



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

**УТИЦАЈ ХИПЕРБАРИЧНЕ ОКСИГЕНО-  
ТЕРАПИЈЕ НА РЕГУЛАЦИЈУ ОКСИДАТИВНЕ  
ХОМЕОСТАЗЕ И ЛЕЧЕЊЕ БОЛЕСНИКА СА  
СИСТЕМСКИМ ЕРИТЕМСКИМ ЛУПУСОМ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Милорад Рабреновић

Ментор: др сци. мед. Владимир Јаковљевић, редовни професор

## ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b>I Аутор</b>	
Име и презиме:	Милорад Рабреновић
Датум и место рођења:	01. 05. 1960. Зајечар
Садашње запослење:	Центар за хипербаричну медицину, Војномедицинска Академија Београд
<b>II Докторска дисертација</b>	
Наслов:	Утицај хипербаричне оксигено терапије на регулацију оксидативне хомеостазе и лечење болесника са системским еритематским лупусом
Број страница:	100
Број слика:	23
Број библиографских података:	155
Установа и место где је рад израђен:	Клиника за реуматологију, ВМА Институт за био-хемију, ВМА Институт за Физиологију Медицински факултет Крагујевац ЦХБМ ВМА
Научна област (УДК):	Физиологија/Интерна Медицина
Ментор:	проф. др сци. мед. Владимир Јаковљевић
<b>III Оцена и одбрана</b>	
Датум пријаве теме:	15. 11. 2013. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	IV-03-109/14 од 05. 03. 2014.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	проф. др Зоран Ковачевић, председник проф. др Зорица Јовановић, члан проф. др Милан Петронијевић, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	проф. др Александра Томић-Лучић, председник проф. др Милан Петронијевић, члан доц. др Мирјана Веселиновић, члан
Датум одбране дисертације:	

## Захвалница

---

Овом приликом се захваљујем свом ментору проф. др сци. мед. Владимиру Јаковљевићу на иницијативи у избору теме, али и на конструктивном и активном учешћу у мом истраживању. Својим стрпљењем и стручним саветима његова помоћ ми је била од велике важности, за коначну израду докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем Институту за биохемију ВМА, али посебно доц. др Тамари Ђурић и колегама Института за физиологију Медицинског факултета Крагујевац. Такође се захваљујем проф. др Милану Петронијевићу на моралној подршци и стручним саветима.

Захваљујем се колективу Центра за Хипербаричну медицину ВМА на помоћи у раду и прикупљању неопходних података.

Посебну захвалност дугујем својој сестри прим. доц. др Виолети Рабровић на великој стручној, саветодавној и моралној подршци, као и својој породици у оним тренуцима када сам хтео да одустанем и када ми се чинило да ће ми лакше бити да прекинем рад на тези, подршка сестре и породице и енергија коју су ми пружили довела је да се ова докторска дисертација доведе до краја.

---

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>6</b>
1.1 Системски еритемски лупус .....	6
Дефиниција .....	6
Етиопатогенеза.....	6
Клинички облици.....	8
Лечење .....	13
Хипербарична оксигенотерапија у лечењу системског лупуса еритематодуса.....	13
1.2 Хипербарична медицина.....	14
Увод.....	14
Историски развој лечења Хипербаричне оксигенације.....	14
Физиолошки аспект Хипербаричне оксигенације.....	15
Контраиндикације за примене ХБО терапије.....	17
Рекомпресивне или хипербаричне коморе .....	19
Увод.....	19
Карактеристике комора.....	19
Мере опреза.....	22
1.3 Оксидационо- редуccionи процеси.....	23
Слободни радикали .....	23
1.4. Реактивне кисеоничне врсте (ROS).....	24
Оксидациони стрес .....	25
Настанак и особине појединих врста ROS.....	27
Водоник пероксид $H_2O_2$ .....	28
Хидроксил радикал ( $\bullet OH$ ) .....	30
Синглет кисеоник ( $^1O_2$ ).....	31
Липидна пероксидација (TBARS).....	31
1.5 Реактивне азотне врсте (RNS) .....	34
Азот моноксид (NO).....	34
1.6 Антиоксидативни заштитни систем (AOS).....	37
Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система .....	38
Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система .....	40
1.7 L—Цитрулин.....	41
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>43</b>
2.1 Циљеви и хипотезе студије .....	43
Циљеви студије .....	43

---

Хипотезе студије .....	43
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД .....</b>	<b>44</b>
Испитаници .....	44
Параметри оксидационог стреса .....	45
Одређивање супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) .....	45
Одређивање водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) .....	46
Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS) .....	47
Одређивање нитрита ( $NO_2^-$ ) .....	48
Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD) .....	49
Одређивање активности каталазе (CAT) .....	50
Одређивање активности глутатиона (GSH) .....	51
Одређивање нивоа L- Citrullina .....	51
Статистичка анализа .....	52
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>53</b>
Прооксидативни параметри – резултати .....	58
Антиоксидативни параметри – резултати .....	63
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>67</b>
Утицај хипербаричне терапија на СЕЛ .....	67
Утицај хипербаричне терапије на оксидациони стрес .....	70
Утицај хипербаричне терапије на параметре антиоксидационе одбране .....	71
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>73</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>75</b>
<b>ПРИЛОЗИ .....</b>	<b>85</b>

---

# 1. УВОД

---

## 1.1 Системски еритемски лупус

---

### Дефиниција

Системски лупус еритематодус лупус је хронично инфламацијско обољење које припада групи болести имуних комплекса. Процес примарно захвата васкуларно и везивно ткиво разних органа: кожу, бубреге, зглобове, серозне мембране и крвне судове. СЛЕ се јавља првенствено у жена око 90% најчешће између 20 и 40 година. Јавља се нагло, али углавном има хроничан ток са епизодама егзарцедације. Патолошкоанатомски карактерише се фиброидном дегенерацијом везивног ткива, верикозним ендокардитисом и нефритисом. Карактеристика ове болести је различита имунолошка абнормалност, са појавом аутоантитела која учествују у имунолошким променама ткива [1, 2].

### Етиопатогенеза

Етиологија СЛЕ није дефинитивно разјашњена јер на механизам настанка утичу генетски чиниоци, инфекцијски и имуни чиниоци, ултра љубичаста светлост, пол, трудноћа, лекови и емоционална напетост [3, 4]. Потврда за генетску предиспозицију су монозиготни близанци код којих се налази HLA-DR2 и HLA-DR3 – антигена [5]. Као могући узрок у настанку СЛЕ наводе се вирусне инфекције, пошто су нађене инклузије сличне вирусима у цитоплазми ендотелних ћелија капилара бубрега, синовији и других ткива које личе на миксо вирусе и парамиксовирусе, као и налаз повишеног титра антитела против Epstein-Barrовог вируса. Нађени налаз антитела против двоструке рибонуклеинске киселине код оболелих људи су претпоставка за вирусну инфекцију. На дејство ултраљубичасте светлости указују акутна погоршања као и у време трудноће или у постпорођајном периоду. Примећено је да после узимања лекова (хидралазин, прокаин амид, сулфонамида, пеницилина, антиконвулзионих средстава, оралних контрацептивних средстава се испојила или погоршала клиничка слика СЛЕ. Сматра се да лекови покрећу механизам

који доводи до структуралних промена нуклеуса протеина на различите ДНК који тако постају имуногени. Теорија о имуним променама у настанику СЛЕ дефинитивно је потврђена открићем ЛЕ ћелија (Hargraves 1948.) ЛЕ фактора (Haserick 1950.) и антитела против ДНК које изазивају стварање ЛЕ ћелија [6].

Међусобним деловањем антигена са антителима у крвотоку стварају се топливи макромолекуларни комплекси који доводе до акутних или хроничних запаљења [7, 8]. Главна карактеристика СЛЕ је стварање аутоантитела према сопственим антигенима локализованим у нуклеоплазми, нуклеосу, цитоплазми или на ћелиској мембрани:

Антинуклеусна антитела АНА

- ДНК (двоструке и једноструке)
- Дезоксинуклеопротеини (ЛЕ фактор)
- Хистона
- Комплекс хистон – ДНК
- Нуклеусног гликопротеина (Ам антиген)
- Нуклеусне РНК
- Антитела против саставни делова цитоплазме РНК, митохондрија и рибозома
- Антитела против леукоцита, еритроцита, тромбоцита, лимфоцита, чиниоца коагулације (нарочито VIII фактор)
- Друга антитела: реуматоидни фактор (IgG или IgM) органотропна (против тиреоидеје)
- Антитела која су одговорна за лажно позитивне тестове за Лусе, токсоплазмоза

Истовремено ова антитела мењају имунолошку функцију нормалних лимфоцита са повећањем активности Б ћелија, а смањивањем активности супресорских Т ћелија као и способности Т ћелија да луче интерлеукин. Апсолутни број Т лимфоцита у циркулацији је смањен [9].

Механизам оштећења ћелија и ткива код СЛЕ је тај да антитела на антигене ћелиске мембране доводе до лизе ћелија преко активарања система комплемената, или тако што утичу на фагоцитозу ћелија од стране мононуклеарног фагоцитног система Целокупна хемолитичка активност комплемената смањена у серуму многих болесника од СЛЕ. Највећа смањења комплемената су код С1, С3, С4 [10–12]. Такође може доћи до транслокације интраћелиских антигена на површини ћелије, за коју се везује специфична аутоантитела која покрећу лизу ћелија.

Нека аутоантитела могу да стимулишу, инхибирају или модификују рецептор на ћелиској мембрани за коју су везана, овим механизмом се објашњава деловање антифосфолипидних антитела. Клинички је потврђено да антифосфолипидна антитела код болесника са СЛЕ имају значајну везу између постојања тих антитела и позитивног налаза за тромбозу, неуролошке промене и тромбоцитопенију, али не и за побачај код жена са овом болешћу [13].

Сигурно је да је механизам оштећења ткива преко имунских комплекса највише проучен. Имуни комплекси постају везивањем аутоантитела за аутоантигене који су ослобођени из ћелија у циркулацију или тако што се вежу за аутоантиген *in situ*. Богато васкуларизована ткива и органи (кожа, бубрег, мозак) изузетно су подложни таложењу циркулишућих имунских комплекса. Уз помоћ Fc рецептора, имуни комплекси активирају маст ћелије и фагоците и систем комплемената, чиме се покреће процес запаљења.

### Клинички облици

СЛЕ се клинички манифестује лошим општим стањем, са захватањем било ког органа, али углавном почиње са афекцијом коже или зглобова. Болест се може испољити са акутним или хроничним током уз повећање телесне температуре која обично указује на присутност инфекције [14, 15].

Акутни облик се карактерише наглим почетком и брзим током уз малксалост, бол у зглобовима, мишићима, црвенилом на образима и корену носа, нефритисом, полисерозитисом, делиријумом, комом, пнеумонијском инфилтрацијом, перикардитисом, тахикардијом, поремећајем срчаног ритма, лимфаденопатијом, хепатоспленомегалијом. Летални завршетак често наступа после неколико недеља код нелечених случајева или прелази у хронични облик.

Хронични облик почиње постепено, болест траје годинама, са повременим погоршањима и побољшањима.

Клиничке манифестације системског еритемског лупуса:

хематолошке	– миалгија
артритис	– перикардитис
кожне	– гастроинтестиналне
температура	– Reynolds fenomen
замор	– ЦНС
губитак тежине	– очне
бубрежне	– периферна неуропатија
хипертензија	– пнеумонитис
плеуритис	– увећање тироиде



Патогенетски механизми са овако распрострањеним и широким деловањем дају и веома богату и шаренолику клиничку слику у којој слободно можемо рећи да нема органа и ткива које не може бити погођено и оштећено овим процесима.

СЛЕ је генерализована болест са основном лезијом у смислу дифузног васкулитиса, насталог депоновањем комплекса антиген-антитело и комплекса.

Болест почиње општим симптомима умора 76% болесника, губитком тежине, код 80% болесника јавља се повишена температура, али најчешће афекције су на кожи и зглобовима.

Кожно мишићне манифестације су узроковане депоновањем имунских комплекса, активирањем система комплекса и поремећајем функције комплекса ћелија имуног система и као таква предмет су истраживања последњих деценија 20. века. Природни ток болести типичан по варијацијама степена активности и прогресивном току измењен је применом имуносупресивних лекова као и другим терапијским поступцима те је СЛЕ од прогресивне и фаталне болести трансформисан у хронично обољење склоно рецидивима са знатно побољшаном прогнозом. Преовладавају артралгије транзиторног карактера праћене јутарњом укоченошћу различитог трајања. Код 86% болесника јавља се артритис, па се у почетку сматра да се ради о РА. Заједничка карактеристика зглобних промена у СЛЕ је знатно јаче изражен субјективан осећај бола од објективних промена. Код једног броја болесника са тешким обликом болести који се лечи високим дозама кортикостероида могу се јавити васкуларне лезије косног ткива које се клинички испољава боловима. Ове промене у облику исхемије или аваскуларне некрозе најчешће се локализују у глави фемура, ређе у глави хумеруса, кондилима тибија и фемура.

Кожне промене се јављају у 70–85% болесника и манифестују се у облику еритема, булозних лезија, пигментације и депигментација [16]. Најчешће се јављају на лицу, врату, екстремитетима, нарочито на врховима прстију, око ноката, длановима и лактовима. Мањи број особа има еритем на кожи лица, образа, корена носа, понекад чела, што даје класичну слику лептира и дискоидног лупуса. Алопеција је честа и то дифузна или фокална. Лезије слузнице се виде код 30–40% болесника и то у подручју меког и тврдог непца, без симптома су, откривају се прегледом усне шупљине и зацељују у потпуности.

Срце је често захваћено и то перикардитис до 40% било у сувом или ексудативном облику. Клинички се манифестује болом у прекордијуму, епизодног

типа, а аскултаторно трењем. Ендокардитис (Libman-Sacks) обично се јавља у оквиру тешког фебрилног стања и често се летално завршава. Клинички знаци ендокардитиса се јављају код 10% болесника, а обично су захваћени митрални и аортални залисци. Артеритис коронарних артерија може довести до инфаркта миокарда [17]. Хипертензија је честа и налази се у 25% болесника од СЛЕ са нефротском етиологијом, мада се хипертензија јавља и код болесника са неоштећеном бубрежном функцијом [18, 19].

Васкулитис код СЛЕ манифестује се афекцијом малих и великих артерија што се клинички манифестује безазленим симптомима па све до развијене слике полиартитиса. Најчешћи знак је Raynaudov феномен. Такође јавља се и уртикаријски васкулитис праћен хипокомплементемијом (C1q, C4, C2, C3) афекцијом плућа, ока, компликацијом нервног система и другим знацима [20].

Промене нервног система јављају се код 60% болесника од СЛЕ и често представљају дијагностички и терапијски проблем. Имају лошу прогнозу и клинички се манифестују депресијом, анксиозним стањем, дезоријентацијом, халуцинацијама и шизоидним реакцијама. Ово се испољава кроз појаву епилептиформних грчева, хемиплегија, хореје, тремора, спастичне пареплегије и оштећења кранијалних нерава.

На дигестивном тракту промене се испољавају анорексијом, гастричним крварењима, боловима у трбуху и диарејом, код 1/3 болесника постоји хепатомегалија.

Очне промене се манифестују појавом цитоидних тела на ретини у виду белих мрља која су у ствари дегенеративне промене пахуљастог ексудата у слојевима нервних влакана. Клинички знаци су фотофобија, осећај страног тела, те кератокоњуктивитис сика.

Лупусни нефритис је међу водећим клиничким манифестацијама СЛЕ од којег зависи ток и исход болести (1–4 с арх авг 130, 2002). Бубрежне промене се јављају код 50% одраслих болесника од СЛЕ и 70–80% деце. Таложење имуноглобулина и комплемената у гломерулима налази се код око 90 посто болесника, а промене ултраструктуре практично код свих оболелих особа код којих је извршена биопсија бубрега (3) Клиничко испољавање лупус нефритиса врло је разнолико и по правилу зависи од врсте односно тежине морфолошких лезија, мада на основу клиничко-лабораторијских манифестација не могу увек да се предвиде ни врста ни тежина патохистолошких промена (3). Код болесника са СЛЕ и оштећењем бубрега нефритисом прогноза је лошија него код оних без промена на бубрезима.

Према афекцији структура постоје следеће манифестације нефритиса:

#### *Минимални или мезангијски нефритис*

Код малог броја болесника са нефротским синдромом хистолошки налаз показује мезангијско пролиферативни гломерулонефритис, што је понекад тешко раздвојити од промена у МЦНС. Код овог мезангијскопролиферативног је неспецифичан налаз који се може видети код различитих примарних или секундарних гломерулских болести (СЛЕ). Он се сматра посебним идентитетом у случајевима где се светлосним микроскопом не откривају промене на капиларним петљама и где нема других знакова болести. Имунолошки се откривају IgM депозити у мезангијама. Клинички се испољава сликом асимптоматске мокраћне ненормалности или сликом нефротског синдрома. У болесника са нефротским синдромом честа је микрохематурија, а хипертензија се јавља у око 30% случајева. Комплемент је нормалан [21].

#### *Мембранозни нефритис*

Карактерише се постојањем имуноглобулина у свим базалним мембранама и то дифузно за разлику од осталих нефритиса у СЛЕ. Клинички се уочава протинурија са хематуријом или без ње. Прогноза је углавном добра [22].

#### *Дифузни пролиферативни нефритис*

Карактерише се афекцијом више од половине свих гломерула са интерстицијалним инфилтратима и одлагањем имуноглобулина и комплемената у тубуларним базалним мембранама и то у зидовима перитубуларних капилара и у интерстицијуму. Клинички се представља благом до јаком протеинуријом са нефротским синдромом, хематуријом и благом до умереном бубрежном инсуфицијенцијом. Код овог облика јављају се спонтане ремисије.

#### *Нефротски синдром*

Нефротски синдром је клиничко стање које карактерише обилна протеинурија, хипопротеинемија са хипоалбуминемијом, хиперлипидемија, едеми и хипертензија.

Нефротски синдром је један од пет клиничких гломерулопатија кога изазивају најразличитија патолошка стања. Међу којима СЛЕ с другим мулти-системским болестима представља важну групу.

Нефротски синдром може бити испољен као примарна гломерулска болест или секундарна као што је случај код СЛЕ-а.

Основни покретачки механизам свих поремећаја у нефротском синдрому јесте повећана пропустљивост капиларног зида гломерула. Главни знак нефротског синдрома је протеинурија. У мокраћи се налазе разни протеини што је у директној зависности од њихове молекулске масе. Нај карактеристичнији поремећај у концентрацији серумских протеина јесте хипоалбуминемија која је у корелацији са протеинуријом. Поред ње постоји повећана алфа 2 глобулин и бета глобулин док су гама глобулини обично снижени. Појава едема је директно узрокована протеинуријом због поремећеног онкотског притиска плазме услед чега долази до преласка течности у интерстицијум. Хиперлипидемија настаје код 70-100 посто болесника с нефротским синдромом док су подаци о последичној инциденцији коронарне болести веома различити. У нефротском синдрому се манифестује повећање концентрације укупног холестерола, фосфолипида, триглицерида, ЛДЛ-а и ВЛДЛ. Сматра се да услед промене онкотског притиска због хипоалбуминемије води повећање продукције ВЛДЛ у јетри а утиче и на њихов катаболизам. У клиничкој слици су симптоми и знаци основног обољења и нефротског синдрома. Испољавају се хипертензија, хематурија и азотемија, а израженост зависи од природе гломерулског оштећења.

Хипертензија је пратилац нефротског синдрома, а настаје из следећих разлога: јачина бубрежног крвотока равна је 1/5 минутног волумена срца и износи 1200 мл/мин. То значи да сваких пет минута цео минутни волумен срца протиче кроз бубреге. Јачина гломерулског крвотока равна је јачини бубрежног крвотока, јер практично цео бубрежни крвоток протиче кроз гломеруле. Код нефротског синдрома у СЛЕ смањена је филтрација кроз гломеруле због чега се јавља хипертензија и због тога је то важан знак у прогностичком смислу.

Артеријска хипертензија се често јавља и од великог је значаја у прогностичком смислу, али може бити независна од развоја инсуфицијенције бубрега.

У склопу клиничке слике јављају се и промене од стране нервног система, а као најозбиљнија манифестација је мождани органски синдром који се карактерише поремећајем перцепције, оријентације у простору и времену, памћења и интелектуалних функција [23]. Периферна неуропатија се јавља у 10 до 14% болесника уз појаву испада моторике и осета. Појава ових сметњи се везује у склопу са васкулитисом [23].

Промене на плеури и плућима се јављају код болесника са СЛЕ, уз плеурални бол и присутан ексудат, а болест може да прати акутни пнеумонитис или да пређе у хронични ткз. дифузни интерстициски пнеумонитис. Такође присутно је увећање јетре и слезине уз пораст ензима, трансaminaза, алкалне фосфатаза [24, 25].

## Лечење

Пошто је клиничка слика СЛЕ веома различита и сам приступ лечењу је такав, углавном је заснован на антизапаљенским и имуносупресивним лековима. Сама примена лекова узрокована је према клиничким манифестацијама, почиње се са нестероидним анти реуматицима, затим антималарицима, па имуносупресивним лековима. Данас због бољег разумевања СЛЕ укључена су у лечење и моноклонска антитела антитела на CD3, CD4, CD5, CD45 ћелије или IL-6 и 10) као и терапија генима [26–28]. У терапију је потребно укључити и неспецифичне лекове за кардиоваскуларне болести, остеопорозу хипертензију, липиде. Циљ дугогодишњег лечења болесника са лупусом има за циљ постизање стабилне реналне функције, мале протенурије и имунолошке стабилности, што су све знаци супресије болести [29, 30].

## Хипербарична оксигенотерапија у лечењу системског лупуса еритематодуса

ХБО или хипербарична оксигенација је удисање 100% медицинског кисеоника у специјалним уређајима које се зову хипербаричне коморе. У њима се стварају услови као код роњења, због чега парцијални притисак кисеоника се до 20 пута више раствара у плазми, због чега мења своја физичка својства. На тај начин он допире до свих места у телу без обзира на стање крви (Fe, Hg), као и какво је стање крвних судова.

Хипербарични кисеоник доводи до неоангиогенезе, има антизапаљенски и антимикуробни ефекат, поседује имуностимулативно дејство, стимулише раст ћелија које убрзавају зарастање рана и костију. Такође има антиедематозни ефекат и убрзава метаболичке процесе у организму.

ХБО налази потпуно оправдано своје место у лечењу системских болести, а међу њима и код СЛЕ, узимајући имунопатогенетску природу ове болести. Карактеристичне промене су узроковане васкулитисом, метаболичким поремећајима са нагомилавањем великог броја запаљенских фактора, што све за последицу има стварање слободних кисеоничних радикала. На све то хипербарични кисеоник делује тако што анулира хипоксију и исхемију ткива, смањује адхезију леукоцита, агрегацију тромбоцита у крвним судовима, доводи до капиларне ангиогенезе, поспешује стварање колагена и фибробласта. Његов имуносупресивни ефекат се испољава смањењем интерлеукина 1 и простагландина E2, при чему интерлеукин 6 није измењен.

Хипербарична терапија као допунска терапија код СЛЕ је све више присутна, јер и субјективан осећај пацијената, али и објективно њихово здравствено стање то показује, а нежељени ефекти су минимални [31–33].

---

## 1.2 Хипербарична медицина

---

### Увод

На првом светском конгресу у Амстердаму dr J. H. Jakobson из "Mount Sinai Hospital" своје излагање започео је следећим речима:

„Примена кисеоника под притиском вишим од атмосферског притиска представља напредак који се по значају може поредити са увођењем трансфузије крви и антибиотика у терапију.“

Принцип деловања ХБОТ је контролисано удисање 100% кисеоника на притиску већем од једне атмосфере у хипербаричним коморама. Пацијенти се у хипербаричним коморама излажу терапијском притиску од 2. 0АТА до 2.8 АТА најчешће у трајању од 60 па до 125 минута. Постоје протоколи за лечење разних болести, али притисак и експозиција кисеоника се одређују индивидуално. Деловање хипербаричног кисеоника засновано је на његовој физичкој растворљивости у плазми и дифузији кроз мембране ћелија у ткивима. За кисеоник који је растворен у плазми није потребан никакав биохемиски чинилац за транспорт. Повишени атмосферски притисак сам по себи делује као физичка сила на едеме [34].

### Историски развој лечења Хипербаричне оксигенације

Модерно схватање хипербаричне медицине почиње 1937. године, када су Венке и Shaw употребили хипербаричну комору за третирање декомпресионе болести.

Значајна је 1947. година у којој End из САД почиње да лечи декомпресионе болести искључиво са кисеоником под повишеним притиском. Кисеоник под условима повишеног притиска се користио у Холандији у хирургији при чему је читава операциона сала била под повећаним притиском, а све да би се ткива очувала због кисеоника под притиском. Од 1955. године почиње шира примена хипербаричне оксигенотерапије и за друге болести поред декомпресионе. Те године Churchill-Davidson су почели да користе оксигену терапију за третирање пацијената оболелих од карцинома због последица лечења радио терапијом. 1956. године Воегема у Холандији је извео прву операцију на срцу у хипербаричној комори. 1962. године Sharp и Smit у Шкотској су били први који су лечили троване угљен моноксидом уз помоћ хипербаричног кисеоника. 1965. године Prrins из Велике Британије је доказао ефекте хипербаричне оксигенације код остеомијелитиса. 1966. године Saltzman и сарадници из САД су показали ефекте хипербаричне оксигенације код болесника са можданим



ударом. 1970. године Boschetty и Icernoch из Чехословачке су применили хипербаричну оксигенацију код мултиплекс склерозе. 1971. године Lamm из Западне Немачке примењује хипербаричну оксигенацију у лечењу изненадне глувоће. 1973. године Thurston је показао да хипербарична оксигенација у раној фази примењена смањује смртост код инфаркта миокарда. Током неколико година хипербарична оксигенација се посебно показала ефикасна против анаеробних инфекција и то код гасне гангрене [34].

Што се тиче наших простора 1933. године краљевска ратна морнарица Југославије је набавила дводелну рекомпресиону комору Siebe Gorman, али због недостатка компресора и ваздушне банке није пуштена у рад. Тек после рата ову комору је преузео Бродоспас где је након инсталирања на брод и њеног комплетирања пуштена у рад и кроз њу су се третирали многи лакши и средњи случајеви декомпресионе болести 1969. године у Институту за поморску медицину ратне морнарице почела је са радом велика рекомпресиона комора. 1970. године пуковник др Страцимир Гошовић почиње систематску примену кисеоника под повећаним притиском у клиничке сврхе.

Хипербарична медицина се у оквиру војске на територији Србије први пут користи за потребе Речне Ратне Флотиле у оквиру војске тада Југославије, а сада Србије са седиштем у Новом Саду. Почетак се везује за 70–те године прошлог века, прво за потребе збрињавања рониоца, а касније за лечење неронилачких болести. За те потребе користили су две мобилне једномесне хипербаричне коморе италијанске производње Galeazzi које су биле смештене једна на броду, а друга на камиону. Такође била је и једна стационарана у самој Флотили са укупно 10 места. Оснивач прве јединице 1974 године за лечење хипербаричним кисеоником у Србији у Земунској болници био је прим. др. сц. Никола Деклева.

Хипербаричне коморе које се данас употребљавају у клиничке сврхе, користе искључиво кисеоник. Оне су настале из комора које су коришћене за физиолошка тестирања, затим из рекомпресионих комора за профилактичку декомпресију и декомпресију на површини, рекомпресионо лечење као и за тренаж рониоца. Хипербарично је „дешавање под вишим притиском у односу на нормалан атмосферски притисак“ [35].

### **Физиолошки аспект Хипербаричне оксигенације**

Удисањем ваздуха на нормалном притиску хемоглобин је сатуриран кисеоником 97 %, а у 100 милилитара крви има га 19,5 волумен % хемијски везаног и 0,32 волумен % раствореног. Дишући кисеоник у хипербаричним

условима до три бара растворени кисеоник у плазми расте до 6 милилитара волумен % док хемоглобин везује до 20,1 волумен % кисеоника хемијским путем [33].

Неспорно је утврђено да удисање 100% кисеоника у хипербаричној комори у физиолошком смислу позитивно делује на сва ткива која због исхемије имају слабије снабдевање кисеоником, да има антиинфламаторно и бактерицидно дејство, да побољшава циркулацију крви, има имуносупресивни ефекат, регулише ниво простагландина у организму, подстиче синтезу колагена вршећи регенерацију ткива и поспешује стварање калуса код прелома костију. Хипербарична оксигенација је већ задњих четрдесет година прихваћена као метод лечења многих хируршких и интернистичких обољења, а код неких је и једини лек. Само дејство ХБОТ доводи до вазоконстрикције која редукује проток крви, али ефективна оксигенација ћелија обезбеђена је и ако је проток ослабљен због високог парцијалног притиска кисеоника [37]. Висок парцијални притисак кисеоника је директно условљен дубином зарона и што је он већи, већа је растворљивост у плазми и у ткивима, због чега је његов ефекат лечења већи. Тако у раствореном стању он дифузијом стиже свуда без обзира на стање циркулације, а то је уствари и његова моћ лечења.

Однос кисеоника и парцијалног притиска на нивоу капилара

Притисак кисеоника	Притисак на нивоу капилара
Normal AIR	50 mmHg pO <sub>2</sub>
100%@ 1atmos.	75 mmHg pO <sub>2</sub>
100%@ 1, 3 atmos.	246 mmHg pO <sub>2</sub>
100%@ 1, 5 atmos	437 mmHg pO <sub>2</sub>

Однос парцијалног притиска кисеоника у односу на нормалне и хипербаричне услове

1. 0 atm	1. 3 atm
21% Oxigen	100 % Oxigen
↓	↓
160 mmHg	988 mmHg
Oxigen	Oxigen
↓	↓
Arterial	Arterial
100 mmHg	632 mmHg
↓	↓
Venous	Venous
39 mmHg	246 mm Hg



## Индикације за хипербаричну терапију су следећи:

Акутне индикације	Хроничне индикације
тровање угљен моноксидом артеријски гасни емболизам гасна гангрена декомпресиона болест озбиљне инфекције меког ткива, укључујући дијабетичну гангрену „краш“ повреде и компартмент синдром опекотине са инхалацијом или без инхалације дима анемија узрокована великим губитком крви постаноксична енцефалопатија изненадна глувоћа озбиљни поремећаји вида узроковани васкуларном патологијом	1. улцерације на кожи због хроничне исхемије проузроковане: а) артеријском инсуфицијенцијом б) венском инсуфицијенцијом ц) дијабетичним васкуларним поремећајима д) декубитусом е) посттрауматски ф) пострадијационо г) гангренозном пиодермом 2. компромитовани графт – васкуларне или инфективне природе 3. радијационе некротичне лезије 4. хронични рефракторни остеомиелитис
– Амерички колеџ за хипербаричну медицину је својим протоколом из 1983. годи- не, навео и реуматоидни артритис и склеродермију.	

## Контраиндикације за примене ХБО терапије

Табела – Апсолутне контраиндикације ХБОТ

Апсолутне контраиндикације	Разлог контраиндикације	Неопходно стање пре спровођења НВОТ
Нелечен пнеумоторакс	Гасна емболија Тензиони пнеумоторакс Пнеумомедијастинум	Торакостома
Bleomycin	Интерстицијални пнеумонитис	Без терапије одређено време после узимања лека
Cisplatin	Отежано зарастање рана	Без терапије одређено време после узимања лека
Disulfiram	Блокира супероксид дисмута- зу, који служи као заштита од токсичности кисеоника	Прекид узимања лека
Doxorubicin	Кардиотоксичност	Прекид узимања лека
Sulfamylon	Отежано зарастање рана	Прекид узимања и уклањање лека

Табела – Релативне контраиндикације ХБОТ

Релативне контраиндикације	Разлог контраиндикације	Неопходно стање пре узимања НВОТ
Астма	Заробљавање ваздуха због смањеног дијаметра усходних путева, која може да води до пнеумоторакса	Мора бити врло добро контролисана лековима
Клаустофобија	Анксиоза	Терапија бензодиазепинима
Конгенитална сфероцитоза	Узнапредовала хемолиза	Нема; НВОТ само у ургентним стањима
Хронична опструктивна болест плућа (ХБОТ)	Губитак хипоксичног рефлекса за дисање	Праћење у комори
Дисфункција Еустахијеве тубе	Баротраума тимпаничне мембране	Вежбање изједначавања притиска кроз Еустахијеву тубу
Висока телесна температура	Повећан ризик од настанка конвулзија	Терапија антипиретицима
Пејс мејкер или епидурална пумпа против бола	Квар или деформација уређаја под повећаним притиском	Проверите да ли је компанија дала атест уређајима на повећани притисак и колики
Трудноћа	Непознати ефекти на развој фетуса (претходна истраживања Руских научника сугерирају да је НВОТ безбедна процедура)	Нема; коришћење НВОТ за ургентна стања
Конвулзивни напади	Може имати нижи праг за настанак конвулзија	Уколико је под терапијом требало би да буде стабилно стање; размислити о увођењу бензодиазепина
Инфекција горњих респираторних путева	Баротраума	Одлука након разматрања симптома или примена декогенстанта

### *Компликације приликом терапије ХБОТ*

Приликом ХБОТ као и код било које друге медицинске терапије, сама терапија има своје позитивне и негативне стране. Од повереда приликом спровођења НВОТ најчешће срећемо баротрауму која је проузрокована повећаним притиском, као неспособност особе да изједначи притиске између ува, плућа, синуса, али и бол у зубима. Пацијенти који болују од шећерне болести и имају не регулисан шећер могу да доживе хипогликемију, која уколико се не препозна може да заврши са комом. Код терапије где је притисак 2.5 АТА и више могућ је настанак токсичног ефекта кисеоника. Развоја се клиничка

слика слична епи нападу у току третмана у хипербаричној комори и треба увек размишљати о могућности као што је неуротоксично деловање кисеоника које се јавља на већим притисцима и код дуже инхалације 100% кисеоника. Овај ефекат је важан јер указује на осетљивост пацијента на 100 % кисеоник под хипербаричним условим и таквим пацијентима се прекида ХБО терапија [35].

## Рекомпресивне или хипербаричне коморе

### Увод

Хипербаричне или рекомпресивне коморе су цилиндри у којима се особе излажу контролисаном притиску, у програмираном временском интервалу и све време удишу неки од медијума : ваздух, кисеоник или неку гасну мешавину. У њима се спроводи терапијска рекомпресија, а принцип је да се оболели изложи притиску (рекомпресији) и после дозираног задржавања на максималном притиску, започиње се са постепеним смањењем притиска (декомпресији). Рекомпресивно лечење може да се изводи ваздухом, или кисеоником. Због ефикасности и релативно ниског притиска рекомпресије апсолутну предност имају режими у току којих се дише кисеоник [33]. Прву рекомпресивну комору за лечење декомпресионе болести поставио је Ернест Моир 1893. године на градилишту реке Ист Ривер у Њујорку. Он је том приликом успешно рекомпресијом лечио декомпресиону болест код радника [38].

Због њихове основне намене рекомпресионе коморе су обавезне на ронилачким бродовима, подморичарским базама и школама роњења.

### Карактеристике комора

Коморе се деле према намени, броју просторија, величини, покретљивости и гасу који се у њима удише.

- Оне могу бити једномесне или вишемесне, стационарне или покретне, једнопросторне или вишепросторне. За све коморе важи исто, поседују и предности и мане. Тако једномесне покретне коморе могу да се пренесе са једног места на друго (бродом, камионом, авионом), мале су тежине, лаке за руковање и цена им је повољна. Слабија страна су им је мали капацитет, ограниченост примене код свих врста болесника, немогућност асистенције медицинског особља код третмана, слабија комфорност за пацијенте као и опасност од кисеоника пошто се целе испуњавају њиме.



Слика 1 –

– Стационарне вишесторне коморе су комфорније, пацијента прати медицинско особље за време третмана са могућношћу извођења медицинских интервенција, кисеоник се узима помоћу маске инхалацијом, постоји могућност регулације микроклиме што у многосторне повећава комфор. Безбедније су за употребу од једносторних комора. Капацитет тих комора је од 4 па и 30 седећих пацијената, са могућношћу да се унесе и лежећи пацијент са креветом. Недостаци су висока цена, неопходност већег просторног капацитета, потреба за већим бројем обучених људи који њоме руководе као и утрошак веће количине кисеоника [39].

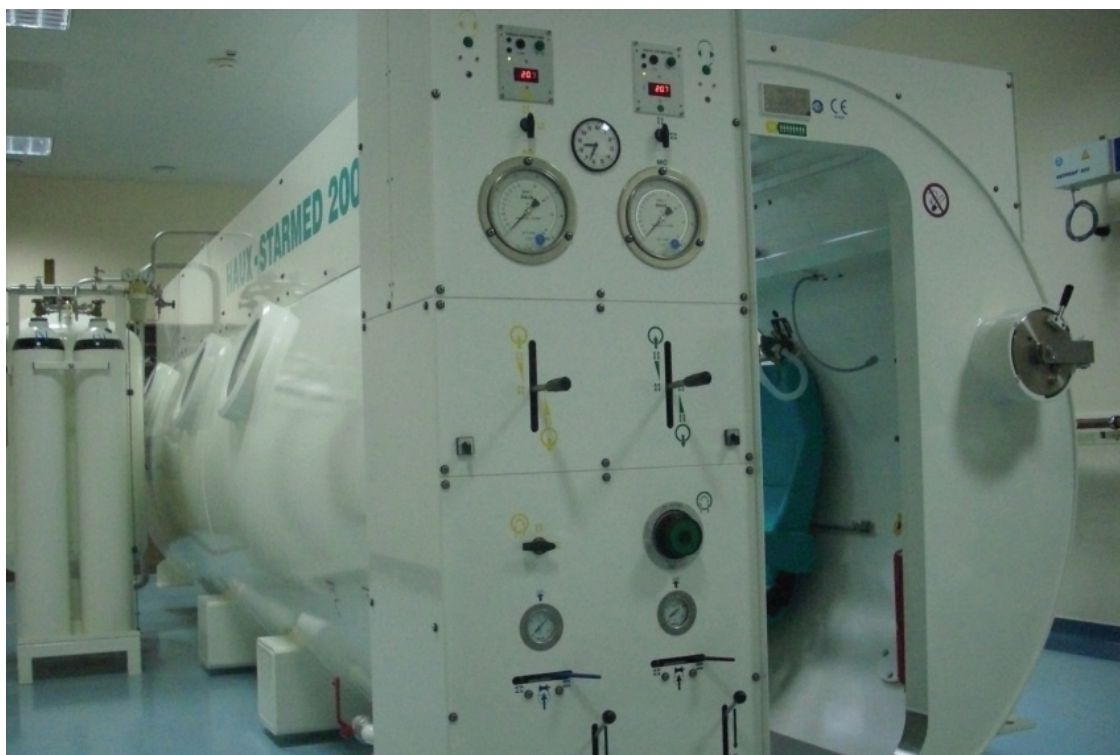


Слика 2 –



Све коморе су простори у којима делује повећани притисак због чега је неопходно да буду веома квалитетно израђене, а данас су то најчешће следећи материјали: ситно зрнасти челик БХ – 31, аустенитни челик и АЛ – Мг – Си [40].

Основни делови коморе су: командни пулт, врата коморе, прозори коморе, прирубница за изобарично спајање са другом комором, коморица за манипулацију, електричне инсталације и телефонско-интерфонска линија. Од исправности наведених делова зависи функционисање и сигурност читаве коморе. Командни пулт који се налази на спољашњем делу коморе садржи вентиле за декомпресију, редукуцију кисеоника и ваздуха, уређаје за осветљење и телефонско-интерфонску везу, регулатор за микро климу, а на новијим коморама и телевизијски надзор [39]. Такође у коморома постији и медицински мониторинг којим се прати пулс, крвни притисак, ткивна оксиметрија и телесна температура. Постоје и коморе за пацијенте који захтевају интензивну негу па и њима постоји одговарајућа опрема.



Слика 3 –

Хипербаричне коморе које се користе у клиничке сврхе пуне се целе медицинским кисеоником или се он до пацијента допрема преко маске. Наиме, кисеоник се у коморе допрема из резервоара (кисикана) у којима је притисак боца од 150 до 200 бара да би се притисак на улазу у комору редуковао на 40 бара, а у у самој комори редуковао на 5 до 7 бара. Пацијент у комори кисеоник

добија по систему (на захтев) при чему га удише под оним притиском који је одређен у третману. Данашње хипербаричне коморе из фабрика излазе тако да је притисак ограничен на максимално 3 бара и то се обично односи на покретне једномесне коморе.

Начин примене кисеоника у рекомпресивним и хипербаричним коморама спроводи се коришћењем стандардних декомпресионих таблица 5 и 6. Те таблице су развијене првенствено за потребе морнарице, али њихова модификација има примену и у хипербаричној медицини [41].

Евидентно је да са широком употребом хипербаричне оксигенације, хипербарична медицина доживљава напредак увођењем нових протокола лечења, као и побољшањем техничких особина самих комора (компјутерска контрола, мониторинг, ЕКГ итд.) [39, 40].

### Мере опреза

Највећа опасност која прети пацијентима у комори као и самој комори је настанак пожара или експлозије. У периоду од 1923. године до 1996. године забележено је у Азији, Европи и северној Америци 77 људских жртава у 35 пожара. Пожари су захватили два ронилачка звона, осам их је било у рекомпресивним коморама и двадесетпет у клиничким хипербаричним коморама [42].

За безбедно функционисање рекомпресионих комора потребно је придржавати се следећих правила:

- У њих је строго забрањено уносити и држати запаљив материјал.
- Коморе морају бити чисте без присуства било каквог уља или горива.
- Електричне инсталације морају да буду потпуно исправне без икаквих накнадних модификација. Електрични уређаји који се користе унутар коморе искључиво се напајају струјом од 24 V или нижим напоном. Сви електрични каблови се искључиво постављају по спољашњим зидовима коморе као и прекидачи и склопке.
- Строго је забрањено користити електричне апарате унутар коморе.
- Постељина и сви материјали који се користе у комори укључујући и одећу особља и пацијента морају бити искључиво од памука.
- Неопходна је редовна вентилација комора чиме се спречава накупљање кисеоника изнад максимално допуштеног нивоа, односно врши се измена ваздуха ако се комора пуни ваздухом. Ово је због тога што се више просторне коморе пуне искључиво ваздухом или хелијумом, за разлику од једномесних које се пуне кисеоником. У коморама у којима

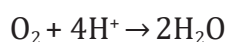
се удише кисеоник у отвореном кругу за вентилацију треба осигурати 375 л ваздуха по особи која мирује при чему кисеоник у атмосфери коморе не сме бити виши од 25,0 волумен процента.

- Обавезна је једногодишња контрола односно петогодишња проба притиска коморе.

### 1.3 Оксидационо– редукциони процеси

#### Слободни радикали

Слободни радикали (CP) су молекули, атоми или јони који садрже један или више неспарен електрон у својој структури, односно налазе се између оксидованог и редукованог стања [43]. Кисеоник је есенцијални елемент за аеробне организме, он у својој валентној орбити садржи два неспарена електрона због чега може да прими електроне и при чему се сам редукује. У митохондријама на унутрашњој мембрани врши се редукција молекула кисеоника и његова витална функција је да у току процеса оксидативне фосфорилације ствара константно велике количине АТФ-енергетске монете ћелије. У овом процесу молекуларни кисеоник O<sub>2</sub> представља крајњи акцептор електрона *cytochrome*-с оксидазе, завршне компоненте NADH комплекса који катализује редукцију O<sub>2</sub> до воде, без стварања слободних радикала. Потпуна редукција молекула кисеоника до воде одвија се примањем четири електрона и протеина



Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивни(радикал-катјон) или(радикал-анјон).



Слободне радикале карактеришу три фазе

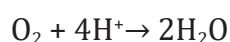
- Фаза иницијације где не радикали примају или губе један електрон и због тога им се мењају физичке и хемиске особине.
- У фази пропагације новонастали слободни радикал активира околне хемиске врсте, те им одузима по један електрон, чиме себс стабилише, а циљни молекул се трансформише у форму слободног радикала. Ти слободни новонастали радикали веома реактивни делују даље па се за кратко време вишеструко умножи број слободних радикала.

- Трећа фаза је терминација при којој долази до заустављања неутрализације слободних радикала и даљепропагације. За овај тип реакције задужени су неензимски оксиданси, ензимски оксидансии судар два слободна радикала.

Слободни радикали настају током нормалног метаболизма у свим ћелијама и укључени су у многе нормалне метаболичке активности. Међутим ако измакну контроли постају веома реактивни и штетни за ћелију, јер оштећују многобројне функционалне путеве у њој. Под термином слободни радикали подразумева се низ органских и неорганских молекула, укључујући метале, металне јоне и металне комплексе. У пракси се под слободним радикалима обично мисли на неметалене хемиске врсте, као што су реактивне кисеоничне и реактивне азотне врсте [44].

#### 1.4. Реактивне кисеоничне врсте (ROS)

Молекул кисеоника садржи два неспарена електрона због чега може да прими електроне и тако може да се сам редукује. Редукција молекулског кисеоника врши се на унутрашњој мембрани митохондрија и то у процесу респирације, при чему он прима четири протона и четири електрона и редукује се до молекула воде:



При нормалним метаболичким процесима у ћелијама аеробних организама, углавном се кисеоник потпуно редукује до воде у респирациском ланцу или као супстрат у ензимским реакцијама. У околностима када се молекулски кисеоник редукује мањим бројем електрона, настају делимично редуковани међупроизводи који се називају ROM (реактивни метаболити кисеоника, ТОМ (токсични метаболити кисеониока), или ROS (реактивне врсте кисеоника).

Реактивне врсте кисеоника делимо на две групе:

1. Слободни радикали кисеоника
2. Нерадикалски облици кисеоника

У најширем смислу сваки молекул, јон или атом који садржи један или више неспарених електрона представља слободан радикал [45, 46]. Неки од њих нису слободни радикали по својој структури, али су снажни прооксиданси или претходници радикала, због чега се често ROS поистовећује са „слободним радикалима” што је суштинска и терминолошка грешка.



Tabela 1 – Реактивне кисеоничне врсте

Слободни радикали кисеоника		Нерадикалски облици кисеоника	
Ознака	Назив	Ознака	Назив
$O_2\cdot$	Супероксид анјон радикал	$H_2O_2$	Водоник пероксид
$\cdot OH$	Хидроксил радикал	$HOCl$	Хипохлорна киселина
$HO_2\cdot$	Хидропероксил радикал	Оз	Озон
$RO\cdot$	Алноксил радикал	$^1O_2$	Синглет кисеоник
$RO_2\cdot$	Пероксил радикал	$ROOH$	Органски хидропероксид

При физиолошком процесу дисања свега 5-10%  $O_2$  непотпуно редукује и трансформише у ROS, који највећим делом чине кисеонички слободни радикали [46]. Присутна вредност слободних радикала у организму је веома мала (32-320 фемтограма по граму ткива супероксид анјон радикала). Углавном су веома реактивна и живе врло кратко, али довољно да изазове ефекте који су веома штетни јер проузрокују реакције на великом броју молекула, оштећујући DNA, RNA, интрацелуларне и мембранске протеине и липиде [47, 48].

ROS настају дејством ензимских и неензимских система који су локализовани како на плазматској мембрани, тако и у цитосолу и на мембранама органела. На нивоу ћелије места стварања ROS су ензимски системи локализовани на унутрапњој страни мембране митохондрија, пероксизома, микрозома. Али и ензимски системи везани за мембране-липооксигеназе, циклооксигеназе [49, 50, 51].

Најзначајнији стимулус који индукује ксантин оксидазу да ствара ROS јесте ткивна хипоксија [52]. Fridowich је први публикувао да процес у којем долази до смањења кисеоника у ткивима је услов за оштећења која су условљења нагомилавањем слободних радикала [53].

Под неким условима ROS може имати физиолошки и терапијски значај. ROS има улогу у физиолошким процесима трансдукције и регулације [54, 55]. Овај парадокс да ROS учествује у интраћелијским сигналним процесима као физиолошки биомолекули може се лако објаснити завишношћу од њихове концентрације. Такође ово важи и за азот моноксид, који такође има своје биорегулаторне (у малим количинама), односно цитотоксичне ефекте (у великим количинама) [56, 57].

### Оксидациони стрес

Оксидациони стрес настаје у тренутку када се створи толико слободних радикала да њихов број постане много већи од антиоксидационе способности

ћелије, приликом чега се поремети равнотежа између њих [57–59]. Различити су услови који доводе до оксидационог стреса егзогени, али и ендогени фактори, па долази до појачане фагоцитне способности на месту оштећена ткива, активација метаболита арахидонске киселине, оштећење респираторног ланца митохондрија, смањења заштитног капацитета ћелије. С тога можемо речи да оксидациона оштећења настају због повећаног оксидационог стреса и или недовољне антиоксидационе заштите.

Штетно дејство ROS на организам, првенствено на биомакромолекуле, може се сажети на следеће [60]:

1. У реакцији са липидима мембрана дешава се липидна пероксидација
2. Стварање нерадикалских продуката који оштећују структуре унутар ћелије
3. У реакцији са протеинима и нуклеинским киселинама (DNK, RNK) дешавају се промене ковалентне структуре које за последицу имају промене или инактивацију њихове функције

ROS реагује са свим конститутивним аминокиселинама са последичном модификацијом и променама у терцијарној структури протеина. Реакција радикала са полипептидним ланцем и интерференција са функционалним групама пептидних веза доводи и до модификације секундарне структуре. Оксидациони стрес може довести до оштећења екстрацелуларних и интрацелуларних протеина. Оштећења могу бити директна због специфичних интеракција са ROS или индиректна, која настају активацијом протеолитичких ензима [45]. Изменом секундарне или терцијалне структуре протеина, са променом њихове растворљивости и укупног наелектрисања, мења се функција и активност датог протеина, при чему се мењају функције мембрана и ћелије, а последица су и агрегација рецепторских протеина [45, 61].

Оксидациона оштећења на нивоу DNK настају током репликације и транскрипције када је DNK одмотана и „рањива“. Када овакве промене структуре прођу неопажено од стране репарационих система на нивоу ћелије. DNK се репликација закључава и промене се преносе као мутација на следећу генерацију [62].

ROS, укључујући синглетни кисеоник и хидроксил радикал, могу изазвати читав спектар оксидационих оштећења DNK [63, 64, 60]. Излагање оксидансима већ после неколико секунди долази до прекида DNK ланца и активације поли ADP-рибозо полимеразе. Прекиди ланаца директно су последица дејства  $\cdot\text{OH}$  радикала из  $\text{H}_2\text{O}_2$  у присуству прелазних метала.

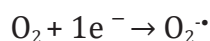
Оксидациона оштећења DNK ремете процесе репликације. Транскрипције и транслације изазивајући мутације, старење и смрт ћелије [64].

Митохондријална DNK (mtDNK), за разлику од једарне, осетљивија је на оксидационо оштећење изазвано дејством ROS. Разлога има неколико: mtDNK нема заштитних хистона, непрестано је изложена већој количини ROS који настају током процеса оксидативне фосфорилације (пре свих супероксид анјон радикала и водоник пероксида), а капацитет опоравка оштећење DNK је веома мали (mtDNK поседује ензиме за исецање база, али не и ензиме за исецање нуклеотида) [65, 66]. Мутације и промене mtDNK. соматских ћелија се јављају код појединих неуродегенеративним обољењима, као и код неоплазни. Постоји уверење да је оксидативни стрес у малигним ћелијама, делимично, последица онкогене стимулације и дисфункције митохондрија [67].

### Настанак и особине појединих врста ROS

#### *Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ )*

Супероксид анјон радикал настаје на начин код једноелектронске редукције молекулског кисеоника у електронском транспортном ланцу:



Стварање  $O_2^{\cdot-}$  у митохондријама дешава се када електрони који се нормално крећу дуж мембранских протеинских комплекса до терминалног електронског акцептора, прећу директно на  $O_2$ . Ово померање електрона догађа се на два места у електронском транспортном ланцу: у делу NADH дехидрогеназе и у региону коензима Q на комплексу I, где се  $O_2^{\cdot-}$  ствара већином у матриксу митохондрија и на комплексу III, где се  $O_2^{\cdot-}$  ствара на обе стране унутрашње митохондријалне мембране [68, 69]. Поред многих чиниоца, тако и висока локална концентracија кисеоника, може да узрокује продукцију  $O_2^{\cdot-}$  у електронском транспортном ланцу [70]. Најважнија биолошка реакција при којој настаје ROS је респираторна оксидација, јер се количине продукованог  $O_2^{\cdot-}$  у осталим реакцијама мање него количине створене од стране митохондрија. [44]. Различито од овога је ситуација у којој активирани фагоцитне ћелије врше интензивну експресију ензимских комплекса названих NADPH оксидазе на својим плазма мембранама [71].

Међутим осим комплекса NADPH оксидаза, који продукују супероксид анјон радикал, има протеина који продукују  $O_2^{\cdot-}$ , али као међупродукт њихове нормалне улоге (као електронски транспортни ланац у митохондријама) [44]. У ту групу се могу побројати: неспецифичне пероксидазе, ксантин оксидаза, циклооксигеназа, нитропропан оксидаза, триптофан диоксигеназа, алдехид оксидаза, синтаза азот монооксида и др. [72]. Супероксид анјон радикал се

продукује и аутооксидацијом високореактивних хемиских једињења, на првом месту са кондензованим хетероциклима у структури: флавина и леукофлавина [73, 74], као и оксидацијом хемоглобина (Hb) и миоглобина (Mb) [74, 75].



Узимајући да је јон,  $\text{O}_2^{\cdot -}$  он не може слободно да прође двослојни липидни слој ћелијске мембране и делује као сигнал унутар ћелије, већ једино кроз јонске канале [76, 77]. Крајњи резултат већине произведеног  $\text{O}_2^{\cdot -}$  јесте његова дисмутација у водоник пероксид, било ензимским или неензимским путем, који затим дифундује из лумена у цитоплазму ћелија [44]. Други начин да  $\text{O}_2^{\cdot -}$  уђе у ћелију је да буде протонизован у хидропероксил радикал ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) и онда пасивно дифундује, али ово се не сматра важним механизмом, јер се врло мала количина  $\text{O}_2^{\cdot -}$  може протонизовати [44]. Изразита токсичност супероксид анјон радикала се исказује после реакција са другим слободним радикалима, азот моноксидом и прелазним металима као што је гвожђе [44]. Супероксид анјон радикал је релативно токсичан по ћелију, међутим његова штетност се огледа због његовог учествовања у стварању других реактивних врста кисеоника као што су:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{OONO}^-$ . Међутим  $\text{O}_2^{\cdot -}$  може довести до деполимеризације полисахарида, инактивирања вируса, уништавања бактерија, оштећења ензима и ћелијске мембране, као и индукцију пероксидације липида, ремети синтезу DNA и транскрипцију RNA, учествујући у процесима канцерогенезе [78,79].

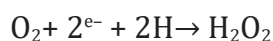
Да би се разградио  $\text{O}_2^{\cdot -}$  долази до реакције између два супероксид анјон радикала и при чему настаје водоник пероксид. Када је средина кисела ово је спонтана реакција, а на физиолошком pH реакција дисмутације је диригована ензимом супероксид дизмутаза.



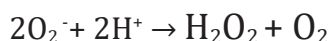
Уколико  $\text{O}_2^{\cdot -}$  избегне дисмутацију или реагује са NO градећи пероксинитрит, или реагује на различите начине са транзиционим металима учествује у Фентоновој реакцији са водоник пероксидом при чему настаје хидроксил радикал, или бива протонизован у хидропероксил радикал.

### Водоник пероксид $\text{H}_2\text{O}_2$

Водоник пероксид је најстабилнији облик ROS и не спада у слободне радикале и настаје двовалентном редукцијом молекула кисеоника, са два електрона и два протона:



Такође може да настане дисмутацијом супероксид анјон радикал створеног од митохондрија или NADPH оксидаза [44]. SOD



Најчешће место настанка водоник пероксида су пероксизоми, митохондрије, микрозоме и мембране ендоплазматског ретикулума [80]. Ствара се деловањем SOD, али и урат-оксидаза и оксидаза неких Д-амино киселина, али и реакцијама аутооксидације витамина Ц, глутатиона, тиолаи катехоламина [45].

Око 75% водоник пероксида настаје у катаболизму допамина, дејством MAO В изоензима на спољној мембрани митохондрија у ћелијама глија [81].

Активност водоник пероксида као редокс сигнала зависи од места продукције. Небитно је да ли је водоник пероксид настао екстрацелуларно (фагоцити), или органела (у митохондријама) или из других ћелија да би се активирао он мора проћи фосфолипидни двослој како би стигао до протеинских места која су у већини у цитоплазми ћелија [44]. Као липосолубилан водоник пероксид може дифундовати кроз мембране и изазвати промене далеко од места његовог стварања.

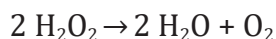
Главни механизам којим водоник пероксид делује као сигнал јесте путем специфичне, реверзибилне модификације кључних аминокиселина и протеина [44]. Водоник пероксид може да доведе до оксидације сулфхидрилних група протеина и до иницијације реакције липидне пероксидације. Веома је опасно индиректно деловање водоник пероксида са супероксид анјон радикалом или јонима метала ( $\text{Fe}^{2+}$ ) при чему доводи до стварања реактивног хидроксил радикала ( $\cdot\text{OH}$ ). који је најзначајнији активатор пероксидације мембранских липида [82,83].

Физиолошка улога водоник пероксида у ћелијама сисара продукује у процесима пролиферације, диференцијације и миграције [82]. Ефекат водоник пероксид је у зависности од јачине концентracије, ниски нивои делују пре пролиферативно него антипролиферативно [84]. Многе туморске ћелије стварају високи ниво водоник пероксида, што је важно за развој тумора, али може и сензибилизирати ћелије тумора [85].

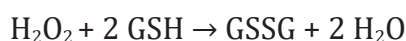
У процесима разградње водоник пероксида као антиоксидативни заштитни систем који брани организам од њега су каталаза, пероксиредоксини и глутатион пероксидаза [44].

Каталаза разграђује водоник пероксид директно у воду и молекулски кесеоник;

CAT

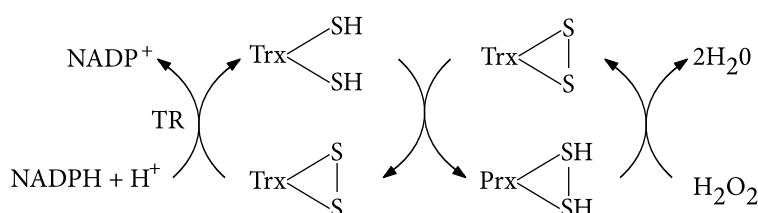


Такође уклањање водоник пероксида од стране глутатион пероксидазе



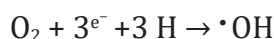
Високе концентracије водоник пероксида су скоро леталне за сва жива бића.

Разградња водоник пероксида од стране пероксиредоксина



### Хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ )

Један од најтоксичних врста ROS је хидроксил радикал и његов настанак је последица непотпуне редукције молекулског кисеоника са три електрона и три протона.



Главни извор хидроксил радикала је водоник пероксид, који лако пролази кроз липидни двослој мембране и уз присутне јоне прелазних метала ( $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ ) ствара ову врсту ROS. Ова реакција се назива Фентонова реакција.



Реакција између супероксид анјон кисеоника и водоник пероксида у присуству редокс активних металних јона доводи до стварања хидроксил радикала [85, 79].

Хидроксил радикал је врло реактиван и тиосичан, нема специфичног партнера, рецептора или биомолекула да би вршио сигнализацију већ су му мета било који биолошки молекул. Поред појединих ћелијских мета, протеина, нуклеотида и масних киселина хидроксил радикал може реаговати и са неорганским врстама којих има у ћелијама. Значи хидроксил радикал улази у реакцију са скоро свим биомолекулима: алкохолима, органским киселинама, шећерима, аминокиселинама, фосфолипидима и нуклеотидима због чега се стварају органски радикали. Висока реактивност, али и мала селективност

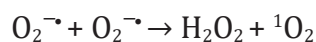
утичу на његову токсичност на ћелију и њене функције. Када дође до реакције два хидроксил радикала ствара се водоник пероксид.

### Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ )

Молекуларни кисеоник је слободни радикал са два неспарена електрона паралелних спинова. Уколико се промени спин једног од валентних електрона молекуларног кисеоника настаје електронски побуђени облик кисеоника-синглет кисеоник [45]. Синглет кисеоник и водоник пероксид су нерадикалске форме ROS, али су изразити оксидациони агенси.

Синглет кисеоник настаје:

- Интеракцијом два супероксид анјон радикала:



- У Haber– Weiss-овој реакцији



- У фотосензитивним реакцијама, приликом осветљења фотосензибилизисаних једињења у присуству кисеоника. Приликом стабилисања она пошто прво приме квант светлостне енергије, она затим предају вишак енергије околина. Ако се у тој околина налази молекуларни кисеоник, он ће примити емитовану енергију и настаће синглет стање [79].
- метаболичко стварање  $^1\text{O}_2$  врши се и код стимулираних неутрофила код којих  $^1\text{O}_2$  настаје у серијама реакција која укључује мијелопероксидазе које користе  $\text{H}_2\text{O}_2$  и хлор ( $\text{Cl}^-$ ) да би створиле хипохлорне јоне ( $\text{ClO}^-$ ) који затим са  $\text{H}_2\text{O}_2$  стварају синглет кисеоник [86].

Штетност деловања  $^1\text{O}_2$  је у стварању ендпероксида, хидропероксида, фенола, хинона и сулфоксида, такође подстиче процес липидне пероксидације, а може лако да пређе у друге облике ROS [79].

### Липидна пероксидација (TBARS)

Под липидном пероксидацијом се подразумева уградња молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина у биолошке мембране. Добро је позната штетна последица деловања ROS на живе организме преко липидне пероксидације, при чему су последице изражене кроз пероксидацију липида плазме мембране, и то [79]:

- Поремећај флуидности ћелијске мембране
- Могуће „цурење“ садржаја цитосола у ванћелијску средину



- Појачана пропустљивост за једновалентне и двовалентне јоне због чега долази до промене осмотског притиска ћелије али и ван ње
- Инактивација ензима
- Оштећење система преноса информација са рецептора на мембрану на унутарћелиске системе.

Сам процес липидне пероксидације тече ензимским или неензимским путем.

- Ензимски пут се одвија преко оксидације липида стереоспецифичном адицијом молекуларног кисеоника полинезасићеним масним киселинама уз помоћ ензима липооксигеназа и циклооксигеназа. У запаљенским процесима ови ензими катализују оксидацију до медијатора запаљења (простагландини и леукотриени), а холестерол оксидишу до хидроксихолестерола па катализује цитохром P450 [87].
- Слободни радикали који се уклањају дејством специфичних система
- Неензимским путем неконтролисан ROS напада на полинезасићене масне киселине из липидног двослоја мембрана.
- Контролисана реакција бисинтезе једињења еикосаноида

Неконтролисана неензимска оксидација полинезасићених масних киселина (PUFA-polyunsaturated fatty acids) одвија се у три фазе [44];

1. Фаза иницијације
2. Фаза пропагације
3. Фаза терминације

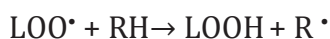
У првој фази ROS одузима Н-атом из метил групе у алфа положају у односу на двогубу везу у молекулу PUFA. Одузимањем Н-атома на С-атому метил групе настаје липидни радикал(L<sup>•</sup>). Због стабилизације хемиског једињења на угљоводоничном низу PUFA настаје премештање електрона. Адицијом молекула кисеоника на овакав радикал, на месту С-атом радикала ствара се пероксил-радикал (LOO<sup>•</sup>).

У другој фази пропагације пероксил радикал започиње фазу тако што одузима Н-атом:

Од свог угљоводоничног ланца и тиме улазе у процес аутооксидације. На тај начин се формирају циклични радикали. Даље у бета оксидацији масних киселина, премештањем двогубих веза дају алкене и алкине скраћених ланаца и посебно токсичне хидрокси алкене који настављају даљу оксидацију околних PUFA.

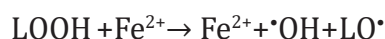
Са угљоводоничних ланаца околних PUFA. Тако се стварају нови липидни пероксиди и липидни радикали.





Липидни пероксиди (LOOH) су веома снажни генератори слободних радикала и утичу на даље реакције оксидације PUFA. Пошто се ради о липосолубилним једињењима који дифундују кроз липидни слој плазме мембране и тако испољавају своје дејство.

Хомолитичком разградњом O-O везе у LOOH, у присуству  $\text{Fe}^{2+}$  – јона, настају хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ) и алкоксил радикали ( $\text{LO}^\bullet$ ) у класичној Фен-тоновој реакцији:



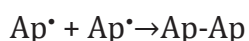
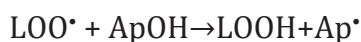
Алкоксил радикали улазе у једну од три реакције:

1. Преузимањем H-атома из молекула воде, стварају се нови хидроксил радикали и ацил –хидроксид  $\text{LO}^\bullet + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{LOH}$
2. Преузимањем H-атома из околних PUFA (RCOOH) могу се генерисати липидни пероксид (LOOH) и нови ацил –радикал:  $\text{LO}^\bullet + \text{RCOOH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{RCO}^\bullet$
3. Улазе у процес  $\beta$  оксидације којом се ствара ацил-алдехид скраћеног ланца

У трећој фази долази до престанка пропагације ланчане реакције и то:

Сударом два слободна радикала, при чему настаје нерадикалски производ, и деловањем антиоксидационог система ензимског или неензимског.

Неензински антиоксидациони системи са  $\text{LOO}^\bullet$  стварају ароматични радикал ( $\text{Ar}^\bullet$ ) који је слабо реактиван. Процес се прекида димеризацијом ароматичних радикала.



Као задњи производ липидне пероксидације PUFA је малонил-диалдехид (MDA). Да би се доказала липидна пероксидација у биолошком систему и квантитативна мера присуства липидних пероксида, у киселој средини кондезује се 2 молекула ТБА (тиобарбитурна киселина) дајући производ који адсорбује у видљивом спектру, са апсорбционим максимумом на 532 nm.

Липидна пероксидација је веома штетна јер атакује на PUFA, а и на протеине плазма мембране, при чему смањује количине мембранских липида, пре свега диена и PUFA, То узрокује смањење флуидности мембране и утиче на трансдукцију сигнала [88]. Неурони ЦНС и ћелије глија су веома осетљиви на дејство ROS због високог садржаја PUFA у липидима мозга-сфингомијелина, цереброзида и ганглиозида [89].

## 1.5 Реактивне азотне врсте (RNS)

Реактивне азотне врсте – RNS (Reactive Nitrogen Species), имају изразиту оксидациону снагу при чему су веома биореактивне за ометање физиолошке функције протеина, липида, угљених хидрата, као и нуклеинских киселина [90–92].

Tabela 2 – Реактивне врсте азота

NO•	Азот моноксид	NO <sup>+</sup>	Нитрозил катјон
NO <sub>2</sub> •	Азот диоксид	NO <sup>-</sup>	Нитроксил анјон
		HNO <sub>2</sub>	Азотна киселина
		N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Диазот триоксида
		N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Диазот тетроксида
		NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Нитронијум јон
		ONOO <sup>-</sup>	Пероксинитрит
		RONOO	Алkil пероксинитрити

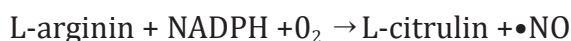
Водећи експонент реактивних азотних врста је азот моноксид (•NO), а његов метаболизам и реактивност воде до стварања много других RNS, као што су пероксинитрити (ONOO<sup>-</sup>), азот диоксид (NO<sub>2</sub>•), диазот триоксид (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) и диазот тетроксида (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

Поред реактивне врсте кисеоника и ове врсте имају низ функција које нису увек штетне по ћелију, али и имају врло велику биореактивност да наштете физиолошким функцијама протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина [92].

Сама подела на ROS и RNS није баш релевантна, а ако се зна да већина RNS садржи и кисеоник, може да постоји питање да ли реактивност ове врсте потиче од кисеоника или азота. У литератури се зато често називају RONS {Reactive Oxygen and Nitrogen Species}.

### Азот моноксид (NO)

Азот моноксид (•NO) је слободни радикал са разним улогама у редокс сигнализацији. Настаје у ћелијама под дејством групе ензима назване „азот моноксид синтетазе“ (Nitric Oxide Synthases – NOSs) које са NADPH, а у присуству више редокс-кофактора, катализују оксидацију терминалног гванидног азотног атома L-arginin-а, продукујући •NO и L-citrulin.



$\bullet\text{NO}$  има кратак полуживот у ћелијама и његова радикалска природа  $\bullet\text{NO}$  диригује да су његов циљ супстанце са металним центрима и парамагнетске супстанце, укључујући и друге слободне радикале [44].

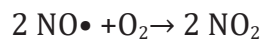
Генерално,  $\bullet\text{NO}$  сигнализирање је у складу са класичним сигналним парадигмама која укључују контролисане количине продукције, специфичну реактивност са протеинима и пратећу промену у активности/функцији, појачавање секундарних сигнала или метаболизма који „искључује“ сигнал [44].

Активношћу NOS стварају се физиолошке количине  $\text{NO}$  са врло малим полуживотом (3-5s), које диктирају његове физиолошке функције. Међутим, индуцибилна NOS (iNOS) одговорна је за продукцију много веће количине  $\text{NO}$ , за чије максимално стварање је потребно извесно време (8-12h), али се ефекат дуготрајнији (5-36h). iNOS индукују разни цитокини у макрофагама, полиморфонуклеарним леукоцитима. Купферовим ћелијама и хепатоцитима [93].

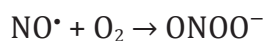
У физиолошким условима

$\bullet\text{NO}$  брзо дифундује у суседне ћелије где првенствено стимулише синтезу цикличног гуанозинмонофосфата (cGMP) [94]. Улога  $\text{NO}$  у организму је значајна: он је сигнални молекул у нервном ткиву, медијатор вазодилатације. Цитотоксичне активности макрофага, смањује агребилност тромбоцита [95-97].

$\bullet\text{NO}$  константно улази у реакцију са супероксид ањон радикалом ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , најважнијим ROS у организму сисара, формирајући RNS. Неки од облика RNS, као азот диоксид ( $\text{NO}_2$ ) и азот триоксид ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) настају простом аутооксидацијом азот монооксида у нитрите ( $\text{NO}$ ) чиме се потенцира ткивни нитрозо-стрес [98]):

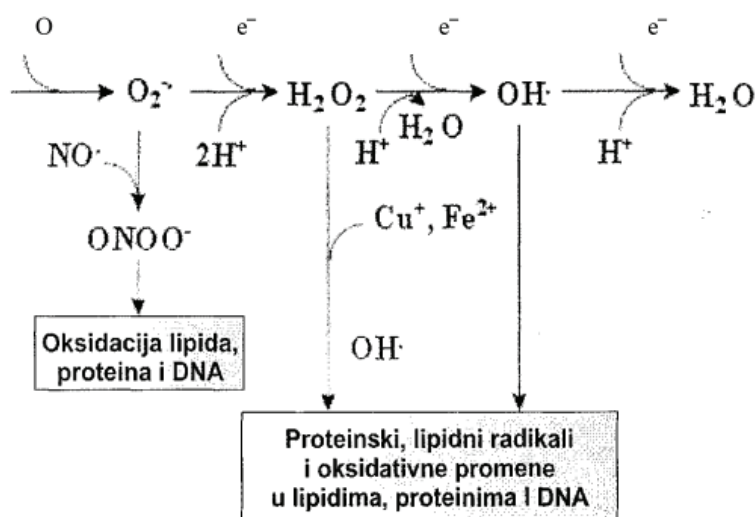


Проста аутооксидација  $\bullet\text{NO}$  у нитрите ( $\text{NO}_2$ ), односно реакција између  $\bullet\text{NO}$  и  $\text{O}_2$  доводи до продукције оксидованих, нитрованих и нитрозованих врста као што је азот диоксид ( $\text{NO}_2$ ) и диазот триоксид ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ). Реакцијом азот монооксида ( $\bullet\text{NO}$ ) са супероксид ањон радикалом ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) постаје високореактивни пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), који је јак оксидант и може да реагује или директно са тиолима и металним центрима, али и да се комбинuje са хидроген пероксидом ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и угљен диоксидом ( $\text{CO}_2$ )



•NO је слаб оксидант и он не нитрује нити нитрозује биомолекуле, али кад реагује са другим слободним радикалима долази до стварања секундарних RNS, од којих су неки високотоксични као ONOO<sup>-</sup>.

Овим реакцијама NO<sup>•</sup> инактивира извесне количине O<sub>2</sub><sup>-•</sup> и делује цитопротективно, али се и сам инактивира и то стварајући можда најтоксичнију реактивну врсту. Наиме, пероскинитрит покреће читав низ реакције која продукују стварање липидних пероксида, реакцијом са масним алкохолима (RO<sup>•</sup>) и пероксил радикалом (ROO<sup>•</sup>), чиме се узрокује процес оштећења липидних мембрана [99, 100].



Слика 4 – Штетио дејство ROS и реактивних азотних врста (RNS) на ћелију

NO који је настао активношћу eNOS дифундује до ћелија васкуларног глатког мишића, где активира солубилну гуанилциклазу (sGC) [101]. Спајањем NO за sGC базална активност овог ензима повећава се 200 пута, а тиме се повећава и концентрација интрацелуларног другог гласника cGMP-a који активира протеин киназу зависну од cGMP. Крајњи резултат је фосфорилација киназа лаког ланца миозина, тако се спречава стварање веза између актина и миозина у глатким мишићима. Циљ је релаксација глатке мишићне ћелије, односно вазодилатација артерије [101]. NO је најважнији код регулације васкуларног тонууса у артериском васкуларном стаблу, како у базалним условима тако и у условима повећаних потреба за протоком крви.

Потврђен је налаз да је оксидациони стрес укључен у патогенезу многих патофизиолошких стања: у коронарној болести, хипертензији, при чему је уочена деактивација NO<sup>•</sup> од стране O<sub>2</sub><sup>-•</sup> [102–104]. Може се констатовати да до

данас нису доказани специфични механизми путем којих оксидативни стрес делује, већ су само познати могући механизми његовог ефекта.

## 1.6 Антиоксидативни заштитни систем (AOS)

Током еволуције код свих аеробних организама развија се антиоксидативни заштитни систем који има задатак да спречи или умањи штетни ефекат деловања реактивних врста кисеоника. Антиоксидант је свака супстанца која је када је присутна у малим концентрацијама у поређењу са оксидабилним супстратом, значајно смањује или спречава оксидацију тог супстрата [45]. Појам оксидабилни супстрат је скоро свака супстанца која се нађе у храни или ткивима људи, као и у протеинима, липидима, угљеним хидратима и ДНА. Антиоксиданси су оксиданси који делују пре или у току реакција ROS и то у три фазе :иницијације, пропагације, терминације или у току реакција оксидативних продуката са осетљивим циљним молекулима [105]. Антиоксиданти имају способност да делују као хватачи слободних радикала, дају електроне, разграђују хидропероксиде липида настале у фази пропагације, елиминишу дејство синглетних облика кисеоника, инхибирају неке ензиме или секвестрирају прелазне метале [106]. Антиоксидациони заштитни систем има примарну и секундарну антиоксидациону заштиту.

Примарну антиоксидациону заштиту чине ензимске и неензимске компоненте [107].

### *Ензимске компоненте:*

- Супероксид дизмутаза (SOD)
- Каталаза(CAT)
- Ензими глутатионског редокс циклуса: глутатио-пероксидаза (GSH-Px), глутатио-S-т-трансфераза (GST) и глутатион редуктаза(GR)

### *Неензимске компоненте*

- Липосолубилна једињења
- Витамн Е
- Проватамин А
- Витамин А
- Коензим Q

*Хидросолубилна једињења*

- Витамин Ц
- Мокраћна киселина
- Глутатион GSH
- Жучни пигмент– билирубин и биливердин
- Транспортни протеини крвне плазме: албумини, трансферин, феритин
- Амино киселине :цистеин, хистидин

Секундарна антиоксидациона заштита чине ензими који се когу сврстати у две класе [45].

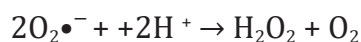
То су прва класа репаратори чија је улога да санирају оштећења и чине их ДНК гликозилаза, ДНК полимераза, ДНК липаза, ендонуклеаза;

Друга класа су дезинтегратори који уништавају настала оштећења и то су различите протеазе које су активне на оксидационо модификоване протеине: протеин– специфичне оксидоредуктазе, протеин– ADP-рибозил-трансфераза, АТФ и Ca<sup>2+</sup> – независна протеаза;

**Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система***Супероксид дисмутаза (SOD)*

Супероксид дисмутаза (SOD) је металопропротеин који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у молекулски кисеоник и водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [108].

SOD



SOD је једна од примарних ензимских антиоксидантних одбрана од супероксид радикала [109]. Супероксид дисмутаза је један од врло ефикасних биолошких катализатора који може да постоји у више облика: супероксид дисмутаза која садржи гвожђе (Fe SOD) и обележје је прокариотских организма.

Супероксид дисмутаза која садржи манган (Mn SOD). Ген за Mn SOD код човека се налази на хромозому 6 и пружа заштиту од липидне пероксидације ћелији и ван ње, јер се секретује у екстраћелиске просторе и тако штити ћелиску мембрану. Mn SOD је битан чинилац редокс равнотеже, њена повећана активност штити ткива од оксидационог стреса [110]. У колико се догоди да код повећане експресије Mn SOD пређе физиолошке услове може довести до

акумулације ROS и оксидационог стреса који доприноси туморским метастазама и ангиогенези [111].

Супероксид дисмутаза која садржи бакар и цинк (CuZn SOD) је још један облик и њега има у ћелијама сисара и то у цитосољу и једру, али и у митохондријама, Голђијевом апарату, ендоплазматском ретикулуму и лизозомима. У хуманим фибробластима и ћелијама једра се налази углавном у перокси-зонима. Ген за CuZn SOD код човека се налази на чног повећања полуживота хромозому 21.

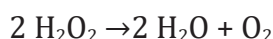
– екстрацелуларни супероксиг дисмутаза (EC SOD) садржи бакар и цинк, али се разликује по другачијој аминоксиленској секвенци од CuZn SOD. Налази се у екстрацелуларној течности, плазми, лимфи и цереброспиналној течности. Због тога има важну улогу у пресретању  $O_2^{\cdot}$

и  $NO^{\cdot}$  и последичног повећања полуживота  $NO^{\cdot}$ , чиме се смањује укупна продукција моћног оксиданта перокснитрита (ONOO), [112]. Верује се да нормалан организам дневно произведе око 5 милиона јединица SOD и других ензима каталазе. SOD ревитализује ћелије и одржава њихову функцију и успорава време и брзину њихове деструкције [101]. У нормалним ситуацијама  $O_2^{\cdot}$  је успешно елиминисан од стране SOD.

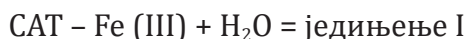
#### *Каталаза (CAT)*

Каталаза је ензим који катализује процес претварања водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у воду и молекулски кисеоник;

CAT



Реакција је двостепена и захтева везивање два молекула водоник пероксида у активном центру ензима, али је то мало вероватно при ниским концентрацијама водоник пероксида. Ова реакција је веома брза;  $K_b$  каталазе је  $4 \times 10^7 M^{-1} sec^{-1}$ .



CAT показује и такозвану пероксидазну активност. Пероксидазна реакција је спора и одвија се при ниским концентрацијама водоник пероксида и у присуству неког донора (етанол, редуковани пиридин). Азот оксид може да модулира обе поменуте активности CAT [113].



CAT се налази у ткивима код сисара, при чему највећу активност показује у ткиву јетре и еритроцитима, док је мало има у мозгу, плућима, оку, срцу, скелетним мишићима, а нема је у ендотелним ћелијама [45]. Синтетише се у рибозомима и преноси до пероксизома. Пероксизоми су респираторне органеле које каталишу већину супстанци преко  $H_2O_2$  генеришућих ензима. Водоник пероксид који настаје активношћу ових ензима, разлаже се помоћу каталазе која чини преко 40% свих протеина у пероксизомима. Присутством каталазе у пероксизомима где под утицајем пероксизмалних ензима настаје водоник пероксид, омогућава се заштита овог дела ћелија од његовог дејства. Тамо где у ћелијама нема каталазе или је има мало, то преузима да брани од водоник пероксида пероксидаза.

CAT уз SOD и GP<sub>x</sub> има важну улогу у ензимској одбрани од оксидационог стреса [114].

### Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система

#### *Глутатион (GSH)*

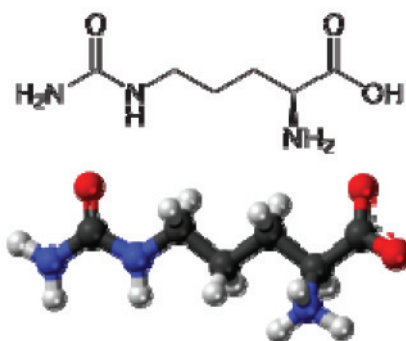
Триптид  $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин(GSH) је главни неензимски и најраспрострањенији регулатор ћелиске редокс хеомстазе. Глутатиона има свака ћелија у милимоларним концетрацијама [115]. Поседују га једно. ендоплазматски ретикулум и митохондрије. Карактеристика присуства GSH у митохондријама је да га има око 10%, међутим то је GSH који је синтетизован у цитосолу јер у митохондријама нема ензима који синтетишу глутатион. [116]. Неутрализација ROS преко GSH остварује се директно или индиректно када је глутатион супстрат за GP<sub>x</sub> и GST у поступку детоксификације водоник пероксида, липидних хидропероксида и електрофилних једињења [106]. У физиолишком редокс стању у ћелији скоро сав глутатион је у редукованом облику, а негде око 1% у оксидованом облику GSSG (глутатион дисулфид). [117]. Приликом оксидационог стреса концетрација глутатиона се брзо пада за разлику од потенцијално токсичног GSSG који се повећава што узрокује стварање мешаних дисулфида са ћелиским протеинима. Вишак GSSG се излучи из ћелија и ванћелиског простора и деградира чиме шаље сигнал ћелији за де novo синтезу GSH. Целокупно смањење GSH у ћелији је последица активности и GP<sub>x</sub> и GST. Глутатион је као редуктант врло важан у одржавању стабилности мембране еритроцита (нормалан однос GSH : GSSG код еритроцита је 100 : 1) [118]. Са улогом редуктанта, антиоксиданта и детоксиканта GSH игра важну улогу у регулацији здравља људи. Уколико је смањена концетрација глутатиона у организму, то се повезује са патогенезом болести јетре, плућа и неуроде-



генеративних болести [119]. Такође присутна је и слабост имуног система јер су пролиферација, раст и диференцијација ћелија имуног система зависне од GSH [118]. Сматра се да је и процес старења повезан са концентracијом глутатиона, млађе особе га имају више него старије [120].

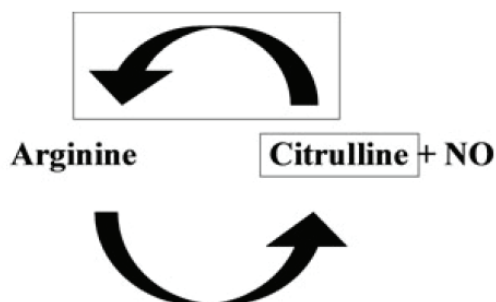
Глутатион је неопходан за функционисање GSH ензима који учесњтвују у првој и другој линији одбране у спречавању цитотоксичног ефекта деловања ROS, јер сам није довољан

## 1.7 Л—Цитрулин



Л-Цитрулин или 2-амино-5-(карбамоиламино) пентаноинска киселина, је алфа-аминокиселина присутна код свих живих организама. Најбогатији извор је лубеница из које је први пут изолована и по којој је добила име. Спада у не-есенцијалне аминокиселине и синтетише се у организму, тачније у цревима и циркулацијом иде до бубрега где се метаболише у Л-аргинин.

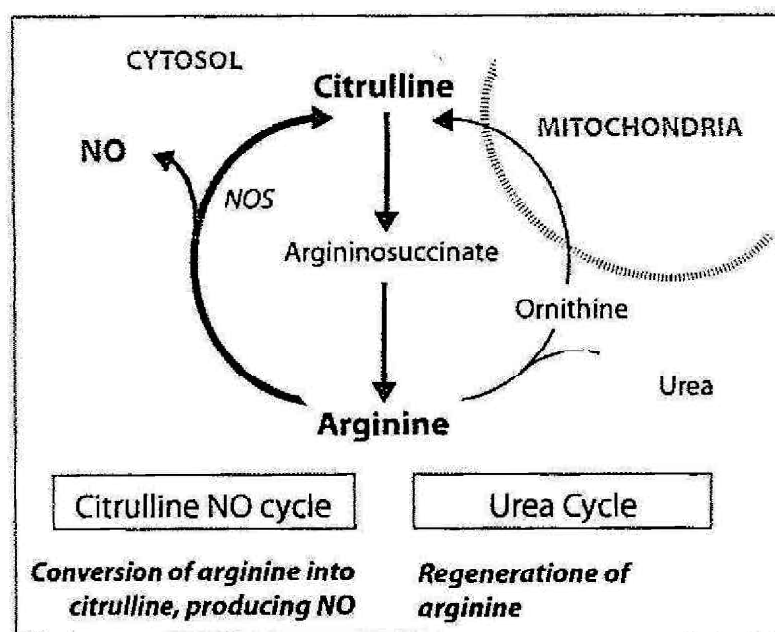
Л-аргинин је прекурсор у стварању азот оксида (NO) који има важну улогу за кардиоваскуларни имуни и нервни систем.



Слика 4 – Конверзија Аргинина, Цитрулина и Азот оксида

Из Л-аргинин се под утицајем ензима азот моноксид синтазе (NOS) стварају цитрулин и азот моноксид (NO), а под утицајем аргиназе настају Л-орнитин и полиамини (Слика 5). Л-Цитрулин делује антиоксидативно, антихипертензивно а под неком условима има анаболички ефекат. Такође Л-аргинин је есенцијална аминокиселина која служи као прекурсор за синтезу протеина, урее и креатина. Из аргинина се под утицајем ензима азот моноксид синтазе (NOS) врши цепање терминалног гванидино азота, при томе се ствара цитрулин и ослобађа азот моноксид (NO).

Л-аргинин представља семиесенцијалну аминокиселину, што значи да за већину животињских врста није неопходна за раст и развој (Јаковљевић, 1998). Међутим сва ткива преузимају Л-аргинин и користе га за синтезу протеина користе, синтезу примарног енергетског фосфата, креатинин-фосфата, за синтезу других аминокиселина (орнитин, цитрулин, глутамат, пролин), а он улази и н у циклус уреје.



Immundiagnostik AG – Stubenwald- Allee 8a – 64625 Bensheim- Germany

---

## 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

---

### 2.1 Циљеви и хипотезе студије

---

#### Циљеви студије

1. Одредити нивое проксидативних ( $O_2^-$ ,  $NO_2$ ,  $H_2O_2$  и TBARS) и антиоксидативних (SOD, GSH, CAT) параметера редокс равнотеже и нивоа уринарног цитрулина код свих болесника са СЛЕ иницијално
2. Одредити утицај ХБО на ниво проксидативних ( $O_2^-$ ,  $NO_2$ ,  $H_2O_2$  и TBARS) и антиоксидативних (SOD, GSH, CAT) параметера редокс равнотеже и нивоа уринарног цитрулина у испитиваној групи 30 дана и 60 дана након третмана
3. Одредити корелацију степена активности болести, параметера редокс равнотеже и нивоа уринарног цитрулина, у испитиваној групи 30 дана након оксигенотерапије и након 60 дана.

#### Хипотезе студије

1. Коришћењем ХБО у третману болесника са СЛЕ значајно се побољшава клиничка слика болесника, убрзава ремисија и стабилизација болести и смањују фактори упале.
2. Праћењем нивоа параметара редокс равнотеже и концентрације уринарног цитрулина у болесника са СЛЕ могуће је утврдити утицај ХБО на ниво оксидативног стреса и активност саме болести

---

## 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Ово испитивање је имало мултидисциплинарни приступ и обухватило је методе физиологије и реуматологије са применом хипербаричне терапије. Испитивање је изведено на пацијентима Клинике за реуматологију ВМА, Катедри за физиологију Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу и Центру за Хипербаричну Медицину ВМА. Студија је одобрена од стране Етичког одбора ВМА. Сви пацијенти су добровољно пристали да учествују у студији и сви испитаници су информисани о природи, сврси трајању, очекиваним ефектима и евентуалним ризицима, те је од њих добијена писмена сагласност за учешће у студији. Студија је спроведена у складу са принципима Хелсиншке декларације и добре клиничке праксе.

### Испитаници

---

Студија је обухватила 52 болесника са СЛЕ потврђеним према АРА (American Rheumatism Association) критеријумима, оба пола и различите старосне доби (старији од 18 година), рандомизовано подељених у две групе од по 26 болесника: испитивана група и контролна група. Испитивану групу сачињава 26 болесника (са јасном дијагнозом СЛЕ и одређеним СЛЕДАИ скором за активност болести, као и клиничко- лабораториским карактеристикама обољења) код којих ће се уз одговарајућу медикаментозну терапију спровести ХБО терапија у трајању од десет дана на притиску од 2. 2 АТА у трајању од 70 минута по одговарајућем протоколу за лечење хроничних упалних процеса. Контролна група се састоји од 26 болесника (са јасном дијагнозом СЛЕ и одређеним СЛЕДАИ скором за активност болести, као и клиничко-лабораториским карактеристикама обољења) код којих ће се применити одговарајућа медикаментозна терапија. Праћен је и упоређиван однос параметара између испитиване и контролне групе и то параметри клиничког стања и лабораторијских анализа, маркера запаљења као и показатеља оксидативног стреса (TBARS, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub><sup>-</sup>) показатељи антиоксидационе заштите (SOD, CAT, GSH) и имунских параметара (ЦРП, , комплетна крвна слика, Ц3, Ц4, АНА, анти дс-ДНА

Ат, уринокултура, протеинурија и цитрулин у урину). Упоређивани су параметри клиничког стања и лабораторијских анализа, маркера запаљења као и показатеља оксидативног стреса у 3 времена – 1) иницијално (на почетку студије и пре започињања ХБО), 2) прва визита након месец дана ХБО третмана и 3) друга визита два месеца након завршетка третмана. Такође, у наведеним дефинисаним терминима пратили би се и поредили параметри оксидативног стреса као и други параметри активности болести испитиваних група.

Испитаници су регрутовани са клинике за реуматологију Војномедицинске Академије (ВМА) у Београду, а сврставање у испитивану и контролну групу је вршено методом случајног избора.

### Параметри оксидационог стреса

У прикупљеним узорцима урина, спектрофотометријским методама ће се одређивати следећи биомаркери оксидационог стреса: стреса супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). индекс липидне пероксидације – мерен као TBARS: азот моноксид у форми нитрита ( $NO_2^-$ ),

#### Одређивање супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ )

Одређивање количине супероксид анион радикала ( $O_2^-$ ) у урину заснива се на реакцији  $O_2^-$  са нитро тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium* – NBT) до нитроформаза плавог [121]. Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max} = 550nm$ . Есејна смеша („assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12×100) је пипетирано 50  $\mu$ l урина и 950  $\mu$ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо урина коришћена је адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција  $E_1$ . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближн о исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као  $E_2$ . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

1. Концентрација ослобођеног  $O_2^-$  добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml урина} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

### Одређивање водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Детерминација количине водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseshoe Radish Peroxidase* – HRPO). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције  $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$  [122]. Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> је постојана за 1-60  $\mu\text{M}$  опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12×100) пипетирано је 200  $\mu\text{l}$  урина и 800  $\mu\text{l}$  свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ( $\text{pH}=7$ ), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим дода 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси  $\text{pH} \approx 12$ , помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба уместо урина је адекватна количина дестиловане воде. Концентрација ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у урину израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређивањем за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уз претходну проверу концентрације ( $A_{230}$  за 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо урина) 5, 10 и 20  $\mu\text{l}$ , 1 mM раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200  $\mu\text{l}$  дестиловане, 800  $\mu\text{l}$  раствора фенол црвеног и 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је  $\text{pH} \approx 12$  помоћу 1 M NaOH (10  $\mu\text{l}$ ). Тако је финална концентрација H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ , у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ulltrospec 4050. Од добијених апсорбанци одузимана је вредност апсорбанце следеће пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у урину израчунавана је на основу:

1. Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

2. На основу апсорбанце узорка на  $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$  ( $A_u$ ) и њеног упоеђивања са слепом пробом ( $A_{sp}$ ) израчунава се финална апсорбанца ( $\Delta A$ ) ( $A = A_u - A_{sp}$ ). Помоћу овако добивене апсорбанце, фактора  $F$  и количине урина употребљене у есеју (200 ml) и израчунавана је концентрација и количина  $H_2O_2$  у урину по формули:

$$\text{nmol } H_2O_2/\text{ml урина} = \Delta A / F$$

### Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, је одређиван индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у урину смо одређивали спектрофотометријски [123]. Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12×100) пипетирано је 800  $\mu\text{l}$  урина и 200  $\mu\text{l}$  1% ТВА у 0.05 М NaOH. Као слепа проба уместо урина коришћена је еквивалентна количина дестловане воде. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у урин спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda = 530\text{nm}$ .

1. Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml урина} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25,$$

при чему је  $A_u$  апсорбанца узорка, док је  $A_{sp}$  апсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј.

Важно је напоменути да се, за разлику од свих осталих биохемијских параметара, ниво TBARS изражава у  $\mu\text{M}$ , док је количина осталих молекула изражавана у nM. Разлог је у количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара. Овакав наш резултат је последица неспецифичности TBARS, као теста, јер он представља сумацију целог једног начина деловања реактивних кисеоничних и азотних врста, док сви остали параметри везани за појединачне молекуле, имају различите механизме дејства, као појединачне кисеоничне врсте.



### Одређивање нитрита ( $\text{NO}_2^-$ )

Одређивање количине ослобођених нитрита у урину представљало је за нас најдоступнију индиректну методу за одређивање функционалности ендотелног L-аргинин: NO система у коронарној циркулацији. С обзиром да су методе за директно одређивање азотног монооксида (NO) нама за сада недоступне, спектрофотометријска метода одређивања количине ослобођених нитрита представља доступну и довољно поуздану методу за ову процену [124]. С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита у урину представља количину ослобођеног NO-а. Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 × 100) је пипетирано 1 ml урина, 250  $\mu\text{l}$  свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125  $\mu\text{l}$  амонијачног пуфера (pH = 9.0), кога сачињавају амонијум хлорид ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) и натријум тетраборат ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо урина коришћено је 1 ml дестиловане воде.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорака, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM  $\text{NaNO}_2$  у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24  $\mu\text{l}$ , чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol  $\text{NO}_2^-/\text{ml}$ . Након стабилизације доје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda=550$  nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:



Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

$$\frac{\text{Екстинија стандарда} - \text{Екстинија слепе пробе}}{\text{Контракција NaNO}_2 \text{ Екстинија у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Дељењем разлике екстинија узорка и слепе пробе са стандардом F добили смо вредности нитрита у урину:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml урина} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

### Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Одређивање активности супероксид дисмутазе врши се адреналинском методом, и она припада групи метода „негативног” типа, због смањења брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од  $O_2^{\cdot -}$  [125]. Супероксид дисмутазе уклања  $O_2^{\cdot -}$ . При чему инхибира реакцију аутооксидације адреналина Брзина којом се врши аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома.

Брзине аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Као мера каталитичке активности ензима користи се проценат инхибиције. Брзина аутооксидације адреналина у недостатку ензима важи као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности.

Реакциона смеша од 3,2 ml која се састоји од: 3 ml карбонат пуфера Ph = 10,2 и 0,1 ml раствора адреналина, додато је 0,01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидације адреналина праћена је у току 4 минута на 480 nm. Температура реакције је на температурном нивоу 26-300 °C. Контролна реакција је рађена упоредо. Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорака, према контролној реакцији аутооксидације адреналина коришћен је за израчунавање SOD активности. Количина SOD престављена је у јединицама SOD активности по g Hb (jed/ g Hb). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50% инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунавање је урађено по следећој једначини:

$$\text{SOD} - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta L) \times R}{V \times Hb \times K}$$

$\Delta K$  – промена апсорпције контролне реакције у минути

$\Delta L$  – промена апсорпције реакције са узорком у минути

$V$  – запремина узорка који се сипа у реакциону смешу (ml)

$Hb$  – количина џемоглобина (g/ 100 ml lizata)

$R$  – разблажење

### Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи Beutler-a [126]. Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. Водоник –пероксид на тој таласној дужини апсорбује светлост. Концентрација водоник-пероксида тачно се одеђује на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30% раствора  $H_2O_2$  (1:100). Концентрација водоник-пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за  $H_2O_2$  на 230 nm, 0,071 по формули:

$$C = \frac{\Delta A}{0,071}$$

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM.

Реакциона смеша:

У кварцну кивету у којој се налази 50  $\mu$ l пуфера додаје се од 5 до 50  $\mu$ l узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm. У току 3 минута. Активност се изражава у јед/ mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог  $H_2O_2$ , изражена у  $\mu$ M, у минути. Прорачун се врши по следећој једначини:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \cdot R}{0,071 \cdot \text{Low} \cdot V}$$

$\Delta A$  — промена апсорбанце у минути

$R$  — разблажење

$V$  — запремина узорка (ml)

Low — количина протеина (mg/ ml сонификата)

### Одређивање активности глутатиона (GSH)

Спектрофотометријском методом по Beutler одређује се ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми, а то се врши оксидацијом глутатиона (GSH) помоћу 5,5-дитио- бис-6,2-нитробензеовом киселином (DTNB) [127]. Глутатион (GSH) се естрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4ml плазме и 0,75ml раствора за преципитацију (1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4°C). Након мешања на Vortex-мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 грм. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. 3 епрувете (У епрувети (12×100) пипетира се 300 µl венског ефлуента, NaHPO<sub>4</sub> и 100 µl DTNB/ ml 1% натријум цитрата). За слепу пробу користи се дестилована проба. Концетрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрациског дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. Да би се конструисала стандардна крива користи се стандардни Stock- раствор редукованог глутатиона концетрације 1,5 mmol/l. У 4 епрувете се пипетира (уместо венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40 µl 1 mM раствора GSH, 300 µl хладног перфузионог Krebs- Hensenleit- овог раствора. На тај начин се одреди концетрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/ GSH, /ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\max} = 420$  nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B) чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концетрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

$$\Delta A = \frac{\Delta A}{\text{nmol GSH}/\text{cuv}}$$

$$\text{Nmol GSH/ml ефлуента} = \Delta A / F$$

### Одређивање нивоа L- Citrullina

Одређивање нивоа L- Citrullina у урину је методом ELISA са колориметрским принципом теста у комбинацији са узорцима урина и прочитаним на 540 nm. Мерни опсег је од 6, 25-400 µmol/l

---

## Статистичка анализа

---

Комплетна статистичка анализа података извршена је помоћу комерцијалног статистичког софтвера SPSS Statistics 18.

Од параметара дескриптне статистике коришћени су средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD). Провера нормалности дистрибуције података извршена је применом Kolmogorov-Smirnov testa. У зависности од резултата овог теста, статистичка значајност између 2 независне групе проверавана је применом Студентовог t-теста (алтернативно Mann-Whitney тест). Поређења више од 2 зависне групе (унутар третмана) спроведена су применом Friedmanovog testa уз накнадна *post hoc* парна поређења применом Wilcoxon testa.

Поједине варијабле су представљене у виду фреквенција појединих обележја (категорија) а статистичка значајност разлика утврђена је применом  $\chi^2$  квадрат теста.

Статистички значајна разлика процењивана је на нивоу:

\*  $p < 0,05$ ,

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

## 4. РЕЗУЛТАТИ

Табела 3 – Основни епидемиолошко-демографски подаци болесника

Параметри*	Без ХБОТ (иниц)	Поређење ←   →	ХБОТ (иниц)	ХБОТ (30. дан)	ХБОТ (60. дан)
Пол, n (%)					
мушки женски	5 (19,2) 21 (80,8)	$\chi = 0,134$ $p = 1,000$	5 (19,2) 21 (80,8)	-	-
Укупно	26 (100, 0)		26 (100,0)		
Год. старости	50,92 ± 9,82	$t = 0,885$ $p = 0,380$	53,42 ± 10,52	-	-
Тел. тежина (kg)	65,85 ± 10,00	$z = 1,777$ $p = 0,076$	71,19 ± 11,86	71,31 ± 11,89 <sup>ns</sup>	71,58 ± 12,17 <sup>ns</sup>

\* Вредности параметара (осим пола) приказане су као средње вредности ± SD

<sup>ns</sup> –статистички незначајна разлика у односу на иницијалну телесну тежину.

Није утврђена статистички значајна разлика дистрибуције полова у испитиваним групама. На иницијалном мерењу, обе групе су биле уједначене када су у питању године старости и телесна тежина. У групи ХБОТ током наредних мерења није регистрована значајна промена телесне тежине.

Табела 4 – Упоредни приказ вредности неких параметара крви у испитиваним групама

Параметри*	Без ХБОТ (иниц)	Поређење ←   →	ХБОТ (иниц)	ХБОТ (30. дан)	ХБОТ (60. дан)
Er (x 10 <sup>12</sup> /L)	4,47 ± 0,42	$z = 1,136$ $p = 0,256$	4,54 ± 0,22	4,51 ± 0,19	4,52 ± 0,18
Hb (g/L)	133,50 ± 10,13	$z = 1,714$ $p = 0,087$	129,11 ± 8,05	131,07 ± 8,91	130,26 ± 9,58
Le (x 10 <sup>9</sup> /L)	6,21 ± 1,21	$z = 1,739$ $p = 0,082$	7,31 ± 2,28	6,67 ± 1,85	6,53 ± 1,96
Tr (x 10 <sup>9</sup> /L)	246,96 ± 67,96	$z = 0,348$ $p = 0,728$	245,84 ± 57,28	246,69 ± 45,06	249,88 ± 54,39

\* Вредности свих параметара приказане су као средње вредности ± SD

За статистичку анализу коришћен је Mann-Whitney тест

На иницијалном мерењу нису утврђене статистички значајне разлике вредности приказаних параметара две групе.

Табела 5 – Парна поређења параметара у групи ХБОТ

Параметри	Иниц: 30. дан	Иниц: 60. дан	30. дан: 60. дан
Er	$\chi^2=3,78$ ; $p=0,51$	$\chi^2=3,78$ ; $p=0,51$	$\chi^2=3,78$ ; $p=0,51$
Hb	$z = 2,61$ ; $p=0,009$	$z = 1,66$ ; $p=0,096$	$z = 1,66$ ; $p=0,096$
Le	$z = 2,93$ ; $p=0,003$	$z = 2,71$ ; $p=0,007$	$z = 0,59$ ; $p=0,554$
Tr	$\chi^2=2,69$ ; $p=0,259$	$\chi^2=2,69$ ; $p=0,259$	$\chi^2=2,69$ ; $p=0,259$

Коришћен је Friedman тест, у случају добијања значајне разлике парна поређења изведена применом Wilcoxon теста.

Значајне разлике добијене када је у питању Hb (тренд раста) и Le (тренд пада) вредности у односу на иницијалне податке.

Табела 6 – Упоредни приказ вредности неких параметара крви у испитиваним групама

Параметри*	Без ХБОТ (иниц)	Поређење ←   →	ХБОТ (иниц)	ХБОТ (30. дан)	ХБОТ (60. дан)
CRP (mg/L)	2,15 ± 1,39	$z = 1,684$ $p = 0,092$	3,71 ± 3,78	3,35 ± 3,07	2,51 ± 1,62
Urea (mmol/L)	5,17 ± 1,20	$z = 1,859$ $p = 0,063$	4,66 ± 1,77	5,56 ± 2,58	4,94 ± 1,76
Kreatinin ( $\mu\text{mol/L}$ )	72,51 ± 15,04	$z = 1,611$ $p = 0,107$	65,70 ± 19,94	68,70 ± 26,74	68,73 ± 16,38
CKDeGFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	86,61 ± 20,35	$z = 0,934$ $p = 0,350$	92,38 ± 17,54	91,42 ± 14,21	92,26 ± 14,43
Proteini (g/L)	69,07 ± 5,56	$z = 1,782$ $p = 0,075$	72,19 ± 5,87	71,53 ± 5,06	72,03 ± 5,30
Albumin (g/L)	42,64 ± 5,03	$z = 0,193$ $p = 0,847$	42,96 ± 4,39	42,88 ± 4,20	43,61 ± 4,00
Glukoza (mmol/L)	5,03 ± 0,72	$z = 0,193$ $p = 0,847$	5,06 ± 1,07	5,26 ± 1,94	4,99 ± 0,80
Trigliceridi (mmol/L)	1,43 ± 0,41	$z = 1,849$ $p = 0,064$	1,22 ± 0,54	1,26 ± 0,40	1,27 ± 0,42
Holesterol (mmol/L)	5,71 ± 0,80	$z = 0,256$ $p = 0,798$	5,69 ± 0,82	5,64 ± 0,79	5,69 ± 0,79
Мокраћна кис. ( $\mu\text{mol/L}$ )	279,03 ± 85,70	$z = 0,915$ $p = 0,360$	252,50 ± 92,71	247,73 ± 94,68	260,23 ± 94,78

\* Вредности свих параметара приказане су као средње вредности ± SD

За статистичку анализу коришћен је Mann-Whitney test

На иницијалном мерењу нису утврђене статистички значајне разлике вредности приказаних параметара две групе.

Табела 7 – Парна поређења параметара у групи ХБОТ

Параметри	Иниц:30. дан	Иниц:60. дан	30. дан:60. дан
CRP	$z = 0,92$ ; $p=0,354$	$z = 2,55$ ; $p=0,011$	$z = 2,56$ ; $p=0,010$
Urea	$z = 2,41$ ; $p=0,016$	$z = 1,09$ ; $p=0,273$	$z = 2,78$ ; $p=0,005$
Kreatinin	$\chi^2=3,51$ ; $p=0,173$	$\chi^2=3,51$ ; $p=0,173$	$\chi^2=3,51$ ; $p=0,173$
CKDeGFR	$\chi^2=0,55$ ; $p=0,758$	$\chi^2=0,554$ ; $p=0,758$	$\chi^2=0,554$ ; $p=0,758$
Proteini	$\chi^2=0,46$ ; $p=0,792$	$\chi^2=0,467$ ; $p=0,792$	$\chi^2=0,467$ ; $p=0,792$
Albumin	$z = 0,08$ ; $p=0,935$	$z = 1,51$ ; $p=0,131$	$z = 2,06$ ; $p=0,039$
Glukoza	$\chi^2=0,32$ ; $p=0,851$	$\chi^2=0,323$ ; $p=0,851$	$\chi^2=0,323$ ; $p=0,851$
Trigliceridi	$\chi^2=2,15$ ; $p=0,340$	$\chi^2=2,155$ ; $p=0,340$	$\chi^2=2,155$ ; $p=0,340$
Holesterol	$z = 1,09$ ; $p=0,276$	$z = 1,10$ ; $p=0,269$	$z = 1,94$ ; $p=0,052$
Мокраћна кис.	$z = 1,26$ ; $p=0,206$	$z = 2,51$ ; $p=0,012$	$z = 3,08$ ; $p=0,002$

Коришћен је Friedman тест, у случају добијања значајне разлике парна поређења изведена применом Wilcoxon теста.

Статистички значајне неконзистентне промене, у односу на иницијалне вредности, добијене су код CRP, uree, albumina, holesterola i мокраћне kiseline.

Табела 8 – Упоредни приказ вредности неких имунолошких параметара у испитиваним групама

Параметри*	Без ХБОТ (иниц)	Поређење ←   →	ХБОТ (иниц)	ХБОТ (30. дан)	ХБОТ (60. дан)
C3 (g/L)	$1,03 \pm 0,21$	$z = 0,898$ $p = 0,369$	$0,98 \pm 0,16$	$0,98 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,13$
C4 (g/L)	$0,28 \pm 0,08$	$z = 1,377$ $p = 0,168$	$0,30 \pm 0,12$	$0,31 \pm 0,12$	$0,29 \pm 0,12$
SLEDAI	$1,11 \pm 0,81$	$z = 0,734$ $p = 0,463$	$1,00 \pm 1,01$	$0,61 \pm 0,80$	$0,65 \pm 0,74$

\* Вредности свих параметара приказане су као средње вредности  $\pm$  SD

За статистичку анализу коришћен је Mann-Whitney тест

На иницијалном мерењу нису утврђене статистички значајне разлике вредности приказаних параметара две групе.

Табела 9 – Парна поређења параметара у групи ХБОТ

Параметри	Иниц: 30. дан	Иниц: 60. дан	30. дан: 60. дан
C3	$\chi^2=3,02$ ; $p=0,221$	$\chi^2=3,02$ ; $p=0,221$	$\chi^2=3,02$ ; $p=0,221$
C4	$\chi^2=4,52$ ; $p=0,104$	$\chi^2=4,52$ ; $p=0,104$	$\chi^2=4,52$ ; $p=0,104$
SLEDAI	$z = 2,88$ ; $p=0,004$	$z = 2,71$ ; $p=0,007$	$z = 0,57$ ; $p=0,564$

Коришћен је Friedman тест, у случају добијања значајне разлике парна поређења изведена применом Wilcoxon теста.

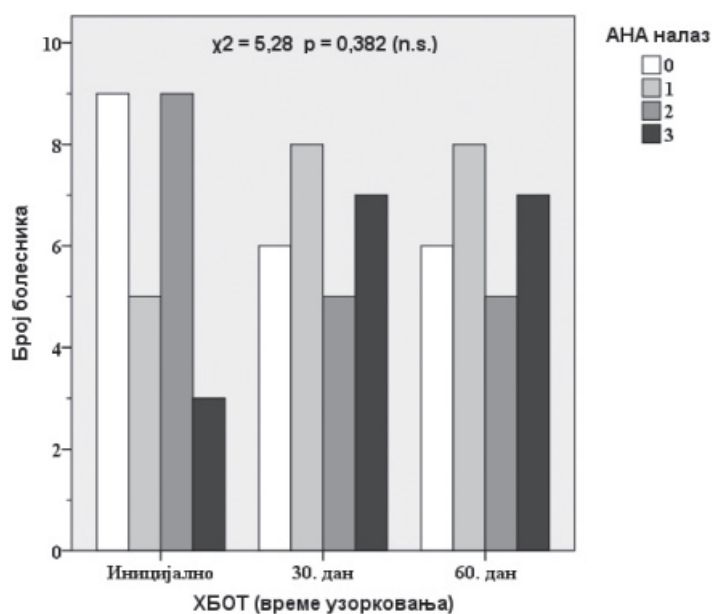
У односу на иницијалне вредности, уочен је статистички значајан пад SLEDA индекса у групи ХБОТ 30. и 60. дана третмана. Вредности друга два параметра остају уједначене током целог периода праћења.

Табела 10 – Дистрибуција налаза ANA теста на иницијалном мерењу болесника обе групе

	Налаз		Без ХБОТ (иниц)	ХБОТ (иниц)	Укупно
	ANA (inic)	0	N	11	9
% (ANA)			55,0	45,0	100,0
% (grupa)			42,3	34,6	38,5
1		N	10	5	15
		% (ANA) % (grupa)	66,7 38,5	33,3 19,2	100,0 28,8
2	N	3	9	12	
	% (ANA) % (grupa)	25,0 11,5	75,0 34,6	100,0 23,1	
3	N	2	3	5	
	% (ANA) % (grupa)	40,0 7,7	60,0 11,5	100,0 9,6	
Укупно	N	26	26	52	
	% (ANA)	50,0	50,0	100,0	
	% (grupa)	100,0	100,0	100,0	
Поређење			$\chi^2 = 5,067$ ; $p = 0,155$		

На иницијалном мерењу, није утврђена статистички значајна разлика дистрибуције ANA налаза у испитиваних група болесника.





Графикон 1 – Дистрибуција АНА налаза у групи ХБОТ

Није утврђена статистички значајна разлика у дистрибуцији АНА налаза у групи ХБОТ болесника током 3 периода узорковања крви. Региструје се нешто већи број болесника са налазом АНА (3+) после 30 дана и на финалном мерењу.

Поређењем лабораториских анализа у урину: налаз седимента урина, уринкултуре, протеинурије није запажена статистички значајна разлика између испитиваних група, као и унутар групе са ХБОТ у праћеним временским интервалима поређењима.

Табела 11 – Упоредни приказ вредности цитрулина у урину у испитиваним групама

Параметри*	Без ХБОТ (иниц)	Поређење ←   →	ХБОТ (иниц)	ХБОТ (30. дан)	ХБОТ (60. дан)
Citrulin ( $\mu\text{mol/l}$ )	50,03 $\pm$ 49,68	$z = 0,750$ $p = 0,453$	65,38 $\pm$ 68,33	66,62 $\pm$ 65,49	66,07 $\pm$ 67,38

\* Вредности параметра приказане су као средње вредности  $\pm$  СД

За статистичку анализу коришћен је Манн-Вхитнеу тест

На иницијалном мерењу нису утврђене статистички значајне разлике вредности цитрулина две групе.

Табела 12 – Парна поређења вредности цитрулина у групи ХБОТ

Параметри	Иниц: 10. дан	Иниц: 30. дан	30. дан:60. дан
Citrulin	$\chi^2=4,21$ ; $p = 0,12$	$\chi^2=4,21$ ; $p = 0,12$	$\chi^2=4,21$ ; $p = 0,12$

Применом Фриедман теста није добијена статистички значајна разлика између вредности цитрулина током целокупног трајања клиничке студије ( $\chi^2=4, 21; p = 0, 12$ ).

### Прооксидативни параметри – резултати

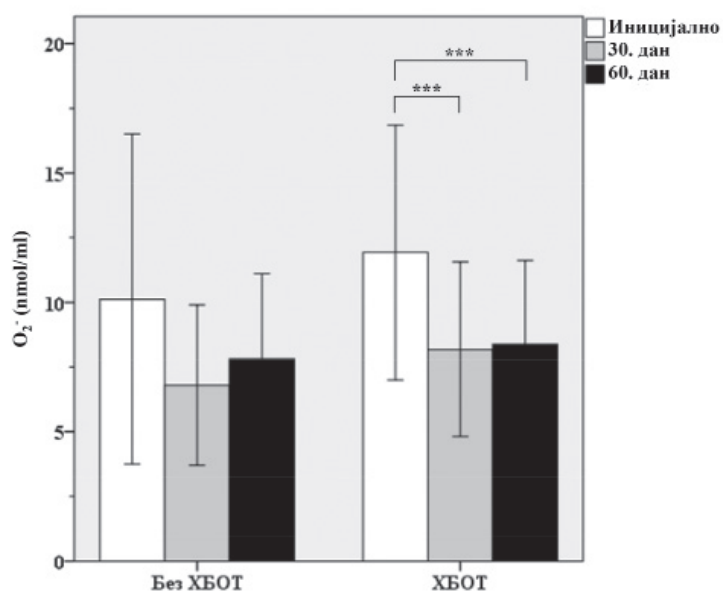
Табела 13 – Динамика прооксидативних параметара у испитиваних група болесника

Параметри	Без ХБОТ			ХБОТ		
	Иниц.	30. дан	60. дан	Иниц.	30. дан	60. дан
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	10,12 ± 6,38	6,79 ± 3,10	7,81 ± 3,28	11,92 ± 4,93	8,18 ± 3,37	8,38 ± 3,22
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	2,40 ± 0,61	2,35 ± 0,65	3,17 ± 1,18	2,72 ± 0,58	2,77 ± 0,76	2,75 ± 0,81
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	1,38 ± 0,61	1,47 ± 0,48	1,25 ± 0,70	1,52 ± 0,55	1,51 ± 0,59	1,54 ± 0,61
TBARS (μmol/ml)	0,87 ± 0,33	1,01 ± 0,25	0,90 ± 0,38	1,01 ± 0,37	1,09 ± 0,41	1,05 ± 0,39

Табела 14 – Поређење вредности прооксидативних параметара у испитиваних група болесника током 3 периода узорковања

Параметри	Групе	Иниц.	30. дан	60. дан
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Без ХБОТ	$z = 1,647$	$z = 0,494$	$z = 0,970$
	ХБОТ	$p = 0,099$	$p = 0,621$	$p = 0,332$
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Без ХБОТ	$z = 1,914$	$z = 0,275$	$z = 2,654$
	ХБОТ	$p = 0,056$	$p = 0,784$	$p = 0,008$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Без ХБОТ	$z = 0,989$	$z = 0,860$	$z = 0,961$
	ХБОТ	$p = 0,323$	$p = 0,390$	$p = 0,337$
TBARS	Без ХБОТ	$z = 0,815$	$z = 1,098$	$z = 0,567$
	ХБОТ	$p = 0,415$	$p = 0,272$	$p = 0,570$

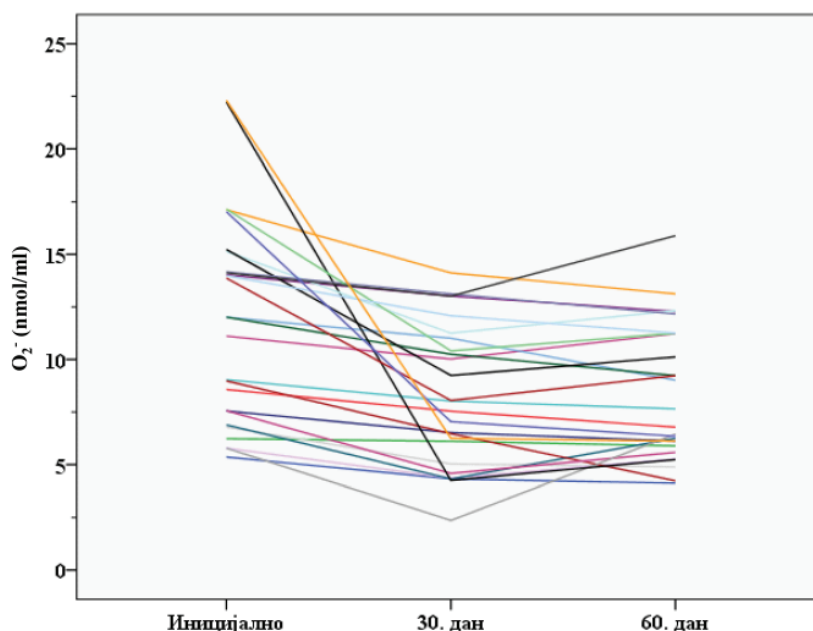
Статистички значајна разлика између две групе утврђена је једино код параметра NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 60. дана од почетка студије. Значајно веће вредности овог параметра ( $p = 0, 008$ ) измерене су у групи без ХБОТ.



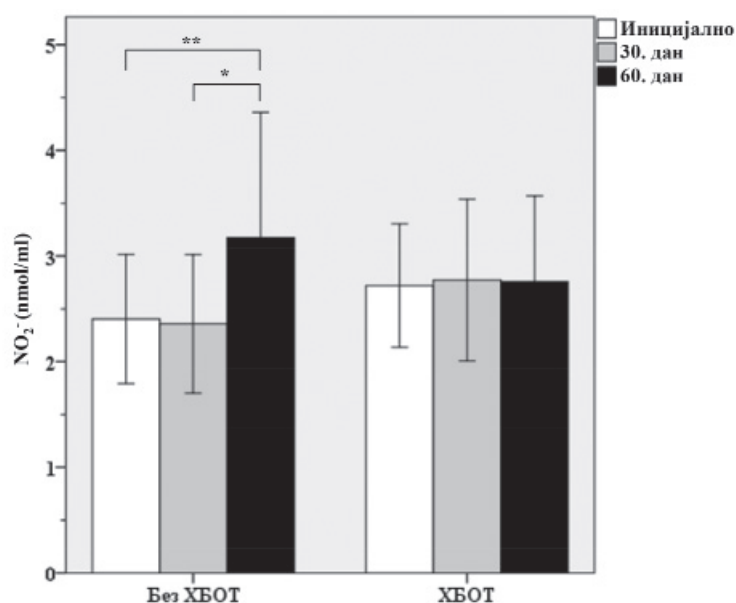
\*\*\* $p < 0,001$  између појединих мерења.

Графикон 2 – Нивои супероксид анјон радикала  $O_2^-$  – у урину (презентоване су средње вредности са СД). Поређене су иницијалне вредности, после 30 дана и након 60 дана у обе групе (без ХБОТ и са ХБОТ).

Статистички значајне разлике унутар група регистроване су само код болесника групе ХБОТ (значајан пад вредности  $O_2^-$  30. и 60. дана у односу на иницијалне вредности).



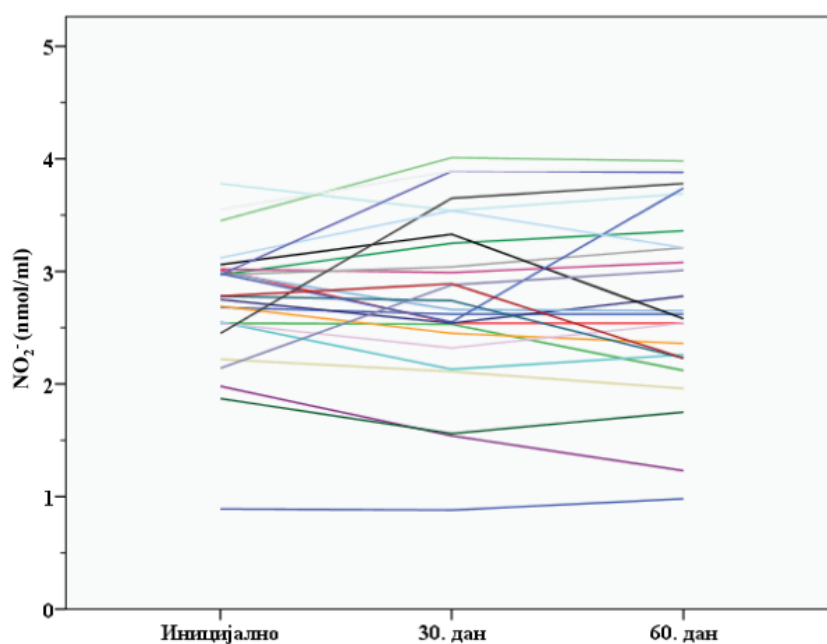
Графикон 3 – Појединачни прикази нивоа  $O_2^-$  у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима. Код већине пацијената запажа се смањење нивоа  $O_2^-$  у периоду након ХБОТ и до прве визите након 30 дана.



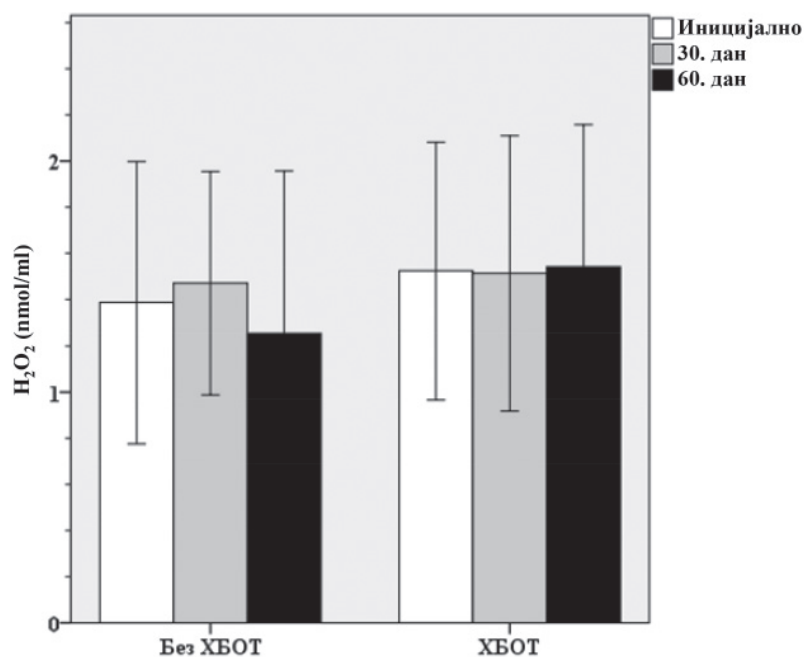
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  између појединих мерења.

Графикон 4 – Нивои нитрита  $\text{NO}_2^-$  – у урину (презентоване су средње вредности са СД). Поређене су иницијалне вредности, после 30 дана и након 60 дана у обе групе (без ХБОТ и са ХБОТ).

Статистички значајне разлике унутар група регистроване су само код болесника групе без ХБОТ (значајан пораст вредности  $\text{NO}_2^-$  60. дана у односу на иницијалне вредности) и вредности регистроване 30. дана.

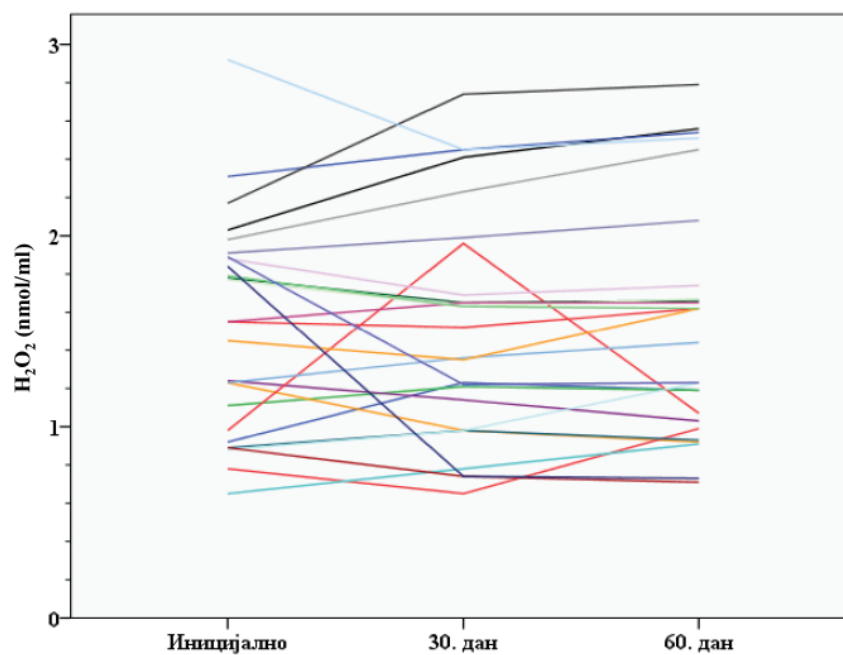


Графикон 5 – Појединачни прикази нивоа нитрита  $\text{NO}_2^-$  у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима.

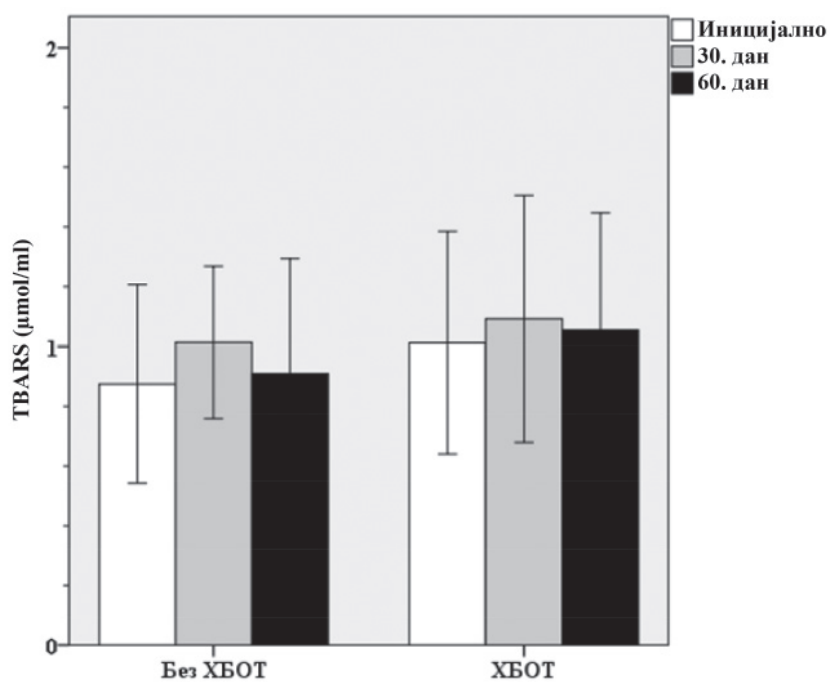


Графикон 6 – Нивои водоник пероксида  $H_2O_2$  у урину (презентоване су средње вредности са SD). Поређене су иницијалне вредности, после 30 дана и након 60 дана у обе групе (без ХБОТ и са ХБОТ).

Нису утврђене статистички значајне разлике унутар група.

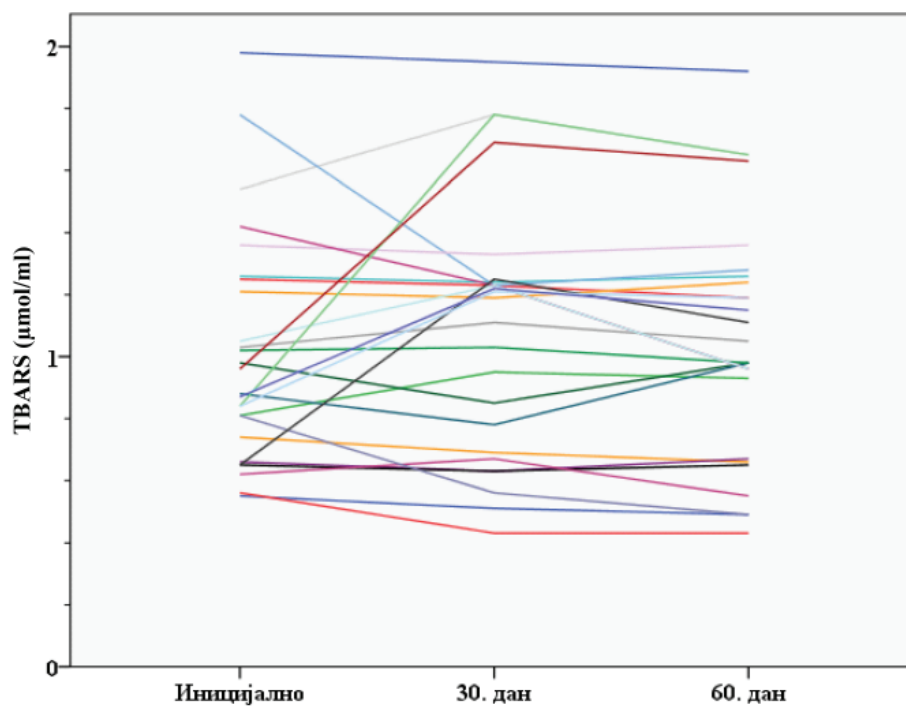


Графикон 7 – Појединачни прикази нивоа водоник пероксида  $H_2O_2$  у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима.



Графикон 8 – Нивои TBARS у урину (презентоване су средње вредности са SD).  
Поређене су иницијалне вредности, после 30 дана и након 60 дана у обе групе  
(без ХБОТ и са ХБОТ).

Нису утврђене статистички значајне разлике унутар група.



Графикон 9 – Појединачни прикази TBARS у урину код пацијената у групи ХБОТ,  
праћени у планираним временским интервалима

### Антиоксидативни параметри – резултати

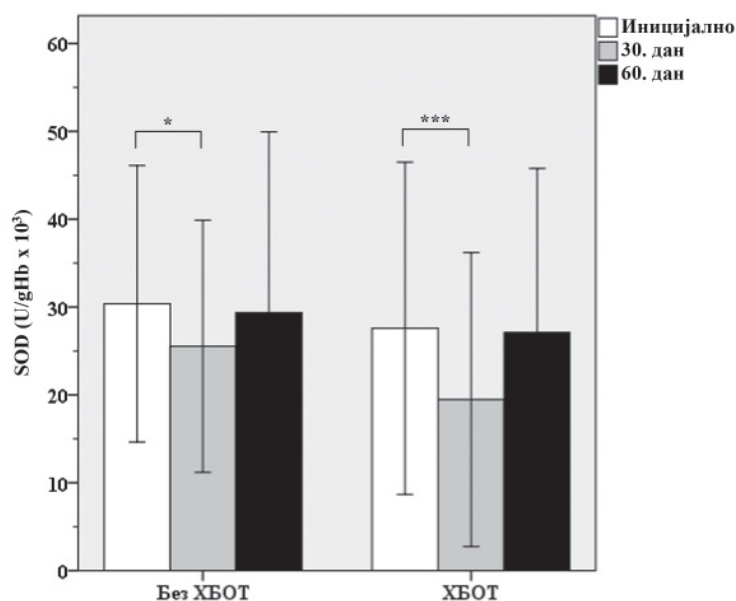
Табела 15 – Динамика антиоксидативних параметара у испитиваних група болесника

Параметри	Без ХБОТ			ХБОТ		
	Иниц.	30. дан	60. дан	Иниц.	30. дан	60. дан
SOD (U/gHbx10 <sup>3</sup> )	30,37 ± 15,73	25,53 ± 14,35	29,36 ± 20,57	27,58 ± 18,91	19,46 ± 16,73	27,11 ± 18,67
GSH (nmol/mlx10 <sup>3</sup> )	70809,20 ± 11321,73	70323,50 ± 10381,25	77117,11 ± 15761,23	66342,73 ± 10730,54	79433,05 ± 12989,09	69712,81 ± 17963,12
CAT (U/gHbx10 <sup>3</sup> )	6,43 ± 1,45	6,41 ± 1,71	4,35 ± 0,62	5,78 ± 0,72	4,77 ± 0,84	3,81 ± 0,71

Табела 16 – Поређење вредности антиоксидативних параметара у испитиваних група болесникатоком 3 периода узорковања

Параметри	Групе	Иниц.	30. дан	60. дан
SOD	Без ХБОТ	$z = 1,510$	$z = 1,528$	$z = 0,348$
	ХБОТ	$p = 0,131$	$p = 0,126$	$p = 0,728$
GSH	Без ХБОТ	$z = 1,611$	$z = 3,115$	$z = 0,156$
	ХБОТ	$p = 0,107$	$p = 0,002$	$p = 0,876$
CAT	Без ХБОТ	$z = 1,593$	$z = 3,921$	$z = 0,933$
	ХБОТ	$p = 0,111$	$p = 0,001$	$p = 0,351$

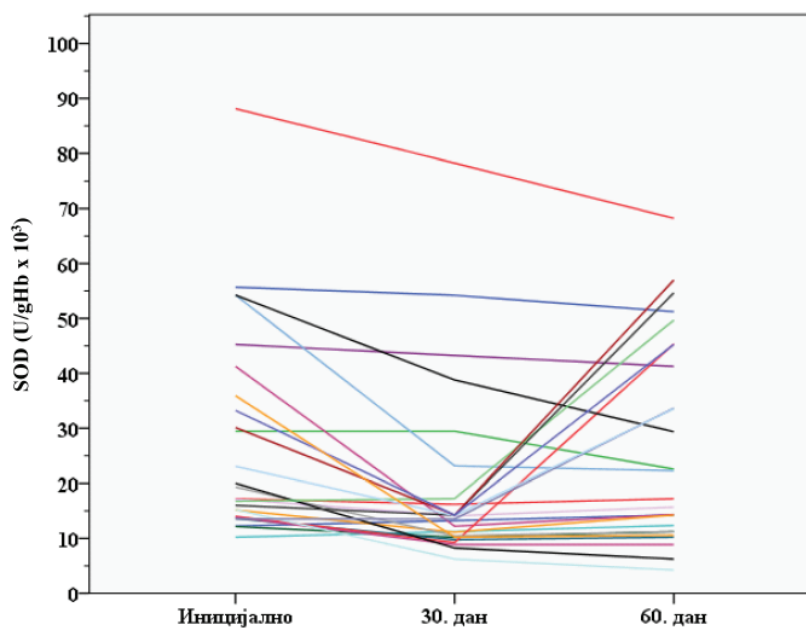
Статистички значајна разлика између две групе утврђена је код 2 параметра (GSH i CAT) 30. дана од почетка студије. Значајно веће вредности GSH ( $p = 0,002$ ) измерене су у групи ХБОТ. Супротно томе, значајно веће вредности CAT регистроване су у групи болесника без ХБОТ.



\*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  између појединих мерења.

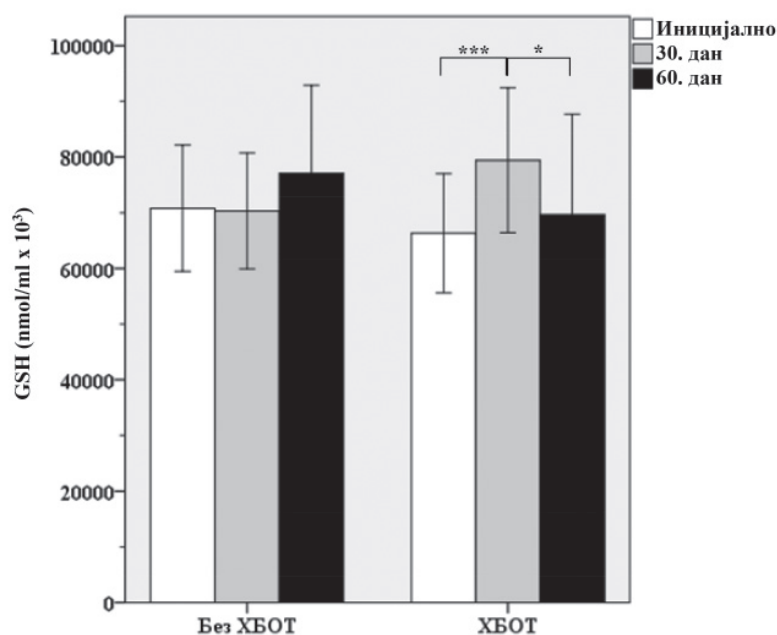
Графикон 10 – Нивои SOD у крви (презентоване су средње вредности са SD

Статистички значајне разлике унутар група регистроване су у обе групе болесника (значајно веће вредности на иницијалном мерењу у односу на мерење после 30 дана. Пад SOD активности био је више изражен у болесника ХБОТ групе.



Графикон 11 – Појединачни прикази SOD у крви код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима

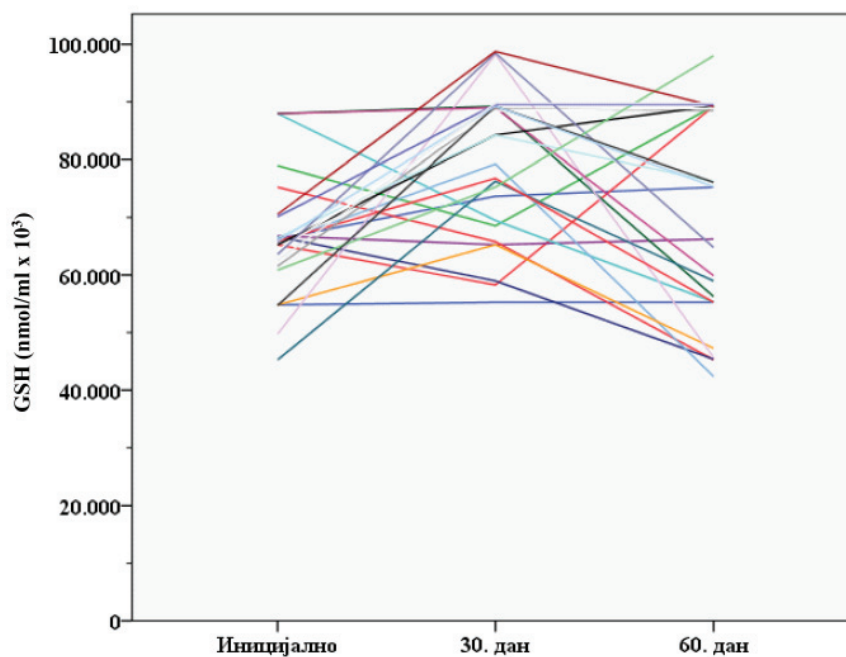




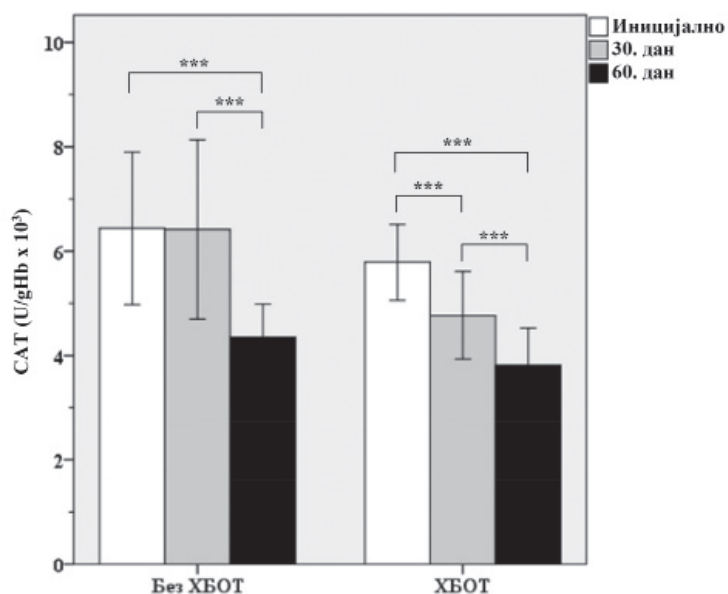
\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  између појединих мерења.

Графикон 12 – Нивои GSH у крви (презентоване су средње вредности са SD

Статистички значајне разлике унутар група регистроване су само у болесника групе ХБОТ (значајно веће вредности GSH после 30 дана како у односу на иницијално мерење тако и у односу на 60. дан).



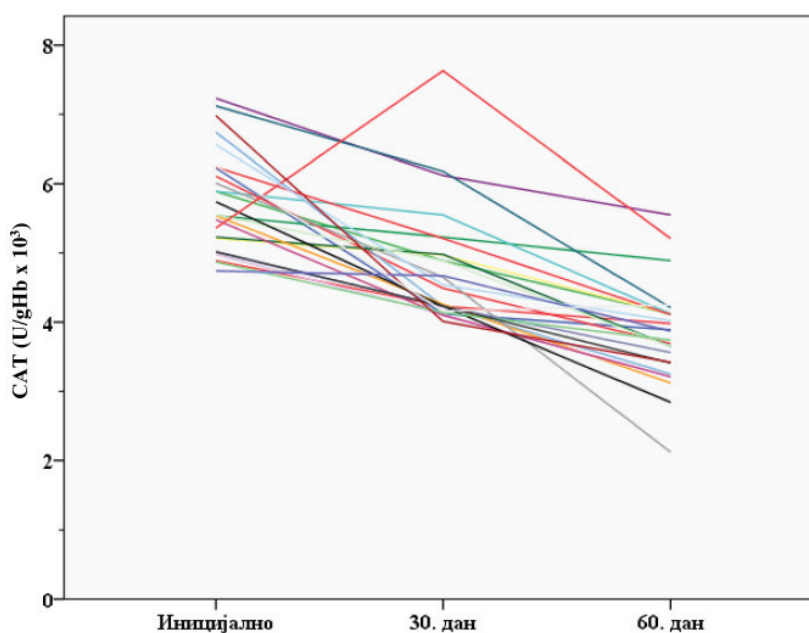
Графикон 13 – Појединачни прикази GSH у крви код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима



\*\*\* $p < 0,001$  између појединих мерења.

Графикон 14 – Нивои САТ у крви (презентоване су средње вредности са SD)

Бројне, статистички значајне разлике унутар група регистроване су у обе групе болесника. Најзначајније карактеристике су временско-зависни пад активности САТ у групи ХБОТ и дисконтинуирани пад активности САТ 60. дана у групи болесника без ХБОТ. После 60 дана САТ активност има приближно исти ниво у обе групе.



Графикон 15 – Појединачни прикази САТ у крви код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима

---

## 5. ДИСКУСИЈА

---

### Утицај хипербаричне терапија на СЛЕ

---

Кисеоник је неопходан за живот, мозак за три до четири минута без њега може да се трајно оштети. Такође у току свакодневних метаболичких процеса у којима учествује кисеоник ствара се велики број продуката на ћелијском нивоу, слободних радикала, који су у стању да оштете ћелију. Кисеоник учествује у синтези (аутооксидацији) катехоламина и стероидних хормона као и у елиминацији пуринских неклеотида (АТФ и ГТФ), због чега се ствара ксантин и трансферише у ацидум урикум. Такође има улогу у неспецифичној имунолошкој одбрани током фагоцитозе и разградње патогених микроорганизама. [128, 129]. Да би се организам сачувао и одржао оксидативну равнотежу постоји стална борба између реактивних кисеоничних врста (ROS), али и елемената антиоксидационог заштитног система (AOS). Улога (AOS) је да одржава равнотежу између процеса оксидације узроковане слободним радикалима (оксидансима) и антиоксидационог заштитног система. Та равнотежа је благо померена у корист оксидационих процеса, јер је то неопходно за стварање енергије, такође и у нормалним метаболичким процесима стварају се увек слободни радикали. Тако створене слободне радикале организам контролише антиоксидансима, али код нарушавања овакве равнотеже долази до оксидативног стреса [45]. Оксидациони стрес подразумева повећану производњу реактивних кисеоничних врста у биолошком систему. Најважнији су NO, супер-оксид анјон радикал  $O_2^-$ , хидроксил радикал  $HO^\cdot$ , водоник пероксид  $H_2O_2$  и пероксинитрит  $ONOO^-$  [130]. У физиолошким процесима цитотоксично деловање слободних радикала је контролисано и њега спречавају антиоксидантни ензими као што су супероксид – дисмутаза или глутатион пероксидаза [131]. Оксидациони стрес се налази у патогенези многих патофизиолошких стања у коронарној болести, хипертензији, хиперлипидемији, психичком стресу, инфламацији, повишеној телесној температури [103, 104, 132, 132].

Системски еритемски лупус, је хронична аутоимуна болест са захватом многих органских система. Познато је да у основи имунопатогенезе запаљених реуматичних болести је васкулитис са задебљањем крвних судова, што

узрокује смањен прилив кисеоника са метаболичким поремећајима при чему се ослобађају многи медијатори запаљења пре свих слободни кисеонички радикали, а све то има за последицу исхемију, некрозу и на крају деструкцију ткива [134]. Оксидациони стрес код СЛЕ настаје као последица повећане продукције реактивних кисеоничних врста, али и смањене антиоксидационе заштите. У таквим ткивима је нарушена циркулација, при чему кисеоник недостаје и када се она подвргну дејству хипербаричне оксигенотерапије због пораста парцијалног притиска кисеоника појачана је перфузија и дифузија у ткивима и на тај начин се ткива опскрбљују кисеоником, и до 20 пута више [135, 31]. У исхемичним зглобовима и ткивима настају сви штетни услови за деловање слободних кисеоничних радикала и то пероксидација липида, оштећење ћелиске мембране и деградација протеина. ХБО налази потпуно оправдано своје место у лечењу системских болести, а међу њима и код СЛЕ, узимајући имунопатогенетску природу ове болести. Карактеристичне промене су узроковане васкулитисом, метаболичким поремећајима са продукцијом великог броја запаљенских фактора, што све за последицу има стварање слободних кисеоничних радикала. На све то хипербарични кисеоник делује тако што анулира хипоксију и исхемију ткива, смањује адхезију леукоцита, агрегацију тромбоцита у крвним судовима, доводи до капиларне ангиогенезе, поспешује стварање колагена и фироласта. Његов имуносупресивни ефекат се испољава смањењем интерлеукина 1 и простагландина Е2, при чему интерлеукин 6 није измењен.

И поред свега горе наведеног, прихватање хипербаричне оксигенотерапије није ишло тако глатко и она у медицинским круговима добија назив „Пепељуга модерне медицине“. Томе је допринело што се у медицинским школама хипербарична медицина помиње само информативно и увек у склопу подводне или ваздухопловне медицине. Други разлог је тај да је принцип лечења само на изглед једноставан и он се састоји од излагања пацијента повишеном атмосферском притиску у посебним хипербаричним коморама уз дисање 100% кисеоника. За спровођење овог третмана потребна је наведена специјализована опрема која захтева одређену додатну апаратуру, али и специјализовано особље и начин одржавања. Са друге стране, као лек, кисеоник је јефтин и лако доступан, па ниједна фармацеутска компанија није нашла интерес да финансијски подржи хипербаричну медицину. Почетком 1970. године др Георге Харт као председавајући комитета формираног од стране Социјалне безбедносне агенције (САД), има задатак да донесе стручну одлуку који пацијенти имају право на плаћено лечење хипербаричном оксигенацијом. Истовремено је добио наредбу од својих претпостављених да рецимо „шлог“

не буде на тој листи болести, без обзира на успех терапије, јер захтева велике трошкове што додатно оптерећује цене лечења [136].

Хипербарична терапија као допунска терапија код СЛЕ је све више присутна, јер и субјективан осећај пацијената, али и објективно њихово здравствено стање то показује, а нежељени ефекти су минимални [31–33]. Хипербарична терапија поред механичког (едем) и физиолошког (перфузија, дифузија) ефекта учествује у низу биохемиских процеса. Поред главног ефекта уклањања хипоксије угроженог ткива, на молекуларним биохемиском нивоу долази до активирања и деактивирања низа ензима и ензимских система. Узрок је повећање Л-САТ (лецитин–холестерол ацид трансферазе) са крајњим ефектом повећања HDL, активише се сукцинат дехидрогеназа са последицом повећање потрошње глукозе. Уз то се активира тирон хидроксилаза са повећаном синтезом катехоламина, као и цитохром оксидаза и гликоген фосфорилаза. Истовремено се инхибише циклооксигеназа као и глицерол-3-фосфо-дехидрогеназа које има за последицу смањење продукције пирувата [137]. Сматрало се да дејство ХБО доводи до стварања слободних кисеоничних радикала, и да је потребно давати пацијентима после терапије витамине Ц, Е, селен, бета и алфа каротен, односно биофлавоноиде [138]. Више експерименталних студија су се бавиле односом ХБО терапије и њеног деловања на оксидациону стрес и на ензиме антиоксидационе заштите, показало се да код здравих пацова постоји пораст индекса липидне пероксидације као и активност ензима прве линије антиоксидационе заштите (SOD и CAT). Овде се радило само о једном третману у трајању од 90 минута [139]. У клиничким студијама резултати се у неким случајевима поклапају са експерименталним, док у другим су добијени опречни резултати [140–142]. Амерички колеџ за хипербаричну медицину је својим протоколом из 1983. године, уврстио и реуматоидни артритис и склеродермију. на листи индикација за лечење са ХБО [34].

Многе клиничке студије су обрађивале третмане пацијената са СЛЕ у хипербаричним условима и дошли су до значајних резултата који су показивали побољшања код пацијената третираних у односу на оне који нису третирану у ХБ комори. Разлика се огледала у значајном повећању ензима антиоксидационе заштите, у заустављању пролиферације TNF (tumor necrosis factor alpha), Клиничка слика и побољшање како субјективно тако и објективно је било значајно код пацијената који су третирану ХБО у односу на оне који нису. [143, 20, 144].

Патофизиолошки аспект СЛЕ није још увек разјашњен, али се зна да у основи улога оксидационог стреса је велика при чему се мења експресија инфламаторних цитокина утичући на пораст запаљења и настајање оштећења

тквива [145]. Хипоксија и запаљење које се развија у склопу болести додатно повећава оксидативни стрес и постоји корелација са параметрима оксидативног стреса и активности болести [146].

### Утицај хипербаричне терапије на оксидациони стрес

Студија је дизајнирана у области физиолошких истраживања утицаја хипербаричне оксигенације код пацијената са СЛЕ са посебним нагласком на потенцијалне поремећаја редокс биланса, код групе која је третирана (ХБОТ) и групе без примене (ХБОТ). Третман ХБОТ доводи до повећања количине раствореног кисеоника у плазми, стварајући дифузиони градијент који олакшава прелаз кисеоника из капилара до исхемичких ткива [147]. Познато је да реактивне врсте кисеоника (ROS) посредују токсичност супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), која се манифестује у три специфичне форме: на централни нервни систем (ЦНС), респираторни систем и у очима код превремено рођених беба [148].

Ми смо пратећи супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), као параметар оксидационог стреса запазили статистички значајне разлике ( $p < 0,001$ ) само код болесника групе ХБОТ и то значајан пад вредности супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ) 30. и 60. дана у односу на иницијалне вредности. Ниво водоник –пероксида ( $H_2O_2$ ) и код једне и друге групе без обзира на третман ХБОТ ни после 30 дана и 60 дана нису дали значајне помаке.

Код испитиваних група разлике нивои индекса липидне пероксидације (TBARS) се не могу видети упоређивањем са иницијалним нивоом, након ХБОТ третмана и након 30 и 60 дана, у обе групе пацијената.

Нивои нитрита ( $NO_2^-$ ) пре и после ХБОТ терапије су слични, али статистички значајне разлике регистроване су само код болесника групе без ХБОТ и то значајан пораст вредности  $NO_2^-$  60. дана у односу на иницијалне вредности и вредности регистроване 30. дана. Добијени резултати јасно указују да ХБОТ нема прооксидациони ефекат, а раније је била због тога и показана и многи су препоручивали додавање разних суплемената као антиоксидативне заштите [149].

Подаци из разних студија су оскудни и тешко је упоређивати наше резултате са другима, међутим, једна од студија које је испитивала ефекте ХБОТ-а код пацијената са СЛЕ-ом, и која је коришћена у комбинација са имуносупресивном терапијом потврдила је ефекте у опоравку пацијената [147].

Такође и други су пријавили своје искуство употребом ХБОТ за лечење код СЛЕ пацијента са закључком да је овај третман био веома успешан, при чему постоји и субјективан, али и објективан ефекат на ремисију болести [150]. Позитиван, прооксидативни ефекат ХБОТ је потврђен и код студија са РА и СЛЕ, односно и код других реуматских болести [151].

### Утицај хипербаричне терапије на параметре антиоксидационе одбране

Што се тиче компоненте антиоксидантне одбране, примијетили смо пратећи SOD да постоје значајно веће вредности на иницијалном мерењу у односу на мерење после 30 дана. Пад SOD активности био је више изражен у болесника ХБОТ групе. И код других студија је забележен пад SOD што би се објаснило тиме што је то веома важан за одржавање редокс равнотеже и који својом повећаном активношћу чува ткиво од оксидационог стреса [152]. У нашој студији запазили смо снижење активности SOD, а такође и смањен ниво супероксид анјон радикала. Раније истраживања су показала да нижи ниво активности СОД последица је хиперпродукције слободних кисеоничних радикала и њеног утицаја на њих, међутим у нашој студији запазили смо и нижи ниво супероксид анјон радикала а остали прооксиданти нису показали статистичку значајност. Сматра се да здрав организам дневно произведе близу 5 милиона јединица SOD и да је његова улога да ревитализује ћелије, одржава њихову функцију и успорава време и брзину њихове деструкције [102].

Посматрајући GSH утврдили смо статистички значајне разлике унутар група, али само код болесника групе ХБОТ ( $p = 0,002$ ) и то значајно веће вредности GSH после 30 дана у односу на иницијално мерење тако и у односу на 60. дан. У стању оксидационог стреса концентрација GSH се брзо смањује, и то доводи да различитих поремећаја у организму као смањење нивоа синтезе протеина укључујући и синтезу DNA [153].

**У нашој студији запажен је пораст GSH после 30 дана.** и константан ниво сво време у групи са ХБОТ је важан као податак у нашој студији. Доказано је у другим студијама колико је битан у одржавању здравља као и његова веза са старењем организма, али и као одбрана од болести јетре, плућа и неуродегенеративних болести [154].

Најзначајније карактеристике су временско-зависни пад активности САТ у групи ХБОТ и дисконтинуирани пад активности САТ 60. дана у групи



болесника без ХБОТ. После 60 дана САТ активност има приближно исти ниво у обе групе.

Статистички значајна разлика између две групе утврђена је код 2 параметра (GSH и САТ) 30. дана од почетка студије. Значајно веће вредности GSH ( $p = 0,002$ ) измерене су у групи ХБОТ. Супротно томе, значајно веће вредности САТ регистроване су у групи болесника без ХБОТ.

Ми смо у студији кренули од чињенице да ниво L-Citrillina у урину представља сурогат маркер NO и да је показатељ нитрозативног стреса, а одређивањем код наших пацијената нисмо утврдили статистички значајне разлике вредности и код групе СЛЕ-ом која је била без ХБОТ и код групе са СЕЛ-ом и ХБОТ. Такође и током целокупног трајања студије нисмо добили статистички значајну разлику између вредности цитрулина у групи која је била на ХБОТ, што потврђује да у нашој студији током ХБОТ није било нарушавања оксидативне равнотеже.

У неким студијама наведени су подаци да су: нивои уринарног цитрулина били знатно виши код пацијената са СЛЕ-ом у поређењу са оним који не болују од СЛЕ-ом Такође нивои серумског и уринарног цитрулина били су већи код болести коже у поређењу са другим манифестацијама. У повећаном нивоу цитрулина (производња NO) не може се посматрати као специфично за дату клиничку слику, већ као рефлексију имунолошке реакције. Зато, у њиховој студији добијени подаци сугеришу да NO треба узети у обзир као потенцијал који допринеси прогресији СЛЕ [155].

---

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу наведеног истраживања може се закључити следеће

1. У нашој студији код пацијената оболелих од СЛЕ-а, који су били подељени у две групе хомогене по годинама старости и телесној тежина од којих је једна третирана са ХБОТ запазили смо у биохемиским параметрима да групе која је третирана са ХБОТ има статистички значајну разлику за ниво Нб ( $p = 0,009$ , тренд раста) и Ле ( $p = 0,003$  тренд пада) поређењем иницијалних података са подацима након 30 дана.

Такође у групи пацијената са ХБОТ статистички значајне неконзистентне промене, запажене су код CRP, урее, албумина, холестерола и мокраћне киселине. у односу на иницијалне вредности и након 60 дана.

У групи пацијената са ХБОТ, поређењем SLEDAI индекс активности болести запазили смо статистички значајну вредност поређењем иницијалне са вредношћу након 30 и 60. дана.

Поређењем иницијалних вредности С3, С4 и ANA са вредностима након 30 и 60 дана нису утврђене статистички значајне разлике унутар групе пацијената са ХБОТ.

2. У групи која је у нашој студији третирана са ХБОТ пратећењем супер-оксид анјон радикала ( $O_2^-$ ), као важног параметара оксидационог стреса запазили смо статистички значајно снижену вредности. То је забележено код вредности 30 и 60 дана у односу на вредности на иницијалном одређивању.

3. У нашој студији после ХБОТ терапије код пацијената нивои нитрита ( $NO_2^-$ ) на иницијалном одређивању као и 30 дана и 60 дана, без статистички значајних разлика, нису регистроване.

4. Након десетодневне терапије ХБОТ није добијена статистички значајна промена нивоа водоник –пероксида ( $H_2O_2$ ) ни после 30 и 60 дана у односу на иницијално одређивање.

5. Код испитиваних група разлике нивоа индекса липидне пероксидације (TBARS) се не могу видети упоређивањем са иницијалним нивоом, након ХБОТ третмана и након 30 и 60 дана, у обе групе пацијената.

6. У групи болесника третираних са ХБОТ посматрајући супероксид дизмутаза (SOD) која је важан параметар антиоксидативне заштите у нашој студији забележене су веће вредности на иницијалном мерењу, а дошло је до смањења вредности у односу на мерење после 30 дана. Након 60 дана вредност SOD се вратила на ниво иницијалне вредности.

7. Посматрајући GSH утврдили смо код болесника групе са ХБОТ значајно веће вредности GSH ( $p = 0,002$ ) после 30 дана, у односу на иницијално мерење, тако и у односу на 60 дана ( $p = 0,876$ ).

8. У групи пацијената са ХБОТ забележена је смањена активности каталазе (CAT) у односу на иницијално мерење ( $p = 0,001$ ) да би после 60 дана каталаза (CAT) имала активност приближно исту као на почетку.

Наши резултати показују да код пацијената са СЛЕ-ом након третмана са ХБОТ није нарушена антиоксидациона заштита.

9. На иницијалном мерењу нису утврђене статистички значајне разлике вредности цитрулина код пацијената са ХБОТ и пацијената без ХБОТ. Такође није добијена статистички значајна разлика између вредности цитрулина током целокупног трајања клиничке студије.

---

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Brunner H. I.;Feldman B. M.;Bombardier C.;Silverman E. D. Sensitivity of the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index. *Arthritis Rheum* 1999 jul 42(7):1354-60.
2. Gladman D. D. Urowitz M. B. Systemic lupus erythematosus. In Klippel J. H. , Dieppe P. A. *Rheumatology*, Mosby, London, 1998;7, 11-118
3. Hahn B. H. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In:Kelly, Harris, Ruddy, Sledge. *Textbook of Rheumatology*, Philadelphia, WB Saunders Co. 1993
4. Seinerberg A. D. et al. Systemic Lupus erythematosus: NIH Conference (pathogenesis) *ANN Intern Med* 115:548, 1991.
5. Batchelor JR: Systemic Lupus erythematosus: and genes within the HLA region. *Brit J Rheum* 32:13, 1993
6. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of 2 bone marrow elements: the "tart" cell and the "LE: cell. *Proc Mayo Clin* 23:25, 1948.
7. Germuth FG Jr: A comparative histologic and immunologic study in rabbit if induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J Exper Med* 97:257, 1953
8. Dixon FJ, Vazquez JJ, Weigle WO I Cochrane CG: Pathogenesis of serum sickness. *Arch Pathol* 65:18, 1958
9. Messner RP, Lindstrom Fs RC Jr: Peripheral blood lymphocyte cell surface markers during the course of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 52:3046, 1973.
10. Schur PH, Sandson J: Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 278:533, 1968.
11. Angello V: Complement deficiency states. *Medicine* 57:1, 1978
12. Towens AS, Stewart CR Jr, Order AG:: Immunologic studies of systemic lupus erythematosus. II Variations of nucleoprotein- reactive gamma globulin and hemolytic serum complement levels with disease activity. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 112:202, 1963
13. Love PE I Santoro SA: Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 112:682, 1990

14. Ropes MW: Systemic lupus erythematosus Cambridge, Harvard University press, 1976
15. Stahl NI, Klippel JH, Decker JL: Fever in systemic lupus erythematosus, Am J Med 67:935, 1979
16. Klippel J. H. Systemic lupus erythematosus. Management. In: Klippel J. H., Dieppe P. A. Rheumatology, Mosby, London, 1998;7, 71-78
17. Cervera R., Font J, Pare C i sar: Cardiac disease in systemic lupus erythematosus: prospective study of 70 patients. Ann Rheum Dis 51:156, 1992.
18. Clarck WF, Moist LM. Management of chronik renal insufficinetcy in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension end dyslipedemia in progression of renal disease. Lupus 1988;7(9):649-53.
19. Naiker IP, Chrystal V. Randeree IG, Seedat YK. The significance of arterial hypertension at onset of clinical; lupus nephritis. Posgrad Med J 1997 Ap;73 (858;230-3.
20. Lui, N. L, Thumboo, J. and Frong, KY:” A case of refractory vasculitis ulcers in a systemic lupus erythematosus patient responding to rituximab and hyperbaric oxigen therapy”. Int J Rheum Dis; 12 (4): 366-369, 2009.
21. Ginzler EM, Nicastrri AD, Chun-Juo C. Progression of mesangial and focal to diffuse lupus nephritis. N Engl J Med 73:929. 1970.
22. Baldwin DS, Lowenstein J, Rothfield I. The clinical course of the proliferative membraneous forms of lupus nephritis. Ann Inntern Med 73:929, 1970
23. Klippel JH, Zwaifler NJ: Neuropsychiatric abnormalities in systemic lupus erythematosus. Clin Rheum Dis 1:621, 1975
24. Perović R. Patogeneza lupusnog nefritisa: uloga nefritogenih autoantitela. Balneoclimatologija 1998; supl. 1: 45-50
25. Illei GG. Klippel JH. Novel approaches in the tretmant of lupus nephritis. Lupus 1998;7 (9):644-648.
26. Bootsman H. , Spronk P. , Derkesen R. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. Lancet 1995;345:1595-9
27. D Cruz D. Cuadrado MJ. Mujić F. Tungekar MF. Taub N. Zloid M. Khamasta MA. Hughes GR. Imunosuppressive therapy in lupus nephritis. Clin. Exp. Rheumatol. 1997; 15(3):275-82
28. Manger K. Kalden JR. Monger B. Cyclosporine A in the treatment of systemic lupus erythematosus; a results of an open clinical study: Br. J. Rheumatol. 1996; 35(7):669-75
29. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Induction and maintenance therapy for lupus nephritis: a systemic review and meta-analysis. Lupus 2010;19(6):703-10.

30. Stojmirović B, Petrović D. Klinički značaj kontrole faktora rizika u sprečavanju progresije hronične slabosti bubrega. *Vojnosanit. Pregl.* 2006; 63(6): 585-91
31. Grim S. P, Gottlieb J. L, Boddie A, Baston E. Hyperbaric Oxygen Therapy. *JAMA* 1990; 263: 2216-20.
32. Savage, S.; New medical therapy; hyperbarics. *Tenn Med.*; 103 (3);39-40, 2010
33. Lukić LV, Kurakina LV, Polkova BL. Hiperbaric oxigeno therapy in treatment of systemic diseases. *Klin. Med. (mosk)* 1991; 15-20
34. Oriani G, Marroni A, Wattel E et al. Handbook on Hyperbaric Medicine. Springer Verlag, Berlin;1995. p 4-10.
35. Gošović S. Safe diving. *Jumena*1986. (Serbo- Croatian)
36. Rabrenović M, Rabrenović V, Zoranović U. Razvoj hiperbarične medicine. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63 (7): 667-71.
37. Jain KK. Textbook of Hyperbaric Medicine. 4 th ed. Ashland, On: Hogrefe & Huber; 2004.
38. Moir EW. Tunneling by compressed air. *Journal of the Society of Arts*, 1896; 44: 567
39. Gošović S. Hendbook of professional and military diving. *Grafforna*. Split 1997. (Serbo- Croatian).
40. Gerhard H. Diving and diving technique. *Spektar*. Zagreb 1982. (Serbo- Croatian).
41. American Heritage Dictionary. Boston: Houghton Mifflin Co;1994.
42. Sheffield PJ, Desautels DA. Hyperbaric and hypobaric chamber fires: a 73-year analysis. *Undersea Hyperb Med* 1997; 24(3):153-64.
43. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007), Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
44. Hurd TR, Murphy MP (2009). Introduction In: Jacob C. Winyard PG, editors. Redox signaling and regulation in biology and medicine. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co; p. 13-40
45. Halliwell B, and Gutteridge JM (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 rd ed. New York: Oxford University Press.
46. Halliwell B, and Gutteridge JMC (1985) *Free Radicals in Biology and Medicine*. First edition, Clarendon Press, Oxford.
47. Landolt-Borstein, Numerical Data and Funcional Relationships in Science and Tehnology: Radical reaction rates. New Series. Ficher H. Berlin Springer- Verlag. 13; 1984
48. Freeman BA, Crapo JD, Biology of desaese: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47; 412-26.

49. Dargel R. Lipid peroxidation-a common pathogenic mechanism. *Exp. Toxicol Pathol* 1991;44:169-81.
50. Moldovan L, Moldovan NI, Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 395-412.
51. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:61-88
52. Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry- Lane P, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, NAD(P)H oxidase by trombin. Evidence that p47phox may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274:19814-19822.
53. Fridovich. I. Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv Neurol* 1979; 26:255-59.
54. Finkel T, Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998:10 248-253.
55. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31:53-59.
56. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992: 6; 3051-3064.
57. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2014;21(1):23. doi 10. 1186/1423-0127-21-23
58. Kim H Kim Y-N, Kim H, Kim C-W. Oxidative stress attenuates Fas- mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bcl-2 induction. *Oncogene* 2005; 24: 1252-61.
59. Macip S, Kosoy A, Lee SW, O Connel MJ, Aaronson SA. Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p 53- null cancer cells, involving a Chk-1- dependent G2 checkpoint. *Oncogene* 2006; 25; 6037-47.
60. Halliwell B, Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.*, 2007; 35 (5): 1147-50.
61. Dalle-Donna I, Rossi R, Columbo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52 (4):601-23.
62. Huang HL, Fang LW, Lu SP, Chou CK, Luh TY, Lai MZ. DNA - damaging reagent induces apoptosis through reactive oxygen species-dependent. Fas aggregation. *Oncogene* 2003; 22:8186-77.
63. Melovv-Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J.* 1984;218(1): 273-275
64. Marnett JL. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):361-70.
65. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec L. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation and disease. *Faseb J* 2003; 17: 1195-214.



66. Birch– Machin. MA. Using mitochondrial DNA as a biomarker of early cancer development. *Br J Cancer* 2005; 93: 271-272.
67. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidativestress. *DNA Repair* 2006; 5: 145-52.
68. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* 2004; 7(2):97-110.
69. Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. (2002). Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39:191-207.
70. St Peirre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial nElectron Transport Chain. *J Biol Chem* 277(47):44784-44790.
71. Nicholis DG (2004). Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3(1):35-40.
72. Henderson LM, Chappel JB (1996). NADPH oxidase of neutrophilis. *Biochim Biophys Acta* 1273(2):87-107.
73. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E (1987). Relation ship between melanin content and superoxide dismutasse (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 5(2):123-8.
74. De Groot H, Littauer A (1989). Hypoxia, reactive oxigen, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 6(5):541-51.
75. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E (1987). Relation ship between melanin content and superoxide dismutasse (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 5(2):123-8.
76. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxidide dismutatses. *Cancer Treatment* 1986; 13:17-44.
77. Wolin MS. Gupte SA. Oeckler RA (2002). Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39:191-207
78. Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS – generating NADPH oxidases:physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1):245-313.
79. (Fridovich I. Hypoxia and oxigen toxicity. *Adv Neurol* 1979;26:255-59.
80. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. (2000). Karakteristike slobodnih radikala. In: *Biohemija slobodnih radikala*(Đorđević V B, Pavlović D D, and Kocić G M, es.). Tehnofarm d. o. o. Beograd, pp. 7-69.
81. Sies H. (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress*. New York: Academic Press, p 1-8.



82. Sandri G, Panfili E, Ernster L (1990). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and  $Ca^{2+}$  efflux. *Biochim Biophys Acta* 1035(3):300-5.
83. Rhee SG. a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006; 312: 1882-3.
84. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
85. Lo YY, Wong JM, Crus TF (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 271(26):16703-7.
86. Lopes-Lazaro M, Dual role of hydrogen peroxyde in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters* 2007; 252:1-8.
87. Steinbeeck MJ, Khan AU, KarnovskyMJ (1992) Intracellular singlet oxigen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* 267(19): 13425-33.
88. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society* 1934;147: 332-51.
89. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(1):668-76.
90. Safford SE, Oberley TD, Urano M, St Clair DK: Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase, *Cancer Research* 1994; 54: 4261-4265.
91. Scott. G. Antioxidants the modern elixir. *Chem Britain* 1995; 31:879-882.
92. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspect Med* 1998; 19:221-357
93. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy nitrite. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:385-391
94. Hussain SP, Hofseth LJ, Harsi CC. Radical causes of cancer. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:276-85.
95. Dileepan NK, Page CJ, Li J, Stechschulte J. Direct activation of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon gamma. *J Interf Cytokine Res* 1995; 15:387-94.
96. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1441:334-350.
97. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lung of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1995; 333:214-21

98. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203-36
99. Morgan DL, Shines CJ. Alveolar macrophage cytotoxicity for normal lung fibroblasts is mediated by nitric oxide release. *Toxicol in vitro* 2004; 18:139-46.
100. Wink DA, Mitchell JB, Chemical biology of nitric oxide. Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998; 25: 434-456.
101. Oeckler RA, Wolin MS. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr. Atheroscler Rep* 2000; 2:437-444.
102. Janero DR. Nitric oxide (NO)-related pharmaceutical contemporary approaches to therapeutic NO modulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:11495-1506.
103. Mujović VM. (1998). *Autakoidni sistem*. Nauka, Beograd
104. Garderman A, Mages P, Katz N, Tillmann H, Haberbosch W. The 22<sup>phox</sup> A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with heart coronary disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1999;145:315-23.
105. Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cochen RA. Superoxide anion from the adventitia of the rat. Thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82:810-818.
106. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Heckler M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:61-69.
107. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem. *FEBS Letters* 2003; 540 (1-3):3-6.
108. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovanni C, Novel mechanisms of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16:577-586.
109. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
110. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Bio Chem* 1969; 244:6049-55.
111. Powers SK, Lenon SL. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 1025-1033
112. Epperlu MW, Defillippi S, Sikora C, Gretton J, Greenberger JS (. 2002) Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of human manganese superoxide dismutase transgene. *Mil Med* 167(2 Suppl):71-3.
113. Zhang J. (2002) MnSOD alters gene expression associated with apoptosis. *Virology* 76:355-363.

114. Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J physiol* 268 (5Pt 1): L699-722.
115. Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. (2001). Modulation of catalase peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 7:709-14
116. Spasić M, Korać B, Blagojević D, Buzadić B, Sačić ZS, Nikolić V. The role of selenium supplementation on attenuation of toxic doxorubicin effects. *Iugoslav Physiol Pharmacol Acta* 2000; 36(1): 119-30.
117. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 710-60.
118. Fernandez- Checa JC, Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Mari M, Miranda M, Ardite E (1998). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8 (1-2):7-11.
119. Dickinson DA, Forman, HJ. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-26
120. Čepelak I. Dodig S. (2004). Glutathion i oksidacijski stres. *Biochem Med* 13:93-100
121. Shultz JB, Kindeanan J and Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. Biochem* 267:4904-4911.
122. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. In: Boca Raton, CRC Press p. 123-132.
123. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-70.
124. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
125. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrite, nitrite and (15N) nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
126. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.
127. Beutler E (1982). *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton.
128. Grodsky M. G: Hemija i funkcija hormona. U *Pregled Fiziolo[ke hemije. Savremena administracija*, Beograd. 1982.
129. Majkić -ingh N. Enzimi kod sr;anih oboqewa. U *Klinička enzimologija. ATD Praktikum*, Beograd 1993.

130. Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress *Circ Res* 87 (10):840-4.
131. Jakovljević VLJ, Zlatković M, Čubrilo D, Pantić I, Djurić DM. (2011). The effects of progressive exercise on cardiovascular function in elite athletes: focus on oxidative stress. *Acta Physiol Hung* 98 (1): 51-8.
132. Kovacs P, Junarek I, Stankovicova T, Svec P. Lipide peroxidation during acute stress. *Pharmazie* 1996; 51(1):51-3.
133. Tkacova R, Kluchova Z, Joppa P, Petrasova D, Molcanyiova A. Systemic inflammation and systemic oxidative stress in patients with acute exacerbations of COPD. *Respir Med* 2007; 101 (8): 1670-6.
134. Kehrer P. J. Free radicals es mediators of tissue injuri and dsease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993;23:21-48
135. Touhey J. E. Hyperbaric oxygen therapy. *Orthop. Rev.* 1987;16:923-33.
136. Freels D. Medicare's noncovered conditions: a conversation with dr George B. Hart. *Hyperbaric Medicine Today* 2003; 2 (2): 7-12
137. Bannister J. V. Rotilio G: *The Biology and Chemistry of Active Oxigen radicals.* New York. Amsterdam. Oxford. 1984
138. Bland J: *Bioflavonoids in Nutrition Superbook 1; The Antioxidants*, Ed by Jean Barilla M. S. Keats Publ. Connecticut.
139. Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Korkmaz A, Oter S, et al. Persistence of hyperbaric oxigen-induced oxidative effects after exposure in rate brain cortex tissue. *Life Sci* 2007; 80(22):2025-9.
140. Yogartnam JZ, Laden G, Madden L. A. Seymour AM, Guvendik L. Cowen M, et al. Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection. *Cardiovasc Revasc Med* 2006; 7(#): 146-54.
141. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E. The effects if hyperbaric oxigen therapy on oxidative stress. , inflammation and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. *BMC Pediatr* 2007; 7:36.
142. Handy RD, Bryson P, Moody AJ, Handy LM, Sneyd JR. Oxidative metabolism in platelets, platelet aggregation and hematology in patentes undergoing multiple hyperbaric oxigen exposures. *Undersea Hyperb Med.* 2005: 32(5):327-340.
143. Kuffler DP. Hyperbaric oxygen therapy:an overview. *J Wound Care* 19(2); 77-79, 2010
144. Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthtitis Rheum.* 2005; 52:2069-2079.

145. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A (2011) Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 216(9): 1010-7.
146. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 14(4):325-31. doi: 10.1111/j.1756-185x.2011.01630.x.
147. Olivieri AN, Mellos A, Duilio C, Di Meglio M, Mauro A, Perrone L. Refractory vasculitic ulcer of the toe in an adolescent suffering from systemic lupus erythematosus treated successfully with hyperbaric oxygen therapy. *Ital J Pediatr* 2010; 36:72.
148. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009;106(3):988-95.
149. Živković M. Hiperbarična i podvodna medicina. Beograd: Nauka; 1998.
150. Jou YC, Lien FC, Cheng MC, Shen CH, Lin CT, Chen PC. Hyperbaric oxygen therapy for cyclophosphamide-induced intractable refractory hemorrhagic cystitis in a systemic lupus erythematosus patient. *J Chin Med Assoc.* 2008;71(4):218-20.
151. Costenbader H, Kang JH, Karlson EW (2010). Antioxidant intake and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women. *American Journal of Epidemiology* 172(2): 205-216
152. Epperly MW, De filippi S, Sikora C, Gretton J, Greenberger JS (2002). Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene. *Mil Med* 167(2 Suppl): 71-3
153. Uhling S, Wendel A (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences* 51:1083-94.
154. Schultz JB, Kindeanu J and Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. Biochem* 267:4904-4911
155. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Sakhuja V, Thennarasu K, Sud A, Barmbery P. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus; a possible addition to activity parameters?

## ПРИЛОЗИ

**8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА****УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ****Редни број (РБ):****Идентификациони број (ИБР):****Тип документације (ТД):** Монографска публикација**Тип записа (ТЗ):** Текстуални штампани материјал**Врста рада (ВР):** Докторска дисертација**Аутор (АУ):** прим. др Милорад Рабреновић**Ментор/коментор (МН):** проф. др Владимир Јаковљевић**Наслов рада (НР):** Утицај хипербаричне оксигено терапије на регулацију оксидативне хомеостазе и лечење болесника са системским еритемским лупусом**Језик публикације (ЈП):** Српски / ћирилица**Језик извода (ЈИ):** Српски /енглески**Земља публиковања (ЗП):** Србија**Уже географско подручје:** Београд**Година (ГО):** 2018**Издавач (ИЗ):** Ауторски репринт**Место и адреса (МС):** Београд Арчибалда Рајса 55**Физичи опис рада (ФО):**

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина (ДИ):** Физиологија/Интерна Медицина

**Предметна одредница/ кључне речи (ПО):** хипербарична оксигено терапија СЛЕ, редокс фактори

**УДК**

**Чува се (ЧУ):** Библиотека Факултета Медицинских Наука,  
Универзитет у Крагујевцу

**Важна напомена (МН):**

**Извод (ИД):**

**Датум прихватања теме од стране ННВ (ДП):** 26. 02. 2014. године

**Датум одбране (ДО):**

**Чланови комисије (КО):** проф. др Александра Томић-Лучић, председник  
проф. др Милан Петронијевић, члан  
доц. др Мирјана Веселиновић, члан



## Утицај хипербаричне оксигенотерапије на регулацију оксидативне хомеостазе и лечење болесника са системским еритемским лупусом

### Сажетак

---

Циљ ове студије био је испитивање хипербаричне оксигенотерапије (ХБОТ) на ниво инфламаторних маркера, оксидативног стреса и активност системског еритемског лупуса

Проспективна студија је обухватила 52 болесника са системским еритемским лупусом који су подељени у две једнаке групе: контролну и испитивану која је подвргнута третману у хипербаричној комори (на 2,2 АТА у трајању од 70 минута).

Праћени и поређени су параметри иницијално, након 30 дана и након 60 дана: крвна слика, стандардни биохемијски параметри, маркери оксидативног стреса (супероксид анјон радикал- $O_2$ , нитрити  $-NO_2$ , водоник пероксид-  $H_2O_2$ , реактивни производи тиобарбитуратне киселине- TBARS, супероксид дисмутаза SOD, редуковани глутатион GSH, каталаза CAT), имунски параметри (C3, C4, ANA) анализе урина, протеини и цитрулин у урину.

Анализирајући добијене резултате запажена је статистички значајна разлика за ниво хемоглобина (тренд пораста), леукоцита (тренд смањења) у групи која је третирана у хипербаричној комори. Поређењем вредности СЛЕДАИ статистички значајна разлика је запажена у групи са ХБОТ (ниже вредности).

Праћењем  $O_2$  у групи која је лечена ХБОТ добијена је статистички значајно нижа вредност и то након 30 и након 60 дана у односи на иницијалне вредности.

Није запажена значајна разлика праћењем  $N_2$ ,  $H_2O_2$ , TBARS, у испитиваној групи.

Од маркера антиоксидативне заштите запажено је да је GSH у испитиваној групи имао значајно више вредности након 30 дана и након 60 дана у односу на иницијалну вредност, SOD је у испитиваној групи показао иницијално вишу активност, а смањење након 30 дана а након 60 дана се вратила на почетне вредности, а CAT је имала снижену активност у односу на иницијалну да би након 60 дана активност била као иницијална.

Статистичка значајност није запажена за цитрулин у урину .

Студија је указала на статистички значајно ниже вредности супероксид анјон радикала који је параметар оксидативног стреса у групи која је лечена хипербаричном оксигенотерапијом.

---

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number (ANO):**

**Identification number (INO):**

**Documentation type (DT):** Monographic publication

**Type of record (TR):** Textual material printed

**Contents code (CC):** Ph. D Thesis

**Author (AU):** prim. Dr Milorad Rabrenovic

**Menthor/co-mentor (MN):** Ph. D Vladimir Jakovljevic

**Title (TI):** Impact of hyperbaric oxygen therapy on regulation of oxidative homeostasis and treatment of patients with systemic lupus erythematosus

**Language of text (LT):** Serbian/ Cyrillic

**Language of abstract (LA):** Serbian / English

**Country of publication (CP):** Serbia

**Locality of publication (LP):** Belgrade

**Publication year (PY):** 2018

**Publisher (PU):**

**Publication place (PP):** Belgrade

**Physical description (PD):**

**Scientific field (SF):** Medicine

**Scientific discipline (SD):** Internal medicine, Hiperbaric medicine

**Subject/key words (SKW):** hyperbaric oxygen therapy, Systemic lupus erythematosus, redox status

**UDC**

**Holding data (HD):** Library of Faculty of Medical Science University of Kragujevac, Serbia

**Note (N):**

**Abstract (AB):**

**Accepted by the Scientific Board on (ASB):** 26. 02 2014. године

**Defended on (DE):**

**Thesis defended board (TDB):** Ph D Aleksandra Tomić-Lučić, predsednik  
Ph D Milan Petronijević, član  
Ph D Mirjana Veselinović, član

**(Degree/name/surname/title/faculty) (DB):**

## **Impact of hyperbaric oxygen therapy on regulation of oxidative homeostasis and treatment of patients with systemic lupus erythematosus**

### **Abstract**

---

The aim of this study was to examine a role of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) on the level of inflammatory markers, oxidative stress and activity of systemic lupus erythematosus. A prospective clinical study included 52 patients with systemic lupus erythematosus, divided into two equal groups: control and examined group with treatment in a hyperbaric chamber (at 2.2 ATA for 70 minutes). Observed and compared parameters were initially after 30 days and after 60 days: blood count, standard biochemical parameters, oxidative stress markers (superoxide anion radical- $O_2$ , nitrite- $NO_2$ , hydrogen peroxide- $H_2O_2$ , reactive products of thiobarbituric acid-TBARS, superoxide dismutase SOD, reduced glutathione GSH, CAT catalase), immune parameters (C3, C4, ANA), urinary analysis, proteins and citrulline in urine. Analyzing the obtained results, a statistically significant difference was observed for the level of hemoglobin (increasing trend), leukocyte (decreasing trend) in the group treated in the hyperbaric chamber. By comparing the value of SLEDAI, a statistically significant difference was observed in the HBOT group (lower value). By monitoring  $O_2$  in a group that was treated with HBOT a statistically significantly lower value was obtained after 30 and after 60 days in relation to the initial values. No significant difference was observed by monitoring  $N_2$ ,  $H_2O_2$ , TBARS, in the examined group. Of the antioxidant markers, it was observed that the GSH in the investigated group had significantly higher values after 30 days and after 60 days compared to the initial value, SOD showed an initially higher activity in the investigated group, and a decrease after 30 days and after 60 days returned at baseline, and CAT had a decreased activity compared to initial that after 60 days activity would be as initial. Statistical significance was not observed for citrulline in urine. The study showed a statistically significantly lower levels of superoxide anion radical oxidative stress parameters in the group treated with hyperbaric oxygen therapy.

---

## БИОГРАФИЈА

Примаријус пуковник др Милорад Рабреновић је рођен 01. 05. 1960. године Зајечару. Основну и средњу школу завршио је у Приштини. Дипломирао је на Медицинском факултету у Београду 1989. као војни стипендиста. У чину поручника обавио обавезан медицински стаж у ВМА, након тога је упућен у ВМЦ Славија у (Служба хитне помоћи). После се прекомандује у ВМЦ Нови Сад где ради у општој медицинској служби

Због потребе службе упућује се у морнаричку јединици Речне Ратне Флотиле за лекара, где пролази курс за рониоца и као војни рониоц завршава обуку за рад у хипербаричну комори. Кроз ту обуку едукован је за лечење рониоца и рад на хипербаричној комори као средству за лечење и ронилачких и не ронилачких болести. У току 1995. добија специјализацију из опште медицине у Војномедицинској Академији. и специјалистичке студије је завршио у ВМА и положио специјалистички испит са одличном оценом 1998. године. Након положеног испита је радио као начелник Одељења за лечење ВМА, након тога начелник Центра за хитну помоћ ВМА затим начелник Сектора за лечење ВМА уједно помоћник за лечење Начелника ВМА, па формира Центар за хипербаричну медицину ВМА где се и сада налази на дужности начелника. У оквиру усавршавања овладао је принципима менаџмента у здравству на ФОН-у студиско усавршавање лечења хипербаричном оксигено терапијом у Војној болници за подводну и хипербаричну медицину у Лисабону и завршио курс Стратегијског планирања и организације великих система на Војној академији и ФОН-у. Такође у оквиру усавршавања овладао је техником управљања хипербаричном комором коју поседује ВМА.

Стекао је услове и одлуком Министарства здравља 2008. додељена му је звање Примаријуса.

До сада је активно учествовала у раду више конгреса и симпозијума у земљи и у иностранству. Члан је Српског Лекарског друштва. Објавио 43 ауторских и коауторских радова из области интерне медицине и хипербаричне медицине који су публиковани у националним или страним часописима, зборницима у целини или у виду сажетака, а неки од њих су и саопштени на значајним скуповима у земљи и у иностранству.

---

## СПИСАК АУТОРСКИХ И КОАУТОРСКИХ РАДОВА

1. Rabrenović V., Kovačević Z., Jovanović D., Rabrenović M., Dimitrijević J., Škatarić V., Popović D., Abugras S. Mikroskopski poliangitis. *Vojnosanit. Pregl.* 2000; 58(3): 323–328.
2. Mićević D., Rabrenović M., Tretman visinske dekompresivne bolesti - normobarični ili hiperbarični kiseonik, X Simpozijum iz vazduhoplovne medicine i psihologije, sažeci VMA 9 - 10 novembar 2000
3. Matunović R., Pavlović P., Vučinić Ž., Rađen G., Đuran P., Tavčioski D., Rabrenović M., Romanović R., Prcović B., Prcović M. Causes of sudden cardiac death in hospitalized patients with heart failure. Abstract book No. 1, VI Mitteleurope – countries congress of internal medicine June 24–27. 2001 Igalo, Yugoslavia
4. Matunović R., Pavlović P., Vučinić Ž., Rađen G., Mijailović Z., Ćosić Z., Đuran P., Rabrenović M., Prcović B. Heart failure and proarrhythmia, Abstract book No. 1, VI Mitteleurope – countries congress of internal medicine June 24–27. 2001 Igalo, Yugoslavia
5. Matunović R., Pavlović P., Milenković Z., Rabrenović M., Rađen G., Vučinić Ž., Mijailović Z., Đuran P., Tavčioski D., Prcović B. Prosthetic endocarditis in our clinical experients. Abstract book No. 1, VI Mitteleurope – countries congress of internal medicine June 24–27. 2001 Igalo, Yugoslavia.
6. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Petrović S., Stojanović M., Damjanović M. Significance of high blood pressure in patients with lupus glomerulonephritis In Abstract book of International simposium on hypertension; 2002 29 september – 2 october; Belgrade, 2002:
7. Rabrenović V., Nunić N., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D., Škatarić V. Bubrežna insuficijencija u multiplom mijelomu - učestalost, terapija i uticaj na preživljavanje. U Predavanja i sažeci VII jugoslovenski kongres za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. 2002 16–19 oktobar; Niš 2002:63.
8. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D., Stanković-Popović V., Škatarić V. Učestalost i kliničke karakteristike nefrotskog sindroma u pojedinim tipovima primarnih glomerulonefritisa. U predavanja i sažeci VII jugoslovenski kongres za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju; 2002 16-19 oktobar; Niš 2002:68.
9. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D., Škatarić V., Stanković-Popović V. Mikroskopski poliangitis - kliničko laboratorijske karakteristike i

- terapijski pristup. U predavanja i sažeci VII jugoslovenski kongres za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju; 2002 16–19 oktobar; Niš 2002:87
10. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Skataric V., Hrvacevic R., Jovanovic D. Treatment of membranoproliferative glomerulonephritis presenting with nephrotic syndrome. In book of abstracts World congress of nephrology 2003; 8–12 june; Berlin 2003:618.
  11. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Škatarić V., Jovanović D., Popović-Stanković V. Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory characteristic and therapeutical approach. In Bantao Journal Vol 1 (issue 1) 2003; Sept; Varna 2003:85.
  12. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Škatarić V., Jovanović D., Ignjatović LJ. Treatment of resistant nephritic syndrome in primary glomerulonephritis by mycophenolate mofetil. In book of abstracts XLI congress of the European renal association European Dialysis and Transplant association 2004; 15–18 May; Lisabon 2004:40
  13. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D. Treatment of membranous nephropathy presenting with nephrotic syndrome - our experience. In Bantao Journal Vol 2005; Sept 8–11; Ohrid 2005:
  14. Rabrenović M., Rabrenović V., Matunović R., Kovačević Z., The role of hypertension in patients with Lupus glomerulonephritis. In Bantao Journal Vol 2005; Sept 8–11; Ohrid 2005:
  15. Rabrenović M., Rabrenović V., Kovačević Z., Zgradić I., Matunović R. The significance of secondary antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. Abstract book: XVIII Danube symposium of nephrology 26–28 September 2006 ; Novi Sad 2006:63 PW 12 poster
  16. Rabrenović M., Rabrenović V., Zoranović U. Razvoj hiperbarične medicine Vojnosanit Pregl 2006; 63 (7): 667–671. aktuelna tema
  17. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D., Ignjatović Lj. Asimptomatske abnormalnosti urina. Zbornik sažetaka: VIII kongres interne medicine Srbije i Crne Gore. 20–24 jun 2006; Igalo 2006:134 uvodno predavanje
  18. Rabrenović V., Kovačević Z., Rabrenović M., Jovanović D. Secondary polycythemia in patients with focal segmental glomerulonephritis (FSGN). Abstract book: XVIII Danube symposium of nephrology 26–28 September 2006; Novi Sad 2006:62 PW 11 poster
  19. Rabrenović V., Kovačević Z., Jovanović D., Rabrenović M., Milović N., Cerović S. Plazmocitom sa ekstramedularnom lokalizacijom u mokraćnoj bešici - neobična lokalizacija. Vojnosanit. Pregl. 2006; 63 (11): 975–8. prikaz slučaja
  20. Radomir Matunović, Dragan Tavčiovski, Zdravko Mijalilović, Zoran Ćosić, Predrag Đuran, Milorad Rabrenović. Infektivni endokarditis u našoj kliničkoj praksi,



2. Kongres Kardiorakalnih hirurga Srbije i Crne Gore 2006; Zbornik sažetaka, 26 (Supl.1), 29.
21. Radomir Matunović, Dragan Tavčiovski, Zdravko Mijalilović, Milorad Rabrenović. Značaj dijastolne disfunkcije u prognozi bolesnika sa srčanom slabošću koji su podvrgnuti hirurškoj revaskularizaciji, 2. Kongres Kardiorakalnih hirurga Srbije i Crne Gore 2006; Zbornik sažetaka, 26 (Supl.1), 30–31.
22. Matunović R., Stojanović A., Mijailović Z., Rabrenović M., Terapijski i prognostički značaj srčanih biomarkera kod bolesnika sa akutnim koronarnim sindromom. Srpski Arhiv, BIBLID: 0370 - 8179, 134 (2006) 3–4, p. 162–165.
23. Matunović R., Rabrenović V., Rabrenović M., Kovačević Z., Mijailović Z., Jovanović D. Kontrastna nefropatija kod bolesnika sa transplantiranim bubregom i akutnim koronarnim sindromom nakon koronarne angiografije. Zbornik radova: Treći simpozijum iz kardionefrologije sa međunarodnim učešćem. 2007, Vrnjačka Banja 2007: 230 usmeno saopštenje
24. Rabrenović V., Kovačević Z., Jovanović D., Rabrenović M. Abdominal pain as first manifestation of the systemic lupus erythematosus. Book of abstracts World Congress of Nephrology 21–25 april 2007; Rio de Janeiro, Brasil 2007:360 MPO 1123
25. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Kovačević Z. Lupus nephritis and cardiovascular disorders. Book of abstracts: 8th Congress BANTAO 16–19 september 2007; Belgrade, Serbia 2007:
26. Rabrenović M., Matunović R., Mićević D.; Hiperbarična oksigenacija u bolesnika sa oboljenjima kardiovaskularnog sistema. XVI Kongres Udruženja Kardiologa Srbije, 14–17 oktobar 2007; Kardiologija, volumen 28 (Supl.1), 31.
27. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Jovanović D., Kovačević Z.; Lupus nephritis and Cardiovascular Disorders – Our Clinical Experience. Bantao Journal 2007: 5(2):64
28. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Zoranović U.; Hiperbarična medicina – mogućnosti i dileme. Vojnosanit. Pregl. 2008; 65(3): 235–238.
29. Rabrenović M., (prevod) Sesil, Interna medicina, poglavlje 300, Taloženje kristala – Artropatija, Knjiga II , 21 izdanje
30. Rabrenović M., (prevod) SESIL, Interna medicina, poglavlje 301, Relapsni polihondritis, Knjiga II , 21 izdanje
31. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Todorović V., Mićević D., Zoranović U.; Hiperbarična medicina i urgentna stanja. Vojnosanit. Pregl. 2008; Avgust vol. 65(8): 583–658.
32. Rabrenović V., Kovačević Z., Jovanović D., Rabrenović M., Vavić N.; Unusual Presentation of Plasmcytoma in the Urinary Bladder. Book of abstracts: XIII Congress of Balcan Military Medical Committee, 1-5 june 2008, Kusadasi Turkiye

33. Matunović R., Mijailović Z., Tavčiovski D., Vučinić Ž., Rabrenović M.; The Value of Finding Unviable Tissue in Regard to Early Recovery of Heart Failure Patients With Myocardial Infarction. Book of abstracts: XIII Congress of Balcan Military Medical Committee, 1-5 june 2008, Kusadasi Turkiye
34. Matunović R., Mijailović Z., Tavčiovski D., Vučinić Ž., Rabrenović M., Davičević Ž., Jović Z.; Inportance Diastolic Filling Patern of Left Ventricule in Patients After Coronary Artery Bypass Grafting. Book of abstracts: XIII Congress of Balcan Military Medical Committee, 1-5 june 2008, Kusadasi Turkiye
35. Kovačević Z. Rabrenović V. Jovanović D. Petrović M. Rabrenović M. Matunović R.: Gastrointestinalna simptomatologija kao prva manifestacija sistemskog lupusa.Vojnosanit. Pregled 2009: Mart vol. 66(3) 238-241.
36. Matunović R. Mijailović Z. Rabrenović M. Rabrenović V: Novi biohumoralni markeri za dijagnozu dispneje kod bolesnika sa sumnjom na srčanu slabost. Med. Pregled 2010: LXIII (5-6) 387–392, Novi Sad
37. Rabrenović V. Čulafić S. Rabrenović M. Kovačević Z. Matunović R. Petrović M. Gašić B: Aneurizma arterije subklavije kod bolesnika sa hroničnom insuficijrn-cijom kao uzrok glavobolje- prikaz slučaja.Knjiga sažetka.1 Kongres nefrologa Srbije. Beograd 7-10 oktobar 2010.
38. Rabrenović M . Trešnjic S. Rabrenović V. Čikiriz N. Mašić S. Matunović R : Treatement of decompression sickness, Case Report. Book of abstracts: 18 th Congress of Balcan Military Medical Committee, june 2013, Turkiye
39. Rabrenović V., Kovačević Z., Jovanović D., Rabrenović M., Antić S., Ignjatović LJ., Petrović M., Significance of urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker of disease activity in patients with lupus nephritis; Book of abstracts: 51 Congress , Amsterdam may 31 june 3 2014; Netherlands
40. Rabrenović V. Mijušković Z. Marjanović S. Rabrenović M. Jovanović D. Antić S. Ignjatović LJ. Petrović M . Pilčević D; Kidney failure as an unusual initial presentation of biconal gammopathy (IgD multiple myeloma associated with light chain disease) – A case report.Vojnosanitetski Pregled 2015.72(2):196–199
41. Rabrenović M. Trešnjic S. Rabrenović V. Čikiriz N. Mašić S. Matunović R Neurotoksični efekat kiseonika u hiperbaričnim uslovima Vojnosanitetski Pregled
42. Rabrenović M. Nikolić T. Rabrenović V. Bradić J. Trešnjic S Petković A. Jakovljević B. Mašić S. Bokonjić D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patie with systemic lupus erythematosus Vojnosanitetski Pregled
43. Rabrenović M. Nikolić T. Rabrenović V. .Trešnjic S Mašić S. Hyperbaric Oxigen Therapy and Redox Status in Patientes with Systemic Lupus Erithematisus Book of abstracts: 23 th Congress of Balcan Military Medical Committee, may 2018, Turkiye

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милорад Рабреновић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

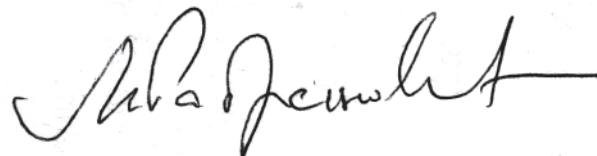
**Утицај хипербаричне оксигено терапије на регулацију оксидативне хомеостазе и лечење болесника са системским еритемским лупусом**

која је одбрањена на Факултету Медицинских Наука, Универзитет у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 2108., \_\_\_\_\_ године



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милорад Рабреновић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Утицај хипербаричне оксигено терапије на регулацију оксидативне хомеостазе и лечење болесника са системским еритемским лупусом**

која је одбрањена на Факултету Медицинских Наука, Универзитет у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

① Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

у Крагујевц, 2018. , \_\_\_\_\_ године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: [http://creativecommons.org/rs/](http://creativecommons.org.rs/)

---

## СПИСАК РАДОВА КАО УСЛОВ ЗА ДОКТОРСКУ ДИСЕРТАЦИЈУ

1. Rabrenović M. Nikolić T. Rabrenović V. Trešnjic S Mašić S. Hyperbaric Oxigen Therapy and Redox Status in Patientes with Systemic Lupus Erithematosus Book of abstracts: 23th Conngrss of Balcan Military Medical Committee, may 2018, Turkiye.
2. Rabrenović M. Nikolić T. Rabrenović V. Bradić J. Trešnjic S Petković A. Jakovljević B. Mašić S. Bokonjić D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patie with systemic lupus erythematosus Vojnosanitetski Pregled.
3. Rabrenović M. Trešnjic S. Rabrenović V. Čikiriz N. Mašić S. Matunović R Neurotoxic effects of oxygen in hyperbaric environment Vojnosanitetski Pregl. 2015;72(9) 827–830.
4. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Todorović V., Mićević D., Zoranović U.; Hiperbarična medicina i urgentna stanja. Vojnosanit. Pregl. 2008; Avgust vol. 65(8): 583–658.
5. Rabrenović M., Rabrenović V., Zoranović U. Razvoj hiperbarične medicine Vojnosanit Pregl 2006; 63 (7): 667–671. aktuelna tema.
6. Rabrenović M., Matunović R., Rabrenović V., Zoranović U.; Hiperbarična medicina – mogućnosti i dileme. Vojnosanit. Pregl. 2008; 65(3): 235–238.
7. Rabrenović M., Rabrenović V., Matunović R., Kovačević Z., The role of hypertension in patients with Lupus glomerulonephritis. In Bantao Journal Vol 2005; Sept 8–11; Ohrid 2005.

## CASE REPORT

UDC: 616.8-02:615.853  
DOI: 10.2298/VSP140312059R

## Neurotoxic effects of oxygen in hyperbaric environment: A case report

### Neurotoksični efekat kiseonika u hiperbaričnim uslovima

Milorad Rabrenović\*, Saša Trešnjić\*, Violeta Rabrenović<sup>†‡</sup>, Nikola Čikiriz<sup>§</sup>,  
Siniša Mašić<sup>§</sup>, Radomir Matunović<sup>‡||</sup>

\*Center of Hyperbaric Medicine, <sup>†</sup>Clinic of Nephrology, <sup>§</sup>Institute of Hygiene, <sup>||</sup>Clinic of  
Cardiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia; <sup>‡</sup>Faculty of Medicine of the  
Military Medical Academy, University of Defense, Belgrade, Serbia

#### Abstract

**Introduction.** Oxygen is an essential element of life in aerobic organisms. However, if not controlled, inhalation of oxygen under increased pressure in conditions of hyperbaric oxygen therapy can lead to serious damage and even death. **Case report.** We presented a 20-year-old male who had begun exhibiting symptoms of epilepsy during diving test in a hyperbaric chamber while inhaling 100% oxygen. He was immediately taken off oxygen mask and started breathing air and began rapid decompression. He lost consciousness, began foaming at the mouth, and had a series of tonic spasms. The patient was previously completely healthy and not on any medications. He was admitted for emergency treatment in our hospital, where he was treated for epilepsy. On admission, he complained of muscle and joint pain, and had erythematous changes on the forehead, neck and chest. All these changes occurred after leaving the hyperbaric chamber. Bloodwork revealed leukocytosis with neutrophil (Leukocytosis  $16.0 \times 10^9/L$  (reference values  $4.00\text{--}11.00 \times 10^9/L$ ), Neutrophili  $13 \times 10^9/L$  (reference values  $1.9\text{--}8.0 \times 10^9/L$ ), with elevated enzymes aspartate aminotransferase (AST) 56 U/L (reference values 0–37 U/L), alanin aminotransferase (ALT) 59 U/L, (reference values 25–65 U/L), creatine kinase (CK) 649 U/L, (reference values 32–300 U/L), lactate dehydrogenase (LDH) 398 U/L (reference values 85–

227 U/L). Because of pain and his condition we began treatment in a hyperbaric chamber at a pressure of 2.0 ATA for 70 minutes, resulting in a reduction of symptoms and objective recovery of the patient. Within 24 h, repeated laboratory tests showed a reduction of leukocytosis ( $13 \times 10^9/L$  and neutrophils ( $7.81 \times 10^9/L$ ), and the gradual reduction of the enzymes AST (47 U/L), ALT (50 U/L, CK (409 U/L), LDH (325 U/L). Since head CT and EEG were normal, epilepsy diagnosis was ruled out. This fact, along with medical tests, facilitated the differential diagnosis and confirmed that this was a case of neurotoxic effects of oxygen while the patient was in a hyperbaric chamber, not epileptic seizures. **Conclusion.** This case report suggests that in patients with symptoms of epileptic seizures while undergoing treatment in a hyperbaric chamber, it is always important to think of neurotoxic effects of pure oxygen which occurs at higher pressures and with a longer inhalation of 100% oxygen. In these patients, reexposure to hyperbaric conditions leads to recovery. This effect is important in daily inhalation of 100% oxygen under hyperbaric conditions which is why the use of pure oxygen is controlled and diving is allowed in shallow depths and for a limited time.

**Key words:**  
oxygen; epilepsy; skin manifestations; hyperbaric oxygenation; treatment outcome.

#### Apstrakt

**Uvod.** Kiseonik je element od životne važnosti za aerobne organizme. Međutim, udisanje kiseonika pod povišenim pritiskom u uslovima hiperbarične oksigenoterapije može, ukoliko nije kontrolisano, da dovede do ozbiljnih oštećenja, pa i do smrti. **Prikaz bolesnika.** U radu je prikazan 20-godišnji muškarac koji je tokom testa za ronjoca u hiperbaričnoj komori, prilikom udisanja 100% kiseonika, dobio simptome epilepsije. Odmah mu je skinuta maska sa kiseonikom, prešao je na disanje vazduha i započeta je brza dekompresija. Kod bolesnika je došlo do gubitka svesti, do pojave pene na ustima i serije toničkih grčeva. Bolesnik je ranije bio potpuno zdrav i nije koristio nikakvu medikamentoznu terapiju. Primljen je na lečenje u našu ustanovu kao hitan slučaj, i lečen kao da je imao epileptični na-

pad. Na prijemu je zapaženo da se žali na bolove u mišićima i zglobovima i da ima eritematozne promene na čelu, vratu i grudima koje su se javile posle izlaska iz hiperbarične komore. Laboratorijski nalazi pokazali su da u krvnoj slici postoji leukocitoza sa neutrofilijom (leukociti  $16,0 \times 10^9/L$  (referentne vrednosti  $4,00\text{--}11,00 \times 10^9/L$ ), neutrofilii  $13,0 \times 10^9/L$  (referentne vrednosti  $1,9\text{--}8,0 \times 10^9/L$ ), uz povišene enzime aspartat aminotransferazu (AST) 56 U/L; (referentne vrednosti 0–37 U/L), alanin aminotransferazu (ALT) 59 U/L, (referentne vrednosti 25–65 U/L, ), kreatin kinazu (CK) 649 U/L (referentne vrednosti 32–300 U/L) laktat dehidrogenazu (LDH) 398 U/L (referentne vrednosti 85–227 U/L). Zbog bolova i opšteg stanja bolesnik je podvrgnut tretmanu u hiperbaričnoj komori na pritisku od 2.0 ATA u trajanju od 70 minuta, nakon čega je došlo do nestanka tegoba i objektivnog oporavka. Ponovljene labora-



torijske analize posle 24 časa pokazale su sniženje leukocita na  $13 \times 10^9/L$ , neutrofila na  $7,81 \times 10^9/L$ , kao i na postepeno smanjenje aktivnosti enzima u serumu (AST 47 U/L, ALT 50 U/L, CK 409 U/L, LDH 325 U/L). Budući da su multislajсни skener (MSCI) glave i elektroencelafogram (EEG) bili uredni, isključena je dijagnoza epilepsije. Uz ostale nalaze, to je olakšalo diferencijalnu dijagnozu i potvrdilo da se radilo o neurotoksičnom efektu kiseonika koji je pacijent imao u hiperbaričnoj komori, a ne o epileptičnom napadu. **Zaključak.** Prikazani bolesnik upućuje na zaključak da bi u slučaju sa razvojem stanja epinapada u toku tretmana u hiperbaričnoj komori, trebalo uvek

razmišljati o prouzrokovanom neurotoksičnom delovanju kiseonika koje se javlja pri većim pritiscima i kod duže inhalacije 100% kiseonika i da ponovno izlaganje hiperbaričnim uslovima kod takvih bolesnika dovodi do oporavka. Ovaj efekat je važan kod svakodnevnog udisanja 100% kiseonika pod hiperbaričnim uslovima zbog čega se kontrolniše njegova upotreba i dozvoljava ronjenje na malim dubinama i na ograničeno vreme.

**Ključne reči:**  
kiseonik; epilepsija; koža, manifestacije; hiperbarična oksigenacija; lečenje, ishod.

## Introduction

People's attempts to stay under water while breathing air go back to the distant past. Throughout history there have been many attempts to create machines that would enable people to stay under water with more or less success. There also was always a desire to treat patients with many diseases under these conditions.

In 1662, British doctor Henshaw<sup>1</sup> constructed a ball-shaped chamber into which he pumped air using two organ bellows, and tried to cure a number of diseases. The idea was that breathing compressed air has the therapeutic effect.

A Frenchman, Antoine Lavoisier (1743–1794), even though he was not a doctor, came to the conclusion that gas exchange takes place in the lungs. He was sure that the oxygen in the body converts into carbon dioxide, and that the nitrogen which he discovered is removed from the body unchanged.

Following the discovery of oxygen, Joseph Priestley (1733–1804) was the first to raise the question about the possibility of harmful effects of this gas on the body<sup>2</sup>. Oxygen was called "a vital gas" at that time, and Lavoisier described changes in the lungs caused by its inhalation. Only in 1899, after several experiments, Lorain-Smith found that breathing oxygen at a pressure greater than 0.6 bar after a prolonged exposure causes irreversible pathological changes in the lungs. In his honor, this phenomenon is called the Lorain-Smith effect.

In the excellent book "La pression barométrique", French physiologist Paul Bert in 1878, pointed out that breathing oxygen pressurized above 2 absolute bar causes convulsions similar to epilepsy. In deference to him, such cases are referred to as "Paul Bert effect" or neurotoxic effects of oxygen<sup>2</sup>. Others, starting with Berta, have proposed to replace air with oxygen during treatment process<sup>4</sup>. Behnke and Shaw<sup>5</sup> were the first to try this. Their work resulted in a recommendation of therapy based on the severity of the condition and first application of mixtures of oxygen and nitrogen different than normal air. Paul Bert effect is important in daily inhalation of oxygen, which is why its use is limited and diving is allowed in shallow depths and for a limited time. The most accepted mechanism is that oxygen inactivates ferments necessary for the performance of normal processes in nerve cells<sup>6</sup>.

Bert<sup>4</sup> also noted that rapid transition from higher to lower pressure leads to sickness and even fatality, so he suggested the prevention of decompression sickness by gradually decreasing pressure (gradual decompression). This

is actually the first introduction of the prophylactic decompression procedure based on the principle of slow and continuous emergence. An important aspect of this early work was the recognition of safe limits of exposure to oxygen in relation to dose and time, and the highest possible oxygen pressure and the longest exposure time with the minimum possible risk of oxygen toxicity to the central nervous system<sup>7, 8</sup>. Later, navies became interested in oxygen and expanded its use, speeding up the process of decompression and improving the efficiency and treatment of divers<sup>9, 10</sup>.

Bert's other significant contribution to the practice of hyperbaric medicine was the recognition of oxygen toxicity to the central nervous system with application of oxygen under high partial pressures<sup>6, 7</sup>. Oxygen toxicity on the central nervous system was not significant for many years as it was mainly related to diving until the use of sufficiently high partial pressures of oxygen in the clinical setting<sup>11</sup>. The mechanism of oxygen neurotoxicity explains that hyperbaric oxygen inactivates ferments responsible for bioregulation of vital processes in nerve cells, but there is also a view that dissolved oxygen disrupts a regular transport of oxygen and removal of carbon dioxide<sup>6</sup>.

## Case Report

A 20-year-old male, a diver candidate became ill during testing in the hyperbaric chamber, and admitted to our hospital as an emergency case. The patient's history and medical records indicated that previously he was a healthy person who did not take any medication. While breathing 100% oxygen at the depth of 18 m for 60 minutes in the chamber, he developed problems that were manifested as the loss of consciousness, foaming at the mouth, and a series of convulsions of the entire body and limbs.

A companion in the chamber reacted by removing the mask and the patient began rapidly to ascent, and from that moment he stopped breathing 100% oxygen and breathed air during the ascent. After surfacing and exiting the hyperbaric chamber the patient was confused, he had nausea and queasiness, and within the next 50 minutes, he developed redness on the forehead, neck and chest, and conjunctival suffusion, with pain in the shoulders and muscles (Figure 1).

Post-admission laboratory analysis and blood work showed leukocytosis with neutrophilia (leukocytes  $16.0 \times 10^9/L$ , neutrophils  $13.0 \times 10^9/L$ ), with elevated aspartate ami-

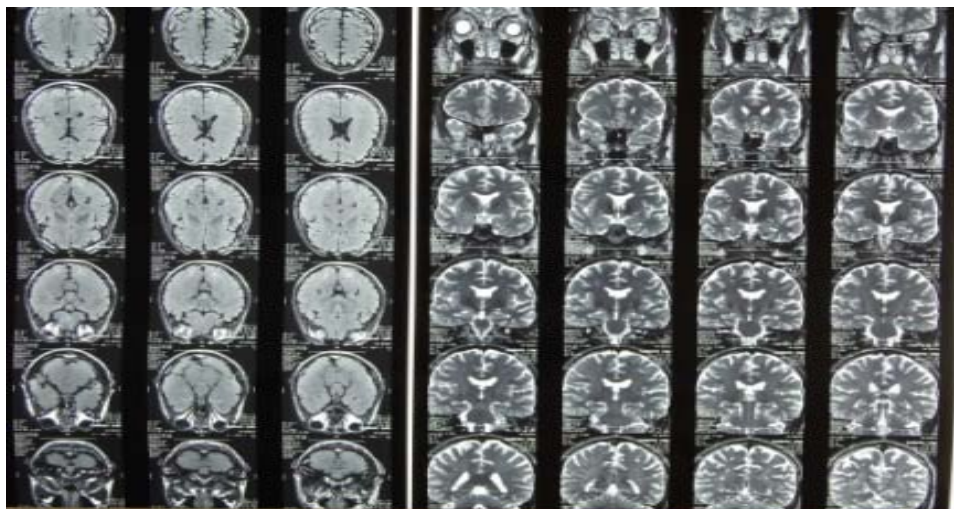


**Fig. 1 – Appearance of the patient before treatment with hyperbaric oxygen therapy: a) Changes on the skin of the face; b) Changes on the skin of the neck; c) Changes on the conjunctive (conjunctival suffusion)**

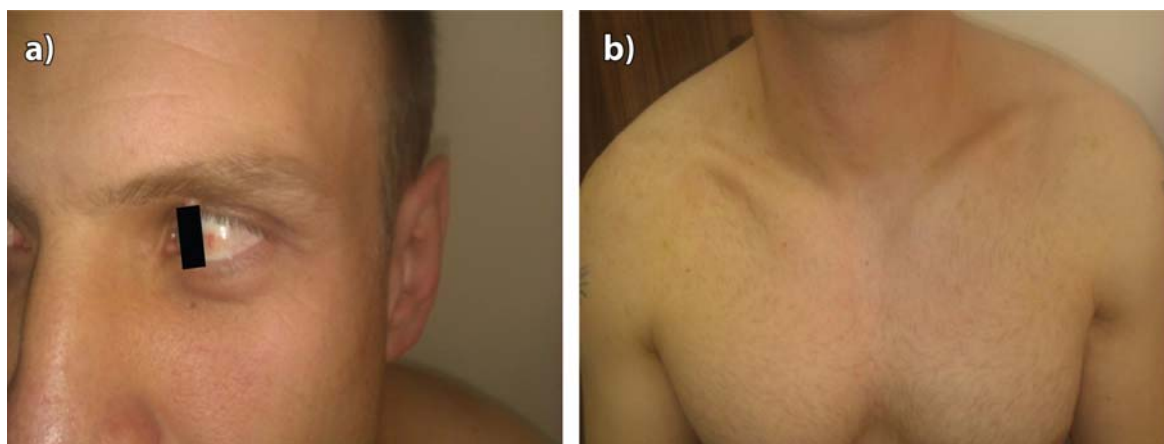
notransferase (AST) 56 U/L, alanine aminotransferase (ALT) 59 U/L, creatine kinase (CK) 649 U/L, lactate dehydrogenase (LDH) 398 U/L. Other laboratory tests were within the normal range. Radiography of the heart and the lungs, and head computed tomography (CT) were also normal (Figure 2), as were cardiological and neurological examinations. Head magnetic resonance imaging (MRI) with contrast was also normal. Despite the demonstrated symptoms that resembled the epileptic seizure, the tests confirmed that it was the neurotoxic effect of oxygen. Despite the manner of onset of

the disease and the findings that were suggestive of neurotoxic effect of oxygen, the patient was treated in a hyperbaric chamber for 70 minutes at the pressure of 2.0 ATA, primarily due to the redness of the forehead, neck and chest, conjunctival suffusion, and pain in the shoulders, muscles and joints.

During the treatment in the hyperbaric chamber, within 30 minutes the patient's condition improved, skin redness and muscular and joint pain disappeared, and conjunctival suffusion became less pronounced (Figure 3).



**Fig. 2 – Computed tomography (CT) scan of the head – normal findings.**



**Fig. 3 – The patient after first treatment in the hyperbaric chamber: a) A significant reduction in conjunctival suffusion; b) A significant regression in skin changes.**

The next day, laboratory analysis was repeated, revealing a reduction in leukocytes count to  $13 \times 10^9/L$ , neutrophils to  $7,81 \times 10^9/L$ , as well as a gradual reduction in serum enzymes activities (AST 47 U/L, ALT 50 U/L, CK 409 U/L, LDH 325 U/L).

### Discussion

Occurrence of neurotoxic effects of oxygen has been described in divers who do not comply with the depth of dive, and time for inhalation of 100% oxygen in a closed apparatus<sup>12</sup>. This effect can occur in a hyperbaric chamber in the event of inhalation of 100% oxygen over 2.0 ATA pressure in people who are particularly sensitive to elevated partial pressure of oxygen.

In this case report, we presented healthy person who had been tested in a hyperbaric chamber. While breathing 100% oxygen at the pressure of 2.8 ATA he exhibited a neurotoxic effect, with the appearance of clinical symptoms that resembled epileptic seizures.

This effect is not unknown in the literature and is also called oxygen epilepsy or Paul Bert effect<sup>2</sup>. The clinical picture is consistent with epileptic seizure and may represent a major differential diagnostic problem to clinicians who are not familiar with diving diseases. Only later, as in the case of our patient, after neurological examination (EEG, CT and MRI of the head) neurotoxic effect of oxygen that the

patient breathed at high pressure, and not epileptic seizure, was confirmed.

Also, with pressure reduction in the chamber and cessation of breathing 100% oxygen, symptoms disappear spontaneously and there is no need for further treatment in most cases.

However, immediately upon admission and after examination and the diagnosis, we placed our patient in a hyperbaric chamber where he was treated for pain in the muscles, joints, and erythema which appeared at the head, neck and chest and conjunctival suffusion. We did that at the pressure of 2.0 ATA for 70 minutes. Already in the course of treatment in the hyperbaric chamber, the patient's condition objectively and subjectively improved which was confirmed by laboratory findings.

### Conclusion

We presented a case with neurotoxic effects of oxygen that occurred in the hyperbaric chamber. Such cases occur frequently when diving in a closed type apparatus. In particular, in such cases we emphasize the need to carefully and quickly perform a differential diagnosis to severe neurological diseases, but taking into account inhalation of 100% oxygen, which precedes the condition. The diagnosis is easy to establish following normal EEG, CT and MRI of the head findings, unlike a true epileptic attacks.

### R E F E R E N C E S

1. *Henshaw N.* Aero-chalinos. Dublin: Dancer; 1664.
2. *Gošović S.* Safe diving: diving medicine and the basics of diving. Zagreb: JUMENA; 1990. (Croatian)
3. *Clark JM.* Oxygen toxicity. In: *O, Bennett PB, Elliot DH.* The Physiology and Medicine of Diving. London: Bailliere-Tindall; 1982. p. 200–38.
4. *Bert P.* La Pression Barometrique. Paris: Masson; 1879.
5. *Behnke AR, Shaw LA.* The use of oxigen in the treatment of compressed-air illness. US Nav Med Bull (Washington) 1937; 35: 61–73.
6. *Gošović S.* Safe diving. Split: Institute for Navy Medicine; 2011. (Croatian)
7. *Patel DN, Goel A, Agarwal SB, Garg P, Lakhani KK.* Oxygen Toxicity. J Ind Acad Clin Med 2003; 4(3): 234–7.
8. *Clarke D.* Diver medics; The first ten years. Proceedings of International Diving Symposium. New Orleans: Association of Diving Contractors; 1984.
9. United States Navy Diving Manual. Rev. 4. Washington, DC: Superintendent of Documents U. S. Government Printing Office; 1999.
10. *Newton HB.* Neurologic complications of scuba diving. Am Fam Physician 2001; 63(11): 2211–8.
11. *Dejours P, Dejours S.* The effects of barometric pressure according to Paul Bert: the questions today. Int J Sport Med 1992; 13(1): 1–5.
12. *Arieli R, Shochat T, Adir Y.* CNS toxicity in closed-circuit oxygen diving: symptoms reported from 2527 dives. Aviat Space Environ Med 2006; 77(5): 526–32.

Received on March 12, 2014.

Revised on June 26, 2014.

Accepted on July 25, 2014.

Online First July, 2015.

Copyright of Vojnosanitetski Pregled: Military Medical & Pharmaceutical Journal of Serbia is the property of Military Medical Academy INI and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.



## Razvoj hiperbarične medicine

## Development of hyperbaric medicine

Milorad Rabrenović\*, Violeta Rabrenović†, Uroš Zoranović‡

Vojnomedicinska akademija, \*Centar hitne pomoći, †Klinika za nefrologiju,

‡Klinika za vaskularnu hirurgiju, Beograd

### Ključne reči:

hiperbarična oksigenacija; lečenje, ishod; istorija medicine; dekompresiona bolest.

### Key words:

hyperbaric oxygenation; treatment outcome; history of medicine; decompression sickness.

### Uvod

Hiperbarična medicina se bavi terapijskom primenom 100% kiseonika pod pritiskom većim od jedne atmosfere u specijalnim komorama. Izdvojivši se iz podvodne medicine ona je prevazišla osnovnu ulogu u zbrinjavanju ronilaca i danas ima značajno mesto u skoro svakoj grani medicine. Pojam „hiperbarično“ podrazumeva „dešavanja pod višim pritiskom u odnosu na normalan atmosferski pritisak“<sup>1</sup>.

Na prvom svetskom kongresu u Amsterdamu dr J. H. Jakobson iz „Mount Sinai Hospital“ svoje izlaganje započeo je sledećim rečima: „Primena kiseonika pod pritiskom višim od atmosferskog pritiska predstavlja napredak koji se po značaju može porediti sa uvođenjem transfuzije krvi i antibiotika u terapiju“<sup>2</sup>.

### Počeci primene hiperbarične oksigenacije

Prvi pisani tragovi o ronjenju datiraju iz 700. godine pre n. e. iz vremena trojanskog rata, a naveo ih je Homer u Ilijadi. Takođe, postoji pisani trag da je Aleksandar Makedonski koristio 333. godine pre n. e. vojne ronioce za rušenja pod vodom u opsadi grada Tira.

Do pojave Leonarda Da Vinčija (1452–1519) sva ronjenja su bila „na dah“, a onda je on projektovao prvi model ronilačkog odela sa perajima za ruke i noge (slika 1). Pojava zvona za ronjenje donela je veliki napredak, pa je omogućeno duže ostajanje ronilaca pod vodom. Još Aristotel opisuje zvono za ronjenje sa tehničkim podacima za

njegovu primenu. U delu *Architettura Militare Franchesca de Marchi* (1490–1574) opisuje se zvono konstruktora Gulielma Lorene u kojem se pod vodom moglo ostati do jedan sat. Britanac Henshow 1662. godine konstruiše komoru lop-tastog oblika u koju ubacuje vazduh pomoću sistema mehova preuzetih od orgulja. U ovoj komori sa vazduhom pod povišenim pritiskom Henshow je lečio brojna oboljenja<sup>3</sup>.

Edmund Halley 1691. godine uvodi sistem dovoda vazduha sa površine uz pomoć bureta ispunjenog vazduhom koje je spuštano do zvona. Na ovaj način ronioци su se spuštali do dubine od oko 18 m i zadržavali pod vodom jedan sat i trideset minuta. Kasnije, zamenom bureta ispunjenog vazduhom sistemom kojim se dopremao vazduh omogućeno je



Sl. 1 – Ronilac Leoanrda da Vinčija u planovima za vojne akcije. Crtež iz knjige *Codex Atlanticus*, folio 909 v. (ranije folio 333 v. iz *Il Codice Atlantico di Leonardo da Vinci nella biblioteca Ambrosiana di Milano*, Milano: Hoepli; 1894-1904.)

konstruisanje zvona za ronjenje u kome su ronionci mogli daleko duže da borave i rade pod vodom<sup>4</sup>.

Francuski naučnik Antoine Lavoisier (1743–1794), pored toga što nije bio lekar, dolazi do zaključka da se gasovi prilikom disanja razmenjuju u plućima. On otkriva da se udahnuti kiseonik u plućima zamenjuje sa ugljen-dioksidom, kao i da se azot koji je on otkrio izbacuje nepromenjen iz organizma<sup>4</sup>.

Joseph Priestley (1733–1804) posle pronalaska kiseonika prvi postavlja sumnju da je moguće njegovo štetno dejstvo na organizam. Beddos i Watt su 1799. godine uočili patološke promene na plućima u eksperimentima na mačićima koji su bili izloženi atmosferi koja je sadržala 80% kiseonika.

Francuski hirurg Fontaine projektovao je pokretnu komoru, koja se zasnivala na jednom od osnovnih zakona fizike (Henrijev zakon). On je povećavanjem atmosferskog pritiska u komori povećavao količinu kiseonika koja se nalazi u krvotoku bolesnika prilikom davanja azot-oksida kao anestetika, čime je sprečavao pad nivoa kiseonika u krvi, što se događa prilikom hirurških intervencija u dubokoj anesteziji<sup>5</sup>.

Triger je 1845. godine opisao simptome kod rudara slične sa simptomima dekompresione bolesti<sup>6</sup>.

Pol i Watelle su 1854. godine objavili da je dekompresija razlog za pojavu smetnji i da se rekompresijom mogu smanjiti simptomi<sup>7</sup>.

Francuski fiziolog Paul Bert objavljuje 1876. godine da su azotni mehurići koji se stvaraju uzroci problema koji se javljaju tokom brze dekompresije<sup>7</sup>. Isti naučnik 1878. godine dokazuje da i udisanje kiseonika pod pritiskom višim od dva apsolutna bara dovodi do konvulzija sličnih onima koji se javljaju kod epilepsije. Ova pojava se naziva Paul Bertov efekat i podrazumeva neuro-toksično delovanje kiseonika. Iste godine Paul Bert razvija teoriju koja je posle i prihvaćena kao pneumatska teorija etiologije kesonske (dekompresione) bolesti. On je utvrdio da su gasni mehurići, koje je našao u cirkulaciji brzo dekomprimovanih životinja, pretežno sastavljeni od azota<sup>8</sup>.

U većem broju eksperimenata Lorain–Smith 1899. godine utvrđuju da udisanje kiseonika pod pritiskom većim od 0,6 bara, posle produženog izlaganja, izaziva ireverzibilne patološke promene na plućima. Ova pojava se zbog toga naziva Lorain–Smithov efekat<sup>4,9</sup>.

Početak 1900. godine Cunningham je primetio da postoje razlike u zdravstvenom stanju ljudi, koji boluju od istih kardiovaskularnih oboljenja, u zavisnosti od nadmorske visine na kojoj žive. On je to povezao sa promenom atmosferskog pritiska i postavio je hipotezu da podizanje pritiska iznad normanog nivoa može biti korisno. S tim u vezi razvio je cilindričnu komoru dimenzija 3 × 27 m koju je koristio za lečenje mnogih stanja, posebno opstruktivnih oboljenja pluća, oboljenja srca, hipertenzije, reumatske groznice, artritisa, dijabetesa melitusa i sifilisa. Njegov početni uspeh doveo je do toga da mu je zahvalni bolesnik izgradio 1921. godine u Kansas Sitiju komoru u obliku čelične lopte oko 20 m u širini koja je sadržala prostoriju za pušenje, ručavanje i privatne separee. Primena ove komore se nije održala jer medicinski autoriteti tog vremena nisu imali razumevanja za ovaj metod lečenja, te je ona bila zatvorena i završila je na otpadu<sup>10,11</sup>.

Krajem XIX i početkom XX veka u ratnoj mornarici Velike Britanije grupa lekara pod vodstvom profesora J. S. Haldanea vrši istraživanja problema dekompresije sa ciljem da se unapredi tehnologija za ronjenje i podmorničarstvo.

Prvu rekompresionu komoru za lečenje dekompresione bolesti postavio je Ernest Moir 1893. blizu podvodnih gradišta na Istočnoj reci u Njujorku. Prilikom rekompresije on je uspeo da eliminiše teške oblike dekompresione bolesti, jer su radnici imali probleme pri radu sa vazduhom pod pritiskom. U to vreme radnici koji su radili na konstrukciji mosta na reci Hadson imali su problema sa delovanjem vazduha pod pritiskom i otprilike ¼ je umrla od dekompresione bolesti<sup>12</sup>.

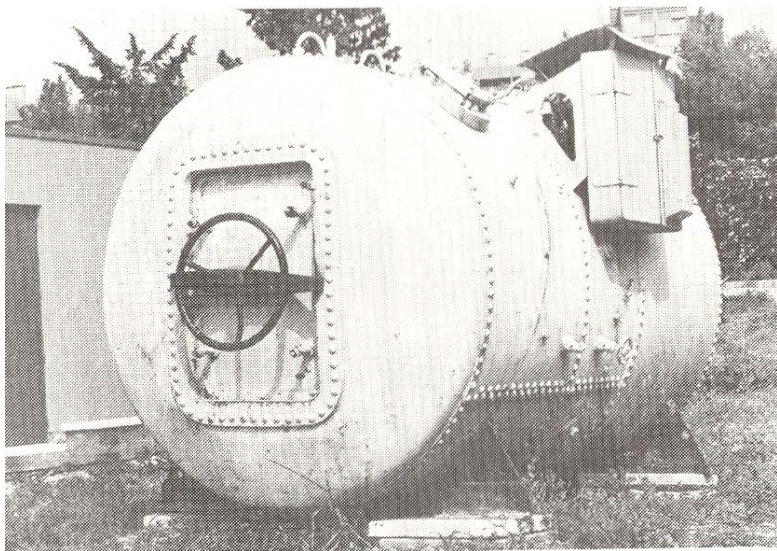
Moderno doba hiperbarične medicine počinje 1937. godine kada su Benhke i Shaw počeli da koriste hiperbaričnu komoru za lečenje dekompresione bolesti.

Van Ave, Benhke i saradnici 1945. godine razvijaju u ratnoj mornarici SAD rekompresionu metodu koja je narednih 20 godina bila glavna u lečenju dekompresione bolesti i barotraumske gasne embolije. Veoma je važna 1947. godina u kojoj End iz SAD počinje da leči dekompresionu bolest isključivo sa kiseonikom pod povišenim pritiskom. Hiperbarični kiseonik je korišćen u Holandiji, u oblasti hirurgije, sa ciljem natapanja tkiva kiseonikom zbog čega je čitava operaciona sala bila pod povećanim pritiskom<sup>13</sup>.

Od 1955. godine hiperbarična oksigenacija (HBO) je počela da se koristi i za lečenje drugih bolesti pored dekompresione. Te godine Churchill i Davidson su počeli da koriste oksigenoterapiju za lečenje bolesnika obolelih od karcinoma zbog posledica lečenja radioterapijom. Boerema u Holandiji 1956. godine izvodi prvu operaciju na srcu u hiperbaričnoj komori. U 1962. godini, Sharp i Smit u Škotskoj prvi tretiraju trovanje ugljen monoksidom uz pomoć hiperbarične oksigenacije. Prins iz Velike Britanije je 1965. godine ukazao na efekte hiperbarične oksigenacije kod bolesnika sa osteomijelitisom. Saltzman i saradnici iz SAD su 1966. godine pokazali efekte hiperbarične oksigenacije kod bolesnika sa moždanim udarom. Boschetty i Cernoch iz Čehoslovačke su 1970. godine koristili hiperbaričnu oksigenaciju kod multiple skleroze. Lamm iz Zapadne Nemačke 1971. godine je koristio hiperbaričnu oksigenaciju u lečenju iznenadne gluvoće. Thurston je 1973. godine opisao da hiperbarična oksigenacija primenjena u ranoj fazi smanjuje smrtnost kod infarkta miokarda<sup>14</sup>. Tokom nekoliko godina hiperbarična oksigenacija se posebno pokazala efikasnom kod anaerobnih infekcija i to kod gasne gangrene<sup>15</sup>. Veliki uspeh se postizao i u lečenju trovanja ugljen-monoksidom<sup>16</sup>.

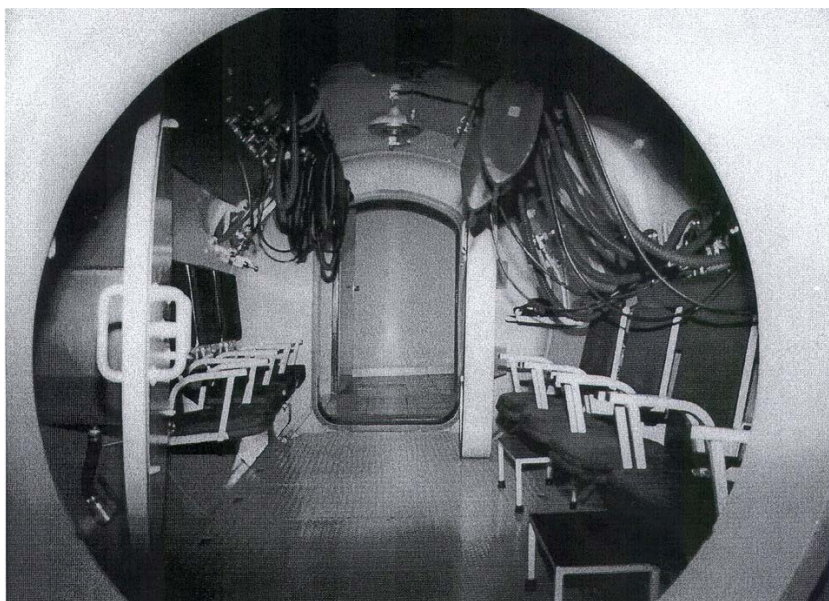
Na našim prostorima 1933. godine Kraljevska ratna mornarica je nabavila dvodelnu rekompresionu komoru Siebe Gorman, ali zbog nedostatka kompresora i vazdušne banke nije puštena u rad (slika 2). Posle rata ova komora je preuzeo Brodospas, gde je nakon instaliranja na brod i njenog kompletiranja puštena u rad. U njoj su se lečeni mnogi lakši i srednje teški slučajevi dekompresione bolesti. U Institutu za pomorsku medicinu ratne mornarice u Splitu 1969. godine otpočela je sa radom velika rekompresiona komora. Dr Stracimir Gošović 1970. godine počinje sistematsku primenu kiseonika pod povećanim pritiskom u kliničke svrhe u istom Institutu<sup>4</sup>. U Beogradu je 1974. godine pri KBC Zemun os-





Sl. 2 – Rekompresiona komora nabavljena 1933. godine za bivšu ratnu mornaricu

novan Hiperbarični centar pod rukovodstvom dr Dekleve. Tokom 1994. godine počinje sa radom u Beogradu Zavod za hiperbaričnu medicinu (slika 3).



Sl. 3 – Moderna hiperbarična komora

### Princip delovanja hiperbarične oksigenacije

Danas se rekompresiona terapija sprovodi u jednomesnim ili višemesnim komorama primenom standardnih tablica 5 i 6 koje su primarno bile razvijene za potrebe mornarice. Modifikovane tablice našle su primenu i u hiperbaričnoj medicini, gde se lečenje zasniva na istom principu kao i kod rekompresione terapije<sup>17</sup>.

Udisanjem vazduha pri normalnom pritisku hemoglobin je saturisan kiseonikom 97%, a u 100 ml krvi ima ga 19,5 volumen % hemijski vezanog i rastvorenog 0,32 volumen %. Ukoliko se diše kiseonik pod hiperbaričnim uslovima do tri atmosfere, rastvoreni kiseonik u plazmi se povećava do 6 ml

volumen %, dok hemoglobin vezuje do 20,1 volumen % kiseonika hemijskim putem<sup>18</sup>.

Ovu pojavu objašnjava i potvrđuje Henrijev zakon: „Rastvorljivost gasa u tečnosti direktno je proporcionalan, pri određenoj temperaturi, pritisku koji taj gas vrši na tečnost“. To znači da se sa povećanjem pritiska povećava kapacitet tečnosti da rastvori određeni gas, odnosno ako se pritisak kiseonika poveća za dva puta pri dovoljnom vremenu i konstantnoj temperaturi u tečnosti kiseonik će se dva puta više rastvoriti nego u normalnim uslovima. Na ovakav način kiseonik rastvoren u krvi i svim drugim telesnim tečnostima organizma difuzijom prolazi kroz membrane ćelija i nisu mu potrebni hemijski faktori neophodni za klasičan transport. Ovim postupkom se ublažava ili potpuno otklanja hipoksija.

Pored Henrijevog zakona ovu pojavu objašnjava i Boyle-Mariotov zakon koji glasi: „Kod konstantne temperature volumen gasa menja se obrnuto proporcionalno od apsolutnog pritiska, dok je gustina gasa upravo proporcionalna s pritiskom“. To bi praktično značilo da ako se cilindar napunjen vazduhom okrene sa otvorom prema vodenoj površini i postepeno spušta u vodu na 10 m pri pritisku od dva bara vazduh u cilindru će se zbiti za polovinu svoje zapremine, na 20 m pri pritisku od tri bara vazduh u cilindru zahvatiće samo trećinu zapremine itd. Smanjenje volumena vazduha prati porast njegove gustine zbog čega respiratorni sistem trpi pritisak (gustina vazduha) i dolazi do gubitka svesti.

Dalton je utvrdio da je fiziološki efekat gasova zavisi od parcijalnog pritiska, a ne od procenta sadržaja što je i definisao svojim zakonom koji glasi: „Pritisak koji vrši gasna mešavina jednak je zbiru pritisaka koji bi vršio svaki od tih gasova ako bi sam zauzimao ukupni volumen“. Visina parcijalnog pritiska direktno utiče na fiziološke efekte gasova. Tako visok parcijalni pritisak kiseonika pokazuje narkotičko delovanje. To je potvrđeno u eksperimentu Precontinente III u kome je grupa akvanauta disala u podvodnoj kućici na oko 100 m dubine, gasnu mešavinu koja je sadržavala 2% kiseonika i 98% helijuma. Parcijalni pritisak kiseonika na 100 m je 0,22 bara ili 22% preračunato na normalne uslove, a to je optimum za odvijanje životnih procesa. U slučaju da se ovakva mešavina sa sadržajem kiseonika od 2% udiše na nivou mora pritisak bi bio 0,02 bara i to bi dovelo do trenutnog gubitka svesti usled nedostatka kiseonika<sup>4</sup>.

Indikacija za primenu HBO je nedostatak kiseonika u tkivima, koji dovodi do destrukcije, pri čemu se oslobađaju medijatori zapaljenja, posebno slobodni radikali<sup>19</sup>. Zbog nastalih promena u tkivima produbljuje se slab dotok kiseonika i njegovo vezivanje za tkiva. U uslovima hiperbarične oksigenacije kiseonik se rastvara u krvi i telesnim tečnostima 20 puta više<sup>20,21</sup>. Hiperbarična oksigenacija u fiziološkom smislu deluje na sva tkiva koja zbog ishemije imaju slabije snabdevanje kiseonikom. Ima antinflatorno i baktericidno dejstvo, poboljšava cirkulaciju krvi, ima antiedematozno dejstvo i imunosupresivno dejstvo, povećava propustljivost hematocefalične barijere, reguliše nivo prostaglandina u organizmu, podstiče sintezu kolagena i regeneraciju tkiva, podstiče stvaranje kalusa kod preloma kosti.

U toku HBO povećava se stvaranje slobodnih radikala kiseonika, o čemu je potrebno voditi računa pošto je za normalno funkcionisanje potrebna ravnoteža između slobodnih radikala i aktivnosti antioksidantne zaštite.

Kiseonik može biti i lek i otrov. Haugard 1971. godine ga naziva univerzalnim otrovom i to direktno zavisi od visine parcijalnog pritiska i vremena ekspozicije. Zbog toga je kod primene HBO u uslovima visokog parcijalnog pritiska i dugih serija lečenja neophodno primeniti antioksidantne supstance (vitamin C, vitamin E, selen, magnezijum, beta i alfa karoten...) <sup>22, 23</sup>. U protivnom toksički efekat kiseonika, posebno slobodnih radikala, može da se odrazi na funkcionisanje kardiovaskularnog sistema, jetre, bubrega, mozga, kao i endokrinih žlezda, izazivajući oštećenja ćelijskih struktura, čime im umanjuje funkciju i sposobnost samoregulacije.

### Perspektiva hiperbarične medicine

Prvi uspesi primene HBO su ohrabivali i došlo je do osnivanja većeg broja medicinskih tela i održavanja međunarodnih sastanaka pri čemu se najviše izdvojila Američka nacionalna akademija nauka koja je prihvatila hiperbaričnu medicinu.

Razumevanje patofizioloških efekata primene HBO pomoglo je da se hiperbarična medicina unapredi kako u pogledu medicinskih protokola lečenja, tako i u tehničkom smislu<sup>24</sup>.

Podvodno medicinsko društvo koje je formirano u SAD 1976. godine dodalo je svom imenu 1986. godine i naziv „hiperbarično“.

Iskustva stečena primenom hiperbarične oksigenacije na našim prostorima su mala. Negativan stav prema njoj i oskudna primena posledica su nedovoljne obaveštenosti lekarskog kadra.

Za razliku od nas, svet odavno primenjuje HBO i to ne u skladu alternativne medicine već kao sastavni deo terapijskih protokola u mnogim oboljenjima. Evropski komitet za hiperbaričnu medicinu preporučio je primenu hiperbaričnog kiseonika u mnogim slučajevima<sup>18</sup>. Indikacije za primenu kod akutnih stanja su: trovanje ugljen-monoksidom, arterijski gasni embolizam, gasna gangrena, dekompresiona bolest, ozbiljne infekcije mekog tkiva, uključujući dijabetičku gangrenu, „kraš“ povrede i kompartment sindrom, opekotine sa inhalacijom ili bez inhalacije dima, anemija uzrokovana velikim gubitkom krvi, postanoksička encefalopatija, iznenadna gluvoća, ozbiljni poremećaji vida uzrokovani vaskularnom patologijom, hronične indikacije obuhvataju ulceracije na koži zbog hronične ishemije (prouzrokovane arterijskom insuficijencijom, venskom insuficijencijom, dijabetičkim vaskularnim poremećajima, dekubitusom, posttraumatski, posttrajicijom, gangrenoznom piodermom), kompromitovani graft (vaskularne ili infektivne prirode), radijacione nekrotične lezije i hronični refraktorni osteomielitis.

Polazeći od ovih iskustava od 2000. godine Američki odbor medicinskih specijalizacija odobrio je uvođenje podvodne i hiperbarične medicine kao supspecijalizacije u okviru urgentne i preventivne medicine.

Imajući u vidu brojna područja primene, terapijske efekte koji se postižu, kao i preporuke Evropskog komiteta za hiperbaričnu oksigenaciju, smatramo da su se stekli uslovi da se i u našoj sredini otpočne sa širom primenom hiperbarične oksigenacije.

### L I T E R A T U R A

1. American Heritage Dictionary. Boston: Houghton Mifflin Co; 1994.
2. Živković M, Kanjuh Ž, Bakčević P. Historical development of hyperbaric medicine and physiological basis of its application. In: Živković M, editor. Hyperbaric and underwater medicine. Beograd: HBO centar; 1998. p. 103–13. (Serbian)
3. Simpson I. Compressed air as a therapeutic agent in the treatment of consumption, astma, chronic bronchitis and other diseases. Edinburg: Sutherland & Knox; 1857.
4. Gošonić S. Safe diving. Zagreb: Jumena; 1986. (Serbo-Croatian)
5. Fontaine J.A. Emploi chirurgical de l'air comprime. Union Med 1897; 28: 445. (French)
6. Triger M. Letter to Monsieur Arago. Compte Rendus de l'Academie des Sciences. 1845; 20: 445.
7. Pol M, Watelle M. Memoire sur des effets de compression de l'air applique creusement de putis houille. Annales Hygiene Hygiene Publique et de Medicine Legale. Second Series 1854; 1: 241. (French)
8. Bert P. La Pression barometrique, recherches de physiologie experimentale. Paris: Masson; 1878. (French)
9. Wattel F, Mathiev D. Oxygenotherapeutic hyperbare et Reanimation. Paris: Masson; 1990. (French)
10. Jacobson JH 2nd, Morsch JH, Rendell-Baker L. Clinical experience and implications of hyperbaric oxygenation. The historical perspective of hyperbaric therapy. Ann N Y Acad Sci 1965; 117: 651–70.
11. Sheridan RL, Shank ES. Hyperbaric oxygen treatment: a brief overview of a controversial topic. J Trauma 1999; 47(2):426–35.
12. Moir EW. tunnelling by compressed air. Journal of the Society of Arts, 1896; 44: 567.
13. Boerema I, Huiskes JW, Kroll JA, Kroon B, Lokin E, Meyne NG. High atmospheric pressure as an aid to cardiac surgery. Arch Chir Neerl 1956; 8(3): 193–211.
14. Jain KK. Textbook of Hyperbaric Medicine. 4th ed. Ashland On: Hogrefe & Huber; 2004.
15. Brummelkamp WH, Hogendijk J, Boerema Y. Treatment of anaerobic infections (clostridial myositis) by drenching tissues



- with oxygen under high atmospheric pressure. *Surgery* 1961; 49: 299–302.
16. *Smith G, Ledingham IM, Sharp GR, Norman JN, Bates EH.* Treatment of coal-gas poisoning with oxygen at 2 atmospheres pressure. *Lancet* 1962; 1: 816–9.
  17. *Denoble P.* Pathophysiology of decompression disease. *Naval medicine (scientific dissevisions)*. Mornarički glasnik 1990; 269–77.
  18. *Oriani G, Marroni A, Wattel E,* editors. *Handbook on hyperbaric medicine*. New York: Springer; 1996.
  19. *Kehrer JP.* Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21–48.
  20. *Touhey JE, Davis JC, Workman WT.* Hyperbaric oxygen therapy. *Orthop Rev* 1987; 16(11): 829–33.
  21. *Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E.* Hyperbaric oxygen therapy. *JAMA* 1990; 263(16): 2216–20.
  22. *Ferrari R, Visioli O, Guarnieri C, Calderera M.* Vitamin E and the heart: possible role as antioxidant. *Acta Vitaminol Enzymol* 1983; 5(1): 11–22.
  23. *Allen RJ, Brook M, Broadbent SR.* The variability of vitamin C in our diet. *Br J Nutr* 1968; 22(4): 555–63.
  24. *National Academy of Sciences, National Research Council.* *Fundamentals of Hyperbaric Medicine*. Publication 1298. Washington: National Academy of Science; 1966.

Rad je primljen 18. I 2006.



## Hiperbarična medicina i urgentna stanja

## Hyperbaric medicine in emergencies

Milorad Rabrenović\*, Radomir Matunović†, Violeta Rabrenović‡,  
Veljko Todorović§, Dušan Mićević¶, Uroš Zoranović||

Vojnomedicinska akademija, \*Centar za hitnu pomoć, †Klinika za kardiologiju,  
‡Klinika za nefrologiju, §Klinika za vaskularnu hirurgiju, Beograd; §Uprava za  
zdravstvo Ministarstva odbrane Vojske Srbije, Beograd;  
¶Zavod za hiperbaričnu medicinu, Beograd

### Ključne reči:

hiperbarična oksigenacija; lečenje; kiseonik; medicina,  
urgentna; dekompresiona bolest; embolija vazduhom;  
trovanje ugljenmonoksidom.

### Key words:

hyperbaric oxygenation; therapeutics; oxygen;  
emergency medicine; decompression sickness;  
embolism, air; carbon monoxide poisoning.

### Uvod

U urgentnoj medicini postoji nekoliko priznatih indikacija za primenu hiperbarične oksigenoterapije (HBOT), kao što su dekompresiona bolest (DB), barotraumska gasna embolija (BGE), trovanja ugljen-monoksidom, cijanidom i vodonik-sulfidom, kao i gasna gangrena. Osnovna dilema je da li je lista urgentnih stanja u kojima treba primenjivati hiperbaričnu oksigenaciju ovim iscrpljena ili nije i da li je hiperbarična medicina kao grana medicine pravilno pozicionirana u odnosu na službu urgentne medicinske pomoći.

Opravdanost ovog pitanja potvrđuje delovanje HBOT na organizam. Udisanjem vazduha pri normalnom pritisku hemoglobin je saturisan kiseonikom 97%, a u 100 ml krvi ima ga 19,5% v/v hemijski vezanog i 0,32% v/v rastvorenog. Udisanjem kiseonika u hiperbaričnim uslovima do 3 atmosfere, rastvoreni kiseonik u plazmi raste do 6% v/v, dok hemoglobin vezuje do 20,1% v/v kiseonika hemijskim putem<sup>1</sup>. Tako se odgovara na metaboličke zahteve organizma i onda kada je količina hemoglobina nedovoljna za prenos potrebnih količina kiseonika.

Danas, uglavnom, prevladava mišljenje da HBOT treba koristiti kao terapijsku meru kod hroničnih stanja, dok pojedini lekari samo barotraumu svrstavaju u akutne indikacije i veoma retko pominju hiperbaričnu medicinu<sup>2-4</sup>.

Osnovni princip dejstva HBOT je kontrolisano dejstvo 100% kiseonika pod pritiskom većim od jedne atmosfere na bolesnike u hiperbaričnim komorama. U hiperbaričnim komorama koje se danas koriste u kliničke svrhe koristi se isključivo kiseonik. One su nastale iz komora predviđenih za

fiziološka testiranja, zatim rekompresionih komora za profilaktičku dekompresiju i dekompresiju na površini<sup>5</sup>. Bolesnici u hiperbaričnim komorama izlažu se pritisku u terapijskom odnosu od 2,0 do 2,8 atmosfera, najčešće u trajanju od 60 ili 90 min. Postoje protokoli za lečenje raznih bolesti, ali pritisak i trajanje tretmana uglavnom se određuju individualno. Reč hiperbarično znači „dešavanje pod višim pritiskom u odnosu na normalan atmosferski pritisak“<sup>6</sup>.

Delovanje hiperbaričnog kiseonika zasnovano je na njegovoj fizičkoj rastvorljivosti u plazmi i difuziji kroz membranu ćelija. Za kiseonik rastvoren u plazmi nije potreban nikakav hemijski činilac za klasičan transport. Zbog toga je i kod kompromitovanog krvnog suda obezbeđeno normalno snabdevanje organizma kiseonikom. Povišeni pritisak i sam deluje kao fizička sila, što povoljno utiče na edeme. Dejstvo HBOT dovodi do vazokonstrikcije koja redukuje protok krvi, ali efektivna oksigenacija ćelija obezbeđena je i ako je protok oslabljen zbog visokog parcijalnog pritiska kiseonika. Parcijalni pritisak kiseonika u normalnim uslovima, pri udisanju vazduha uvek je viši od 100 mmHg, a tokom disanja u hiperbaričnim uslovima čistog kiseonika dostiže od 1 500 do 2 200 mmHg pri izlaganju pritisku od 2,2 do 2,8 atmosfere. U hiperbaričnim uslovima kiseonik se rastvara u krvi i telesnim tečnostima 20 puta više nego u normobaričnim uslovima<sup>7,8</sup>.

Savremena upotreba HBOT u kliničkoj praksi počela je 1965. godine i opisana je u radovima Churchill-Davidson i sar.<sup>9</sup> i Boerema i sar.<sup>10</sup>. Podvodno medicinsko društvo (UMS) formiralo je 1976. godine Hiperbarički kiseonički komitet sa zadatkom da svake druge godine objavljuje izveštaje prihvaćenih medicinskih stanja<sup>11</sup>.

## Urgentna stanja

Izvesno je da HBOT danas ima svoje mesto kao lek izbora u DB i BGE, zajedno sa drugim terapijskim postupcima u hitnim stanjima, gde se uz pomoć kiseonika u hiperbaričnim uslovima otklanja hipoksija tkiva i redukuju efekti vazdušne embolije uzrokovani gasnim mehurićima<sup>12</sup>. Kao lek izbora HBOT se primenjuje i u trovanjima ugljen-monoksidom, vodonik-sulfidom i cijanidima. Koliki je efekat hiperbaričnog kiseonika može se videti iz sledećeg: vreme poluraspada ugljen-monoksida udisanjem vazduha na nivou mora iznosi 5,3 sati, dok udisanjem 100% kiseonika, takođe na nivou mora, to vreme iznosi 1,3 sata, da bi udisanjem 100% kiseonika na pritisku do 3 apsolutne atmosfere (ata) bilo 23 minuta<sup>13-15</sup>. U urgentnim situacijama svaki gubitak vremena drastično smanjuje šanse za preživljavanje, a u daljem lečenju pruža mogućnosti za pojavu sekvela. I u veoma često kombinovanim trovanjima cijanidima i ugljen-monoksidom, preporučuje se HBOT kao dopuna u lečenju<sup>16</sup>.

Gasna gangrena predstavlja jednu od najčešćih indikacija za primenu HBOT. Kiseonik je, sam po sebi, bakteriostatican i baktericidan za anaerobne mikroorganizme iz roda *Clostridium* (C.). Od opisanih 150 sojeva, samo šest su izazivači gasne gangrene kod ljudi: *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. bifermensans*, *C. sporogenes*, *C. fallax* i *C. novyi*. Primena HBOT dovodi do inhibicije alfa toksina, dok na uništavanje bakterije ne utiče. Alfa toksin je glavni činičac u razvijanju nekrotizirajućeg miozitisa, odnosno destrukcije mišića. Mada HBOT ne isključuje hirurške procedure, niti antibiotsku terapiju, veoma je važan činičac sa dokazanim povoljnim učinkom<sup>17</sup>.

Danas listu akutnih (urgentnih) stanja preporučuju *Undersea and Hyperbaric Medical Society* (UHMS), koje je lider za pitanja ronjenja i hiperbarične medicine u SAD, i *American College of Hyperbaric Medicine* (ACHM): trovanja cijanidom i ugljen-monoksidom, arterijski gasni embolizam centralnog nervnog sistema (CNS), dekompresiona bolest, anemija uzrokovana velikim gubitkom krvi, nekrotizirajući fasciitis, gasna gangrena, kraš povrede i kompartment sindrom, periferna ishemija, uključujući kompartment sindrom, opekotine, ujed braon pauka i ponovno ušivanje otkinutih ekstremiteta.

Ovim spiskom navedene organizacije ne zatvaraju listu, već smatraju da ona može biti proširena. Zapravo, insistiraju da se lista dopuni kroz naučne studije i pozitivnu kliničku praksu.

U osnovi svih urgentnih stanja je šok koji predstavlja akutni, generalizovani poremećaj perfuzije tkiva. Smrt nastupa zbog nemogućnosti da se zadovolje metaboličke potrebe tkiva za kiseonikom i da se iz tkiva uklone toksične materije. Funkcija ćelija narušena je i to posebno na nivou mitohondrijskog aparata. S druge strane, upravo mitohondrije pasivnom difuzijom koriste 80% kiseonika, dok 20% koriste supcelularni organi (mikrozomi, nukleus, plazma membrana...). Uzimajući u obzir ovu činjenicu, mišljenja smo da se lista može proširiti.

Ratliff i sar.<sup>18</sup> ispitivali su karakterističnu leziju miokarda koja je patognomonična za hipovolemijski šok. Te

lezije imaju značajan udeo u nastanku srčane insuficijencije u šoku. Utvrdili su da lezije reaguju na hiperbaričnu oksigenaciju i da daju reverzibilan odgovor. Kosongov i sar.<sup>19</sup> dokazali su da se kod traumatskog šoka ranom primenom HBOT u postperfuzionom periodu postižu bolji rezultati. Barcal i sar.<sup>20</sup> još 1975. godine, na osnovu svojih ispitivanja bolesnika u kardiogenom šoku nakon akutnog infarkta miokarda, utvrdili su da tretman HBOT može imati sličan efekat kao što ima primena intraaortnog kontrapulzativnog balona<sup>18</sup>.

Akutna ishemija ekstremiteta dovodi do promena u mikrocirkulaciji, protoku i transportu materija, naročito zbog narušenog integriteta membrana intravaskularnog i ekstravaskularnog prostora i nastalog edema u ishemičnom mišiću. Upravo je studija Nylandera i sar.<sup>21</sup> iz 1985. godine pokazala značajnu redukciju postishemičnog i postoperativnog edema kod bolesnika tretiranih HBOT. Takav efekat se zadržavao 40 sati posle tretmana, pa je ponovljenim izlaganjem HBOT stimulisan aerobni metabolizam s posledičnim sniženjem nivoa aktivnosti fosforilaze, kao markera mišićnog oštećenja.

Mozak koristi 20–25% ukupno utrošenog kiseonika u ljudskom organizmu, zbog čega smetnje u cerebralnoj cirkulaciji ili u dotoku kiseonika vode ka hipoksiji, odnosno ishemiji. S obzirom na to da mozak ima najveće energetske potrebe, a nema mogućnost stvaranja rezervi kiseonika, niti formiranja kolateralnog krvotoka, to je veoma osetljiv organ i produžena ishemija dovodi do nepovratnog gubitka neurona. Kako je hiperbarični kiseonik najefikasniji supstrat za popravak hipoksije i ishemije, evidentno je da postoji opravdanost korišćenja HBOT kod svakog bolesnika sa povredom mozga<sup>22</sup>. Takođe, HBOT ima veoma značajnu ulogu kod cerebrovaskularnih poremećaja i traumatskih oštećenja mozga i akutnih povreda kičmene moždine<sup>23</sup>. Jedno je sigurno, a to je da HBOT daje dragocenu prednost u vremenu do primene drugih dijagnostičkih i terapijskih procedura kod akutnih povreda mozga i kičmene moždine<sup>24,25</sup>. To potvrđuju i kliničke studije koje su se bavile odnosom HBOT i traumatskih povreda mozga u kojima je nedvosmisleno pokazano da je smrtnost smanjena za 60%. Takođe, izlaganje bolesnika HBOT tokom 1,5 sati u trajanju od 5 do 7 dana nakon operacije, dovelo je do izrazitog poboljšanja cirkulacije i metaboličkih procesa u CNS<sup>26</sup>.

Na listu urgentnih indikacija za HBOT mogli bi biti uvršteni i: nagli gubitak sluha, zujanje u ušima, vrtoglavica, čiji uzrok je ishemija. Poznati su pozitivni rezultati lečenja iznenadnog gubitka sluha i zujanja kod vojnika nakon eksplozije ili pucnja, kada je prosečno 16 seansi tretmana, započetog odmah nakon traume, dovelo do izlečenja<sup>27</sup>.

Kod nas, HBOT se još uvek nije izborila za mesto u sastavu urgentnih službi kao rutinski postupak, ali u organizovanim urgentnim službama sveta tendencija je da jedinice sa hiperbaričnim komorama usko sarađuju sa trauma centrima i centrima za hitnu pomoć, gde su i fizički uz njih smeštene. Danas, Kina, Rusija i Japan imaju najveći broj komora u funkciji i te zemlje su najdalje otišle u njihovoj primeni i iskorišćenosti.

Vreme je da na isti način i mi razmotrimo mesto hiperbarične medicine i da prilikom zbrinjavanja raznih urgentnih stanja, hiperbarični centri preuzmu aktivnu ulogu u sklopu urgentnih i trauma centara, za šta ima puno opravdanja.

### Zaključak

Imajući u vidu mali broj kontraindikacija, primena HBOT od velike je koristi u zbrinjavanju urgentnih stanja, naročito u kombinaciji sa hirurškim i medikamentnim procedurama.

### L I T E R A T U R A

1. Oriani G, Marroni A, Wattel E, editors. Handbook on hyperbaric medicine. Berlin: Springer Verlag; 1996.
2. Gabb G, Robin ED. Hyperbaric oxygen. A therapy in search of diseases. Chest 1987; 92(6): 1074–82.
3. Mills J, Ho MT, Trunkey D. Emergency medicine. Beograd: Savremena administracija; 1985. (Serbian)
4. Vučović D. Emergency medicine. Beograd: Obeležja; 2002. (Serbian)
5. Gašović S. Handbook for professional and military diving. Split: Grafforna; 1997. (Croatian)
6. Gošović S. Safety diving. Split: Jumena; 1986. (Croatian)
7. Toubey JE, Davis JC, Workman WT. Hyperbaric oxygen therapy. Orthop Rev 1987; 16(11): 829–33.
8. Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E. Hyperbaric oxygen therapy. JAMA 1990; 263(16): 2216–20.
9. Churchill-Davidson I, Sanger C, Thomlinson RH. High-pressure oxygen and radiotherapy. Lancet 1955; 268(6874): 1091–5.
10. Boerema I, Huiskes JW, Kroll JA, Kroon B, Lokin E, Meyne NG. High atmospheric pressure as an aid to cardiac surgery. Arch Chir Neerl 1956; 8(3): 193–211.
11. The Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS), Hyperbaric Oxygen Therapy Committee. Guidelines: Indications for Hyperbaric Oxygen. Kensington: UHMS; 2000.
12. Edmonds C, Lowery C, Pennefather J. Diving and subaquatic medicine. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd; 1994.
13. End E, Long CW. Oxygen under pressure in carbon monoxide poisoning. J Ind Hyg Toxicol. 1942; 24: 302–6.
14. Pace N, Strajman E, Walker EL. Acceleration of carbon monoxide elimination in man by high pressure oxygen. Science 1950; 111(2894): 652–4.
15. Britten JS, Myers RA. Effects of hyperbaric treatment on carbon monoxide elimination in humans. Undersea Biomed Res 1985; 12(4): 431–8.
16. Hill GB, Osterhout S. Experimental effects of hyperbaric oxygen on selected clostridial species. II. In-vitro studies in mice. J Infect Dis 1972; 125(1): 26–35.
17. Brummelkamp WH, Hoogendijck J, Boerema I. Treatment of anaerobic infections (clostridial myositis) by drenching tissues with oxygen under high atmospheric pressure. Surgery 1961; 49: 299–302.
18. Ratliff NB, Hackel DB, Mikat E. The effect of hyperbaric oxygen on the myocardial lesions of hemorrhagic shock in dogs. Am J Pathol 1967; 51(3): 341–9.
19. Kosonogov LF, Leonov LN, Shapovalova NV, Rodionov VN, Magomedov AG. Extracorporeal perfusion and hyperbaric oxygenation in the treatment of severe traumatic shock. Anesteziol Reanimatol 1978; (6): 24–9. (Russian)
20. Barcal R, Emmerova M, Sova J, Topinka I, Hadravský M. Hyperbaric oxygen therapy of cardiogenic shock in acute stage of myocardial infarction. Cas Lek Cesk 1975; 114: 259–62. (Czech)
21. Nylander G, Lewis D, Nordström H, Larsson J. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. Plast Reconstr Surg 1985; 76(4): 596–603.
22. Helms AK, Whelan HT, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis 2005; 20(6): 417–26.
23. Zhang JH, Lo T, Mychaskiw G, Colohan A. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. Pathophysiology 2005; 12(1): 63–77.
24. Jain KK. Textbook of hyperbaric medicine. Seattle: Hogrefe&Huber; 2004.
25. Dekleva N. Hyperbaric medicine. Užice: Lapčević; 1997. (Serbian)
26. Rockswold GL, Ford SE, Anderson DC, Bergman TA, Sherman RE. Results of a prospective randomized trial for treatment of severely brain-injured patients with hyperbaric oxygen. J Neurosurg 1992; 76(6): 929–34.
27. Živković M, editor. Hyperbaric and subaquatic medicine. Beograd: Nauka; 1977. (Serbian)

Rad je primljen 1. IV 2008.



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **IMPACT OF THE HYPERBARIC OXYGEN THERAPY ON THE REDOX STATUS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

**UTICAJ HIPERBARIČNE OKSIGENOTERAPIJE NA REDOKS STATUS PACIJENATA SA SISTEMSKIM ERITEMSKIM LUPUSOM**

Authors: **Milorad Rabrenović\***, **Tamara Nikolić†**, **Violeta Rabrenović‡ 2**, **Jovana Bradic†**, **Saša Trešnjić\***, **Anica Petković†**, **Biljana Jakovljević §**, **Siniša Mašić§**, **Dubravko Bokonjić ||**; *Vojnosanitetski pregled* (2017); Online First September, 2017.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP170110106R>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

## **IMPACT OF THE HYPERBARIC OXYGEN THERAPY ON THE REDOX STATUS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

### **UTICAJ HIPERBARIČNE OKSIGENOTERAPIJE NA REDOKS STATUS PACIJENATA SA SISTEMSKIM ERITEMSKIM LUPUSOM**

Milorad Rabrenović\*, Tamara Nikolić†, Violeta Rabrenović‡<sup>2</sup>, Jovana Bradic†, Saša Trešnjic\*, Anica Petkovic†, Biljana Jakovljević §, Siniša Mašić§, Dubravko Bokonjić ||. Center of Hyperbaric Medicine\*, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, Department of Pharmacy†, Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. Clinic of nephrology‡, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia Institute of Hygiene §, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia Centre for Poisoning Control ||, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia Faculty of Medicine<sup>2</sup>, Military Medical Academy, University of Defense, Belgrade, Serbia.

### **UTICAJ HIPERBARIČNE OKSIGENOTERAPIJE NA REDOKS RAVNOTEŽU PACIJENATA SA SISTEMSKIM LUPUSOM ERITEMATOZUSOM**

Milorad Rabrenović\*, Tamara Nikolić†, Violeta Rabrenović‡<sup>2</sup>, Jovana Bradic†, Saša Trešnjic\*, Anica Petkovic†, Biljana Jakovljević §, Siniša Mašić§, Dubravko Bokonjić ||. Correspondence to: **Rabrenović Milorad, Centar za hiperbaričnu medicinu, Vojnomedicinska Akademija, Beograd, Srbija**  
**E mail: milorad.rabrenovic@vma.mod.gov.rs**

## Sažetak

**Uvod/Cilj:** Hiperbarična oksigenoterapija (HBOT) je metoda kojom se rastvorljivost kiseonika u plazmi povećava i do 20 puta. Taj efekat je veoma značajan u terapiji poremećaja cirkulacije koji smanjuju oksigenaciju i dovode do povećanja produkcije medijatora zapaljenja i slobodnih kiseoničkih radikala. Cilj ove studije bio je ispitati uticaj HBOT na parametre oksidativnog stresa kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE).

**Metode:** Prospektivnom studijom obuhvaćeno je 18 pacijentkinja sa SLE (ACR kriterijumi) prosečne starosti  $52,2 \pm 8,82$  godina, koje su tretirane HBOT u trajanju od 60 min/dan, pri pritisku od 2,2 apsolutne atmosfere (ATA), ukupno 10 dana, u kombinaciji sa odgovarajućom terapijom za SLE. U serumu su određivani sledeći parametri: C-reaktivni protein (CRP), hemoglobin, kreatinin, albumin, komplement 3 (C3), antinuklearna antitela (ANA), stopa glomerularne filtracije (GFR korišćenjem CKD-EPI formule). U urinu spektrofotometrijski su određivani parametri oksidacionog stresa: nivo superoksid anjon radikala ( $O_2^-$ ), vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), nitrita ( $NO_2^-$ ) i koncentracija reaktivnih produkata tiobarbituratne kiseline (TBARS). U hemolizatu, određivani su parametri antioksidativne zaštite: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i redukovani glutation (GSH). Uzorci za analize su sakupljeni 3 puta: pre HBOT (inicijalne vrednosti), nakon 10 dana HBOT i nakon mesec dana terapije.

**Rezultati:** Uočili smo statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje nivoa  $O_2^-$  nakon 10 dana, kao i nakon mesec dana od HBOT ( $11,92 \pm 6,86$ ;  $8,26 \pm 13,62$ ;  $8,39 \pm 4,94$  nmol/ml). Nisu pokazane značajne razlike u vrednostima ostalih parametara oksidativnog stresa kao što su  $NO_2^-$ , TBARS i  $H_2O_2$  tokom posmatranog perioda. Što se tiče parametara antioksidativne zaštite, otkrili smo nešto veću vrednost GSH nakon tretmana ( $66,34 \pm 16,31$ ;  $79,43 \pm 36,77$ ;  $69,72 \pm 22,32$   $\mu$ mol/ml eritrocita), koja se održala nakon mesec dana, ali nije bila statistički značajna. Aktivnost SOD i CAT, pre i posle HBOT, nije se statistički značajno menjala.

**Zaključak:** Naši rezultati ukazuju na povoljan efekat HBOT na redoks ravnotežu kod bolesnika sa SLE sniženjem nivoa  $O_2^-$ .

**Glavne reči:** sistemski eritemski lupus, hiperbarična oksigenoterapija, redoks status

## Abstract

**Introduction/Aim:** Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a method which increases oxygen solubility in plasma up to 20 times. This effect is very important in the treatment of circulatory disorders, which reduces oxygenation and leads to increased production of inflammatory mediators and free oxygen radicals. The aim of this study was to examine the impact of HBOT on oxidative stress parameters in patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

**Methods:** This prospective study included 18 females with SLE (ACR criteria), average age  $52.2 \pm 8.82$  years, treated with HBOT for 60 minutes/day, with average partial oxygen pressure of 2.2 atmospheres absolute (ATA), during 10 days, in combination with appropriate medication therapy for SLE. In serum the following parameters were determined: C-reactive protein (CRP), hemoglobin, creatinine, albumin, complement 3 (C3), antinuclear antibodies (ANA), glomerular filtration rate (GFR using the CKD-EPI formula). In the urine parameters of oxidative stress were spectrophotometrically determined: levels of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitrites ( $NO_2^-$ ) and concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In hemolysate, parameters of antioxidant protection were measured: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH). Samples for analysis were collected three times: before HBOT (initial values), after 10 days of HBOT and after 1 month.

**Results:** We noticed statistically significant ( $p < 0,05$ ) decrease in level of  $O_2^-$ , both after 10 days of HBOT and after one month ( $11.92 \pm 6.86$ ;  $8.26 \pm 13.62$ ;  $8.39 \pm 4.94$  nmol/ml). Values of other parameters of oxidative stress such as  $NO_2^-$ , TBARS and  $H_2O_2^-$  showed no significant difference during the monitored period. Regarding the parameters of antioxidant protection, we revealed slightly higher value of GSH after treatment ( $66.34 \pm 16.31$ ;  $79.43 \pm 36.77$ ;  $69.72 \pm 22.32$   $\mu$ mol/ml RBCs) which was held after a month, but it was not statistically significant. Activity of SOD and CAT, before and after HBOT, did not change significantly.

**Conclusion:** Our results suggested potential beneficial effects of HBOT on redox status in patients with SLE by decreasing levels of  $O_2^-$ .

**Key words:** systemic lupus erythematosus, hyperbaric oxygen treatment, redox status



## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a very serious autoimmune inflammatory disease, with an unpredictable course and outcome, whose etiology remains largely unknown and the effects of conservative treatment are limited<sup>1</sup>. Human and animal studies indicate that oxidative stress is involved in the pathogenesis of SLE. Excessive production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), including peroxynitrite-  $\text{ONOO}^-$ , can damage lipids, proteins and DNA and products of oxidative modification can be detected in biological fluids<sup>2</sup>. The abundance of those products correlates with disease activity in SLE patients, suggesting oxidative modification acts as biomarkers<sup>3-5</sup>. While several studies implicate nitric oxide as an important mediator of disease in SLE<sup>6,7</sup>, there is a lack of data revealing the association between level of urine nitrite and citrulline levels, as surrogate markers of nitrogen monoxide (NO) production, among patients with systemic lupus erythematosus and disease activity<sup>8</sup>. Also, previous data suggested that lipid peroxidation could be a risk factor for endothelial dysfunction in some autoimmune diseases<sup>9</sup>.

Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a treatment modality in which a person breathes 100%  $\text{O}_2$  intermittently while exposed to increased atmospheric pressure, greater than 1 atmosphere, usually 2 to 2.5 atmospheres absolute (ATA)<sup>10</sup>. Primary mechanisms of action include hyperoxygenation and a decrease in bubble size, or vasoconstriction, angiogenesis, fibroblast proliferation, oxidative leukocyte degradation, toxin inhibition and antibiotic synergy<sup>11,12</sup>. Hyperbaric oxygen may be used as the primary therapy intervention in some conditions, such as carbon monoxide poisoning, decompression sickness and arterial gas embolism, arterial insufficiencies, cardiovascular diseases, osteomyelitis and as an adjunctive therapy for wound healing<sup>13-15</sup>. HBOT has shown beneficial effects in hypoxic diabetic ulcers that result in severe wound-healing problems and osteoradionecrosis, and is frequently used for necrotic soft tissues and bone that fails to heal. HBOT also induces significant angiogenesis, which in one study was measurable after eight HBOT sessions. Previous clinical studies revealed that vasculitis skin ulcers in patient suffering from SLE has been treated successfully with HBOT<sup>16-18</sup>. There are not many studies that examined effects of HBO treatment on redox homeostasis and inflammation in patients with SLE.

Given the fact that HBOT can modify oxidation-reduction reactions, the aim of our study is to establish an influence of hyperbaric oxygenation on oxidative stress parameters and antioxidant enzymes in patients with SLE.

## **Participants and Methods**

This prospective study included 18 females with SLE, treated with hyperbaric oxygenation therapy once a day for 60 minutes (total 10 days) with average partial oxygen pressure of 2.2 ATA, in combination with appropriate therapy for SLE. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (Faculty of Medicine of the Military Medical Academy, University of Defence Studies, Belgrade, Serbia) and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All the participants were informed about the research protocol before giving their written consent to participate in the study.

All patients were admitted to Military Medical Academy, Belgrade, Serbia from October 2011 to December 2014, providing that they fulfilled inclusion criteria: a diagnosis of SLE. In order to define severity of the disease course in this study the original 1997 ACR classification of SLE was used<sup>18,19</sup>. All participants were in similar stage of disease, in remission (SLEDAI Score  $0,30 \pm 0,47$ ), at the beginning of study. The exclusion criteria were: pregnant women with SLE, patients with urinary infection (positive urine culture), with renal insufficiency-creatinine clearance  $<60$  ml/min, the presence of malignancy, patients with any other ongoing inflammatory process, or under 18 years of age. Patients who were on immunosuppressive therapy such as mycophenolate mofetil, cyclophosphamide and other cytotoxic agents, were excluded. The only therapy, that the patients have taken, was the corticosteroids-the maintenance dose of 5mg.

All patients with any contraindication for HBOT were also excluded. All participants were non-smokers and did not take any antioxidant dietary supplement for 1 month before the study. Before beginning the HBOT, all participants passed a standard medical and physical revision at the hospital. During the study period there were no eliminated patients.

### *Hyperbaric oxygen therapy (HBOT)*

HBOT was performed at The Center for Hyperbaric Medicine, Military Medical Academy in Belgrade, Serbia. HBOT treatment consisted of 10 sessions (1 session a day/5 days a week) in a multiplace (10-person) hyperbaric chamber. In total 60 min of 100% medical oxygen was administered to patients under increased pressure of 2.2 atmospheres absolute (ATA) during a 70-min hyperbaric session. At this pressure, 100% oxygen was delivered via an oronasal mask in two episodes of 30 min, each interrupted by 5 min of air breathing. During pressure changes, great care was taken to avoid barotraumas, particularly of the middle ear, which is the most common side-effect of a hyperbaric treatment. All patients tolerated the treatment well without any complications.

### *Biochemical analysis*

Samples for biochemical analysis were collected three times: before HBOT (initial values), after 10 days of HBOT (2 hours after last HBOT session) and after 1 month. The following parameters were determined in blood serum samples: C-reactive protein (CRP), hemoglobin (Hb), creatinine, albumin, complement 3 (C3), antinuclear antibodies (ANA), glomerular filtration rate (GFR using the CKD-EPI formula). In the urine samples, following parameters of redox status were spectrophotometrically determined: levels of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitrites ( $NO_2^-$ ) and concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Parameters of antioxidant protection were measured in blood samples: activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and level of reduced glutathione (GSH).

### *Superoxide anion radical determination ( $O_2^-$ )*

The level of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) was measured using nitro blue tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer combined with urine samples and read at 530 nm<sup>20</sup>.

### *Hydrogen peroxide determination ( $H_2O_2$ )*

The protocol for measurement of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase<sup>21</sup>. 200  $\mu$ l sample with 800  $\mu$ l PRS

(phenol red solution) and 10  $\mu$ l POD (Horseradish Peroxidase) were combined (1:20). The level of  $H_2O_2$  was measured at 610 nm.

#### *Nitric oxide determination ( $NO_2^-$ )*

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. Nitrite ( $NO_2^-$ ) was determined as an index of nitric oxide production with Griess reagent<sup>22</sup>. 0.1 ml 3 N PCA (Perchloride acid), 0.4 ml 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.2 ml urine were put on ice for 15 min, then centrifuged 15 min at 6,000 rpm. After pouring off the supernatant, 220  $\mu$ l  $K_2CO_3$  was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

#### *Determination of concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

The degree of lipid peroxidation in urine was estimated by measuring concentration of TBARS using 1 % TBA (thiobarbituric acid) in 0.05 NaOH, incubated with urine at 100  $^{\circ}C$  for 15 min and read at 530 nm. Distilled water was used as a blank probe. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml urine and 0.4 ml trichloro-acetic acid (TCA), than samples were put on ice for 10 min, and centrifuged for 15 min at 6,000 rpm. This method was described previously<sup>23</sup>.

#### *Preparation of hemolysate*

Blood samples were taken from an antecubital vein into vacutainer test tube containing sodium citrate anticoagulant. Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs). Isolated RBCs were washed 3 times with 3 vol. of ice cold 0.9 mmol/l NaCl. Blood samples were stored immediately and kept for further analyses<sup>24</sup>.

#### *Determination of antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD)*

Hemolysates containing about 50 g Hb/l prepared according to *McCord and Fridovich*<sup>24</sup> were used for the determination of CAT activity which was expressed in U/gHb x 1000. CAT activity was determined according to Beutler<sup>25</sup>. Lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove hemoglobin. Then 50  $\mu$ l CAT buffer, 100  $\mu$ l sample, and 1 ml 10 mM  $H_2O_2$  were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. Distilled water was used as a blank probe.

SOD activity was determined by the epinephrine method of Misra and Fridovich<sup>26</sup> and it was expressed in U/gHb x 1000. A hundred µl lysate and 1 ml carbonate buffer were mixed, and then 100 µl of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm.

#### *Determination of reduced glutathione (GSH)*

Level of reduced glutathione (GSH) was determined spectrophotometrically, and it is based on GSH oxidation via 5,5-dithiobis-6,2-nitrobenzoic acid. GSH extract was obtained by combining 0.1 ml 0.1 % EDTA, 400 µl haemolysate, and 750 µl precipitation solution (containing 1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, and filled with distilled water until 100 ml; the solution is stable for 3 weeks at +4C°). After mixing in the vortex machine and extraction on cold ice (15 min), it was centrifuged on 4000 rpm (10 min). Distilled water was used as a blank probe. Measuring was performed at 420 nm. The concentration is expressed as micromoles per milliliter of red blood cells (RBCs).<sup>25, 27</sup>

#### *Statistical analyzes*

In case of continuous data, variables were presented as mean value ± standard deviation (SD). Kolmogorov-Smirnov test was used for evaluation of distribution of biochemical data. Statistical significance between groups was tested by Friedman (repeated measure) test (*post hoc* Wilcoxon test). All the analyses were estimated at p<0.05 level of statistical significance. Complete statistical analysis of data was done with the statistical software package, SPSS Statistics 18.

#### **Results**

A total of 18 woman, the average age 52.22 ±8.82 years, enrolled in the study. The patients presented SLE with an average time without symptoms of healing of 20.2±5.0 months when they underwent the HBOT.

The values of the serum parameters such as C-reactive protein(CRP), hemoglobin (Hb), creatinine, albumin, complement 3 (C3); antinuclear antibody (ANA), chronic kidney disease estimated glomerular filtration rate(CKD eGFR), were not statistically significantly different when compared initial values, values after 10 days and after a month of therapy (Table 1).

#### *Levels of Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)*

We noticed statistically significant decreased ( $p < 0.05$ ) levels of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) after 30 days HBOT compared to initial values of this parameter, and significantly decreased values after 10 days of HBOT compared to initial values ( $11.92 \pm 6.86$ ,  $8.26 \pm 13.6$ ,  $8.39 \pm 4.94$  nmol/ml) (Fig. 1).

#### *Levels of Nitrites ( $NO_2^-$ )*

Levels of nitrites ( $NO_2^-$ ) before and after HBOT therapy were similar ( $2.72 \pm 0.16$ ,  $2.77 \pm 0.29$ ,  $2.76 \pm 0.20$  nmol/ml). We found that this parameter was not significantly affected with HBOT when comparing initial values to values after 10 days of HBOT and after one month (Fig. 2).

#### *Levels of Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )*

During the observed period of HBOT, there were no statistically significant changes of  $H_2O_2$  levels when compared the initial values, values after 10 days and after one month of HBOT. This parameter was not changed in the group during the study ( $1.52 \pm 0.08$ ,  $1.51 \pm 0.07$ ,  $1.54 \pm 0.17$  nmol/ml) (Fig. 3).

#### *Concentration of TBARS*

Among the examined groups, TBARS concentration was not significantly altered after HBOT treatment and after a month ( $1.01 \pm 0.11$ ;  $1.09 \pm 0.11$ ;  $1.05 \pm 0.96$   $\mu$ mol/ml) (Fig. 4).

#### *Activity of superoxide dismutase (SOD)*

In the study group, we noticed a decreased activity of SOD after HBOT when compared initial value to value after 10 days of therapy ( $27.58 \pm 8.86$  to  $19.47 \pm 10.63$  after HBOT). However, a month after, values were similar to those from the beginning of the study protocol and the activity was  $27.11 \pm 28.26$ . Those changes were without statistical significance (Fig. 5).

#### *Level of reduced glutathione (GSH)*

Level of reduced glutathione (GSH) was not statistically significant increased in our group (initially  $66.34 \pm 16.31$  to  $79.43 \pm 36.77$  after HBOT treatment). However, a month

after values were similar to those from the beginning of the study protocol and the activity was  $69.72 \pm 22.32$  (Fig. 6).

#### *Activity of catalase (CAT)*

We observed a decrease in the activity of catalase (CAT) after 10 days of HBOT compared to the initial value ( $5.44 \pm 3.55$  to  $4.77 \pm 2.93$ ), and it continued to decrease, so after a month it was lower than before HBOT and after 10 days of HBOT ( $3.82 \pm 2.49$ ). However those differences were not statistically significant (Fig. 7).

### **Discussion**

This study was designed in the field of physiology research of hyperbaric oxygenation with special emphasis on potential systemic effects of disturbed redox balance, induced by systemic disease before and after the application of oxygen. Actually, hyperbaric oxygen therapy (HBOT) leads to an increase in the amount of dissolved oxygen in the plasma, creating a diffusion gradient which facilitates the transition of oxygen from the capillaries to the ischemic tissues<sup>17</sup>. Studies reported controversial results regarding the effect of HBOT on oxidative stress and enzymes of antioxidative defense in several pathophysiological models. The role of ROS and RNS in therapeutic responses of HBOT in patients with SLE has still not been completely revealed and explained<sup>28-31</sup>.

Immune dysfunction, genetic, hormonal and environmental factors are included in an etiology of SLE, however molecular mechanisms underlying this systemic autoimmune response remain largely unknown<sup>31,32</sup>. It's believed that oxidative stress has an important role in the pathogenesis of SLE. Excessive production of ROS (including ONOO<sup>-</sup>) can damage all biomolecules such as lipid, protein and DNA and cause a formation of different products which can be detected in biological fluids<sup>2-5</sup>. In case of patients with SLE, this fact can be useful since their abundance correlates with disease activity and organ damage<sup>3</sup>. Our study included patients with SLE in whom the disease was in remission, which was maintained before and after HBOT was performed. Comparing laboratory parameters (CRP, hemoglobin, creatinine, albumin, complement C3, ANA) before and after the performed therapy, as well as after a month, we did not notice statistically significant differences in values. We examined the effects of 10 session of HBOT on parameters of redox balance in patients with SLE. We found statistically significant decreased levels of

$O_2^-$  after HBOT, which were held after 30 days. There is a concern that HBOT might increase oxidative stress via the production of reactive oxygen species, however oxidative stress appears to be less of a concern at hyperbaric pressures under 2.0 ATA<sup>33</sup>. Patients in our study were exposed to the higher pressure such as 2.2 ATA and we revealed the beneficial effects of hyperbaric oxygen on  $O_2^-$  levels. On the other hand, other pro-oxidants, such as  $NO_2^-$ , TBARS and  $H_2O_2$  were not affected by HBOT. In order to validate our results, we excluded all patients with renal disease or urinary infection, because oxidative stress parameters may have not been removed from plasma because of insufficient excretion and may continue to rediffuse in circulation<sup>30-33</sup>. So, because of this fact, we could not be sure in unchanged levels of oxidative markers.

Literature data regarding the effects of HBOT on SLE treatment is limited, and it is hard to compare our results to the others due to the fact that available researches were mostly focused on the effects of HBOT on ulcers healing. One of a few studies which examined the effects of HBOT in a SLE patient was a case report conducted by *Olivieri et al*<sup>17</sup>. They described a SLE patient with a case of refractory vasculitic ulcer responding to hyperbaric oxygen (HBO), which was used in combination with immunosuppressive therapy. *Jou* and coworkers<sup>35</sup> reported their experience with the use of hyperbaric oxygen for the treatment of intractable hemorrhagic cystitis in an SLE patient treated with cyclophosphamide. They concluded that this treatment was very successful, with no recurrent hematuria after hyperbaric oxygen therapy during 6 months<sup>35</sup>. *S. Efrat et al*<sup>16</sup> reported that HBOT may serve as an effective safe treatment for patients with vasculitis having nonhealing skin ulcers, which is in agreement with the results of previously mentioned authors and with ours regarding safety of HBOT. Increase in tissue oxygenation appeared to be one of the major components responsible for the high cure rates in patients with ulcers<sup>16,17</sup>.

In order to complete our picture about influence of HBOT on redox status, we examined activity of antioxidant enzyme system. GSH is an important endogenous antioxidant and prime scavenger of free radicals in cells. One of the body's most powerful natural antioxidant enzymes are superoxide dismutase and catalase. Superoxide dismutase, essential to catalyze the dismutation of superoxide, has been shown to protect cells from oxygen free radicals. Exposure to ROS from a variety of sources led to develop a series of defence mechanisms to neutralize these species and so protect cells against their toxic



effects and that protection is achieved mainly by enzymatic antioxidants such as catalase. Some of the research concludes that hyperbaric oxygen treatment below 2.0 ATA can increase the activity of antioxidant enzymes including SOD, reduced glutathione and catalase<sup>36-40</sup>.

Regarding component of antioxidant defense including SOD, GSH, CAT we observed that levels of GSH were higher (but without statistical significance) after 10 days exposed to hyperbaric oxygen treatment and month later too.

We believe that these beneficial results in regard to levels of  $O_2^-$  and GSH after HBOT imply to possibility that the study with larger number of patients or changes of number of treatments could have results which would be statistically significant for these parameters. That refers on results noticed for SOD and CAT.

Activities of SOD and CAT were affected by HBOT but not statistically significantly. We have noticed that activity of SOD decreased after 10 days, but returned to the initial level after 30 days, and level of CAT decreased after a month compared to the initial value and value after 10 days of HBOT. However, these changes were not statistically significant. Considering that differences in the activity of SOD and CAT between peroxide initial level and level after HBOT were insignificant, we have not observed any significant influence on pro-oxidants such as hydrogen, showed insignificant difference.

We believe that the smaller number of patients participated in our study has influenced on our results. The assumption is that the future studies with different design (larger number of patients, more treatments, additional analysis etc.) could clarify the fact that we have not got correlation between decreased level of  $O_2^-$  (statistically significant in our study) and increased values of antioxidant protection parameters (GSH not statistically significant in our study).

We decided to treat SLE patients with HBOT not only because it improves the oxygenation of ischemic tissues and exerts beneficial effects on vascular inflammatory response by regulating the chemotaxis of leukocytes, but also because it facilitates the healing process of infected wounds promoting the deposition of collagen, angiogenesis, epithelialization and facilitating the oxygen-dependent killing by leukocytes<sup>16-18</sup>. Previous studies suggested that vasculitis skin ulcers in patient suffering from SLE had been treated successfully with HBOT<sup>17</sup>.

Given the fact that HBOT can modify oxidation-reduction reactions and because of mentioned beneficial effects of HBOT in different tissues in patients with SLE, this protocol of therapy can be one of the possibility.

## **Conclusion**

Our results highlighted some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen treatment on redox balance among patients suffering from systemic lupus erythematosus. However, management of systemic lupus erythematosus (SLE) is complex and more research is required to establish the complete mechanism by which HBOT can modify oxidation-reduction reactions in patients with SLE so it can become a additional potential therapeutic strategy in treatment of SLE.

## **REFERENCES**

1. Adinolfi A, Valentini E, Calabresi E, Tesei G, Signorini V, Barsotti S et al. One year in review 2016:systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34(4):569-74.
2. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2014;21(1):23.
3. Mansour RB, Lassoued S, Gargouri B, El Gaïd A, Attia H, Fakhfakh F. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2008;37(2):103-8.
4. Avalos I, Chung CP, Oeser A, Milne GL, Morrow JD, Gebretsadik T et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. *Lupus* 2007;16(3):195-200.
5. Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett* 2010;129(1):7-12.
6. Gilkeson G, Cannon C, Oates J, Reilly C, Goldman D, Petri M. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *JRheumatol* 1999;26(2):318-24.

7. Oates JC, Shaftman SR, Self SE, Gilkeson GS. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008;58(1):263-72.
8. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Sakhuja V, Thennarasu K, Sud A et al. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a possible addition to activity parameters? *J Clin Rheumatol* 2001; 7(1):10-5.
9. Stanisavljevic N, Stojanovich L, et al. Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients. *Clin Rheumatol*. 2016;35(10):2485-93
10. Kumar MA, Radhika B, Gollamudi N, Reddy SP, Yaga US. Hyperbaric Oxygen Therapy-A Novel Treatment Modality in Oral Submucous Fibrosis: A Review. *J Clin Diagn Res* 2015;9(5):ZE01-4.
11. Bhutani S, Vishwanath G. Hyperbaric oxygen and wound healing. *Indian J Plast Surg* 2012;45(2):316-24.
12. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* 2014;41(3):247-52.
13. Boykin JV Jr, Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care* 2007;20(7):382-8.
14. Health Quality Ontario. Hyperbaric oxygen therapy for non-healing ulcers in diabetes mellitus: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser* 2005;5(11):1-28.
15. Rabrenović M, Matunović R, Rabrenović V, Zoranović U. Hiperbarična medicina – mogućnosti i dileme. *Vojnosanit. Pregl* 2008; 65(3): 235-8.
16. Efrati S, Bergan J, Fishlev G, Tishler M, Golik A, Gall N. Hyperbaric oxygen therapy for nonhealing vasculitic ulcers. *Clin Exp Dermatol* 2007;32(1):12-7.
17. Olivieri AN, Mellos A, Duilio C, Di Meglio M, Mauro A, Perrone L. Refractory vasculitic ulcer of the toe in an adolescent suffering from systemic lupus erythematosus treated successfully with hyperbaric oxygen therapy. *ItalJPediatr* 2010;36:72.

18. Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. *Arthritis Rheum* 1999;42(9):1785-96.
19. Tunncliffe DJ, Singh-Grewal D, Kim S, Craig JC, Tong A. Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015;67(10):1440-52.
20. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton; 1985. p. 123–32.
21. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161–70.
22. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-8.
23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
24. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244(22):6056–63.
25. Beutler E. Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York; 1982. p. 105–6.
26. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170–5.
27. Beutler E. Reduced glutathione (GSH) In: Beutler E, editor. *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. New York, NY, USA: Grune and Stratton; 1975. p. 112–114.
28. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009;106(3):988-95.

29. Gošović S. Temelji vojnobrodsk e i podvodne medicine sa zaštitom dišnog sustava. Medicinska naklada Split 2000; 142-4.
30. Allen R, Balin A. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 631–61.
31. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutation Res* 1999; 428: 83–9.
32. Aringer M, Schneider M. Management of systemic lupus erythematosus. *Internist (Berl)* 2016; 57(11):1052-9.
33. Crow MK. Etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR et al, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2013; chap 79.
34. Yatsuzuka H. Effects of hyperbaric oxygen therapy on ischemic brain injury in dogs. *Masui* 1991;40(2):208–23.
35. Jou YC, Lien FC, Cheng MC, Shen CH, Lin CT, Chen PC. Hyperbaric oxygen therapy for cyclophosphamide-induced intractable refractory hemorrhagic cystitis in a systemic lupus erythematosus patient. *J Chin Med Assoc* 2008;71(4):218-20.
36. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med* 2004;203(4):253–65.
37. Yasar M, Yildiz S, Mas R, Dundar K, Yildirim A, Korkmaz A et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003;52(1):111-6.
38. Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(6):1637–43.
39. Gulec B, Yasar M, Yildiz S, Oter S, Akay C, Deveci S et al. Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res* 2004;53(5):493–9.
40. Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA. Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* 2001;86(1):24–7.

Table 1-Comparison of selected laboratory parameters - the initial value, value after 10 days and after a month.

Laboratory parameters in serum	Initial ( X± SD)	10.days (X ± SD)	30.days (X± SD)
CRP (mg/l)	5,16 ± 5,7	4,93 ± 6,06 <sup>ns</sup>	3,26 ± 2,25 <sup>ns</sup>
Hb (g/L)	129,3 ± 10,27	131,00 ± 12,51 <sup>ns</sup>	129,44 ± 14,13 <sup>ns</sup>
Creatinine (mmol/l)	72,00 ± 22,84	78,55 ± 26,09 <sup>ns</sup>	74,55 ± 23,55 <sup>ns</sup>
Albumin (g/l)	42,33 ± 2,95	40,66 ± 2,50 <sup>ns</sup>	42,33 ± 2,95 <sup>ns</sup>
C3 (g/l)	1,05 ± 0,23	1,05 ± 0,29 <sup>ns</sup>	1,03 ± 0,25 <sup>ns</sup>
ANA ( IU/ml)	1,11 ± 1,16	1,44 ± 1,33 <sup>ns</sup>	1,00 ± 1,11 <sup>ns</sup>
CKDeGFR (mil/min/1,73m <sup>2</sup> )	89,00 ± 22,46	84,33 ± 19,53 <sup>ns</sup>	87,44 ± 20,91 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> non significant differences in comparison to initial values

C -reactive protein(CRP), hemoglobin (Hb), complement 3 (C3); antinuclear antibody (ANA), chronic kidney disease estimated glomerular filtration rate (CKD eGFR).

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Level of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) in urine samples (values are presented as mean and SD). Statistical significances are presented as significance between values after 10 days vs. initial values and after 30 days HBOT vs. initial values (\* $p < 0.05$ ).

**Fig. 2.** Levels of nitrites ( $NO_2^-$ ) in urine samples (values are presented as mean and SD). There was no significant difference before and after HBOT.

**Fig. 3.** Levels of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in urine samples (values are presented as mean and SD). There were no significant differences before and after HBOT.

**Fig. 4.** Concentration of TBARS in our groups in urine samples (values are presented as mean and SD). There were no significant differences before and after HBOT.

**Fig. 5.** Activity of superoxide dismutase (SOD) in blood samples values are presented as mean and SD). Comparing the initial value of SOD and SOD after HBOT treatment, it was observed decrease in the level but without significant difference. After 30 days activity of SOD is similar to the initial values.

**Fig. 6.** Level of reduced glutathione (GSH) in our group in hemolysate samples (values are presented as mean and SD). Comparing the values of GSH (initially and after HBOT treatment) there were no statistically significant differences.

**Fig. 7.** Activity of catalase (CAT) in hemolysate samples (values are presented as mean and SD). Comparing initial values, after HBOT treatment (10 days), and values after 30 days, there was no statistically significant differences.

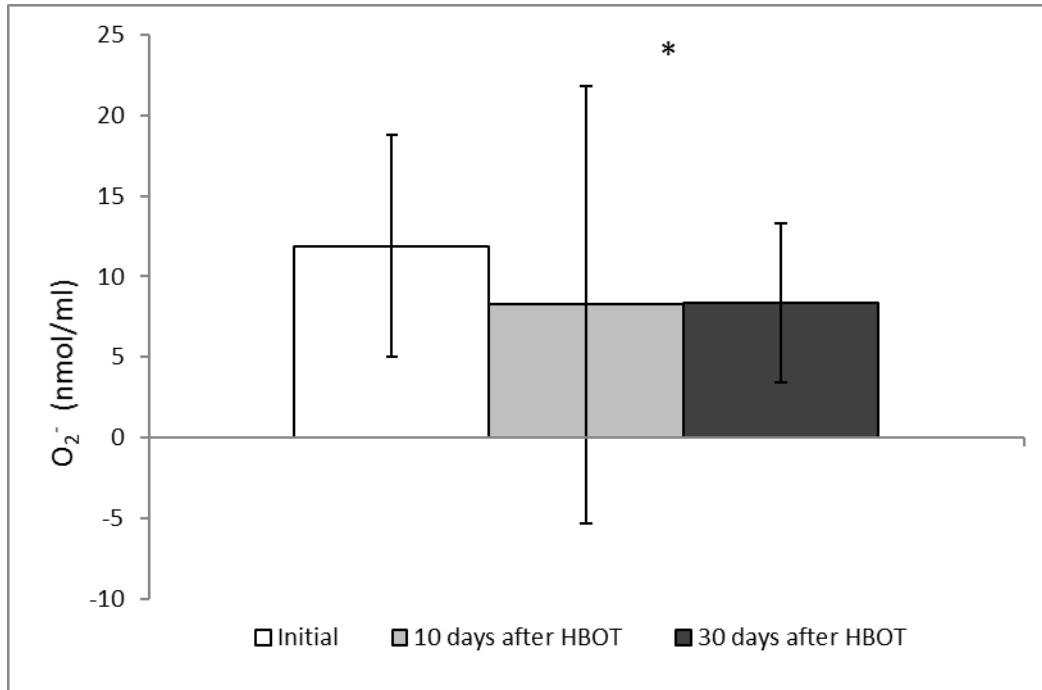


Figure 1.

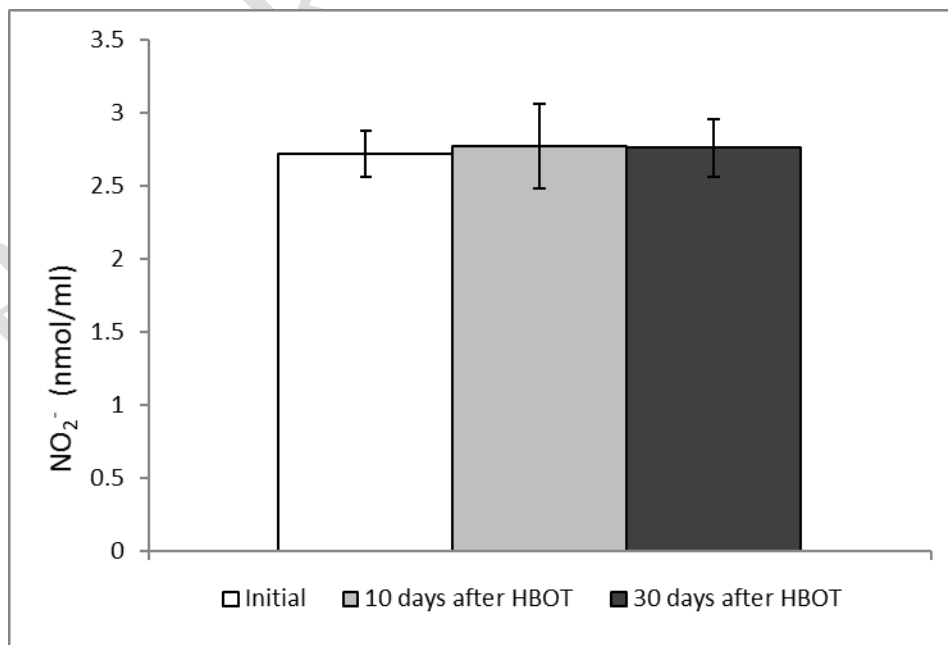


Figure 2.



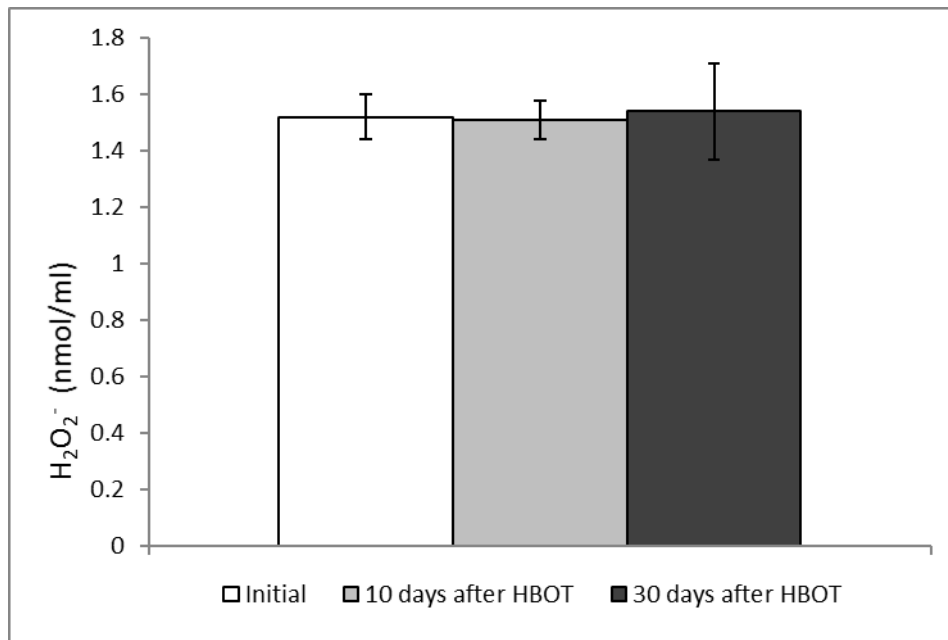


Figure 3.

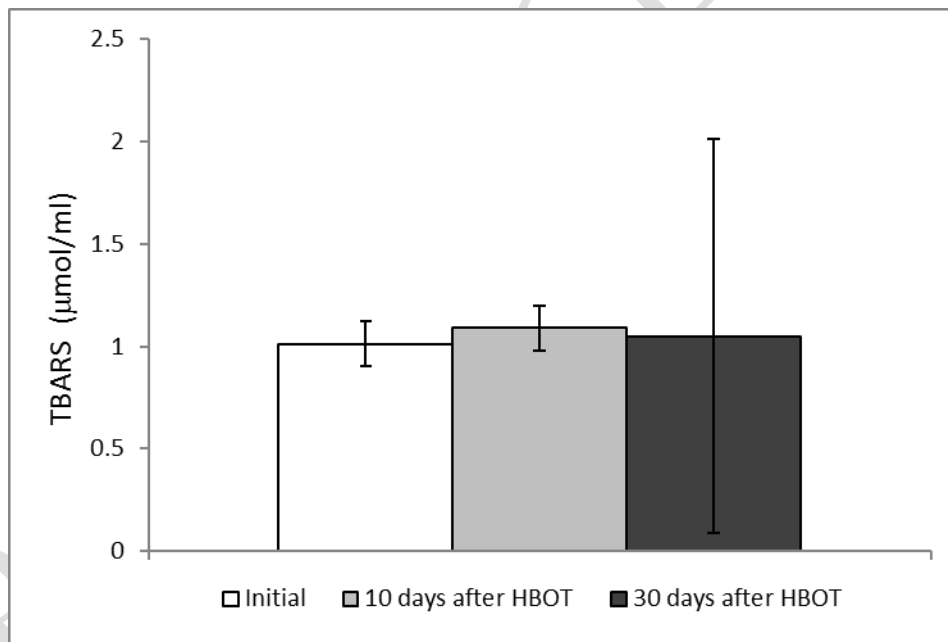


Figure 4.

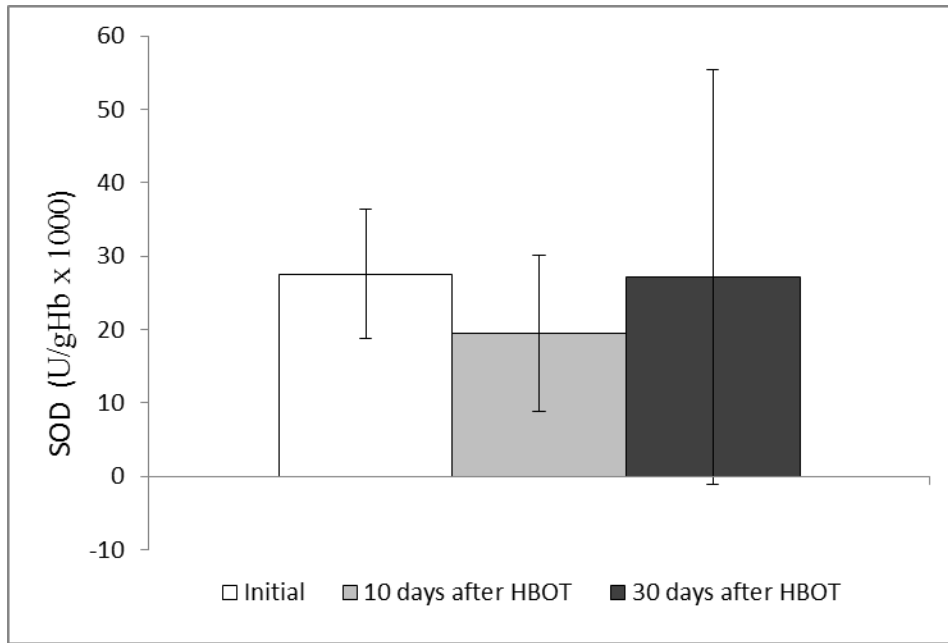


Figure 5.

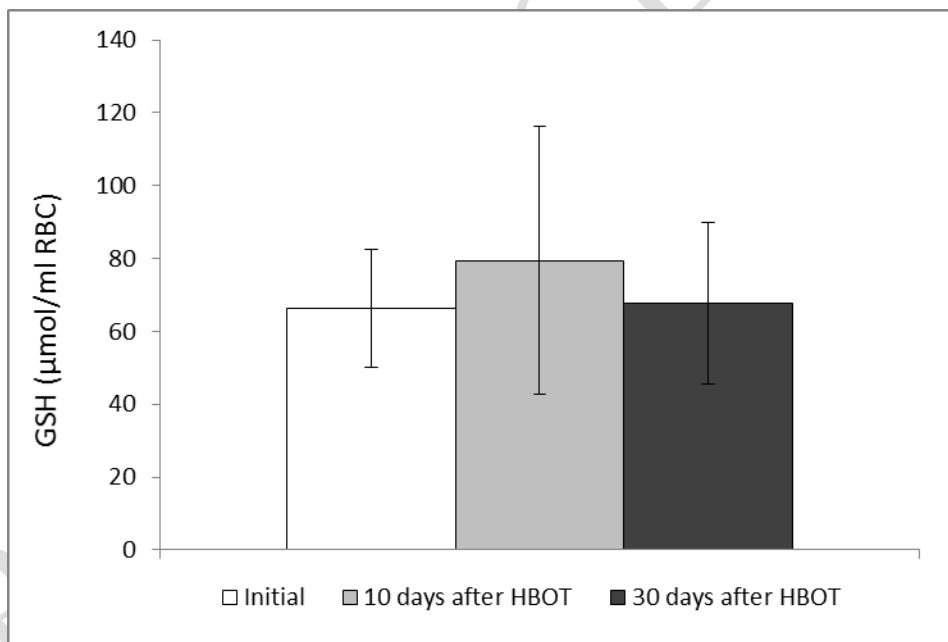


Figure 6.

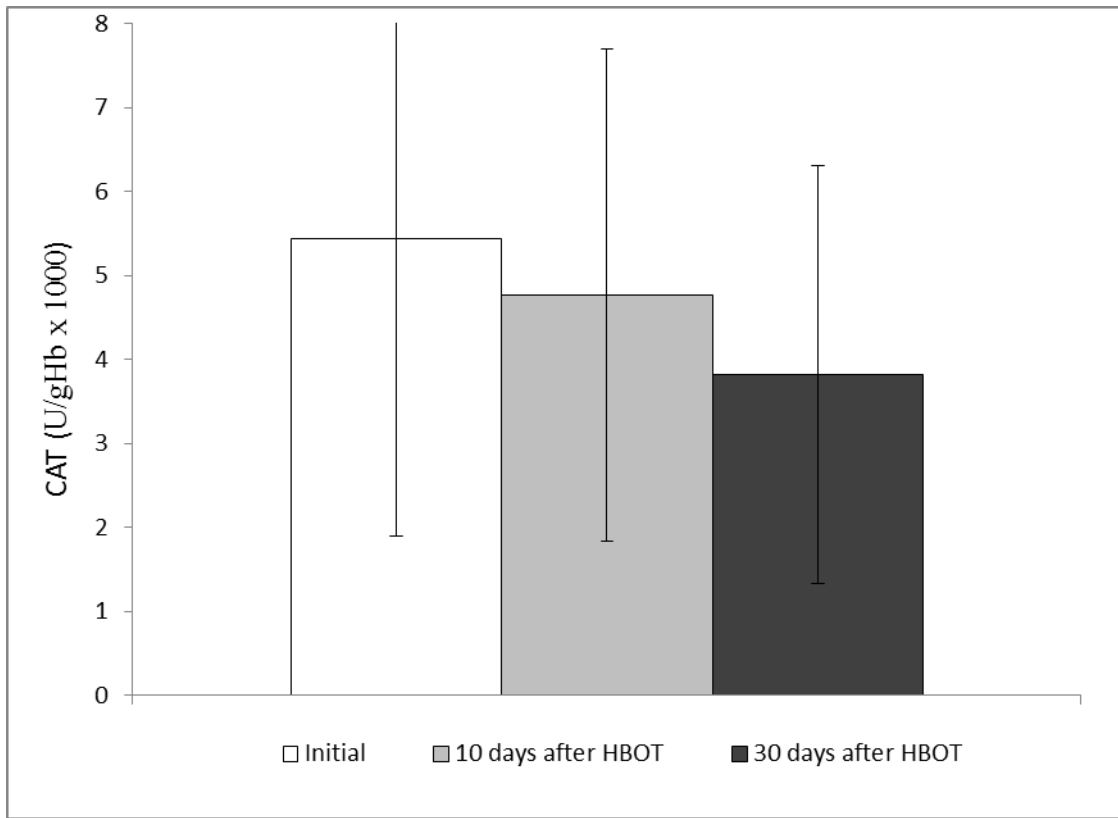


Figure 7.

Received on January 10, 2017.

Revised on July 18, 2017.

Accepted on July 24, 2017.

Online First September, 2017.

PAPER ACCEPTED