

WPLYW HIPERBARII TLENOWEJ NA POZIOM NADTLENKÓW LIPIDÓW MÓZGU SZCZURĄ

Tadeusz Doboszyński, Bogdan Łokucijewski

Katedra Medycyny Morskiej i Tropikalnej WAM Gdynia

STRESZCZENIE

Problem toksyczności tlenu i jego wpływu na układ nerwowy jest zagadnieniem ważnym wobec stosowania tlenu i mieszanin oddechowych w praktyce nurkowej, oraz w świetle uderzającego synergizmu działania tlenu i promieniowania jonizującego. Badania poziomu nadtlenków lipidów wykonywano w mózgu szczurów. Zwierzęta poddawano wyczerpującemu wysiłkowi w komorze ciśnieniowej pod działaniem tlenu przy ciśnieniu od 0-3 atn w okresie 25-60 minut. Równolegle przeprowadzono badania na zwierzętach znajdujących się w spoczynku. Po wypreparowaniu mózg homogenizowano i oznaczono nadtlenki lipidów metodą Wollmana z TBA. U zwierząt obciążonych wysiłkiem fizycznym w podanych przedziałach czasu, nie stwierdzono odchyłań w poziomie nadtlenków lipidów, w porównaniu z grupą kontrolną. Wzrost poziomu nadtlenków lipidów stwierdzono u szczurów u których wystąpiły objawy zatrucia tlenowego. Na podstawie powyższych wyników autorzy przypuszczają, że wzrost nadtlenków lipidów mózgu w przypadkach hiperbarii tlenowej należy uznać za daleko posunięty szkodliwy efekt działania tlenu, następujący po uszkodzeniu enzymatycznym oraz zachwianiu obrony antyoksydatywnej komórek. Przy niskich nadciśnieniach tlenu nie stwierdzono odchyłań w poziomie nadtlenków lipidów, w porównaniu z grupą kontrolną.

Słowa kluczowe: tlen, nadciśnienie, szczur, nadtlenki lipidów.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2017 Vol. 57 Issue 1 pp. 63 - 68

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.1515/phr-2017-0005

Strony: 6, rysunki: 0, tabele: 1

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

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

Typ artykułu: oryginalny

Publikowano Przeglądzie Lekarskim nr 3 w 1966 roku

Przyjęto do druku w PHR 30-09-2016



WSTĘP

Z pracami dotyczącymi szkodliwego działania tlenu spotykamy się w piśmiennictwie już od czasu klasycznych doświadczeń P.Berta [1878], który wykazał, że ekspozycja na нефизjologicznie zwiększone ciśnienie tlenu powoduje nieodwracalne uszkodzenie żywej materii [7].

Chociaż zjawisko ograniczenia wyższych form życia w atmosferze z deficytem tlenu zostało dobrze poznane, to jednak nie zawsze potrafimy odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu należy uznać za szkodliwy wzrost ciśnienia parcjalnego tlenu [2,6]. Problem toksyczności tlenu nabrał szczególnego znaczenia w związku z potrzebą wytwarzania sztucznej atmosfery w badaniach podwodnych, lotach kosmicznych oraz w świetle uderzającego synergizmu działania tlenu i promieniowania jonizującego [7]. Praktyczny zasięg zainteresowania hiperbarią tlenową sięga dalej gdyż z powodzeniem są czynione próby stosowania hiperbarii tlenowej w chirurgii, ostrej niewydolności naczyniowej, zatruciu CO, zakażeniu clostridium i innych przypadkach [4].

W związku z powyższym na przestrzeni ostatnich lat można zauważyć wzrost zainteresowania nadtlenkami lipidów i ich wpływu na systemy biologiczne [1,11]. Zauważono, że nadtenki lipidów unieczynnają wiele enzymów a liczni badacze wykazali, że nadtenki lipidów mogą być po części odpowiedzialne za wpływ uszkodzeń radiacyjnych [1]. W pracach na zwierzętach doświadczalnych została potwierdzona możliwość powstawania nadtlenków lipidów mózgu w następstwie kilkugodzinnej ekspozycji na tlen pod zwiększonym ciśnieniem do kilku atmosfer [1].

Celem naszej pracy było zbadanie czy należy liczyć się z możliwością powstawania nadtlenków lipidów w mózgu zwierząt, które będą przebywały krócej w nadciśnieniu tlenowym ale będą wykonywały wyczerpującą pracę, która jak wiadomo ma istotny wpływ na wcześniejsze występowanie objawów zatrucia tlenowego u ludzi [5,13,14].

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzone w doświadczalnej komorze hiperbarycznej dla małych zwierząt na szczurach kapturowych wagi 180-220 g. Badania przeprowadzono na 49 szczurach, które podzielono na 6 grup liczących od 7 do 11 zwierząt. Zwierzęta z grup nie obciążonych wysiłkiem umieszczono w komorze w małych klatkach, pozostałe pływały w wprowadzonej do komory wodzie o temperaturze 23°-24°C. Tlen o czystości 99% wprowadzono do komory (po wyparciu z niej powietrza) z butli pod żądanym ciśnieniem, zapewniając wentylację komory ca 10 l/minutę.

Po upływie zamierzonego czasu lub w przypadku zwierząt pływających, gdy nie miały dość siły aby utrzymać się na powierzchni, obniżono ciśnienie w komorze. Zwierzęta wydobywano i uśmiercano przez przerwanie rdzenia na wysokości drugiego kręgu szyjnego. Mózgowie natychmiast wypreparowywano i niezwłocznie analizowano w oparciu o metodę podaną przez Wollmana [1] z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBA) [12,3]. Zważony mózg homogenizowano przez 3 minuty w temperaturze 0°C z potrójną ilością wody.

Następnie pobierano 3ml homogenatu, który przenoszono do próbowki wirowniczej z zawartością 4,5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego. Zawartość wytrząsano a następnie wirowano. Po odwirowaniu pobierano 3 ml roztworu, który przenoszono do próbowki z zawartością 1ml. 0,75% roztworu kwasu 2-tiobarbiturowego. Próbkę umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 100°C na okres 15 min. Równolegle wykonywano próbę kontrolną. Oznaczanie ilościowe przeprowadzano na fotometrze Pulfricha przy użyciu filtra S-53 w kuwecie F-4992. Otrzymane wyniki ilustruje tabela 1.

Tab.1.

Wyniki oznaczeń poziomu nadtlenków lipidów mózgu szczura.						
Grupa	Warunki eksperymentu	Ilość oznaczeń	Średnia arytmetyczna odczytu (\bar{x})	Błąd standardowy E(\bar{x})	T obliczenie z wzoru Studenta dla rozpatrywanej grupy kontrolnej w odniesieniu do t z tabeli	
I	Powietrze ciśn. atmosferyczne – grupa kontrolna	11	0,259	0,0179	-	
II	Tlen 1 atn – wysiłek wyczerpujący poniżej 60 minut	7	0,283	0,0186	1,048<t	
III	Tlen 2 atn – wysiłek wyczerpujący poniżej 35 minut	8	0,292	0,0270	1,09<t	
IV	Tlen 3 atn – wysiłek wyczerpujący poniżej 25 minut	8	0,281	0,0146	1,112<t	
V	Tlen 3 atn – spoczynek poniżej 25 minut	7	0,296	0,0179	1,654<t	
VI	Tlen 3 atn – spoczynek poniżej 4 godzin	8	0,492	0,0302	7,06>t	

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki oznaczeń przedstawiono w jednostkach ekstynkcji jako średnie arytmetyczne odczytów. Najwyższą wartość uzyskano dla grupy VI, w której zwierzęta znajdowały się pod ciśnieniem 3 atn tlenu przez okres około 4 godzin. Dla pozostałych grup uzyskano wartości zbliżone, jednakże z dość znacznym rozrzutem w obrębie każdej z grup na co wskazuje obliczony błąd standardowy.

Należy przypuszczać, że odchylenia te mogą być potraktowane jako błąd metodyki ponieważ istotny wpływ na zawartość nadtlenków lipidów w analizowanej próbie mają nawet bardzo nieznacznie zmienione parametry między innymi czasu i temperatury zarówno do momentu homogenizacji jak i jej wykonywania. Wyliczone wartości t z wzoru Studenta dla grupy rozpatrywanej w odniesieniu do kontrolnej tj. pierwszej, wykazują po porównaniu z tablicami [9] znamienność statystyczną przy $P=0,05$ jedynie w odniesieniu do grupy szóstej. Dla pozostałych grup znamienności statystycznej nie stwierdzono.

DYSKUSJA

Poziom nadtlenków lipidów oznaczono przy pomocy reakcji kolorymetrycznej z TBA, która jest wykładnikiem obecności dwualdehydu malonowego w badanym materiale. Ponieważ powyższy przebieg reakcji w odniesieniu do homogenatu tkankowego może budzić dodatkowe zastrzeżenia ze względu na jej niepełną specyficzność należy podkreślić, że podane w piśmiennictwie wyniki badań na mitochondriach, mikrosomach oraz komórkach wysiękowych wykazały korelację pomiędzy wynikami próby z TBA a innymi wskaźnikowymi próbami utleniania lipidów [3].

Opierając się na pozytywnej ocenie omawianej reakcji w odniesieniu do badań biochemicznych zastosowaliśmy ją do oceny poziomu nadtlenków lipidów mózgu szczura, przy czym standaryzacja wykonywania próby ograniczyła niekorzystny wpływ czasu i temperatury.

W celu sprawdzenia czy w warunkach sprzyjających wcześniejszemu zatruciu tlenowemu tj. przy wyczerpującym wysiłku (grupa II, III, IV) powstają nadtlenki lipidów, obok grupy kontrolnej nie znajdującej w hiperbarii tlenowej wprowadziliśmy jeszcze dwie grupy dodatkowe (V, VI), w których zwierzęta znajdowały się w spoczynku. W grupach zwierząt obciążonych wysiłkiem w miarę wzrostu nadciśnienia tlenowego wydolność ustroju malała widocznie co manifestowało się skróceniem czasu pływania.

Tym niemniej zarówno przy ciśnieniu 2 atn (w dwóch przypadkach) jak i 3 atn (w jednym przypadku) obserwowano objawy zatrucia tlenowego wyrażające się drgawkami. W grupie zwierząt znajdujących się w spoczynku przez okres 25 minut pod ciśnieniem 3 atn objawów zatrucia nie stwierdzono. Natomiast w grupie zwierząt przebywających do 4 godzin w analogicznych warunkach objawy zatrucia wystąpiły u wszystkich zwierząt przy czym u niektórych rozpoczęły się po 2 godzinach.

Podwyższone wartości dla nadtlenków lipidów mózgu szczura uzyskano jedynie w przypadku właśnie tej grupy. Z przedstawionych danych wynika, że powstawanie nadtlenków lipidów mózgu w ilościach wykazywalnych stosowaną metodą następuje dopiero w dłuższym trwającym zatruciu tlenowym, a przy krótkiej ekspozycji nie jest wykrywalne w okresie pierwszym widocznych objawów zatrucia. U zwierząt wykonujących wyczerpujący wysiłek fizyczny, który automatycznie skracał ekspozycję, podwyższonej zawartości nadtlenków lipidów mózgu nie wykryto.

Wprawdzie mechanizm toksycznego działania tlenu na tkankę mózgową jest niejasny [10], jednakże można sądzić, że istotny wpływ wywiera jeden lub kilka czynników, z których bezpośredni toksyczny wpływ wysokich ciśnień parcyjnych tlenu na pewne składniki komórek mózgu może mieć zasadnicze znaczenie.

Wpływ ten należałoby wiązać z zaburzeniami podstawowych procesów utleniania komórkowego. Najogólniej przyjęte wyjaśnienie tych zaburzeń podkreśla, że enzymy mogą paść ofiarą nieodwracalnej oksydacji, w której tlen odgrywa rolę akceptora elektronów [2, 8]. Zwraca się przy tym uwagę na paramagnetyczne właściwości tlenu, które w powiązaniu z jego nadmiarem lub brakiem mają oddziaływać na ruch elektronów w przylegających częściach łańcucha oddechowego i w ten sposób zagrażać normalnym funkcjom systemu wieloenzymowego.

Z tego względu hyperoksja lub hypoksja mają wpływać na przeciwne końce łańcucha oddechowego [2]. Stąd też wydaje się, że wzrost nadtlenków lipidów mózgu w przypadku hiperbarii tlenowej należy uznać za daleko posunięty szkodliwy efekt, następujący po uszkodzeniu enzymatycznym oraz zachwianiu obrony antyoksydatywnej komórek. W przypadku obciążenia zwierząt wyczerpującym wysiłkiem, ale skróceniu czasu ekspozycji, poziom nadtlenków lipidów mózgu nie uległ podwyższeniu.

WNIOSKI

1. U szczurów w hiperbarii tlenowej 1-3 atn O_2 , obciążonych wysiłkiem fizycznym do całkowitego wyczerpania nie stwierdzono wzrostu nadtlenków lipidów mózgu.
2. Wzrost poziomu nadtlenków lipidów mózgu stwierdzono u szczurów podczas przedłużonego pobytu w hiperbarii tlenowej do około 4 godzin pod ciśnieniem 3 atn O_2 .

BIBLIOGRAFIA

1. Becker N., Galvin J.: *Acrospace Medicine*. 1962, 33, 985-987;
2. Beischer D.: "Man's dependence on the earth's atmosphere. Wyd. The McMillan Comp. New York. 1962, 166-186;
3. Bieri J.: *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Wyd. Oxford 1964, v. 7: 2, 247-266;
4. Boerema J.: *American Heart Journal*. 1965, 69, 289-292;
5. Dolatkowski A.: *Zbiór prac wykonanych za lata 1929-1957*. D-wo Mar.Woj. Gdynia 1957;
6. Fenn W.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 1963, 39, 24, 1703-1713;
7. Froese G.: *J. Appl. Physiol.* 1960, 15, 53-98;
8. Gerschmun H.: *Man's dependence on the earth's atmosphere*. Wyd. The McMillan Comp. New York 1962, 171-178;
9. Guilford J.: *Podstawowe metody stosowane w psychologii i pedagogice*. PWN, Warszawa 1960;
10. Lambertson C., Kough R., Cooper D., Emmel G., Loeschoke M., Schmidt C.: *J. Appl. Physiol.* 1953, 5, 9, 471-486;
11. Placer Z., Wieselikowa A., Słabochowa E.: *Woprosy Pitanja* 1964, 6, 30-33;
12. Sodlacek S.: *Nahrung* 1958, 2, 655;
13. Sjostedt S.: *Biol. Neonatorum*. 1964, 6, 1-2, 1-7;
14. Szczupakow W.: *Profilaktika i leczenie kessonnej choroby*. Medgiz 1962.

Tadeusz Doboszyński

Katedra Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Wojskowa Akademia Medyczna