ÚLOHA REAKTÍVNYCH METABOLITOV KYSLÍKA V PROCESE KYSLÍKOVEJ TOXICITY INDUKOVANEJ HYPERBARICKOU OXYGENOTERAPIOU

THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE PROCESS OF OXYGEN TOXICITY INDUCED BY HYPERBARIC OXYGEN TERAPHY

KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, GREGUŠ Vladimír, MELUŠ Vladimír, KAŠLÍKOVÁ Katarína

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Reaktívne metabolity kyslíka sa v organizme bežne využívajú v procesoch post-fagocytárneho priebehu eliminácie patogénov. V prípade expozície zvýšenej koncentrácii kyslíka pri hyperbarických podmienkach sa však rôzne formy kyslíkových radikálov vyskytujú vo vyššej koncentrácii aj v ostatných bunkových a extracelulárnych priestoroch. To predstavuje zvýšenú záťaž a riziko pre detoxikačné systémy, houskeeping gény a ovplyvňujú aj biologický polčas informačných a štruktúrnych biomakromolekúl. V našej štúdii sumarizujeme doterajšie publikované zistenia o úlohe reaktívnych metabolitov kyslíka a antioxidačných systémov v problematike kyslíkovej toxicity.

Kľúčové slová: Reaktívne metabolity kyslíka. Kyslíková toxicita. Hyperbarická oxygenoterapia.

ABSTRACT

Reactive oxygen species are commonly used in the body in post-phagocytic processes of pathogen elimination. However, when exposed to an increased concentration of oxygen under hyperbaric conditions, various forms of oxygen radicals are found to be more concentrated in other cellular and extracellular spaces. This represents an increased burden and risk for detoxification systems, houskeeping genes and also affects the biological half-life of informational and structural biomacromolecules. In our study, we summarize previously published findings on the role of reactive oxygen species and antioxidant systems in oxygen toxicity.

Key words: Reactive oxygen species. Oxygen toxicity. Hyperbaric oxygen therapy.

ÚVOD

Hyperbarická oxygenoterapia (HBOT) patrí medzi terapeutické techniky, ktoré primárne menia vonkajšie podmienky ľudského organizmu. V tomto prípade pacient inhaluje 100%-ný medicínsky kyslík v hyperbarickom prostredí. Práve táto jej nešpecifickosť a generalizovanosť jej efektu na všetky tkanivové a orgánové sústavy je zdrojom oprávnených konštatovaní vo vedeckých publikáciách, že sa jedná o adjuvantnú terapiu. Vzhľadom k multivariabilite parametrov, ktoré svojim účinkom môže ovplyvniť a stimulovať, však patrí aj v prípade terapie viacerých ochorení k aktuálnym výzvam aplikovaného výskumu v biomedicíne [1].

Terapeutické aplikácie HBOT, ako je tomu v prípade mnohých liečebných postupov, majú vnútorný potenciál na vyvolanie viacerých miernych až závažných nepriaznivých účinkov. Možné komplikácie pri liečbe HBOT zahŕňajú barotraumatické lézie (napr. stredné ucho, vnútorné ucho, pľúca, zuby), kyslíkovú toxicitu (centrálnej nervovej sústavy, pľúc), úzkosť i očné poruchy [2]. Pri správnom používaní HBOT sú však závažné nežiaduce účinky zriedkavé a tie, ktoré sa vyskytujú, sú takmer vždy reverzibilné [3].

CIEĽ

Cieľom predkladanej prehľadovej práce je sumarizácia a syntéza výsledkov dostupných literárnych zdrojov, ktoré sú zamerané na klinické a experimentálne štúdie z pohľadu úlohy reaktívnych metabolitov kyslíka a antioxidačných systémov v problematike kyslíkovej toxicity.

KYSLÍKOVÁ TOXICITA

Kyslík môže byť za určitých okolností a stavov toxický voči všetkým bunkám, tkanivám i orgánom ľudského organizmu. Toxicita kyslíka je však striktne závislá od celkovej dávky kyslíka danej pO_2, od dĺžky trvania expozície ako aj od počtu expozícií, ktorému je daný jedinec vystavený. Vo všeobecnosti sú v dostupných literárnych zdrojoch popisované najmä dva druhy kyslíkovej toxicity. Jedná sa predovšetkým o toxicitu centrálnej nervovej sústavy (CNS) a pľúcnu toxicitu. Poškodené však môžu byť aj iné orgány ako sú napr. oko (zúženie zorného poľa, prechodná myopia), srdce, obličky, pečeň a i. [4, 5].

K najčastejšie citovaným hypotézam mechanizmu a patofyziológie kyslíkovej toxicity patrí nadmerná produkcia ROS a RNS. Platí to predovšetkým u stavov s nedostatočnou produkciou vlastných ochranných mechanizmov. Výsledkom pôsobenia oxidačného stresu je následná peroxidácia mastných kyselín, poškodenie štruktúry bielkovín, vrátane enzýmov i poškodenie nukleových kyselín

[4]. Na druhej strane existencia silných antioxidačných obranných mechanizmov a reparačných postupov poskytuje priaznivý pomer rizika a prínosu HBOT spomalením vývoja kyslíkovej toxicity za súčasnej urýchlenej reparácie jeho subklinických účinkov. Vedecké štúdie určené na overenie rozsahu hraníc tolerancie organizmu voči hyperoxii musia nutne používať expozičné podmienky, ktoré produkujú merateľné toxické účinky hyperbarického kyslíka. Je dôležité si však uvedomiť, že terapeutické expozície bežne používané v klinickej praxi sa zriedka približujú k týmto experimentálnym podmienkam [3].

Mechanizmus pôsobenia voľných radikálov v podmienkach hyperoxie

Reaktívne metabolity kyslíka (ROS) sú produkty normálnych bunkových oxidačno-redukčných procesov. Pri podmienkach hyperoxie, sa ich produkcia markantne zvyšuje. Povaha kyslíkovej molekuly ju robí náchylnejšou na jednostranné redukčné reakcie v bunkách a na vytváranie superoxidového aniónu (O_2^-), ktorý je vysoko reaktívny cytotoxický voľný radikál. Môžu byť vytvárané aj iné produkty reakcie kyslíkového metabolizmu, vrátane peroxidu vodíka (H_2O_2), hydroxylových radikálov ($OH^\cdot$) a singletového kyslíka ($^1O_2$). Tieto reaktívne formy kyslíka sú zodpovedné za oxidovanie sulfhydrylových (SH) skupín enzýmov, ktoré interagujú s DNA a podporujú lipoperoxidáciu bunkových membrán [6].

Prvou reakciou reťazca voľných radikálov je lipoperoxidácia. Lipoperoxidy majú následne rušivý vplyv na štruktúru biomembrán, inhibujú enzýmy s SH-skupinami a posúvajú bunkový redoxný stav glutatiónu k oxidácii. Oxidované produkty z prvej reakcie sú prenášané cez sekundárne reakcie na pyridínové nukleotidy s oxidáciou mitochondriálneho nikotínamidadeníndinukleotidu (NADH), ktorý spôsobuje poruchu produkcie energie. Enzýmová inhibícia, zmenená produkcia energie a zníženie alebo strata funkcií môžu byť dôsledkom buď zvýšených peroxidov alebo zníženej antioxidačnej obrany. Hoci bola za experimentálnych podmienok v systéme *in vivo* zvýšená produkcia ROS pred nástupom kŕčov indukovanými HBOT dokumentovaná v bezvedomí potkanov, ich produkcia v asociácii s kyslíkovou toxicitou nebola dostatočne demonštrovaná na ľuďoch. Zistili sa síce zvýšené signály elektrónovej spinovej rezonancie vo vzorkách krvi osôb vystavených HBOT, ale tie sa vrátili do normálu počas 10 minút od ukončenia expozície HBOT [6].

Reaktívne metabolity kyslíka – vybrané klinické štúdie

V štúdii, ktorú uskutočnili Eken so spol. [7] bolo cieľom skúmať účinky hyperbarického kyslíka na oxidačný stres a genotoxicitu. Pätnásť pacientov bolo liečených prostredníctvom HBOT kvôli rôznym patologickým stavom spojeným s hypoxiou. Vzorky krvi boli odoberané pred začatím HBOT a na konci 1., 10. a 20. expozície. Boli študované antioxidačné parametre a genetická toxicita. Nebol zaznamenaný žiadny významný rozdiel v hodnotách superoxiddismutázy (CuZn-SOD), na seléne závislej glutatiónperoxidázy (SeGSH-Px) a malóndialdehydu (MDA) v erytrocytoch. Výsledky naznačujú, že HBOT nespôsobila významné zmeny v antioxidačnej kapacite ani v peroxidácii lipidov, môže však vyvolať genotoxicitu v dôsledku rôznych mechanizmov.

Boloush [8] vo svojej práci vytvoril kritický prehľad, ktorý popisuje metódy, výsledky a závery o prínosoch a poškodeniach indukovaných HBOT vo vzťahu k produkcii voľných radikálov. V štúdii boli zahrnuté poranenia mozgu, cievna mozgová príhoda a niektoré neurologické poruchy. Dôkazy o druhu, frekvencii a závažnosti nežiaducich účinkov HBOT v praxi sú však podľa autorov nedostatočné a obmedzené. Pomer prínosov a poškodení HBOT na poranenie mozgu, mozgovej obrny, či cievnej mozgovej príhody neboli dostatočne študované, pretože dôkazy publikované v klinických štúdiách boli obmedzené. Početné fyziologické zmeny boli spôsobené zvýšenými parciálnymi tlakmi kyslíka (pO_2), čo môže v konečnom dôsledku viesť ku kyslíkovej toxicite CNS. V inej štúdii Mannig so spol. [9] konštatovali, že ak sa zvyšuje pO_2, a tým následné nasýtenie ochranných enzýmov, má to nepriaznivý vplyv na posun ochranných reakcií v smere stimulácie neurónových sietí. Zlyhanie môže nastať pri zvýšenom pO_2, ktorý môže mať za následok tonicko-klonický záchvat až smrť. Pri randomizovaných a kontrolných štúdiách populácie by sa vyžadovala väčšia a dlhodobejšia štúdia s následnou identifikáciou úrovne toxicity kyslíka.

Štúdia Narkowicz so spol. [10] potvrdila teóriu, že vystavenie organizmu vysokým koncentráciám kyslíka spôsobí zvýšenie produkcie kyslíkových radikálov, ktoré môžu vyvolať toxické účinky. Vyšet-

rovaná bola krv osôb, ktoré podstúpili HBOT. Spektroskopia preukázala výrazný nárast veľkosti signálu zapríčinený voľnými radikálmi. Po ukončení expozície HBOT sa signál zmenšil a priblížil k normálu počas 10 minút. Ďalšie testovania krvi odhalili elektrónovou spinovou rezonanciou (ESR) signál askorbátu, vytvorený v červených krvinkách v závislosti od koncentrácie oxyhemoglobínu, ktorý mal vlastnosti nerozoznateľné od osôb, ktoré mali signál ESR askorbátu radikálne iný od prechádzajúcich expozícií HBOT. Predpokladá sa, že následná expozícia HBOT dokáže zvýšiť koncentráciu askorbátu v krvi, čo pravdepodobne odráža zvýšenie spotreby askorbátu v erytrocytoch.

ROS môžu spôsobiť poškodenie DNA. Jedným zo spôsobov detekcie DNA a indukcie ROS je v laboratórnych metódach technika jednobunkovej gélovej elektroforézy (*z angl.* Single Cell Gel Electrophoresis; SCGE). Dennog so spol. [11] skúmali účinok HBOT na poškodenie DNA pomocou SCGE. Bola stanovená konverzia oxidovaných báz DNA do zlomov pomocou bakteriálnej formaminopyrimidín-DNA-glykozylázy (FPG). Na opravu DNA bol použitý enzým, ktorý sa špecificky vryje do DNA v miestach 8-oxoguanínu a formamidopyrimidínu. Stanovenia opakovateľne a jasne poukazovali na poškodenie DNA v leukocytoch všetkých testovaných subjektov po expozícii HBOT. Zvýšené poškodenie DNA bolo zistené bezprostredne na konci liečby. Použitím FPG sa zistilo významné oxidačné poškodenie ihneď po HBOT. Poškodenie DNA bolo detegované iba po prvej expozícii. Autori na záver konštatovali, že k poškodeniu DNA vplyvom ROS generovaných v procese HBOT by nedošlo, ak by úvodná expozícia HBOT mala kratšie trvanie, ktoré by sa pri následných expozíciách postupne zvyšovalo.

Dennog so spol. [12] v ďalšej štúdii poukázali na skutočnosť, že HBOT u ľudí indukuje poškodenie DNA detegované v leukocytoch opäť prostredníctvom SCGE. Použitím FPG zaistili nepriame dôkazy pre indukciu oxidačného poškodenia DNA. 8-hydroxyguanín bola jedna z hlavných zmien DNA vyvolaných ROS. Pre mutagénne lézie zaznamenali indukované mutácie na HPRT lokuse. Zistili tiež genotypy pre glutatiónтransferázu (GST) a testovali vplyv genotypov GSTM1 a GSTT1 na citlivosť. Výsledky ukázali, že aj napriek jasnej indukcii FPG, nebolo zistené žiadne zvýšenie hladiny 8-OHdG a HPRT mutácie v lymfocytoch po expozícii HBOT.

Dennog so spol. [13] testovali mechanizmy, ktoré stanovili antioxidačný stav z krvných elementov pred a po expozícii HBOT. Nenašli rozdiely v koncentráciách antioxidačných vitamínov A, C a E po HBOT. HBOT nemala žiadny vplyv na antioxidačné ochranné systémy v krvnej plazme, ktoré boli merané FRAP-testom alebo na koncentrácie redukovaného glutatiónu, ktorý bol stanovený v plazme alebo v lymfocytoch. Aktivity superoxiddismutázy, katalázy, glutatiónperoxidázy neboli ovplyvnené HBOT. Naproti tomu, syntéza proteínu tepelného šoku HSP70, ktorý hrá dôležitú úlohu v bunkovej ochrane pred oxidačným stresom, bola významne indukovaná v lymfocytoch po jednej expozícii. Zistenie, či zvýšený príjem antioxidantov môže chrániť pri HBOT, ktorá môže poškodiť DNA, nebolo dokázané.

Reaktívne metabolity kyslíka – vybrané experimentálne štúdie

Oxid dusnatý (NO) sa podieľa na vývoji toxicity kyslíka v CNS, pretože inhibícia syntetázy oxidu dusnatého (NOS) významne chráni zvieratá pred hyperbarickým kyslíkom. Zhang so spol. [14] skúmali mechanizmus tejto ochrany. Potkany boli vystavené rôznym koncentráciám O_2 pri tlaku nižšom ako 304 kPa v časovom intervale 15 min. Cerebrálny prietok krvi (CBF) a kyslíkové napätie bolo merané pomocou laserového Dopplerovho merača a O_2 elektródou bez predbežného spracovania NOS s pridaním N-omega-nitro-L-arginínmetylesteru (L-NAME). Autori zistili, že expozícia HBOT významne zvýšila napätie mozgu vzhľadom k tomu, že zmeny v CBF neboli významné. V porovnaní s kontrolnou skupinou potkanov, podávanie L-NAME nezmenilo napätie v mozgu. Autori dospeli k záveru, že účinky L-NAME na okysličenie CBF počas expozície HBOT nedokáže poskytnúť ochranu pred toxicitou.

Arieli so spol. [15] testovali ochranný mechanizmus CNS u potkanov. V štúdii boli použité štyri skupiny potkanov. Potkany, ktoré boli súčasťou kontroly a negatívnej kontroly boli umiestnené v normobarickom prostredí. Dve skupiny potkanov podstúpili HBOT pri tlaku 202 kPa počas 1 hodiny, jedenkrát každý druhý deň. Dvadsaťštyri hodín po stabilizácii jedna z vopred upravených kontrolných skupín potkanov bola exponovaná HBOT (608 kPa) a bola meraná latencia kyslíkovej toxicity CNS. Tkanivá zozbierané z hipokampu a frontálnej

kôry boli hodnotené z hľadiska úrovne enzymatickej aktivity a nitrotyrozínu. V skupine vystavenej tlaku 608 kPa sa latencia kyslíkovej toxicity CNS zvýšila z 12,8 na 22,4 min po stabilizácii. Významný pokles aktivity glutatiónreduktázy a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy a významné zvýšenie aktivity glutatiónperoxidázy boli pozorované v hipokampe potkanov pred pôsobením HBOT. V kôre potkanov, ktoré boli exponované, došlo k významnému zvýšeniu aktivít glutatión-S-transferázy a glutatiónperoxidázy. Opakovaná expozícia HBOT zabezpečila ochranu proti kyslíkovej toxicite CNS. Ochranný mechanizmus zahŕňa zmeny v enzýmových aktivitách antioxidačného systému a nižšej úrovne peroxydusitanu a to najmä v hipokampe.

Chavko so spol. [16] skúmali antioxidačné enzýmy a zápalové cytokíny. Jedna skupina potkanov bola vystavená kontinuálne tlaku 282 kPa až do konečnej eradikácie. Ďalšie skupiny boli vystavené 30, 60 a 120 minútovým expozíciám HBOT, prerušovaným rôznym počtom 30 minútových prestávok. V oddelenom experimente boli zvieratá utratené pred terminálnou expozíciou a pľúcne tkanivá boli zhromaždené na analýzu génovej expresie. Kontinuálna expozícia mala za následok aktiváciu zápalových cytokínov TNF-alfa a IL-1-beta. Pri prerušovaných expozíciách nebola pozorovaná zápalová odpoveď. Expresia hemoxygenázy-1 mRNA bola významne zvýšená u všetkých expozičných skupín, zatiaľ čo mangán-superoxiddismutáza a expresia mRNA boli zvýšené len pri nepretržitých expozíciách. Výsledky ukazujú, že prerušované vystavenie vzduchu chráni pred toxicitou pľúc tým, že inhibuje zápal.

Významným zdrojom ROS je nikotínamidadeníndinukleotidfosfát (NADPH), ktorý po aktivácii vyvoláva tvorbu superoxidu oxidáciou v mitochondriách. ROS sa podieľajú na patogenéze diabetických komplikácií, vrátane neuropatie. HBOT sa používa pri rôznych ochoreniach, no taktiež zvyšuje tvorbu ROS. Účelom štúdie autorov Mutsanami so spol. [17] bolo skúmať účinky pôsobenia HBOT na génovú expresiu NADPH-oxidázy a expresiu génov v pankrease pomocou apocynínu, ktorý je inhibítor NADPH-oxidázy. Expresie génov mRNA súvisiacich s NADPH-oxidázou a apoptózou výrazne vzrástli ($p < 0,05$) v pankrease u diabetických potkanov po HBOT. Podobne, aktivity NADPH-oxidázy a kaspázy-3 sa zmenili súbežne s mRNA. Tieto výsledky naznačujú, že oxidačný stres spôsobený expozíciou HBOT u diabetických zvierat indukuje zánik ROS. Táto štúdia môže prispieť k rozvoju lepšieho pochopenia molekulárnych mechanizmov apoptózy u diabetických pacientov za pôsobenia HBOT.

ZÁVER

K najčastejšie citovaným hypotézam mechanizmu a patofyziológie kyslíkovej toxicity patrí nadmerná produkcia ROS. Tolerancia toxicity kyslíka musí byť preto definovaná v rozsahu bezpečných tlakov na získanie maximálneho úžitku z terapeutických výhod hyperoxie, pričom sa zabráni nežiaducim účinkom. V klinických štúdiách, pri ktorých sa používali odporúčané časové intervaly expozícií a hodnoty tlakov, boli zamerané predovšetkým na poškodenia DNA, oxidačný stres a neurologické poruchy. Štúdie potvrdili teóriu, že vystavenie pacienta vysokým koncentráciám kyslíka spôsobí zvýšenie tvorby kyslíkových radikálov, ktoré môžu vyvolať toxické účinky. Na druhej strane, v niektorých prípadoch sú práve ROS predpokladaným mechanizmom terapeutického účinku HBOT. V experimentálnych štúdiách boli použité niekoľkonásobne vyššie pracovné tlaky v porovnaní s bežnou klinickou praxou HBOT ako aj s klinickými štúdiami publikovanými v dostupných literárnych zdrojoch. Štúdie na zvieratách poukázali, že nástup a rýchlosť progresie otravy kyslíkom môže byť ovplyvnená rôznymi podmienkami, postupom liečby a liekmi a potvrdili tak existenciu kyslíkovej toxicity za daných experimentálnych podmienok.

Na základe dostupných literárnych údajov možno konštatovať, že HBOT aplikovaná v rozsahu pracovných tlakov 1,4 – 3 ATA a pri dĺžke expozície 60 až 90 minút je relatívne bezpečná metóda vo vzťahoch k toxickým vlastnostiam kyslíka. Problematika kyslíkovej toxicity si však vyžaduje ďalšie štúdie.

Poďakovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou projektu „Dobudovanie technickej infraštruktúry pre rozvoj vedy a výskumu na Trenčianskej univerzite Alexandra Dubčeka prostredníctvom hyperbarickej oxygenoterapie“ ITMS kód 26210120019 Operačného programu Výskum a vývoj.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

[1] KRAJČOVIČOVÁ Z., SLOBODNÍKOVÁ J., MELUŠ V., et al. Aplikácia kyslíka za hyperbarických podmienok a možnosti jej využitia v terapii karcinómu prsníka. *MAMO TREN-D´2017*.

Trenčín: TnUAD, 2017, ISBN 978-80-8075-778-6. 14-22.

[2] PLAFKI C., PETERS P., ALMELING M., et al. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviat Space Environ Med.* 2000; 71 (2): 119-124.

[3] NEUMAN T.S., THOM S.R. *Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy*. Saunders Elesvier, Philadelphia, 2008, 606 s., ISBN 978-1-4160-3406-3.

[4] HÁJEK M. et al. *Hyperbarická medicína.* Mladá fronta a.s., Praha, 2017, 453 s., ISBN 978-80-204-4235-2.

[5] BUTLER F.K. Jr., HAGAN C., MURPHY-LAVOIE, H. Hyperbaric oxygen therapy and the eye. *Undersea Hyperb Med.* 2008; 35 (5): 333-387.

[6] KRAJČOVIČOVÁ Z., MELUŠ V., HOLLÁ M. *Hyperbarická oxygenoterapia z aspektu oxidačných a antioxidačných systémov.* Masarykova univerzity Brno, 2017, in press

[7] EKEN A., AYDIN A., SAYAL A., et al. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans. *Clin Biochem.* 2005; 38 (12): 1133-1137.

[8] BOLOUSHI Z.A. *Hyperbaric Oxygen therapy in relation to production of free radicals.* Diplomová práce. Fakulta tělesné výchovy a sportu. Univerzita karlova, Praha, 2009. On-line dostupné na: https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/73410/ [cit. 01.08.2017]

[9] MANNING E.P. Central Nervous System Oxygen Toxicity and Hyperbaric Oxygen Seizures. *Aerosp Med Hum Perform.* 2016; 87 (5): 477-486.

[10] NARKOWICZ C.K., VIAL J.H., MCCARTNEY P.W. Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun.* 1993; 19 (2): 71-80.

[11] DENNOG C., HARTMANN A., FREY G., et al. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis.* 1996; 11 (6): 605-609.

[12] DENNOG C., GEDIK C., WOOD S., et al. Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment. *Mutat Res.* 1999; 431 (2): 351-359.

[13] DENNOG C., RADERMACHER P., BARNETT Y.A., et al. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res.* 1999; 428 (1-2): 83-89.

[14] ZHANG J., SAM A.D., KLITZMAN B., PIANTADOSI C.A. Inhibition of nitric oxide synthase on brain oxygenation in anesthetized rats exposed to hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med.* 1995; 22 (4): 377-382.

[15] ARIELI Y., KOTLER D., EYNAN M., et al. Hyperbaric oxygen preconditioning protects rats against CNS oxygen toxicity. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014; 197: 29-35.

[16] CHAVKO M., MAHON R.T., MCCARRON R.M. Mechanisms of protection against pulmonary hyperbaric O(2) toxicity by intermittent air breaks. *Eur J Appl Physiol.* 2008; 102 (5): 525-532.

[17] MATSUNAMI T., SATO Y., HASEGAWA Y., et al. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J ClinExp Pathol.* 2011; 4 (3): 255-266.