

INFLUENȚA EXPUNERII ACUTE LA OZON ȘI HIPOXIE HIPOBARĂ ASUPRA BALANȚEI TISULARE OXIDANȚI/ANTIOXIDANȚI ÎN EFORT FIZIC

ÁGNES UGRON¹, SIMONA TACHE², NICOLETA DECEA², REMUS MOLDOVAN²

¹Departamentul Discipline teoretice și kinetoterapie, Facultatea de Educație Fizică și Sport, Universitatea „Babeș-Bolyai” Cluj-Napoca

²Departamentul Fiziologie, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Rezumat

Obiective. S-a studiat influența postexpunerii acute la O_3 și hipoxie hipobară asupra reactivității redox tisulare, în condiții de repaus și efort la nivelul creierului, miocardului, plămânilor și mușchilor striati.

Materiale și metode. Cercetările au fost efectuate pe 3 loturi de șobolani albi masculi rasa Wistar: Lotul I – control, sedentari în condiții de normoxie; Lotul II – sedentari expuși la stres combinat acut: O_3 acut + hipoxie hipobară; Lotul III – animale expuse la un stres acut combinat, urmat de efort. Expunerea simulată s-a făcut la camera hipobarică timp de 3 zile, 20 de ore pe zi la 2500 m. Expunerea la ozon s-a făcut timp de 3 zile, zilnic 5 min. Lotul III a fost antrenat zilnic timp de 3 zile în condiții de normoxie, prin proba de înot. În vederea determinării indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți (O/AO), s-au recoltat, în ziua a 3-a, probe din țesuturi: creier, miocard, plămâni și mușchiul cvadriceps femural.

Rezultate. Animalele supuse efortului fizic postexpunere la stres combinat, față de martori prezintă creșterea semnificativă a stresului oxidativ (SO) la nivel pulmonar. La nivelul miocardului și mușchiului striat se constată modificări ale SO, similare celor găsite la animale sedentare supuse stresului combinat. La nivel cerebral se constată scăderea semnificativă a SO simultan cu scăderea semnificativă a apărării AO, atât față de lotul martor, cât și față de lotul sedentar supus stresului combinat.

Concluzii. Efortul fizic prestat postexpunere acută la O_3 și hipoxie hipobară determină modificări ale balanței O/AO la nivel tisular pulmonar, miocardic și cerebral. Modificările adaptative majore sunt la nivel pulmonar, unde crește SO, simultan cu creșterea apărării AO.

Cuvinte cheie: expunere acută, hipoxia hipobară, ozon, balanța O/AO, efort fizic.

INFLUENCE OF ACUTE OZONE AND HYPOBARIC HYPOXIA EXPOSURE ON THE TISSUE OXIDANT/ANTIOXIDANT BALANCE IN PHYSICAL EXERCISE

Abstract

Aims. The influence of acute O_3 and hypobaric hypoxia exposure on tissue redox reactivity during rest and exercise conditions was studied in the brain, myocardium, lungs and striated muscles.

Material and methods. The investigation was performed in 3 groups of white male Wistar rats: group I – control group, sedentary rats under normoxia conditions; group II – sedentary rats exposed to acute combined stress: acute O_3 + hypobaric hypoxia; group III – animals exposed to acute combined stress, followed by exercise.

Exposure was simulated in the hypobaric chamber for 3 days, 20 hours a day, at 2500 m. Ozone exposure was performed for 3 days, 5 min daily. Group III was trained daily for 3 days under normoxia conditions, by the swimming test. In order to measure the indicators of the oxidant/antioxidant (O/AO) balance, on day 3 tissue samples were taken from the brain, myocardium, lungs and femoral quadriceps muscle.

Results. *Animals undergoing physical exercise after acute combined stress exposure have a significant increase in oxidative stress (OS) in the lungs compared to controls. In the myocardium and striated muscle, there are OS changes similar to those found in sedentary animals exposed to combined stress. In the brain, there is a significant decrease in OS simultaneously with a significant decrease in AO defense compared to both the control group and the sedentary group exposed to combined stress.*

Conclusions. *Physical exercise performed after acute O₃ and hypobaric hypoxia exposure induces significant changes in the O/AO balance in pulmonary, myocardial and brain tissue. Major adaptive changes occur in the lungs, where OS and AO defense increase simultaneously.*

Keywords: acute exposure, hypobaric hypoxia, ozone, oxidant/antioxidant balance, physical exercise.

INTRODUCERE

Cercetările noastre experimentale anterioare [1] privind efectul preexpunerilor acute la O₃ cu reducerea capacității maxime de efort și efectul preexpunerii acute asociate la O₃ și hipoxie hipobară moderată, cu creșterea semnificativă a capacității maxime de efort, ne-au determinat să studiem modificările biochimice acute ale balanței oxidanți/antioxidanți (O/AO) în aceleași condiții, având în vedere stresul oxinitrozativ (SON) generat de efort și de factorii ambientali: O₃ acut și hipoxia hipobară. Creșterea capacității maxime de efort la animale, postexpunere la un stres combinat [1], **poate fi atribuită** creșterii DH. Precondiționarea hipoxică cu O₃ are efectele cele mai semnificative asupra creșterii capacității maxime de efort, care s-ar putea datora efectelor protective ale O₃ asupra musculaturii scheletice în efort și stresului oxidativ (SO) de efort via glutatation, hemoxigenază-1 (HO-1) și metalotioneină, care mediază capacitatea antioxidantivă [1,2].

Expunerea acută la factori ambientali asociați, O₃ și hipoxie hipobară moderată, ar putea fi recomandată pentru îmbunătățirea performanțelor fizice și a capacității de apărare AO la sportivi [3].

OBIECTIVE

S-a studiat influența postexpunerii acute la O₃ și hipoxie hipobară asupra reactivității redox tisulare în condiții de repaus și efort la nivelul creierului, miocardului, plămânilor și mușchilor striati.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate în Laboratorul Expe-

rimental al Catedrei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, pe 3 loturi de șobolani albi masculi, rasa Wistar (n=10 animale/lot), cu greutate de 280-300 g, menținuți în condiții de vivarium adecvate. Pe timpul cercetării experimentale a fost respectată legislația în vigoare privind protecția animalelor; la terminarea experimentului animalele au fost eutanasiate.

Loturi

Loturile au fost împărțite astfel:

- Lotul I – control, sedentari în condiții de normoxie. Normoxia corespunde altitudinii de 364 m, O₂: 20,93%;
- Lotul II – sedentari expuși la stres combinat acut: O₃ acut + hipoxie hipobară moderată;
- Lotul III – animale expuse la un stres acut combinat (O₃ acut + hipoxie hipobară moderată), urmat de efort, în condiții de normoxie.

Metode

a) Expunerea la ozon

Expunerea la ozon s-a făcut timp de 3 zile, zilnic 5 min la 0,5 ppm, conform normelor UE, utilizând aparatul AIR O₃NE Labor (SC Triox SRL).

b) Expunerea la hipoxie moderată acută

Expunerea simulată la hipoxie moderată acută s-a făcut la camera hipobarică, cu pompa vid KB0016D, timp de 3 zile, 20 de ore pe zi, corespunzător altitudinii de 2500 m, pO₂ – 117 mmHg, 15% O₂, din dotarea Laboratorului Experimental al Catedrei de Fiziologie. Întreruperea zilnică a hipoxiei a fost necesară pentru nutriția animalelor, igienizarea cuștilor și pentru efectuarea efortului.

c) Proba de efort

Lotul III a fost antrenat zilnic timp de 3 zile în condiții de normoxie, prin proba de înot. Proba s-a efectuat într-un bazin cu apă termostată 32°C. Durata probei s-a calculat în secunde.

d) Explorarea balanței oxidanți-antioxidanți

Determinările biochimice au fost efectuate în Laboratorul pentru Studiul Stresului Oxidativ din cadrul Catedrei de Fiziologie, a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

În vederea determinării indicatorilor balanței oxidanți/antioxidanți s-au recoltat de la animalele anesteziate probe din țesuturi: creier, miocard, plămâni și mușchiul cvadriiceps femural. Momentul analizat a fost ziua a 3-a.

Ca indicatori pentru stresul oxidativ s-au dozat:

- malondialdehida (MDA) (metoda de dozare prin fluorescență, după Conti) [4]; **valorile de concentrație sunt exprimate în nmoli/ml;**

- proteinele carbonilate (PC) (determinarea proteinelor carbonilate după Reznick) [5]; **valorile de concentrație sunt exprimate în nmoli/mg proteine.**

Ca indicatori pentru apărarea antioxidantă s-au dozat:

- capacitatea de donori de hidrogen (DH) (metoda de dozare după Janaszewska) [6]; **valorile s-au exprimat în procente de inhibiție (i%);**

- conținutul de grupări sulfhidril (tiol) totale (SH) (determinarea grupărilor SH după Hu) [7]; **valorile sunt exprimate în μmoli/ml.**

e) Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul programelor SPSS 19.0 și aplicației Microsoft Excel.

REZULTATE**a) Analiza statistică comparativă a indicatorilor balanței O/AO**

S-au comparat indicatorii balanței tisulare O/AO la animale sedentare și care au efectuat efort fizic, în condiții de normoxie postexpunere la O₃. Majoritatea comparațiilor au fost semnificative (Tabelele I, II, III și IV).

Tabelul I. Analiza statistică comparativă a indicatorilor balanței O/AO în creier la loturile studiate.

Lotul A	Lotul B	MDA	PC	DH	SH
Lotul I	Lotul II	.715	.000	.000	.132
Lotul I	Lotul III	.281	.000	.000	.639
Lotul II	Lotul III	.157	.000	.025	.282

Tabelul II. Analiza statistică comparativă a indicatorilor balanței O/AO în miocard la loturile studiate.

Lotul A	Lotul B	MDA	PC	DH	SH
Lotul I	Lotul II	.000	.000	.332	.002
Lotul I	Lotul III	.000	.000	.000	.052
Lotul II	Lotul III	.000	.000	.000	.148

Tabelul III. Analiza statistică comparativă a indicatorilor balanței O/AO în plămâni la loturile studiate.

Lotul A	Lotul B	MDA	PC	DH	SH
Lotul I	Lotul II	.000	.018	.000	.000
Lotul I	Lotul III	.093	.000	.001	.000
Lotul II	Lotul III	.003	.000	.000	.000

Tabelul IV. Analiza statistică comparativă a indicatorilor balanței O/AO în mușchi la loturile studiate.

Lotul A	Lotul B	MDA	PC	DH	SH
Lotul I	Lotul II	.005	.000	.917	.005
Lotul I	Lotul III	.003	.000	.639	.270
Lotul II	Lotul III	.816	.393	.714	.050

b) Corelațiile pentru indicatorii balanței O/AO pe loturi

Sunt prezentați coeficienții de corelație Pearson *r* între indicatorii balanței O/AO la fiecare lot de animale în tabelele V, VI, VII și VIII. Semnificația a fost luată la **p*≤0.05 și ***p*≤0.01.

Tabelul V. Corelația între indicatorii balanței O/AO în creier la loturile studiate și semnificația.

Indicatori		Lotul I	Lotul II	Lotul III
MDA – PC	<i>r</i>	-.683	-.912	-.453
	<i>p</i>	.317	.088	.547
MDA – DH	<i>r</i>	.953*	.416	.931
	<i>p</i>	.047	.584	.069
MDA – SH	<i>r</i>	-.333	-.200	-.052
	<i>p</i>	.667	.800	.948
PC – DH	<i>r</i>	-.527	-.153	-.117
	<i>p</i>	.473	.847	.883
PC – SH	<i>r</i>	.914	-.083	.876
	<i>p</i>	.086	.917	.124
DH – SH	<i>r</i>	-.140	-.972*	.316
	<i>p</i>	.860	.028	.684

Tabelul VI. Corelația între indicatorii balanței O/AO în miocard la loturile studiate și semnificația.

Indicatori		Lotul I	Lotul II	Lotul III
MDA – PC	<i>r</i>	.140	-.844	-.524
	<i>p</i>	.860	.156	.476
MDA – DH	<i>r</i>	.561	-.975*	-.850
	<i>p</i>	.439	.025	.150
MDA – SH	<i>r</i>	-.196	-.650	-.454
	<i>p</i>	.804	.350	.546
PC – DH	<i>r</i>	.851	.704	.859
	<i>p</i>	.149	.296	.141
PC – SH	<i>r</i>	-.988*	.801	.951*
	<i>p</i>	.012	.199	.049
DH – SH	<i>r</i>	-.826	.533	.729
	<i>p</i>	.174	.467	.271

Tabelul VII. Corelația între indicatorii balanței O/AO în plămâni la loturile studiate și semnificația.

Indicatori		Lotul I	Lotul II	Lotul III
MDA – PC	<i>r</i>	.371	-.606	.945
	<i>p</i>	.629	.394	.055
MDA – DH	<i>r</i>	.105	-.953*	-.931
	<i>p</i>	.895	.047	.069
MDA – SH	<i>r</i>	-.660	-.981*	.989*
	<i>p</i>	.340	.019	.011
PC – DH	<i>r</i>	-.836	.420	-.810
	<i>p</i>	.164	.580	.190
PC – SH	<i>r</i>	-.835	.489	.981*
	<i>p</i>	.165	.511	.019
DH – SH	<i>r</i>	.657	.994**	-.882
	<i>p</i>	.343	.006	.118

Tabelul VIII. Corelația între indicatorii balanței O/AO în mușchi la loturile studiate și semnificația.

Indicatori		Lotul I	Lotul II	Lotul III
MDA – PC	r	.111	-.917	-.967*
	p	.889	.083	.033
MDA – DH	r	.819	-.931	.819
	p	.181	.069	.181
MDA – SH	r	.264	-.891	-.992**
	p	.736	.109	.008
PC – DH	r	-.372	.810	-.785
	p	.628	.190	.215
PC – SH	r	-.842	.998**	.944
	p	.158	.002	.056
DH – SH	r	.490	.786	-.879
	p	.510	.214	.121

DISCUȚII

a) Analiza pe loturi

Expunerea acută la un stres combinat: O₃ și hipoxie hipobară (lotul II) determină, față de animalele sedentare expuse la normoxie (lotul I): creșterea semnificativă a PC și scăderea semnificativă a DH în creier; creșterea semnificativă a MDA, PC și a grupărilor SH în miocard; scăderea semnificativă a MDA, PC, DH și grupărilor SH în plămâni și creșterea semnificativă a MDA și grupărilor SH, scăderea semnificativă a PC în mușchi.

Expunerea la un stres acut combinat (O₃ acut + hipoxie moderată), urmat de efort (lotul III) determină, față de animalele sedentare expuse acut la normoxie (lotul I): scăderea semnificativă a PC și DH în creier; creșterea semnificativă a MDA, PC și scăderea semnificativă a DH în miocard; creșterea semnificativă a PC și grupărilor SH și scăderea semnificativă a DH în plămâni și creșterea semnificativă a MDA și scăderea semnificativă a PC în mușchi.

Asocierea expunerii acute la O₃ și hipoxiei hipobare acută preefort (lotul III) determină, față de animalele sedentare expuse acut la un stres combinat (lotul II): scăderea semnificativă a PC și DH în creier; creșterea semnificativă a MDA, PC și scăderea semnificativă a DH în miocard; creșterea semnificativă a MDA, PC, DH și grupărilor SH în plămâni și modificări nesemnificative ale MDA, PC și DH și scăderea semnificativă a grupărilor SH în mușchi.

b) Analiza pe țesuturi

În creier, la animalele expuse la un stres acut combinat (O₃ acut + hipoxie moderată), urmat de efort (lotul III), se constată scăderea semnificativă a SO pe seama PC și a apărării AO pe seama DH, față de loturile sedentare (lotul I și lotul II).

În miocard, la animalele expuse la un stres combinat, urmat de efort (lotul III), se constată creșterea semnificativă a SO pe seama MDA și PC și scăderea semnificativă a apărării AO pe seama DH, față de loturile sedentare (lotul I și lotul II).

În plămâni, la animalele expuse la un stres combinat urmat de efort (lotul III) se constată creșterea semnificativă

a SO pe seama MDA și pe seama PC, față de loturile sedentare (lotul I și lotul II) și creșterea semnificativă a apărării AO pe seama grupărilor SH, față de loturile sedentare (lotul I și lotul II).

În mușchi, la animalele expuse la un stres combinat urmat de efort (lotul III) se constată scăderea semnificativă a apărării AO pe seama grupărilor SH, față de animale sedentare expuse acut la un stres combinat (lotul II) și creșterea semnificativă a SO pe seama MDA și scăderea PC față de loturile sedentare (lotul I și lotul II).

c) Analiza corelațiilor între indicatorii balanței tisulare O/AO

Între indicatorii balanței tisulare O/AO se evidențiază corelații semnificative în creier: la animalele sedentare între MDA și DH, precum și la animalele sedentare expuse acut la un stres combinat între DH și grupările SH la lotul II; în miocard: la animalele sedentare între PC și grupările SH la lotul I, la animalele sedentare expuse acut la un stres combinat între MDA și DH la lotul II, precum și la animalele antrenate după expunere la un stres acut combinat între PC și grupările SH la lotul III; în plămâni: la animalele sedentare expuse acut la un stres combinat între MDA și DH, între MDA și grupările SH, între DH și grupările SH la lotul II, precum și la animalele antrenate după expunere la un stres acut combinat între MDA și grupările SH la lotul III; în mușchi: la animalele sedentare expuse acut la un stres combinat între PC și grupările SH la lotul II, precum și la animalele antrenate după expunere la un stres acut combinat între MDA și grupările SH, între MDA și grupările SH la lotul III.

Rezultatele noastre arată că, față de martori (lotul I), la animale sedentare supuse stresului combinat (lotul II) au loc scăderi semnificative ale SO (pe seama MDA și PC) și apărării AO (pe seama DH și SH) în plămâni și creșteri semnificative ale SO în miocard (pe seama MDA și PC) și mușchi (pe seama MDA), cu creșteri semnificative ale apărării AO în aceleași țesuturi (pe seama grupărilor SH). La nivel cerebral modificările semnificative interesează PC, care cresc și DH, care scad.

Animalele supuse efortului fizic postexpunere la stres combinat (lotul III), față de martori (lotul I), prezintă creșterea semnificativă a SO (pe seama MDA și PC) și scăderea semnificativă a DH cu creșterea semnificativă a grupărilor SH la nivel pulmonar. Creșterea SO poate fi atribuită efortului fizic postexpunere asociat cu creșterea apărării AO pe seama grupărilor SH și DH. La nivelul miocardului și mușchiului striat se constată modificări ale SO pentru MDA și PC, similare celor găsite la animale sedentare supuse stresului combinat (lotul II). La nivel cerebral se constată scăderea semnificativă a SO pe seama PC, simultan cu scăderea semnificativă a apărării AO pe seama DH, atât față de lotul martor (lotul I), cât și față de lotul sedentar supus stresului combinat (lotul II).

CONCLUZII

1. Efortul fizic prestat postexpunere acută la O₃ și hipoxie hipobară determină modificări ale balanței O/AO la nivel tisular pulmonar, miocardic și cerebral.
2. Modificările adaptative majore sunt la nivel pulmonar, unde crește SO, simultan cu creșterea apărării AO.
3. La nivelul miocardului se constată creșterea SO și scăderea apărării AO.
4. La nivel cerebral se constată scăderea SO și apărării AO.
5. La nivel muscular au loc scăderi ale apărării AO.

Precizări

Lucrarea se bazează pe cercetări din cadrul tezei de doctorat a primului autor.

Bibliografie

1. Ugron Á, Tache S, Moldovan R. The effect of acute moderate hypoxia and acute ozone exposure on exercise performance in rats. *Studia Educatio Artis Gymnasticae*. 2011; LVI.(4): 47-54.
2. Saxena S, Shukla D, Saxena S, et al. Hypoxia preconditioning by cobalt chloride enhances endurance performance and protects skeletal muscles from exercise-induced oxidative damage in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Nov; 200(3):249-63.
3. Ugron Á, Bidian C, Moldovan R, Decea N, Boroș-Balint I, Tache S. Influence of acute ozone and hypobaric hypoxia exposure on the serum oxidant/ antioxidant balance in physical exercise. *Studia Educatio Artis Gymnasticae*. 2012; LVII(1):101-108.
4. Conti M, Moran PC, Levillain P. et al. Improved fluorimetric determination of malondialdehyde. *Clin.Chem*. 1991; 37:1273-1275.
5. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 1994; 233: 357 - 363.
6. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Lab. Invest*. 2002;62:231-236.
7. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology* 1994; 233:380-384.