



Uticaj toksičnog dejstva kiseonika na membranu eritrocita i mogućnost procene poremećaja funkcije centralnog nervnog sistema

Impact of oxygen toxic action on the erythrocyte membrane and possibility of estimating central nervous system function disturbances

Branislava Belić*, Marko R. Cincović†

*Zavod za transfuziju krvi Vojvodine, Novi Sad, Srbija; †Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Produženo izlaganje hiperbaričnom kiseoniku dovodi do promene oblika eritrocita zbog toksičnog delovanja kiseonika na njihovu membranu. Cilj ovog rada bio je da se ispita veza između pojave patoloških oblika eritrocita u različitim vremenskim periodima od početka izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji i momenta nastanka konvulzije, zatim međusobna veza zastupljenosti različitih patoloških oblika eritrocita tokom izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji, kao i veza između zastupljenosti rupturiranih eritrocita i funkcije centralnog nervnog sistema (CNS) posle završenog hiperbaričnog tretmana. **Metode.** Šezdeset laboratorijskih miševa soja *Mus musculus* izlagano je 100% kiseoniku pod pritiskom od 3,5 apsolutnih atmosfera (ATA). Životinjama je krv uzimana iz rečne vene u 32, 34, 36, 38. i 40. minutu od početka hiperbarične oksigenacije, a prisustvo patoloških oblika eritrocita ispitivano je pomoću elektronskog mikroskopa. Tokom trajanja hiperbarične oksigenacije beleženo je vreme nastanka konvulzija kod eksperimetalnih životinja. Posle dekompresije vršen je neurološki pregled životinja i registrovano je prisustvo (ocena 1), odnosno odsustvo (ocena 0) određenih refleksa. Izračunate su jednačina linearne regresije i Pearson-ov koeficijent korelacije za parametre navedene u ciljevima rada. **Rezultati.** Hiperbarični kiseonik doveo je do oštećenja eritrocita

već u 34. minutu od početka tretmana uz pojavu različitih patoloških oblika eritrocita. Neposredno pred pojavu ireverzibilnih promena (ruptura membrane eritrocita) najzastupljeniji oblik patološki izmenjenih eritrocita bili su ehinociti. Broj oštećenih eritrocita u 34. minutu statistički je značajno korelirao sa stepenom oštećenja eritrocita u kasnijim vremenskim intervalima (36, 38. i 40. minutu od početka hiperbarične oksigenacije). Takođe, broj oštećenih eritrocita bio je u korelaciji i sa pojavom konvulzija. Naime, što je broj oštećenih eritrocita bio veći, konvulzije su se pojavljivale značajno ranije kod ispitivanih jedinki ($p < 0,01$). Utvrđena je i negativna korelacija između broja ireverzibilno oštećenih eritrocita (ruptura) u 40. minutu i neurološkog skora kod ispitivanih životinja ($p < 0,05$). **Zaključak.** Analizom broja izmenjenih eritrocita tokom hiperbarične oksigenacije može se predvideti moment nastanka konvulzija, a samim tim i ograničiti trajanje oksigenacije. Pojava ehinocita ukazuje na skorupturu eritrocita i mogući nastanak konvulzija. Broj rupturiranih eritrocita može ukazati na potencijalno oštećenje funkcije CNS-a i posle prestanka izlaganja kiseoniku pod pritiskom.

Ključne reči: hiperbarična oksigenacija; nervni sistem, centralni; konvulzije; toksičnost, akutna, testovi; eritrociti; miševi.

Abstract

Background/Aim. Prolonged exposure to hyperbaric oxygen leads to changes of erythrocytes shape as a consequence of toxic effects of oxygen on the erythrocyte membrane. The aim of this study was to examine the association between occurrence of pathological forms of erythrocytes at different time from the start of hyperbaric oxygenation and the moment of convulsions occurrence, an interrelationship of different pathological forms of erythrocytes during exposure to hyperbaric oxygenation, as well as the correlation between the presence of ruptured erythrocytes and function

of central nervous system (CNS) after completion of hyperbaric treatment. **Methods.** Sixty laboratory mice, *Mus musculus*, were exposed to the wholly-oxygen pressure of 3.5 absolute atmospheres (ATA). Blood was collected at the 32nd, 34th, 36th, 38th and 40th minutes after the exposure to oxygen. Pathological forms of erythrocytes were examined by electron microscopy. A moment of convulsions occurrence was registered in all animals. After decompression neurological examinations of experimental animals were performed. The Pearson's coefficient of correlation, and linear regression equations for the parameters outlined in the aim of the study were calculated. **Results.** Hyperbaric oxy-

gen caused damages of erythrocytes at the 34th minute after beginning of the treatment. Various forms of abnormal red blood cells occurred, and immediately before the occurrence of irreversible changes (erythrocyte membrane rupture) echinocyte shape was dominated. A significant correlation between the number of damaged red blood cells at 34th minute and their number at the 36th, 38th and 40th minute was found. Convulsions were diagnosed significantly earlier in mice with a greater number of damaged red blood cells ($p < 0.01$). There was a negative correlation between the number of irreversibly damaged red blood cells (ruptured) at the 40th minute and neurological score in the studied animals (p

Uvod

Hiperbarična terapija prvi put je opisana u XVII veku naše ere, kada se pominje hiperbarična komora zvana domiculum. U toku XIX veka javljaju se pretpostavke toksičnog dejstva kiseonika u stanjima produžene anestezije¹. Krajem XIX i početkom XX veka dolazi do usavršavanja mikroskopskih tehnika, uključujući i elektronsku mikroskopiju, koja je pomogla da i ovaj eksperimentalni rad, koji je imao cilj da rasvetli neka zbivanja vezana za morfologiju eritrocita pod uticajem hiperbarične oksigenacije, bude doveden do kraja.

Eritrocit ili crvena ćelija krvi je funkcionalno zrela ćelija periferne krvi, specifičnog oblika, prilagođena prenosu kiseonika iz pluća u periferna tkiva, da bi se zadovoljile potrebe organizma za kiseonikom. Kiseonik je neophodan za stvaranje energije, čime se reguliše i održava funkcionalna sposobnost i unutrašnja ravnoteža ćelije. Transport kiseonika je biohemijski aktivan proces^{2,3}. Prolongirano izlaganje hiperbaričnom kiseoniku dovodi do promene oblika eritrocita zbog toksičnog delovanja kiseonika na membranu eritrocita. U prethodnim ispitivanjima utvrđeno je da postoji veza između intenziteta promena oblika eritrocita i momenta nastanka konvulzija tokom izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji⁴. Tako je pokazano da prilikom izlaganja eksperimentalnih životinja hiperbaričnom kiseoniku od 3,5 apsolutnih atmosfera (ATA) u 40. minutu najveći broj životinja ispolji konvulzije i da tada dominiraju patološke forme eritrocita (80–90%).

Cilj ovog rada bio je da se detaljnije ispita veza između pojave patoloških oblika eritrocita u različitim vremenima od početka izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji i momenta nastanka konvulzija, zatim međusobna veza zastupljenosti različitih patoloških oblika eritrocita tokom izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji, kao i veza između zastupljenosti rupturisanih eritrocita i funkcije centralnog nervnog sistema (CNS) posle završenog hiperbaričnog tretmana.

Metode

Eksperimenti su vršeni na laboratorijskim miševima (*Mus musculus*) starosti 3–5 nedelja, koji su gajeni pod istim uslovima ishrane i nege. Ova vrsta posebno je prilagođena za rad u laboratorijskim uslovima, a poznata je njihova otpornost i visoki nivo preživljavanja, čak i posle ozbiljnjih ope-

< 0.05). **Conclusion.** The analysis of altered erythrocytes during hyperbaric oxygenation could predict a moment of seizures occurrence, and therefore the duration of the therapy with hyperbaric oxygen. Echinocytes indicate impending rupture of red blood cells and a possible occurrence of seizures. An increased number of ruptured red blood cells may also even indicate the potential burden of CNS after cessation of hyperbaric oxygenation.

Key words:

hyperbaric oxygenation; central nervous system; seizures; acute toxicity tests; erythrocytes; mice.

racija. Životinje su bile podeljene na eksperimentalnu i na kontrolnu grupu, po 60 jedinki u svakoj.

Životinje iz eksperimentalne grupe bile su stavljane u hiperbarične komore, posebno namenjene za eksperimentalna istraživanja (tip Dräger 1 200). Životinje iz kontrolne grupe boravile su u komorama, ali nisu izlagane hiperbaričnom kiseoniku.

Komora ima performanse koje omogućuju dostizanje pritiska do 40 ATA. Ovaj tip komore omogućava i stalno praćenje važnih parametara kao što su: EKG, EEG, vrednost parcijalnog pritiska kiseonika, kao i njegove promene. Na komori se nalaze i izvodi za uzorkovanje krvi tokom trajanja tretmana.

Posle hermetizacije počinjalo se sa kompresijom (0,2 bara/minut) koja je kod eksperimentalnih životinja išla do 3,5 ATA. Vreme ekspozicije životinja bilo je oko 40 minuta. Temperatura u komori bila je 37°C, a vlažnost vazduha između 60 i 70%. Navedene vrednosti po standardima predstavljaju zonu komfora u ovim uslovima. Posle ekspozicije, interval dekompresije trajao je oko 30 minuta.

Uzorci krvi uzimani su od eksperimentalnih životinja direktno iz repne vene. Toksični efekti kiseonika na membranu eritrocita posmatrani su elektronskim mikroskopom, a priprema preparata vršena je prema ranije opisanim postupcima^{5,6}.

Krv je uzimana u 32, 34, 36, 38. i 40. minutu od početka izlaganja hiperbaričnim uslovima. Ovo vreme izabrano je na osnovu ranije ispitane pojave nastanka konvulzija kod laboratorijskih pacova⁴, koje predstavljaju kontraindikaciju za dalje izlaganje hiperbaričnim uslovima.

Neurološko ispitivanje CNS-a podrazumevalo je, osim prećenja nastanka konvulzija, sledeće: refleks fleksije, refleks hvatanja, refleks ispravljanja, izazivanje reakcije, test ekvilibrijuma, kornealni refleks, pupilarni refleks, reakciju na auditorni stimulus, refleks odmahivanja glavom, refleks širenja prstiju, što je modifikovano prema Tupper-u i Wallace-u⁷. Postojanje aktivnosti bilo je ocenjeno sa 1, dok je odložena ili spora aktivnost, kao i odsustvo aktivnosti ocenjeno sa 0.

Statistička obrada dobijenih podataka podrazumevala je procenu povezanosti broja izmenjenih eritrocita i momenta nastanka konvulzija, međusobnu povezanost broja i vremena nastanka različitih patoloških oblika eritrocita, kao i povezanosti broja rupturisanih eritrocita i skora neuroloških ispiti-

vanya posle završetka hiperbarične oksigenacije. Statistička značajnost ovih korelacija određivana je pomoću jednačina linerane regresije i Pearson-ovog koeficijenta korelacije. U statističkoj obradi podataka korišćen je statistički paket Statistica 5 (Stat. Soft. Inc.).

Rezultati

Kiseonik pod pritiskom od 3,5 ATA doveo je do pojave patoloških formi eritrocita već u 34. minutu od početka izlaganja životinja hiperbaričnoj oksigenaciji. Broj nepromenjenih eritrocita značajno je opadao tokom trajanja hiperbarične oksigenacije, tako da u 40. minutu od početka tretmana bilo ih je svega 10–20% (tabela 1). Među patološkim oblicima

Rezultati prikazani u tabeli 2 pokazuju da se na osnovu rane pojave patoloških oblika eritrocita može sa visokom značajnošću predvideti pojava drugih patoloških oblika ovih ćelija, pa čak i rupturisanе forme eritrocita u daljem toku izlaganja hiperbaričnom kiseoniku. Ovo je posebno interesantan nalaz, ako se uzme u obzir da se ruptura eritrocita i konvulzije dešavaju u vrlo uskom vremenskom intervalu, pa je na osnovu pojave ranih patoloških formi eritrocita moguće znatno pre pojave konvulzija predvideti njihovo ispoljavanje. Ipak, ovi rezultati zahtevaju obimnija istraživanja na većem broju životinja, uz učestalije merenje. Kada se uporedi jačina korelacije između različitih oblika eritrocita uočava se da najveća korelacija postoji između akantocita i stomatocita, stomatocita i ehinocita, kao i ehinocita i rupturisanih eritro-

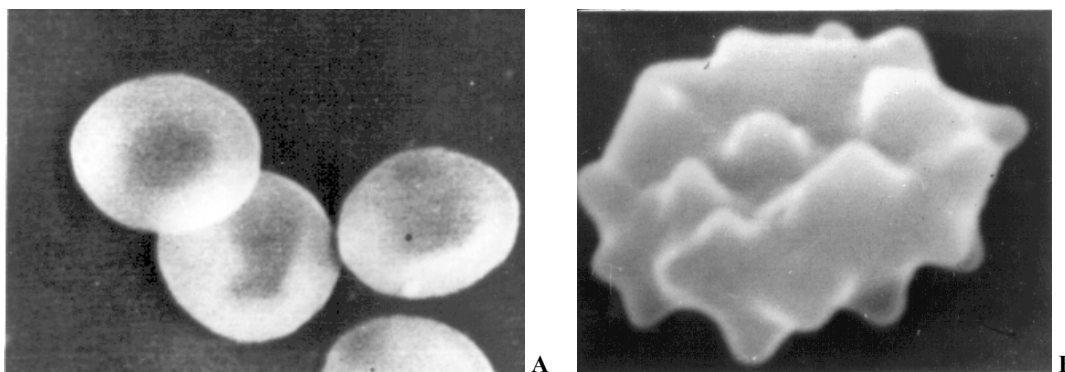
Tabela 1
Zastupljenost patoloških oblika eritrocita (E) kod miševa u 40. minutu od početka izlaganja životinja hiperbaričnoj oksigenaciji (HO)

Vreme od početka HO (min)	Oblici eritrocita (%)				
	Akantocit	Stomatocit	Ehinocit	Rupturisani E	Normalni E
32	0	0	0	0	100
34	1–2	0	0	0	98–99
36	10–15	20–30	0	0	55–70
38	10	10	40–45	0	35–40
40	0	0	55–60	25–30	10–20

eritrocita registrovani su akantociti, stomatociti, ehinociti i eritrociti sa rupturisanom membranom. Oni su se pojavljivali upravo ovim redosledom, tako da je poslednja forma koja je dominirala pred nastanak rupturisanog eritrocita bila forma ehinocita. S druge strane, kod kontrolne grupe životinja, svi eritrociti bili su nepromenjenog oblika (slika 1).

Ovakav nalaz, preslikan na kliničke uslove, sugerise da pojava ehinocita kod bolesnika tokom hiperbarične oksigenacije može ukazati na njihovu osetljivost prema kiseoniku pod pritiskom.

Broj oštećenih eritrocita tokom hiperbarične oksigenacije bio je značajno povezan sa vremenom nastanka konvul-



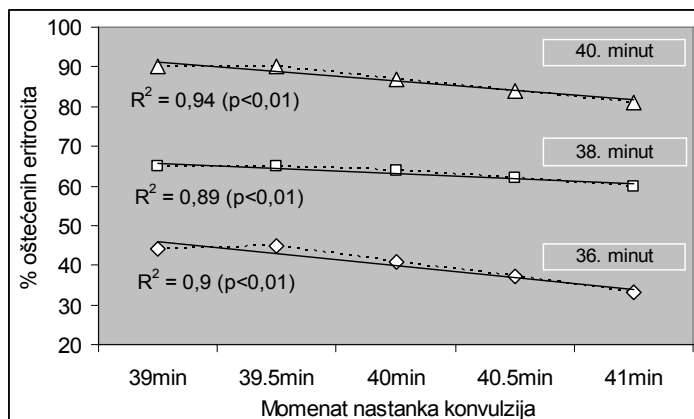
Sl. 1 – Izgled nepromenjenog eritrocita (A) i ehinocita (B) čija pojava prethodi rupturi membrane eritrocita

Tabela 2
Ispitivanje korelacije zastupljenosti patoloških oblika eritrocita (E) u krvi miševa u različito vreme od početka izlaganja životinja hiperbaričnoj oksigenaciji

Oblici eritrocita	36. min akantociti	36. min stomatociti	38. min ehinociti	40. min ehinociti	40. min rupturisani E
36. min akantociti	1	0,85**	0,74**	0,65*	0,59*
36. min stomatociti		1	0,91**	0,71**	0,66*
38. min ehinociti			1	0,89**	0,74**
40. min ehinociti				1	0,92***
40. min rupturisani E					1

* $p < 0,1$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

zija (slika 2). Što je broj oštećenih eritrocita bio veći, konvulzije su se ranije javljale. Ako bi broj oštećenih eritrocita bio nezavisno promenljiva, a vreme pojave konvulzija zavisno promenljiva, formule linearne jednačine za 36, 38. i 40. minutu ekspozicije hiperbaričnoj oksigenaciji bio bi, redom: $y_{36} = 46 - 0,15x$; $y_{38} = 61,851 - 0,3457x$; $y_{40} = 56,941 - 0,1961x$. Pored ovoga, povišen broj rupturiranih eritrocita bio je indikator eventualne kompromitovanosti CNS-a, budući da je bio u značajnoj negativnoj korelaciji sa neurološkim skorom životinja izloženih dejstvu kiseonika pod pritiskom ($p < 0,05$) (slika 3). Najčešće izostali refleksi bili su: refleks hvatanja, ekvilibrjuma, refleks posle izazivanja reakcije, refleks odmahivanja glavom i refleks širenja prstiju.



Sl. 2 – Pojava konvulzija kod miševa u funkciji broja izmenjenih oblika eritrocita u 36, 38. i 40. minutu od početka izlaganja životinja hiperbaričnoj oksigenaciji

Diskusija

Naši rezultati pokazali su da tokom izlaganja eksperimentalnih životinja hiperbaričnom kiseoniku dolazi do promena u obliku eritrocita, pa čak i do pojave ruptura u njihovoj membrani, što predstavlja znak njihovog ireverzibilnog oštećenja. Pojava rupturiranih eritrocita značajno koreliše sa pojavom konvulzija kod životinja izloženih dejstvu kiseonika pod povišenim pritiskom. Budući da je ustanovljena značajna povezanost između pojave pojedinih patoloških formi eritrocita u zavisnosti od trajanja hiperbarične oksidacije, moguće je na osnovu ranih promena u obliku eritrocita predvideti pojavu ozbiljnijih oštećenja ovih ćelija, kao i funkcije CNS-a, što može da ima i praktične implikacije u smislu planiranja trajanja ovakvog tretmana.

Kiseonik, u koncentraciji nižoj od 60% i pod pritiskom od jedne atmosfere ne izaziva toksične efekte. Međutim, pod pritiskom od jedne atmosfere kiseonik se može udisati samo tokom četiri časa bez štetnog dejstva, pod uslovom da ga udiše zdrava, odrasla osoba. Vreme njegovog udisanja bez izazivanja oštećenja skraćuje se sa porastom pritiska. Tako npr. organizam može da udiše kiseonik pod pritiskom od 2 ATA tokom tri časa, a dva časa ako je pod pritiskom od 3 ATA. Najvažnije je davati kiseonik samo onoliko koliko je potrebno, jer je u većim količinama toksičan za svaku živu ćeliju. Simptomatologija trovanja kiseonikom je veoma kompleksna zbog čestog preplitanja simptoma. Prilikom trovanja kiseonikom dolazi do usporavanja oksidacije glukoze,

fruktoze i laktoze, sputavanja hemoreceptora u aorti i *glomus coraticum-u*, povećanja tonusa *nervus vagus-a*, smanjenja minutnog volumena srca, dilatacije krvnih sudova pluća, konstrikcije cerebralnih i renalnih krvnih sudova, pojave tonično-kloničnih konvulzija, plućnog edema, atelektaza i alveolokapilarne blokade⁸.

Toksični efekat kiseonika na CNS naziva se „Bert-ov efekat“, a ime je dobio po Paul-u Bert-u, koji je 1878. godine demonstrirao konvulzije kod ptica izloženih pritisku od 15-20 ATA (apsolutni pritisak vazdušnog omotača). Takozvani „Smith-ov efekat“ predstavlja efekat kiseonika na plućni sistem, koji je dobio naziv po Lorain-u Smith-u, koji je 1899. godine opisao fatalnu pneumoniju kod pacova četi-

ri dana posle izlaganja životinja 73% kiseoniku pod pritiskom od 1 ATA. Kod akutnog trovanja dominiraju simptomi vezani za CNS, dok kod hroničnog trovanja dominiraju pulmonalni simptomi⁹. Detaljnija istraživanja, pored manifestnih konvulzija, pokazala su, i promene u EEG zapisu¹⁰. Razloge pomenutih promena možemo naći u izmenjenoj cirkulaciji u CNS-u, promenama metabolizma NO i NADPH, promenama u citoskeletonu usled oksidativnog stresa i dr¹¹.

Takve promene u eritrocitima mogu se javiti u različitim patološkim procesima, npr. u primarnim i sekundarnim anemijama, ali najčešće bez karakteristične rupture membrane eritrocita. U toksičnoj oksigenaciji rupture nastaju kao posledica specifičnog rasporeda fosfolipida, kada na mestima izmene zid eritrocita postaje umanjeno rigidan¹²⁻¹⁴. Pojava ruptura membrane eritrocita je ireverzibilna, a nastaje na mestu predhodnog istanjenja membrane^{5,6}.

Dalja istraživanja iz ove oblasti treba usmeriti na detaljnija ispitivanja proteinske i lipidne strukture zida eritrocita i ispitivanje enzimske antioksidativne aktivnosti u krvi. U prilog navedenim činjenicama idu i novija istraživanja koja pokazuju da je oksidativni stres značajan patofiziološki mehanizam oštećenja eritrocita u hiperbaričnim uslovima¹⁵.

Ovakva istraživanja mogu imati značaj za planiranje terapije hiperbaričnim kiseonikom u pogledu izbora odgovarajuće doze (pritiska kiseonika) i trajanja tretmana, jer će se na taj način dodatno poboljšati ekonomičnost lečenja i zaštita bolesnika od potencijalno toksičnog efekta kiseonika.

Zaključak

Analizom broja izmenjenih eritrocita tokom hiperbarične oksigenacije može se predvideti momenat nastanka konvulzija, a samim tim i ograničiti trajanje oksigenacije. Pojava

ehinocita ukazuje na skoru rupturu eritrocita i mogući nastanak konvulzija. Broj rupturiranih eritrocita može ukazati na potencijalno oštećenje funkcije CNS-a i posle prestanka izlaganja kiseoniku pod pritiskom.

L I T E R A T U R A

1. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. QJM 2004; 97(7): 385–95.
2. Bruce LJ. Red cell membrane transport abnormalities. Curr Opin Hematol 2008; 15(3): 184–90.
3. Tomaszenski CA, Thom SR. Use of hyperbaric oxygen in toxicology. Emerg Med Clin North Am 1994; 12(2): 437–59.
4. Belić B, Cincović MR. Comparative research of hyperbaric oxygen toxic effect to CNS. and erythrocytes Contemp Agricult 2009; 58(3–4): 52–7.
5. Belić B, Cincović MR, Belić J, Vidović B. Irreversible erythrocyte membrane rupture caused by hyperbaric oxygenation. Contemp Agricult 2010; 59(1–2): 151–5.
6. Belić B. The examination of the toxic effect of the oxygen on the erythrocyte membrane. Chronicle of scientific papers 2008; 32(1): 140–7. (Serbian)
7. Tupper DE, Wallace RB. Utility of the neurological examination in rats. Acta Neurobiol Exp (Wars) 1980; 40(6): 999–1003.
8. Dekleva N. Introduction in hyperbaric medicine. Beograd: Naučna knjiga; 1989. (Serbian)
9. Dharmeskumar NP, Ashish G, Agarwal SB, Praveenkumar G, Krishna KL. Oxygen Toxicity. J Indian Acad Clin Med 2003; 4(3): 234–7.
10. Kurasako T, Takeda Y, Hirakawa M. Increase in cerebral blood flow as a predictor of hyperbaric oxygen-induced convulsion in artificially ventilated rats. Acta Med Okayama 2000; 54(1): 15–20.
11. D'Agostino DP, Colomb DG Jr, Dean JB. Effects of hyperbaric gases on membrane nanostructure and function in neurons. J Appl Physiol 2009; 106(3): 996–1003.
12. Byers TJ, Brandin E, Lue RA, Winograd E, Branton D. The complete sequence of Drosophila beta-spectrin reveals supramotifs comprising eight 106-residue segments. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(13): 6187–91.
13. Mische SM, Morrow JS. Spectrin phosphorylation regulates spectrin subunit interactions. J Cell Biol 1989; 107: 469a.
14. Lambert S, Yu H, Prehal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, et al. cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(5): 1730–4.
15. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Özcan O, Sadir S, Özler M, et al. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. Clin Biochem 2005; 38(8): 706–11.

Primljen 15. 12. 2009.
Revidiran 30.12. 2009.
Prihvaćen 19. 1. 2010.