

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

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

прим. др. Милорад Рабреновић

Ментор: проф. др. Вларимир Јаковљевић

Крагујевац, 2018. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	4
1.1 Системски еритемски лупус	4
Дефиниција	4
Етиопатогенеза.....	4
Клинички облици.....	6
Лечење	11
Хипербарична оксигенотерапија у лечењу системског еритемског лупуса	11
1.2 Хипербарична медицина.....	12
Увод.....	12
Историски развој лечења Хипербаричне оксигенације.....	12
Физиолошки аспект Хипербаричне оксигенације.....	13
Контраиндикације за примене ХБО терапије.....	15
Рекомпресивне или хипербаричне коморе	17
Увод.....	17
Карактеристике комора.....	17
Мере опреза.....	20
1.3 Оксидационо- редуccionи процеси.....	21
Слободни радикали	21
1.4. Реактивне кисеоничне врсте (ROS).....	22
Оксидациони стрес	23
Настанак и особине појединих врста ROS.....	25
Водоник пероксид H_2O_2	26
Хидроксил радикал ($\bullet OH$)	28
Синглет кисеоник	29
Липидна пероксидација (TBARS).....	29
1.4 Реактивне азотне врсте (RNS)	32
Азот моноксид (NO).....	32
1.5 Антиоксидативни заштитни систем (AOS).....	35
Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система	36
Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система.....	38
1.6 Л—Цитрулин	39
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	41
2.1 Циљеви и хипотезе студије	41
Циљеви студије	41

Хипотезе студије	41
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД	42
Испитаници	42
Параметри оксидационог стреса	43
Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)	43
Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)	44
Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	45
Одређивање нитрита (NO_2^-)	46
Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)	47
Одређивање активности каталазе (CAT)	48
Одређивање активности глутатиона (GSH)	49
Одређивање нивоа L- Citrullina	49
Статистичка анализа	50
4. РЕЗУЛТАТИ	51
Прооксидативни параметри – резултати	56
Антиоксидативни параметри – резултати	61
5. ДИСКУСИЈА	65
Утицај хипербаричне терапија на СЕЛ	65
Утицај хипербаричне терапије на оксидациони стрес	68
Утицај хипербаричне терапије на параметре антиоксидационе одбране	69
6. ЗАКЉУЧЦИ	71
7. ЛИТЕРАТУРА	73

1. УВОД

1.1 Системски еритемски лупус

Дефиниција

Системски еритемски 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 двострукењ 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, антиколузионих 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 може се 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	– Raynardov 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 комплемента, активирањем система комплемента и поремећајем функције комплемента ћелија имуног система и као таква предмет су истраживања поледдњих 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 транзисторног 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 краниалних 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 () Клиничко исполјавање лупус нефритиса врло је разнолико и по правилу завици од врсте односно тежине морфолошких лезија, мада на основу клиничко-лабораторијских манифестација не могу увек да се предвиде ни врсат ни тежина патохистолошких промена (). 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 протинуријом 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 протинурија, хипопротинемија са хипоалбуминемијом, хиперлипидемија, едеми и хипертензија.

Нефротски синдром је један од пет клиничких гломерулопатија кога изазивају најразличитија патолошка станја. 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 нефротско синдрому јесте повећана пропустљивост капиларног зида гломерула. Главни знак нефротског синдрома је протинурија. У мокраћи се налазе разни протеини што је у директној зависности од њихове молекулске масе. Најкарактеристичнији поремећај у концентрацији серумских протеина јесте хипоалбуминемија која је у корелацији са протинуријом. Поред ње постоји повећана алфа 2 глобулин и бета глобулин док су гама глобулини обично снижени. Појава едема је директно узрокована протинуријом 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 инциденти коронарне болести веома различити. У нефротском синдрому се манифестује повећањем концентрације укупног холестерола, фосфолипида, триглицерида, ЛДЛ-а и ВЛДЛ. Сматра се да услед промене онкотског притиска због хипоалбуминемије води повећане 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 чега 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(). 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, мала протенурија и имунолошка стабилност, што су све знаци супресије болести [29, 30].

Хипербарична оксигенотерапија у лечењу системског еритемског лупуса

ХБО или хипербарична оксигенација је удисање 100% медицинског кисеоника у специјалним уређајима које се зову хипербаричне коморе. У њима се стварају услви 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, стимулиже 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 СЕЛ, 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, поспежује стварање колагенаи фибробласта. Његов имуносупресивни ефекат се испољава смањењем интерлеукина 1 и простагландина Е2, при чему интерлеукин 6 није измењен.

Хипербарична терапија као допунска терапија код СЕЛ 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 тераписком 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 Бенке и Shaw употребили хипербаричну комору да би третирали декомпресиону болест.

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 користи 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 направила 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 стационарна 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].

Неоспорно 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 хелија 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 ₂
100%@ 1atmos.	75 mmHg pO ₂
100%@ 1, 3 atmos.	246 mmHg pO ₂
100%@ 1, 5 atmos	437 mmHg pO ₂

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 преносе 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.



Slika 1 –

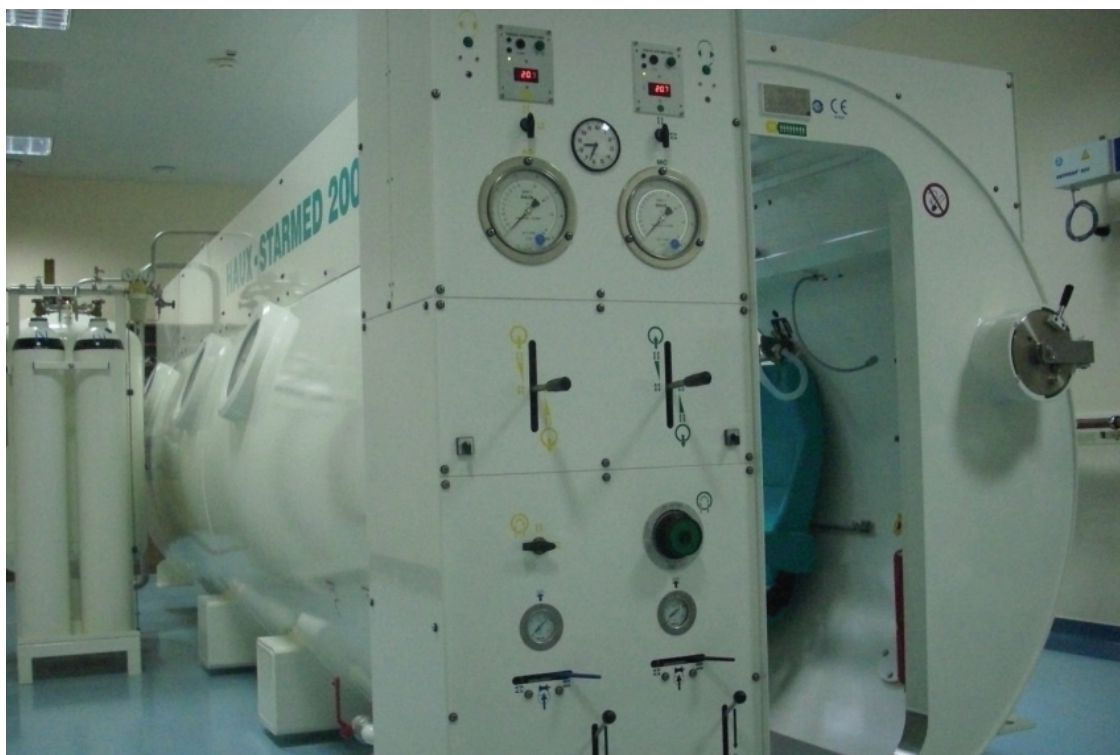
- Стационарне вишесторне коморе су комфорније, пацијента прати медицинско особље за време третмана са могућношћу изводјења медицинских интервенција, кисеоник се узима помоћу маске инхалацијом, постоји могућност регулације микроклиме што у многост повећава комфор. Безбедније су за употребу од једномесних 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].



Slika 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, аустенични 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.



Slika 3 –

Хипербаричне коморе које се користе у клиничке сврхе пуне се целе 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 упоребом 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

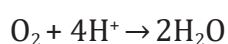
се удише кисеоник у отвореном кругу за вентилацију треба осигурати 375 л ваздуха по особи која мирује при чему кисеоник у атмосфери коморе не сме бити виши од 25,0 волумен процента.

- 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 O₂ представља крајњи акцептор електрона *cytochrome*-с оксидазе, завршне компоненте NADH комплекса који катализује редукцију O₂ 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

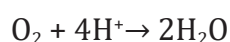
- Фаза иницијације где нерадикали примају или губе један електрон и због тога им се мењају физичке и хемиске особине.
- У фази пропагације новонастали слободни радикал активира околне хемиске врсте, те им одузима по један електрон, чиме себс стабилише, а циљни молекул се трансформише у форму слободног 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 многобројнефункционалне путеве у њој. Под термином слободни радикал 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 непарених 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 кисеоничке врсте [102]

Слободни радикали кисеоника		Нерадикалски облици кисеоника	
Ознака	Назив	Ознака	Назив
$O_2\cdot$	Суперокси анјон радикал	H_2O_2	Водоник пероксид
$\cdot OH$	Хидроксил радикал	$HOCl$	Хипохлорна киселина
$HO_2\cdot$	Хидропероксил радикал	O_3	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 унутрашњој 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 публиковао да процес у којем долази до смањења кисеоника у ткивима је услов за оштечења 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 парадок да ROS учествује у интраћелијским сигналним процесима као физиолошки биомолекули може се лако објаснити завишношћу од њихове концентрације. Такође ово важи и за азот монооксида, 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 ендегени 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 непажено 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 ланца директно су последица дејства $\cdot\text{OH}$ радикала из H_2O_2 у присуству прелазних метала.

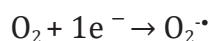
Оксидациона оштећења DNK ремете процесе репликације. Транскрипције и транслације изазивајући мутације. Старење и смрт ћелије [64].

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 (Sichel et al, 1987), као и оксидацијом хемоглобина (Hb) и миоглобина (Mb) [73, 74].



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 [75, 76]. 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 (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: H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, 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, учествовати у процесима канцерогенезе [77,78].

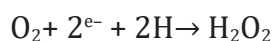
Да би се разградио $\text{O}_2^{\cdot -}$ долази до реакције између два супероксид анјон радикала и при чему настаје водоник пероксид. Када је средина кисела ово је спонтана реакција, а на физиолошком pH реакција дисмутације је диригована ензимом супероксид димутаза.



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.

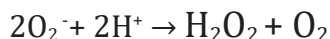
Водоник пероксид H_2O_2

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 [79]. 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 [80].

Активност водоник пероксида као редокс сигнал 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.

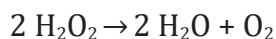
Главни механизам којим водоник пероксид делује као сигнал јесте путем специфичне, реверзибилне модификације кључних аминокиселина и протеина [44]. Водоник пероксид може да доведе до оксидације сулфхидрилних група протеина и до иницијације реакције липидне пероксидације. Веома је опасно индиректно деловање водоник пероксида са супероксид анјон радикалом или јонима метала (Fe^{2+}) при чему доводи до стварања реактивног хидроксил радикала ($\cdot\text{OH}$). који је најзначајнији активатор пероксидације мембранских липида [81,82].

Физиолошка улога водоник пероксида у ћелијама сисара продукује у процесима пролиферације, диференцијације и миграције [81]. Ефекат водоник пероксид је у зависности од јачине концентracије, ниски нивои делују пре пролиферативно него антипролиферативно [83]. Многе туморске ћелије стварају високи ниво водоник пероксида, што је важно за развој тумора, али може и сензибилисати ћелије тумора [84].

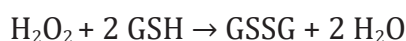
У процесима разградње водоник пероксида као антиоксидативни заштититни систем који брани организам од њега су каталаза, пероксиредоксини и глутатион пероксидаза [44].

Каталаза разграђује водоник пероксид директно у воду и молекулски кесеоник;

CAT

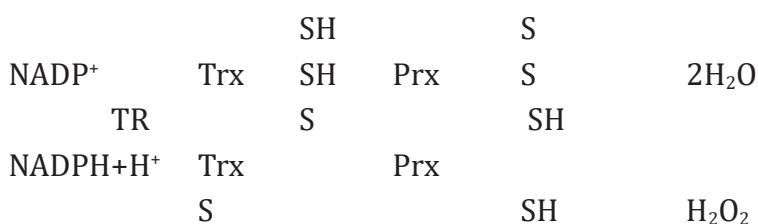


Такође уклањање водоник пероксида од стране глутатион пероксидазе



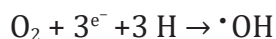
Високе концентracије водоник пероксида су скоро леталне за сва жива бића.

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 (Fe^{2+} и 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 [84, 78].

Хидроксил радикал је врло реактиван и тиосичан, нема специфичног партнера, рецептоа или биомолекула да би вршио сигнализирање 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 ствара органски радикали. Висока реактивност, али и мала селективност

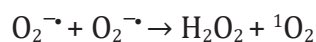
утичу на његову токсичност на ћелију и њене функције. Када дође до реакције два хидроксил радикала ствара се водоник пероксид.

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 [78].
- 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 H_2O_2 и хлор (Cl^-) да би створиле хипохлорне јоне (ClO^-) који затим са H_2O_2 стварају синглет кисеоник (Steinbeek et al, 1992)

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 [78].

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 [78]:

- 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 [86].
- 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];

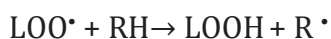
1. Фаза иницијације
2. Фаза пропагације
3. Фаза терминације

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^{*}). 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^{*}).

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

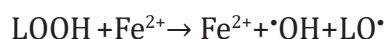
Од свог угљоводоничног ланца и тиме улазе у процес аутооксидације. На тај начин се формирају циклични радикали. Даље у бета оксидацији масних киселина, премештањем двогубих веза дају алкене и алкине скраћених ланаца и посебно токсичне хидрокси алкене који настављају даљу оксидацију околних PUFA.

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



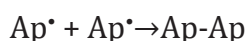
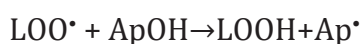
Алкоксил радикали улазе у једну од три реакције:

1. Преузимањем H-атома из молекула воде, срварају 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 β оксидације којом се ствара ацил-алдехид скраченог 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 LOO^\bullet стварају ароматични радикал (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 [87]. Неурони ЦНС и ћелије глија су веома осетљиви на дејство ROS због високог садржаја PUFA у липидима мозга-сфингомијелина, цереброзида и ганглиозида [88].

1.4 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 [89–91].

Tabela 2 – Реактивне врсте азота

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

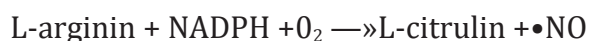
Водећи експонент реактивних азотних врста је азот моноксид (•NO), а његов метаболизам и реактивност воде до стварања много других RNS, као што су пероксинитрити (ONOO⁻), азот диоксид (NO₂•), диазот триоксид (N₂O₃) и диазот тетроксида (N₂O₄).

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 [91].

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).

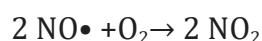
Генерално, $\bullet\text{NO}$ сигнализирање је у складу са класичним сигналним парадигмама која укључују контролисане количине продукције, специфичну реактивност са протеинима и пратећу промену у активности/функцији, појачавање секундарних сигнала или метаболизма који „искључује“ сигнал [44].

Активношћу NOS стварају се физиолошке количине NO са врло малим полуживотом (3-5s), које диктирају његове физиолошке функције. Међутим, индуцибилна NOS (iNOS) одговорна је за продукцију много веће количине NO \bullet , 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 [92].

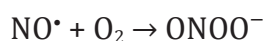
У физиолошким условима

$\bullet\text{NO}$ брзо дифундује у суседне ћелије где првенствено стимулише синтезу цикличног гуанозинмонофосфата (cGMP)(93). Улога NO \bullet у организму је значајна: он је сигнални молекул у нервном ткиву, медијатор вазодилатације. Цитотоксичне активности макрофага, смањује агреабилност тромбоцита [94–96].

$\bullet\text{NO}$ константно улази у реакцију са супероксид ањон радикалом ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и H_2O_2 , најважнијим ROS у организму сисара, формирајући RNS. Неки од облика RNS, као азот диоксид (NO_2) и азот триоксид (N_2O_3) настају простом аутооксидацијом азот монооксида у нитрите (NO) чиме се потенцира ткивни нитрозо-стрес [97]):

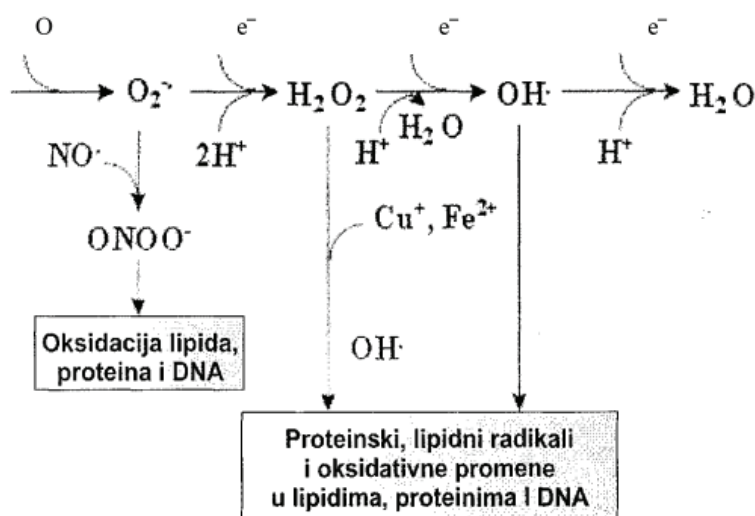


Проста аутооксидација $\bullet\text{NO}$ у нитрите (NO_2), односно реакција између $\bullet\text{NO}$ и O_2 доводи до продукције оксидованих, нитрованих и нитрозованих врста као што је азот диоксид (NO_2) и диазот триоксид (N_2O_3). Реакцијом азот монооксида ($\bullet\text{NO}$) са супероксиданјон радикалом ($\text{O}_2^{\bullet-}$) постаје високореактивни пероксинитрит (ONOO^-), који је јак оксидант и може да реагује или директно са тиолима и металним центрима, али и да се комбинује са хидроген пероксидом (H_2O_2) и угљен диоксидом (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⁻.

Овим реакцијама NO[•] инактивира извесне количине O₂^{-•} 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[•]) и пероксил радикалом (ROO[•]), чиме се узрокује процес оштећења липидних мембрана [98, 99].



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). (100). Спајањем NO за sGC базална активност овог ензима повећава се 200 пута, а тиме се повећава и концентracија интрацелуларног другог гласника cGMP-а 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. (100). NO је најважнији код регулације васкуларног тонуса 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[•] од стране O₂^{-•} [101–103]. Може се констатовати да до данас нису доказани специфични механизми путем којих оксидативни стрес делује, већ су само познати могући механизми његовог ефекта.

1.5 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 [104]. 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 [105]. Антиоксидациони заштитни систем има примарну и секундарну антиоксидациону заштиту.

Примарну антиоксидациону заштиту чине ензимске и неензимске компоненте [106].

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;

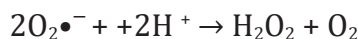
Друга класа су дезинтегратори који уништавају настала оштећења и то су различите протеазе које су активне на оксидационо модификоване протеине: протеин- специфичне оксидоредуктазе, протеин- ADP-рибозил-трансфераза, АТР и Ca^{2+} – независна протеаза;

Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система

Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) је металопротеин који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала (O_2^-) у молекулски кисеоник и водоник пероксид (H_2O_2) [107].

SOD



SOD је једна од примарних ензимских антиоксидантних одбрана од супероксид радикала [108]. 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 организама.

Супероксид дисмутаза која садржи манган (Mn SOD). Ген за Mn SOD код човека се налази на хромозому 6 и птижа заштиту од липидне пероксидације у ћелији и ван ње, јер се секретује у екстраћелиске просторе и тако штити ћелијску мембрану. Mn SOD је битан чинилац редокс равнотеже, њена повећана активност штити ткива од оксидационог стреса [109]. 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 [110].

Супероксид дисмутаза која садржи бакар и цинк (CuZn SOD) је још један облик и њега има у ћелијама сисара и то у цитосолу 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.

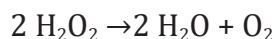
– екстрацелуларни супероксиг дисмутаза (EC SOD) садржи бакар и цинк, али се разликује по другачијој аминокиселинској секвенци од CuZn SOD. Налази се у екстрацелуларној течности, плазми, лимфи и цереброспиналној течности. Због тога има важну улогу у пресретању O_2^{\cdot}

и NO^{\cdot} и последичног повећања полуживота NO^{\cdot} , чиме се смањује укупна продукција моћног оксиданта перокснитрита (ONOO), [111]. 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. (100). 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 двотепена 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 [112].

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]. Синтетиче 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, разлаше се помоћу каталазе која чини преко 40% свих протеина у пероксизомима. Присутством каталазе у пероксизомима где под утицајем пероксизомалних 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_x има вашну улогу у ензимској одбрани од оксидационог стреса [113].

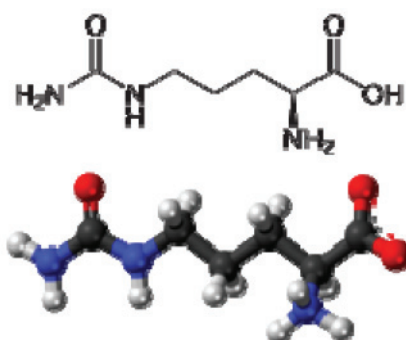
Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система

Глутатион (GSH)

Триптид γ -глутамилцистеинилглицин(GSH) је главни неензимски и најраспрострањенији регулатор ћелиске редокс хеомстазе. Глутатиона има свака ћелија у милимоларним концентрацијама [114]. 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. [115]. Неутрализација ROS преко GSH остварује се директно или индиректно када је глутатион супстрат за GP_x и GST у поступку детоксификације водоник пероксида, липидних хидропероксида и електрофилних једињења [105]. У физиолишком редокс стању у ћелији скоро сав глутатион је у редукованом облику, а негде око 1% у оксидованом облику GSSG (глутатион дисулфид). [116]. Приликом оксидационог стреса концентрација глутатиона се брзо пада за разлику од потенцијално токсичног GSSG 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 *de novo* синтезу GSH Целокупно смањење GSH у ћелији је последица активности и GP_x и GST. Глутатион је као редуктант врло важан у одржавању стабилности мембране еритроцита (нормалан однос GSH : GSSG код еритроцита је 100: 1) [117]. Са улогом редуктанта, антиоксиданта и детоксиканта GSH игра важну улогу у регулацији здравља људи. Уколико је смањена концентрација глутатиона у организму, то се повезује са патогенезом болести јетре, плућа и неуродегенеративних болести [118]. Такође присутна је и слабост имуног система јер су пролиферација, раст и диференцијација ћелија имуног система зависне од GSH [117]. Сматра се да је и процес старења повезан са концентрацијом глутатиона, млађе особе га имају више него старије [119].

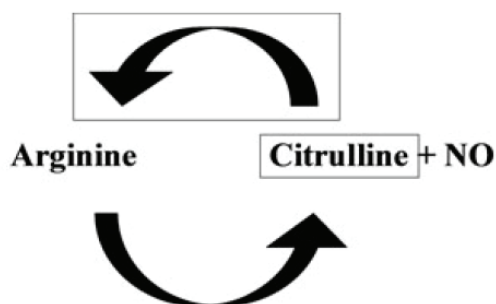
Глутатион је неопходан за функционисање GSH ензима који учесћују у првој и другој линији одбране у спречавању цитотоксичног ефекта деловања ROS, јер сам није довољан

1.6 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 дубрега 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 5 – 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 монооксид синтазе (NOS) врши цепање терминалног гванидино азота, при томе се ствара цитрулин и ослобађа азот монооксид (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 (Костић, 1993).

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 СЕЛ 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 јеутврдити 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 зчешће 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, H₂O₂ и O₂⁻) 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 (120). 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 μ l урина и 950 μ 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 (H₂O₂)

Детерминација количине водоник пероксида (H₂O₂) 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 $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (121). Линеарна зависност апсорбанце 610nm од концентрациј H₂O₂ је постојана за 1-60 μM опсег концентрација (1-60 nmol/ml). Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H₂O₂ за временски интервал од 5-60 минута. У епрувете (12×100) пипетирано је 200 μl урина и 800 μl 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 μl (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 H₂O₂ у урину израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређивањем за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H₂O₂, уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H₂O₂ износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо урина) 5, 10 и 20 μl , 1 mM раствора H₂O₂, 200 μl дестиловане, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је $\text{pH} \approx 12$ помоћу 1 M NaOH (10 μl). Тако је финална концентрација H₂O₂ у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H₂O₂/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 слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H₂O₂ 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 (ΔA) ($A = A_u - A_{sp}$). 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 [122]. 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 μl урина и 200 μl 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:

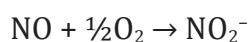
$$\text{nmol TBARS/ml урина} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25,$$

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 μM , 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 (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 [123]. 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 μl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH = 9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) 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 NaNO_2 у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24 μl , чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol NO_2^-/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:

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

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Дељењем разлике екстиниација 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 $O_2^{\cdot -}$ [124]. 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 потише 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 у 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 представљена 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:

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

ΔK – промена апсорпције контролне реакције у минути

ΔL – промена апсорпције реакције са узорком у минути

V – запремина узорка који се сипа у реакцијону 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 (125). 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 нила, 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 μ l пуфера додаје се од 5 до 50 μ 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 μ M, у минути. Прорачун се врши по следећој једначини:

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

ΔA — 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) [126]. 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, NaHPO₄ 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 (ΔA). 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 χ^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 ^{ns}	71,58 ± 12,17 ^{ns}

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

^{ns} –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 ¹² /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 ⁹ /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 ⁹ /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 ²)	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	$z = 2,88$; $p=0,004$	$z = 2,71$; $p=0,007$	$z = 0,57$; $p=0,564$

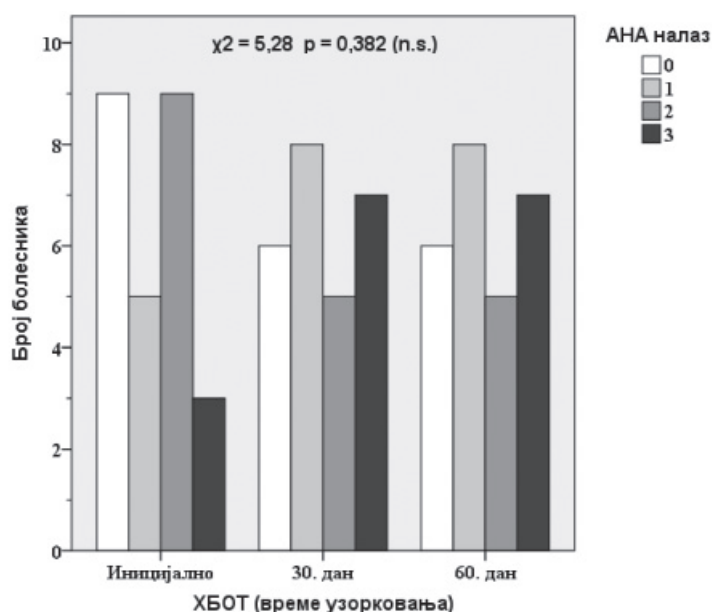
Коришћен је Friedman тест, у случају добијања значајне разлике парна поређења изведена применом Wilcoxon теста.

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	
Укупно	3	N	2	3	5
		% (ANA)	40,0	60,0	100,0
		% (grupa)	7,7	11,5	9,6
	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

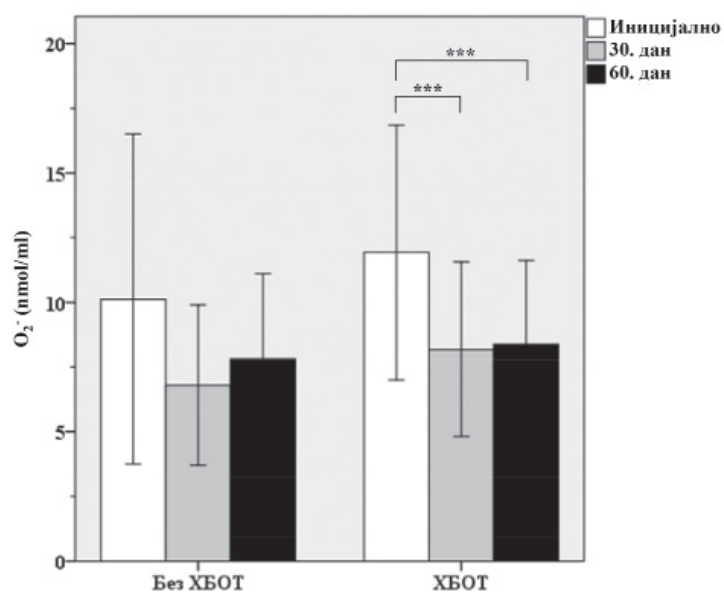
Табела 13 – Динамика прооксидативних параметара у испитиваних група болесника

Параметри	Без ХБОТ			ХБОТ		
	Иниц.	30. дан	60. дан	Иниц.	30. дан	60. дан
O ₂ ⁻ (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 ₂ ⁻ (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 ₂ O ₂ (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 ₂ ⁻	Без ХБОТ	$z = 1,647$	$z = 0,494$	$z = 0,970$
	ХБОТ	$p = 0,099$	$p = 0,621$	$p = 0,332$
NO ₂ ⁻	Без ХБОТ	$z = 1,914$	$z = 0,275$	$z = 2,654$
	ХБОТ	$p = 0,056$	$p = 0,784$	$p = 0,008$
H ₂ O ₂	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	$p = 0,415$	$p = 0,272$	$p = 0,570$

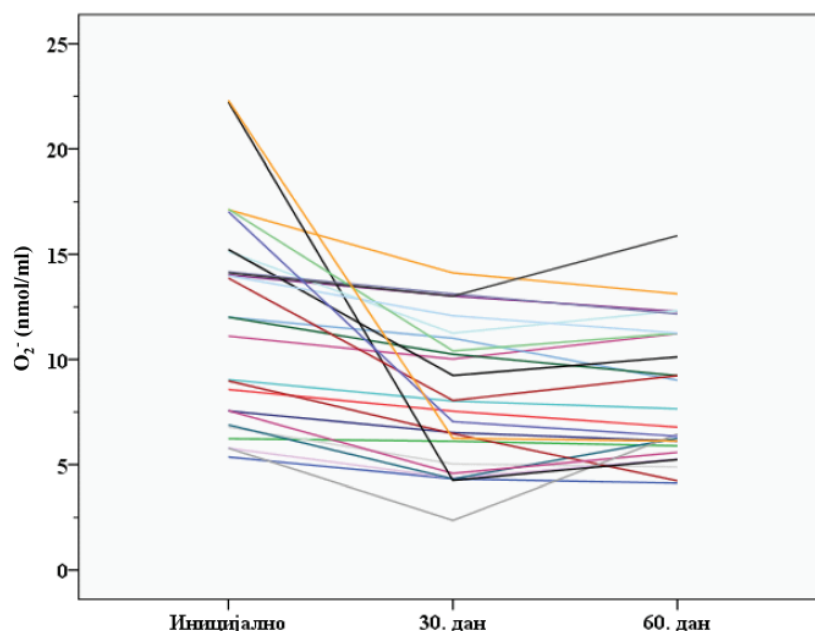
Статистички значајна разлика између две групе утврђена је једино код параметра NO₂⁻ 60. дана од почетка студије. Значајно веће вредности овог параметра ($p = 0, 008$) измерене су у групи без ХБОТ.



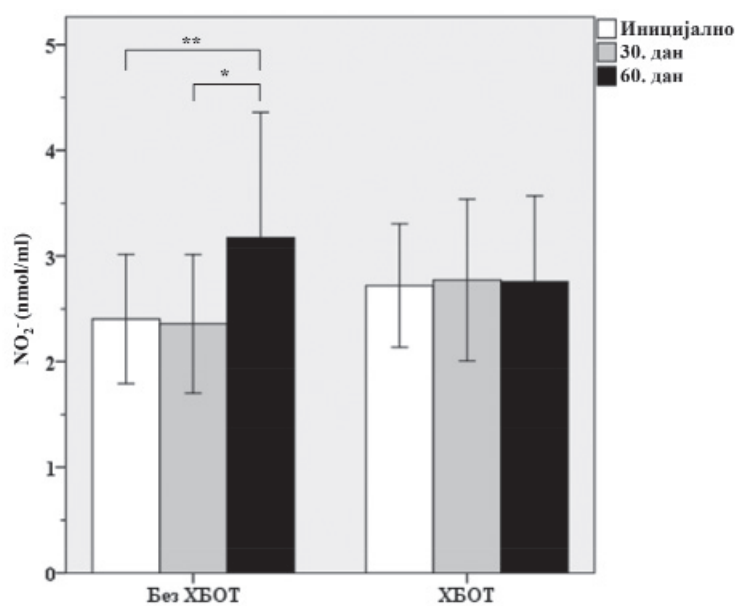
*** $p < 0,001$ између појединих мерења.

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).



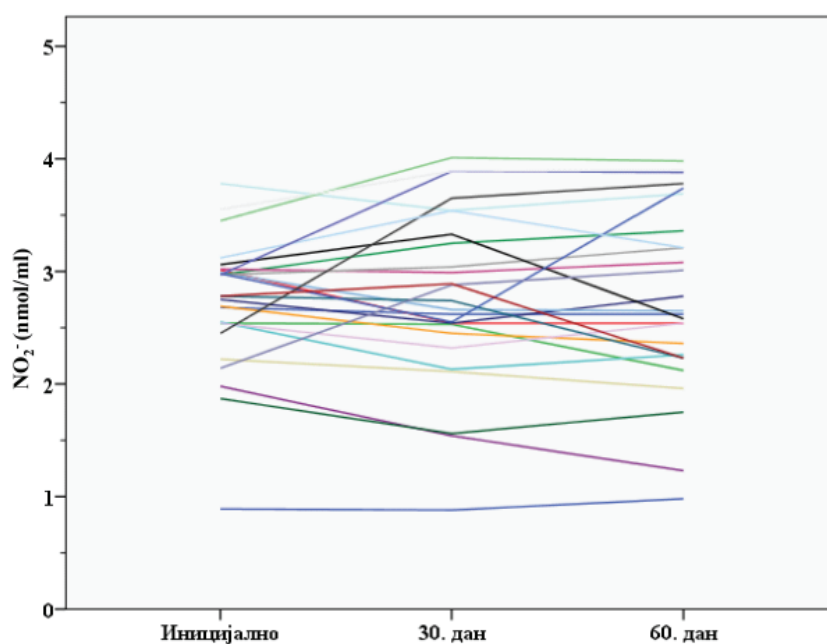
Графикон 3 – Појединачни прикази нивоа O_2^- у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима. Код већине пацијената запажа се смањење нивоа O_2^- у периоду након ХБОТ и до прве визите након 30 дана.



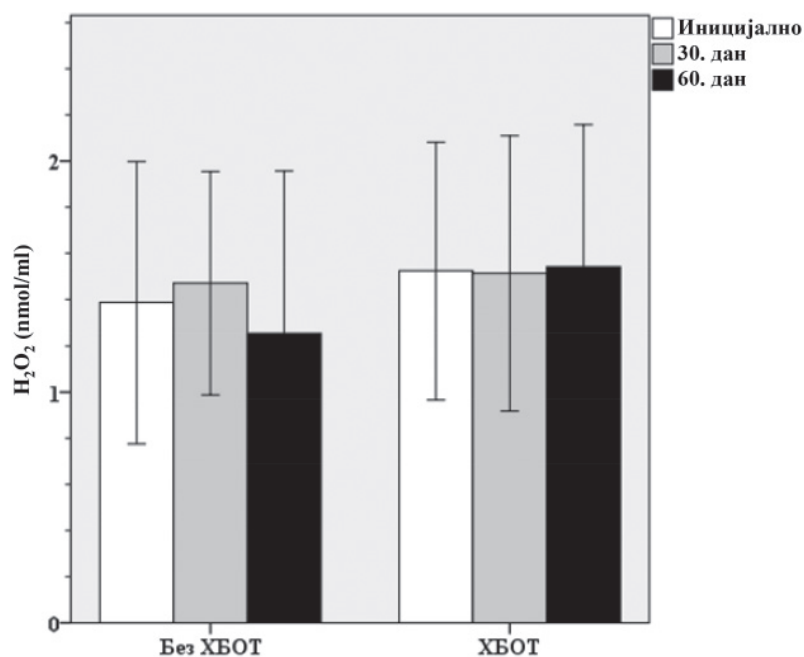
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ између појединих мерења.

Графикон 4 – Нивои нитрита 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 NO_2^- 60. дана у односу на иницијалне вредности и вредности регистроване 30. дана).

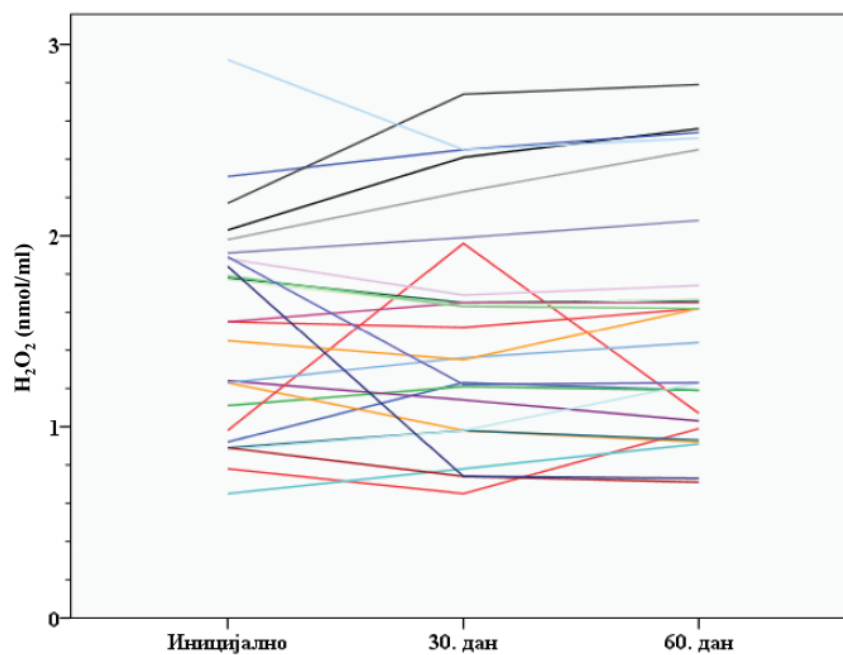


Графикон 5 – Појединачни прикази нивоа нитрита NO_2^- у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима.

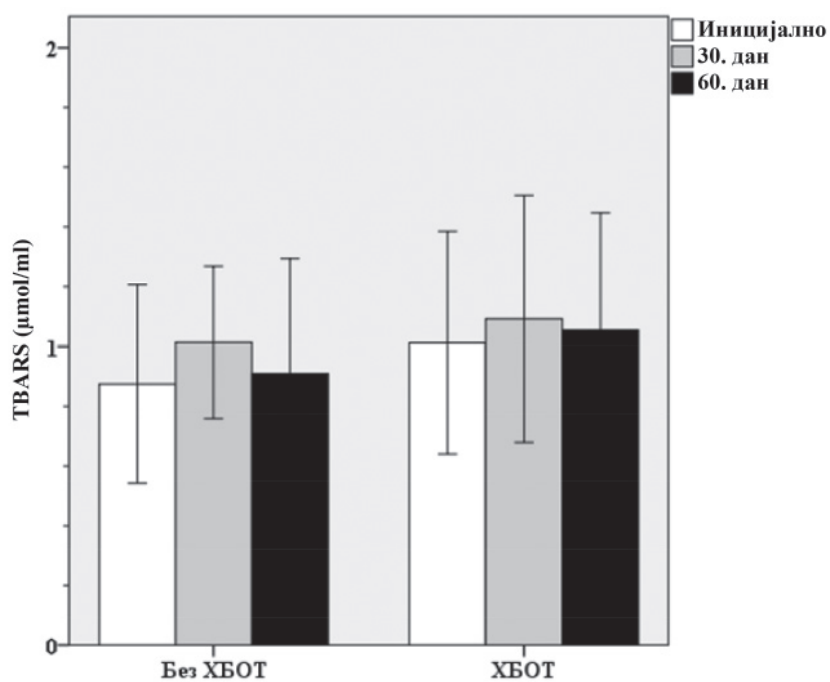


Графикон 6 – Нивои водоник пероксида H_2O_2 у урину (презентоване су средње вредности са SD). Поређене су иницијалне вредности, после 30 дана и након 60 дана у обе групе (без ХБОТ и са ХБОТ).

Нису утврђене статистички значајне разлике унутар група.

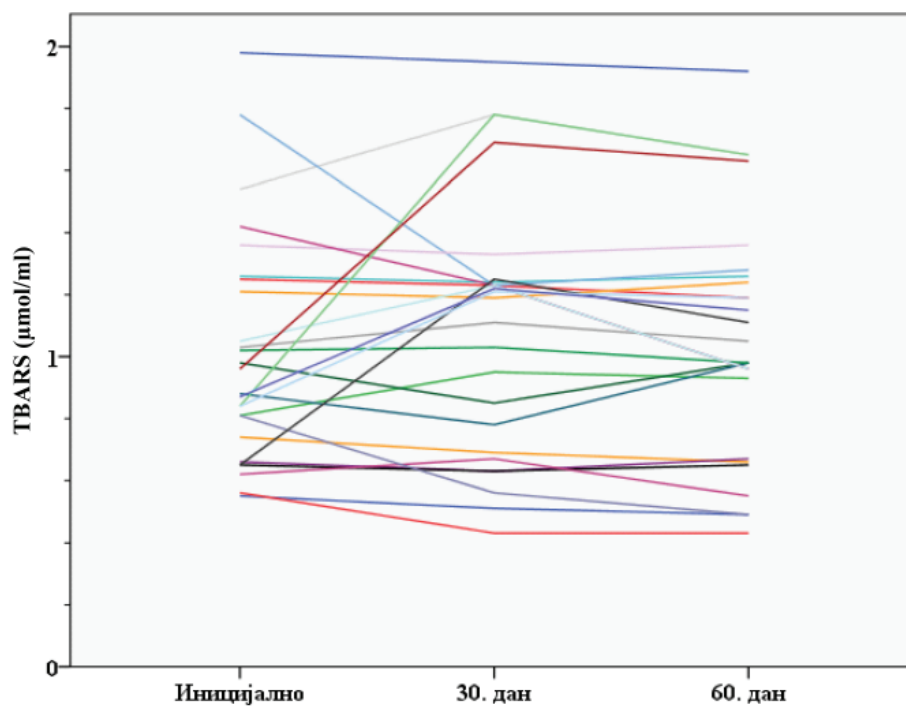


Графикон 7 – Појединачни прикази нивоа водоник пероксида H_2O_2 у урину код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима.



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

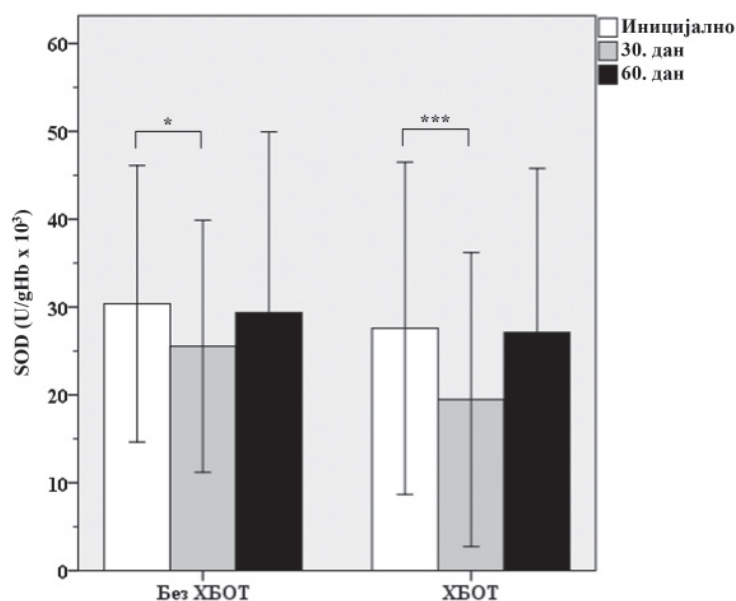
Табела 15 – Динамика антиоксидативних параметара у испитиваних група болесника

Параметри	Без ХБОТ			ХБОТ		
	Иниц.	30. дан	60. дан	Иниц.	30. дан	60. дан
SOD (U/gHbx10 ³)	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 ³)	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 ³)	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	$p = 0,111$	$p = 0,001$	$p = 0,351$

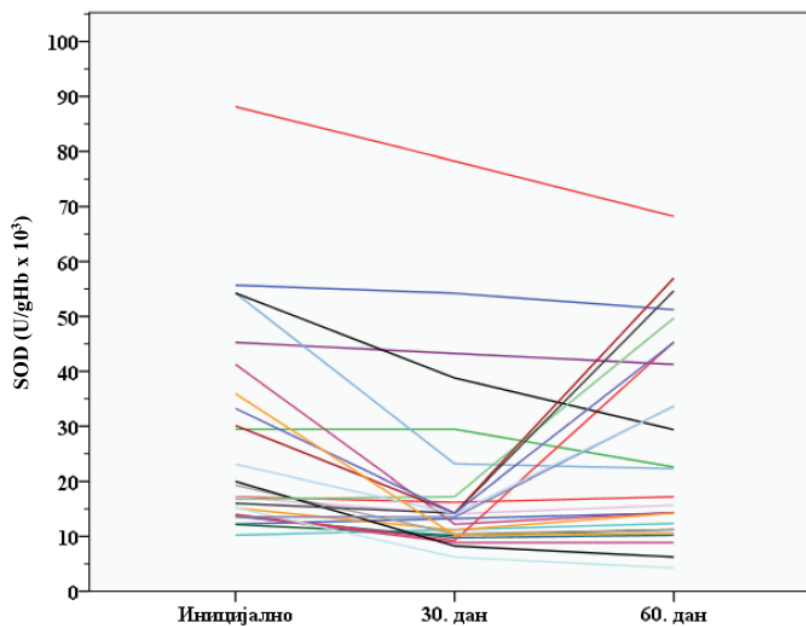
Статистички значајна разлика између две групе утврђена је код 2 параметра (GSH i CAT) 30. дана од почетка студије. Значајно веће вредности GSH ($p = 0,002$) измерене су у групи ХБОТ. Супротно томе, значајно веће вредности CAT регистроване су у групи болесника без ХБОТ.



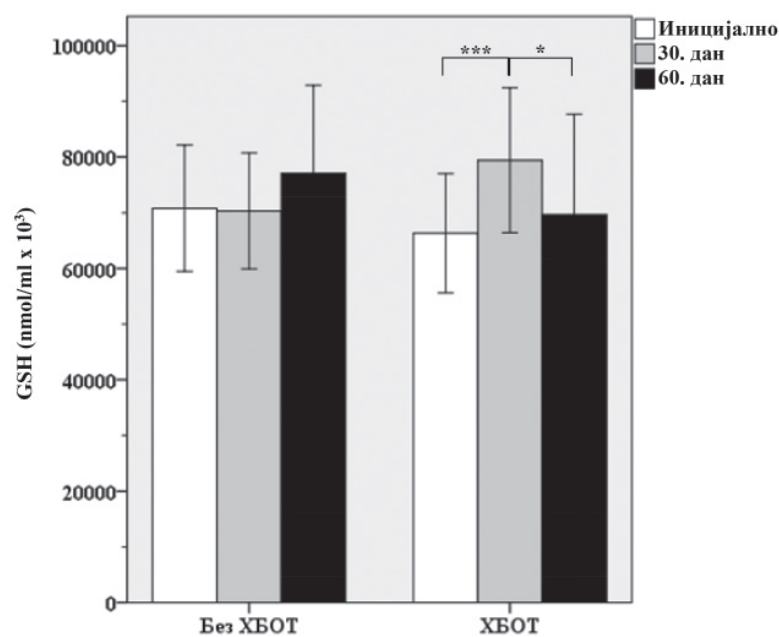
* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ између појединих мерења.

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.



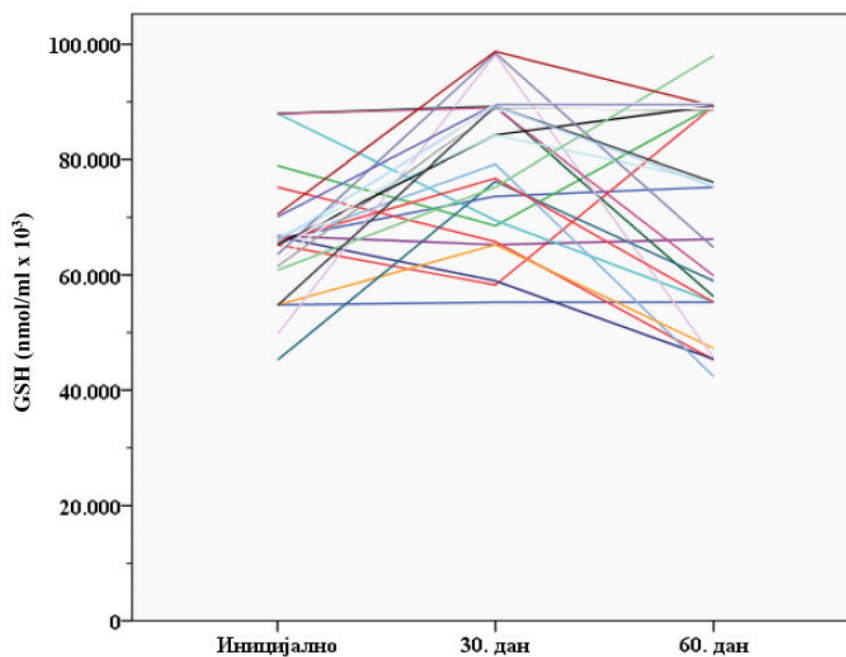
Графикон 11 – Појединачни прикази SOD у крви код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима



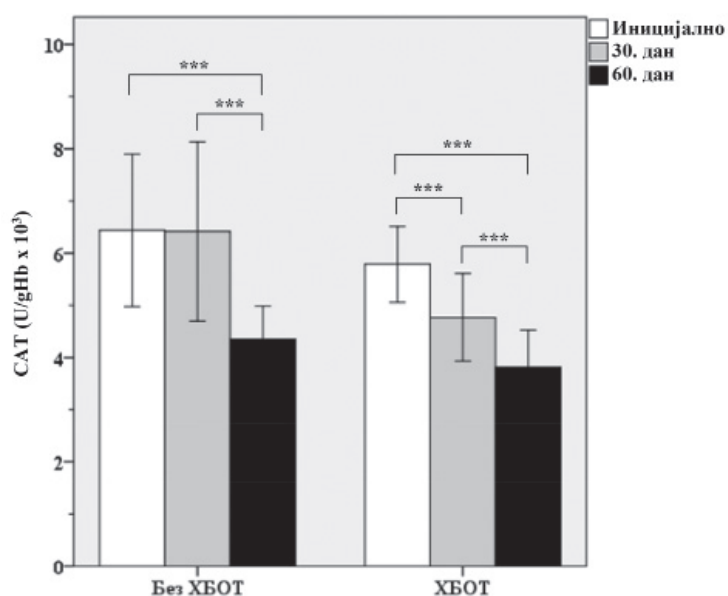
* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ између појединих мерења.

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).



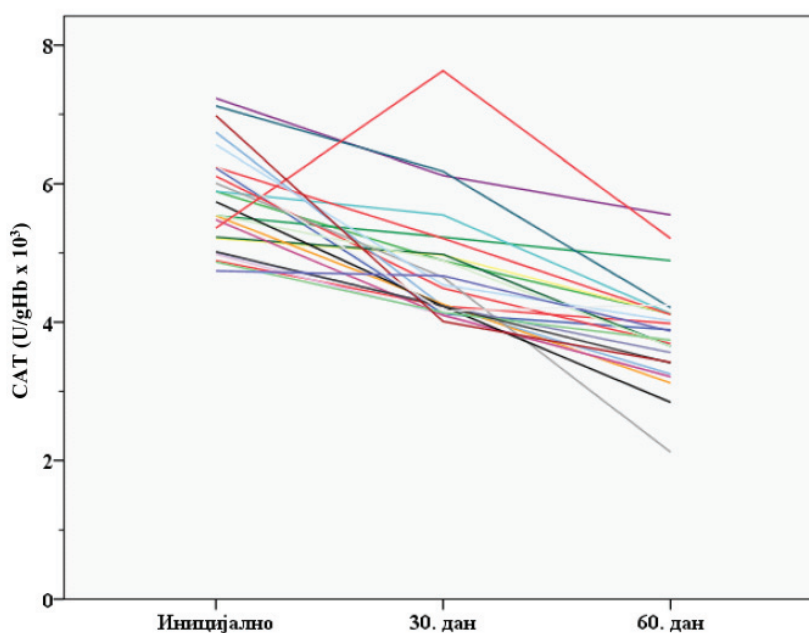
Графикон 13 – Појединачни прикази GSH у крви код пацијената у групи ХБОТ, праћени у планираним временским интервалима



*** $p < 0,001$ 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 СЕЛ

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. [127, 128]. 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, супероксид O_2^- , хидроксил радикал $HO^•$, водоник пероксид H_2O_2 и пероксинитрит $ONOO^-$ [129]. У физиолошким процесима цитотоксично деловање слободних радикала је контролисано и њега спречавају антиоксидантни ензими као што су супероксид – дисмутаза или глутатион пероксидаза [130]. Оксидациони стрес се налази у патогенези многих патофизиолошких стања у коронарној болести, хипертензији, хиперлипидемији, психичком стресу, инфламацији, повишеној телесној температури [102, 103, 131, 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 [133]. Оксидациони стрес код СЕЛ 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 у ткивима и на тај начин се ткива опскрбљују кисеоником, и до 20 пута више [134, 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 СЕЛ, 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, поспежује стварање колагена и фибробласта. 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 спроводјене овог третмана потребна је наведена специјализована опрема која захтева одредјену 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 [135].

Хипербарична терапија као допунска терапија код СЕЛ 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) 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 тироин 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 [136]. 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 [137]. 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 [138]. У клиничким студијама резултати се у неким случајевима поклапају са експерименталним, док у другим су добијени опречни резултати [139–141]. 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 СЕЛ у хипербаричним условима и дошли су до значајних резултата који су показивали побољшања код пацијената третираних у односу на оне који нису третирани 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 третирани ХБО у односу на оне који нису. [142, 20, 143].

Патофизиолошки аспект СЕЛ 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

ткива [144]. Хипоксија и запаљење које се развија у склопу болести додатно повећава оксидативни стрес и постоји корелација са параметрима оксидативног стреса и активности болести [145].

Утицај хипербаричне терапије на оксидациони стрес

Студија је дизајнирана у области физиолошких истраживања утицаја хипербаричне оксигенације код пацијената са СЕЛ 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 [146]. 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 превремених дојенчади [147].

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 [148].

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 [146].

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 [149]. Позитиван, прооксидативни ефекат ХБОТ је потврђен и код студија са РА и СЕЛ, односно и код других реуматских болести [150].

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 [151]. 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 [101].

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 концентracија GSH се брзо смањује, и то доводи да различитих поремећаја у организму као смањење нивоа синтезе протеина укључујући и синтезу DNA [152].

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 [152].

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 СЕЛ – 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 СЕЛ – ом у поређењу са оним који не болују од СЕЛ-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 [153].

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу наведеног истраживања може се закључити следеће

1. У нашој студији код пацијената оболелих од СЕЛ-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 значајне разлике нису регистроване.

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

5. 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.

6. У групи болесника третираних са ХБОТ посматрајући супероксид дизмутаза (SOD) као важан параметар антиоксидативне заштите у нашој студији ми смо забележили веће вредности на иницијалном мерењу, а да је дошло 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. дан ($p = 0,876$).

8. У групи пацијената са ХБОТ забележена је смањена активности каталаза (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 СЕЛ-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. Seiner 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. Clark WF, Moist LM. Management of chronic renal insufficiency in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension and dyslipidemia 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 oxygen therapy". Int J Rheum Dis; 12 (4): 366-369, 2009.
21. Ginzler EM, Nicasari 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 membranous forms of lupus nephritis. Ann Intern 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 treatment 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. Mujic F. Tungekar MF. Taub N. Zloid M. Khamasta MA. Hughes GR. Immunosuppressive 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 Connell MJ, Aaronson SA. Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53- null cancer cells, involving a Chk1- 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 neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1273(2):87-107.
73. De Groot H, Littauer A (1989). Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 6(5):541-51
74. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E (1987). Relation ship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 5(2):123-8.
75. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxidide dismutases. *Cancer Treatment* 1986; 13:17-44.
76. Wolin MS. Gupte SA. Oeckler RA (2002). Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39:191-207
77. Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS – generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1):245-313.
78. (Fridovich I. Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv Neurol* 1979;26:255-59.
79. 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.
80. Sies H. (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress*. New York: Academic Press, p 1-8.
81. Sandri G, Panfili E, Ernster L (1990). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat– brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim Biophys Acta* 1035(3):300-5.
82. Rhee SG. a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006; 312: 1882-3.

83. 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.
84. 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.
85. Lopes-Lazaro M, Dual role of hydrogen peroxyde in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters* 2007; 252:1-8.
86. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society* 1934;147: 332-51.
87. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(1):668-76.
88. 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.
89. Scott. G. Antioxidants the modern elixir. *Chem Britain* 1995; 31:879-882.
90. 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
91. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:385-391
92. Hussain SP, Hofseth LJ, Harsi CC. Radical causes of cancer. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:276-85.
93. 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.
94. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1441:334-350.
95. 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
96. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 203-36
97. Morgan DL, Shines CJ. Alveolar macrophage cytotoxicity for normal lung fibroblasts is mediated by nitric oxide release. *Toxicol in vitro* 2004; 18:139-46.
98. 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.

99. Oecklar RA, Wolin MS. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr. Atheroscler Rep* 2000; 2:437-444.
100. Janero DR. Nitric oxide (NO)-related pharmaceutical contemporary approaches to therapeutic NO modulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:11495-1506.
101. Mujović VM. (1998). *Autakoidni sistem*. Nauka, Beograd
102. Garderman A, Mages P, Katz N, Tillmann H, Haberbosch W. The 22^{phox} A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with heart coronary disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 1999;145:315-23.
103. 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.
104. 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.
105. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem. *FEBS Letters* 2003; 540 (1-3):3-6.
106. 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.
107. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
108. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Bio Chem* 1969; 244:6049-55.
109. Powers SK, Lenon SL. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 1025-1033
110. 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.
111. Zhang J. (2002) MnSOD alters gene expression associated with apoptosis. *Virology* 76:355-363.
112. Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J physiol* 268 (5Pt 1): L699-722.
113. Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. (2001). Modulation of catalase peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 7:709-14
114. 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.

115. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 710-60.
116. 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.
117. Dickinson DA, Forman, HJ. (2002). Cellular glutathione and tiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-26
118. 118. Čepelak I. Dodig S. (2004). Glutation i oksidaciski stres. *Biochem Med* 13:93-100
119. Shultz JB, Kindeanan J and Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. Biochem* 267:4904-4911.
120. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxigen radical reasarch*. Ine: Boka Raton, CRC Press p. 123-132.
121. 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.
122. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
123. 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.
124. 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.
125. Beutler E (1982). *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton.
126. Grodsky M. G: Hemija i funkcija hormona. U *Pregled Fiziolo[ke hemije*. Savremena administracija, Beograd. 1982.
127. Majkić -ingh N. Enyimi kod sr;anih oboqewa. U *Klinička enzimologija*. ATD Praktikum, Beograd 1993.
128. Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress *Circ Res* 87 (10):840-4.
129. 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.
130. Kovacs P, Junarek I, Stankovicova T, Svec P. Lipide peroxidation during acute stress. *Pharmazie* 1996; 51(1):51-3.

131. 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.
132. Kehrer P. J. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993;23:21-48
133. Touhey J. E. Hyperbaric oxygen therapy. *Orthop. Rev.* 1987;16:923-33.
134. Freels D. Medicare's noncovered conditions: a conversation with dr George B. Hart. *Hyperbaric Medicine Today* 2003; 2 (2): 7-12
135. Bannister J. V. Rotilio G: *The Biology and Chemistry of Active Oxygen radicals.* New York. Amsterdam. Oxford. 1984
136. Bland J: *Bioflavonoids in Nutrition Superbook 1; The Antioxidants,* Ed by Jean Barilla M. S. Keats Publ. Connecticut.
137. Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Korkmaz A, Oter S, et al. Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue. *Life Sci* 2007; 80(22):2025-9.
138. 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.
139. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E. The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. *BMC Pediatr* 2007; 7:36.
140. Handy RD, Bryson P, Moody AJ, Handy LM, Sneyd JR. Oxidative metabolism in platelets, platelet aggregation and hematology in patients undergoing multiple hyperbaric oxygen exposures. *Undersea Hyperb Med.* 2005; 32(5):327-340.
141. Kuffler DP. Hyperbaric oxygen therapy: an overview. *J Wound Care* 19(2); 77-79, 2010
142. Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:2069-2079.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 2009;106(3):988-95.
147. Živković M. Hiperbarična i podvodna medicina. Beograd Č Naukač 1998
148. 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.
149. 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
150. 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
151. Uhling S, Wendel A(1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences* 51:1083-94.
152. Schultz JB, Kindeanu J and Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. Biochem* 267:4904-4911
153. 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?