

Wpływ „morsowania” na stężenie dialdehydu malonowego w erytrocytach i osoczu krwi u zdrowych osób – doniesienie wstępne

The effect of winter swimming on concentration of malondialdehyde in erythrocytes and blood plasma of healthy individuals – a preliminary report

Roland Wesołowski, Celestyna Mila-Kierzenkowska, Karolina Szewczyk-Golec, Alina Woźniak

Katedra Biologii Medycznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

Wprowadzenie: Zmienne warunki środowiska zewnętrznego mogą być przyczyną zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej. Szczególny rodzaj takich zaburzeń u organizmów stałocieplnych wywołany jest za sprawą gwałtownego ochłodzenia. Organizm stara się za wszelką cenę zapobiegać szkodliwym skutkom działania zimna przez uruchamianie wielu reakcji prowadzących do zachowania homeostazy. Pomimo tego mechanizmy te są często niewystarczające i dochodzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego, który przejawia się m.in. wzmożoną peroksydacją lipidów.

Cel badań: Celem niniejszej pracy było oznaczenie wpływu kąpieli w zimnej wodzie na stężenie dialdehydu malonowego (głównego produktu peroksydacji lipidów) u osób regularnie korzystających z kąpieli w zimnej wodzie (morsy) oraz osób wcześniej niekorzystających z regularnych kąpieli w zimnej wodzie (grupa kontrolna).

Materiał i metody: Badaniami objęto grupę 30 osób (15 morsów i 15 osób w grupie kontrolnej). Wszyscy badani poddani zostali ekspozycji na niskie temperatury otoczenia podczas 3-minutowej kąpieli w rzece o temperaturze 0°C, podczas gdy temperatura otoczenia wynosiła +4°C. Krew do badań pobrano przed wejściem do zimnej wody oraz 5 i 30 minut po ochłodzeniu ciała. U wszystkich badanych oznaczono stężenie dialdehydu malonowego (MDA) zarówno w osoczu krwi, jak i erytrocytach.

Wyniki: W pracy wykazano brak istotnych statystycznie różnic między stężeniem MDA w osoczu krwi oraz erytrocytach między morsami i osobami niekorzystającymi z regularnych kąpieli w zimnej wodzie. Zauważono natomiast istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA w osoczu krwi o 19,4% ($p < 0,05$) u morsów 5 minut po wyjściu z zimnej wody, w stosunku do stężenia przed ochłodzeniem organizmu. W erytrocytach morsów zaobserwowano również istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA, zarówno 5 minut (37,1%; $p < 0,05$) jak i 30 minut (33,4%, $p < 0,05$) po wyjściu w zimnej wody, w porównaniu do stanu przed zadziałaniem zimna. W osoczu krwi oraz erytrocytach w grupie kontrolnej nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian stężenia MDA w wyniku ekspozycji na niską temperaturę, ale zaobserwowano niższe wartości stężeń tego markera.

Wnioski: Wykazane w niniejszej pracy obniżenie stężenia MDA po kąpieli w zimnej wodzie u osób regularnie stosujących tego typu zabiegi oraz tendencja do obniżania się tego parametru w grupie kontrolnej, sugerują szybkie i skuteczne usuwanie produktów peroksydacji lipidów w efekcie pojawiającego się przekrwienia obwodowego. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują, że w grupie morsów mechanizmy obrony przed skutkami stresu oksydacyjnego mogą działać sprawniej niż u osób niepoddawanych regularnej ekspozycji na niskie temperatury w wyniku uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych.

Summary

Introduction: Variable environmental conditions can disturb oxidant-antioxidant balance. The particular type of such changes in warm-blooded organisms is caused by sudden cooling. The organism tries to prevent the harmful effects of cold by activating many reactions leading to preserve homeostasis. Nevertheless, these mechanisms are often insufficient and oxidative stress occurs, which is manifested by increased lipid peroxidation.

Purpose of the study: The purpose of the study was to determine the effect of cold water immersion on the concentration of malondialdehyde (the main product of lipid peroxidation) in the blood of regular and novice winter swimmers.

Material and methods: The study was conducted in a group of 30 healthy volunteers, half of whom were regular winter swimmers and half were novices. All participants were exposed to low temperatures during a 3-minute bath in a river, water temperature was 0°C, while the ambient temperature was +4°C. Blood samples were taken three times: at baseline, as well as 5 and 30 minutes after cold water immersion. Concentrations of malondialdehyde (MDA) in both plasma and erythrocytes were determined.

Results: There were no statistically significant differences of plasma and erythrocytic MDA concentrations between regular winter swimmers and controls at baseline. The significant decrease in plasma MDA concentration (19.4%; $p < 0.05$) was observed in regular winter swimmers 5 minutes after leaving the cold water. Likewise, a statistically significant decreases of MDA concentrations were observed in the erythrocytes of the regular winter swimmers, both 5 minutes (37,1%; $p < 0.05$) and 30 minutes (33,4%; $p < 0.05$) after winter swimming. There were no significant changes in MDA concentrations in both blood plasma and erythrocytes of controls due to exposure to low temperatures. Nevertheless, a trend to lower concentrations of these parameters were observed in this group of swimmers.

Conclusions: The decrease of MDA concentration in patients who regularly use cold water immersion and the trend to decrease this parameter in control group demonstrated in this paper may indicate a rapid and effective removal of lipid peroxidation products as a result of peripheral hyperemia. Furthermore, the results suggest that the mechanisms of defence against oxidative stress may be more effective in the regular winter swimmers than in people not regularly exposed to low temperatures. This may point to the activation of adaptive mechanisms as a result of regular cold water immersions.

Słowa kluczowe: dialdehyd malonowy, kąpiele w zimnej wodzie, morsowanie, niskie temperatury, peroksydacja lipidów
Key words: cold water immersion, lipid peroxidation, low temperatures, malondialdehyde, winter swimming

Wprowadzenie

Środowisko życia większości organizmów rzadko jest stałe, dlatego w celu przetrwania niezbędna jest pewnego rodzaju elastyczność na stres środowiskowy [1]. Stresory w postaci związków chemicznych, takich jak zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne, mogą wywołać różne skutki. Razem z naturalnymi bodźcami stresowymi, takimi jak chociażby promieniowanie, mają jednak jeden wspólny efekt. Czynniki środowiskowe mogą przyspieszać produkcję wolnych rodników, czyli związków powstających stale w wyniku wielu fizjologicznych procesów metabolicznych zachodzących w organizmie [2]. Czynniki zewnętrzne pozostają bowiem w ścisłym związku z oksydacyjnymi uszkodzeniami komórek [1]. Wzrost stężenia wolnych rodników tlenowych, bądź też obniżenie sprawności bariery antyoksydacyjnej, jak i współistnienie obu tych czynników jednocześnie, prowadzi do stresu oksydacyjnego [3]. Stres oksydacyjny jest zazwyczaj zjawiskiem niekorzystnym dla organizmu, gdyż dochodzi do przesunięcia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej na korzyść procesów związanych z powstawaniem wolnych rodników tlenowych [4]. Na skutek zachwiania równowagi między procesami powstawania i usuwania reaktywnych form tlenu, dochodzi m. in. do zmian w przepuszczalności błony komórkowej, które prowadzą do jej depolaryzacji [2]. Guzman i wsp. [5] opisują zmiany w potencjale błony komórkowej oraz fosforylacji oksydacyjnej jako łagodne i przejściowe, które przyczyniają się do uruchomienia mechanizmów obronnych organizmu, zapobiegających wystąpieniu stresu oksydacyjnego i jego destrukcyjnym skutkom.

W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi także do peroksydacji lipidów (LPO). Jest to proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład fosfolipidów, podczas którego powstają nadtlenki tych związków [6]. Do fosfolipidów znajdujących się wewnątrz podwójnej warstwy lipidowej, wprowadzone zostają polarne grupy nadtlenkowe, ketonowe, aldehydowe i hydroksylowe. Powoduje to obniżenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błon komórkowych, a także zmianę organizacji podwójnej warstwy lipidowej, co prowadzi do zaburzenia asymetrii lipidowej błon [7]. W wyniku LPO dochodzi również do zahamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących, np. Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-azy [6]. W ostateczności ma miejsce

obniżenie potencjału elektrycznego pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem pozakomórkowym oraz rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, co skutkuje pobudzeniem procesu apoptozy [2, 8]. Przypuszcza się też, że LPO związana jest również z procesami starzenia organizmu [9].

W praktyce laboratoryjnej powszechnie przyjęto, że podwyższone stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS; *thiobarbituric acid reactive substances*) odzwierciedla zwiększoną peroksydację lipidów i jest parametrem wykorzystywanym do jej oceny [6]. Głównym produktem reagującym z kwasem tiobarbiturowym, jak również głównym produktem LPO jest dialdehyd malonowy (MDA) [2, 6], który wykazuje właściwości mutagenne i kancerogenne oraz przyczynia się do powstawania pęknięć nici DNA [10, 11]. Poza dialdehydem malonowym, w procesie peroksydacji lipidów dochodzi również do powstania innych produktów utleniania kwasów tłuszczowych. W przebiegu LPO, w wyniku oderwania atomu wodoru od reszty wielonienasyconego kwasu tłuszczowego następuje przegrupowanie wiązań podwójnych i dochodzi do powstania sprzężonych dienów (CD; *conjugated dienes*). Reaktywne formy tlenu reagują również z innymi związkami m.in. białkami i kwasami nukleinowymi. Pod wpływem utleniania zasad purynowych dochodzi do powstania 8-hydroksy-2'-deoguanozyny [12]. Warto wspomnieć również o 4-hydroksynonenalu, czyli związku opisywanym coraz częściej jako czuły marker stresu oksydacyjnego [13]. W odniesieniu do produktów LPO nie określono jeszcze zakresów referencyjnych, ani nie poznano do końca ich biologicznego działania. Wiadomo jednak, że poprzez bezpośrednie i pośrednie reakcje z biomolekułami wywołują różnokierunkowe patologiczne zmiany, m.in. modyfikując lipoproteiny do form prozapalnych i proaterogennych. MDA jako produkt LPO ma największe znaczenie biologiczne i w literaturze uznawany jest za bardzo dobry marker stresu oksydacyjnego [14, 15]. Zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku procesów oksydacyjnych ma istotne znaczenie w patogenezie wielu chorób, stąd potrzeba prowadzenia dalszych badań, aby lepiej zrozumieć procesy zachodzące w organizmie człowieka zarówno w przebiegu chorób, jak i w następstwie działania czynników zewnętrznych.

W dzisiejszych czasach coraz większym zainteresowaniem cieszy

się morsowanie, czyli korzystanie z kąpeli w akwenach wodnych w okresie zimowym. Jest to ciekawa forma rekreacji ruchowej, jednakże zmiany parametrów biochemicznych krwi zachodzące w czasie takich kąpeli nie zostały dotychczas dobrze poznane. Wiadomo, że ekspozycja na ekstremalnie niskie temperatury (np. podczas krioterapii ogólnoustrojowej) wiąże się z występowaniem stresu oksydacyjnego i uruchomieniem mechanizmów antyoksydacyjnych [16, 17]. Osoby morsujące poprzez swoją aktywność poddane są podobnym zmianom, dochodzi u nich do zjawiska niedokrwienia i reperfuzji. Systematyczne kąpiele w zimnej wodzie mogą zaadaptować ich do takich zmian i zapobiec występowaniu stresu oksydacyjnego.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu kąpeli w zimnym akwenu wodnym na stężenie dialdehydu malonowego, jako markera peroksydacji lipidów, w erytrocytach i osoczu krwi u osób regularnie korzystających z takich kąpeli w okresie jesienno-zimowym (morsowanie) oraz u osób niestosujących tego typu aktywności.

Materiał i metody

Badanie przeprowadzono na grupie 30 mężczyzn. Połowa z nich regularnie korzystała z kąpeli w zimnej wodzie (morsy). Średnia wieku w tej grupie wynosiła 28 (± 7) lat. Pozostałą część grupy badanej (grupa kontrolna), stanowiły osoby, które nigdy wcześniej nie stosowały tego typu aktywności. Średnia ich wieku wynosiła 26 (± 5) lat.

Kryterium włączenia do grupy morsów było regularne morsowanie od co najmniej roku. Osoby te wchodziły do zimnej wody od listopada do marca, raz w tygodniu. Podstawowym kryterium włączenia do grupy kontrolnej było z kolei niewykonywanie tego typu aktywności. Wszystkie osoby badane były zdrowe, nie paliły papierosów oraz nie stosowały środków, które mogłyby wpłynąć na oznaczane parametry, czyli m.in. suplementów diety zawierających witaminy antyoksydacyjne, leków przeciwastmatycznych czy innych.

Wszyscy badani spędzili 3 minuty w rzece Wadąg koło Olsztyna, w wodzie o temperaturze 0°C, podczas gdy temperatura otoczenia wynosiła -4°C. Badania przeprowadzono pod koniec sezonu morsowania (na początku marca), odbywały się pod kontrolą lekarską, a badani zostali poinformowani o ewentualnym ryzy-

ku i możliwości wycofania się z udziału w badaniach w każdej chwili, bez jakichkolwiek konsekwencji. Krew do badań pobrano z żyły odłokciowej trzykrotnie: przed wejściem do wody (próbka kontrolna) oraz 5 i 30 minut po kąpeli w zimnej wodzie. Materiał pobrano do sterylnych probówek w systemie próżniowym, po czym przetransportowano w temperaturze +6°C do laboratorium. W osoczu krwi oraz erytrocytach oznaczono stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Oznaczenie poziomu TBARS przeprowadzono zgodnie z metodą Buege i Austa [18] w modyfikacji Esterbauera i Cheesemana [19]. Produkty peroksydacji lipidów oznaczono wykorzystując do badań kwas tiobarbiturowy (TBA). Głównym produktem peroksydacji lipidów reagującym z kwasem tiobarbiturowym jest dialdehyd malonowy (MDA), dlatego dla uproszczenia poziom wszystkich substancji reagujących z TBA przedstawiono jako stężenie MDA. Do 0,5 ml hemolizatu krwi lub osocza dodano 4,5 ml mieszaniny reakcyjnej o składzie: 0,375% kwasu tiobarbiturowego (TBA) i 15% kwasu trójchlorooctowego (TCA) w 0,25 N HCl. Następnie próbki inkubowano w łaźni wodnej przez 20 minut w temperaturze 100°C w celu optymalizacji warunków reakcji dialdehydu malonowego z kwasem tiobarbiturowym. W kolejnym etapie próbki ochładzano i wirowano w temperaturze +4°C przez 15 minut przy 2000 x g. Po odwirowaniu pobrano supernatant i zmierzono ekstynkcję przy długości fali $\lambda=532$ nm, względem mieszaniny inkubowanej w tych samych warunkach. Stężenie TBARS w erytrocytach wyrażono w nmol MDA/g Hb, natomiast w osoczu w nmol MDA/ml osocza. Analizę statystyczną wykonano stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem porównań post hoc (test HSD Tukeya). Normalność rozkładu potwierdzono testem Kołmogorowa-Smirnowa, natomiast jednorodność wariancji sprawdzono testem Levene'a. Za istotny statystycznie przyjęto współczynnik istotności statystycznej $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie (\pm odchylenie standardowe).

Wyniki

Porównując stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w osoczu krwi oraz erytrocytach między grupą osób niestosujących kąpeli w zimnej wodzie i morsów nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, zarówno przed wejściem do wody, jak i po kąpeli w zimnej wodzie (tab. I). Stężenie MDA w osoczu niekorzystających z re-

Tabela. I. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w osoczu krwi i erytrocytach morsów oraz osób niekorzystających z kąpeli w zimnej wodzie (grupa kontrolna) przed wejściem do zimnej wody oraz 5 i 30 minut po wyjściu z zimnej wody. Wyniki przedstawiono jako $\bar{x}_s \pm SD$.

Grupa	Parametr	Przed wejściem do zimnej wody	5 minut po wyjściu z zimnej wody	30 minut po wyjściu z zimnej wody
Morsy	MDA _{os} [nmol / ml osocza]	0,319 \pm 0,051	0,257 \pm 0,065 *	0,296 \pm 0,049
	MDA _{er} [nmol / g Hb]	30,40 \pm 17,08	19,13 \pm 9,16 *	20,25 \pm 7,92 *
Grupa kontrolna	MDA _{os} [nmol / ml osocza]	0,326 \pm 0,057	0,294 \pm 0,043	0,288 \pm 0,048
	MDA _{er} [nmol / g Hb]	26,82 \pm 9,17	21,14 \pm 7,82	22,96 \pm 9,44

Różnice istotna statystycznie: * versus przed wejściem do zimnej wody ($p < 0,05$)

MDA_{er} – stężenie dialdehydu malonowego w erytrocytach

MDA_{os} – stężenie dialdehydu malonowego w osoczu krwi

gularnych kąpiele w zimnej wodzie po 5 minutach od ekspozycji na niską temperaturę obniżyło się o około 10%, a po 30 minutach było około 12% niższe w stosunku do wartości początkowej (tab. I). Pomimo wykazanej tendencji do obniżania się stężenia MDA w osoczu krwi w grupie kontrolnej, nie stwierdzono występowania różnicy istotnej statystycznie między poszczególnymi badaniami. Stężenie MDA w osoczu krwi w grupie morsów 5 minut od wyjścia z zimnej wody istotnie statystycznie obniżyło się o około 19% ($p < 0,05$), a po 30 minutach było około 7% niższe niż początkowo (tab. I). Stężenie MDA w erytrocytach w grupie kontrolnej po 5 minutach od ekspozycji na niską temperaturę stanowiło wartość około 21% niższą w stosunku do stężenia początkowego. Po 30 minutach od kąpiele w zimnej wodzie stężenie MDA było około 14% niższe w stosunku do stężenia wyjściowego, nie były to jednak różnice istotne statystycznie. Stężenie MDA w erytrocytach w grupie morsów po 5 minutach od kąpiele w zimnej wodzie zmniejszyło się około o 37% ($p < 0,05$). Z kolei po 30 minutach od kąpiele w zimnej wodzie osiągnęło wartość około 33% niższą od stężenia początkowego. Była to również różnica istotna statystycznie na poziomie istotności $p < 0,05$ (tab. I).

Dyskusja

W prezentowanej pracy wykazano, że ekspozycja organizmu na niską temperaturę nie powoduje wzrostu stężenia MDA, co oznacza, że ten czynnik stresowy nie powoduje wzmożonej peroksydacji lipidów u osób poddanych badaniu w ramach niniejszej grupy. Co więcej wykazano, że poziom MDA zarówno w osoczu krwi, jak i erytrocytach 5 i 30 minut po kąpiele w zimnej wodzie obniża się, przy czym jedynie u morsów zmiana ta jest istotna statystycznie. Wykazane w pracy obniżenie stężenia MDA po kąpiele w zimnej wodzie może być wynikiem bardzo szybkiego usuwania tego produktu peroksydacji lipidów po ekspozycji na zimno. Wiadomo, że w wyniku obwodowego przekrwienia dochodzi do poprawy metabolizmu i szybkiego usuwania szkodliwych jego produktów [20]. U osób poddanych wpływowi niskich temperatur najpierw dochodzi do niedokrwienia, a po 3-5 minutach od zadziałania zimna rozpoczyna się faza reperfuzji, w której następuje rozszerzenie naczyń krwionośnych i zwiększenie ukrwienia skóry [21]. Procesy te mogą być zatem odpowiedzialne za usuwanie MDA u osób w naszych badaniach. Przekrwienie występujące na skutek ekspozycji na ekstremalnie niskie temperatury, jako kluczowe zjawisko w usuwaniu szkodliwych produktów przemiany materii, w tym MDA, zostało również wykazane w badaniach nad wpływem kriostymulacji ogólnoustrojowej na równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną u sportowców [22].

W badaniach na pisklętach kurzych zauważono, że hipotermia zmniejsza aktywność życiową, ale nie wpływa na zmiany mitochondrialnych enzymów utleniających [23]. Autorzy nie zaobserwowali jednak wzrostu stężenia MDA w osoczu po ekspozycji na niską temperaturę. Zauważono natomiast wyraźny wzrost peroksydacji lipidów w mózgu i sercach piskląt. Stwierdzono, że oksydacyjne uszkodzenia w mózgu i sercu mogą przyczynić się do zaburzenia mechanizmów fizjologicznych, behawioralnych i termoregulacyjnych, które wzmagają wrażliwość w ekspozycji na niską temperaturę [23]. W prezentowanych wynikach badań

również nie wykazano wzrostu stężenia MDA w osoczu krwi, a zauważono wręcz tendencję do jego obniżania. W odniesieniu do otrzymanych przez Mujahida i Fursuea [23] wyników, nie możemy natomiast wykluczyć wzmożonej peroksydacji lipidów w pozostałych tkankach w grupie osób badanych. W innych badaniach przeprowadzonych na szczurach, Osorio i wsp. [24] oceniali wpływ hipotermii na nasilenie stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny był oznaczany w oparciu o stężenie MDA (zmierzone jako stężenie TBARS) i wyliczany na podstawie stosunku stężenia TBARS do stężenia zredukowanego glutationu oraz stężenia TBARS do stężenia witaminy E. Ekspozycji na niskie temperatury poddano ciężarne szczury, które codziennie przez 30 min pływały w zbiorniku z wodą. Szczury podzielono na trzy grupy. Pierwsza wykonywała zwiększony wysiłek fizyczny (80% maksymalnego obciążenia pracą, w postaci narastającego obciążenia przytwierdzanego do nich podczas pływania) i była wcześniej wytrenowana do tego typu obciążeń, druga również wykonywała porównywalny wysiłek fizyczny, ale nie była wytrenowana. Trzecia grupa pływała bez dodatkowego obciążenia (odpowiednik siedzącego trybu życia). Zauważono, że u szczurów w grupie trzeciej w przebiegu hipotermii występował wyższy wskaźnik stresu oksydacyjnego niż u szczurów, z grup pierwszej i drugiej. Aktywny tryb życia powoduje zatem skuteczniejszą aktywację mechanizmów antyoksydacyjnych w warunkach stresu związanego z obniżeniem temperatury.

Wykazano, że nasilona peroksydacja lipidów jest skorelowana z ostatecznym rozpadem integralności błony oraz śmiercią komórki, mimo to rzadko jest rozważana w kategorii przyczyny śmierci [1]. Davies [3] zauważył, że na podstawie analizy badań laboratoryjnych „powinniśmy szybko umierać z powodu oksydacyjnych uszkodzeń niezbędnych składników komórek, gdyby enzymy i związki antyoksydacyjne były naszym jedynym środkiem obrony”. Dlatego istnieją również wspomagające systemy naprawcze dla utlenionych białek, lipidów błonowych i DNA. Podstawowy system antyoksydacyjny tworzą zarówno wyspecjalizowane enzymy, jak i inne związki, które uczestniczą w usuwaniu wolnych rodników tlenowych oraz zapobiegają ich powstawaniu [2]. Spośród reaktywnych form tlenu, anionorodnik ponadtlenkowy oraz rodnik hydroksylowy znacząco inicjują proces autokatalitycznej peroksydacji lipidów [12]. Reakcje peroksydacji nasilają się w komórkach narażonych na działanie stresu oksydacyjnego, np. w czasie infekcji, w stanach zapalnych, procesach starzenia, jak również w chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworowych [6]. Mogą one być też bardziej intensywne w wyniku działania różnych czynników środowiska zewnętrznego. Blagojević i wsp. [25] zauważyli, że niskie temperatury przyczyniają się do wzrostu produkcji ciepła oraz towarzyszącego temu nasilenia procesów oddychania, zużycia tlenu oraz produkcji wolnych rodników tlenowych. Również Lubkowska i wsp. [26] twierdzą, że ekspozycja na ekstremalnie niskie temperatury skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego, jednak jego poziom nie jest bardzo wysoki. Siems i wsp. [27] zaobserwowali z kolei wzrost stężenia 4-hydroksynonenalu po 15 minutach od ekspozycji na niską temperaturę i obniżenie stężenia tego związku jedną godzinę po ekspozycji, co obrazuje bardzo dynamiczne zmiany w przebiegu LPO. Obniżenie

stężenia 4-hydroksynonenalu świadczy o szybkim zmniejszeniu intensywności peroksydacji lipidów i uruchomieniu mechanizmów ograniczających skutki stresu oksydacyjnego. Pozostaje to w zgodzie z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. W grupie morsów zauważono bowiem istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA w osoczu krwi oraz erytrocytach po 5 oraz 30 minutach od ekspozycji na niską temperaturę. Również w grupie kontrolnej, pomimo braku różnic istotnych statystycznie, zauważono tendencję do obniżania się stężenia MDA w osoczu krwi oraz erytrocytach. Wyniki te mogą zatem świadczyć o nasilonym działaniu elementów bariery antyoksydacyjnej zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Wzmocniona obrona antyoksydacyjna może prowadzić do zmniejszenia ilości anionorodnika nadtlenkowego i rodnika hydroksylowego, które są w znacznej mierze odpowiedzialne za inicjację procesu peroksydacji lipidów. Obniżenie poziomu tych reaktywnych form tlenu może zatem skutkować zmianą stężenia produktów peroksydacji lipidów do poziomu niższego niż przed kąpielą w zimnej wodzie.

Innym mechanizmem odgrywającym istotną rolę w powstawaniu produktów peroksydacji lipidów jest obrona antyoksydacyjna erytrocytów [28]. Krwinki czerwone, ze względu na wysoką zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej, jak również na wysoką zawartość tlenu i hemoglobiny są szczególnie podatne na uszkodzenia związane z występowaniem stresu oksydacyjnego [22]. W otrzymanych w niniejszej pracy wynikach nie zauważono istotnych statystycznie zmian stężenia MDA w erytrocytach osób po raz pierwszy poddanych działaniu niskich temperatur. Zauważono natomiast istotne statystycznie obniżenie stężenia MDA w erytrocytach morsów. Można to tłumaczyć tym, że regularna ekspozycja na niskie temperatury i powtarzające się działanie stresującego bodźca, zmuszają organizm do adaptacji poprzez wytworzenie silnej bariery antyoksydacyjnej właśnie w erytrocytach. W ostatnich latach fizjologiczne mechanizmy odpowiedzi na adaptację do niskiej temperatury stały się przedmiotem licznych badań. Badanie morsów, czyli osób regularnie korzystających w kąpielach w zimnych akwenach wodnych w okresie jesienno-zimowym stanowi dobry model do badań nad adaptacją do zimna u ludzi. Wybiral i wsp. [29] zaobserwowali, że osoby, które regularnie korzystają z kąpielach w zimnej wodzie, są bardziej odporne na działanie zimna. Zauważyli, że u wytrenowanych morsów (kąpiących się regularnie przez okres kilku lat, 2-3 razy w tygodniu w miesiącach od września do marca) obniżenie tempa przemian metabolicznych pod wpływem działania niskich temperatur przebiega wolniej niż u osób niestosujących tego typu zabiegów. Przyczyną tego mogą być zmiany w podwzgórzowych ośrodkach termoregulacji, które za sprawą powtarzających się bodźców stają się bardziej „niewrażliwymi” na zmiany temperatury na powierzchni skóry, odpowiadając wolniejszymi zmianami w krążeniu obwodowym. Istnieją również dane mówiące o pośrednim ograniczeniu utraty ciepła z ciała [29]. Janský i wsp. [30] w swoich badaniach, zaobserwowali u morsów niższą temperaturę spoczynkową ciała, niższe podstawowe tempo przemiany materii oraz obniżenie progu zimna wywołującego termogenezę. Przyjmuje się również, że istotnym czynnikiem, który wpływa na tolerancję zimna, jest grubość tkanki skórno-tłuszczowej. Knechtle

i wsp. [31] zaobserwowali, że osoby z grubszą warstwą tkanki tłuszczowej lepiej znoszą ekspozycję na niskie temperatury i wytrzymują w zimnej wodzie dłużej niż osoby o mniejszej zawartości składników tłuszczowych. Ponieważ stres oksydacyjny może pojawić się wtedy, gdy zwiększa się metabolizm tlenowy tkanek, spowolnienie procesów metabolicznych związane ze zmniejszeniem zapotrzebowania na tlen, wiąże się z generacją mniejszej puli wolnych rodników tlenowych w łańcuchu oddechowym. Efektem takich zmian może być zmniejszenie poziomu peroksydacji lipidów. Sutkowy i wsp. [32] zbadali wpływ kąpielach w zimnej wodzie jako elementu odnowy biologicznej po wysiłku fizycznym na stężenie TBARS. We krwi osób, u których zastosowano immersję w zimnej wodzie zaobserwowano niższe wartości tego parametru niż u osób odpoczywających w temperaturze pokojowej. Mila-Kierzenkowska i wsp. [16] nie zaobserwowali natomiast wzrostu stężenia enzymów antyoksydacyjnych we krwi morsów.

W niniejszej pracy, poprzez porównanie stężenia MDA w osoczu krwi oraz erytrocytach w grupie badanej i kontrolnej podjęto próbę oceny adaptacji do stresu oksydacyjnego wywołanego nagłym, dość gwałtownym ochłodzeniem ciała. Obie grupy charakteryzowały się podobnymi wartościami indeksu masy ciała, stąd na wykazane przez nas różnice między grupami w odpowiedzi na zimno nie miała wpływu grubość tkanki tłuszczowej. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic poziomu MDA między grupami we krwi pobranej przed kąpielą. Podobne wyniki uzyskali wcześniej Paprocki i Wesołowski [33], badając spoczynkowe stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w osoczu krwi oraz erytrocytach morsów i osób niestosujących tego typu zabiegów, również nie wykazali istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do oznaczanych parametrów. Wyniki te zdają się nie potwierdzać istnienia adaptacji organizmu na działanie zimna wykazanej przez Wybiralą i wsp. [29]. Przyczyną rozbieżności może być inny schemat doświadczenia. W badaniach Wybiralą i wsp. [29] grupa badana poddana była zanurzeniu w wodzie o temperaturze +13°C przez okres 1 godziny, w naszych badaniach zastosowano 3-minutową ekspozycję na działanie wody o temperaturze 0°C. Istnieje wiele doniesień, które wskazują na adaptację organizmu do stresu oksydacyjnego u osób regularnie kąpiących się zimą w akwenach wodnych.

Blagojević [34] opisuje reakcje adaptacyjne powstałe w efekcie naturalnej odpowiedzi na czynniki środowiskowe, dotyczące między innymi systemów antyoksydacyjnych, jako najsilniej wspomagających adaptację do niskich temperatur. Siems i wsp. [27] analizowali z kolei wpływ powtarzającego się stresu oksydacyjnego u morsów. Zaobserwowali zwiększoną adaptację o charakterze antyoksydacyjnym u morsów korzystających z kąpielach w zimnej wodzie przez okres co najmniej 2 lat. Zmiany przystosowawcze polegające na zwiększonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych autorzy tłumaczą jako wynik wcześniejszej ekspozycji na stres w postaci kąpielach w zimnej wodzie. Zmiany te zwiększają z kolei odporność na uszkodzenia wynikające z aktywności wolnych rodników tlenowych. Na podstawie przytoczonej literatury i badań własnych można stwierdzić, że powtarzający się stres oksydacyjny indukuje adaptacyjną odpowiedź, która zwiększa tolerancję na stres środowiskowy, i w znaczący sposób przyczyniać

się może do spowolnienia procesu peroksydacji lipidów. Mimo licznych prób wyjaśnienia, fizjologiczne i biochemiczne podstawy stosowania krótkotrwałych kąpeli w zimnej wodzie, pozostają jednak nadal niejasne.

Wnioski

W prezentowanej pracy wykazano, że ekspozycja organizmu na niską temperaturę nie powoduje wzrostu stężenia MDA, co oznacza, że ten czynnik stresowy nie powodował wzmożonej peroksydacji lipidów u osób w badanych grupach. Obniżenie stężenia dialdehydu malonowego w osoczu krwi i erytrocytach osób regularnie korzystających z kąpeli w lodowatej wodzie oraz tendencja do obniżania się poziomu tego związku w grupie kontrolnej mogą być wynikiem szybkiego usuwania niniejszego produktu peroksydacji lipidów w efekcie pojawiającego się przekrwienia obwodowego po ekspozycji na niską temperaturę. Większe zmiany poziomu MDA u morsów niż u osób, które po raz pierwszy poddały się kąpeli w zimnej wodzie, sugerują istnienie adaptacyjnych procesów chroniących przed skutkami stresu oksydacyjnego w wyniku regularnej ekspozycji na niską temperaturę.

Piśmiennictwo

1. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 2011; 434: 201-210.
2. Czajka A. Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Now Lek* 2006; 75: 582-586.
3. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000; 50: 279-289.
4. Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol* 1996; 44: 6-13.
5. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D i wsp. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 2010; 468: 696-700.
6. Grosicka-Maciąg E. Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2011; 65: 357-366.
7. McConnell EJ, Bittelmeyer AM, Raess BU. Irreversible inhibition of plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase and Ca²⁺ transport by 4-OH-2, 3-trans-nonenal. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361: 252-256.
8. Pawliczak R. Rola wolnych rodników tlenowych w zapaleniu. *Pol Merk Lek* 2003; 1: 493-496.
9. Hulbert AJ. Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids? *Integr Comp Biol* 2010; 50: 808-817.
10. Nowis D, Legat M, Grzela T i wsp. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2006; 25: 3365-3374.
11. Valko M, Rhodes C, Moncol J i wsp. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
12. Woźniak A. Wpływ kriostymulacji ogólnoustrojowej i wysiłku fizycznego na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną oraz aktywność enzymów lizosomalnych we krwi kajakarzy i wioślarzy (rozprawa habilitacyjna). Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera, Bydgoszcz, 2005, 19-22.
13. McIntyre TM, Hazen SL. Lipid oxidation and cardiovascular disease: introduction to a review series. *Circ Res* 2010; 107: 1167-1169.
14. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 469-484.
15. Pawłowska M, Mila-Kierzenkowska C, Kwiatkowska A i wsp. Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u chorych na tuszczycę. *Diagn Lab* 2016; 52: 101-106.
16. Mila-Kierzenkowska C, Wozniak A, Boraczynski T i wsp. Thermal stress and oxidant-antioxidant balance in experienced and novice winter swimmers. *J Therm Biol* 2012; 37: 595-601.
17. Sutkowy P, Augustynska B, Wozniak A i wsp. Physical exercise combined with whole-body cryotherapy in evaluating the level of lipid peroxidation products and other oxidant stress indicators in kayakers. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 402631.
18. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
19. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
20. Suszko R. Whole-body cryotherapy. *Rehabil Med* 2003; 7: 63-71.
21. Kasprzak W. Fizjoterapia kliniczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2011, 175-180.
22. Mila-Kierzenkowska C, Wozniak A, Wozniak B i wsp. Whole-body cryostimulation in kayaker women: a study of the effect of cryogenic temperatures on oxidative stress after the exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 2009; 49: 201-207.
23. Mujahid A, Furuse M. Oxidative damage in different tissues of neonatal chicks exposed to low environmental temperature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2009; 152: 604-608.
24. Osorio R, Christofani J, D'Almeida V i wsp. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 135: 89-95.
25. Blagojevic D, Grubor-Lajsic G, Spasic M. Cold defence responses: the role of oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 416-427.
26. Lubkowska A, Dolegowska B, Szygula Z i wsp. Activity of selected enzymes in erythrocytes and level of plasma antioxidants in response to single whole-body cryostimulation in humans. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 387-394.
27. Siems WG, Brenke R, Sommerburg O i wsp. Improved antioxidative protection in winter swimmers. *QJM* 1999; 92: 193-198.
28. Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E i wsp. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84: 1-7.
29. Vybiral S, Lesna I, Jansky L i wsp. Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human catecholamine thermogenesis. *Exp Physiol* 2000; 85: 321-326.
30. Jansky L, Pospisilova D, Honzova S i wsp. Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996; 72: 445-450.
31. Knechtel B, Christinger N, Kohler G i wsp. Swimming in ice cold water. *Ir J Med Sci* 2009; 178: 507-511.
32. Sutkowy P, Woźniak A, Boraczynski T i wsp. Postexercise Impact of Ice-Cold Water Bath on the Oxidant-Antioxidant Balance in Healthy Men. *Biomed Res Int* 2015; 2015: Article ID 706141.
33. Paprocki J, Wesołowski R. Stężenie produktów peroksydacji lipidów u osób regularnie korzystających z kąpeli w zimnej wodzie (morsy) oraz osób niestosujących tego typu zabiegów (streszczenie); International Students' Conference of Medical Sciences [Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów Uczelni Medycznych], Kraków, 28-30 kwietnia 2011. *Przegl Lek* 2011; 68; suplement 1: 52.
34. Blagojevic DP. Antioxidant systems in supporting environmental and programmed adaptations to low temperatures. *CryoLetters* 2007; 28: 137-150.

Autor do korespondencji:

mgr Roland Wesołowski
Katedra Biologii Medycznej CM UMK
85-092 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24
tel. +48 52 585 38 22
e-mail: roland@cm.umk.pl

Otrzymano: 30.06.2017

Akceptacja do druku: 18.09.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono