

## WPLYW TLENKU AZOTU NA ODKSZTAŁCALNOŚĆ ERYTROCYTÓW U SZCZURÓW PODDANYCH STRESOWI IMMERSJI WODNEJ

BOGDAN CHMIEL<sup>1</sup>, BOLESŁAW TURCZYŃSKI<sup>2</sup>, STANISŁAW SZCZĘSNY<sup>2</sup>,  
LECH CIERPKA<sup>1</sup>, KRZYSZTOF ZAGALSKI<sup>1</sup>, LUDMIŁA SŁOWIŃSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Transplantologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biofizyki Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

**Influence of modification of nitric oxide synthase activity on rat's erythrocyte deformability during water immersion stress was investigated. It was shown that inhibition of nitric oxide activity significantly decreases erythrocyte deformability during water immersion stress. On the other hand increase of the nitric oxide synthase activity induces slight increase of erythrocyte deformability during water immersion stress.**

### WSTĘP

Stres jest wyrazem całokształtu zmian, poprzez które organizm odpowiada na czynniki mające zdolność wywoływania określonych reakcji wewnętrznych, takich jak: wzmożone napięcie nerwowe, reakcje lękowe, wzrost pobudzenia itp. Jest on również zjawiskiem powszechnie występującym w chirurgii. Zarówno sama choroba, jak również unieruchomienie chorego w łóżku, oczekiwanie na operację, a wreszcie czynniki uszkadzające, takie jak: operacja oraz ewentualne zakażenia są również czynnikami stresorodnymi. Wśród różnorodnych zmian związanych ze stresem mogą zachodzić również istotne zmiany właściwości czynników reologicznych krwi, takie jak: zmniejszenie odkształcalności krwinek czerwonych i wzrost ich agregacji oraz adhezja do śródbłonna naczyń (Chang, Absolm, Strong, Stubley & Zingg, 1988; Mohandas & Chasis, 1993).

Odkształcalność erytrocytów odgrywa rolę, zarówno na poziomie naczyń oporowych, jak i w naczyniach włosowatych. W naczyniach oporowych, w których gradient prędkości jest duży, dochodzi do odkształcenia erytrocytów, tym większego im mniejsza jest ich sztywność. Erytrocyty odkształcone wykazują zmniejszone oddziaływanie hydrodynamiczne z fazą rozpraszającą, wskutek czego dochodzi do zwiększenia płynności krwi. W wypadku przepływu erytrocytów o zmniejszonej odkształcalności oddziaływanie hydrodynamiczne się zwiększają, zaś płynność krwi ulega zmniejszeniu (Chien, 1987; Gaetgens, Dührssen & Albrecht, 1980; Stuart & Nash, 1990). Natomiast na poziomie naczyń włosowatych, których średnica jest znacznie mniejsza niż krwinek

czerwonych, przepływ erytrocytów staje się możliwy tylko wówczas, gdy zmniejszy się odpowiednio ich średnica. Jest to możliwe wówczas, gdy krwinki są elastyczne. W przypadku gdy krwinki są sztywne ich przepływ przez naczynia odżywiająca staje się niemożliwy. Prowadzi to do zaburzeń ukrwienia komórek i tkanek (Maeda & Shiga, 1994; Sarelius, 1995; Shiga, 1994). Zmniejszona odkształcalność erytrocytów prawdopodobnie występuje również w stresie. Np. doświadczalnie u królików stwierdzono, że w takcie znieczulenia mieszaniną halotanu z pentabarbitalem występują reakcje stresowe, którym towarzyszyło przejściowe zmniejszenie odkształcalności erytrocytów (Yesilkaya, Ertug, Yegin, Melikoglu & Baskurt, 1998).

Jednym z doświadczalnych modeli stresu jest immersja wodna zwierząt. Prowadzi ona do aktywacji układu współczulnego oraz zaburzeń przepływu krwi w mikrokrażeniu (Reilly, Rivalier, Compagnon & Laplane, 1934). Niektórzy autorzy obserwowali u ludzi występowanie zaburzeń przepływu krwi w naczyniach włosowatych w wyniku ciężkiego wysiłku fizycznego, co łączono ze zmniejszoną odkształcalnością erytrocytów (Van der Brug, 1995). U zwierząt poddanych immersji wodnej występuje między innymi uszkodzenie błony śluzowej żołądka w postaci owrzodzeń. Przyjmuje się, że uszkodzenia te są związane z nadmierną produkcją tlenu azotu, czego dowodem ma być to, że zmiany w śluzówce żołądka można usunąć przez zastosowanie inhibitora syntezy tlenu azotu (Nishida, Ohta & Ishigura, 1998).

Wpływ tlenu azotu na odkształcalność erytrocytów nie został dotychczas jednoznacznie ustalono.

ny. Przyjmuje się, że zarówno zbyt małe, jak też zbyt duże stężenie tego środka powoduje usztywnienie erytrocytów (Korbut & Gryglewski, 1993). Dotyczy to szczególnie erytrocytów zwierząt poddanych stresowi oksydacyjnemu, który to stres znacznie uwrażliwia erytrocyty na działanie czynników zmniejszających elastyczność erytrocytów przez peroksydację.

Celem pracy była ocena wpływu modyfikacji aktywności syntazy tlenu azotu na odkształcalność erytrocytów podczas stresu wywołanego immersją wodną u zwierząt doświadczalnych.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiło 30 szczurów – samców rasy Sprague Dawley o masie ciała od 250 do 300 g. Szczury podzielono na dwie grupy po 15 osobników wybranych drogą losową. Jedną z nich była grupa kontrolna (A), druga zaś – poddawana stresowi immersji wodnej – stanowiła grupę (B). Z każdej grupy wyodrębniono – również drogą losową – po trzy podgrupy, z których każda złożona była z 5 osobników.

Podgrupom A-1 i B-1 podawano dootrzewnowo jedynie 2 ml 0,9% roztworu NaCl – podgrupom A-2 i B-2 – do 2 ml roztworu NaCl dodawano 10 mg/kg wagi ciała inhibitor syntazy tlenu azotu w postaci Nw-nitro L-arginine methylester (L-

Name), natomiast – podgrupom A-3 i B-3 – dodawano l- Argininę w ilości 25 mg/kg wagi ciała. Następnie szczury grupy B poddawano stresowi immersji wodnej. Procedura była następująca. Szczura umieszczano w indywidualnej klatce, a następnie zanurzano w pozycji pionowej do wysokości wyrostka mieczykowatego w wodzie o temperaturze 23°C na cztery godziny, po czym usypiano eterem i po rozcięciu mostka pobierano z komory serca krew. W pobranej krwi wykonywano pomiary indeksu elongacji erytrocytów (IE) za pomocą aparatu Rheodyn SSD firmy Myrenne (Roengen – Niemcy).

Zasada działania aparatu opiera się na automatycznej analizie obrazów dyfrakcyjnych, uzyskiwanych za pomocą promienia laserowego, przechodzącego przez zawiesinę erytrocytów w odpowiednim roztworze dekstranu. Odształcenie krwinek zachodziło w wyniku działania rosnących naprężeń ścinających generowanych między współosiowymi płytkami. Stosowano następujące naprężenia ścinające wyrażone w [Pa]: 0,3; 0,6; 1,2; 3,0; 6,0; 12,0; 30,0; 60,0. Procedurą pomiarową sterował odpowiednio oprogramowany komputer.

Indeks elongacji wyliczano na podstawie pomiaru natężenia światła pierwszorzędowej części widma dyfrakcyjnego obrazu erytrocyta w obu ortogonalnych osiach, równo oddalonych od środ-

Tabela 1. Analiza statystyczna indeksów elongacji w podgrupach grupy kontrolnej:  $\bar{X} \pm S_n$ , oraz współczynnik zmienności [%].

Naprężenie ścinające Pa	Indeks elongacji [%]		
	A-1	A-2	A-3
0,3	12,03 ± 0,7 5,8	11,53 ± 0,9 7,8	12,57 ± 1,2 9,5
0,6	16,56 ± 2,0 12,0	16,16 ± 0,9 5,5	16,93 ± 1,5 8,8
1,2	21,35 ± 2,0 9,3	20,94 ± 0,8 4,0	21,52 ± 1,3 6,0
3,0	29,18 ± 1,5 5,0	28,93 ± 0,7 2,4	28,97 ± 1,1 3,8
6,0	35,1 ± 0,9 2,6	35,1 ± 0,6 1,7	34,5 ± 0,5 1,4
12,0	39,5 ± 0,8 2,0	39,9 ± 0,7 1,7	38,3 ± 0,6 1,5
30,0	42,9 ± 1,2 2,8	43,5 ± 1,0 2,3	40,9 ± 1,3 3,2
60,0	43,2 ± 1,2 2,8	43,8 ± 1,0 2,3	41,2 ± 1,3 3,1

Brak istotności pomiędzy indeksami elongacji w poszczególnych podgrupach grupy kontrolnej.

ka obrazu, wg wzoru:

$$IE = \frac{L - W}{L + W} 100\%,$$

gdzie L – długość elipsy, zaś W – szerokość.

U każdego szczura wykonywano po 5 pomiarów IE w pięciu różnych próbkach tej samej krwi. Wynik pomiaru stanowiła średnia arytmetyczna. Błąd pojedynczego pomiaru nie przekraczał 0,5%. Równolegle przeprowadzano te same badania w grupie kontrolnej. Istotność weryfikowano analizą wariancji.

### WYNIKI

W tabeli 1 zestawiono średnie wartości IE, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności w podgrupach grupy kontrolnej w funkcji naprężenia ścinającego.

Jak wynika z przedstawionych danych w żadnym z zastosowanych naprężeń ścinających nie wystąpiły istotne różnice odkształcalności pomiędzy podgrupami tej grupy.

Wyniki badań w grupie B zestawiono w tabeli 2.

W podgrupie B-1 IE erytrocytów nie różnił się istotnie w porównaniu z podgrupą A-1. Pewne

tendencje zmniejszenia IE w podgrupie B-1 w porównaniu z podgrupą A-1 wystąpiły przy szybkościach ścinania od 3 Pa do 30 Pa. Średni względny spadek IE w tym zakresie nie przekraczał 2,3%; przy naprężeniu ścinającym 60 Pa nie zanotowano różnic. Oznacza to, że zastosowany stres immersji wodnej powodował tylko nieznaczny wzrost IE erytrocytów.

Dodatek substancji modyfikujących aktywność syntazy tlenu azotu łącznie z zastosowanym stresem wywołanym immersją wodną spowodował istotne zmiany IE. W podgrupie B-2 w porównaniu zarówno z podgrupą A-1, jak i B-1 wystąpiło istotne, znaczące obniżenie IE erytrocytów, natomiast w podgrupie B-3 wystąpił istotny wzrost tego parametru, zarówno w porównaniu z podgrupą A-1, jak również B-2. Względne zmiany IE w badanych podgrupach zależały od naprężenia ścinającego. Zmiany te w podgrupach grupy badanej względem podgrup A-1 przedstawiono na rycinie 1.

Względne zmniejszenie IE erytrocytów w podgrupie B-2 w porównaniu z podgrupą A-1 było największe przy naprężeniu 0,3 Pa, natomiast przy naprężeniu 60 Pa wynosiło ono 9,2%. Podobne zmiany miały miejsce w porównaniu z podgrupą B-1. W podgrupie B-3 wystąpił wzrost IE, przy czym wzrost ten mieścił się w granicach od około 25% do około 10% przy naprężeniach ścinających

Tabela 2. Analiza statystyczna indeksów elongacji w podgrupach grupy badanej:  $\bar{X} \pm S_{II}$ , oraz współczynnik zmienności [%].

Naprężenie ścinające Pa	Indeks elongacji [%]		
	B-1	B-2	B-3
0,3	12,30 ± 1,44 11,7	10,59 ± 0,97 * 9,1	15,22 ± 1,02 *** 6,7
0,6	17,10 ± 1,60 9,3	14,14 ± 0,51 *** 3,6	18,83 ± 0,51 * 2,7
1,2	21,52 ± 1,56 7,2	19,01 ± 1,20 ** 6,3	23,72 ± 0,34 ** 1,4
3,0	28,75 ± 1,42 4,9	26,12 ± 1,13 *** 4,3	30,96 ± 0,43 *** 1,4
6,0	34,43 ± 1,26 3,6	31,89 ± 1,64 **** 5,1	36,79 ± 0,88 **** 2,4
12,0	38,60 ± 1,15 2,9	36,26 ± 2,68 ** 7,4	41,07 ± 1,56 *** 3,8
30,0	41,44 ± 1,12 2,7	39,29 ± 2,11 * 5,3	44,04 ± 2,28 * 5,1
60,0	43,23 ± 1,19 2,7	39,55 ± 2,22 * 5,6	44,33 ± 2,33 * 5,2

\* p< 0,05 \*\* p< 0,02 \*\*\* p< 0,01 \*\*\*\* p<0,002

od 0,3 do 1,2 Pa, natomiast przy wyższych naprężeniach ścinających wzrost ten był mniejszy i wynosił odpowiednio od około 6-2,5% przy szybkościach ścinania  $3,0 \div 60,0$  Pa.

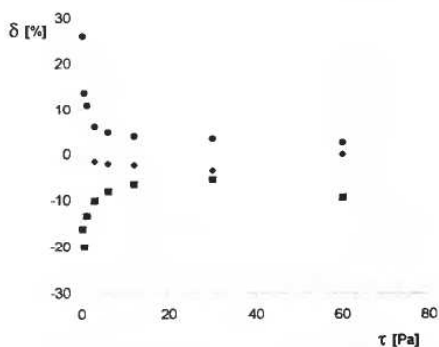
### OMÓWIENIE

Wyniki naszych badań wskazują, że u szczurów poddanych stresowi przez immersję wodną (podgrupa B-1) wystąpiło jedynie nieznaczne obniżenie IE w porównaniu z podgrupą A-1. Obniżenie to zaszło jedynie w zakresie naprężeń ścinających od 3,0 do 30,0 Pa. Zatem obniżka deformowalności erytrocytów w obecnym doświadczeniu była mniejsza w porównaniu z badaniami poprzednimi (Chmiel, Grabowska-Bochenek & Piskorska, 2001), w których czas działania stresu immersji wodnej wynosił 6 godzin. Prawdopodobnie stres trwający 4 godziny był za krótki by doszło do wyraźnego obniżenia odkształcalności krwinek czerwonych. Obniżenie IE zachodzące pod wpływem stresu jest związane z wytwarzaniem w organizmie produktów o bardzo dużej reaktywności, takich jak: reaktywne formy tlenu, wodoru, rodniki hydroksylowe, rodniki tlenu, a także tlenki azotu (Baskurt, Temiz & Meiselman, 1998). Stwierdzono, że produkty te są przyczyną wielu procesów prowadzących do uszkodzenia komórek i tkanek (Soczyński & Bartosz, 1996; Stour, Bilot & Juma, 2000). Szczególne znaczenie w tych procesach ma oksydacja powierzchniowych składników komórek a zwłaszcza oksydacja lipidów błony komórkowej, protein oraz degradacja prote

oglikanów (Beckman, Beckman, Chen, Marshall & Freeman, 1990). Wyżej opisane zmiany dotyczą również krwinek czerwonych (Soczyński & Bartosz, 1997), w wyniku czego dochodzi do obniżenia ich odkształcalności. Jedynie nieznaczne obniżenie IE w naszych badaniach w podgrupie B-1 należy tłumaczyć stosunkowo krótkim czasem ekspozycji na stres. Spadek odkształcalności erytrocytów wywołany stresem oksydacyjnym poprzez wewnątrz jak i zewnątrz komórkową generację anionodnika nadadtlenkowego obserwowali Baskurt i wsp. (Baskurt *et al.*, 1998).

Modyfikacja aktywności syntazy tlenu azotu zastosowana w naszych badaniach u szczurów grupy kontrolnej nie wywołała istotnych zmian odkształcalności erytrocytów. Wydaje się to sprzeczne z wynikami badań innych autorów (Starzyk, Korbut & Gryglewski, 1999), którzy obserwowali spadek odkształcalności erytrocytów po podaniu L-Name zwierzętom doświadczalnym. Stosowali oni jednak krótszy czas obserwacji oraz inną drogę podania leku, co może tłumaczyć obserwowaną rozbieżność wyników.

Natomiast w warunkach stresu wywołanego immersją wodną zablokowanie syntazy tlenu azotu (podgrupa B-2) wywołało - w naszych badaniach - znaczne obniżenie odkształcalności erytrocytów. Wyniki te są zgodne z wynikami autorów (Zinchuk & Borisiuk, 1998), którzy - badając wpływ równoczesnego zastosowania L-Name oraz hipertermii u szczurów - stwierdzili również spadek odkształcalności erytrocytów. W dalszym ciągu naszych badań stwierdziliśmy, że nasilenie aktywności syntazy tlenu azotu poprawia odkształcalność erytrocytów (podgrupa B-3). Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (Starzyk *et al.*, 1999), którzy stwierdzili wzrost odkształcalności erytrocytów po dożylnym podaniu donoru tlenu azotu (SIN-1). Na podstawie uzyskanych wyników nasuwa się hipoteza, że stres wywołany immersją wodną uwrażliwia erytrocyty na działanie tlenu azotu. W rezultacie wzrost aktywności syntazy łączy się ze wzrostem odkształcalności, zaś spadek tej aktywności z jej zmniejszeniem. Badania *in vitro* przeprowadzone przez autorów pracy (Korbut & Gryglewski, 1993) wskazują, że zarówno zbyt mała, jak i zbyt duża koncentracja tlenu azotu powodowała usztywnienie erytrocytów. Jak wynika z naszych wcześniejszych badań - szczególnie erytrocyty poddane stresowi oksydacyjnemu - ulegają w znacznym stopniu podatności na usztywnienie poprzez peroksydację (Chmiel, Turczyński, Grabowska-Bochenek, Olszowy & Kuśmierski, 1999).



Rys. 1. Względna zmiana indeksu elongacji erytrocytów względem podgrupy A-1:  $\blacklozenge$  - w podgrupie B-1,  $\blacksquare$  - w podgrupie B-2,  $\bullet$  - w podgrupie B-3.

## WNIOSKI

Stres wywołany immersją wodną trwającą około 4 godziny u szczura wywołuje nieznacznie zmniejszenie odształcalności erytrocytów.

Zablokowanie syntazy tlenu azotu podczas immersji wodnej prowadzi do stosunkowo znacznego zmniejszenia u szczurów odształcalności erytrocytów.

Zwiększenie aktywności tlenu azotu podczas stresu wywołanego immersją wodną prowadzi u szczurów do miernego zwiększenia odształcalności erytrocytów.

## LITERATURA

- Baskurt O. K., Temiz A. & Meiselman H. J. (1998). Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radical Biology & Medicine* **24**, 102-110.
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. & Freeman B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Chang G., Absalom D. R., Strong A. B., Stubble G. D. & Zingg W. (1988). Physical and hydrodynamic factors affecting erythrocyte adhesion to polymer surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 13-29.
- Chien S. (1987). Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev. Physiol.* **49**, 177-192.
- Chmiel B., Grabowska-Bochenek R. & Piskorska D. (2001). Tirilazad mesylate improve water immersion stress induced decrease in erythrocyte deformability in the rats. *Med. Sci. Monit.* **7**, 38-41.
- Chmiel B., Turczyński B., Grabowska-Bochenek R., Olszowy Z. & Kuśmierski S. (1999). Changes in nitric oxide concentration enhances t-butylhydroperoxide induced decrease in erythrocyte deformability. *Biorheology* **36**, 98.
- Gaetgens P., Duhressen C. & Albrecht K. H. (1980). Motion, deformation and interaction of blood cells and plasma during flow through narrow capillary tubes. *Blood cells.* **6**, 799-812.
- Korbut R. & Gryglewski R. (1993). Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *European Journal of Pharmacology* **234**, 17-22.
- Maeda N. & Shiga T. (1994). Velocity of oxygen transfer and erythrocyte rheology. *News Physiol. Sci.* **9**, 22-27.
- Mohandas N. & Chasis J. A. (1993). Red cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin. Hematol.* **30**, 171-192.
- Nishida K., Ohta Y. & Ishiguro I. (1998). Changes in nitric oxide production with development in the gastric mucosa of rats with water immersion restraint stress. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **100**, 201-212.
- Reilly J., Rivalier E., Compagnon A. & Laplane R. (1934). Hemorragies lésions vasculaires et lymphatiques du tube digestif déterminées par l'injection périsplanchnique de substances diverses. *CR Soc. Biol.* **116**, 24-26.
- Sarelius J. H. (1995). Invited editorial on „Effects of RBC Shape and deformability on pulmonary O<sub>2</sub> diffusing capacity and resistance to flow in rabbit lungs”. *J. Appl. Physiol.* **78**, 763-764.
- Shiga T. (1994). Oxygen transport in microcirculation. *Jpn J. Physiol.* **44**, 19-34.
- Soczyński M. & Bartosz G. (1996). Effect of peroxynitrite on erythrocytes. *Bioch. Bioph. Acta* **1291**, 107-114.
- Soczyński M. & Bartosz G. (1997). Penetration of erythrocytes membrane byperoxynitrite: participation of the anion exchange protein. *Biochemistry and Molecular Biology International* **43**, 319-325.
- Starzyk D., Korbut R. & Gryglewski R. (1999). Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats *ex vivo* and *in vitro*. *J. Physiol. Pharmacol.* **50**, 629-637.
- Stour M. A., Billo Y. Y. & Juma M. (2000). Susceptibility of erythrocytes from non-insulin-dependent diabetes mellitus and hemodialysis patients, cigarette smokers and normal subjects to *in vitro* oxidative stress and loss of deformability. *Clin. Hem. Mic.* **22**, 173-180.
- Stuart J. & Nash G. B. (1990). Red cell deformability and hematological disorders. *Blood Rev.* **4**, 141-147.
- Van der Brug G. E., Peters H. P. F., Hardeman M. R., Schep G. & Mosterd W. L. (1995). Hemorheological response to prolonged exercise; no effects of different kinds of feedings. *Int. J. Sports Med.* **16**, 231-137.
- Yesilkaya A., Ertug Z., Yegin A., Melikoglu M. & Baskurt O. K. (1998). Deformability and oxidant stress in red blood cells under the influence of halothane and isoflurane anesthesia. *Gen. Pharmacol.* **31**, 33-36.
- Zinchuk V. & Borisiuk M. (1998). The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats. *Respir. Physiol.* **113**, 39-45.