-reperfuzja-HBO (4 godz. niedokrwienie, 30 min. reperfuzja, HBO podczas ostatnich 90 min. niedokrwienia, IR-HBO), grupa kontrolna NIC-HBO i fazy późnej: NIC, grupa niedokrwienie-reperfuzja (4 godz. niedokrwienie, 24 godz. reperfuzja, IR), grupa niedokrwienie-reperfuzja-HBO (4 godz. niedokrwienie, 24 godz. reperfuzja i HBO podczas ostatnich 90 min. niedokrwienia, IR-HBO). HBO: 100% tlen, 2,5 ATA.

Niedokrwienie wywołano przez zaciśnięcie tętnicy i żyły udowej na określony czas, a następnie zwolnienie zacisku dla uzyskania reperfuzji. W grupach fazy wczesnej (reperfuzja 30 min) nie zauważono istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA dla NOS w gracilis muscle, rectus femoris muscle, aorcie, tkance płucnej ani pomiędzy grupami. Istotny spadek ekspresji mRNA NOS obserwowano w aorcie w grupie IR-HBO w porównaniu do grupy NIC. Zauważono 120% wzrost

ekspresji mRNA eNOS w gracilis muscle w grupie IR-HBO względem IR (79.4 ± 22.3 vs. 36.1 ± 4.5 ; $p < 0.05$). 200% wzrost ekspresji obserwowano w tkance płucnej w grupie IR-HBO względem NIC i IR (91.0 ± 31.2 vs. 30.0 ± 7.8 i 30.2 ± 3.1 ; $p < 0.01$). Wzrost ekspresji mRNA wiązał się istotnie większą ekspresją białka eNOS wykazaną metodą Western blot. Autorzy nie wykazali, aby dla którejś z grup występowała różnica w ekspresji iNOS [26].

Istnieją wyniki badań, gdzie materiałem jest surowica. Badania przeprowadzone na wojskowych, zawodowych nurkach [27] wykazały wysoki, wyjściowy poziom NO_3^- i istotny spadek po 6 tygodniach treningu nurkowego ($49.61 \pm 19.86 \mu\text{M}$ vs. $36.99 \pm 8.82 \mu\text{M}$, $p < 0.05$), co wskazywać może na zmniejszanie się ekspresji i aktywności iNOS w kolejnych tygodniach treningu. Istnieje również pogląd mówiący o hamowaniu syntezy iNOS na skutek toksycznego oddziaływania tlenu (hiperoksja podczas nurkowania). Autorzy powyższego badania odnoszą się także do pracy, w której wykazano, że możliwy jest istotny wzrost ekspresji iNOS po nurkowaniach scuba [28].

DYSKUSJA

BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO

W pracy przedstawiono wpływ hiperoksji i warunków hiperbarycznych na ekspresję białek szoku cieplnego i aktywność syntazy tlenu azotu w różnych tkankach i w surowicy krwi. Efekty oddziaływania tlenu pod ciśnieniem normalnym i zwiększonym są różne, w zależności od rodzaju komórek i tkanek (układów). O ile we wszystkich cytowanych badaniach zaobserwowano wzrost ekspresji różnych HSP i aktywności NOS (i jej poszczególnych izoform), która zależała ściśle od rodzaju badanego materiału.

Brakuje większej ilości badań i wyników odnoszących się do jednego, określonego typu komórek lub tkanek i oznaczeń ekspresji HSP, aktywności NOS w tych tkankach, porównania z surowicą i czasu, po jakim wykonywane są oznaczenia parametrów. Bez tych danych bardzo trudno jest porównać wyniki badań.

HSP nazywane są białkami opiekuńczymi. Jedną z ich ról jest obrona komórek przed szkodliwym oddziaływaniem stresu oksydacyjnego (ściśle: reaktywnych form tlenu) i nitrozacyjnego [29]. Odpowiadają za połączenie pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a komórkami, są zlokalizowane głównie wewnątrzkomórkowo; charakterystyczna dla tych polipeptydów jest też aktywność antyapoptotyczna, która pozwala zwiększyć przeżycie komórek podczas działania stresorów [30].

Dla przykładu ekspresja HSP90 zachodzi na wysokim poziomie w warunkach prawidłowych, tj. fizjologicznych, HSP70 z kolei po zadziaaniu czynników stresowych [31]. Stąd wynikać może obserwowany, istotny wzrost ekspresji m.in. HSP70, HSP72 w warunkach hiperbarycznych (cytowane [14,15,16]), gdzie nasila się wytwarzanie ROS i stres oksydacyjny. Ten z kolei, a ściśle poziom reaktywnych form tlenu może prowadzić do aktywacji czynnika HSF1 (heat shock factor 1) indukującego transkrypcję genów HSP [32].

W tych warunkach dochodzi do powstania uszkodzeń oksydacyjnych białek. HSP70 zapoczątkowują degradację tych cząsteczek w proteasomach, poprzez rozpoznanie, przyłączenie się do cząsteczki białka i skierowanie jej do proteasomów 20S [33].

Wzrost ekspresji HSP70 w komórkach poddanych działaniu stresu oksydacyjnego może dochodzić do ponad 200%, a jej zahamowanie prowadzi do nagromadzenia białek z uszkodzeniami oksydacyjnymi [33]. Reeg i wsp. stwierdzili także, że zahamowanie ekspresji HSP70 nie prowadzi do zmian w formowaniu się agregatów białkowych [33]. Jest to sprzeczne z wieloma doniesieniami o roli białek szoku cieplnego (m.in. hamowanie powstawania agregatów denaturowanych białek, usuwanie denaturowanych polipeptydów [34]) i może wskazywać, że rodzina HSP70 nie uczestniczy w procesie przeciwdziałania agregacji.

HSP70 uczestniczą także w usuwaniu białek na drodze ubiquitynacji [35]. Podczas stresu oksydacyjnego, w zachowanie stabilności i integralności proteasomów 20S zaangażowane jest też białko HSP90; związek ten został opisany już w 1998 roku [36].

Istotnego wzrostu ekspresji HSP70 nie zaobserwowano jednak w neuronach rdzeniowych [19]. Dla tkanki nerwowej charakterystyczny jest wysoki poziom białka HSP70-2 (jednego z białek podrodziny HSP70, wykazującego 84% homologii z HSP70-1a opisywanego w literaturze jako właśnie HSP70/72) [34]. Być może oznaczenie ekspresji dokładnie jednego białka (HSP70-2) przyniosłoby inne rezultaty.

Autorzy badania [16] nie wykazali istotnego statystycznie wzrostu ekspresji białka HSP27 w neuronach rdzeniowych. Zaznaczyć jednak należy, że polipeptyd ten przeciwdziała nagromadzeniu się w komórkach nerwowych uszkodzonych białek, odpowiadających za rozwój chorób neurodegeneracyjnych [37].

Wykazuje również działanie antyoksydacyjne, utrzymuje glutation w formie zredukowanej przyczyniając się do zmniejszenia poziomu wolnych rodników [38].

Ochronę przez stresem oksydacyjnym i reaktywnymi formami tlenu zapewnia także HSP32. Oksygenaza hemowa usuwa ze środowiska reakcji hem, wpływający na wytwarzanie ROS w reakcji Fentona [39]; tlenek węgla blokuje z kolei utlenianie Fe^{2+} hamując efekty prooksydacyjne [40]. Pamiętać należy jednak, że HSP32 może nasilać wytwarzanie ROS spowodowane wysokim stężeniem uwalnianych jonów Fe^{2+} [20].

SYNTAZA TLENU AZOTU

Hiperoksja i oddziaływanie tlenu hiperbarycznego prowadzi do zmniejszenia ekspresji iNOS w chrząstce [15]. HSP70 chroni chondrocyty przed aktywacją kaspazy 3 indukowaną NO [41], wykazując działanie antyapoptotyczne.

Oddziaływanie hiperoksji i/lub hiperbarii na aktywność syntazy tlenu azotu jest różne – zależne od izoformy enzymu. Wyróżnić można 3 izoformy: neuronalną, indukowaną i endotelialną (zwaną też, łącznie z nNOS - konstitutywną, cNOS). Forma indukowana odpowiada za długotrwałą syntezę większych ilości NO [42]. Jednak większość wyników zaprezentowanych badań pokazuje, że zwiększone ciśnienie i zawartość tlenu w mieszaninie oddechowej nie wpływa istotnie na ekspresję iNOS w tkankach.

Wydaje się jednak, że sytuacja ta może przedstawiać się inaczej w surowicy/osoczu [27,43] i innych tkankach. Hiperoksja (>95% O₂) powoduje 5-krotny wzrost ekspresji iNOS i 2-krotny wzrost ekspresji eNOS w tkance płucnej szczurów [44]. Wzrost ekspresji mRNA dla iNOS, białka iNOS i stężenia nitrotyrozyny obserwuje się także w mózgu w warunkach zwiększonej koncentracji tlenu [45].

Poszczególne izoformy różnią się strukturą, masą cząsteczkową i m.in. umiejscowieniem w komórce. Zadaniem enzymu jest synteza tlenu azotu (II) z reszty azotowej L-argininy. Tlenek azotu spełnia istotne funkcje w wielu procesach życiowych. Odpowiada m.in. za regulację ciśnienia krwi, hamowanie agregacji płytek krwi, neuroprzekaznictwo i wiele innych. Nadekspresja NOS, szczególnie formy iNOS może być niekorzystna dla organizmu, a wysokie stężenie NO może wywierać wpływ cytotoksyczny na komórki [46].

Duże ilości NO mogą hamować przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym i aktywować cyklooksigenazę (COX) prowadząc do wytworzenia reaktywnych form tlenu [47]. Reakcja tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenukowym (reaktywną formą tlenu powstającą m.in. w warunkach stresu oksydacyjnego) prowadzi do wytworzenia wysoce reaktywnego i toksycznego nadtlenuazotynu (OONO[•]). Zmienione przez nadtlenuazotyn białka mogą tracić swoje specyficzne właściwości i zdolności, np. katalityczne. Miarą ilości powstającego OONO[•] może być zmienione białko – nitrotyrozyna.

Dostępne badania wskazują, że NO i NOS mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie uszkodzenia oksydacyjnego płuc, wywierając zarówno działanie negatywne, jak i minimalizując uszkodzenia narządu [48]. Przyjmuje się, że narażenie na wysokie stężenia tlenu prowadzi do wzrostu ekspresji NOS i aktywności NO (w miększu płuc szczególnie eNOS). Oddziaływanie jednak różnych warunków tlenowych na NOS zależne jest od narządu, formy enzymu i lokalizacji komórek zawierających NOS w narządach.

BIBLIOGRAFIA

- Kopp RE, Kirschvink JL, Hilburn IA, Nash CZ. The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;9;102(32):11131-6;
- Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27(6):583-96;
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):1005-28;
- Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58;
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11-26;
- Neuzil J, Gebicki JM, Stocker R. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J*. 1993;293:601-6;
- Macario AJL, Conway de Macario E. Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications. *Front Biosci*. 2007;12:2588–600;
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem*. 1986;55:1151–1191;
- M.P. Mayer, B. Bukau, Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, *Cell. Mol. Life Sci*. 2005;62:670–684;
- Tanaka K, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 2010;80:920–31;
- Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil*. 2016;12(4):255-9;
- Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1547-1559;
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37;
- Denno C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res*. 1999;428(1-2):83-9;
- Ueng SW, Yuan LJ, Lin SS, Niu CC, Chan YS, Wang IC, Yang CY, Chen WJ. Hyperbaric oxygen treatment prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular cartilage injury via enhancement of the expression of heat shock protein 70. *J Orthop Res*. 2013;31(3):376-84;
- Ni XX, Ni M, Fan DF, Sun Q, Kang ZM, Cai ZY, Liu Y, Liu K, Li RP, Xu WG. Heat-shock protein 70 is involved in hyperbaric oxygen preconditioning on decompression sickness in rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013;238(1):12-22;
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, Sakai T, Nishino H, Aoike A, Kawai K, Nagata K. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* 1990;15:393;
- Ghosh A, Chawla-Sarkar M, Stuehr DJ. Hsp90 interacts with inducible NO synthase client protein in its heme-free state and then drives heme insertion by an ATP-dependent process. *FASEB J* 2011;25:2049–60;
- Huang G, Diao J, Yi H, Xu L, Xu J, Xu W. Signaling pathways involved in HSP32 induction by hyperbaric oxygen in rat spinal neurons. *Redox Biol*. 2016;10:108-118;
- Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1767-1812;
- S. Tsuchihashi, C. Deondevila, J.W. Kupiec-Weglinski, Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury, *Ann. Transplant*. 9 (2004) 84–87;
- Huang G, Xu J, Xu L, Wang S, Li R, Liu K, Zheng J, Cai Z, Zhang K, Luo Y, Xu W. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against oxidative injury and oxygen-glucose deprivation by up-regulating heat shock protein 32 in rat spinal neurons. *PLoS One*. 2014;9(1):e85967;
- Lin CD, Wei IH, Lai CH, Hsia TC, Kao MC, Tsai MH, Wu CH, Tsai MH. Hyperbaric oxygen upregulates cochlear constitutive nitric oxide synthase. *BMC Neurosci*. 2011;12:21;
- Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, Nilakantan V, Kindwall E, Niezgodna JA, Baker JE. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res*. 2006;72(1):143-51;
- Chavko M, Auker CR, McCarron RM. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide*. 2003;9(1):18-23;
- Baynosa RC, Naig AL, Murphy PS, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Wang WZ, Zamboni WA. The effect of hyperbaric oxygen on nitric oxide synthase activity and expression in ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2013;183(1):355-61;
- Alcaraz-García MJ, Albaladejo MD, Acevedo C, Olea A, Zamora S, Martínez P, Parra S. Effects of hyperoxia on biomarkers of oxidative stress in closed-circuit oxygen military divers. *J Physiol Biochem*. 2008;64(2):135-41;
- 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*, 2007,41:274-281;
- Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(4):310-8;
- Kazmierczuk A, Kiliańska ZM. Plejotropowa aktywność białek szoku cieplnego. *Postepy Hig Med. Dosw*. 2009;63:502-521;
- Takayama S, Reed J, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:9041-9047
- Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* 2007;581:3758-3769;
- Reeg S, Jung T, Castro JP, Davies KJ, Henze A, Grune T. The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome. *Free Radic Biol Med*. 2016;99:153-166;
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007;581:3702-3710;
- S.H. Park, N. Bolender, F. Eisele, Z. Kostova, J. Takeuchi, P. Coffino, et al. The Cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell* 2007,18(1):153–165;



36. M. Conconi, I.Petropoulos, I.Emod, E.Turlin, F.Biville, B.Friguet, Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochem. J.* 1998;333:407–415;
37. Laskowska E. Małe białka szoku termicznego – rola w apoptozie, karcynogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Post. Biochem.* 2007;53:19-26;
38. Arrigo AP, Virof S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:414-422;
39. Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, Rebelo S, Penido C, Smith NR, Coutinho A, Soares MP. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:15837-15842;
40. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2007;13:703-710;
41. Arai Y, Kubo T, Kobayashi K, et al. Adenovirus vector mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor beta 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol* 1997;24:1787–1795;
42. Lechner M., Lirk P., Rieder J.: Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol.* 2005;15:277–289;
43. Ferrer, M.D., Sureda, A., Batlle, J.M., Tauler, P., Tur, J.A., Pons, A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res.* 2007;41:274-281;
44. Potter CF, Kuo NT, Farver CF, McMahon JT, Chang CH, Agani FH, Haxhiu MA, Martin RJ. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups. *Pediatr Res.* 1999;45(1):8-13;
45. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Siffringer M, Bittigau P, Koehne P, Hoppenz M, Obladen M, Bühner C. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res.* 2003;54(2):179-84;
46. Moncada S, Higgs A.E. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:2002–2012;
47. Sokółowska M, Włodek L. Dobre i złe strony tlenku azotu. *Folia Cardiol* 2001;8(5):467-477;
48. Xu F, Tai Fai F, Yung E, Yang M, A YIN J. Endothelial and inducible nitric oxide synthase gene and protein expression in hyperoxia-induced lung injury in premature rat. *Acta Pharmacol Sin* 2002;(23 Suppl):52-58.

Jakub Szyller

DiaLab Laboratoria Medyczne
Życziwa 15-17, 50-001 Wrocław