WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII im. Gen. Karola Kaczkowskiego

Rozprawa doktorska

mgr Jakub SZYLLER

Wpływ hiperbarii na ekspresję wybranych białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu we krwi nurków

Promotor

kmdr por. (r) dr hab. med. Piotr SIERMONTOWSKI, prof. AMW Akademia Marynarki Wojennej im. Bohaterów Westerplatte w Gdyni

Promotor pomocniczy dr n. med. Mariusz KOZAKIEWICZ Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Warszawa, 2020

Moim Rodzicom i bliskim. Bez Was nie doszedłbym do tego momentu. Dzięki Wam spełaniają się wszystkie marzenia! Dziękuję za wszystko. Jesteście wielcy!

Podziękowania

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi Panu dr hab. n. med. Piotrowi Siermontowskiemu, prof. AMW za opiekę naukową, wsparcie podczas pisania pracy, cierpliwość, cenne uwagi i wskazówki, za wyjaśnienie zawiłości patofizjologii i techniki nurkowania.

> Serdecznie dziękuję promotorowi pomocniczemu Panu dr n. med. Mariuszowi Kozakiewiczowi za ogromną pomoc przy pracach laboratoryjnych, dobre rady, dyskusje naukowe i konsultacje.

Serdecznie dziękuję wszystkim, którzy zawsze wspierali mnie w dotychczasowej nauce, pracy i okazywali wsparcie. Praca ta powstała z głębokiego szacunku do nauki. Wartości zanikającej...

Pragnę wyrazić słowa szacunku i uznania dla mojego Przyjaciela, oficera Wojska Polskiego, niegodzącego się z bylejakością, kierującego się niezwykle ważnymi wartościami moralnymi i dbającego o honor żołnierza. Przyjaciela, na którego wsparcie, pomoc i życzliwość zawsze można liczyć. Dziękuję, że mogłem Cię poznać. Pamiętaj, dobrych ludzi nikt nie zapomina!

Spis treści

Spis treści	5
Spis skrótów używanych w pracy	10
Wstęp	12
1. Warunki hiperbaryczne i biochemia stresu oksydacyjnego	14
1.1. Hiperbaria i charakterystyka środowiska hiperbarycznego	14
1.2. prawa gazowe	15
1.2.1 Prawo Daltona	15
1.2.2. Prawo Henry'ego	16
1.2.3. Prawo Boyle'a-Mariotte'a	17
1.2.4. Prawo Gay-Lussaca	17
1.2.5. Prawo Charles'a	18
1.2.6. Prawo podziału Nernsta	18
1.2.7. Dyfuzja	19
1.3. Mieszaniny oddechowe	19
1.3.1. Nitroks	19
1.3.2. Helioks	21
1.3.3. Trimiks	22
1.4. Stres oksydacyjny	23
1.4.1. Reaktywne formy tlenu i ich powstawanie	25
1.4.2. Wybrane biochemiczne parametry stresu oksydacyjnego	28
1.4.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa	28
1.4.2.2. Katalaza	29
1.4.2.3. Peroksydaza glutationowa	29
1.4.2.4. Dialdehyd malonowy	30
1.4.2.5. Wskaźnik antyoksydacyjny De Haan'a	31
1.4.2.6. Żelazo	31
1.5. Wpływ warunków hiperbarycznych na rozwój stresu oksydacyjnego	32
1.6. Białka szoku cieplnego	34
1.6.1. Charakterystyka i klasyfikacja	34

1.6.2. Występowanie	35
1.6.3. Charakterystyka wybranych rodzin białek szoku cieplnego	36
1.6.3.1. HSP70	36
1.6.3.2. HSP90	37
1.6.4. Wzajemne oddziaływanie HSP70 i HSP90	37
1.6.5. Rola białek szoku cieplnego	38
1.6.6. Wpływ stresu oksydacyjnego na ekspresję białek szoku cieplnego	39
1.7. Syntaza tlenku azotu i tlenek azotu	41
1.7.1. Definicja, klasyfikacja i rola	41
1.7.2. Współdziałanie białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu – HSP jako	
modulator funkcji NOS	44
1.7.2.1. Modulator iNOS	44
1.7.2.2. Modulator eNOS	45
1.7.3. Wpływ warunków hiperbarycznych i stresu oksydacyjnego na aktywność	ć
syntazy tlenku azotu, stężenie tlenku azotu i rozwój stresu nitrozacyjneg	;o 46
2. Cel pracy	49
3. Grupa badana	50
4. Metody	53
4.1. Przebieg badania	53
4.2. Oznaczenia parametrów biochemicznych	54
4.2.1. Oznaczanie stężenia białka szoku cieplnego HSP70, HSP90 i syntazy tle	nku
azotu eNOS	55
4.2.2. Oznaczanie stężenia syntazy tlenku azotu iNOS	56
4.2.3. Oznaczanie stężenia żelaza całkowitego	56
4.3. Analiza statystyczna	59
4.4. Ograniczenia metody	60
5. Wyniki	61
5.1. Ekspozycje hiperbaryczne 30 m – dekompresja tlenowa	61
5.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	61
5.1.2. Katalaza (CAT)	61
5.1.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)	62

5.1.4. Dialdehyd malonowy (MDA)	
5.1.5. Wskaźnik antyoksydacyjny	63
5.1.6. Białko szoku cieplnego HSP70	
5.1.7. Białko szoku cieplnego HSP90	
5.1.8. Syntaza tlenku azotu eNOS	
5.1.9. Żelazo	65
5.2. Ekspozycje hiperbaryczne 60 m – dekompresja tlenowa	66
5.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	
5.2.2. Katalaza (CAT)	67
5.2.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)	
5.2.4. Dialdehyd malonowy (MDA)	
5.2.5. Wskaźnik antyoksydacyjny	
5.2.6. Białko szoku cieplnego HSP70	
5.2.7. HSP70 bez podziału na grupę 30 i 60 m	
5.2.8. Białko szoku cieplnego HSP90	
5.2.9. HSP90 bez podziału na grupę 30 i 60 m	74
5.2.10. Syntaza tlenku azotu eNOS	74
5.2.11. eNOS bez podziału na grupę 30 i 60 m	
5.2.12. Syntaza tlenku azotu iNOS	
5.2.13. Żelazo	
5.3. Różnice w wartościach początkowych oznaczanych parametrów, mogą	се
wynikać z następujących po sobie ekspozycji	
5.4. Ekspozycje hiperbaryczne 60 m – dekompresja powietrzna	79
5.4.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	
5.4.2. Katalaza (CAT)	
5.4.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)	
5.4.4. Dialdehyd malonowy (MDA)	
5.4.5. Wskaźnik antyoksydacyjny	
5.4.6. Syntaza tlenku azotu iNOS	
5.5. Porównanie aktywności stężenia białka iNOS w grupie dekompresji	
powietrznej i tlenowej	

5.6. Analiza korelacyjna84
5.6.1. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego
i stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 30 m
5.6.2. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
białek szoku cieplnego – ekspozycje 30 m
5.6.3. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
żelaza – ekspozycje 30 m 88
5.6.4. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i
stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 60 m
5.6.5. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
białek szoku cieplnego – ekspozycje 60 m
5.6.6. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
żelaza – ekspozycje 60 m90
5.6.7. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem
syntazy tlenku azotu eNOS – ekspozycje 30 m
5.6.8. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
syntazy tlenku azotu eNOS – ekspozycje 30 m
5.6.9. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem
syntazy tlenku azotu eNOS i iNOS – ekspozycje 60 m
5.6.10. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem
syntazy tlenku azotu eNOS i iNOS – ekspozycje 60 m
5.6.11. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem eNOS a białkami HSP70 i HSP90 -
ekspozycje 30 m94
5.6.12. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem eNOS a białkami HSP70 i HSP90 -
ekspozycje 60 m94
6. Dyskusja
6.1. Enzymy antyoksydacyjne96
6.2. Żelazo
6.3. Białka szoku cieplnego 100
6.4. Syntaza tlenku azotu108
6.5. Znaczenie uzyskanych wyników dla praktyki nurkowej i wiedzy z zakresu

fizjologii	
7. Wnioski	
Załącznik	
Spis rysunków	
Spis tabel	
Streszczenie	
Abstract	
8. Bibliografia	125

Spis ważniejszych skrótów używanych w pracy

ABD –	domena wiążąca ATP (ang. ATPase binding domain)
ALT –	aminotransferaza alaninowa (ang. <i>alanine transaminase</i>)
ATA –	atmosfera absolutna (ang. atmosphere absolute)
ATP –	adenozynotrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
CAT –	katalaza (ang. catalase)
COX –	cyklooksygenaza (ang. cyclooxygenase)
CTD –	domena C-końcowa (ang. C-terminal domain)
eGFR –	estymowany współczynnik przesączania kłębuszkowego (ang. estimated
	glomerular filtration rate)
eNOS –	endotelialna syntaza tlenku azotu (ang. endothelial nitric oxide synthase)
FAD -	dinukleotyd flawinoadeninowy, forma utleniona (ang. flavin adenine
	dinucleotide)
FADH ₂ –	dinukleotyd flawinoadeninowy, forma zredukowana (ang. flavin adenine
	dinucleotide)
FMN –	mononukleotyd flawinowy (ang. flavine mononucleotide)
GPx –	peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
GSH –	glutation zredukowany (ang. glutathione)
GSSG –	glutation utleniony (ang. glutathione disulfide)
HBO –	tlen hiperbaryczny (ang. hyperbaric oxygen)
HBOT –	leczenie tlenem hiperbarycznym (ang. hyperbaric oxygen therapy)
HIF-1α –	czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją 1 (ang. hypoxia-inducible
	factor 1)
HSF –	czynnik szoku cieplnego 1 (ang. heat shock factor 1)
HSP –	białko szoku cieplnego (ang. heat shock proteine)
iNOS –	indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. inducible nitric oxide synthase)
JAK –	kinazy tyrozynowe Janus (ang. Janus-activated kinases)
L-DOPA –	L-dihydroksyfenyloalanina, lewodopa (ang. L-dihydroxyphenylalanine)
MDA –	dialdehyd malonowy (ang. m <i>alondialdehyde</i>)

- MHC główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
- MnSOD zależna od manganu dysmutaza ponadtlenkowa (ang. manganesedependent superoxide dismutase)
- mRNA matrycowy RNA (ang. messenger RNA)
- **NADH** dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)
- **NADPH** fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NBD domena łącząca nukleotydy (ang. nucleotide binding domain)
- **NF-κB** jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa-B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- **nNOS** neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. neuronal nitric oxide synthase)
- Nrf2 jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. nuclear erythroid 2-related factor)
- **NTD** domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*)
- OUN ośrodkowy układ nerwowy
- PBD domena łącząca peptydy (ang. *peptide binding domain*)
- RFT reaktywne formy tlenu
- **ROMs** reaktywne metabolity tlenu (ang. *reactive oxygenated metabolites*)
- **ROS** reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
- **SBD** domena łącząca substrat (ang. *substrate binding domain*)
- sHSP małe białka szoku cieplnego (ang. small heat shock proteins)
- **SOD** dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)
- **STAT1** przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji typu 1 (ang. *signal transducer and activator of transcription 1*)
- **TBARS** substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. *thiobarbituric acid reactive substances*)
- **TMB** tetrametylobenzydyna (ang. *tetramethylbenzidine*)
- **ZnSOD** zależna od cynku dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *zinc-dependent superoxide dismutase*)

Wstęp

Chęć swobodnego przebywania pod wodą towarzyszy człowiekowi od wieków. Obecnie nurkowanie jest nie tylko szeroko wykorzystywane w celach naukowych, poznawczych, poszukiwawczych czy militarnych na całym świecie, ale w związku z rosnącą dostępnością, dla wielu ludzi stało się sposobem na spędzanie wolnego czasu i poznawanie tajemniczego, podwodnego świata. Podczas nurkowania organizm ludzki narażony jest na wysoce specyficzne warunki, nie występujące w środowisku lądowym. Przebywanie w warunkach zwiększonego ciśnienia ma miejsce także podczas tlenoterapii hiperbarycznej, a niektóre aspekty fizjologii i biochemii obu tych stanów są zbieżne. Pomimo publikowania na całym świecie licznych doniesień z zakresu biologii redoks, patofizjologii nurkowania i tlenoterapii hiperbarycznej, dostępnych jest zaledwie kilkanaście doniesień omawiających wpływ nurkowania na procesy biochemiczne zachodzące w organizmie, przy czym zdecydowana większość z tych badań oparta była na zwierzętach lub liniach komórkowych. W dodatku każde badanie zaplanowane było w inny sposób i przeprowadzane w odmiennych warunkach, co uniemożliwia obiektywne porównanie wyników.

Szczególne zainteresowanie oddziaływaniem ekstremalnych warunków na organizm, chęć szerszego poznania fizjologii i patofizjologii człowieka, jak również próba wpłynięcia na bezpieczeństwo nurków związana z postępem technicznym i naukowym, stanowiło przyczynek do podjęcia badań. Mając na uwadze możliwość wystąpienia choroby dekompresyjnej (DCS) i wskazywaną w pojedynczych doniesieniach rolę HSP i NO w rozwoju DCS, w celu spójnego połączenia tematyki, zbadano w pracy nasilenie stresu oksydacyjnego, stężenie białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90, a także syntaz tlenku azotu eNOS i iNOS przed i po ekspozycjach w komorze hiperbarycznej, symulujących nurkowania do głębokości 30 i 60 m. u zdrowych, zawodowych nurków.

Dane pochodzące z niniejszej pracy, gdzie omawiane oznaczenia biochemiczne po raz pierwszy (łącznie) wykonano w materiale pochodzącym od nurków, pozwolą uzyskać nową, ogólną wiedzę i położyć podwaliny pod kolejne, bardziej zaawansowane badania, w których oprócz stężenia m.in. syntaz tlenku azotu, warto skoncentrować się

także na aktywności enzymu, gdyż nie zawsze zmiany w stężeniu (ekspresji) białka muszą wiązać się ze zmianą aktywności enzymatycznej.

Dostępne obecnie wyniki nielicznych doświadczeń, opartych na bardzo różnych warunkach ekspozycji i z wykorzystaniem m.in. różnych komórek (głównie zwierzęcych) powodują niemałe zamieszanie w piśmiennictwie. Próbą częściowego usystematyzowania i pogłębienia wiedzy jest niniejsza praca.

1. Warunki hiperbaryczne i biochemia stresu oksydacyjnego

1.1. Hiperbaria i charakterystyka środowiska hiperbarycznego

Określenie hiperbaria pochodzi z języka greckiego od słów "*hypér"* – nad, powyżej, oznacza zbyt wysoki poziom i "*báros"* – waga. Poszukiwanie jednej definicji "*hiperbarii*" czy "*środowiska hiperbarycznego*" jest niezwykle trudne. Zazwyczaj mając na myśli te pojęcia, odnosimy się do zwiększonego ciśnienia (otaczającej nas atmosfery, środowiska itp.). Słowniki tłumaczą to pojęcie m.in. tak:

"większe niż normalne (1 atm., 101325 Pa) ciśnienie gazów lub większy ciężar właściwy roztworów od przyjętego jako wartość odniesienia" [1].

Określenia hiperbaria wykorzystanego w stosunku do cieczy (dokładnie jej ciężaru właściwego) praktycznie się nie spotyka w literaturze.

Środowisko to ogół elementów (ożywionych i nieożywionych) jakie nas otaczają. Odnosząc się do nauk przyrodniczych mówimy np. o środowisku wodnym, lądowym. Gdy każdy element tej przestrzeni oddziałuje na nasz organizm z ciśnieniem wyższym niż ciśnienie atmosferyczne można powiedzieć, że przebywamy w środowisku hiperbarycznym. Taka sytuacja występuje np. pod powierzchnią wody w czasie nurkowania. Przykładem może być środowisko wewnątrz komory hiperbarycznej stosowanej m.in. w tlenoterapii hiperbarycznej, habitatu czy dzwonu nurkowego.

W naukach medycznych najczęściej spotyka się hiperbarię tlenową lub leczeniem tlenem hiperbarycznym (HBOT, *ang. Hyperbaric Oxygen Therapy* lub HBO, *Hyperbaric Oxygen*) polegające na oddychaniu 100% tlenem pod ciśnieniem wyższym (wyrażonym w atmosferach absolutnych - ATA, *ang. atmosphere absolute*) od ciśnienia atmosferycznego, tj. 1 atm. [2]. Stosowane zazwyczaj ciśnienie wynosi od 2 do 3 ATA [3]. Podczas przebywania w takim środowisku ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej osiąga do ok. 2000 mm Hg, a w tkankach 200-400 mm Hg [4].

Między innymi ze względu na głębokość nurkowania dzieli się na:

- płytkie (do 20 m H₂O)

- średniogłębokie (od 20 do 45(60) m H_2O)

- głębokie (> 45(60) m H₂O).

W niniejszej pracy omawiane są nurkowania średniogłębokie, eksperymentalne, krótkotrwałe – prowadzone w warunkach symulowanych komory hiperbarycznej, w czasie, w którym nie dochodzi do pełnego wysycenia tkanek gazami obojętnymi.

Zmiany ciśnienia w trakcie nurkowania są niezwykle ważne i wymagają dokładnego zrozumienia. Oddziałujące na nurka ciśnienie sprawia, że wszelkie aspekty związane z właściwościami gazów nabierają istotnego znaczenia biologicznego, co dotyczy także gazów obojętnych chemicznie. Najczęściej stosowaną jednostką ciśnienia w nurkowaniu jest bar (1 bar odpowiada 1000 hPa). Inną często stosowaną jednostką jest ATA, wyrażające ciśnienie absolutne (w stosunku do próżni) w atmosferach fizycznych (1 ATA = 760 mm Hg = 1013,25 hPa). Ogólną zależność pomiędzy jednostkami ciśnienia (zgodną z układem SI) można przedstawić następująco:

0,1 bar = 0,01 MPa = 10 kPa = 0,1 at = 1 msw (metr wody morskiej)

Mówiąc o ciśnieniu działającym na nurka, bierzemy pod uwagę sumę ciśnień: atmosferycznego i ciśnienia hydrostatycznego słupa wody:

$$p_{abs} = p_{atm} + p_{hydr}$$

gdzie:

p_{abs} - ciśnienie absolutne (całkowite), ATA

p_{atm} – ciśnienie atmosferyczne

p_{hydr} – ciśnienie hydrostatyczne

Ciśnienie hydrostatyczne wzrasta liniowo co 10 m H_2O o 1 at (atmosferę techniczną¹).

Rozpatrując liczne aspekty patofizjologii nurkowania (w tym biochemiczne), zawsze należy uwzględniać podstawowe prawa gazowe.

1.2. Prawa gazowe

1.2.1. Prawo Daltona

Ważnym zagadnieniem jest ciśnienie parcjalne decydujące o wpływie danego gazu na fizjologię organizmu. Zgodnie z prawem Daltona (prawem ciśnień parcjalnych, mającym ogromne znaczenie w patofizjologii nurkowania w związku z toksycznym

¹ 1 at = 0,9678415 atm (atmosfery fizycznej)

oddziaływaniem gazów na organizm nurka) ciśnienie mieszaniny gazów równe jest sumie ciśnień, jakie wywierałyby poszczególne jej składniki, gdyby każdy z nich umieszczony był osobno (w jednakowej temperaturze i pod jednakowym ciśnieniem):

$$p = \sum_{i=1}^{k} p_i$$

gdzie:

p – ciśnienie w mieszaninie k-składnikowej w temperaturze T i objętości V

pi – ciśnienie parcjalne (cząstkowe) składnika i w jednakowej temperaturze i objętości

Ciśnienie parcjalne równe jest iloczynowi ciśnienia całkowitego gazu i procentowej zawartości objętościowej danego składnika. Wyrażane jest w atmosferach technicznych [at]. Prawo Daltona spełnione jest jednak tylko dla gazów doskonałych, w przypadku gazów rzeczywistych dotyczy tylko gazów rozrzedzonych.

1.2.2. Prawo Henry'ego

Istotną kwestią związaną z nurkowaniem jest rozpuszczalność gazów. Zmiany ciśnienia powodują istotne zmiany rozpuszczalności gazów w tkankach i płynach organizmu. Zgodnie z prawem Henry'ego, które stanowi teoretyczną podstawę modeli dekompresji, rozpuszczalność gazów rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia, przy czym zależność ta ma charakter liniowy. Wynika to bezpośrednio z równania:

$$p_i = n_i K_i$$

gdzie:

p_i - ciśnienie cząstkowe par składnika i

n_i - liczba moli składnika i

K - stała charakterystyczna dla danego składnika i (gazu) w stałej temperaturze.

Nasycanie gazem (np. tkanek) zwiększa się wraz ze wzrostem ciśnienia. Nasycanie nazywane jest saturacją, odsycanie desaturacją. Procesy te są ważne z punktu widzenia teorii dekompresji i leżą u podstaw patogenezy choroby dekomresyjnej.

1.2.3. Prawo Boyle'a-Mariotte'a

Przemianę izotermiczną gazu opisuje prawo Boyle'a-Mariotte'a:

$$pV = const.$$

(gdy T = const.)

gdzie:

p - ciśnienie gazu

V – objętość gazu

Wynika z niego, że wzrostowi ciśnienia gazu (lub mieszaniny gazów) w stałej temperaturze towarzyszy spadek objętości. Podczas rozprężania gazu rośnie jego objętość. Wynikające z prawa Boyle'a-Mariotte'a zmiany objętości gazu w zamkniętych przestrzeniach organizmu są przyczyną dużej grupy patologii nurkowych; urazów ciśnieniowych. Zależność ta ma także bezpośrednie przełożenie na praktyczne aspekty dekompresji nurków i zużycie mieszanin oddechowych, które rośnie wraz z głębokością.

1.2.4. Prawo Gay-Lussaca (prawo stosunków objętościowych)

Przy stałym ciśnieniu (przemiana izobaryczna) stosunek objętości gazu do jego temperatury jest stały, lub inaczej, objętość gazu jest wprost proporcjonalna do jego temperatury bezwzględnej:

$$\frac{V}{T} = const.$$
 lub $V_t = \frac{V_0 \Delta T}{273}$

gdzie:

V – objętość gazu

V₀ – objętość gazu przed ogrzaniem

V_t – objętość gazu po ogrzaniu

T – temperatura gazu

Jest to niezwykle ważna zależność z punktu widzenia zmian temperatury podczas nurkowania, dotycząca zarówno nurków jak i wykorzystywanego sprzętu (np. butli z mieszaninami oddechowymi). Z powyższego równania wynika np., że dwukrotnemu wzrostowi temperatury gazu towarzyszyć będzie dwukrotny wzrost objętości.

1.2.5. Prawo Charles'a (prawo objętości)

Prawo Charles'a opisuje przemianę izochoryczną (tj. bez zmiany objętości gazu) i nabiera szczególnego znaczenia praktycznego m.in. w odniesieniu do zmian ciśnienia gazów w butlach nurkowych w różnych temperaturach. Matematycznie może zostać wyrażone następująco:

$$\frac{p}{T} = cons.$$

gdzie:

p – ciśnienie gazu

T – temperatura gazu

co oznacza, że w stałej objętości, stosunek ciśnienia gazu do jego temperatury bezwzględnej jest stały. Jeśli temperaturę gazu wzrośnie, to wzrośnie również jego ciśnienie i odwrotnie. Zależność ta ma szczególne znaczenie w nurkowaniu, kiedy ciśnienie gazów zależy np. od temperatury otoczenia lub temperatury ciała.

1.2.6. Prawo podziału Nernsta

Za wymianę gazową w organizmie odpowiada układ krążenia i układ oddechowy. Z punktu widzenia patofizjologii nurkowania istotne jest, jak szybko zostanie osiągnięty stan równowagi pomiędzy stężeniami określonego gazu we krwi i tkankach. Prawo podziału określa w jaki sposób dowolna substancja chemiczna rozpuszcza się w dwóch sąsiadujących ośrodkach, różniących się od siebie. Matematycznie prawo Nernsta wyrażone jest wzorem:

$$\frac{C_1}{C_2} = k$$

gdzie:

C₁, C₂ – stężenia molowe określonej substancji

K – współczynnik podziału

Stosunek stężeń substancji rozpuszczonej w dwóch fazach w danej temperaturze w stanie równowagi jest stały i niezależny od stężenia ogólnego. Wartość współczynnika K charakteryzuje gazy obojętne pod kątem działania narkotycznego.

1.2.7. Dyfuzja

Dyfuzja jest jednym z podstawowych zjawisk, jakie zachodzą w środowisku o zwiększonym ciśnieniu i polega na samorzutnym rozprzestrzenianiu się i przenikaniu cząsteczek w ośrodku o temperaturze T>0 K spowodowanym ruchem cieplnym i wynikającym z różnicy stężeń gazów, a prowadzącym do wyrównania stężeń w układzie faz. Dyfuzja opisana jest ogólnie dwoma prawami Ficka. Dyfuzję gazów opisuje prawo Grahama:

$$\frac{\mu_1}{\mu_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}}$$

gdzie:

 μ_1 , μ_2 - średnie prędkości cząsteczek składnika m₁ i m₂ M₁, M₂ - masy molowe cząsteczek składnika m₁ i m₂

Zgodnie z prawem Grahama szybkość dyfuzji gazów jest odwrotnie proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego z mas molowych tych gazów.

Oddziałujące na nurka ciśnienie jest istotnym czynnikiem wpływającym na fizjologię organizmu. Środowisko wodne jest dla człowieka skrajnie nieprzyjazne. Z przebywaniem w warunkach hiperbarycznych wiąże się szereg zagrożeń: toksyczne działanie tlenu i toksyczne (narkotyczne) działanie gazów obojętnych, związane ze zmianą ich ciśnień parcjalnych, zaburzenie funkcji układów sensorycznych, urazy ciśnieniowe (m.in. płuc, ucha) czy choroba dekompresyjna. Urazy ciśnieniowe spowodowane są dużymi zmianami ciśnienia i niemożnością wyrównywania ciśnień w przestrzeniach powietrznych organizmu. Jest to zagadnienie ważne szczególnie przy ekspozycjach na większe głębokości.

1.3. Mieszaniny oddechowe

1.3.1. Nitroks

Nitroks (nitrox) jest to każda mieszanina tlenu i azotu. Będące również mieszaniną tych samych gazów w stosunku 21% tlenu i 78% azotu powietrze stanowi punkt odniesienia; nitroks normooksyczny. Mieszaniny w których udział procentowy tlenu jest niższy niż w powietrzu atmosferycznym nazywamy nitroksami hipooksycznymi

a te, w których udział tlenu jest większy niż w powietrzu nazywamy nitroksami hiperoksycznymi. Praktyczne zastosowanie w nurkowaniu i technologii hiperbarycznej ma tylko ten ostatni.

Pierwotnie nitroks był stosowany jako mieszanina dekompresyjna. Zastosowanie mieszaniny o mniejszym udziale gazu obojętnego na poszczególnych przystankach dekompresyjnych zwiększało jego eliminację i skracało dekompresję. Również w dekompresji leczniczej nitroks znalazł swoje miejsce. Tabela 6A w której zastąpiono na największej głębokości powietrze nitroksem stawała się bardziej skuteczną [dotyczy tabel dekompresyjnych Marynarki Wojennej].

W nurkowaniach krótkotrwałych, zarówno profesjonalnych jak i dla celów militarnych, stosowane są nitroksy hiperoksyczne o zawartości tlenu od 28 do 80%. Nitroks znalazł zastosowanie w aparatach o obiegu otwartym i półotwartym. Każda technologia nurkowania i każdy skład procentowy nitroksu wymaga opracowania osobnych tabel dekompresyjnych. Nitroks stosowany jest także w aparatach o obiegu zamkniętym, które dysponują możliwością elektronicznej kontroli składu mieszaniny².

Zastosowanie nitroksów jako mieszaniny oddechowej pozwalało na dłuższe w stosunku do oddychania powietrzem czasy ekspozycji i pobytów na głębokości. Jednak te same nitroksy ograniczają głębokość maksymalną nurkowania w stosunku do powietrza ze względu na mózgową toksyczność tlenową. Im większa zawartość tlenu w mieszaninie, tym dłuższy czas pobytu bezdekompresyjnego na danej głębokości, ale też tym mniejsza bezpieczna głębokość.

Wyżej wymienione właściwości nitroksów wywołały zainteresowanie tym czynnikiem oddechowym płetwonurków amatorów. Sprzęt do nurkowań amatorskich oznaczony kolorem żółto – zielonym oraz oferta ładowania butli nitroksem stały się istotnym źródłem dochodów dla federacji i baz nurkowych.

W nurkowaniach saturowanych nitroks nie ma większego zastosowania z uwagi na zagrożenie narkozą azotową a szczególnie toksycznością tlenu [5, 6]. Mieszaniny nitroksowe na głębokościach większych niż 45 m powodują objawy narkozy azotowej mogące stanowić zagrożenie dla nurków, a przede wszystkim eliminują możliwość pracy, która jest celem wykonywania nurkowań saturowanych [7-10].

² NO-07-A005 Nurkowanie w celach militarnych – czynniki oddechowe – klasyfikacja, wymagania i badania.

Dodatkowym zagrożeniem jest możliwość wystąpienia choroby dekompresyjnej. W swoich badaniach Tikuisis opisał 97 przypadków choroby dekompresyjnej w grupie 2023 nurków zaangażowanych w opracowanie tabel dekompresyjnych dla saturowanych nurkowań powietrznych i nitroksowych [11].

1.3.2. Helioks

Mieszaniną oddechową, która w istotny sposób poszerzyła możliwości eksploracyjne nurków jest helioks. Zastąpienie azotu lżejszym, słabiej rozpuszczającym się w tłuszczach i rzadszym helem pozwoliło na zmniejszenie oporów oddechowych, a przede wszystkim na eliminację narkozy azotowej. Oddychający helioksem, oczywiście hipooksycznym, nurkowie osiągnęli głębokość 420 m. Do wad helu, poza znaczną i cały czas rosnąca ceną, należą trudności z komunikacja głosową. Prędkość rozchodzenia się dźwięku w atmosferze helowej jest znacznie większa niż w powietrzu, co czyni mowę ludzką niezrozumiałą [12, 13].

Znacznie istotniejsza wadą helu jest jego przewodnictwo cieplne, 6-cio krotnie większe niż powietrza. Powoduje to istotne problemy z zachowaniem termostazy i ochroną cieplną nurków. Przy dłuższych nurkowaniach konieczne jest stosowanie podgrzewania mieszaniny oddechowej i ogrzewanie skafandrów, a w nurkowaniach saturowanych utrzymywanie we wnętrzu komory znacznie wyższej temperatury niż przy innych czynnikach oddechowych, zamykającej się w wąskich granicach 28 – 32°C [14-16].

Jednak mimo wszystkich wyżej wymienionych wad, mieszaniny helowo – tlenowe, dzięki swoim zaletom, znajdują szerokie zastosowanie w nurkowaniach profesjonalnych, dla celów militarnych, a także dla wąskiej grupy płetwonurków amatorów. Granicą nurkowań na mieszaninie helioksowej jest głębokość ok. 150 metrów, na której pojawiają się objawy podobne do narkozy azotowej, nazywane zespołem neurologicznym wysokich ciśnień (HPNS).

Badania mające na celu usunięcie wad helioksu pozwoliły na stworzenie mieszaniny trójskładnikowej: trimiksu. Dodanie do helioksu pewnej ilości azotu obniżyło cenę mieszaniny, zmniejszyło też jej przewodnictwo cieplne i prędkość rozchodzenia się dźwięku. Powstał w ten sposób najbardziej uniwersalny czynnik

oddechowy łączący zalety powietrza i helioksu, natomiast pozbawiony ich wad. Mieszaniny te są najekonomiczniejszym czynnikiem oddechowym i znajdują szerokie zastosowanie we wszystkich typach nurkowań [17].

1.3.3. Trimiks

Trimiks jest najlepszym czynnikiem oddechowym jaki może być stosowany podczas nurkowań saturowanych. Niewielka, rzędu 5 – 10 % domieszka azotu w helioksie powoduje zwiększenie zasięgu bezpiecznych nurkowań do ponad 400 m, poprzez eliminację objawów zespołu neurologicznego wysokich ciśnień [18]. Celem osiągnięcia głębokości większych niż 400 metrów zastosowano do sporządzania mieszanin oddechowych jedyny gaz lżejszy i rzadszy od helu, czyli wodór. Ze względu na wysoką palność i wybuchowość wodoru, niemożliwe było bezpieczne sporządzanie mieszanin tlenowo – wodorowych o zawartości tlenu większej niż 4%. Z tego powodu mieszaniny wodorowe (hydroks) stosowane być mogą na głębokościach większych niż 200 m, gdzie ta zawartość tlenu jest wystarczająca fizjologicznie. Wodór generuje podobne problemy z zachowaniem termostazy oraz mową, co hel. Również objawy zespołu neurologicznego wysokich ciśnień podczas oddychania mieszaniną wodorowo – tlenową pojawiały się na głębokościach zbliżonych do tych, na których obserwowano go przy oddychaniu helioksem czy trimiksem.

Dlatego w dalszych pracach badawczych postąpiono podobnie jak wcześniej, gdy tworzono trimiks. Do mieszaniny wodorowo – tlenowej dodano hel. Powstał hydrelioks. Mieszanina ta pozwoliła na osiągnięcie największej jak do tej pory głębokości na której znalazł się człowiek. W kompleksie hiperbarycznym firmy COMEX w Marsylii we Francji 3 nurków saturowanych oddychających hydrelioksem osiągnęło nadciśnienie odpowiadające głębokości 675 m. Jeden z nich odbył wycieczkę na głębokość 701 m [19].

W pracach badawczych próbowano stosować również inne mieszaniny gazowe oparte na gazach szlachetnych (argon, ksenon), jednak duża gęstość i właściwości narkotyczne na głębokościach znacznie mniejszych niż w przypadku powietrza wyeliminowały je z wykorzystania praktycznego.

1.4. Stres oksydacyjny

Tlen jest pierwiastkiem bardzo rozpowszechnionym na Ziemi. Jego zawartość wynosi: w skorupie ziemskiej - 46,6%, w stanie wolnym w atmosferze - 23,15% masowych, odpowiada też za 89% masy wody. Wiadomym jest, że oprócz właściwości życiodajnych (szczególnie w formie wolnej – postaci gazowej, cząsteczkach O₂), w trakcie metabolizmu komórkowego bierze udział w powstawaniu reaktywnych form tlenu (RFT), których przemiany w odpowiednich warunkach mogą przyczyniać się do uszkadzania cząsteczek (np. białek, DNA) i struktur komórkowych, rozwoju chorób, starzenia organizmu i wpływać na liczne procesy biochemiczne [20].

Podstawą procesu oddychania w ujęciu biochemicznym jest pełna redukcja tlenu do cząsteczki wody polegająca na przyłączeniu do cząsteczki tlenu 4 elektronów i 4 protonów z utworzeniem 2 cząsteczek wody zachodząca zgodnie z równaniem [21]:

$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$

Jest to reakcja egzoergiczna, a powstające cząsteczki wody są neutralne względem wszystkich składników komórkowych.

Redukcja tlenu może przebiegać również stopniowo w etapach jednoelektronowych z utworzeniem "form pośrednich" – reaktywnych form tlenu (RFT, ang. ROS, *reactive oxygen species*). To właśnie one odpowiedzialne są za wystąpienie stresu oksydacyjnego, czyli niekontrolowanego wzrostu ich stężenia w określonym środowisku (np. w komórce) i warunkują toksyczność tlenu [22]. Koncepcja tego stanu została sformułowana po raz pierwszy w 1985 roku przez Helmuta Sies uważanego za ojca nowoczesnej "biologii redox" (biologii procesów oksydacyjno-redukcyjnych). Oficjalna, pierwsza definicja stresu oksydacyjnego brzmiała następująco:

"zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, na korzyść reakcji oksydacyjnych, prowadzące do potencjalnych zaburzeń" [22].

Zaburzenie to może wynikać ze "zmniejszenia rezerw antyoksydacyjnych lub zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu" [23].

W roku 2007 Sies i Jones uaktualnili ją (podkreślając jednocześnie rolę sygnalizacji redoks) nadając następujące brzmienie:

"brak równowagi pomiędzy oksydantami i antyoksydantami na korzyść oksydantów, prowadzący do zaburzenia sygnalizacji i kontroli redoks i/lub uszkodzeń na poziomie molekularnym" [24].

Definicja ta doskonale uzupełnia się z definicją samego pojęcia *"stres"*, którą można przedstawić następująco:

"proces modyfikacji homeostazy biochemicznej wywołany przez czynniki psychologiczne, fizjologiczne i środowiskowe" [25].

Stres oksydacyjny i toksyczne oddziaływanie tlenu to cena, jaką ponoszą organizmy żyjące w atmosferze bogatej w ten pierwiastek i wykorzystujące go w reakcjach metabolicznych jako czynnik utleniający. W toku ewolucji wytworzone zostały liczne mechanizmy zabezpieczające przed negatywnymi skutkami oddziaływania reaktywnych form tlenu (jak niskocząsteczkowe antyoksydanty i białka enzymatyczne), jednak nie zawsze są one zdolne zapewnić wystarczającą ochronę. Wśród niekorzystnych efektów oddziaływania stresu oksydacyjnego na organizm można wyróżnić m.in. wpływ na rozwój miażdżycy, nowotworów, cukrzycy [26]. Stanowi on jedną z molekularnych składowych mechanizmów chorób, a jego istotą mogą być *"uszkodzenia oksydacyjne"*; można wymienić tu np. oksydację cząsteczek białek, węglowodanów, kwasów nukleinowych [27].

Aktualna definicja uszkodzeń oksydacyjnych (ang. oxidative damage) brzmi:

"uszkodzenia na poziomie biomolekularnym spowodowane przez atak reaktywnych

form tlenu na składniki organizmów żywych" [28].

Należy pamiętać, że wzrost liczby uszkodzeń nie musi wynikać tylko i wyłącznie ze zwiększonego nasilenia stresu, ale także z niewydolnej pracy systemów naprawczych. Oddziaływanie stresu oksydacyjnego na organizm zależne jest od rodzaju utleniacza, miejsca i intensywności jego wytwarzania, aktywności antyoksydantów i zdolności systemów naprawy [27]. Czynniki bezpośrednio odpowiedzialne za wystąpienie stresu oksydacyjnego to tzw. prooksydanty. Każdy z nich może indukować i/lub nasilać w określonych warunkach wytwarzanie reaktywnych form tlenu.

Podsumowując, stres oksydacyjny może być wynikiem zmniejszonej zawartości (aktywności) antyoksydantów w organizmie i/lub zwiększonej produkcji RFT w wyniku

np. ekspozycji na wysokie ciśnienie tlenu, toksyny czy rozwoju reakcji zapalnej i aktywacji komórek fagocytujących.

1.4.1. Reaktywne formy tlenu i ich powstawanie

Toksyczność tlenu wynika głównie z jego zdolności do tworzenia reaktywnych form (w tym wolnych rodników). Reaktywne formy tlenu są tworzone i degradowane przez wszystkie organizmy tlenowe. Ich fizjologiczne stężenie jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek i przekazywania sygnałów [29]. Nadmierne stężenie prowadzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego.

Określenie RFT zawiera w sobie wiele reaktywnych molekuł posiadających atom tlenu z niesparowanym elektronem i jednocześnie niezerowym spinem elektronowym (określane jako *rodniki* lub *wolne rodniki*) lub wiązania –O–O– w cząsteczce zdolne do uczestniczenia w reakcjach chemicznych (do tej grupy należy m.in. nadtlenek wodoru) [30]. Wysoka reaktywność rodników wynika z ich szczególnej "chęci" do sparowania elektronów przez pozbycie się elektronu nadmiarowego lub przyłączenie dodatkowego. Uproszczoną klasyfikację RFT (najważniejszych przedstawicieli) przedstawia Tabela 1.

Reaktywne formy tlenu będące	Reaktywne formy tlenu nie będące
wolnymi rodnikami	wolnymi rodnikami
 anionorodnik ponadtlenkowy (O2^{•-}) rodnik wodoronadtlenkowy (HO2[•]) rodnik hydroksylowy (OH[•]) rodnik alkoksylowy (RO[•]) rodnik węglanowy (CO3^{•-}) 	 tlen singletowy (¹O₂) ozon (O₃) nadtlenek wodoru (H₂O₂) nadtlenki organiczne (ROOH) nadtlenoazotyn (ONOO⁻)

 Tabela 1. Klasyfikacja reaktywnych form tlenu. Na podstawie [30].

Wolne rodniki powstają zazwyczaj w procesach homologicznego rozrywania wiązań cząsteczek związków chemicznych (potrzebna do tego energia może być dostarczona przez promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, promieniowanie podczerwone), w wyniku przenoszenia jonów, w reakcjach redoks, reakcjach katalizowanych przez

niektóre metale lub w bezpośredniej syntezie. Są to jednakże reakcje o marginalnym znaczeniu biologicznym.

Ogólny schemat powstawania RFT w wyniku redukcji cząsteczki tlenu został przedstawiony na Rysunku 1.



Rysunek 1. Powstawanie reaktywnych form tlenu. RFT powstają w wyniku jedno-, dwu- lub czteroelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Na podst. [31].

W organizmie źródłami RFT są głównie:

- autooksydacja związków niskocząsteczkowych (np. adrenaliny, L-DOPA, FADH₂)
 [32],
- procesy oddychania komórkowego (łańcuch oddechowy) i reakcje z udziałem oksydaz [32],
- reakcje zachodzące po narażeniu na promieniowanie jonizujące i jony metali:
 żelaza (Fe²⁺), miedzi (Cu²⁺), glinu (Al³⁺), cynku (Zn²⁺) [33, 34].

Najistotniejsze z punktu widzenia biologii człowieka są źródła wewnątrzkomórkowe – utlenianie zredukowanych form związków chemicznych i białek oddechowych, a także reakcje zachodzące z udziałem enzymów.

Niskocząsteczkowe związki ulegają jednoelektronowemu utlenianiu z utworzeniem wolnego rodnika i $O_2^{\bullet-}$ zgodnie z ogólną reakcją:

$$RH_2 + O_2 \rightarrow RH + H^+ + O_2$$

W ten sposób reagują m.in. cukry redukujące (glukoza), zredukowana ryboflawina, aminy katecholowe (adrenalina), FADH₂, związki tiolowe (glutation). Grupy –SH białek

również mogą być utleniane, a proces ten katalizowany jest przez jony metali przejściowych [35].

Tlen w stanie podstawowym (trypletowym, ${}^{3}\Sigma_{g}O_{2}$) nie wykazuje zbyt dużej reaktywności i najczęściej ulega redukcji jednoelektronowej:

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{--}$$

stąd pierwszym powstającym rodnikiem jest anionorodnik ponadtlenkowy (anion – gdyż posiada wypadkowy ładunek ujemny).

Mitochondria i łańcuch oddechowy stanowią jedno z najpoważniejszych źródeł RFT. Proces oddychania komórkowego dostarcza niezbędnej organizmowi energii w postaci ATP, lecz jednocześnie stanowi ogromne źródło RFT. Głównym enzymem biorącym udział w procesie oddychania jest oksydaza cytochromowa (EC 1.9.3.1) – przeprowadza ona czteroelektronową redukcję tlenu z wytworzeniem cząsteczki wody, jednak część elektronów redukuje tlen poza tym szlakiem, tworząc anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) [36]. Odpowiedzialnymi za tę reakcję są: ubichinon i dehydrogenaza NADH. Ich zredukowane formy (tj. zredukowany NADH-CoQ i ubichydrochinon) reagują z tlenem w reakcji jednoelektronowej stając się źródłem RFT [37].

Enzymy macierzy mitochondrialnej także mogą być odpowiedzialne za produkcję RFT (dehydrogenaza liponianowa, akonitaza, flawoproteina). Jednak dzięki obecnej w mitochondriach manganowej dysmutazie ponadtlenkowej (MnSOD, EC 1.15.1.1) anionorodnik ponadtlenkowy jest neutralizowany; ulega on reakcji dysmutacji z utworzeniem H₂O₂ [38].

Istotnym źródłem RFT w komórce są także reakcje enzymatyczne katalizowane przez oksydazy (oksydoreduktazy). Enzymy te odpowiedzialne są za przenoszenie elektronów lub atomów wodoru na cząsteczkę tlenu czego efektem jest powstanie cząsteczki wody. Istnieją jednak oksydazy, których produktem działania jest nadtlenek wodoru. Należą do nich np. oksydaza aldehydowa (EC 1.2.3.1), oksydaza ksantynowa (EC 1.2.3.2), oksydaza galaktozowa (EC 1.1.3.9) i inne [39]. Oksydaza ksantynowa może redukować tlen jedno- i dwuelektronowo, prowadząc w efekcie do powstania odpowiednio anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru [40].

Duże znaczenie mają białka oddechowe i ich utlenianie – hemoglobina i mioglobina. Oba zawierają w swojej cząsteczce jony żelaza Fe^{2+} , które w obecności tlenu utleniają się do Fe^{3+} (redukcja jednoelektronowa, powstaje $O_2^{\bullet-}$). Nie jest to jednak tak łatwo zachodząca reakcja jak w przypadku wolnych jonów żelaza i np. nadtlenku wodoru, znana jako reakcja Fentona (jedno ze źródeł rodnika hydroksylowego [•]OH) [41]:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH + OH^- + Fe^{3-}$$

Promieniowanie jonizujące prowadzi do radiolizy cząsteczki wody. Wzbudzone energią promieniowania cząsteczki rozpadają się zgodnie z reakcją:

$$H_2O^* \rightarrow H^\bullet + ^\bullet OH$$

gdzie "*" oznacza stan wzbudzony [42]. Także zjonizowane pod wpływem promieniowania cząsteczki są źródłem rodnika hydroksylowego [42]:

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + {}^{\bullet}OH$$

1.4.2. Wybrane parametry biochemiczne stresu oksydacyjnego

1.4.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa

Dysmutaza ponadtlenkowa, SOD (E.C. 1.15.1.1) jest enzymem, metaloproteiną z grupy oksydoreduktaz, katalizującym reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, w wyniku której powstają dwa produkty: tlen i nadtlenek wodoru zgodnie z reakcją [43]:

$$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

W komórkach ludzkich występują: dysmutaza cynkowo-miedziowa (SOD1, CuZnSOD) w cytozolu i mitochondriach w przestrzeni międzybłonowej, peroksysomach, dysmutaza manganowa (SOD2, MnSOD) głównie w mitochondriach, a także dysmutaza pozakomórkowa (SOD3, ECSOD). Jako, że najbardziej narażonym na atak wolnych rodników organellum komórkowym są mitochondria (około 5% tlenu przekształcane jest w anionorodnik ponadtlenkowy), MnSOD uważana jest za najważniejszy enzym układu antyoksydacyjnego komórek. MnSOD zabezpiecza m.in. genom mitochondrialny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [43].

1.4.2.2. Katalaza

Katalaza, CAT (E.C. 1.11.1.6) jest enzymem należącym do oksydoreduktaz (podobnie jak SOD) występującym u niemal wszystkich organizmów (zwierzęcych i roślinnych) i katalizującym rozkład nadtlenku wodoru do tlenu i wody zgodnie z reakcją:

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Podobną reakcję może katalizować peroksydaza glutationowa (opisana poniżej). Katalaza jest enzymem o największej liczbie obrotów³, wyrażającej jej aktywność. Jedna cząsteczka CAT może w ciągu sekundy katalizować rozkład (w odpowiednich warunkach) 40 milionów cząsteczek nadtlenku wodoru [44]. U organizmów jądrowych występuje głównie w peroksysomach, a także w mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym. Największą aktywność katalazy stwierdza się w komórkach wątroby, nerek, we krwi (w erytrocytach) i błonach śluzowych [45]. Ludzka katalaza jest homotetramerem zbudowanym z 4 podjednostek o masie 60 kDa każda. Obniżenie aktywności katalazy obserwowane w niektórych chorobach (np. w hipo- i akatalazemii) prowadzi do znacznego nasilenia stresu oksydacyjnego.

1.4.2.3. Peroksydaza glutationowa

Peroksydaza glutationowa, GPx (E.C. 1.11.1.9) jest enzymem zawierającym selenocysteinę należącym do oksydoreduktaz (jak SOD i CAT) wykazującym aktywność peroksydaz, biorącym udział w neutralizacji wolnych rodników. Enzym jest tetramerem o masie 4 kDa, zbudowanym z czterech podjednostek, z których każda zawiera warunkujący aktywność enzymatyczną atom selenu [46]. GPx katalizuję redukcję nadtlenku wodoru przez GSH (glutation w formie zredukowanej). Występuje głównie w cytozolu, jądrze komórkowym i mitochondriach. Najwyższą aktywność wykazuje w wątrobie (co w przypadku wielu enzymów związane jest z funkcją detoksykacyjną). GPx do poprawnego funkcjonowania potrzebuje wolnych grup tiolowych i wchodzi w skład układu związanego z glutationem [46]. Glutation krąży w cyklu forma zredukowana – forma utleniona. Przebieg katalizowanych reakcji przedstawia zapis:

³ Liczba obrotów enzymu - liczba cząsteczek substratu, które w określonej jednostce czasu zostają przekształcone przez enzym (w pełni wysycony substratem) w produkt.

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPX} GSSG + 2H_2O$$
$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2 GSH + NADP^+$$

gdzie:

GSH – glutation (forma zredukowana)

GSSG - disulfid glutationu (powstały w wyniku reakcji utlenienia)

GR – reduktaza glutationu

1.4.2.4. Dialdehyd malonowy

Dialdehyd malonowy (MDA, rys. 2) jest produktem peroksydacji lipidów (nieenzymatycznej autooksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, WNKT lub enzymatycznego utleniania) [47]. Szlaki powstawania MDA zostały zaproponowane w 1991 roku przez H. Esterbauera [48]. Biologiczny, łańcuchowy proces utleniania lipidów charakteryzuje się mechanizmem wolnorodnikowym podzielonym na trzy etapy (Tabela 2).

Etap	Dodatkowe informacje	
1. Inicjacja – tworzenie się wolnych rodników lipidowych	Oderwanie atomu wodoru (H) od cząsteczki kwasu tłuszczowego (LH) lub reszty kwasu pod wpływem rodnika (X, np. hydroksylowego) X [•] + LH → L [•] + H [•]	
 Propagacja – łańcuchowa reakcja wolnorodnikowa, której efektem jest powstanie wodoronadtlenków lipidowych 	Wolne rodniki alkilowe L [•] reagują z tlenem, dając wolne rodniki nadtlenkowe LOO [•] , odrywające atomy wodoru od kolejnych cząsteczek nienasyconych kwasów tłuszczowych. Powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego LOOH i następny rodnik alkilowy, który może utleniać kolejną cząsteczkę kwasu tłuszczowego L [•] + O2→ LOO [•] LOO [•] + LH → LOOH + L [•]	
 Terminacja – tworzenie nierodnikowych produktów utleniania lipidów 	Bardzo reaktywne, powstałe w nadmiarze rodniki reagują między sobą tworząc produkty nierodnikowe $L + L^{\bullet} \rightarrow L - L$ $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow L = O + LOH + O_2$ $LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \rightarrow L = O + LOH$	

Tabela 2. Mechanizm	utleniania lipidó	w. Na podstawie	[47].
---------------------	-------------------	-----------------	-------

Malondialdehyd wykorzystywany jest jako naturalny, dobry marker nasilenia stresu oksydacyjnego i zaliczany jest do produktów utleniania lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). MDA charakteryzuje się dużą aktywnością biologiczną. Tworząc połączenia typu zasady Schiffa reaguje z wieloma cząsteczkami posiadającymi grupę –NH₂, a także z grupami tiolowymi (-SH) białek; wykazuje działanie mutagenne, kancerogenne i cytotoksyczne, może modyfikować właściwości błon komórkowych, a także przyczyniać się do rozwoju miażdżycy i stłuszczenia wątroby [47, 49].



Rysunek 2. Wzór strukturalny MDA.

1.4.2.5. Wskaźnik antyoksydacyjny

Zaburzenie stosunku SOD do CAT i GPx może skutkować akumulacją nadtlenku wodoru uczestniczącego w reakcji Fentona i wytwarzaniem dużych ilości rodnika hydroksylowego. W literaturze naukowej często podaje się wskaźnik antyoksydacyjny (wskaźnik De Haan'a) (R), wyliczany następująco:

$$R = \frac{[SOD]}{[GPx] + [CAT]}$$

Wskaźnik wyraża nasilenie reakcji antyoksydacyjnej. De Haan i wsp. wskazują, że przedstawiony powyżej stosunek enzymów antyoksydacyjnych dobrze oddaje status antyoksydacyjny organizmu i koreluje ze starzeniem się.

1.4.2.6. Żelazo

Żelazo nie jest zaliczane do biochemicznych wskaźników stresu oksydacyjnego, jednak z uwagi na olbrzymią rolę jaką pełni w powstawaniu stresu oksydacyjnego, zostało krótko omówione w niniejszej pracy. Współistnienie w układach biologicznych żelaza i tlenu prowadzi do generowania rodnika hydroksylowego, powstającego w reakcji Fentona [41]. Aby nie dopuścić do wchodzenia jonów żelaza w reakcje chemiczne i m.in. cykl Fentona, w płynach biologicznych są one związane z białkami, przeciwdziałając powstawaniu rodnika hydroksylowego. Jednymi z ważniejszych białek są transferryna (wiążąca żelazo w kompartmencie pozakomórkowym) i ferrytyna (wiążąca żelazo w kompartmencie komórkowym) [50]. Głównym źródłem żelaza mogącego uczestniczyć w reakcji Fentona jest tzw. zmienna pula żelaza, tworzona przez jony Fe²⁺ i Fe³⁺ związane z niskocząsteczkowymi ligandami [51]. "Zaburzenie homeostazy żelaza w kierunku jego nadmiaru wzmaga ryzyko wystąpienia stresu oksydacyjnego poprzez zwiększenie puli żelaza katalizującego generowanie rodnika OH[•]. Ma to miejsce wówczas, gdy przekroczony zostaje potencjał ferrytyny detoksykacji jonów żelaza" [52]. Reakcja Fentona nie daje jednak pełnego wyjaśnienia możliwości powstawania rodnika hydroksylowego z udziałem żelaza w układach biologicznych. Szczególną rolę odgrywa reakcja Habera-Weissa, uwzględniająca regenerację żelaza(III):

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

i która obejmuje reakcję Fentona (patrz rozdz. 1.1.3.), sumarycznie przedstawiając się następująco:

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + O_2 + OH^{\bullet}$$

Nasilenie stresu oksydacyjnego podczas przeładowania organizmu żelazem wykazano m.in. w hemochromatozie, tym bardziej, że organizm ludzki nie posiada mechanizmów pozwalających na usuwanie nadmiaru żelaza. Próba analizy stężenia żelaza w surowicy krwi nurków w kontekście niniejszej pracy wydała się bardzo obiecująca, jako że w zasadzie wcześniej dokładnie nie badana. Analiza nielicznych prac wskazuje na możliwy wpływ hiperbarii i odbywanych nurkowań na homeostazę żelaza w organizmie [53-55].

1.5. Wpływ warunków hiperbarycznych na rozwój stresu oksydacyjnego

Powszechnie akceptowanym poglądem jest, że podczas oddychania powietrzem (i mieszaninami gazów) pod ciśnieniem >1 ATA, oprócz wzrostu ciśnienia parcjalnego tlenu (hiperoksji), zwiększa się jego rozpuszczalność w osoczu krwi [56]. Jest to podstawą terapeutycznego mechanizmu hiperbarii tlenowej. Zgodnie z zaleceniami Undersea and Hyperbaric Medical Society maksymalne ciśnienie stosowane podczas HBO wynosi 3 ATA przez maksymalnie 2 godziny [57]. Wartości te zostały uznane za bezpieczne przy minimalnej częstości występowania działań ubocznych. U osób poddanych ekspozycjom hiperbarycznym wysycenie hemoglobiny tlenem sięga 100% (także we krwi żylnej), wzrasta ilość rozpuszczonego tlenu w osoczu, obserwuje się istotny wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu i wpływ na równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną [56]. Obserwuje się gromadzenie produktów oksydacji w płucach, erytrocytach, jednak nie w mózgu, który posiada bardzo wydolne mechanizmy antyoksydacyjne, a utlenione cząsteczki są usuwane znacznie szybciej niż z innych tkanek [58]. Ogromną rolę w oddziaływaniu HBO na procesy komórkowe na poziomie molekularnym odgrywają m.in. białka wrażliwe na zmiany potencjału redoks jak oksygenaza hemowa-1 (HSP32) i Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), HSP70 (*heat shock proteine 70*), HIF-1α (*hypoxia-inducible factor-1 alpha*), endogenny system antyoksydacyjny (katalaza, peroksydaza, dysmutaza ponadtlenkowa, glutation) [58]. Efektem wystąpienia stresu oksydacyjnego jest zwiększone stężenie produktów peroksydacji lipidów (dialdehydu malonowego), białek i kwasów nukleinowych; obserwuje się także wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych - m.in. katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej [59]. Wydaje się, że jest to reakcja charakterystyczna m.in. dla osób wykonujących nurkowania rzeczywiste i symulowane do nadciśnień odpowiadających głębokości ponad 30 m, a także poddawanych HBO. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu aktywności katalazy i peroksydazy glutationu u nurkujących w wodzie na głębokość ok. 9 metrów [60]. Dane pochodzące z różnych badań są niejednoznaczne i dotyczą różnych warunków (nurkowań rzeczywistych, symulowanych jak i terapii w komorze hiperbarycznej) [60-68]. Istotny wpływ na rozwój stresu oksydacyjnego ma także czas przebywania w warunkach hiperbarycznych. Czynnik ten może istotnie modyfikować wpływ hiperbarii na oznaczane parametry stresu oksydacyjnego, nitrozacyjnego (TBARS, GPx, SOD, NO_x) i dynamikę ich zmian [69, 70]. Przy rozpatrywaniu wyników badań prowadzonych podczas nurkowań należy wziąć pod uwagę czas samego przebywania w warunkach zwiększonego ciśnienia i czas przeznaczony na dekompresję (o ile jest konieczna).

SOD jest kluczowym, komórkowym enzymem antyoksydacyjnym. U nurków obserwuje się zmniejszoną wyjściową aktywność SOD przed ekspozycjami hiperbarycznymi w stosunku do grupy kontrolnej, co może świadczyć o zaburzonym funkcjonowaniu bariery antyoksydacyjnej lub fizjologicznej adaptacji; pod uwagę bierze się również destrukcyjne oddziaływanie wysokiego ciśnienia na struktury komórkowe i spadek ich zdolności antyoksydacyjnych [71].

Zwiększone wytwarzanie RFT obserwuje się podczas terapii HBO, nurkowań symulowanych w komorach hiperbarycznych, nurkowań rzeczywistych, w tym z zastosowaniem różnych mieszanin oddechowych [72]. Jednym z głównych efektów oddziaływania środowiska hiperbarycznego jest wzrost wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego [73]. Długotrwałe ekspozycje hiperbaryczne prowadzą do kumulowania się reaktywnych metabolitów tlenu (ROMs, *ang. reactive oxygenated metabolites*) i malonylodialdehydu (MDA, *ang. malondialdehyde*) w osoczu z jednoczesnym spadkiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w erytrocytach [74]. Zmniejszenie stresu oksydacyjnego wyrażonego stężeniem reaktywnych metabolitów tlenu zaobserwowano po ekspozycjach hiperbarycznych z zastosowaniem niskich ciśnień – 1,3 ATA (mHBT, *ang. mild-pressure hyperbaric therapy*) [75].

1.6. Białka szoku cieplnego

1.6.1. Charakterystyka i klasyfikacja

Białka szoku cieplnego (HSP, *ang. heat shock proteins*) należą do najstarszego filogenetycznie systemu ochronnego komórki i nazywane są też białkami stresu lub białkami opiekuńczymi (w literaturze anglojęzycznej *"molecular chaperones"*). Stanowią 5-10% wszystkich białek. Należą do polipeptydów, których cechą charakterystyczną jest wysoki stopień konserwatywności struktury pierwszorzędowej, tj. wysoka zachowawczość sekwencji aminokwasów w cząsteczce (najwyższa w biosferze) [76]. Ekspresjonowane są w odpowiedzi na czynniki stresowe (fizyczne, chemiczne, biologiczne), ale także na niskim poziomie w warunkach fizjologicznych, wchodząc w interakcję z wieloma innymi białkami co jest cechą odróżniającą je od większości pozostałych białek komórkowych [76, 77]. W wyniku działania czynników

stresowych zwiększa się ekspresja i transport HSP m.in. do jądra komórkowego, gdzie jako białka opiekuńcze wykazują działanie ochronne w stosunku do cząsteczek pre-mRNA, DNA, białek jądrowych itp. [78]. Transkrypcja genów *HSP* indukowana jest przez czynniki środowiskowe, procesy fizjologiczne i patofizjologiczne, a ekspresja białek wymaga aktywności czynnika HSF (ang. *ang. heat shock factor*) występującego w czterech formach: HSF1-HSF4 (u ludzi HSF1 i HSF2) [79].

Klasyfikacja HSP opiera się na masie cząsteczkowej poszczególnych białek (Tabela 3). W literaturze istnieje jednak zamieszanie co do dokładnej klasyfikacji zgodnie z masą. Wyróżnić można następujące rodziny białek: małe HSP (sHSP, *ang. small heat shock proteins*) o masie cząsteczkowej 16-30 kDa (inne źródła 8,5-40 kDa lub 10-40 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP110 [77, 80]. Nieco inna klasyfikacja przedstawia białka szoku cieplnego jako rodzinę o masach 10 kDa do ponad 100 kDa: HSP10, HSP20, HSP30 (o masie cząsteczkowej 15-43 kDa), HSP40, HSP50, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100 [81].

1.6.2. Występowanie białek szoku cieplnego

HSP występują u wszystkich organizmów prokariotycznych (*Prokaryota*) i eukariotycznych (*Eukaryota*) i zostały odkryte przypadkowo podczas badań prowadzonych w hodowli muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Rozmieszczenie w komórkach zależne jest od organellum, powinowactwa do innych białek i roli. W największym stężeniu występują w mitochondriach, lizosomach i siateczce śródplazmatycznej (ER), gdzie odbywa się biosynteza białek [82]. Mogą występować też w błonie cytoplazmatycznej komórek nowotworowych, stymulując odpowiedź układu immunologicznego i proces nowotworzenia [83]. Szczegóły dotyczące występowania poszczególnych HSP w komórce przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Klasyfikacja i lokalizacja w komórce wybranych białek szoku cieplnego. Na podstawie [80, 82,84].

Rodzina białek	Masa cząsteczkowa [kDa]	Wybrani przedstawiciele	Lokalizacja w komórce
	10-40	HSP10	mitochondria, zewnątrzkomórkowa
sHSP		HSP20	cytoszkielet, zewnątrzkomórkowa
		HSP32	ER, błona komórkowa, mitochondria
	w literaturze	нерио	cytosol, jądro komórkowe, ER,
HSP40-	bardzo różna, dane	П 3 Р40	aparat Golgiego, błona komórkowa
60	pominięte przez	HSP56	cytosol, błona komórkowa
	autora	HSP60	cytosol, mitochondria
		HSP70/72	cytosol, jądro komórkowe
HSP70	66-78	GRP78/Bip	cytosol, jądro komórkowe, ER, błona komórkowa
		GRP75/	cutosol mitochondria
		mortalina	
HSP90	75-96	HSP90	cytosol, jądro komórkowe
HSP100	100-110	HSP104/HSP105	cytosol

1.6.3. Charakterystyka wybranych rodzin białek szoku cieplnego

1.6.3.1. HSP70

HSP70 stanowią najlepiej poznaną rodzinę białek szoku cieplnego. Uczestniczą przede wszystkim w procesach fałdowania nowo powstających białek, zapobiegania agregacji, odtwarzania prawidłowej struktury białek i kontroli aktywności białek regulatorowych. Szerokie spektrum własności HSP70 wynika m.in. ze współdziałania z wieloma mechanizmami w komórce i kodowania przez różne geny (HSP70 stanowią produkt 17 genów) [85]. Przedstawicielami podrodziny białek HSP70 są m.in. HSP70-1a, HSP70-1b, HSP70-5 (GRP78), HSP70-6, HSP70-9 (mortalina), przy czym synteza indukowana stresem dotyczy trzech z nich - HSP70-1a, HSP70-1b (określanych ogólnie jako HSP70) i HSP70-6 [86]. Białka HSP70 charakteryzują się wysoce konserwatywną strukturą pierwszorzędową (struktura domenowa), gdzie na końcu N łańcucha cząsteczki znajduje się domena NBD/ABD (*ang. nucleotide binding domain/ATPase binding domain*) wiążąca nukleotydy ADP/ATP, na końcu C domena PBD/SBD (*ang. peptide binding domain/substrate binding domain*) wiążąca substraty; pomiędzy nimi występuje domena środkowa [76, 86]. Za domeną PBD/SBD
i regionem zmiennym znajduje się motyw wiążący białka współopiekuńcze (m.in. HSP40 i HSP90) [80]. Funkcja HSP70 zależna jest od ATP i wewnątrzcząsteczkowych ruchów allosterycznych.

1.6.3.2. HSP90

HSP90 jest wysoce konserwatywnym białkiem zależnym od ATP (podobnie jak HSP70) odpowiadającym za homeostazę białek. Cząsteczka HSP90 u organizmów eukariotycznych zaangażowana jest m.in. w remodeling setek różnych białek, transdukcję sygnału komórkowego, wewnątrzkomórkowy ruch białek [87, 88]. HSP90 podobnie jak HSP70 wykazuje budowę domenową i zawiera: domenę N-końcową (NTD, *ang. N-terminal domain*), domenę środkową (MD, *ang. middle-domain*) i domenę C-końcową (CTD, *ang. C-terminal domain*) [88]. NTD łączy się z ATP, NTD i MD łącznie odpowiadają za hydrolizę ATP, region w domenie MD odpowiada prawdopodobnie za połączenie z HSP70 [87-89]. Określone regiony MD i CTD zaangażowane są w połączenie z innymi białkami (substratami dla HSP90).

Białko HSP90 aktywuje liczne kinazy, czynniki transkrypcyjne i receptory hormonów steroidowych [87, 88]. Do prawidłowego funkcjonowania HSP90 wymaga licznych ko-cząsteczek (z ang. co-chaperons). Pomimo licznych badań nad białkami szoku cieplnego, cząsteczki-substraty dla HSP90 w dużej mierze (w przeciwieństwie np. do HSP70) pozostają nieznane. Jest to związane m.in. ze szczególnie skomplikowaną siecią wzajemnych oddziaływań różnych szlaków komórkowych. Z dotychczas poznanych są to np. liczne receptory hormonów steroidowych (mineralokortykoidów, glukokortykoidów, progesteronu, androgenów), kinazy, ligazy, czynniki transkrypcyjne i in. cząsteczki, jak np. NOS3 [87].

1.6.4. Wzajemne oddziaływanie HSP70 i HSP90

Istnieje istotne współdziałanie białek szoku cieplnego rodziny HSP70 i HSP90: zależne od struktury cząsteczki-substratu (interakcja funkcjonalna) i oddziaływanie bezpośrednie. Białka te rozpoznają różne struktury cząsteczkowe, a także wymagają różnych *"co-chaperonów"*. HSP70 przyłącza się do krótkich, hydrofobowych lub aromatycznych sekwencji występujących głównie w rdzeniu sfałdowanych białek; HSP90 z kolei przyłącza się do hydrofobowych i naładowanych struktur na powierzchni cząsteczki, np. w białkach nie sfałdowanych, uszkodzonych lub w cząsteczkach w stanach przejściowych [90, 91]. Znana jest również bezpośrednia interakcja HSP70-HSP90. Łączą się one ze sobą za pośrednictwem cząsteczki Hop (*Hsc/HSP90-organiznig protein*) tworząc kompleks HSP90-Hop-HSP70/HSP40, gdzie HSP40 pełnie niezwykle istotną rolę w przygotowaniu HSP70 do związania z Hop [92]. Model współdziałania HSP70-HSP90 dokładnie opisuje współdziałanie tych białek w reorganizacji struktury przestrzennej nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów. Struktury tworzone przez białka szoku cieplnego i ich wzajemne oddziaływanie, ze względu na niezwykle istotną rolę w komórkach są zachowane na każdym etapie filogenezy i wykazują oporność na zmiany ewolucyjne.

1.6.5. Rola białek szoku cieplnego

Rola HSP jest niezwykle doniosła, bowiem chronią one inne białka przed uszkodzeniami związanymi z oddziaływaniem czynników szkodliwych (egzoi endogennych), jakimi są m.in. temperatura, cytokiny, alkohole, metale ciężkie, promieniowanie, metabolity i wolne rodniki. Tworzą one z nimi przejściowe kompleksy. Przyjmuje się, że HSP ułatwiają fałdowanie białek i uzyskiwanie przez nie właściwej struktury (proces ten nazywany jest wtórną translacją kodu genetycznego), kierują uszkodzone białka na właściwe szlaki degradacji, zapobiegają ich agregacji poprzez nieustanne utrzymywanie białek nieprawidłowo sfałdowanych (*ang. misfolded*) w stanie pośrednim i uczestniczą w naprawie nieprawidłowych cząstek (proces renaturacji białek) [93]. Szczególną rolę w przybieraniu właściwej konformacji przestrzennej odgrywają białka rodziny HSP60 zwane, z racji pełnionej funkcji, foldazami [94]. Gdy naprawa nie jest możliwa, HSP uczestniczą w eliminacji zdenaturowanych białek, kierując je do proteasomów [95].

Poznana została również istotna rola HSP w odpowiedzi immunologicznej i chorobach autoimmunologicznych, gdzie obserwuje się przeciwciała anty-HSP [96]. Białka zewnątrzkomórkowe należące do tej rodziny modulują reakcję zapalną i syntezę cytokin zapalnych [97]. HSP70 (najlepiej poznana grupa białek szoku cieplnego) może łączyć się z czynnikiem NF-κB, powodować jego inhibicję i wywoływać efekt

38

przeciwzapalny [98]. W odróżnieniu od białek HSP60, HSP70 nie wiążą innych białek wewnątrz kompleksów, a na swojej powierzchni w rejonach centrów aktywnych zależnych od ATP [99]. Znane jest również działanie prozapalne HSP [100]. Białka zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej pośredniczą w prezentacji antygenów lub same są antygenami rozpoznawanymi przez komórki NK; biorą tym samym udział w funkcjonowaniu głównego układu zgodności tkankowej (MHC, ang. major histocompatibility complex) [101].

Dowiedziono także roli antyapoptotycznej HSP, ochronnej w warunkach stresu oksydacyjnego, chorobach neurodegeneracyjnych, układu krążenia i układu nerwowego [77]. HSP uczestniczą w procesie krzepnięcia krwi, adhezji i zmianie kształtu płytek krwi, kontrolowaniu polimeryzacji aktyny [102].



Rysunek 3. Domena ATP-binding (NBD/ADB) ludzkiego białka HSP70.

1.6.6. Wpływ stresu oksydacyjnego na ekspresję białek szoku cieplnego

Białka szoku cieplnego pełnią wiele ról w procesach komórkowych, w tym podczas i po narażeniu na stres oksydacyjny [84, 103]. Szczególnie zwiększa się ekspresja białek należących do podrodziny HSP70, które mogą oddziaływać na wielu poziomach [104]. HSP70 odgrywają kluczową rolę w segregacji białek i kontroli ich jakości; białka nieprawidłowe kierują do lizosomów lub proteasomów 20S, gdzie zachodzi ich degradacja. Jest ona niezależna od ubikwitynacji. Cząsteczki białek uszkodzone oksydacyjnie zyskują większą powierzchniową hydrofobowość i dzięki temu rozpoznawane są przez proteasomy 20S [105]. Interakcja HSP70 z białkami uszkodzonymi oksydacyjnie jest znacznie większa niż w przypadku białek prawidłowych; ekspresja HSP70 w warunkach stresu oksydacyjnego zwiększa się około 2-krotnie [95]. Ich główną rolą jest natychmiastowa, indukowana stresem ochrona komórek [106]. Białka szoku cieplnego mogą przyłączać się do cząsteczek innych białek i stabilizować ich strukturę. Przypuszcza się, że rozpoznają one nieprawidłową strukturę białek (np. nieprawidłowe fałdowanie), jednak nie są zdolne do ochrony białek na bardzo wczesnym etapie, kiedy uszkodzenia oksydacyjne nie są jeszcze obserwowane [95]. Oddziaływanie HSP70 z uszkodzonymi przez RFT białkami przedstawia Rysunek 4. Zauważa się, że czynnikiem indukującym ochronę przed stresem oksydacyjnym ze strony HSP mogą być zmiany potencjału oksydacyjnoredukcyjnego (redoks) w środowisku wewnątrzkomórkowym. Swoistymi sensorami tych subtelnych zmian są m.in. białka HSP32 (HO-1, oksygenaza hemowa 1, ang. heme oxygenase-1) i HSP72 [107]. Ekspresja HSP32 jest z kolei regulowana przez aktywację głównego czynnika transkrypcyjnego dla HSP – HSF1 (ang. heat shock factor 1) [77]. HSP70-9 (mortalina) posiada zdolność stabilizowania łańcucha oddechowaego i zmniejszania poziomu RFT [108]. Również badania z wykorzystaniem roślin wykazały znaczący wzrost transkrypcji genów kodujących HSP już po krótkim narażeniu ich na stres oksydacyjny. Szczególną uwagę skupia się na HSP33, które reaguje na wzrost elektropozytywności środowiska wnętrza komórki [109]. Na odpowiedź ze strony HSP wpływa również wzrost wytwarzania RFT podczas ćwiczeń fizycznych i nurkowania [110-112]. Stwierdzono zależny od HBO wzrost wewnątrzkomórkowych RFT, NO i ekspresji HSP32. W indukcję 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 i CNC homology 1) [113].

Po ekspozycjach hiperbarycznych obserwuje się niewielki wzrost ekspresji HSP27 i HSP90 u zwierząt a także znaczy wzrost HSP70, ze szczytem po 18 godzinach [114]. W badaniach z udziałem ludzkich monocytów wykazano z kolei spadek ekspresji HSP72 (białka HSP70-1 należącego do podrodziny HSP70) [115]. W opracowaniach innych autorów dostępne jest tylko jedno badanie, w którym oceniano stężenie HSP70 w surowicy nurków. Wykazało ono niewielki wzrost stężenia białka bezpośrednio po symulowanym nurkowaniu helioksowym i u osób regularnie wykonujących ćwiczenia

40

fizyczne [110]. Brakuje danych dotyczących wykorzystania oznaczeń HSP w surowicy jako markerów procesów biochemicznych.

Zauważono m.in. pozytywny efekt (antyoksydacyjny i antyapoptotyczny) zwiększonej ekspresji HSP70 w komórkach rdzenia przedłużonego i płuc indukowanej przez HBO na przebieg choroby dekompresyjnej i wykazano, że HSP70 zapobiega indukowanej przez NO apoptozie. Nie udało się natomiast wykazać (wbrew przypuszczeniom) wzrostu ekspresji wysoko-indukowalnego HSP72 w leukocytach po ekspozycji na HBO [116]. Podejmowane są próby wykorzystania HBO jako czynnika indukującego HSP w chorobach serca, np. niewydolności i niedokrwieniu mięśnia sercowego. Autorzy tych badań wskazują na wzrost ekspresji HSP po HBO w tkankach nie-sercowych [117]. Brakuje z kolei informacji na temat wpływu hiperbarii i stresu oksydacyjnego na stężenia HSP w surowicy i dynamiki zmian stężeń w odpowiedzi na różne warunki hiperbaryczne. Przydatność oznaczeń HSP70 w surowicy jako biomarkera stresu komórkowego potwierdzono w przebiegu różnych chorób, jak np. cukrzyca, miażdżyca czy endometrioza i przebiegających m.in. z nasileniem stresu oksydacyjnego [118-120]. Nie badano go w kontekście ekspozycji hiperbarycznych (nurkowych).



Rysunek. 4. Oddziaływanie HSP70 z białkami. Białka uszkodzone przez RFT są rozpoznawane przez HSP70 i kierowane do proteasomów. Na podstawie [105] ze zmianami.

1.7. Syntaza tlenku azotu i tlenek azotu

1.7.1. Definicja, klasyfikacja i rola

Syntaza tlenku azotu (EC 1.14.13.39, NOS, *ang. nitric oxide synthase*) została odkryta i po raz pierwszy opisana w 1989 roku, w 1998 roku poznana została jej struktura krystaliczna [121]. NOS jest białkiem enzymatycznym dość niezwykłym. Jako jedyny znany enzym do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje aż 5 kofaktorów! Są

to: NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy), FMN i FAD (mono- i dinukleotyd flawinoadeninowy), BH₄ (tetrahydrobiopteryna) i hem [121]. Jego rola polega na katalizowaniu reakcji syntezy tlenku azotu z L-argininy:

2 L-arginina + 3 NADPH + H^+ + 4 $O_2 \rightleftharpoons$ 2 cytrulina + 2 NO + 4 H_2O + 3 NADP⁺

Reakcja polega na pięcioelektronowej oksydacji azotu L-argininy w dwóch etapach monooksygenacji z utworzeniem produktu przejściowego, którym jest N^{ω} -hydroksy-L-arginina.

Poznano 3 odmienne izoformy NOS, będące produktami różnych genów, posiadające różne lokalizacje w organizmie, różne właściwości katalityczne i odmienne wrażliwości na czynniki hamujące. Są to: nNOS (NOS-1) – neuronalna, iNOS (NOS-2) – indukowalna i eNOS (NOS-3) – endotelialna). Obserwuje się 51-57% homologii pomiędzy poszczególnymi ludzkimi izoformami [122]. Dokładna klasyfikacja została przedstawiona w Tabeli 3. Wszystkie izoformy posiadają C-końcową domenę o aktywności reduktazowej i N-końcową o aktywności oksygenazowej. Domena C-końcowa posiada miejsca łączące dla FMN, FAD i NADPH, a N-końcowa dla hemu, BH₄ i L-argininy; oba końce "połączone" są poprzez kalmodulinę [121]. nNOS i eNOS w przeciwieństwie do iNOS zależne są od poziomu jonów wapnia i kalmoduliny (ich aktywacja zachodzi poprzez kompleks kalmodulina-Ca²⁺).



Rysunek 5. Schematyczna struktura izoform syntazy tlenku azotu [121].

Ekspresja nNOS i eNOS zachodzi przez cały czas na względnie stałym poziomie, przez co obie formy często określane są wspólną nazwą – cNOS (konstytutywne, *ang. constitutive* NOS). Odpowiadają one za syntezę niewielkich ilości tlenku azotu przez krótki czas. Z kolei iNOS zdolna jest wytwarzać duże ilości NO przez długi okres czasu. Ekspresja iNOS indukowana jest przez endotoksyny bakteryjne i cytokiny prozapalne poprzez szlak IKK-NF-κB (IκB kinase/nuclear factor-κB), kinazę Janus (JAK) i aktywatory szlaku transkrypcji 1 (STAT1) [123]. Najsilniejszymi induktorami ekspresji iNOS są lipopolisacharyd (LPS, związany ze szlakiem NF-κB) i interferon-γ (IFN-γ, związany ze szlakiem STAT1), przy czym oba szlaki są niezależne [124]. Istnieją prace na temat wpływu hiperoksji i hiperbarii na aktywność poszczególnych izoform NOS, jednak w większości dotyczą konkretnych tkanek i narządów, a nie aktywności w osoczu lub surowicy. Tym bardziej brakuje doniesień na temat iNOS.

Produkt reakcji z udziałem NOS – tlenek azotu jest niezwykle istotną cząsteczką z biologicznego punktu widzenia. Reguluje m.in. ciśnienie krwi wpływając na opór naczyniowy, wpływa na agregację i przyleganie płytek krwi wykazując działanie przeciwzakrzepowe, rozszerza drogi oddechowe i pełni rolę ważnego neuroprzekaźnika.

Powstający w wyniku aktywacji iNOS tlenek azotu może hamować aktywność oksydazy cytochromu c i przepływ elektronów w łańcuchu oddechowym prowadząc do nasilenia produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, a ONOO⁻ może unieczynnić izoformę mitochondrialną dysmutazy przyczyniając się do dodatkowego zwiększenia wytwarzania RFT [125].

43

Izoforma	Masa [kDa]	Lokalizacja na chromosomie	Występowanie	Wybrane funkcje
nNOS (NOS-1)	161	12q24.2- 12q24.3 chromosom 12	mózg, rdzeń kręgowy, komórki nabłonkowe, wyspy trzustkowe	procesy uczenia się, pamięci, sygnalizacja komórkowa, neurogeneza, regulacja transmisji synaptycznej
iNOS (NOS-2)	131	17cen-q11.2 chromosom 17	różne - układ krwionośny, układ immunologiczny	Ekspresja indukowana czynnikami zapalnymi, cytokinami, stresorami
eNOS (NOS-3)	133	7q35-7q36 chromosom 7	endotelium, kardiomiocyty, neurony mózgowe, płytki krwi	wazodylatacja, hamowanie agregacji i adhezji płytek krwi, hamowanie adhezji leukocytów, modulacja stanu zapalnego, aktywacja progenitorowych komórek endotelialnych

 Tabela 4. Charakterystyka izoform NOS [126-129].

1.7.2. Współdziałanie białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu – HSP jako modulator funkcji NOS

1.7.2.1. Modulator iNOS

Białka szoku cieplnego odgrywają olbrzymią rolę w funkcjonowaniu sytnaz tlenku azotu. Dotyczy to zarówno białek o masie cząsteczkowej 70 kDa jak i 90 kDa. Jak wykazały badania Luo i wsp [123]. HSP90 wzmaga aktywność i jest kluczowym białkiem dla indukcji iNOS – umożliwia połączenie NF-κB i STAT1 do promotora iNOS w komórkach. Umożliwia tym samym transkrypcję mRNA iNOS. Funkcja HSP90 jest niezbędna dla transkrpycji genów iNOS indukowanych LPS. Zastosowanie inhibitora HSP90 nie skutkuje blokadą szlaku IKK-NF-κB w komórkach poddanych działaniu LPS i nie hamuje aktywacji JAK-STAT1 w komórkach stymulowanych IFN-γ, a także nie wywiera wpływu na jądrowy transport NF-κB i STAT1 [123, 130]. Wykazano niezwykle istotny fakt, że HSP90 wywiera wpływ na ekspresję iNOS na poziomie genu – jest niezbędne do połączenia NF-κB i STAT1 z promotorami iNOS. Poza tym faktem, HSP90 spełnia rolę modulatora allosterycznego iNOS.

HSP70 z kolei jest niezbędne w aktywacji szlaku IKK indukowanego przez LPS; zastosowanie inhibitora HSP70 prowadzi do zmniejszenia ekspresji iNOS. Podobnie, HSP70 uczestniczy w łączeniu aktywnego STAT1 do promotora iNOS przy stymulacji IFN-γ [131]. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) HSP70 reguluje pobudliwość komórek nerwowych i warunkuje tolerancję neuronów na niedokrwienie i uszkodzenia oksydacyjne wywołane np. podczas HBO w obrębie OUN [132]. Może hamować ekspresję iNOS i nNOS w neuronach hipokampa, zmniejszać tym samym biosyntezę NO i skutki toksyczności tlenowej [132]. HSP70 może więc wpływać na transaktywację genów poprzez wpływ na transdukcję sygnałów lub oddziaływać na poziomie czynników ranskrypcyjnych [131]. Dostępne wyniki badań wskazują jednak na dużą różnorodność kierunków działania HSP70 w zależności od tkanki, tzn. może wykazywać efekt hamujący jak i aktywujący ekspresję NOS. W układzie nerwowym zdaje się przeważać efekt inhibicyjny NOS. Podobnie, zmniejszenie ekspresji iNOS otrzymuje się w wyniku zahamowania HSF1, co blokuje transkrypcję mRNA iNOS. Pomimo braku wpływu na jądrowy transport NF-κB i STAT1, wykazano redukcję ich łączenia się z promotorami iNOS w komórkach stymulowanych LPS/IFN- γ [130]. Wpływ HSF1 na ekspresję iNOS wiąże się zarówno w oddziaływaniem HSP70 i HSP90 na poziomie genu, jak i z modyfikacjami potranslacyjnymi kontrolowanymi m.in. przez acetylotransferazę p300, gdzie jak się wydaje, HSF1 ułatwia jej połączenie z kompleksem białko-DNA [133].

1.7.2.2. Modulator eNOS

Oddziaływanie HSP na eNOS wydaje się mieć inny mechanizm niż na iNOS wynikający m.in. z innego sposobu aktywacji tej formy syntazy tlenku azotu; jednak obecność tego białka jest niezbędna dla maksymalnej aktywacji enzymu. Dostępne dane wskazują rolę HSP90 jako łącznika pomiędzy kinazą białkową Akt (serynowo-treoninową) i jej jednym z substratów – eNOS. HSP90 łączy się z Akt zabezpieczając cząsteczkę przed defosforylacją. Model ten zakłada istotny udział HSP90 w fosforylacji cząsteczki enzymu eNOS (fosforylacja seryny w pozycji 1177 warunkuje jego aktywność) [134], poprzez utworzenie w śródbłonku i mięśniach gładkich kompleksów HSP90-eNOS zapewniających prawidłową fosforylację cząsteczek enzymu przez Akt

[135, 136]. Oddziaływanie pomiędzy HSP90 i eNOS skutkuje także utrzymaniem enzymu w formie sprzężonej (*ang. coupled*), co zapewnia biosyntezę NO, a nie anionu nadtlenkowego, czyniąc to oddziaływanie ważnym fizjologicznym regulatorem. Oddziaływanie HSP90-eNOS zależne jest także od estradiolu [137]. Wiedza o takich oddziaływaniach i sposobach funkcjonowania metabolicznych szlaków komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem białek szoku cieplnego, jako cząsteczek zaangażowanych w odpowiedź na czynniki stresowe (m.in. stres oksydacyjny), może mieć nieoceniony wpływ na rozumienie fizjologii i wpływu warunków ekstremalnych (np. nurkowań) na organizm człowieka.

1.7.3. Wpływ warunków hiperbarycznych i stresu oksydacyjnego na aktywność syntazy tlenku azotu, stężenie tlenku azotu i rozwój stresu nitrozacyjnego.

Istnieje stosunkowo niewielka liczba doniesień o wpływie terapii hiperbarycznej i związanej z nią hiperoksji na stężenie tlenku azotu i aktywność NOS. Dotyczą one zazwyczaj konkretnych narządów lub tkanek, jak np. mózg czy płuca. Wykazano np. in vitro wzrost ekspresji cNOS w chrząstce po ekspozycji na zwiększone ciśnienie parcjalne tlenu w komorze hiperbarycznej [138, 139], silną zależność pomiędzy zwiększoną koncentracją reaktywnych form tlenu i nasileniem stresu oksydacyjnego a dostępnością NO[•] [140], istotny wpływ HBO na aktywność eNOS w warunkach niedokrwienia tkanek [141], wzrost aktywności iNOS w miąższu płucnym po długotrwałej (7 dni) hiperoksji [142]. Stres oksydacyjny może ponadto zwiększać aktywność iNOS w komórkach nabłonkowych jelita [143].

Ekspozycja hiperbaryczna znacząco nasila generowanie RFT, głównie O₂[•], i stres oksydacyjny [73]. Istnieje ścisły związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a syntezą tlenku azotu. Zarówno RFT jak i NO są wysoce reaktywnymi cząsteczkami. NO może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym i tworzyć niestabilny produkt przejściowy – nadtlenoazotyn (ONOO⁻). Jego forma uprotonowana (ONOOH) jest szczególnie reaktywnym czynnikiem nitrującym. Zarówno NO jak i ONOO⁻ są zdolne do utleniania lipidów, białek i kwasów nukleinowych i mogą wpływać na strukturę

i własności biologiczne wielu cząsteczek. Zwiększona produkcja reaktywnych form azotu może prowadzić do wystąpienia stresu nitrozacyjnego.

W warunkach patologicznych (jak np. stan zapalny) iNOS produkuje duże ilości tlenku azotu przez długi czas. Prowadzi to m.in. do nadaktywacji COX (cyklooksygenazy),

a w konsekwencji do powstawania prostaglandyn i RFT [144]. Prostaglandyny wywierają działanie prozapalne. Dodatkowo cytokiny takie jak: interleukina 1 β , IL2, IL-6, interferon- γ czy TNF- α pobudzają leukocyty poprzez aktywację iNOS do syntezy NO. NO może reagować z O₂^{•-} i utworzyć wysoce toksyczny nadtlenoazotyn (ONOO⁻):

$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^{-}$

Podobnie dzieje się w warunkach hiperbarycznych. Do powstawania znaczących ilości ONOO⁻ dochodzi w sytuacji, gdy szybkość powstawania tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego są takie same. Należy jednak pamiętać, że w warunkach fizjologicznych ilość wytwarzanego w ten sposób nadtlenoazotynu jest niewielka z uwagi na odmienne kinetyki reakcji wytwarzania NO[•] i O₂^{•-}. ONOO⁻ reaguje ponadto z dwutlenkiem węgla z bardzo dużą szybkością i jest w ten sposób eliminowany [145]. Nadtlenoazotyn może wchodzić w reakcję z grupami tiolowymi (-SH) powodując ich utlenienie do siarczków, prowadząc tym samym do zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej [146]. Nadmiar NO może powodować też bezpośrednią nitrozylację grup –SH [147]. Reakcje nitrozylacji mogą mieć związek z mutagenezą. Tlenek azotu przeciwdziała również powstawaniu wolnych rodników blokując jony Fe²⁺ i zapobiegając reakcji Fentona:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH + OH^- + Fe^{3+}$$

i reakcji Habera-Weissa, gdzie jony Fe³⁺ pełnią funkcję katalizatora:

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + O_2 + OH^{\bullet}$$

Może zatem funkcjonować jako antyoksydant.

Gdy rośnie stężenie RFT, czas półtrwania NO[•] zmniejsza się na skutek reakcji tworzenia ONOO⁻, która to przebiega znacznie szybciej niż autooksydacja NO[•] przez tlen cząsteczkowy [148]. ONOO⁻ jest cząsteczką zdolną do współzawodniczenia z dysmutazą ponadtlenkową (SOD, *ang. superoxide dismutase*) o $O_2^{\bullet-}$. Gdy zapewnione jest ciągłe wytwarzanie anionorodnika, NO[•] reaguje z nim tak szybko jak jest on tworzony [148]. Nasilenie stresu oksydacyjnego zmniejsza więc dostępność tlenku azotu. Zostało to potwierdzone w badaniu dotyczącym regulacji perfuzji mózgowej w warunkach hiperbarii [140]. Wykazano też istotne zmiany perfuzji mózgowej zależne od eNOS i nNOS, przy czym tlenek azotu produkowany przez nNOS przyczynia się do generowania dużych ilości nadtlenoazotynu, odgrywającego olbrzymią rolę w rozwoju postaci mózgowej toksyczności tlenowej [140]. Produkcja NO przez nNOS w warunkach hiperbarycznych może wzrosnąć 4-5-krotnie [149]. Bardzo niewielka liczba badań odnosi się do aktywności NOS w surowicy. Wyniki jednego z nich wykazały, że poziom ekspresji syntazy istotnie zależy od stosowanych ciśnień podczas ekspozycji hiperbarycznych [150].

Brakuje jednak danych dotyczących wpływu ww. warunków na aktywność formy indukowalnej NOS – zarówno w tkankach jak i surowicy/osoczu krwi (wyniki takich badań można odnaleźć w zaledwie kilku pracach). Podobnie nie istnieją jednoznaczne wyniki badań odnoszące się do warunków hiperbarycznych występujących podczas nurkowania. W pojedynczych badaniach wykazano, że podczas HBO możliwa jest istotna aktywacja szlaku NF-κB ze wzrostem ekspresji iNOS i syntezy NO [132].

Niektóre dostępne publikacje odnoszą się do współzależności pomiędzy aktywnością RFT i iNOS głównie w procesach rozwoju zmian miażdżycowych, w których istotną rolę odgrywa tlenek azotu [151]. Wydaje się, że RFT mogą być silnym czynnikiem indukującym wzrost ekspresji iNOS m.in. w komórkach nerek i aorty (autorzy cytowanej pracy nie wskazują konkretnych komórek, a materiał do badań uzyskali z homogenatu tkankowego) [152].

Wskazuje to na potrzebę dalszych badań i zbadania wpływu hiperbarii i stresu oksydacyjnego na zachowanie się ww. parametrów w surowicy krwi osób poddawanych działaniu wysokiego ciśnienia i hiperoksji.

48

2. Cel pracy

Celem pracy jest określenie wpływu przebywania w warunkach hiperbarycznych podczas ekspozycji w komorze hiperbarycznej z warunkami ciśnieniowymi panującymi podczas nurkowań na głębokość 30 i 60 m na ekspresję wybranych białek szoku cieplnego (HSP70 i HSP90), syntazy tlenku azotu (eNOS i iNOS) i parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi, a także:

- określenie nasilenia stresu oksydacyjnego podczas nurkowań symulowanych wyrażonego w odpowiedzi układów antyoksydacyjnych,
- zbadanie korelacji pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego a ekspresją HSP i syntazy tlenku azotu,
- zbadanie zależności pomiędzy ekspresją HSP i NOS wynikającą m.in. z roli
 HSP70 i HSP90 jako modulatora aktywności NOS,
- pośrednie określenie wpływu hiperbarii na biosyntezę NO,
- określenie wpływu hiperbarii na stężenie żelaza w surowicy krwi.

Osiągnięcie ww. celów pozwoli odpowiedzieć na pytania:

- czy ekspozycja na warunki hiperbaryczne podczas nurkowań symulowanych w komorze hiperbarycznej wpływa na nasilenie stresu oksydacyjnego i aktywację układów antyoksydacyjnych,
- czy stres oksydacyjny wiąże się ze zmianą ekspresji białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu,
- czy występuje korelacja pomiędzy stężeniem HSP i NOS,
- czy przebywanie w warunkach hiperbarycznych wpływa na zmianę stężenia NOS, a także która izoforma NOS może przypuszczalnie odpowiadać za biosyntezę NO w wymienionych warunkach,
- czy łatwo osiągalna surowica krwi jest dobrym materiałem do oznaczania ww. parametrów.

3. Grupa badana

Badaniami została objęta grupa 65 zdrowych osób – Funkcjonariuszy Państwowej Straży Pożarnej, odbywających nurkowania symulowane w komorze hiperbarycznej, scharakteryzowana pod względem danych antropometrycznych (Tabela 5) i ogólnego stanu zdrowia wynikającego z kwalifikacji zdrowotnej określonej rozporządzeniami Ministra właściwego dla Spraw Wewnętrznych i Administracji^{4,5,6} (Tabela 6). Osoby te na co najmniej 72 godziny przed badaniem nie były eksponowane na działanie wysokiego ciśnienia i nie podejmowały wysiłku fizycznego. Deklarowały także, że nie spożywają alkoholu i nie palą tytoniu.

100% badanych stanowili mężczyźni w wieku od 24 do 51 lat (średnia 32,6 lat, mediana 33 lata), będący Funkcjonariuszami Państwowej Straży Pożarnej i nurkami MSWiA. U 67% badanych wartość wskaźnika BMI kwalifikuje je jako osoby z nadwagą (BMI >25 kg/m²), średnia 26,7 kg/m², mediana 26,5 kg/m². Należy jednak pamiętać o wielu niedoskonałościach wskaźnika BMI i nieuwzględnianiu indywidualnej budowy ciała, co w grupie badanej miało szczególne znaczenie ze względu na duży stopień wytrenowania i znaczną masę mięśniową.

Analiza dostępnych wyników podstawowych badań biochemicznych wykazała prawidłową aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) u 96% badanych. U 4% aktywność ALT przekraczała nieznacznie zakres wartości referencyjnych. 100% osób badanych charakteryzowało się prawidłowymi wartościami stężenia bilirubiny całkowitej i kreatyniny w surowicy. U 10 osób stwierdzono nieznacznie obniżoną wartość szacowanego współczynnika filtracji kłębuszkowej, eGFR. Stężenie glukozy w surowicy mieściło się w zakresie wartości referencyjnych (wynoszących 70-99 mg/dL) u 47% badanych, pozostałe osoby miały w większości nieznacznie

⁴ Rozporządzenie Ministra Spraw Wewnętrznych i Administracji z dnia 16 maja 2011 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wykonywania prac podwodnych w jednostkach organizacyjnych podległych lub nadzorowanych przez ministra właściwego do spraw wewnętrznych. Dz. U. 2011 nr 128 poz. 728

⁵Rozporządzenie Ministra Spraw Wewnętrznych z dnia 5 stycznia 2012 r. w sprawie służby medycyny pracy. Dz. U. 2012 poz. 53

⁶ Rozporządzenie Ministra Spraw Wewnętrznych i Administracji z dnia 11 października 2018 r. w sprawie wykazu chorób i ułomności, wraz z kategoriami zdolności do służby w Policji, Straży Granicznej, Straży Marszałkowskiej, Państwowej Straży Pożarnej oraz Służbie Ochrony Państwa. Dz. U. 2018 poz. 2035

podwyższone stężenie glukozy. Nie wszystkie jednak badania kontrolne wykonywane były na czczo, co w dużej mierze mogło przyczynić się do wzrostu stężenia np. glukozy.

- 13 próbek pochodziło od osób, które odbywały nurkowania symulowane do 30 m z dekompresją tlenową, a następnie po 24 godzinach kolejne nurkowania do głębokości 60 m – grupa ta była grupą podstawową do rozważań nt. białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu, w której wykonano oznaczenia SOD, CAT, GPx, MDA, HSP70, HSP90, eNOS.
- Więcej dostępnych próbek pochodziło jednak od osób odbywających ekspozycje na 60 m. W celu włączenia ich do badań stworzono grupę rozszerzoną (20 osób, tj. osoby z grupy podstawowej i osoby dodatkowe) i analizowaną ją niezależnie od grupy podstawowej. Oznaczono ww. parametry.
- Tam, gdzie było to możliwe, parametry stresu oksydacyjnego analizowano w grupie 40 osób (z podziałem na grupę podstawową – 13-osobową i rozszerzoną, w skład której wchodziły osoby, u których oznaczono stężenie iNOS).
- Stężenie iNOS oceniano z powodów technicznych tylko po ekspozycjach 60 m z dekompresją tlenową i dodatkowo powietrzną, analizując jednocześnie aktywność enzymów antyoksydacyjnych w zależności od sposobu dekompresji.

Uwaga dotycząca grupy badanej

W związku z tym, że ekspozycje w komorze hiperbarycznej symulujące warunki panujące podczas nurkowań nie odbywają się często, a także ze względu na trudności w wielokrotnym uzyskaniu materiału do badań, grupy podzielono tak, aby uzyskać możliwie największą liczebność i najmniejszy błąd w analizie statystycznej.

Należy zdecydowanie zaznaczyć, że tematyka podejmowanego badania jest wysoce specyficzna, co wiąże się z trudnością w uzyskaniu licznej grupy badanej. Również zdecydowana większość dostępnych angielskojęzycznych publikacji naukowych (a przy tym nielicznych) opiera się na zaledwie kilku do kilkunastoosobowych grupach badanych. Grupa którą badano w niniejszej pracy była więc istotnie liczniejsza.

		Wartości dla grupy badanej, n=65									
	Średnia	ednia Mediana Odchylenie std.		Wartość min-max							
Wiek [lat]	32,6	33	5,5	24-51							
Wzrost [cm]	178,8	180	5,7	165,0-190,0							
Waga [kg]	85 <i>,</i> 5	84	10,9	68,9-115,7							
BMI [kg/m ²]	26,7	26,5	2,8	21,1-33,4							

Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej. Dane antropometryczne.

 Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej. Podstawowe badania biochemiczne.

	Wartości dla grupy badanej, n=65								
Parametr	Średnia	Mediana	Odchylenie std.	Wartość min-max					
ALT [U/I]	29,2	28,0	14,2	11,0-83,0					
Bilirubina całk. [mg/dL]	0,72	0,69	0,26	0,24-1,30					
Kreatynina [mg/dL]	0,92	0,93	0,15	0,67-1,22					
eGFR [mL/min/1,73 m ²]*	104,1	102,4	18,2	73,5 – 141,3					
Glukoza [mg/dL]	94,1	92,0	10,3	69,0-110,0					

*Obliczono z uproszczonego wzoru MDRD (ang. Modification of Diet in Renal Disease)

Fabela 7. Zakresy wartości referencyjnych	h dla podstawowych	oznaczeń biochemicznych.
---	--------------------	--------------------------

Parametr	Zakres wartości referencyjnych (Tam, gdzie było to istotne podano zakresy dla płci męskiej. Zakresy mogą się różnić w zależności od zastosowanej metody oznaczenia).
ALT [U/I]	<40
Bilirubina całk. [mg/dL]	0,3-1,2
Kreatynina [mg/dL]	0,8-1,2
eGFR [mL/min/1,73 m ²]	>90
Glukoza [mg/dL]	70-99

4. Metody

4.1. Przebieg badania

Osoby uczestniczące w badaniu, od których pobierany był materiał w celu wykonania oznaczeń biochemicznych, poddawane były ekspozycjom hiperbarycznym (nurkowania symulowane w komorze hiperbarycznej) do nadciśnień odpowiadającym głębokości nurkowania 30 m (400 kPa) i 60 m (700 kPa) w wodzie słodkiej. Przerwa pomiędzy ekspozycjami wynosiła 24 godziny. Dekompresję powietrzną lub tlenową (w zależności od rodzaju ekspozycji) przeprowadzano zgodnie z tabelami dekompresyjnymi Marynarki Wojennej RP (tabele przedstawiono w załączniku).

Całkowity czas dekompresji zawarty w przedstawionych poniżej tabelach oznacza czas potrzebny na wynurzenie z maksymalnej głębokości (plateau ekspozycji) do pierwszej stacji dekompresyjnej, sumę czasów pobytu na kolejnych stacjach i czas przejścia z ostatniej stacji do powierzchni.

Ekspozycja 30 m p. p. m.

Plateau ekspozycji po sprężeniu wynosiło ok. 30 minut po czym nastąpiła stopniowana dekompresja. Ze względów bezpieczeństwa i zminimalizowania ryzyka wystąpienia objawów niepożądanych "bends"; postaci stawowo-mięśniowej choroby dekompresyjnej (bóle kostno-stawowe występujące w lekkiej postaci choroby dekompresyjnej), po ekspozycji na 30 m (400 kPa) zastosowano dekompresję jak po nurkowaniu na 33 metry, co odpowiada ciśnieniu 440 kPa (Tabela 8). W komorze hiperbarycznej w trakcie nurkowań jako mieszaninę oddechową wykorzystano powietrze.

Fksnozycia	Plateau	Głębokość st	Całkowity czas		
[m p.p.m.] [min]		Czas pobytu i	dekompresji		
22	20	9	6	3	25 minut
55	30	6	10	16	35 minut

Tabela 8. Fragment wiersza tabeli dekompresyjnej dla ekspozycji 30 m p. p. m (dekompresja powietrzna)

Ekspozycja 60 m p. p. m.

Podobnie jak w przypadku ekspozycji 30 m plateau wynosiło 30 minut), a czynnikiem oddechowym było powietrze. Dla większego bezpieczeństwa i zminimalizowania ryzyka wystąpienia objawów "bends" zastosowano profil dekompresyjny dla ekspozycji 63 metrowych - 735 kPa (Tabela 9).

Tabola 0 Eragmont wiorsza taboli dokomprosvinci dla okspozycij 60 m n. n. m. (dokomprosia no	
Tabela 3. Fragment wersza tabeli uekombresvinerula ekspozycii od m p. p. m (uekombresia po	vietrzna)

Ekspozycja	Plateau	Gł	ęboko	Całkowity						
[m p.p.m.]	[min]	Cz	as pob	czas dekompresji						
63	30	24	21	18	15	12	9	6	3	3 godz.
05	50	9	13	16	18	22	32	47	58	41 min.

W przypadku dekompresji tlenowych profil wyglądał nieco inaczej i został przedstawiony w Tabeli 10. Całkowity czas dekompresji był krótszy o 1 godz. i 51 min. niż w przypadku dekompresji powietrznej.

Tabela 10. Fragment wiersza tabeli dekompresyjnej dla ekspozycj	ji 60 m p. p. m (dekompresja tlenowa)
---	---------------------------------------

Ekspozycja	Plateau [min]	Głęl	ookość	Całkowity					
[m p.p.m.]		Czas	s pobyt	czas dekompresji					
60	35	21*	18*	15	12	9	6	3	1 godz.
60	35	12	15	8	10	14	20	26	50 min.

*mieszanina oddechowa – powietrze

4.2. Oznaczenia parametrów biochemicznych

Badania dotyczące wpływu hiperbarii na rozwój stresu oksydacyjnego u nurków zostały w Polsce zapoczątkowane przez Pana Doktora Mariusza Kozakiewicza (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu) [49, 56] Krew pobierana była z żyły odłokciowej od osób badanych przed i po ekspozycjach hiperbarycznych, zarówno 30 m jak i 60 m zawsze przez jedną i tą samą osobę. Dla każdej próbki zastosowano jednakowe warunki wirowania materiału, przygotowania do zamrożenia i przechowywania (-80°C).

Parametry stresu oksydacyjnego (SOD, CAT, MDA i GPx) zostały oznaczone przez Pana Doktora Mariusza Kozakiewicza w erytrocytach i wykorzystane w niniejszej pracy za Jego zgodą celem kontynuacji i rozszerzenia profilu badań.

Białka szoku cieplnego HSP70 i HSP90, a także izoformy eNOS i iNOS syntazy tlenku azotu oznaczano w surowicy krwi z wykorzystaniem komercyjnych zestawów odczynnikowych opartych na metodzie ELISA. Stężenie żelaza całkowitego w próbkach surowicy oznaczono metodą spektrofotometryczną. Zastosowane odczynniki i charakterystykę każdej metody przedstawia Tabela 11.

Wszystkie oznaczenia wykonano zgodnie z instrukcją producenta testu. W przypadku metody automatycznej - zgodnie z instrukcją użytkowania zestawu odczynnikowego i analizatora biochemicznego.

4.2.1. Oznaczanie stężenia białka szoku cieplnego HSP70, HSP90 i eNOS

Próbki do badań immunoenzymatycznych met. ELISA, przechowywane w temperaturze -80°C, bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń rozmrożono i doprowadzono do temperatury pokojowej. Następnie poddano wirowaniu przez 10 min przy 1500g celem pozbycia się, powstałych podczas przechowywania próbki, ewentualnych strątów. Wszystkie reakcje przeprowadzono na 96-dołkowych płytkach opłaszczonych przeciwciałami odpowiednio: anty-HSP70, anty-HSP90 i anty-eNOS.

W początkowym etapie (zgodnie z instrukcją producenta testów) przygotowano rozcieńczenia standardów HSP70, HSP90 i eNOS do krzywej kalibracyjnej, po czym naniesiono odpowiednie roztwory do dołków płytki. Następnie do dołków naniesiono roztwory stanowiące próbę ślepą (zerową) i próbki - w każdym przypadku po 100 μl. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę (2 godziny w przypadku HSP70). W kolejnym etapie dodane zostały przeciwciała znakowane peroksydazą

chrzanową (HRP, *ang. horseradish peroxidase*) i inkubowano przez 1 godzinę. Po etapie płukania płytek dodano do każdego dołka substratu TMB (tetrametylobenzydyna) uzyskując po zalecanym czasie 15-25 min. niebieskie zabarwienie próbek. Reakcję przerywano poprzez dodanie roztworu kwasu siarkowego, co powodowało zmianę zabarwienia zawartości dołków na kolor żółty. Absorbancja próbek (intensywność zabarwienia) mierzona była spektrofotometrycznie przy długości fali wynoszącej 450nm zaraz po zakończeniu reakcji. Uzyskane wyniki porównywano do krzywej wzorcowej i wyrażano w ng/mL.

4.2.2. Oznaczanie stężenia syntazy tlenku azotu iNOS

Próbki do badania iNOS przygotowywane były identycznie jak w przypadku pozostałych oznaczeń. Wyjątek w przypadku iNOS stanowiło wstępne rozcieńczenie surowic w stosunku 1:10 zalecane przez producenta testu. Dalszy przebieg testu nie różnił się od opisanego powyżej. Uzyskane wyniki przed ostatecznym przedstawieniem przemnożono razy 10, dla uwzględnienia współczynnika rozcieńczenia. Wyniki wyrażono w pg/mL.

4.2.3. Oznaczanie stężenia żelaza całkowitego

Próbki do oznaczenia stężenia żelaza całkowitego w surowicy rozmrożono w temperaturze pokojowej i następnie wirowano przez 10 min przy 1500g. Supernatant z każdej z próbek przeniesiono do nowej próbówki (odpowiedniej dla analizatora biochemicznego Mindray BS-800M), umieszczono w statywach a następnie na pokładzie zaprogramowanego analizatora w celu wykonania oznaczeń. Uzyskane wartości absorbancji przy długości fali 570 nm (z redukcją tła przy 700 nm) próbek były automatycznie odnoszone do krzywej wzorcowej uzyskanej podczas kalibracji metody. Wyniki wyrażono w μg/dL.

Oznaczany parametr	Odczynniki i zasada metody	Aparatura
HSP70	Odczynniki: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit HSP70 (Human), SEA873Hu, Cloud Clone Corp., Houston, USA Zasada metody: Test immunoenzymatyczny. Próbki surowicy nanoszone są do studzienek polistyrenowej płytki opłaszczonych przeciwciałami swoistymi dla HSP70. Następuje wiązanie antygenu (HSP70) zawartego w próbkach z przeciwciałami. Do związanego HSP70 przyłączane są swoiste przeciwciała znakowane biotyną, a następnie dodawana jest awidyna znakowana peroksydazą chrzanową. Powstaje kompleks awidyna-biotyna. Enzym rozkłada substrat TMB (tetrametylobenzydyna) prowadząc do zmiany barwy mieszaniny reakcyjnej. Reakcja przerywana jest przez dodanie roztworu kwasu siarkowego, a natężenie barwy mierzone jest spektrofoto- metrycznie przy długości fali 450nm. Precyzja - Intra-assay CV: <10%	Czytnik płytek ELISA: BMG LabTech SPECTROstar Nano Płuczka mikropłytek: BioSan Microplate Washer INTELIWASHER 3D-IW8
HSP90	Odczynniki: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit HSP90 (Human), SEA863Hu, Serial No.: 43F83C2A65, Cloud Clone Corp., Houston, USA Zasada metody: Test immunoenzymatyczny. Próbki surowicy nanoszone są do studzienek polistyrenowej płytki opłaszczonych przeciwciałami swoistymi dla HSP90. Następuje wiązanie antygenu (HSP90) zawartego w próbkach z przeciwciałami. Do związanego HSP90 przyłączane są swoiste przeciwciała znakowane biotyną, a następnie dodawana jest awidyna znakowana peroksydazą chrzanową. Powstaje kompleks awidyna-biotyna. Enzym rozkłada substrat TMB (tetrametylobenzydyna) prowadząc do zmiany barwy mieszaniny reakcyjnej. Reakcja przerywana jest przez dodanie roztworu kwasu siarkowego, a natężenie barwy mierzone jest spektrofoto- metrycznie przy długości fali 450nm.	Czytnik płytek ELISA: BMG LabTech SPECTROstar Nano Płuczka mikropłytek: BioSan Microplate Washer INTELIWASHER 3D-IW8

 Tabela 11. Charakterystyka metod immunochemicznych i biochemicznych.

	Precyzja	
	- Intra-assay CV: <10%	
	- Inter-assay CV: <12%	
	Odczynniki: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit NOS2 (Human), SEA837Hu, Cloud Clone Corp., Houston, USA	
NOS2	Zasada metody: Test immunoenzymatyczny. Próbki surowicy nanoszone są do studzienek polistyrenowej płytki opłaszczonych przeciwciałami swoistymi dla NOS2. Następuje wiązanie antygenu (NOS2) zawartego w próbkach z przeciwciałami. Do związanego NOS2 przyłączane są swoiste przeciwciała znakowane biotyną, a następnie dodawana jest awidyna znakowana peroksydazą chrzanową. Powstaje kompleks awidyna-biotyna. Enzym rozkłada substrat TMB (tetrametylobenzydyna) prowadząc do zmiany barwy mieszaniny reakcyjnej. Reakcja przerywana jest przez dodanie roztworu kwasu siarkowego, a natężenie barwy mierzone jest spektrofoto- metrycznie przy długości fali 450nm.	Czytnik płytek ELISA: BMG LabTech SPECTROstar Nano Płuczka mikropłytek: BioSan Microplate Washer INTELIWASHER 3D-IW8
	Precyzja - Intra-assay CV: <10% - Inter-assay CV: <12%	
NOS3	Odczynniki: Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit NOS3 (Human), SEA868Hu, Serial No.: 185828B76A, Cloud Clone Corp., Houston, USA Zasada metody: Test immunoenzymatyczny. Próbki surowicy nanoszone są do studzienek polistyrenowej płytki opłaszczonych przeciwciałami swoistymi dla NOS3. Następuje wiązanie antygenu (NOS3) zawartego w próbkach z przeciwciałami. Do związanego NOS3 przyłączane są swoiste przeciwciała znakowane biotyną, a następnie dodawana jest awidyna znakowana peroksydazą chrzanową. Powstaje kompleks awidyna-biotyna. Enzym rozkłada substrat TMB (tetrametylobenzydyna) prowadząc do zmiany barwy mieszaniny reakcyjnej. Reakcja przerywana jest przez dodanie roztworu kwasu siarkowego, a natężenie barwy mierzone jest spektrofoto- metrycznie przy długości fali 450nm.	Czytnik płytek ELISA: BMG LabTech SPECTROstar Nano Płuczka mikropłytek: BioSan Microplate Washer INTELIWASHER 3D-IW8

	Precyzja			
	- Intra-assay CV: <10%			
	- Inter-assay CV: <12%			
	Odczynniki:			
	Zestaw odczynnikowy Cormay A-800 FERRUM (II			
	Bengent 1. kurst automount (n.l. 1.0) tiemeernik			
	Reagent 1: kwas cytrynowy (pH 1,9), tiomocznik			
	Descent 2. sekenhinian asdu, shlarak asdu, farrazuna			
	Reagent 2: askorbinian sodu, chiorek sodu, ierrozyna,			
	konserwanty			
Żelazo (Fe)	Zasada metody: Metoda kolorymetryczna z ferrozyną, bez odbiałczania. Jony żelaza (Fe ³⁺) związane we krwi z transferyną są uwalniane w środowisku kwaśnym w obecności detergentów, a następnie redukowane do jonów żelaza (Fe ²⁺) przez askorbinian. Jony żelaza (Fe ²⁺) reagują z solą sodową 3-(2-pyridylo)-5,6-bis(2- [4-kwas fenylosulfo-nowy])-1,2,4-triazyny (ferrozyna) tworząc barwny związek. Jony miedzi Cu ²⁺ są wiązane przez tiomocznik. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia żelaza i odczytowana przy długości fali 570 pm (z fala dla	Automatyczny analizator biochemiczny: Mindray BS- 800M		

4.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu "STATISTICA 13" (TIBCO Software Inc. USA). Zmienne ilościowe scharakteryzowano za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (±SD). Zgodność rozkładu danych pochodzących z próbek z rozkładem normalnym sprawdzano testem Kołmogorova-Smirnova z poprawką Lillieforsa. Dane nie mające rozkładu normalnego analizowano nieparametrycznym testem kolejności par Wilcoxona. W przypadku zmiennych niezależnych korzystano z testu nieparametrycznego U Manna-Whitney'a. Do stwierdzenia powiązania i kierunku oddziaływania zmiennych zastosowano analizę korelacji obliczając współczynniki korelacji Pearsona. Na wykresach zależności zmiennych dane przedstawiono wraz z przedziałem ufności (dla poziomu prawdopodobieństwa równego 95%). Za kryterium istotności statystycznej przyjęto p<0,05.

4.4. Ograniczenia metody

Zastosowane w niniejszej pracy metody nie są wolne od błędów i ograniczeń. W szczególności dotyczy to oznaczania stężenia białek HSP70, HSP90, eNOS i iNOS w grupach osób o małej liczności. Z uwagi jednak na fakt, że obszar podjętych w pracy badań jest wysoce specyficzny, a ekspozycje w komorze hiperbarycznej wykonywane w celach badawczych symulujące nurkowania nie należą do często podejmowanych działań na świecie, a tym bardziej w Polsce, grupy odpowiadają licznością większości publikowanych prac naukowych o podobnej tematyce, a zaobserwowane trendy pozwalają na wstępną interpretację wyników.

Kolejnym ograniczeniem jest wykonanie oznaczeń w surowicy krwi (poza parametrami stresu oksydacyjnego). Białka szoku cieplnego i syntaza tlenku azotu należą do białek wewnątrzkomórkowych, gdzie osiągają znacznie wyższe stężenia, przy czym dokładna rola HSP w płynach pozakomórkowych jest aktualnie przedmiotem badań. Analizując dostępne wyniki badań innych autorów, uwagę zwraca fakt, że wszelkie zależności oddziaływania HSP i NOS wydają się być lepiej zauważalne na komórkowym, poziomie jednak brakuje obecnie danych pochodzących z doświadczeń opartych na liniach komórkowych jak i tych, gdzie oznaczenia biochemiczne wykonywano w surowicy krwi obwodowej, a tym bardziej na materiale uzyskanym po rzeczywistych ekspozycjach hiperbarycznych z udziałem ludzi. Przy obecnym stanie wiedzy dokładna interpretacja i odniesienie się do już istniejących wyników w obu przypadkach nie jest łatwa. Surowica krwi jest łatwo dostępna i poznanie efektów oddziaływania hiperbarii na stężenie HSP i NOS (pośrednio wskazujące na ekspresję genów tych białek) w tym materiale uzupełnia niewątpliwie obecnie istniejącą lukę.

Fakt pobrania materiału biologicznego bezpośrednio przed i po ekspozycjach hiperbarycznych również stanowi ograniczenie metody, nie pozwalając na określenie stężeń HSP i NOS w trakcie trwania ekspozycji jak i ocenę późnych efektów, mogących uwidaczniać się po kilku godzinach.

5. Wyniki

5.1. Ekspozycje hiperbaryczne 30 m – dekompresja tlenowa (n=13)

5.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

W grupie osób badanych poddanych ekspozycji hiperbarycznej do nadciśnienia odpowiadającemu głębokości 30 m aktywność SOD w erytrocytach zwiększyła się istotnie. Średnia aktywność SOD przed ekspozycją wynosiła 2548,3±202,8 U/g Hb, po ekspozycji 2681,7±219,9 U/g Hb, p=0,0033.



Rysunek 6. Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.2. Katalaza (CAT)

Po ekspozycji na 30 m aktywność katalazy u osób badanych nie wykazała istotnej statystycznie zmiany (pomimo niewielkiej tendencji wzrostowej). Średnia aktywność CAT przed ekspozycją wynosiła 25,9±2,9 IU/g Hb, po ekspozycji 26,8±2,1 IU/g Hb, p=0,4328.



Rysunek 7. Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)

Aktywność peroksydazy glutationowej po ekspozycjach 30 m nie uległa istotnej statystycznie zmianie. Przed ekspozycją wynosiła średnio 15,9±2,7 U/g Hb, po 15,4±2,7 U/g Hb, p=0,0505.



Rysunek 8. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.4. Dialdehyd malonowy (MDA)

Stężenie aldehydu malonowego podczas ekspozycji znamiennie wzrosło. Przed ekspozycją w komorze hiperbarycznej wynosiło 0,31±0,05 μmol/g Hb, po ekspozycji 0,33±0,05 μmol/g Hb, p=0,0134.



Rysunek 9. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.5. Wskaźnik antyoksydacyjny

Wartość wskaźnika antyoksydacyjnego po ekspozycji 30 m wzrosła z 61,5±8,6 do 64,1±8,4, p=0,1361, nie była to jednak zmiana istotna.



Rysunek 10. Zmiana wartości wskaźnika antyoksydacyjnego przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.6. Białko szoku cieplnego HSP70

Stężenie białka HSP70 w surowicy po ekspozycji na 30 m uległo istotnemu zmniejszeniu. Średnie stężenie przed ekspozycją u osób badanych wynosiło 0,55±0,28 ng/mL, po ekspozycji 0,44±0,34 ng/mL, p=0,0262.



Rysunek 11. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.7. Białko szoku cieplnego HSP90

Stężenie białka HSP90 w surowicy po ekspozycji na 30 m nie zmieniło się istotnie, choć obserwuje się tendencję wzrostową. Średnie stężenie przed ekspozycją wynosiło 0,37±0,08 ng/mL, po ekspozycji 0,45±0,17 ng/mL, p=0,2721.



Rysunek 12. Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.8. Syntaza tlenku azotu eNOS

Masa białka syntazy tlenku azotu eNOS nie uległa istotnej statystycznie zmianie po nurkowaniu symulowanym do 30 m, choć wydaje się być obecny trend spadkowy. Przed sprężeniem w komorze hiperbarycznej średnia masa eNOS w surowicy wynosiła 58,00±0,01 pg/mL, po 57,08±0,01 pg/mL, p=0,5829.



Rysunek 13. Zmiana stężenia eNOs w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.1.9. Żelazo

Stężenie żelaza uległo istotnemu zmniejszeniu. Przed ekspozycją wynosiło 76,5±14,2 μg/dL, po ekspozycji 67,8±17,3 μg/dL, p=0,0186



Rysunek 14. Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

Dovomoty	Wartość ±SD		_
Parametr	przed ekspozycją	po ekspozycji	p
SOD [U/g Hb]	2548,3±202,8	2681,7±219,9	0,0033
CAT [IU/g Hb]	25,9±2,9	26,8±2,1	0,4328
GPx [U/g Hb]	15,9±2,7	15,4±2,7	0,0505
MDA [µmol/g Hb]	0,31±0,05	0,33±0,05	0,0134
HSP70 [ng/mL]	0,55±0,28	0,44±0,34	0,0262
HSP90 [ng/mL]	0,37±0,08	0,45±0,17	0,2721
eNOS [pg/mL]	58,00±0,01	57,08±0,01	0,5829
Żelazo [µg/dL]	76,5±14,2	67,8±17,3	0,0186

Tabela 12. Podsumowanie wartości oznaczanych parametrów i istotności statystycznej (ekspozycje 30m).

5.2. Ekspozycje hiperbaryczne 60 m – dekompresja tlenowa

5.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

W grupie osób badanych poddanych ekspozycji hiperbarycznej do nadciśnienia odpowiadającemu głębokości 60 m aktywność SOD w erytrocytach zwiększyła się istotnie, podobnie jak przy nurkowaniach do 30 m. Średnia aktywność SOD przed ekspozycją wynosiła 2941,4±286,8 U/g Hb, po ekspozycji 3266,4±369,4 U/g Hb, p=0,0033.

Podobną zależność stwierdzono zwiększając grupę (n=40) i włączając do analizy próbki osób, które nie były brane pod uwagę w grupie poddanych ekspozycji 30 m (przed 2833,9±241,9 U/g Hb, po 3181,4±302,8 U/g Hb, p<0,0001). Aktywność SOD była znacząco wyższa po nurkowaniach na 60 m niż na 30 m, odpowiednio 3266,4±369,4 U/g Hb vs. 2681,7±219,9 U/g Hb, p=<0,001 (dla grupy n=12).



Rysunek 15. Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 16. Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.2. Katalaza (CAT)

Po ekspozycji na 60 m aktywność katalazy w próbkach osób badanych istotnie się zmniejszyła. Średnia aktywność CAT przed ekspozycją wynosiła 28,2±1,8 IU/g Hb, po ekspozycji 27,3±2,4 IU/g Hb, p=0,0329. Po zwiększeniu grupy do 40 osób nie wykazano istotnych różnic – przed ekspozycją 21,1±5,5 IU/g Hb, po 22,3±5,3 IU/g Hb, p=0,4516. Zasadną wydaje się ostrożna interpretacja wyników i uznanie, że różnice w aktywności katalazy nie są istotne, a na różnicę w grupie 12 osób wpływ ma mała liczebność próby.



Rysunek 17. Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej



Rysunek 18. Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)

Po ekspozycji na 60 m aktywność GPx wzrosła. Początkowo wynosiła 14,8±1,4 U/g Hb, po ekspozycji 16,9±2,4 U/g Hb, p=0,0044. Po zwiększeniu grupy do 40 wykazano podobną, równie istotną zależność, jednak z mniej zauważalnym wzrostem aktywności. Przed ekspozycją średnia aktywność GPx wynosiła 17,0±3,0 U/g Hb, po ekspozycji 17,6±3,2 U/g Hb, p=0,0167.



Rysunek 19. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 20. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.4. Dialdehyd malonowy (MDA)

Po ekspozycji na 60 m stężenie MDA znacząco wzrosło. Średnie stężenie MDA przed ekspozycją wynosiło 0,25±0,03 µmol/g Hb, po ekspozycji 0,31±0,07 µmol/g Hb, p=0,0033. Po zwiększeniu grupy do 40 wykazano podobną, równie istotną zależność. Wartość MDA w tej grupie początkowo wynosiła 0,27±0,05 µmol/g Hb, po ekspozycji wzrosła do 0,32±0,05 µmol/g Hb, p=0,0000.



Rysunek 21. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 22. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.5. Wskaźnik antyoksydacyjny

Wartość wskaźnika antyoksydacyjnego po ekspozycji 60 m znamiennie wzrosła z 68,2±7,6 do 73,0±10,4, p=0,0186.



Rysunek 23. Zmiana wartości wskaźnika antyoksydacyjnego przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).

5.2.6. Białko szoku cieplnego HSP70

Stężenie białka HSP70 przed ekspozycją wynosiło 0,61±0,55 ng/mL, po ekspozycji 0,44±0,25 ng/mL. Zmiana ta nie była istotna statystycznie, p=0,4236. Zwiększając jednak grupę badaną do 20 osób i włączając osoby, które nie były brane pod uwagę w analizie po ekspozycji na 30 m, widać wyraźny spadek stężenia HSP (przed: 1,33±1,18 ng/mL, po: 0,81±1,28 ng/mL) przy p=0,0504. Sugeruje to, że ekspresja białka HSP70 spada, jednak z uwagi na małą grupę badaną nie udało się uzyskać istotności (zależność taką obserwuje się w ocenie całościowej HSP70, bez podziału na grupy). Nie wykazano różnicy w stężeniu HSP70 po ekspozycji na 30 i na 60 m, p=0,5463.



Rysunek 24. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 25. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.7. HSP70 bez podziału na grupę 30 i 60 m

Oceniając zmianę stężenia HSP70 całościowo (n=32) obserwuje się istotny statystycznie spadek stężenia po ekspozycjach z 1,43±1,91 ng/mL na 0,67±1,04 ng/mL, p=0,0020.



Rysunek 26. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), bez podziału na grupy.
5.2.8. Białko szoku cieplnego HSP90

Stężenie HSP90 po ekspozycji na 60 m uległo zwiększeniu, 0,37±0,08 ng/mL vs. 0,62±0,32 ng/mL, p=0,0166. Podobnie jak w przypadku HSP70, zwiększając grupę badaną do 20 osób i włączając osoby, które nie były brane pod uwagę w analizie po ekspozycji na 30 m, widać również wyraźny wzrost stężenia HSP90, 0,34±0,08 ng/mL vs. 0,50±0,27 ng/mL, p=0,0022. Zmiana stężenia HSP90 po nurkowaniach 30 i 60 m nie jest istotna (p=0,1858).



Rysunek 27. Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 28. Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.9. HSP90 bez podziału na grupę 30 i 60 m

Oceniając zmianę stężenia HSP90 całościowo (n=33) obserwuje się istotny statystycznie wzrost stężenia z 0,35±0,08 ng/mL na 0,48±0,24 ng/mL, p=0,0018.



Rysunek 29. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), bez podziału na grupy.

5.2.10. Syntaza tlenku azotu eNOS

Masa białka syntazy eNOS przed nurkowaniem 60 m wynosiła 49,2±6,5 pg/mL, po 54,9±11,1 pg/mL. Wzrost jest istotny statystycznie, p=0,0367. Zwiększając grupę badaną do 20 osób i włączając osoby, które nie były brane pod uwagę w analizie po ekspozycji na 30 m, wyraźniej widać tendencję wzrostową – przed ekspozycją 53,8±10,7 pg/mL, po ekspozycji 61,0±14,4 pg/mL, p=0,0043. Nie wykazano różnicy w masie eNOS po ekspozycjach na 30 i 60 m (p=0,6443).



Rysunek 30. Zmiana stężenia eNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunk 31. Zmiana stężenia eNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona.

5.2.11. eNOS bez podziału na grupę 30 i 60 m

Oceniając zmianę stężenia białka eNOS całościowo (n=33) obserwuje się istotny statystycznie wzrost stężenia z 55,4±10,6 pg/mL na 59,5±13,5 ng/mL, p=0,0338.

5.2.12. Syntaza tlenku azotu iNOS

Masa białka syntazy iNOS (n=20) przed ekspozycją symulującą nurkowanie na 60 m wynosiła 130,5±20,1 pg/mL, po 129±21,5 pg/mL, p=0,9518. Nie wykazano różnic w stężeniu białka iNOS.



Rysunek 32. Zmiana stężenia iNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).

5.2.13. Żelazo

Stężenie żelaza po ekspozycji na 60 m uległo istotnemu zmniejszeniu z 98,2±30,8 μg/dL do 81,1±21,5 μg/dL, p=0,0262. Zwiększając grupę badaną do 20 osób i włączając osoby, które nie były brane pod uwagę w analizie po ekspozycji na 30 m, także widać spadek stężenia – 102,0±32,1 μg/dL vs. 80,3±22,8 μg/dL, p=0,0005. Nie wykazano różnicy w stężeniu żelaza po ekspozycjach na 30 i 60 m (p=0,1481, porównując ekspozycja do ekspozycji). Z uwagi jednak na fakt, że stężenie żelaza w surowicy jest parametrem bardzo zmiennym, a osoby badane nie zawsze były na czczo, rozpatrywanie stężenia żelaza poza zmianą w czasie ekspozycji hiperbarycznych wydaje się dla tej metodyki badań niezasadne, wymaga jednak podjęcia dalszych badań.



Rysunek 33. Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m).



Rysunek 34. Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), grupa

zwiększona.

		Warto	ść ±SD		
Parametr	grupy pod	stawowe*	grupy po roz	p*/p**	
	przed ekspozycją	po ekspozycji	przed ekspozycją	po ekspozycji	
SOD	2941,4	3266,4	2833,9	3181,4	0,0033/
[U/g Hb]	±286,8	±369,4	±241,9	±302,8	<0,0001
CAT [IU/g Hb]	28,2±1,8	27,3±2,4	21,1±5,5	22,3±5,3	<mark>0,0329</mark> / 0,4516
GPx [U/g Hb]	14,8±1,4	16,9±2,4	17,0±3,0	17,6±3,2	0,0044/ 0,0167
MDA [µmol/g Hb]	0,25±0,03	0,31±0,07	0,27±0,05	0,32±0,05	0,0033/ 0,0000
HSP70 [ng/mL]	0,61±0,55	0,44±0,25	1,33±1,18	0,81±1,28	0,4236/ 0,0504
HSP90 [ng/mL]	0,37±0,08	0,62±0,32	0,34±0,08	0,50±0,27	0,0166/ 0,0022
eNOS [pg/mL]	49,2±6,5	54,9±11,1	53,8±10,7	61,0±14,4	0,0367/ 0,0043
iNOS [pg/mL]	130,5±20,1	129±21,5	-	-	0,9518/ -
Żelazo [µg/dL]	98,2±30,8	81,1±21,5	102,0±32,1	80,3±22,8	0,0262/ 0,0005

Tabela	13.	Podsumowanie	wartości	oznaczanych	parametrów	i istotności	statystycznej	(ekspozycje 60
m).								

5.3. Różnice w wartościach początkowych oznaczanych parametrów, mogące wynikać z następujących po sobie ekspozycji

W przypadku HSP70, HSP90 i stężenia żelaza nie wykazano istotnych statystycznie różnic w początkowych stężeniach białek w surowicy przed ekspozycjami 30 i 60 m. Zauważono jednak istotną różnicę w aktywności SOD i stężeniu syntazy tlenku azotu eNOS. Przed ekspozycjami w komorze hiperbarycznej imitującymi nurkowania na 30 m średnia początkowa aktywność SOD wynosiła 2548,3±202,8 U/g Hb, przed 60 m: 2941,4±286,8 U/g Hb, p=0,0015 (aktywność była wyższa przed ekspozycjami na 60 m w stosunku do mających miejsce 24 godziny wcześniej na 30 m). Stężenie eNOS kształtowało się następująco: przed ekspozycją 30 m: 0,06±0,01 pg/mL, przed ekspozycjami na 60 m: 0,05±0,01 pg/mL, p=0,0210 (spadek stężenia). Różnice przed kolejnymi ekspozycjami wykazywał też parametr MDA. Przed ekspozycją 30 m średnie początkowe stężenie MDA wynosiło 0,31±0,05 µmol/g Hb, natomiast przed 60 m 0,25±0,03 µmol/g Hb, p=0,0106 (spadek stężenia). Różnica w aktywności CAT 26,0±2,9

IU/g Hb vs. 28,2±1,8 IU/g Hb nie była istotna (p=0,0605), choć zauważalna jest większa aktywność enzymu przed ekspozycjami 60 m. Początkowe aktywności GPx nie różniły się między sobą.

5.4. Ekspozycje hiperbaryczne 60 m – dekompresja powietrzna

Podkreślić należy, że podczas ekspozycji hiperbarycznych do 60 m z dekompresją powietrzną, mniejszym ciśnieniom parcjalnym tlenu podczas dekompresji, towarzyszyło znaczne przedłużenie działania hiperbarii w związku z przedłużeniem czasu samej ekspozycji.

5.4.1. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Aktywność SOD w grupie osób poddanych ekspozycji hiperbarycznej 60 m z dekompresją powietrzną uległa istotnemu zwiększeniu z 2669,2±126,2 U/g Hb do 2971,9±104,8 U/g Hb, p=0,0015.



Rysunek 35. Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna.

5.4.2. Katalaza (CAT)

Aktywność katalazy po ekspozycji 60 m z dekompresją powietrzną uległa zwiększeniu. Przed ekspozycją wynosiła 25,6±2,98 IU/g Hb, po ekspozycji 29,6±2,51 IU/g Hb, p=0,0015.



Rysunek 36. Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna.

5.4.3. Peroksydaza glutationowa (GPx)

Aktywność GPx po ekspozycji 60 m w tej grupie Nie uległa zmianie. Przed ekspozycją wynosiła 15,3±3,2 U/g Hb, po ekspozycji 15,2±2,8 U/g Hb, p=0,8139.



Rysunek 37. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna.

5.4.4. Dialdehyd malonowy (MDA)

Stężenie MDA istotnie wzrosło z 0,25±0,03 μ mol/g Hb do 0,29±0,04 μ mol/g Hb, p=0,0015.



Rysunek 38. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna.

5.4.5. Wskaźnik antyoksydacyjny

Wskaźnik antyoksydacyjny po ekspozycjach z dekompresją powietrzną nie uległ zmianie. Początkowo wynosił średnio 65,7±7,0, po ekspozycji 66,6±4,6, p=0,4216.

5.4.6. Syntaza tlenku azotu iNOS

Stężenie białka syntazy iNOS przed nurkowaniem 60 m wynosiło 256,4±170,8 pg/mL, po 317,3±108,5 pg/mL, p=0,5337. Analizując zmiany stężenia iNOS całościowo (n=34) również nie obserwuje się istotnych zmian.



Rysunek 39. Zmiana stężenia iNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna.

abela 14. Porównanie parametrów	po ekspozycjach v	w grupie dekompresji	powietrznej i tlenowej
--	-------------------	----------------------	------------------------

Parametr	Warto	p*/p**	
	dekompresja powietrzna*		
SOD [U/g Hb]	2669,2±126,2	2833,9 ±241,9	<0,0001
CAT [IU/g Hb]	29,6±2,51	21,1±5,5	<0,0001
GPx [U/g Hb]	15,2±2,8	17,0±3,0	0,0725
MDA [μmol/g Hb]	0,29±0,04	0,27±0,05	0,2620
wsk. antyoks.	66,6±4,6	73,0±10,4	0,0003
iNOS [pg/mL]	317,3±108,5	129±21,5	0,0025

5.5. Porównanie aktywności stężenia białka iNOS w grupie dekompresji powietrznej i tlenowej

Pomimo, iż nie udało się wykazać zmian w stężeniu białka iNOS przed i po ekspozycjach symulujących nurkowania do głębokości 60 m, analiza wskazuje na istotną różnicę pomiędzy końcowym stężeniem iNOS w grupie z dekompresją tlenową i powietrzną. Osoby z grupy poddanej dekompresji tlenowej mają niższe stężenie iNOS niż w grupie z dekompresją powietrzną – odpowiednio 129±21,5 pg/mL i 152,5±79,5 pg/mL, p=0,0017. Spostrzeżenie to wymaga dalszych analiz w przyszłości.



Rysunek 40. Porównanie stężenia iNOS w grupie osób poddanych dekompresji tlenowej i powietrznej (60 m).

5.6. Analiza korelacyjna

Wyniki analizy zależności pomiędzy oznaczanymi parametrami w erytrocytach lub surowicy krwi przedstawiono w tabelach. Istotne statystycznie korelacje (z podaniem współczynników korelacji liniowej Pearsona) wyróżniono czcionką pogrubioną i kolorem czerwonym. Brak korelacji oznacza brak zależności liniowej. Próba określenia zachodzących zależności nieliniowych na małej grupie badanej obarczona jest znacznie większym błędem.

5.6.1. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 30 m.

Wykazano istotne statystycznie zależności pomiędzy aktywnością SOD po i aktywnością CAT przed, a stężeniem HSP70 po i HSP90 przed nurkowaniem symulowanym, a także pomiędzy aktywnością GPx przed i po a stężeniem HSP90 przed pobytem w komorze hiperbarycznej. Znamienną statystycznie zależność udało się również wykazać pomiędzy stężeniem MDA po i stężeniem HSP90 przed ekspozycją.

	SOD przed [U/g Hb]	SOD po [U/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	GPx przed [U/g Hb]	GPx po [U/g Hb]	MDA przed [µmol/g Hb]	MDA po [µmol/g Hb]	Żelazo przed [µg/dL]	Żelazo po [µg/dL]
HSP70										
przed [ng/mL]	-0,08	-0,12	-0,02	0,45	0,39	0,24	0,17	0,27	-0,04	0,13
HSP70	0.04	0.47	• • • •	0.00			0.00	0.47	0.47	0.50
po [ng/mL]	0,31	0,17	-0,61	-0,03	0,22	0,23	-0,23	0,17	0,47	0,53
HSP90										
przed	-0,57	-0,58	0,19	-0,04	-0,79	-0,81	-0,51	-0,68	0,02	-0,22
[ng/mL]										
HSP90										
ро	-0,19	-0,09	-0,14	0,05	0,06	-0,08	0,09	0,03	-0,30	-0,10
[ng/mL]										

Tabela 15. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek szoku cieplnego w surowicy – 30 m (wsp. korelacji Pearsona).

Aktywność GPx koreluje ujemnie ze stężeniem HSP90 przed i po ekspozycji hiperbarycznej. Aktywność GPx przed ekspozycjami w komorze hiperbarycznej była mniejsza u osób, u których stwierdzano wyższe stężenia białka HSP90.



Rysunek 41. Zależność pomiędzy aktywnością GPx i stężeniem HSP90 przed ekspozycją hiperbaryczną (30 m).

Podobnie sytuacja wygląda po odbyciu nurkowań symulowanych. Mniejszą aktywność GPx obserwuje się u osób z początkowo wyższym stężeniem HSP90 w surowicy krwi.



Rysunek 42. Zależność pomiędzy aktywnością GPx po ekspozycji i stężeniem HSP90 przed ekspozycją hiperbaryczną (30 m).

W przypadku MDA obserwuje się podobną zależność jak opisane wcześniej. Im wyższe stężenie MDA po ekspozycji, tym mniejsze stężenie białka HSP90 przed.



Rysunek 43. Zależność pomiędzy stężeniem MDA po ekspozycji i stężeniem HSP90 przed ekspozycją hiperbaryczną (30 m).

Oprócz zależności przedstawionych w tabeli, wykazano ciekawą, istotną korelację (r=0,89, p<0,05) pomiędzy zmianą aktywności katalazy (wyrażonej w wartościach procentowych) a stężeniem HSP70 w surowicy po ekspozycji. Im większa zmiana aktywności CAT (im większy wzrost po ekspozycji hiperbarycznej), tym większe końcowe stężenie HSP70 (i tym mniejszy obserwowany spadek stężenia HSP70). Ze względu jednak na małą liczebność grupy, obserwacje te należy interpretować krytycznie i z daleko idącą ostrożnością.



Rysunek 44. Zależność pomiędzy zmianą procentową aktywności CAT i stężeniem HSP70 po ekspozycji hiperbarycznej (30 m).

5.6.2. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 30 m.

Nie wykazano istotnych korelacji między wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem białek szoku cieplnego po ekspozycjach 30 m.

Tabela 16. Zależności pomiędzy wartością wskaźnika antyoksydacyjnego i stężeniem białek szokucieplnego w surowicy – 30 m (wsp. korelacji Pearsona).

	Wskaźnik przed	Wskaźnik po
HSP70 przed [ng/mL]	-0,22	-0,36
HSP70 po [ng/mL]	0,40	-0,02
HSP90 przed [ng/mL]	-0,05	0,03
HSP90 po [ng/mL]	-0,08	-0,04

5.6.3. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem żelaza – ekspozycje 30 m.

Nie wykazano istotnych korelacji między wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem żelaza po ekspozycjach 30 m.

Tabela 17. Zależności pomiędzy wartością wskaźnika antyoksydacyjnego i stężeniem żelaza w surowicy –30 m (wsp. korelacji Pearsona).

	Wskaźnik przed	Wskaźnik po
Żelazo przed [µg/mL]	0,34	0,18
Żelazo po [µg/mL]	0,00	0,00

5.6.4. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 60 m.

Tabela 18. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek szoku cieplnegow surowicy – 60 m (wsp. korelacji Pearsona).

	SOD przed [U/g Hb]	SOD po [U/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	GPx przed [U/g Hb]	GPx po [U/g Hb]	MDA przed [µmol/g Hb]	MDA po [µmol/g Hb]	Żelazo przed [μg/dL]	Żelazo po [μg/dL]
HSP70 przed [ng/mL]	0,11	0,19	-0,59	-0,36	0,43	0,30	0,37	0,36	-0,21	-0,15
HSP70 po [ng/mL]	-0,08	-0,17	-0,08	-0,05	0,35	0,13	-0,14	-0,10	0,01	-0,22
HSP90 przed [ng/mL]	-0,25	-0,24	-0,16	0,17	0,33	0,25	-0,19	-0,19	-0,40	-0,19
HSP90 po [ng/mL]	0,16	0,04	0,46	0,43	-0,26	-0,03	-0,33	-0,34	-0,25	-0,11

Wykazano istotną zależność pomiędzy aktywnością CAT i stężeniem HSP70 przed ekspozycją hiperbaryczną. Interpretacja zależności wskazuje, że wraz ze wzrostem

aktywności CAT (a więc wraz z nasileniem stresu oksydacyjnego) maleje stężenie HSP70 - aktywność CAT jest wyższa u osób z niższym stężeniem HSP70.



Rysunek 45. Zależność pomiędzy aktywnością CAT i stężeniem HSP70 przed ekspozycją hiperbaryczną (60 m).

Podobny związek wykazano pomiędzy aktywnością CAT przed ekspozycją i stężeniem HSP90 po ekspozycji. Może to potwierdzać obserwację, iż po nurkowaniach symulowanych w komorze hiperbarycznej wzrasta stężenie HSP90 (nasila się także stres oksydacyjny). Przedstawiona tutaj zależność pokazuje, że wraz ze wzrostem wyjściowej aktywności CAT w erytrocytach, rośnie stężenie białka HSP90 w surowicy krwi po ekspozycjach.



m).

5.6.5. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem białek szoku cieplnego – ekspozycje 60 m.

Nie wykazano istotnych korelacji między wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem białek szoku cieplnego po ekspozycjach na 60 m.

Tabela 19. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek szoku cieplnego wsurowicy – 60 m (wsp. korelacji Pearsona).

	Wskaźnik przed	Wskaźnik po
HSP70 przed [ng/mL]	0,00	-0,05
HSP70 po [ng/mL]	0,32	0,30
HSP90 przed [ng/mL]	-0,21	-0,01
HSP90 po [ng/mL]	0,03	0,06

5.6.6. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem żelaza – ekspozycje 60 m.

Nie wykazano istotnych korelacji między wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem żelaza po ekspozycjach na 60 m.

wsp. korelacji Pearsona).Wskaźnik przedWskaźnik poŻelazo przed
[µg/mL]-0,15-0,25Żelazo po0.120.10

-0,12

[µg/mL]

-0,18

Tabela 20. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem żelaza w surowicy – 60m (wsp. korelacji Pearsona).

5.6.7. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem syntazy tlenku azotu eNOS – ekspozycje 30 m.

Nie wykazano znamiennych statystycznie zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego a stężeniem eNOS w grupie osób wykonujących nurkowania symulowane do głębokości 30 m.

Tabela 21. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem eNOS w surowicy – 30 m
(wsp. korelacji Pearsona).

	SOD przed [U/g Hb]	SOD po [U/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	GPx przed [U/g Hb]	GPx po [U/g Hb]	MDA przed [µmol/g Hb]	MDA po [µmol/g Hb]	Żelazo przed [μg/dL]	Żelazo po [μg/dL]
eNOS przed [pg/mL]	-0,11	-0,21	-0,16	0,36	0,10	-0,04	0,19	0,21	-0,23	-0,04
eNOS po [pg/mL]	-0,25	-0,44	-0,49	0,06	0,08	0,13	-0,07	0,21	0,01	0,03

5.6.8. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem syntazy tlenku azotu eNOS – ekspozycje 30 m.

Nie wykazano istotnych korelacji między wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem eNOS po ekspozycjach na 30 m.

wsp. korelacji realsolita).Wskaźnik przedWskaźnik poeNOS przed
[pg/mL]-0,04-0,27eNOS po
[pg/mL]0,03-0,39

Tabela 22. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem eNOS w surowicy – 30 m(wsp. korelacji Pearsona).

5.6.9. Analiza korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem syntazy tlenku azotu eNOS i iNOS – ekspozycje 60 m.

Nie wykazano znamiennych statystycznie zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego a stężeniem eNOS i iNOS w grupie osób wykonujących nurkowania symulowane do głębokości 60 m.

Tabela 23. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem eNOS i iNOS w surowicy
– 60 m (wsp. korelacji Pearsona).

	SOD przed [U/g Hb]	SOD po [U/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	GPx przed [U/g Hb]	GPx po [U/g Hb]	MDA przed [µmol/g Hb]	MDA po [µmol/g Hb]	Żelazo przed [µg/dL]	Żelazo po [μg/dL]
eNOS przed [pg/mL]	-0,31	-0,15	-0,35	-0,49	0,23	0,12	0,15	0,42	-0,05	-0,15
eNOS po [pg/mL]	-0,36	-0,20	-0,38	-0,49	0,24	0,25	-0,10	0,38	0,04	0,02
iNOS przed [pg/mL]	0,25	0,12	0,01	-0,06	0,00	-0,09	0,23	0,06	-	-
iNOS po [pg/mL]	0,36	0,29	-0,06	-0,29	-0,16	-0,20	0,06	0,11	-	-

Nie wykazano również znamiennych statystycznie zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego a stężeniem iNOS w grupie osób wykonujących nurkowania symulowane do głębokości 60 m z dekompresją powietrzną.

	SOD przed [U/g Hb]	SOD po [U/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	CAT przed [IU/g Hb]	GPx przed [U/g Hb]	GPx po [U/g Hb]	MDA przed [µmol/g Hb]	MDA po [µmol/g Hb]	Żelazo przed [μg/dL]	Żelazo po [μg/dL]
iNOS przed [pg/mL]	-0,14	-0,53	0,02	-0,04	-0,14	-0,01	-0,04	0,13	-	-
iNOS po [pg/mL]	0,04	-0,12	0,21	0,03	-0,36	-0,30	0,08	0,31	-	-

Tabela 24. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem i iNOS w surowicy – dekompresja powietrzna (wsp. korelacji Pearsona).

5.6.10. Analiza korelacji pomiędzy wskaźnikiem antyoksydacyjnym i stężeniem syntazy tlenku azotu eNOS i iNOS – ekspozycje 60 m.

Nie wykazano znamiennych statystycznie zależności pomiędzy wartością wskaźnika antyoksydacyjnego a stężeniem eNOS i iNOS w grupie osób wykonujących nurkowania symulowane do głębokości 60 m.

	Wskaźnik przed	Wskaźnik po
eNOS przed [pg/mL]	-0,10	-0,01
eNOS po [pg/mL]	-0,01	-0,13
iNOS przed [pg/mL]	0,03	0,29
iNOS po [pg/mL]	0,03	0,35

Tabela 25. Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i eNOS i iNOS w surowicy – 60 m (wsp. korelacji Pearsona).

5.6.11. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem eNOS a białkami HSP70 i HSP90 - ekspozycje 30 m.

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem eNOS i iNOS w surowicy a stężeniem białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90 u nurków odbywających nurkowania symulowane do głębokości 30 m. Wszystkie zależności z p>0,05.

Tabela 26. Zależności pomiędzy stężeniem eNOS i białkami HSP70 i HSP90 w surowicy – ekspozycje 30 m(wsp. korelacji Pearsona).

	HSP70 przed [ng/mL]	HSP70 po [ng/mL]	HSP90 przed [ng/mL]	HSP90 po [ng/mL]	
eNOS przed [pg/mL]	0,35	0,36	0,22	0,44	
eNOS po [pg/mL]	0,50	0,24	0,12	0,14	

5.6.12. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem eNOS a białkami HSP70 i HSP90 - ekspozycje 60 m.

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem eNOS i iNOS w surowicy a stężeniem białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90 u nurków odbywających nurkowania symulowane do głębokości 60 m. Wszystkie zależności z p>0,05.

Tabela 27. Zależności pomiędzy stężeniem eNOS i białkami HSP70 i HSP90 w surowicy – ekspozycje 60 m(wsp. korelacji Pearsona).

	HSP70 przed [ng/mL]	HSP70 po [ng/mL]	HSP90 przed [ng/mL]	HSP90 po [ng/mL]
eNOS przed [pg/mL]	-0,15	-0,05	-0,13	-0,13
eNOS po [pg/mL]	-0,15	-0,06	-0,11	-0,15
iNOS przed [pg/mL]	-0,28	-0,21	-	-
iNOS po [pg/mL]	-0,25	-0,19	-	-

6. Dyskusja

Każdego dnia ukazują się w piśmiennictwie naukowym setki prac na temat stresu oksydacyjnego i białek szoku cieplnego. O ile środowisko naukowe wydaje się być zgodne w opinii, że ekspozycje hiperbaryczne nasilają stres oksydacyjny, o tyle podczas dokładnej analizy publikacji, dość często można spotkać informacje sprzeczne.

Białka szoku cieplnego stanowią ogromną część wszystkich białek organizmów żywych, a ich struktura nie podlega w zasadzie żadnym zmianom w toku ewolucji. W piśmiennictwie podkreśla się niezwykle doniosłą rolę tych cząsteczek w adaptacji organizmu do warunków otoczenia. Zaangażowane są w setki biochemicznych szlaków komórkowych.

Biorąc pod uwagę nie tylko negatywną rolę stresu oksydacyjnego w wywoływaniu uszkodzeń wielu składników komórkowych, ale także ogromny potencjał tkwiący w reaktywnych formach tlenu i ich roli w sygnalizacji komórkowej, a także zaangażowanie białek szoku cieplnego w liczne procesy życiowe postanowiono sprawdzić, czy nurkowanie w warunkach symulowanych w komorze hiperbarycznej (stosowane m.in. w celach treningowych) ma wpływa na stres oksydacyjny i ekspresję białek szoku cieplnego, a także czy istnieje coraz częściej postulowana zależność pomiędzy stresem oksydacyjnym i ekspresją HSP, które jak się wspomina, mogą wykazywać działanie antyoksydacyjne. Nieliczne publikowane doniesienia wskazują, że istnieje także bardzo silna zależność funkcji syntazy tlenku azotu od białek szoku cieplnego. Śródbłonek naczyń krwionośnych i cząsteczka NO odgrywa ogromną rolę w patofizjologii nurkowania.

Ze względu na dużą różnorodność protokołów prowadzonych na świecie badań i używanych technik badawczych w obszarze hiperbarii i nurkowań symulowanych, jednoznaczne porównanie wyników niniejszej pracy jest w zasadzie wykluczone, o czym wspomniano już wcześniej. Niemożliwym jest odnalezienie dwóch publikacji opisujących identyczne warunki nurkowań symulowanych (ciśnienie, głębokość, profil dekompresji itp.) w aspekcie przytaczanych tu oznaczeń biochemicznych (przeszukano bazy PubMed, Cochrane, Google Scholar). Nie ma w tym jednak nic dziwnego, gdyż w każdym kraju na świecie istnieją wewnętrzne procedury nurkowań, dedykowane im tabele dekompresyjne itd. Wedle tych procedur, z użyciem własnych tabel dekompresyjnych prowadzone są nurkowania robocze jak i eksperymentalne. Z tego względu dyskusja otrzymanych wyników została przeprowadzona w oparciu o podobne badania (lub założenia i przyczynowo-skutkową interpretację) z jednoczesnym uwzględnieniem nowych danych, jakie wnosi do wiedzy naukowej przedstawiona praca.

6.1. Enzymy antyoksydacyjne

Wpływ stresu oksydacyjnego na aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest ogólnie znany, jednak w przypadku nurków i ekspozycji hiperbarycznych wiele doniesień naukowych jest sprzecznych i wynika, jak wskazano powyżej, z bardzo różnych warunków przeprowadzania doświadczeń. Znaczna część autorów donosi o aktywacji układów antyoksydacyjnych i wzroście aktywności enzymów, część wykazuje spadek, a jeszcze inni badacze nie zauważają żadnych zmian [60, 66, 153].

Analiza parametrów stresu oksydacyjnego w niniejszym badaniu dała następujące rezultaty: wzrost aktywności SOD i stężenia MDA po ekspozycjach na 30 i 60 m, wzrost aktywności CAT po ekspozycjach 60 m, przy czym po włączeniu do analizy osób spoza grupy podstawowej odbywających ekspozycje na 30 i 60 m utrzymywał się trend wzrostowy bez istotności statystycznej. Aktywność GPx w grupie 30 m wydaje się wykazywać niewielki spadek, obserwowany na granicy istotności statystycznej, z kolei po ekspozycjach 60 m – istotny wzrost.

Wyniki badania potwierdzają, obserwowane przez innych autorów (w innych warunkach), nasilenie stresu oksydacyjnego wyrażonego w aktywacji układów antyoksydacyjnych (szczególnie głównego enzymu antyoksydacyjnego – SOD), która jest prawdopodobnie jednak zmienna w zależności od warunków eksperymentu, statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego osób badanych, treningu, adaptacji do specyficznych warunków środowiskowych. Wzrost aktywności ww. enzymów może być wyrazem kompensacji zwiększonego wytwarzania RFT. Po ekspozycjach 30 i 60 m wzrósł istotnie także wskaźnik antyoksydacyjny. Aktywność SOD była zdecydowanie wyższa po ekspozycjach 60 m, co wskazuje na większe nasilenie stresu oksydacyjnego

w porównaniu z ekspozycjami 30 m, spowodowane prawdopodobnie dłuższym czasem przebywania w komorze hiperbarycznej i wyższym ciśnieniem.

Kozakiewicz M. i wsp. [71] w grupie 10 mężczyzn, którzy zostali poddani ekspozycji hiperbarycznej symulującej warunki ciśnieniowe panujące podczas nurkowania na głębokość 30 m stwierdzili znamienny wzrost aktywności SOD i stężenia MDA po ekspozycji, co wskazuje na nasilenie stresu oksydacyjnego. W badaniu na większej grupie 26 kobiet i 49 mężczyzn Ci sami autorzy wykazali w grupie mężczyzn istotny wzrost aktywności SOD i MDA, bez zmian w aktywności CAT i GPx. W grupie kobiet zauważono wzrost aktywności SOD, CAT, GPx. Stężenie MDA wzrosło istotnie po ekspozycjach 60 m [64]. Ten sam autor w innym badaniu wykazał, że nurkowie mają niższą wyjściową aktywność SOD niż osoby nie nurkujące i nie poddawane działaniu wysokiego ciśnienia [154]. Może być to efektem adaptacji organizmu do specyficznych warunków lub, co bardziej prawdopodobne dysfunkcją bariery ochronnej spowodowanej np. oddziaływaniem wysokiego ciśnienia na struktury komórkowe.

Włodarski A. i wsp. nie wykazali żadnych istotnych zmian w aktywności CAT i GPx u osób nurkujących na głębokość 9 m w wodach otwartych z wykorzystaniem powietrza jako czynnika oddechowego [60].

Körpinar i wsp. stwierdzili znamienny statystycznie spadek aktywności SOD i stężenia GSH, a także wzrost stężenia MDA u szczurów poddanych działaniu HBO (60 min, 2,0 lub 2,4 ATA w odstępach przez 24 godziny lub 15 sesji – różne grupy). Spadek GSH był obserwowany tylko przy 2.4 ATA, a u części szczurów obserwowano wzrost aktywności SOD [155]. Nie można jednak z całą pewnością uznać, że modele zwierzęce są wystarczająco podobne do modelu ludzkiego, a uzyskane wyniki mogą być identycznie interpretowane. Metabolizm zwierząt jest odmienny od metabolizmu organizmu ludzkiego. W tym aspekcie tym bardziej wydaje się nieuzasadnione bezkrytyczne spojrzenie na wyniki w odniesieniu do ludzi, szczególnie mając na uwadze warunki wysoce specyficzne.

Taylor i wsp. [115] wykazali w swojej pracy wzrost w surowicy krwi TBARS (wyrażone jako ekwiwalent MDA) u osób poddanych działaniu powietrza pod zwiększonym ciśnieniem i wyraźny spadek w grupie osób poddanych działaniu tlenu hiperbarycznego. Obserwacja ta stoi w sprzeczności do wyników otrzymanych

w niniejszej pracy, gdzie stężenie MDA, zarówno po ekspozycjach 30 jak i 60 m wzrosło. Fakt ten jest jednak trudny (a wręcz niemożliwy) do porównania ze względu na inne warunki ekspozycji i różne doświadczenie i przygotowanie osób biorących udział w badaniu. Duże znaczenie mogą mieć tutaj uwarunkowania osobnicze, trening i status antyoksydacyjny. Istotne są także różnice metodyczne prowadzonych doświadczeń. W cytowanej pracy nurkowie byli poddawani ekspozycji symulującej głębokość 18 m, a łączny jej czas wynosił 78 min. Pierwsze próbki krwi zostały pobrane 42 min. po zakończeniu ekspozycji, a kolejne po upływie niespełna 5 godz.

Radojevic-Popovic i wsp. oznaczali aktywność SOD, CAT i stężenie TBARS bezpośrednio po nurkowaniach rzeczywistych (doświadczeni nurkowie policyjni) do 30 m z powietrzem jako czynnikiem oddechowym. Zaobserwowali wzrost stężenia TBARS bez istotnych zmian w aktywności enzymów SOD i CAT, zaznaczając, że nurkowanie wpływa tylko nieznacznie na status redox [156].

Alcaraz-Garcia i wsp. wykazali spadek aktywności GPx po serii nurkowań na 7 m w grupie u nurkujących zawodowo żołnierzy (oddychających w czasie nurkowania 100% tlenem), tłumacząc to dobrym stanem zdrowia i zdolnością organizmu do aklimatyzacji [67].

Spadek aktywności SOD i brak wzrostu TBARS bezpośrednio po nurkowaniach rzeczywistych w wodzie słodkiej o temp. 13°C do głębokości 6,2 m (czynnik oddechowy: powietrze) zaobserwowała Mila-Kierzenkowska i wsp. [66]

Jeszcze inne i diametralnie różniące się od siebie wyniki przedstawiają autorzy prac, gdzie parametry stresu oksydacyjnego oznaczane były u pacjentów poddawanych leczeniu w komorze hiperbarycznej.

Paprocki J. i wsp. badali zmiany aktywności SOD, CAT, GPx i TBARS u osób z utratą słuchu leczonych tlenem hiperbarycznym. Wykazali spadek aktywności SOD i CAT, wzrost stężenia TBARS i wzrost aktywności GPx po leczeniu [157].

Również logicznym wydaje się również fakt, że u osób poddanych dekompresji tlenowej aktywność SOD była wyższa, co wiązało się z wyższym wskaźnikiem antyoksydacyjnym, niż w przypadku dekompresji powietrznej. U tych osób obserwuje się jednak niższą aktywność CAT.

Wzrost aktywności SOD, CAT, GPx i stosunku SOD do (CAT+GPx) przy jednoczesnym wzroście stężenia MDA wskazuje jednoznacznie na nasilenie stresu oksydacyjnego i wzrost peroksydacji przede wszystkim lipidów. Sugeruje to, że u badanych osób proces neutralizowania wolnych rodników nie zachodził dostatecznie szybko lub ich wytwarzanie przekraczało zdolności antyoksydacyjne.

6.2. Stężenie żelaza

Stężenie żelaza nie jest parametrem stresu oksydacyjnego, jednak jony żelaza wywierają ogromny wpływ na stres oksydacyjny. W związku z tym, a także brakiem doniesień na temat wpływu hiperbarii na równowagę żelaza, postanowiono oznaczyć stężenie żelaza całkowitego w surowicy krwi nurków.

Zaobserwowano znaczny spadek stężenia żelaza po nurkowaniach symulowanych na głębokość 30 i 60 m, co wydaje się mieć związek z nasileniem stresu oksydacyjnego, jednak spadek stężenia jest duży i trudno jest wnioskować, że wywołany jest on tylko i wyłącznie przemianą w reakcji Fentona (ilość powstających rodników hydroksylowych byłaby wysoce toksyczna, a nawet zabójcza dla każdych komórek). Nie ma jednak badań, których przedmiotem byłby wpływ nurkowań na homeostazę żelaza. Jedyne dwie prace jakie udało się odnaleźć, wskazują na wzrost stężenia ferrytyny i żelaza w surowicy krwi po nurkowaniach saturowanych [54, 158]. Jest to sprzeczne z poczynionymi tutaj obserwacjami, jednak trudno jest porównywać wielodniowe i dłuższe nurkowania saturowane z wykorzystaniem mieszanin oddechowych do nurkowań standardowych, krótkotrwałych z powietrzem jako czynnikiem oddechowym i powietrzem lub tlenem w czasie dekompresji. Pomimo, że stres oksydacyjny może istotnie wpływać no homeostazę żelaza m.in. poprzez indukcję transkrypcji genu dla ferrytyny i nasilenie jego ekspresji, zwiększenie stężenia tego białka w surowicy i intensywniejsze wiązanie jonów żelaza (zastosowana metoda oznaczania żelaza całkowitego pozwala jedynie na uwolnienie jonów z transferryny), to efekt ten jest charakterystyczny dla stresu oksydacyjnego trwającego znacznie dłużej niż 1 godzine (przyjmuje się w niektórych publikacjach >6 godzin), a krew pobierana była od osób badanych bezpośrednio po ekspozycjach, tj. max. po około 3,9 godziny spędzonej w komorze hiperbarycznej (czas najdłuższej dekompresji + 30 min). Tym samym czas potrzebny na wywołanie takiego efektu wydaje się być zbyt krótki.

Jedną z hipotez może być też wzmożona biosynteza enzymów antyoksydacyjnych – białek, których funkcję i aktywność warunkują atomy żelaza wbudowane w ich cząsteczki. Wypadkowa tego procesu, jak i reakcji Fentona (i ew. wzrostu ekspresji białek wiążących jony żelaza) może dać w efekcie zmniejszenie stężenia żelaza w surowicy.

Być może podczas nurkowań saturowanych zachodzi proces adaptacji i po początkowym spadku stężenia żelaza, następuje jego wzrost do wartości wyższych niż wyjściowe. Mogłoby to tłumaczyć rozbieżność wyników cytowanych powyżej prac z wynikami niniejszej pracy i z pewnością wymaga dalszych badań.

6.3. Białka szoku cieplnego

Białka szoku cieplnego należą do białek syntetyzowanych przez komórki w odpowiedzi na czynniki stresowe, jak np.: wysoką i niską temperature, toksyny (alkohole, nikotyna, metale ciężkie), promieniowanie UV, infekcje, stan zapalny, hipoksję, hiperoksję i wiele innych [77]. Dowiedziono istotnego związku pomiędzy ekspresją białek szoku cieplnego a stresem oksydacyjnym, przy czym zarówno stres jak i status antyoksydacyjny mogą wpływać na ekspresję HSP [84, 103]. Nie zostało jednak wyjaśnione, w jakim stopniu HSP odgrywają pozytywną rolę w stresie oksydacyjnym i nitrozacyjnym i w komórkowych uszkodzeniach oksydacyjnych, a także w jaki sposób mogą wpływać na rozwój stresu oksydacyjnego, pełniąc drugorzędną rolę w stosunku do wysoce specyficznych zmiataczy wolnych rodników i układów antyoksydacyjnych [84]. Sugeruje się, że stres oksydacyjny i regulacja redox może odgrywać decydującą rolę w tolerancji cieplnej organizmu, co może częściowo tłumaczyć zmiany ekspresji HSP w stresie oksydacyjnym [159, 160]. Stres cieplny prowadzi do akumulacji RFT, indukując uszkodzenia oksydacyjne; to z kolei aktywuje ekspresję HSP, które aktywują wtórnie układy zmiataczy RFT [161]. HSP są głównie białkami wewnątrzkomórkowymi. Ich rola w przestrzeni pozakomórkowej nie została w pełni wyjaśniona, choć wydaje się, że uczestniczą w licznych procesach biologicznych [162, 163]. Konstytucyjnie ekspresjonowane HSP zapewniają w komórce równowagę oksydacyjno-redukcyjną i m.in. integralność mitochondriów, a także stanowią sensor potencjału redox [164]. HSP70 wspomagają inne białka z uszkodzeniami oksydacyjnymi, przyłączając się do fragmentów hydrofobowych, promując ponowne fałdowanie białek i chronią je przed agregacją [165]. W stresie nitrozacyjnym, reakcja NO z nadtlenkiem prowadzi do powstania niezwykle reaktywnego nadtlenoazotynu i masywnej produkcji RFT [166]. Komórki wystawione na działanie stresu nitrozacyjnego w normalnej temperaturze również wykazują zwiększoną ekspresję HSP [166].

Mając na uwadze doniosłą, jak się wydaje, rolę HSP w rozwoju stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego, postanowiono w kolejnej części pracy określić wpływ hiperbarii i stresu oksydacyjnego na stężenie białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90 w surowicy krwi nurków. Są to dwie, najlepiej poznane rodziny HSP, przy czym HSP90 w warunkach hiperbarii oznaczane było dotąd niezwykle rzadko.

W pracy wykazano spadek stężenia HSP70 w surowicy krwi osób po ekspozycji hiperbarycznej imitującej nurkowanie do głębokości 30 m (spadek z 0,55±0,28 ng/mL do 0,44±0,34 ng/mL, p=0,0262). Trend spadkowy został zaobserwowany także po nurkowaniach symulowanych do głębokości 60 m (przed 1,33±1,18 ng/mL, po 0,81±1,28 ng/mL, p=0,0504). Obserwacja ta stoi w sprzeczności z wykazywanym na nielicznych modelach komórkowych i tkankowych wzrostem ekspresji HSP70 w warunkach hiperbarii tlenowej.

Lee i wsp. oceniali stężenie HSP70/72 w surowicy krwi przed i 2 godziny po nurkowaniach symulowanych w komorze hiperbarycznej (do max. głębokości 87 m) u 19 zdrowych nurków, zawodowych żołnierzy [110]. Czas trwania tych ekspozycji (w związku z większą głębokością) był dłuższy niż omawianych w niniejszej pracy. Badacze (oceniając grupę całościowo) wykazali nieistotny wzrost stężenia HSP70/72 po nurkowaniach (p=0,07). Co ciekawe, znamienny wzrost występował jedynie u osób mających mniejsze doświadczenie w głębokich nurkowaniach <36 miesięcy. W grupie osób doświadczonych (>60 miesięcy) nie obserwowano zwiększonego stężenia HSP70/72, co zdaniem autora niniejszej pracy może być stosunkowo silnym dowodem aklimatyzacji organizmu do warunków zwiększonego ciśnienia. Wydaje się więc, że wpływ na reakcję białek szoku cieplnego ma trening nurkowy i aklimatyzacja do warunków specyficznych, a z pewnością także czas przebywania w tych warunkach. Ta obserwacja wydaje się być zbliżona do wyników przedstawionych w niniejszej pracy, gdzie stężenie HSP70 po ekspozycjach zmalało, być może w związku z doświadczeniem nurkowym badanych osób. Wydaje się, że różnice w ekspresji HSP70 występują u osób przebywających albo w określonych warunkach, lub przez odpowiedni czas. Należy także pamiętać, że istnieje wiele czynników indukujących HSP poza działaniem ciśnienia per se.

Badania Sureda i wsp. rzucają jeszcze inne spojrzenie na białka szoku cieplnego w odniesieniu do nurkowań [167]. Autorzy przywołanej pracy stwierdzili prawie 100% wzrost ekspresji genu *HSP72* w neutrofilach 9 mężczyzn 30 min. po nurkowaniach na głębokość 50 m (łączny czas 35 min). Jednocześnie zauważono mobilizację neutrofilów w warunkach normobarii po nurkowaniu, co świadczy o aktywacji odpowiedzi immunologicznej. W cytowanym badaniu autorzy zwracają uwagę na wykonywanie umiarkowanego wysiłku fizycznego przez nurków. HSP70 uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej wykazuje zdolność do łączenia się z błoną komórkową komórek układu immunologicznego i stymulacji wydzielania cytokin [168].

Matsuo i wsp. opisują wyniki badań prowadzonych podczas nurkowań saturowanych (4,1 MPa, 400 m wody morskiej, He-O₂), gdzie ekspresja HSP70 w limfocytach wzrastała po dekompresji, natomiast w czasie kompresji wykazywała powolny spadek [169]. Moment pobrania materiału (związany z czasem ekspozycji) do badań może wpływać więc istotnie na interpretację wyników, a obserwacja ta pokazuje także, że faza kompresji i dekompresji mogą mieć różny wpływ na ekspresję HSP.

Taylor i wsp. zaobserwowali z kolei spadek ekspresji HSP70 w monocytach krwi obwodowej po symulowanych nurkowaniach w komorze hiperbarycznej u 6 zdrowych mężczyzn (wcześniej nie poddawanych ekspozycjom hiperbarycznym) poddanych działaniu zarówno powietrza jak i tlenu pod zwiększonym ciśnieniem (odpowiadającemu głębokości 28 m, w czasie 78 minut) [115]. Próbki krwi zostały pobrane 42 minuty po ekspozycji i następnie po 4 godz. i 42 min. Spadek ekspresji HSP70 w monocytach obserwowano w obu próbkach, przy czym silniej wyrażony był u osób poddanych działaniu HBO. W monocytach krwi pobranej później, ekspresja HSP70 była już zbliżona do wartości wyjściowych, obserwowanych przed ekspozycją.

Może to tłumaczyć fakt spadku stężenia HSP70 u badanych przeze mnie osób po ekspozycji na 60 m z dekompresją tlenową (trwającej znacznie dłużej), obserwowanego na granicy istotności statystycznej.

Djurhuus i wsp. oceniali wpływ hiperbarii na ekspresję HSP70 i HSP90 w komórkach HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) poddanych działaniu ciśnienia 2.6 MPa (26 bar, 250 m wody morskiej) przez 24 godziny [111]. Nie zaobserwowano zmiany ekspresji HSP70, wykazano jednak niewielki wzrost ekspresji HSP90. Dodatkowo autorzy badania wykazali, że ekspresja HSP zależy nie tyle od fazy dekompresji, co kompresji lub oddziaływania ciśnienia per se. W podobnych komórkach (HMEC-1, *human microvascular endothelial cells*) Godman i wsp. obserwowali wzrost ekspresji genów *HSP70/72* po inkubacji komórek przez 60 min. w atmosferze 100% tlenu, pod ciśnieniem 2.4 atm. [170]. Wzrost obserwowany był do 4 godziny, po czym ekspresja zmniejszała się. Być może w tych warunkach nurkowania saturowanego, gdyby materiał pobierany był podczas całej procedury co pewien czas, byłby możliwy do zaobserwowania spadek ekspresji HSP70 w początkowej fazie.

W kolejnym badaniu spadek stężenia HSP70 i czynnika NF-κB był obserwowany w surowicy krwi po nurkowaniach symulowanych na głębokość 20 m, gdzie czynnikiem oddechowym był Nitroks.

Nie udało się odnaleźć prac, w których autorzy oznaczaliby stężenie/ekspresję HSP90 u nurków, poza jedną – dysertacją doktorską pochodzącą z 2017 roku z Uniwersytetu Stanowego na Florydzie, gdzie grupą osób badanych byli marynarze US Navy [171]. Autor pracy zwraca uwagę, że HSP90 są grupą białek najsilniej reagujących na stres oksydacyjny spośród wszystkich HSP i wykazał 42% spadek stężenia HSP90 w surowicy krwi po 6-godzinnych nurkowaniach w basenie o głębokości 4,57 m (powtarzanych przez 5 dni), gdzie czynnikiem oddechowym było powietrze. Zaobserwowano także 28% wzrost stężenia HSP90 w 5 dniu w stosunku do pierwszego dnia. Wzrost ten korelował ze stężeniem NO₃, co potwierdza istotną zależność funkcji NOS od HSP90 i być może jednoczesny wzrost stężenia HSP90 i eNOS w mojej pracy. W aspekcie hiperbarii i stresu oksydacyjnego wydaje się, że czynnikiem najsilniej aktywującym ekspresję HSP90 są FRT i reaktywne formy azotu wytwarzane z udziałem cząsteczki NO syntezowanej także przez iNOS. Zwiększenie poziomu saturacji O₂ we

krwi wiąże się ze wzrostem HSP. Wzrost ekspresji HSP90, podobny do wykazanego w niniejszej pracy, zauważono w ludzkich komórkach endotelium (HUVEC) podczas ekspozycji hiperbarycznych [172].

Ciekawą obserwacją jest wzrost stężenia HSP90, zarówno po ekspozycjach na 30 m, jak i na 60 m (przy jednoczesnym spadku HSP70). Tym bardziej jest to interesująca obserwacja, gdyż wzrost ekspresji HSP90 pociąga za sobą zwiększenie syntezy NO przez eNOS, co wynika z mechanizmu indukcji biosyntezy eNOS przez HSP90 [134, 173]. Występujący podczas ekspozycji hiperbarycznych stres oksydacyjny może być czynnikiem wywołującym apoptozę komórek. W tym aspekcie, zwiększenie stężenia HSP90 w surowicy krwi może być wyrazem efektu inhibicyjnego HSP w stosunku do szlaków apoptozy [174]. Dodatkowo, pojawiające się u osób nurkujących mikropęcherzyki w układzie krwionośnym i zaburzenia przepływu krwi doprowadzają do niezwykle małych ognisk niedokrwienia i zwiększenia syntezy RFT. Wynik wydaje się potwierdzać obserwacje poczynione na zwierzętach lub modelach komórkowych, przy czym nie udało się odnaleźć informacji, mówiących o wcześniej wykonanych takich badaniach u ludzi. Wyniki tego badania wnoszą więc zupełnie nową wiedzę. Białka HSP90 indukowane są (w przeciwieństwie do HSP70) głównie mitogenami i u ludzi występują jako HSP90 β – ekspresjonowane konstytucyjnie i HSP90 α , które indukowane jest przez czynniki termiczne, przy czym HSP90α zaangażowane jest głównie w procesy adaptacyjne [175, 176]. Wykorzystany w badaniu test ELISA wykrywał obie formy HSP90. Trudno także ocenić w wielu dostępnych publikacjach, którą formę oznaczali w materiale biologicznym inni badacze, gdyż informacja taka często nie jest podawana. Wzrost stężenia nie dziwi jednak, biorąc pod uwagę ogromną rolę białek szoku cieplnego w adaptacji organizmu do warunków środowiskowych.

Stres oksydacyjny może znacznie zwiększać ekspresję HSP90 w ludzkich komórkach endotelium i promować występowanie tych białek na powierzchni błony komórkowej, a uwalnianie z komórki prowadzić do wzrostu stężenia w osoczu/surowicy [177, 178].

W roku 2010 wykazano po raz pierwszy na świecie, że hiperbaria wywiera wpływ na ekspresję HSP70 indukowaną ciepłem, w co mogą być zaangażowane mechanizmy potranslacyjne, a sam wzrost wykrywanego białka nie musi być związany z jego syntezą

de novo [111]. Fakt ten, jak i dalsze badania z obszaru białek szoku cieplnego i hiperbarii mogą mieć ogromny wpływ na zapobieganie, leczenie choroby dekompresyjnej i ew. łagodzenie jej objawów.

Dokładny mechanizm powiązania hiperbarii i ekspresji HSP nie został dotąd poznany. Może być wynikiem nie tylko wystąpienia stresu oksydacyjnego, ale także działania zwiększonego ciśnienia per se, a także związany z aktywacją układu immunologicznego.

Obserwowany spadek stężenia w surowicy wolnego HSP70 być może spowodowany angażowaniem tych białek w procesach ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym lub zmniejszoną sekrecją do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Pewną rolę może też odgrywać stosunkowo silnie wyrażona aktywacja układów antyoksydacyjnych, wpływająca na ograniczenie nasilenia stresu oksydacyjnego. Być może też, spadek stężenia HSP obserwowany jest tylko bezpośrednio po ekspozycji. Ekspresja białek może narastać w późniejszym czasie. W jednej z bardzo intersujących prac autorzy zwracają uwagę, że wzrost stężenia TBARS wiąże się ze zmniejszeniem HSP70, co zgadza się z poczynionymi w tej pracy obserwacjami [179]. Istotnym czynnikiem, wpływającym na spadek stężenia HSP70 może mieć też ewentualna stymulacja przez IL-6. Wymaga to jednak dalszych badań. Należy zwrócić także uwagę na niepodkreślany i nieznany dotąd fakt, że na ekspresję HSP (w tym właśnie HSP70 i HSP90) duży wpływ mają składniki pokarmu (np. aminokwasy) i dieta (białka, probiotyki, dieta wysokotłuszczowa) [180]. Islam i wsp. wskazują, że stężenie pozakomórkowego HSP70 jest odwrotnie proporcjonalne do wskaźnika BMI, procentowej zawartości tłuszczu w tkankach i oporności na insulinę [181]. Należy uwzględnić ten mechanizm, szczególnie, że nie wszystkie osoby włączone do niniejszego badania były na czczo w momencie pobierania krwi, a wskaźnik BMI u niektórych badanych wskazywał na niewielką nadwagę.

Wzrost stężenia HSP90 wydaje się być natomiast zgodny z oczekiwaniami, szczególnie w przypadku, kiedy białka te miałyby silnie reagować na stres oksydacyjny i modulować ekspresję i aktywność eNOS.

Po prześledzeniu wpływu hiperbarii na białka szoku cieplnego sprawdzono, czy występuje zależność pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego (aktywnością enzymów antyoksydacyjnych) a stężeniem HSP.

Yan i wsp. wykazali, że spadek ekspresji HSP70 przyczynia się do zwiększonego wytwarzania RFT i oksydacji białek mitochondrialnych [182]. W roku 2007 opublikowano badania, wskazujące na istotną rolę HSP70 w ekspresji GPx i reduktazy glutationu [183]. Guo i wsp. pokazali, że nadekspresja HSP70 może o około 30% ograniczać wytwarzanie RFT w warunkach hipoksji (nie ma danych w odniesieniu do hiperoksji). Mierząc stosunek GSH/GSSG (który zmniejsza się w stresie oksydacyjnym) określali komórkowy potencjał redox. Wykazano istotnie wyższy wskaźnik GSH/GSSG w komórkach, w których nie zahamowano ekspresji HSP70 (76,1% vs. 59,1%, p<0,01) [183]. Glutation jest kluczowym, niskocząsteczkowym antyoksydantem, w przemianach którego uczestniczy peroksydaza glutationowa. Aktywność GPx w badaniach Guo i wsp. była istotnie wyższa w komórkach z nadekspresją HSP70 i, co bardzo ciekawe, jednocześnie niższa niż w komórkach grupy kontrolnej (z normalną ekspresją HSP70), co pokazuje, że HSP70 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu potencjału redox, a GPx w komórkach z nadekspresją HSP70 nie musi wykazywać bardzo wysokiej aktywności. Autorzy cytowanej pracy wskazują także, że GPx jest enzymem ściśle modulowanym przez HSP70, a wpływ ten (na enzymy antyoksydacyjne) może być krytycznym mechanizmem cytoprotekcyjnym.

W tej pracy nie wykazano korelacji pomiędzy aktywnością GPx, a stężeniem HSP70 w surowicy. Istotna zależność zachodzi jednak pomiędzy aktywnością GPx przed i po ekspozycjach hiperbarycznych (30 m) i stężeniem HSP90 i jest identyczna jak w przypadku HSP70 wykazanym przez Guo i wsp. Osoby badane przeze mnie, miały tym mniejszą aktywność GPx, im wyższe było stężenie białka HSP90. Być może zachodzi tu podobny mechanizm. Brak zależności po nurkowaniach do głębokości 60 m z dekompresją tlenową może być wynikiem małej grupy badanej, ale także krótszego czasu ekspozycji i uruchomieniem innych mechanizmów komórkowych. Obserwuje się także znamienną zależność pomiędzy aktywnością CAT przed ekspozycją a stężeniem HSP70 po ekspozycji, a także aktywnością SOD i stężeniem MDA po ekspozycji a stężeniem HSP90 przed ekspozycją. Każda z tych zależności jest korelacją ujemną, co

oznacza, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie MDA jest niższe u osób z wyższym stężeniem HSP90 oznaczanym w surowicy. Istotną obserwacją, jaką zauważono analizując wyniki jest zależność pomiędzy stężeniem HSP70 po ekspozycji 30 m, a zmianą aktywności CAT. Wyższy był obserwowany przyrost aktywności katalazy u osób, u których stężenie HSP70 po ekspozycji było wyższe, co może wskazywać na działanie antyoksydacyjne HSP70. Po ekspozycjach 60 m zaobserwowano istotną zależność między aktywnością CAT przed ekspozycją a stężeniem HSP70 przed i HSP90 po, przy czym ta ostatnia jest zależnością z dodatnią wartością współczynnika korelacji – wraz ze wzrostem aktywności CAT rośnie stężenie HSP90. Identyczny trend odnotowano dla aktywności CAT po ekspozycji, przy czym nie wykazywał cech istotności statystycznej. Powyższe obserwacje wydają się potwierdzać udział HSP w stresie oksydacyjnym, przy czym po raz pierwszy przeprowadzone zostały na ludziach, w grupie osób odbywających nurkowania symulowane. Nie istnieją obecnie żadne doniesienia, które pokazywałby zależność pomiędzy ekspresją HSP i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych u nurków lub osób przebywających w warunkach hiperbarycznych. Wydaje się, że na utrzymanie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej organizmu mają wpływ i układy antyoksydacyjne i białka szoku cieplnego współdziałające ze sobą. Mniejsza aktywność ww. enzymów przy wyższym stężeniu HSP może wskazywać, że HSP pełnią rolę ochronną i zmniejszają nasilenie stresu oksydacyjnego. Wskazanie jednak konkretnego szlaku komórkowego tego oddziaływania lub dokładnego mechanizmu molekularnego (poza wzajemnym oddziaływaniem HSP w układzie białko-białko) jest obecnie niemożliwe.

Na podstawie badań stężenia HSP w surowicy trudno jest odpowiedzieć na pytanie, czy jego wzrost spowodowany jest zwiększoną biosyntezą HSP, czy ich uwalnianiem z komórek lub modyfikacjami potranslacyjnymi, jak np. fosforylacja i acetylacja (które mogą mieć wpływ na wykrywalność białka przez testy immunochemiczne). Dokładne poznanie np. przyczyny wzrostu stężenia HSP90 i spadku HSP70 wymaga dalszych badań dotyczących m.in. zmian w ekspresji genów.

Olbrzymia trudność w porównaniu wyników badań związana jest w głównej mierze z różnym ich przebiegiem, różnymi warunkami ekspozycji hiperbarycznych i stosowaniem różnych metod wykrywania białek. Jak uważają niektórzy autorzy, np.

zmiany potranslacyjne mogą wpływać na specyficzność metod ELISA i Western-blot [169, 184].

6.4. Syntaza tlenku azotu

Po prześledzeniu zależności, pomiędzy stresem oksydacyjnym i HSP, przeprowadzono analizę wpływu hiperbarii na stężenie syntazy tlenku azotu w surowicy krwi nurków. Biorąc pod uwagę, że nurkowie poddawani są działaniu wielu czynników stresowych mogących w istotny sposób wpływać na funkcje śródbłonka, a także fakt niezwykle istotnego wzajemnego oddziaływania HSP (szczególnie HSP90) NOS, oznaczono stężenie dwóch izoform syntazy tlenku azotu – eNOS i iNOS w surowicy krwi obwodowej. Zarówno eNOS jak i iNOS są enzymami komórkowymi, jednak z uwagi na inwazyjność zabiegu pobrania np. komórek śródbłonka i chęć sprawdzenia, czy surowica (jako materiał łatwo dostępny) nadaje się do wstępnych badań nurków, postanowiono skorzystać z tego materiału. Tym bardziej jest to temat ważny, gdyż nawet nurkowania prowadzone według sprawdzonych i bezpiecznych profili mogą indukować odpowiedź układu odpornościowego, uwalnianie mikrocząstek wpływających na formowanie się mikropęcherzyków gazów i uszkodzenia śródbłonka [25, 186].

Zaobserwowano znamienny statystycznie wzrost stężenia eNOS po ekspozycjach 60 m. Stężenie iNOS nie zmieniło się w tej grupie (nie oznaczano stężenia po ekspozycjach 30 m), podobnie jak eNOS w przypadku ekspozycji 30 m. Obserwuje się zatem wpływ hiperbarii na funkcję śródbłonka. Wykazanie istotnej zmiany tylko po nurkowaniach na 60 m być może związane jest z czasem potrzebnym do zwiększenia ekspresji eNOS lub zwiększonym nasileniem stresu oksydacyjnego i/lub oddziaływaniem ciśnienia na organizm. Nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego a stężeniem eNOS i iNOS. Nie oznacza to jednak, że związek taki nie występuje. Być może można go zaobserwować badając wspomniane parametry na poziomie komórkowym lub oznaczając aktywność enzymu. Nie zauważono też ilościowej zależności pomiędzy stężeniem HSP i badanych NOS. Stężenia jednak HSP90 i eNOS wzrastają po ekspozycjach łącznie, co wydaje się potwierdzać fakt silnego oddziaływania HSP-eNOS. iNOS indukowana jest głównie
przez cytokiny prozapalne. Poczynione obserwacje wydają się wskazywać na brak wpływu hiperbarii na stężenie białka iNOS (jako zawartości masy białka), przynajmniej w przypadku surowicy, jako materiału badanego, i/lub brak zwiększenia wydzielania enzymu do przestrzeni pozakomórkowej.

Istnieją jednak doniesienia mówiące o wzroście syntezy NO przez iNOS. Sureda i wsp. sugerują, że nurkowania rzeczywiste indukują stres oksydacyjny przy jednoczesnym wzroście syntezy NO przez komórki endotelium (spowodowanego wzrostem aktywności enzymu) [167]. Autorzy obserwują po nurkowaniach na głębokość 50 m (35 min) także wzrost syntezy NO w ludzkich neutrofilach, przy braku zmiany stężenia białka. Inni autorzy zauważają w tych komórkach wzrost aktywności i stężenia iNOS, jednak przy innych warunkach prowadzenia badania [72].

Zhen i wsp. zauważają silny związek pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego, a ekspresją eNOS i iNOS, zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i translacyjnym w komórkach śródbłonka naczyń, związany z aktywacją czynnika NF-κB [152]. NO jest jednym z czynników hamujących NF-κB (sprzężenie zwrotne ujemne), jednak jego zmniejszona dostępność w warunkach stresu oksydacyjnego może aktywować szlak NF-κB i prowadzić do zwiększenia ekspresji NOS.

Analizując nieliczne prace, można także zauważyć, że przy nurkowaniach rzeczywistych na głębokość 7 m obserwuje się spadek stężenia NO₃⁻ tłumaczony przez autorów spadkiem aktywności i ekspresji iNOS [67]. Z drugiej jednak strony dostępna jest praca wskazująca na istotny wzrost aktywności i ekspresji iNOS w warunkach hiperbarii [72].

Zwiększenie syntezy NO, jako wolnego rodnika i cząsteczki wykazującej właściwości antyoksydacyjne, obserwowane przy ekspozycjach hiperbarycznych może wpływać ograniczająco na nasilenie stresu oksydacyjnego terminując reakcję utleniania lipidów [154].

Wykazano duży wpływ ekspozycji hiperbarycznych w warunkach symulowanych nurkowań m.in. do głębokości 30 m na funkcjonowanie układu krążenia, m.in. w stosunku do parametrów biochemicznych. Obserwuje się spadek stężenia angiotensyny 1-7 (ANG 1-7) działającej antagonistycznie w stosunku do angiotensyny II. ANG 1-7 zwiększa syntezę NO poprzez aktywację eNOS i nNOS [154].

109

Tlenek azotu wpływa istotnie na formowanie pęcherzyków gazu w układzie krwionośnym w fazie dekompresji, a zastosowanie inhibitora NOS nasila ich formowanie. Efekt taki obserwuje się także w przypadku zmniejszenia ekspresji HSP. Synteza NO rośnie wraz ze wzrostem ekspresji HSP90 [134, 173]. Zwiększenie (np. przez wysiłek fizyczny) syntezy NO poprzez aktywację NOS i zwiększenie ekspresji HSP70 chroni zarówno przed powstawaniem pęcherzyków gazu, jak też przed niekorzystnymi efektami ich obecności w układzie krążenia. Efekt ten wpływa także na zwiększenie przeżywalności nagłej dekompresji. Obserwacje takie poczyniono na zwierzętach. NO może modulować właściwości powierzchni endotelium poprzez zwiększenie hydrofilowości, zmniejszając adherencję prekursorów pęcherzyków gazu do nabłonka naczyń krwionośnych [187].

Medby i wsp. zauważyli także, że jeśli eNOS i HSP90 ekspresjonowane są głównie w komórkach endotelium, to brak ich wykrycia w preparatach tkankowych lub surowicy (lub ich spadek) może świadczyć o uszkodzeniu komórek śródbłonka m.in. przez pęcherzyki gazu [173].

Ciekawym wydaje się fakt, że osoby, które poddano dekompresji powietrznej miały znacznie wyższe średnie stężenie iNOS niż osoby poddane dekompresji tlenowej. Jednocześnie ani w jednej ani w drugiej grupie nie wykazano istotnych statystycznie zmian stężenia iNOS bezpośrednio po ekspozycji. Oznaczenie iNOS wykonano po ekspozycjach 60 m, u osób poddawanych 24 godziny wcześniej ekspozycjom na 30 m. Być może fakt następujących po sobie ekspozycji wpłynął istotnie na różnice w wyjściowym stężeniu iNOS wynikającym z wcześniejszych ekspozycji. Stężenie iNOS przed ekspozycjami było znacznie wyższe u nurków poddanych ekspozycji z dekompresją powietrzną. Być może wzrost ekspresji iNOS byłby zauważalny, gdyby próbki krwi zostały pobrane później, np. po kilku godzinach od zakończenia ekspozycji.

Warto nadmienić również, że w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego eNOS może wytwarzać anionorodnik ponadtlenkowy. Dysmutacja O_2^- do H_2O_2 przez SOD może powodować wtórne uszkodzenia komórek endotelium. Dodatkowo interakcja pomiędzy O_2^- i NO może skutkować powstaniem nadtlenoazotynu, inaktywującego tetrhydrobiopterynę (BH₄) – jeden z kofaktorów eNOS [186]. Efektem jest utrata aktywności eNOS i jednej z głównych funkcji śródbłonka. Zaburzenie homeostazy

endotelium w połączeniu ze stresem oksydacyjnym jest jedną z hiopotez tłumaczących rozwój choroby dekompresyjnej.

6.5. Znaczenie uzyskanych wyników dla praktyki nurkowej i wiedzy z zakresu fizjologii.

Uzyskane z badania wyniki, mogą mieć szczególne znaczenie praktyczne dla ewentualnego zapobiegania występowaniu lub ograniczenia objawów choroby dekompresyjnej (DCS). Choroba dekompresyjna jest wywołana przez pęcherzyki gazu formujące się w tkankach organizmu i w układzie krążenia na skutek nieprawidłowej redukcji ciśnienia w fazie dekompresji podczas nurkowania. Indywidualne cechy organizmu odpowiedzialne za tworzenie się pęcherzyków gazu determinują nasilenie choroby dekompresyjnej. Pęcherzyki gazu mogą oddziaływać na śródbłonek naczyń krwionośnych mechanicznie i/lub wpływać na procesy biochemiczne, wywołując reakcje na granicy faz ciecz-gaz i aktywując niektóre czynniki krzepnięcia, enzymy czy immunoglobuliny. Zauważono, że powtarzane cykle kompresji i dekompresji mogą redukować podatność organizmu na wystąpienie DCS, przy czym mechanizm tego zjawiska nie został dotąd poznany i nie wiadomo w jaki sposób adaptacja wpływa na redukcję pęcherzyków przy kolejnych epizodach kompresji-dekompresji. W jednym z badań na królikach dowiedziono znacznego wzrostu ekspresji HSP70 w niektórych narządach u zwierząt z objawami DCS [188]. Wzrost ten był porównywalny z wywołanym szokiem cieplnym, a wywołanie nadekspresji HSP70 przed ekspozycją hiperbaryczną związane z mniejszym nasileniem objawów DCS i niższą śmiertelnością. Efekt ten obserwuje się u organizmów poddanych działaniu wysokiego ciśnienia i obecnie trudno jest jednoznacznie wykazać, czy wzrost HSP wywołany jest ciśnieniem jako takim, czy ma związek z rozwojem stresu oksydacyjnego. Stwierdzić można, że ekspozycje hiperbaryczne są silnym czynnikiem stresowym, a analiza dostępnych doniesień naukowych wskazuje, iż jednym z czynników biorących udział w aklimatyzacji nurków są HSP. Wiadomym jest również, że HSP mogą zmniejszać uszkodzenia oksydacyjne poprzez inhibicję mediatorów prozapalnych, np. ICAM-1 i zahamowanie sekwestracji neutrofilów w naczyniach krwionośnych, co ściśle związane jest z funkcją endotelium [189, 190]. Ponadto znany jest fakt możliwego oddziaływania HSP ze

szlakami przemian NO w endotelium, które mogą wpływać na stopień tworzenia pęcherzyków gazu w warunkach hiperbarii. NO wytwarzany przez eNOS może osłabiać formowanie pęcherzyków i rozwój DCS. eNOS jest silnie regulowana przez HSP90 (ale także, jak się wydaje analizując literaturę, przez HSP70). Wywołany szokiem cieplnym wzrost ekspresji HSP70 i HSP90 nasila ekspresję eNOS w komórkach endotelium, czego efektem jest zwiększone uwalnianie z tych komórek cząsteczek NO, co ogranicza wazokonstrykcję naczyń krwionośnych i formowanie się pęcherzyków gazu (nie jest to jednak jedyny sposób indukcji eNOS) [190]. U 16 nurków, zawodowych żołnierzy, obserwowano znaczne zmniejszenie ilości pęcherzyków gazu po pojedynczej sesji w saunie na 1 godzinę przed nurkowaniem symulowanym do głębokości 30 m [190]. Podobny efekt (indukcji eNOS i wzrostu syntezy NO) uzyskuje się u zwierząt umieszczonych w saunie, przy czym postuluje się istnienie innego mechanizmu modulacji eNOS, nie angażującego HSP70 i HSP90.

Poczynione obserwacje zależności występujących pomiędzy stresem oksydacyjnym, ekspresją HSP i NOS otwierają nową drogę w sposobach redukcji występowania i leczenia DCS, a także opracowania nowych, bezpieczniejszych protokołów ekspozycji hiperbarycznych stosowanych w celu symulowania warunków nurkowania i modyfikacji treningów przed nurkowaniami rzeczywistymi.

Ekspozycja organizmu ludzkiego na warunki zwiększonego ciśnienia panujące podczas nurkowania skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego, zwiększoną syntezą białek stresowych i wpływem na funkcję nabłonka naczyń krwionośnych. Wydaje się, że odpowiedź ta w dużym stopniu zależna jest od warunków ekspozycji, czasu trwania i wrodzonych czynników osobniczych. Dokładna analiza "odpowiedzi biochemicznej" może mieć szeroko sięgające skutki dla zastosowań medycznych. Ekspozycje hiperbaryczne mają ogromny wpływ na ekspresję wielu genów, co wyraża się w przejściowej lub stałej aklimatyzacji do warunków specyficznych. Dalsze badania, m.in. z zastosowaniem analizy proteomicznej mogą przyczynić się do lepszego poznania i zrozumienia fizjologii organizmu, patofizjologii nurkowania i zwiększenia bezpieczeństwa nurków.

7. Wnioski

- Ekspozycje w komorze hiperbarycznej symulujące nurkowania do głębokości
 30 i 60 m w sposób istotny wpływają na nasilenie stresu oksydacyjnego.
- 2. Nurkowania symulowane w omawianych warunkach modulują odpowiedź ze strony białek szoku cieplnego, wskazując, że hiperbaria jest istotnym czynnikiem stresowym wywołującym zmiany biochemiczne, pomimo przeprowadzania nurkowań w oparciu o bezpieczne, zwalidowane procedury i braku objawów klinicznych.
- Istnieje zależność pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego, a ekspresją białek szoku cieplnego w warunkach hiperbarii.
- 4. Warunki hiperbaryczne mają wpływ na funkcję śródbłonka naczyń krwionośnych wyrażonego w zmianie ekspresji eNOS.
- Wpływ na ekspresję białek szoku cieplnego i syntazę tlenku azotu mają warunki ekspozycji hiperbarycznych, czas ich trwania i zastosowany profil dekompresji.
- Wzrost ekspresji HSP70 przed nurkowaniem może mieć działanie ochronne, wpływając na nasilenie stresu oksydacyjnego.

Załącznik

Tabela 28. Fragment tabeli dekompresyjnej Marynarki Wojennej RP dla głębokości 30 i 33 m (kolorem jasnoniebieskim zaznaczono profil dekompresji stosowany podczas ekspozycji i badań w niniejszej pracy)

ść		do I. onia		Stopień dekompresyjny [mH ₂ O]																
ko	s na ie		42	39	36	33	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	Calko	wity cza	is wynu	rzania
Głębo	Czas dn	Czas stop		Czas spędzony na stopniu [min]										Powietrze		Tlen				
[mH ₂ O]	[min]	[min]		Powietrze								Powietrze i tlen						[min]	[h]	[min]
30	15	4																4		
	20	4														1(1)		5		5
	25	4														4(2)		8		6
	35	3													5(3)	15(8)		23		14
	45	3												2(1)*	13(7)	23(12)		41		23
	60	3											1(1)*	10(5)	15(8)	25(12)		54		29
	80	2										2(1)	10(5)*	14(7)	22(11)	28(14)	1	18		40
	105	2										5(3)	14(7)*	18(9)	28(14)	39(20)	1	16		55
	145	2									10	13(7)	15(8)*	25(13)	36(18)	52(26)	2	33	1	24
	180	2									14	19(10)	21(11)*	30(15)	40(20)	61(31)	3	7	1	43
33	15	5																5		
	20	4														3(2)		7		6
	25	4														10(5)		14		9
	35	3												6(3)*	10(5)	16(8)		35		19
	45	3												8(4)*	14(7)	24(12)		49		26
	60	3											12(6)*	14(7)	17(9)	26(13)	1	12		38
	80	3										6(3)	12(6)*	16(8)	25(13)	32(16)	1	34		49
	105	2									8	12(6)	19(10)*	20(10)	33(17)	41(21)	2	15	1	14
	145	2								9	13	15(8)	20(10)*	30(15)	42(21)	65(33)	3	16	1	51
	180	2								16	19	22(11)	24(12)*	39(20)	60(30)	73(37)	4	15	2	27

Tabela 29. Fragment tabeli dekompresyjnej Marynarki Wojennej RP dla głębokości 60 i 63 m (kolorem jasnoniebieskim zaznaczono profil dekompresji stosowany podczas ekspozycji i badań w niniejszej pracy).

ŝĆ		Czas do l. stopnia		Stopień dekompresyjny [mH ₂ O]											Całkowity cząc wypurzania							
oko	i na ie		42	39	36	33	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	Calko					
Głębc	Czas dn			Czas na stopniu [min]										Powietrze		Tlen						
$[mH_2O]$	[min]	[min]		Powietrze Powietrze i tlen									[h]	[min]	[h]	[min]						
60	5	9																9				
	10	8													3(2)	11(6)		22		16		
	15	7												7(4)*	12(6)	19(10)		45		27		
	20	6										4(2)	10(5)*	13(7)	15(8)	20(10)	1	8		38		
	25	6									4	10(5)	14(7)*	16(8)	22(11)	24(12)	1	36		53		
	35	5								12	15	16(8)	19(10)	28(14)*	40(20)	52(26)	3	7	1	50		
	45	5						12	14	18	20	24(12)	29(15)	39(20)*	48(24)	60(30)	4	29	2	50		
	60	4				12	14	16	16	20	24	29(15)	36(18)	49(25)*	69(35)	40(40)	6	9	3	<i>59</i>		
	80	4			13	15	16	17	19	26	32	39(20)	49(25)	70(35)*	90(45)	105(53)	8	15	5	20		
63	5	9																9				
	10	8													5(3)	12(6)		25		17		
	15	8												9(5)*	14(7)	20(10)		51		30		
	20	7										6(3)	10(5)*	13(7)	17(9)	21(11)	1	14		42		
	25	6									11	13(7)	15(8)*	18(9)	24(12)	26(13)	1	53	1	6		
	35	6							9	13	16	18(9)	22(11)	32(16)*	47(24)	58(29)	3	41	2	13		
	45	5					12	14	15	19	22	27(14)	33(17)	44(22)*	53(27)	71(36)	5	15	3	23		
	60	4			11	14	15	17	18	22	29	32(16)	41(21)	54(27)*	70(35)	95(48)	7	2	4	37		
	80	3		12	14	16	17	18	21	28	35	44(22)	56(28)	80(40)*	96(48)	119(60)	9	19	6	2		

Spis rysunków

Rysunek 1.	Powstawanie reaktywnych form tlenu	26
Rysunek 2.	Wzór strukturalny MDA	31
Rysunek 3.	Domena ATP-binding (NBD/ADB) ludzkiego białka HSP70	39
Rysunek 4.	Oddziaływanie HSP70 z białkami	41
Rysunek 5.	Schematyczna struktura izoform syntazy tlenku azotu	42
Rysunek 6.	Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (30 m)	61
Rysunek 7.	Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (30 m)	62
Rysunek 8.	Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (30 m)	62
Rysunek 9.	Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbaryczn	ej
	(30 m)	63
Rysunek 10.	Zmiana wartości wskaźnika antyoksydacyjnego przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (30 m)	63
Rysunek 11.	Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(30 m)	64
Rysunek 12.	Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(30 m)	64
Rysunek 13.	Zmiana stężenia eNOs w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(30 m)	65
Rysunek 14.	Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(30 m)	65
Rysunek 15.	Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m)	67
Rysunek 16.	Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona	67
Rysunek 17.	Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m)	68

Rysunek 18. Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji
hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona
Rysunek 19. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji
hiperbarycznej (60m) 69
Rysunek 20. Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji
hiperbarycznej (60 m), grupa zwiększona 69
Rysunek 21. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m) 70
Rysunek 22. Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), grupa zwiększona 70
Rysunek 23. Zmiana wartości wskaźnika antyoksydacyjnego przed i po ekspozycji
hiperbarycznej (60 m) 71
Rysunek 24. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m) 71
Rysunek 25. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), grupa zwiększona72
Rysunek 26. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), bez podziału na grupy 72
Rysunek 27. Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m) 73
Rysunek 28. Zmiana stężenia HSP90 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), grupa zwiększona 73
Rysunek 29. Zmiana stężenia HSP70 w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), bez podziału na grupy 74
Rysunek 30. Zmiana stężenia eNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m) 75
Rysunek 31. Zmiana stężenia eNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m), grupa zwiększona 75
Rysunek 32. Zmiana stężenia iNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej
(60 m) 76

Rysunek 33.	Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(60 m) 7	7
Rysunek 34.	Zmiana stężenia żelaza w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej	
	(60 m), grupa zwiększona 7	7
Rysunek 35.	Zmiana aktywności SOD w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna7	9
Rysunek 36.	Zmiana aktywności CAT w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna8	0
Rysunek 37.	Zmiana aktywności GPx w erytrocytach przed i po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m), dekompresja powietrzna8	0
Rysunek 38.	Zmiana stężenia MDA w erytrocytach przed i po ekspozycji hiperbaryczne	ij
	(60 m), dekompresja powietrzna8	1
Rysunek 39.	Zmiana stężenia iNOS w surowicy przed i po ekspozycji hiperbarycznej (60)
	m), dekompresja powietrzna8	2
Rysunek 40.	Porównanie stężenia iNOS w grupie osób poddanych dekompresji	
	tlenowej i powietrznej (60m)8	3
Rysunek 41.	Zależność pomiędzy aktywnością GPx i stężeniem HSP90 przed ekspozycja	ą
	hiperbaryczną (30 m)	5
Rysunek 42.	Zależność pomiędzy aktywnością GPx po ekspozycji i stężeniem HSP90	
	przed ekspozycją hiperbaryczną (30 m) 8	5
Rysunek 43.	Zależność pomiędzy stężeniem MDA po ekspozycji i stężeniem HSP90	
	przed ekspozycją hiperbaryczną (30 m) 8	6
Rysunek 44.	Zależność pomiędzy zmianą procentową aktywności CAT i stężeniem	
	HSP70 po ekspozycji hiperbarycznej (30 m)8	7
Rysunek 45.	Zależność pomiędzy aktywnością CAT i stężeniem HSP70 przed ekspozycja	ą
	hiperbaryczną (60 m)	9
Rysunek 46.	Zależność pomiędzy aktywnością CAT i stężeniem HSP90 po ekspozycji	
	hiperbarycznej (60 m)	9

Spis tabel

Tabela 1.	Klasyfikacja reaktywnych form tlenu25
Tabela 2.	Mechanizm utleniania lipidów 30
Tabela 3.	Klasyfikacja i lokalizacja w komórce wybranych białek szoku cieplnego 36
Tabela 4.	Charakterystyka izoform NOS 44
Tabela 5.	Charakterystyka grupy badanej. Dane antropometryczne 52
Tabela 6.	Charakterystyka grupy badanej. Podstawowe badania biochemiczne 52
Tabela 7.	Zakresy wartości referencyjnych dla podstawowych oznaczeń
	biochemicznych52
Tabela 8.	Fragment wiersza tabeli dekompresyjnej dla ekspozycji 30 m p. p. m
	(dekompresja powietrzna)53
Tabela 9.	Fragment wiersza tabeli dekompresyjnej dla ekspozycji 60 m p. p. m
	(dekompresja powietrzna) 54
Tabela 10.	Fragment wiersza tabeli dekompresyjnej dla ekspozycji 60 m p. p. m
	(dekompresja tlenowa) 54
Tabela 11.	Charakterystyka metod immunochemicznych i biochemicznych 57
Tabela 12.	Podsumowanie wartości oznaczanych parametrów i istotności statystycznej
	(ekspozycje 30 m) 66
Tabela 13.	Podsumowanie wartości oznaczanych parametrów i istotności statystycznej
	(ekspozycje 60 m) 78
Tabela 14.	Porównanie parametrów po ekspozycjach w grupie dekompresji
	powietrznej i tlenowej
Tabela 15.	Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek
	szoku cieplnego w surowicy – 30 m (wsp. korelacji Pearsona) 84
Tabela 16.	Zależności pomiędzy wartością wskaźnika antyoksydacyjnego i stężeniem
	białek szoku cieplnego w surowicy – 30 m (wsp. korelacji Pearsona) 87
Tabela 17.	Zależności pomiędzy wartością wskaźnika antyoksydacyjnego i stężeniem
	żelaza w surowicy – 30 m (wsp. korelacji Pearsona) 88
Tabela 18.	Zależności pomiędzy parametrami stresu oksydacyjnego i stężeniem białek
	szoku cieplnego w surowicy – 60 m (wsp. korelacji Pearsona)

- Tabela 28. Fragment tabeli dekompresyjnej Marynarki Wojennej RP dla głębokości 30
 i 33 m (kolorem jasnoniebieskim zaznaczono profil dekompresji stosowany podczas ekspozycji i badań w niniejszej pracy)......114
- Tabela 29. Fragment tabeli dekompresyjnej Marynarki Wojennej RP dla głębokości 60
 i 63 m (kolorem jasnoniebieskim zaznaczono profil dekompresji stosowany podczas ekspozycji i badań w niniejszej pracy)......115

Streszczenie

Wstęp

Nurkowanie stanowi szczególny model badań dotyczących oddziaływania hiperbarii, stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego na organizm. Stres oksydacyjny i nitrozacyjny przyczynia się do uszkodzenia wszystkich składników komórki i może wpływać m.in. na funkcjonowanie śródbłonka naczyń krwionośnych. Nieliczne doniesienia naukowe wskazujące na istnienie związku pomiędzy stresem oksydacyjnym i/lub nitrozacyjnym a ekspresją białek szoku cieplnego, syntaz tlenku azotu i być może ich wpływem na przebieg choroby dekompresyjnej stały się punktem wyjścia do badań będących podstawą niniejszej pracy.

Cel pracy

Celem pracy było określenie nasilenia stresu oksydacyjnego podczas nurkowań symulowanych i ich wpływu na eksprsję wybranych białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu.

Materiał i metody

Badaniami została objęta grupa 65 zdrowych osób – Funkcjonariuszy Państwowej Straży Pożarnej i MSWiA, odbywających nurkowania symulowane w komorze hiperbarycznej. 100% badanych stanowili mężczyźni w wieku od 24 do 51 lat (średnia 32,6 lat), będący zawodowymi, doświadczonymi nurkami i przechodzący regularne badania lekarskie.

Wyniki

Wykazano istotny statystycznie wpływ hiperbari w warunkach nurkowań symulowanych na nasilenie stresu oksydacyjnego i stężenie w surowicy krwi nurków białek szoku sieplnego i syntazy tlenku azotu. Wykazano istotne korelacje pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi stresu oksydacyjnego a stężeniem HSP.

Wnioski

Ekspozycje w komorze hiperbarycznej symulujące nurkowania w sposób istotny wpływają na nasilenie stresu oksydacyjnego. Modulują odpowiedź ze strony białek szoku cieplnego i mają wpływ na funkcję śródbłonka naczyń krwionośnych wyrażonego w zmianie ekspresji eNOS. Wpływ na ekspresję białek szoku cieplnego i syntazę tlenku azotu mają warunki ekspozycji hiperbarycznych, czas ich trwania i zastosowany profil dekompresji. Wzrost ekspresji HSP70 przed nurkowaniem może mieć działanie ochronne, wpływając na nasilenie stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe

stres oksydacyjny, nurkowanie, białka szoku cieplnego, syntaza tlenku azotu, komora hiperbaryczna

Abstract

Introduction

Diving is a special model of research into the effects of hyperbaria, oxidative and nitrosative stress on the body. Oxidative and nitrosative stress causes damage to all components of the cell and can affect vascular endothelial function. Few scientific reports indicating the existence of a relationship between oxidative and/or nitrosative stress and heat shock protein and nitric oxide synthase expression. Perhaps they affect the course of decompression sickness. This became the starting point for research.

Aim

The aim of this sutudy was to determine the severity of oxidative stress during simulated dives and their impact on HSP and NOS expression in serum.

Materials and methods

65 firefighters, professional divers at the age from 24 to 51 yo. (mean 32,6 yo.) participated in the study. They dived in hyperbaric chamber. All of them underwent medical examinations.

Results

Statistically signifficant influence of hyperbaria on the severity of oxidative stress was demonstrated. The serum concentration of heat shock protein and nitric oxide synthase has changed. Signifficant correlations were found between selectd biochemical parameters of oxidative stress and HSP concentration.

Conclusions

Exposures in a hyperbaric chamber affect the severity of oxidative stress. They modulate response from heat shock proteins and have an effect on endothelium function of blood vessels expressed in the change of eNOS serum concentration. Hyperbaric exposure conditions, their duration time and decompression have an effect on HSP and NOS concentration. An increase of HSP70 before diving can have a protective effect, influencing the severity of oxidative stress.

Keywords

oxidative stress, diving, heat shock proteins, nitric oxide synthase, hyperbaric chamber

Bibliografia

- Wielki Słownik Języka Polskiego. Wyd. 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2018
- Kot J, Desola J, Simao AG, Gough-Allen R, Houman R, Meliet JL, et. al. European code of good practice for hyperbaric oxygen therapy. Int Marit Health. 2004;55(1-4):121-130
- Thom SR. Hyperbaric oxygen its mechanisms and efficacy. Plast Reconstr Surg 2011;127:131-141
- 4. Thom SR. Hyperbaric oxygen therapy. J Intensive Care Med. 1989;4:58–74
- Olszański R. Ocena zagrożenia chorobą dekompresyjną u nurków. Wyd. PTMiTH 2006; 25–26
- 6. Maberry S. Nitrox saturation. The road not taken. Underwater 2001; 80-83
- 7. Hamilton R.W., Adams G.M., Harvey C. A., Knight D.R. SHAD NISAD A composite study of simulated shallow saturation diving. NSMRL Rep. 1982; 985
- Muren A, Adolfson J, Ornhagen H, Gennser M, Hamilton R. W. NISAHEX Deep nitrox saturation with nitrox & trimix excursions. Underwater physiol. 1984, 8; 713–729
- Okamoto M., Yamaguchi H. Developmen of prototype hyperbaric environmental control system (HECS) for nitrox saturation diving system diving and hyperbaric medicine. Proc. 23 – ed EUBS Congress 1997; 242–250
- Wicklund R.I. Vertical excursions breathing air from nitrogen oxygen or air saturation exposures. 1996 U.S. Dept Commerce NOAA
- 11. Tikuisis P, Gault K, Carrod G. Maximum likehood analysis of bubble incidence for mixed gas diving. Undersea Biomed. Res. 1990 17, 2; 159–169
- Buhlmann AA. The use of multiple inert gas mictures in decompression. W:
 Physiology & medicine of diving. London 1969
- 13. Mount T, Gilliam B. Mixed gas diving. Watersport publishing. 1993 INC San Diego
- 14. Ciria Veg. Oxy-helium saturation diving tables. CIRIA Rep. 1978 UR 11 London
- 15. Risberg J, Farstad M, Hjelle JO, Ulvik R. Blood chemistry changes related to saturation diving. Proceedings of the XIXth annual meeting of EUBS 1993

- 16. Ronnestad I, Rovererud HP, Hope A. Inert gases in diving Heat capacity and conductance. EUBS Newsletter 1994; 5-8
- Olszański R. Flow cytometric testing of blood platelet activation in diving. W: Advances in high pressure bioscience and biotechnology. (red. L. Horst) Springer 1999; 565–568
- 18. Bennett PB. Inert gas narcosis. W: Bennett PB, Elliott DH (eds). The physiology and medicine of diving. Saunders, London 1993, 170-193
- Gardette B, Massimelli JY, Comet M, Gortan C, Delauze HG. Hydra 10: A 701 msw onshore record dive on Hydreliox. Proceedings of XIXth Annual Meeting of EUBS 1993; 32–37
- Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K. Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. Carcinogenesis. 1989;10(12):2231-2235.
- 21. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. Biochemia Harpera ilustrowana. Wyd. 6. PZWL, Warszawa 2015
- 22. Sies H. Oxidative stress: introduction. In: Sies H., editor. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Academic Press; London 1991
- 23. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 1999
- 24. Sies H, Jones DP. Encyclopaedia of Stress (ed. G. Fink). Elsevier, San Diego 2007
- 25. N. T. Dimitrios, K. C. Geogrios, and I. X. H. Dmitrios, Neurohormonal hypothesis in heart failure. Hell J Cardiol 2003;44(3):195-205
- 26. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4(2):89-96
- 27. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans 2007;35:1147–
 9
- 28. Halliwell B, Whiteman M. Measuring RS and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 2004;142,231
- 29. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. Cell Signal. 2007;19:1807–1819

- 30. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 5th edition,
 31, Oxford University Press, 2015
- Krumova K, Cosa G. Overview of Reactive Oxygen Species. W: Nonell S, Flors C. Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2016
- Blumenthal SB, Kiemer AK, Tiegs G, Seyfried S, Höltje M, Brandt B, Höltje HD, Zahler S, Vollmar AM. Metalloporphyrins inactivate caspase-3 and -8. FASEB J. 2005;19(10):1272-9
- 33. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012;327(1-2):48-60
- 34. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol 1990;186:1-85
- 35. English AM, Wilcox DE. Effects of metal ions on the oxidation and nitrosation of cysteinę residues in proteins and enzymes. Met Ions Biol Syst. 2001;38:313-350
- Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain.
 Biosci Rep. 1997;17(1):3-8
- 37. Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. Biochem Cell Biol 1992;70:390-403
- 38. McCord JM, Keele BB, Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci USA. 1971;68(5):1024–1027
- 39. Percy ME. Catalase: an old enzyme with a new role? Can J Biochem Cell Biol 1984;62:1006-1014
- 40. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M und Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1): 44-84
- 41. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc. Trans. 1894;65:899-910
- 42. Ferradini C, Jay-Gerin JP. Radiolysis of water and aqueous solutions: histrory and present state of the science. Can J Chem. 1999;77:1542–1575
- 43. Fridovich I. Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 1974, 41, 35-97.

- 44. Milgrom LR. Why Is Catalase So Fast? A Preliminary Network Hypothesis for the Rapid Enzyme-catalysed Decomposition of Hydrogen Peroxide. Water, 2016;7:129-146
- 45. Mueller S., Riedel H.D., Stremmel W.: Direct evidence for catalase as the predominant H2O2-removing enzyme in human erythrocytes. Blood 1997;90: 4973–4978
- 46. Flohe L.: Glutathione peroxidase. Basic Life Sci. 1988;49:663–668.
- 47. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2005;15(4):316-328.
- 48. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991;11:81-128.
- 49. Całyniuk B, Grochowska-Niedworok E, Walkiewicz KW, Kawecka S, Popiołek E, Fatyga E. Malondialdehyde (MDA) – product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. Ann Acad Med Siles 2016;70:224-228
- 50. Gutteridge JMC, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018;502(2):183-186
- 51. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. Mutat Res 2003;531:81-92
- 52. Lipiński P, Starzyński RR, Styś A, Straciło M. Homeostaza żelaza mechanizm obronny w stresie oksydacyjnym. Post Bioch 2010;(3)56:305-316
- 53. Gilman SC, Hunter WL Jr, Mooney LW. Changes in serum ferritin and other factors associated with iron metabolism during chronic hyperbaric exposure. Aviat Space Environ Med. 1979;50(3):223-226
- 54. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. J Nutr 2009;139(1):90-95
- 55. Zwart SR, Jessup JM, Ji J, Smith SM. Saturation diving alters folate status and biomarkers of DNA damage and repair. PLoS One. 2012;7(2):1-5

- 56. Narkowicz, C.K. Hyperbaric oxygen therapy increases free radical level in the blood of humans. Free Rad Res Commun 1993;19:71-80
- 57. Undersea and Hyperbaric Medical Society Hyperbaric Oxygen Committee. Hyperbaric Oxygen Therapy indications: The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report. In: Weaver LK, editor. 13th ed. North Palm Beach, FL, USA: Best Publishing Company; 2014.
- 58. Simsek K, Sadir S, Oter S. The relation of hyperbaric oxygen with oxidative stress reactive molecules in action. Oxid Antioxid Med Sci 2015;4(1):17-22
- 59. Ma L, Li P, Shi Z, Hou T, Chen X, Du J. A prospective, randomized, controlled study of hyperbaric oxygen therapy: effects on healing and oxidative stress of ulcer tissue in patients with a diabetic foot ulcer. Ostomy Wound Manage 2013;59(3):18-24
- 60. Włodarski A, Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C, Sutkowy P. Wpływ zmian ciśnienia otoczenia na aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) i katalazy (CAT) we krwi nurków - badania wstępne. Pol Hyperb Res 2013;1(42):7-26
- 61. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E. The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. BMC Pediatr 2007;16;7:36
- 62. Ikeda M, Nakabayashi K, Shinkai M, Hara Y, Kizaki T, Oh-ishi S, Ohno H. Supplementation of antioxidants prevents oxidative stress during a deep saturation dive. Tohoku J Exp Med 2004;203(4):353-7
- 63. Theunissen S, Sponsiello N, Rozloznik M, Germonpré P, Guerrero F, Cialoni D, Balestra C. Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives. Diving Hyperb Med 2013;43(2):63-66
- 64. Kozakiewicz M, Olszański R, Siermontowski P, Dąbrowiecki Z, Kędziora J. Proand antioxidant proces ses under hyperbaric conditions Pol Hyperb Res. 2011;1(34):21-26
- 65. Paprocki J, Sutkowy P, Krzyżańska-Malinowska E, Piechocki J, Woźniak A. The indicators of oxidant-antioxidant balance in patients performed hyperbaric oxygenation. Pol Hyperb Res 2013;2(43):23–38

- 66. Mila-Kierzenkowska C, Woźniak A, Szpinda M, Wesołowski R, Sutkowy P, Włodarski A. Oxidative stress in blood of healthy people after diving. J Sports Med Phys Fitness. 2015;55(4):352-60
- 67. 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
- Perovic A, Unic A, Dumic J. Recreational scuba diving: negative or positive effects of oxidative and cardiovascular stress? Biochem Med 2014;24(2):235-247
- 69. Oter S, Topal T, Sadir S, Ozler M, Uysal B, Ay H, et al. Oxidative stress levels in rats following exposure to oxygen at 3 atm for 0-120 min. Aviat Space Environ Med 2007;78:1108-13
- 70. Oter S, Simsek K, Sadir S, Ozler M, Uysal B, Topal T, et al. Hyperbaric oxygen induced oxidative stress in rats' brain cortex tissue with relation to the pressure/duration range of the treatment. J Cereb Blood Flow Metab 2009;29:464-5
- 71. Kozakiewicz M, Kędziora J, Kędziora-Kornatowska K, Pawluk H, Olszański R, Dąbrowiecki Z, Kornatowski T. Wpływ hiperbarii na wybrane parametry stresu oksydacyjnego we krwi nurków. Pol Hyperb Res. 2015;3(12):7-12
- 72. Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. Free Radic Res 2007;41:274-281
- 73. Turrens, J. F., Freeman, B. A., Levitt, J. G., and Crapo, J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. Arch. Biochem. Biophys. 1982;217:401–410
- 74. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari
 F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. Clin Biochem. 2004;37(4):312-317
- 75. Kim S, Yukishita T, Lee K, Yokota S, Nakata K, Suzuki D, Kobayashi H. The Effect of Mild-Pressure Hyperbaric Therapy (Oasis O2) on Fatigue and Oxidative Stress. Health 2011;3:432-436

- 76. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. J. Cell. Mol. Med., 2008;12:743–761
- 77. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(4):310-8
- 78. Kiliańska ZM, Ptasińska A. Zmiany w jądrach komórkowych wywołane szokiem termicznym. Acta Biochem. Biophys. 1999:14:103–122
- 79. Cotto J.J., Morimoto R.I.: Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. Biochem. Soc. Symp. 1999;64:105–115
- Kaźmierczuk A. Kiliańska ZM. Plejotropowa aktywność białek szoku cieplnego.
 Postepy Hig Med Dosw. 2009;63:502-521
- 81. Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. J Exerc Rehabil. 2016;12(4):255-9
- Bakubowicz-Gil J. Gawron A. Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. Post. Biol. Kom., 1999;26: 267–283
- 83. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy.
 J. Leukoc. Biol. 2007; 81:15–27
- 84. Sørensen JG. Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. Curr Zool 2010;56:703–713
- 85. Brocchieri L, Convay de Macario E, Macario AJ. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. BMC Evol. Biol., 2008; 8: 1–19
- 86. 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
- 87. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017;18:345–360

- Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. J Biol Chem. 2019;294(6):2109-2120.
- 89. Mayer MP, Le Breton L. Hsp90: breaking the symmetry. Mol. Cell 2015;58:8–20
- 90. Radli M, and Rüdiger SG. Dancing with the diva: Hsp90–client interactions. J. Mol. Biol. 2018;430:3029–3040
- 91. Karagöz GE, and Rüdiger SG. Hsp90 interaction with clients. Trends Biochem. Sci. 2015;40, 117–125
- 92. Hernandez MP, Sullivan WP., Toft DO. The assembly and inter-molecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. J. Biol. Chem., 2002;277: 38294-38304
- 93. Freeman BC, Morimoto RI. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. EMBO J. 1996;15:2969–2979
- 94. Whitesell L. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nature Reviews Cancer. 2005;5(10):761–772
- 95. 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
- 96. Jarjour WN, Jeffries BD, Davis JS 4th, Welch WJ, Mimura T, Winfield JB. Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. Arthritis Rheum. 1991;34(9):1133-8
- 97. Botzler C, Li G, Issels RD, Multhoff G. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. Cell Stress Chaperones. 1998;3(1):6-11
- 98. Guzhova IV, Darieva ZA, Melo AR, Margulis BA, Major stress protein Hsp70 interacts with NF-kB regulatory complex in human T-lymphoma cells. Cell Stress Chaperones 1997;2:132–139
- 99. Kazula A, Kazula E. Stymulacja aktywności białek szoku cieplnego jako nowy kierunek terapii. Farm Pol 2009;65(10):697-706
- 100. Wu T, Tanguay RM. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? Cell Stress Chaperones 2006;11:1–12

- 101. Binder RJ. Functions of Heat Shock Proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. J Immunol 2014;193(12):5765-5771
- 102. Polanowska-Grabowska R, Gear AR. Heat shock proteins and platelet function. Platelets 2000;11:6–22
- 103. Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. Embo J. 1997;16:2452–2462
- 104. Subrizi A, Toropainen E, Ramsay E, Airaksinen AJ, Kaarniranta K, Urtti A. Oxidative stress protection by exogenous delivery of rhHsp70 chaperone to the retinal pigment epithelium (RPE), a possible therapeutic strategy against RPE degeneration. Pharm. Res. 2015;32(1):211–221
- 105. Giulivi C, Pacifici RE, Davies KJ. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. Arch. Biochem. Biophys. 1994;311(2):329–341
- 106. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al.The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 2000;20(19):7146–7159
- 107. Calabrese V, Stella AM, Butterfield DA, Scapagnini G. Redox regulation in neurodegeneration and longevity: role oft he heme oxygenase and HSP70 systems in brain stress tolerance. Antioxid Redox Signal 2004;6:895-913
- 108. Deocaris C.C., Kaul S.C., Wadhwa R.: From proliferative to neurological role of an hsp70 stress chaperone, mortalin. Biogerontology, 2008; 9: 391–403
- 109. Scarpeci TE, Zanor MI, Valle EM. Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. Plant Signaling & Behavior 2008; 3:10:856-857
- 110. Lee HC, Chen YS, Kang BH, Wan FJ, Chang LP, Huang KL. Serum heat shock protein after simulated deep diving in Navy divers. Chin J Physiol. 2009;52(5):295-8
- 111. Djurhuus R, Nossum V, Lundsett N, Hovin W, Svardal AM, Havnes MB, Fismen L, Hjelde A, Brubakk AO. Simulated diving after heat stress potentiates the

induction of heat shock protein 70 and elevates glutathione in human endothelial cells. Cell Stress Chaperones. 2010;15(4):405-14

- 112. Fittipaldi S, Dimauro I, Mercatelli N, Caporossi D. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. Free Radic Res. 2014;48(1):52-70
- 113. 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
- 114. Ni XX, Ni M, Fan DF, Sun Q, Kang ZM, Cai ZY, Liu Y, Liu K, Li RP, Xu WG. Heatshock protein 70 is involved in hyperbaric oxygen preconditioning on decompression sickness in rats. Exp Biol Med (Maywood). 2013;238(1):12-22
- 115. Taylor L, Midgley AW, Sandstrom ME, Chrismas B, McNaughton LR. The effect of the hyperbaric environment on heat shock protein 72 expression in vivo. Res Sports Med. 2012;20(2):142-53
- 116. Vince RV, Midgley AW, Laden G, Madden LA. The effect of hyperbaric oxygen preconditioning on heat shock protein 72 expression following in vitro stress in human monocytes. Cell Stress Chaperones. 2011;16(3):339-43
- 117. Yogaratnam JZ, Laden G, Guvendik L, Cowen M, Cale A, Griffin S. Can hyperbaric oxygen be used as adjunctive heart failure therapy through the induction of endogenous heat shock proteins? Adv Ther. 2007;24(1):106-18
- 118. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. Clin Exp Rheumatol. 2008;26(4):659-62
- 119. Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE, Economou EV, Kaparos G, Kontoravdis A, Papadias C, Creatsas G. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. Fertil Steril. 2009;91(1):46-50
- 120. Nakhjavani M, Morteza A, Khajeali L, Esteghamati A, Khalilzadeh O, Asgarani F, Outeiro TF. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. Cell Stress Chaperones. 2010;15(6):959-64

- 121. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001;357(Pt 3):593-615
- 122. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J. 1994;298 (2):249–58
- 123. Luo S, Wang T, Qin H, Lei H, Xia Y. Obligatory role of heat shock protein 90 in iNOS induction. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;301(1):227-233.
- 124. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol. 2004;500(1-3):255-66.
- 125. Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection — How, Why, When, and Where? Nitric Oxide: Biol. And Chem. 1997; 1: 107–120
- 126. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. FEBS Lett. 1992;307(3):287-93
- 127. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(23):11419-23
- 128. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). J Biol Chem. 1994;269(52):33082-90
- 129. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012;33(7):829-37
- 130. Huang C, Lu X, Tong L, Wang J, Zhang W, Jiang B, Yang R. Requirement for endogenous heat shock factor 1 in inducible nitric oxide synthase induction in murine microglia. J Neuroinflammation. 2015;12:189-200
- 131. Zhang L, Liu Q, Yuan X, Wang T, Luo S, Lei H, Xia Y. Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction. Cell Signal. 2013;25(5):1310-1317
- 132. Yi H, Huang G, Zhang K, Liu S, Xu W. HSP70 protects rats and hippocampal neurons from central nervous system oxygen toxicity by suppression of NO

production and NF-κB activation. Exp Biol Med (Maywood). 2018;243(9):770-779

- 133. Xu D, Zalmas LP, La Thangue NB. A transcription cofactor required for theheatshock response. EMBO Rep. 2008;9:662–9
- 134. Balligand JL. Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling. Circ Res. 2002;90:838-841
- 135. Amour J, Brzezinska AK, Weihrauch D, Billstrom AR, Zielonka J, Krolikowski JG. et. al. Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning. Anesthesiology. 2009;110(2):317-25.
- 136. Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. J Biol Chem. 2003;278:30821–7
- 137. Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender JR. Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells: effects on calcium sensitivity and NO release. J Biol Chem. 2000; 275: 5026–5030
- 138. 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
- 139. Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, Nilakantan V, Kindwall E, Niezgoda JA, Baker JE. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. Cardiovasc Res. 2006;72(1):143-51
- 140. Demchenko IT, Boso AE, Bennett PB, Whorton AR, Piantadosi CA. Hyperbaric oxygen reduces cerebral blood flow by inactivating nitric oxide. Nitric Oxide. 2000;4(6):597-608
- 141. 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

- 142. 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
- 143. Dijkstra G1, Blokzijl H, Bok L, Homan M, van Goor H, Faber KN, Jansen PL, Moshage H. Opposite effect of oxidative stress on inducible nitric oxide synthase and haem oxygenase-1 expression in intestinal inflammation: antiinflammatory effect of carbon monoxide. J Pathol. 2004;204(3):296-303
- 144. Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. Cell. Moll. Life Sci. 1997; 53: 576–582
- 145. Squadrito G.L., Pryor W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. Free Radical Biol. Med. 1998; 392–403
- 146. Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. Biochem J. 1997;322 (1):167-73
- 147. Gorbunov N.V., Yalowich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E. i wsp. Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and nonheme iron. J. Biol. Chem. 1997; 272: 12328–12341
- 148. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. Am. J. Physiol. 1996;271: C1424–C1437
- 149. Elayan IM, Axley MJ, Prasad PV, Ahlers ST, Auker CR. Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain. J Neurophysiol. 2000;83(4):2022-9
- 150. Zhou BY, Lu GJ, Huang YQ, Ye ZZ, Han YK. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy under different pressures on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2008;10(2):133-5
- 151. Ponnuswamy P, Ostermeier E, Schröttle A, Chen J, Huang PL, Ertl G, Nieswandt B, Kuhlencordt PJ. Oxidative stress and compartment of gene expression

determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase. Am J Pathol. 2009;174(6):2400-10

- 152. Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, Zhou XJ. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. Am J Hypertens. 2008;21(1):28-34
- 153. Marlinge M, Coulange M, Fitzpatrick RC, Delacroix R, Gabarre A, Lainé N et. al. Physiological stress markers during breath-hold diving and SCUBA diving. Physiol Rep. 2019;7(6): doi: 10.14814/phy2.14033.
- 154. Kozakiewicz M, Kedziora-Kornatowska K, Kaczerska D, Siermontowski P, Olszanski R, Krefft K. Influence of exposure in hyperbaric chambers on selected parameters of oxidative stress in professional divers. Undersea Hyperb Med. 2018;45(1):49-54.
- 155. Körpinar Ş, Uzun H. The Effects of Hyperbaric Oxygen at Different Pressures on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Rats. Medicina. 2019;55(5):1-8
- 156. Radojevic-Popovic R, Zivkovic V, Jeremic N, Sretenovic J, Velicanin N, Bradic J, Jakovljevic V. An evaluation of the redox state in professional scuba divers. Undersea Hyperb Med. 2015;42(5):409-416
- 157. Paprocki J, Sutkowy P, Piechocki J, Woźniak A. Markers of Oxidant-Antioxidant Equilibrium in Patients with Sudden Sensorineural Hearing Loss Treated with Hyperbaric Oxygen Therapy. Oxid Med Cell Longev. 2019; Article ID 8472346
- 158. Thorsen E, Haave H, Hofsø D, Ulvik RJ. Exposure to hyperoxia in diving and hyperbaric medicine--effects on blood cell counts and serum ferritin. Undersea Hyperb Med. 2001;28(2):57-62
- 159. Pörtner HO. Climate change and temperature-dependent bio-geography: Oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften 2001;88: 137–146.
- 160. Dreyer A, Dietz KJ. Reactive Oxygen Species and the Redox-Regulatory Network in Cold Stress Acclimation. Antioxidants 2018;7(11):169-183
- 161. Driedonks N, Xu J, Peters JL, Park S, Rieu I. Multi-level interactions between heat shock factors, heat shock proteins, and the redox system regulate acclimation to heat. Front Plant Sci 2015;6:999

- 162. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. Shock 2013;40(4):239-246
- 163. Batulan Z, Pulakazhi Venu VK, Li Y1, Koumbadinga G, Alvarez-Olmedo DG, Shi
 C, O'Brien ER. Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27:
 Role in Modifying Vascular Inflammation. Front Immunol. 2016;26;7:285-300
- 164. Kuzmin EV, Karpova OV, Elthon TE, Newton KJ. Mitochondrial respiratory deficiencies signal up-regulation of genes for heat shock proteins. J Biol Chem 2004;279:20672–20677
- 165. Żwirowski S, Kłosowska A, Obuchowski I, Nillegoda NB, Piróg A, Ziętkiewicz S, et. al. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. EMBO J. 2017;36(6):783-796
- 166. Wen J, Li H, Zhang Y, Li X, Liu F (2015) Modification of HSP proteins and Ca2+ are responsible for the NO-derived peroxynitrite mediated neurological damage in PC12 cell. Int J Clin Exp Pathol 2015;8:4492
- 167. Sureda A, Batle JM, Capó X, Martorell M, Córdova A, Tur JA, Pons A. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. Physiol Genomics. 2014;46(17):647-654
- 168. Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. Cell Stress Chaperones 2001;6:386–393
- 169. Matsuo H, Shinomiya N, Suzuki S. Hyperbaric stress during saturation diving induces lymphocyte subset changes and heat shock protein expression. Undersea Hyperb Med. 2000;27(1):37-41.
- 170. Godman CA, Chheda KP, Hightower LE, Perdrizet G, Shin DG, Giardina C. Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells. Cell Stress Chaperones. 2010;15(4):431-442
- 171. Myers C. The Effects of Acute Long-duration O₂ Exposure on Skeletal Muscle Performance and Oxidative Stress in Navy Divers. Florida State University. Tallahassee, USA, 2017

- 172. Fismen L, Hjelde A, Svardal AM, Djurhuus R. Differential effects on nitric oxide synthase, heat shock proteins and glutathione in human endothelial cells exposed to heat stress and simulated diving. European Journal of Applied Physiology 2012;112:2717-2725
- 173. Medby C, Bye A, Wisløff U, Brubakk AO. Heat shock increases survival in rats exposed to hyperbaric pressure. Diving Hyperb Med. 2008;38(4):189-93.
- 174. Jethon Z. Oxidative stress, apoptosis and stress proteins. Pol Hyperb Res 2005;1(10):5-11
- 175. Ammirante M, Rosati A, Gentilella A, Festa M, Petrella A, Marzullo L, Pascale M., Belisario M.A., Leone A., Turco M.C. The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NF-kappa B transcription factors. Oncogene. 2008;27:1175–1178
- 176. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. Biochem J. 2016;473(16):2439-2452
- 177. Liao DF, Jin ZG, Baas AS. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, 2000;75(1):189–196
- 178. Profumo E, Buttari B, Tinaburri L, D'Arcangelo D, Sorice M, Capozzi A. et. al. Oxidative Stress Induces HSP90 Upregulation on the Surface of Primary Human Endothelial Cells: Role of the Antioxidant 7,8-Dihydroxy-4methylcoumarin in Preventing HSP90 Exposure to the Immune System. Oxid Med Cell Longev. 2018, doi: 10.1155/2018/2373167
- 179. Jammes Y, Steinberg JG, Delliaux S, Brégeon F. Chronic fatigue syndrome combines increased exercise-induced oxidative stress and reduced cytokine and Hsp responses. J Intern Med 2009;266:196-206
- 180. Moura CS, Lollo PCB, Morato PN, Amaya-Farfan J. Dietary Nutrients and Bioactive Substances Modulate Heat Shock Protein (HSP) Expression: A Review. Nutrients. 2018;10(6). doi: 10.3390/nu10060683.
- 181. Islam A, Hait SH, Andrews-Shigaki B, Carus S, Deuster PA. Plasma HSP70 levels correlate with health risk factors and insulin resistance in African American subjects. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2014;122(8):496-501.

- 182. Yan LJ, Sohal RS. Analysis of oxidative modification of proteins. Curr Protoc Cell Biol. 2002;14(1):1-25
- 183. Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. Cell Stress Chaperones. 2007;12(3):245-254
- 184. Winter J, Jakob U. Beyond transcription—new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2004;39: 297–317.
- 185. Thom SR, Milovanova TN, Bogush M, Bhopale VM, Yang M, Bushmann K, et al. Microparticle production, neutrophil activation and intravascular bubbles following open-water SCUBA diving. J Appl Physiol. 2012:1268-78
- 186. Berenji Ardestani S, Buzzacott P, Eftedal I. The aging diver: endothelial biochemistry and its potential implications for cardiovascular health. Diving Hyperb Med 2015;45(4):235-239
- 187. Wisløff U, Richardson RS, Brubakk AO. NOS inhibition increases bubble formation and reduces survival in sedentary but not exercised rats. J Physiol. 2003;546:577-582
- 188. Su CL, Wu CP, Chen SY, Kang BH, Huang KL, Lin YC. Acclimatization to neurological decompression sickness in rabbits. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287(5):1214-1218
- 189. Pespeni M, Hodnett M, Pittet JF. In vivo stress preconditionin . Methods 2005;35:158-164
- 190. Blatteau JE, Gempp E, Balestra C, Mets T, Germonpre P. Predive sauna and venous gas bubbles upon decompression from 400 kPa. Aviat Space Environ Med. 2008;79(12):1100-1105.

OŚWIADCZENIE O SAMODZIELNYM NAPISANIU PRACY DOKTORSKIEJ

Warszawa,....

JAKUB SZYLLER

..... Imię i nazwisko kandydata

ul. Bzowa 85/87 m. 5 53-226 Wrocław

Adres zamieszkania

OŚWIADCZENIE

Świadom(a) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że złożona praca doktorska pt.: *"Wpływ hiperbarii na ekspresję wybranych białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu we krwi nurków"*

została napisana przeze mnie samodzielnie. Równocześnie oświadczam, że praca ta nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. 1994, nr 24, poz. 83) i dóbr osobistych chronionych prawem cywilnym oraz nie zawiera informacji i danych uzyskanych w sposób nielegalny i nie była wcześniej przedmiotem innych procedur urzędowych związanych z uzyskaniem dyplomów lub tytułów zawodowych uczelni wyższej.

podpis kandydata

OŚWIADCZENIE O UDOSTĘPNIENIU PRACY DOKTORSKIEJ

Warszawa,....

JAKUB SZYLLER

Imię i nazwisko kandydata

ul. Bzowa 85/87 m. 5 53-226 Wrocław

Adres zamieszkania

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt.

"Wpływ hiperbarii na ekspresję wybranych białek szoku cieplnego i syntazy tlenku azotu we krwi nurków"

Wyrażam zgodę na udostępnianie egzemplarza mojej dysertacji w Czytelni Biblioteki WIHE, z zastrzeżeniem, że udostępnianie to następować będzie wyłącznie na miejscu, w lokalu Biblioteki.

.....

podpis autora rozprawy