

Stress ossidativo e stato antiossidante in pazienti sottoposti a ossigeno terapia iperbarica*

Serena Benedetti¹, Antonio Lamorgese², Michele Piersantelli¹, Silvia Pagliarani¹, Francesca Benvenuti¹, Franco Canestrari¹

¹Istituto di Chimica Biologica "G. Fornaini", Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

²Medicina Iperbarica, Centro di Terapia e Ricerca, Fano (PU)

ABSTRACT

Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy

Exposure to hyperbaric oxygen (HBO) favourably leads to an increase of dissolved oxygen in the blood; however, increased formation of toxic reactive oxygen species has also been observed. The aim of this study was to evaluate the condition of oxidative stress and the possible modifications of the antioxidant defense systems in twelve patients exposed to 15 HBO treatments not receiving antioxidant supplementation. We found that the prolonged exposure to HBO led to a condition of medium-high oxidative stress with reactive oxygen metabolite and malondialdehyde accumulation. At the same time, a decrease in erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities was observed at the 15th HBO session when compared to the 1st treatment. This preliminary study seems to indicate that, in absence of antioxidant supplementation, the prolonged exposure to HBO leads to a condition of oxidative stress which negatively affect the enzymatic antioxidant defense system.

RIASSUNTO

L'ossigeno terapia iperbarica porta ad un favorevole aumento di ossigeno disciolto nel sangue; tuttavia è stata evidenziata anche una contemporanea formazione di specie reattive tossiche. Scopo di questo studio clinico è stato valutare la condizione di stress ossidativo e le possibili modificazioni dei sistemi di difesa antiossidante in dodici pazienti esposti a 15 trattamenti iperbarici in assenza di supplementazione orale di antiossidanti. I nostri risultati indicano che l'esposizione prolungata all'ossigeno iperbarico porta ad una condizione di medio-alto stress ossidativo con accumulo di metaboliti reattivi dell'ossigeno e malondialdeide. Allo stesso tempo, al 15° trattamento si osserva un decremento delle attività degli enzimi eritrocitari superossido dismutasi e catalasi rispetto alla 1^a seduta. Questo studio preliminare sembra indicare che, in pazienti senza supplementazione di antiossidanti, l'esposizione prolungata all'ossigeno iperbarico porta ad una condizione di stress ossidativo che influisce negativamente sul sistema di difesa antiossidante enzimatico.

INTRODUZIONE

L'ossigeno terapia iperbarica (OTI) comporta l'esposizione del paziente ad una pressione barometrica superiore a quella ambientale (1 atmosfera assoluta o 1 ATA) mentre il soggetto respira una miscela di gas ricca di O₂ o preferibilmente 100% O₂ (1, 2). Le pressioni terapeutiche comunemente usate oscillano tra 2 e 2,8 ATA, poiché respirare 100% O₂ a pressioni di 3 ATA può produrre effetti tossici al sistema nervoso centrale entro pochi minuti. Generalmente l'esposizione all'ossigeno iperbarico (OI) viene ripetuta giornalmente, o al più due volte al giorno nel caso di situazioni di urgenza/emergenza, per una durata di 60-90 minuti.

La OTI è stata utilizzata con successo per il trattamento di numerose condizioni cliniche, come malattie da decompressione, intossicazioni da monossido di carbonio, embolismi gassosi o infezioni tissutali (3). L'esposizione all'OI porta

infatti ad un favorevole incremento di ossigeno disciolto nel sangue; tuttavia è stato dimostrato anche un aumento di specie reattive dell'ossigeno in circolo che possono causare danni a cellule e tessuti (4, 5). Per questa ragione, la OTI sembra essere un buon modello per investigare lo stress ossidativo e le sue conseguenze biologiche.

Ad oggi, la risposta cellulare allo stress ossidativo è stata investigata principalmente in modelli animali (6, 7) e solo pochi studi hanno valutato gli effetti dell'OI nell'uomo. Recentemente, Dennog e collaboratori (8) hanno determinato in vivo la risposta antiossidante a una singola esposizione iperbarica in soggetti sani, non trovando differenze significative nei livelli di antiossidanti coinvolti nella difesa primaria contro lo stress ossidativo prima e 24 ore dopo la seduta iperbarica.

Questo articolo riguarda invece uno studio clinico co-

* Lavoro presentato come comunicazione libera a "SIBioC 2003, 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze 14-17 Ottobre 2003

involgente dodici pazienti sottoposti a 15 OTI (2 x 30 minuti ciascuna) a causa di condizioni patologiche legate all'ipossia. Nessuno dei pazienti riceveva supplementazione di antiossidanti. Al fine di valutare in vivo la risposta antiossidante alla prolungata esposizione all'OI, sono stati misurati alcuni indici di stress ossidativo ed alcuni antiossidanti plasmatici e cellulari in campioni di sangue raccolti sia al 1° che al 15° trattamento iperbarico.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Nello studio clinico sono stati coinvolti dodici pazienti (M=8, F=4, età media 57,5±15,0 anni) del Centro di Terapia Iperbarica di Fano (PU) previo consenso informato. Le principali patologie trattate con l'OTI erano piede diabetico, osteomielite cronica refrattaria e osteonecrosi asettica. Nello studio sono stati inclusi anche otto volontari, appartenenti allo staff medico di assistenza, come gruppo sano di riferimento. Nessuno dei soggetti coinvolti riceveva supplementazione orale di antiossidanti.

Protocollo iperbarico

I pazienti sono stati esposti giornalmente all'OI secondo un protocollo terapeutico routinario: la camera iperbarica (una multiposto della Sistemi Iperbarici, Ardea, Italia) viene pressurizzata con aria compressa mentre il paziente respira con una maschera 100% O₂ ad una pressione di 2,5 ATA per un totale di 60 minuti (2 periodi da 30 minuti), con 3 minuti di intervallo in cui il paziente respira solo aria.

Raccolta dei campioni

I campioni di sangue venoso eparinizzato sono stati raccolti da ciascun paziente prima dell'inizio della seduta iperbarica ed immediatamente all'uscita della camera, sia al 1° che al 15° trattamento. Sangue eparinizzato è stato raccolto anche nel gruppo di soggetti sani.

Le provette sono state subito centrifugate ed il plasma ottenuto aliquotato. Dopo la rimozione del buffy coat, gli eritrociti sono stati lavati con soluzione salina; l'emolisato è stato ottenuto aggiungendo 19 volumi di acqua distillata a 1 volume di eritrociti pacati. Il contenuto di emoglobina nel lisato eritrocitario è stato determinato a 540 nm dopo aggiunta della soluzione Drabkins.

Analisi biochimiche

I seguenti parametri sono stati monitorati durante lo studio clinico: metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) e malondialdeide (MDA) come indici di stress ossidativo; glutazione ridotto (GSH), α -tocoferolo e retinolo come antiossidanti non-enzimatici; superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutazione perossidasi (GPx) come antiossidanti enzimatici eritrocitari.

Determinazione colorimetrica dei ROM

I ROM sono stati valutati nei campioni di plasma con l'utilizzo del "d-ROM test" (Alifax, Padova, Italia) come descritto in (9). In questo test, i ROM plasmatici (principalmente idroperossidi) in presenza di ferro generano radicali alcossilici e perossilici, in accordo con la reazione di Fenton. A loro volta, questi radicali ossidano un'ammina aromatica solubilizzata in una miscela cromogena che li trasforma in derivati di colore rosa quantificati spettrofotometricamente a 505 nm. I dati sono espressi in Unità Carratelli (U CARR); 1 U CARR corrisponde a 0,8 mg H₂O₂/L. I soggetti sani presentano valori di riferimento compresi tra 250 e 300 U CARR; condizioni di leggero, medio e alto stress ossidativo sono definite rispettivamente da valori di 320-360, 360-400 e >400 U CARR.

Determinazione della MDA

L'analisi della MDA come indice di perossidazione lipidica è stata eseguita nei campioni di plasma e di lisato eritrocitario a 535 nm in accordo con il test dell'acido tiobarbiturico come descritto in (10).

Determinazione del GSH

I livelli di GSH nei campioni di plasma ed emolisato sono stati misurati spettrofotometricamente a 412 nm con l'utilizzo dell'acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico come descritto da Beutler (11).

Analisi dell'attività enzimatica

L'attività della SOD è stata valutata negli eritrociti seguendo il metodo descritto in (12). Questo metodo si basa sulla misurazione dell'inibizione dell'ossidazione del NADH da parte del superossido monitorata a 340 nm. Una unità di attività è la quantità di enzima che determina il 50% di inibizione dell'ossidazione del NADH. Le attività della CAT e della GPx sono state determinate negli eritrociti come descritto precedentemente (11).

Analisi delle vitamine antiossidanti

I livelli plasmatici di α -tocoferolo e retinolo sono stati misurati tramite HPLC a fase inversa (Jasco Corporation, Tokyo, Giappone) seguendo il metodo descritto in (13) con modificazioni minori. In breve, 0,1 ml di plasma è stato aggiunto a 0,1 ml di etanolo (contenente α -tocoferolo acetato come standard interno, Sigma, Milano, Italia) e a 0,5 ml di esano. Dopo centrifugazione della miscela, la fase contenente esano è stata raccolta, portata a secco con azoto e risospesa in 0,4 ml di metanolo. L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Alltima C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m, Alltech, Milano, Italia) munita di una pre-colonna Alltima C18 (4,6 x 7,5 mm, 5 m). La fase eluente era costituita da metanolo/acqua (98:2); il flusso era 1,6 ml/min. Il rivelatore UV è stato

settato a 292 nm per l' α -tocoferolo ed a 325 nm per il retinolo. Tutti i solventi organici utilizzati erano puri per HPLC (Carlo Erba, Milano, Italia).

Analisi statistica ed elaborazione dei dati

I risultati sono espressi come media ± 1 deviazione standard. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati il test di Student per dati accoppiati ed il test ANOVA. Sono stati accettati valori di probabilità $< 0,05$. Le statistiche ed i grafici sono stati elaborati usando il software Microcal™ Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, USA).

RISULTATI

Indici di stress ossidativo

Gli indici di stress ossidativo sono mostrati in Tabella 1. Prima di cominciare il trattamento iperbarico, i pazienti presentavano livelli plasmatici medi di ROM entro il range di riferimento (250-300 U CARR) e del tutto paragonabili a quelli del gruppo sano (276 ± 42 vs. 271 ± 40 U CARR). Tuttavia, dopo la prima seduta si osserva un aumento dei livelli di ROM (+24,6%) con valori indicanti un leggero stress ossidativo (320-360 U CARR) e prima del 15° trattamento si raggiunge una condizione di medio stress ossidativo (360-400 U CARR) con valori di 379 ± 57 U CARR (+37,3%, $p < 0,05$) (Figura 1). L'accumulo di ROM durante l'esposizione prolungata all'OI è stato confermato anche dall'aumento dei livelli di MDA: la MDA plasmatica aumenta infatti dell'11,1% dopo la 1ª esposizione iperbarica e del 46,4% ($p < 0,05$) all'inizio del 15° trattamento rispetto ai valori osservati prima della OTI n.1 (Figura 2). Si evidenzia anche un incremento della MDA eritrocitaria alla fine della 1ª sessione iperbarica (+13,0%) e all'inizio del 15° trattamento (+7,3%).

Difese antiossidanti non-enzimatiche

La Tabella 2 mostra i livelli degli antiossidanti non-enzimatici GSH, α -tocoferolo e retinolo. Dopo la 1ª esposizione all'OI, si osserva un incremento dei livelli di GSH; infatti, il GSH plasmatico aumenta del 10,9% ed il GSH

eritrocitario del 6,3% rispetto ai valori iniziali. All'inizio del 15° trattamento i valori di GSH sono comparabili a quelli misurati prima della OTI n.1; ma alla fine della 15ª seduta si evidenzia una diminuzione dei livelli di GSH (rispettivamente -10,1% e -8,9% per il GSH plasmatico ed eritrocitario). Per quanto riguarda le vitamine liposolubili α -tocoferolo e retinolo, i livelli plasmatici non mostrano modificazioni significative durante le ripetute esposizioni all'OI; si osserva solo un leggero decremento del retinolo alla fine del 1° e del 15° trattamento rispetto ai valori iniziali (rispettivamente -5,9% e -8,6%).

Difese antiossidanti enzimatiche

La risposta del sistema di difesa antiossidante enzimatico all'OI è mostrato in Tabella 3. Prima di cominciare il trattamento iperbarico, le attività degli enzimi eritrocitari SOD, CAT e GPx erano paragonabili in soggetti sani e pazienti. Alla fine della 1ª sessione, l'attività della SOD sembra rimanere stabile rispetto al valore iniziale (2023 ± 296 vs 2016 ± 313 UI/grHb), mentre le attività degli enzimi CAT e GPx aumentano rispettivamente del 16,0% e del 13,1% ($12,3 \pm 3,0$ vs $10,6 \pm 1,5 \times 10^4$ UI/grHb per la CAT e $45,8 \pm 5,9$ vs $40,5 \pm 4,2$ UI/grHb per la GPx). Tuttavia, subito prima l'inizio del 15° trattamento si assiste ad una marcata diminuzione dell'attività della SOD (-21,1%) rispetto ai valori misurati prima della OTI n.1 (1590 ± 466 vs 2016 ± 313 UI/grHb) (Figura 3, pannello A). Lo stesso andamento si osserva per la CAT: la sua attività diminuisce del 20,8% prima della 15ª seduta rispetto alla 1ª esposizione ($8,4 \pm 2,4$ vs $10,6 \pm 1,5 \times 10^4$ UI/grHb) (Figura 3, pannello B). A differenza della SOD e CAT, al 15° trattamento non sono stati osservati decrementi nell'attività della GPx ($43,8 \pm 4,7$ vs. $40,5 \pm 4,2$ UI/grHb) (Figura 3, pannello C).

DISCUSSIONE

La presenza di un aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno nel sangue di pazienti esposti all'OI è stata precedentemente dimostrata (5); tuttavia, solo pochi studi hanno investigato in vivo la risposta antiossidante allo stress ossidativo in pazienti sottoposti ad una terapia iperbarica prolungata. In questo studio clinico abbiamo valutato in maniera originale lo stato antiossidante di dodici soggetti esposti

Tabella 1

Indici di stress ossidativo in pazienti al 1° e 15° trattamento di ossigeno terapia iperbarica (OTI)

Momento del prelievo	ROM plasmatici (U CARR)		MDA plasmatica ($\mu\text{mol/L}$)		MDA eritrocitaria ($\mu\text{mol/grHb}$)	
	1ª OTI	15ª OTI	1ª OTI	15ª OTI	1ª OTI	15ª OTI
Prima dell'inizio del trattamento	276 ± 42	$379 \pm 57^*$	$10,91 \pm 2,18$	$15,97 \pm 3,01^*$	$0,355 \pm 0,069$	$0,382 \pm 0,075$
Alla fine del trattamento	344 ± 52	393 ± 60	$12,12 \pm 2,26$	$17,63 \pm 3,50$	$0,401 \pm 0,080$	$0,334 \pm 0,052$

Gruppo sano: ROM 271 ± 40 U CARR; MDA plasmatica $9,89 \pm 1,91$ $\mu\text{mol/L}$; MDA eritrocitaria $0,272 \pm 0,077$ $\mu\text{mol/grHb}$.
* $p < 0,05$ vs 1ª OTI

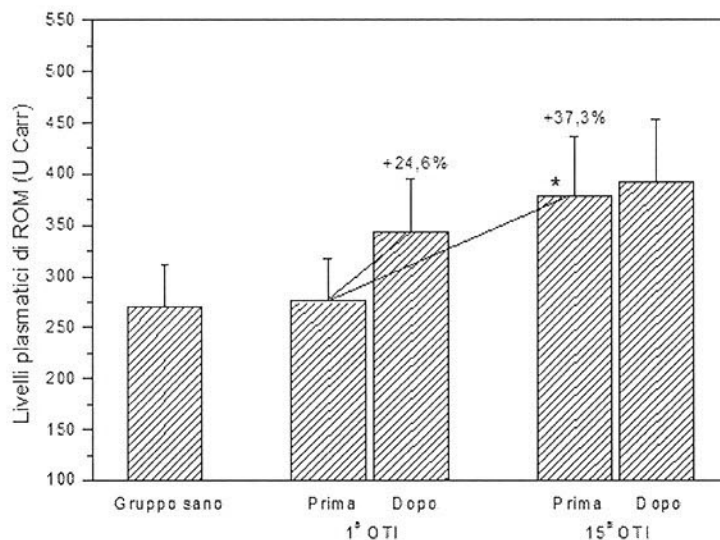


Figura 1
 Effetto dell'ossigeno iperbarico (OI) sui livelli plasmatici di ROM in pazienti esposti a 15 sedute iperbariche. Prima dell'inizio della terapia, i livelli di ROM sono paragonabili in pazienti e soggetti sani; al termine del 1° trattamento si osserva un incremento del 24,6% e prima della 15^a sessione l'aumento è del 37,3% (*p<0,05)

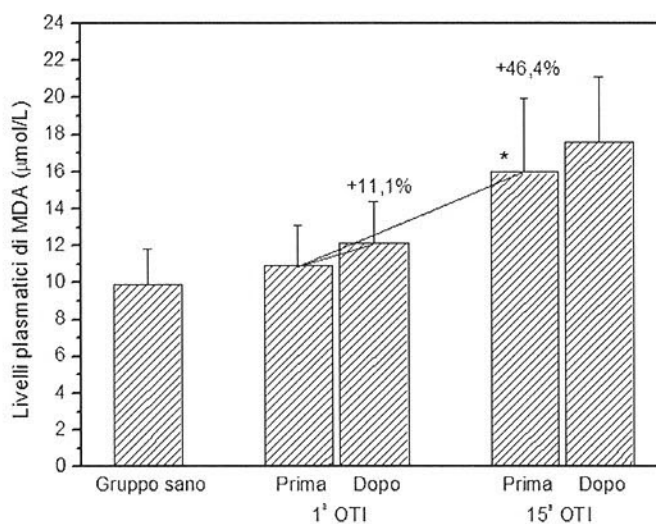


Figura 2
 Effetto dell'OI sui livelli plasmatici di MDA in pazienti esposti a 15 trattamenti iperbarici. Alla fine della 1^a sessione si assiste ad un incremento dell'11,1% nei livelli di MDA; prima della 15^a OTI l'aumento è del 46,4% (*p<0,05)

Tabella 2
 Livelli degli antiossidanti non-enzimatici in pazienti al 1° e 15° trattamento di ossigeno terapia iperbarica (OTI)

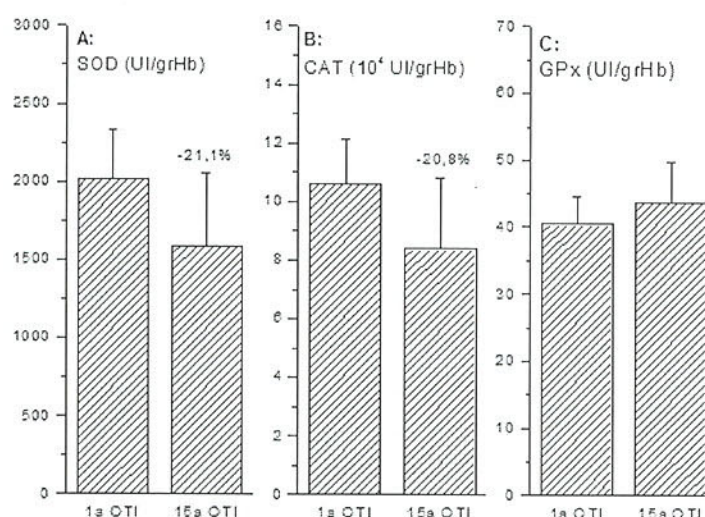
Momento del prelievo	GSH plasmatico (µmol/ml)		GSH eritrocitario (µmol/grHb)		α-Tocoferolo (µmol/L)		Retinolo (µmol/L)	
	1 ^a OTI	15 ^a OTI	1 ^a OTI	5 ^a OTI	1 ^a OTI	5 ^a OTI	1 ^a OTI	5 ^a OTI
Prima dell'inizio del trattamento	0,293±0,068	0,307±0,065	6,22±0,82	6,27±0,068	34,5±3,0	34,5±2,0	2,53±0,42	2,55±0,31
Alla fine del trattamento	0,325±0,70	0,273±0,061	6,61±1,37	5,71±0,99	37,5±2,9	34,3±2,5	2,38±0,24	2,33±0,74

Gruppo sano: GSH plasmatico 0,362±0,082 µmol/ml; GSH eritrocitario 6,70±0,62 µmol/grHb; α-tocoferolo 36,4±1,4 µmol/L; retinolo 2,82±0,33 µmo/L

Tabella 3

Attività degli enzimi antiossidanti eritrocitari in pazienti al 1° e al 15° trattamento di ossigeno terapia iperbarica (OTI)

Momento del prelievo	SOD (UI/grHb)		CAT 810 ^a UI/grHb)		GPx (UI/grHb)	
	1 ^a OTI	15 ^a OTI	1 ^a OTI	15 ^a OTI	1 ^a OTI	15 ^a OTI
Prima dell'inizio del trattamento	2016±313	1590±466	10,6±1,5	8,4±2,4	40,5±4,2	43,8±4,7
Alla fine del trattamento	2023±296	1545±434	12,3±3,0	9,5±2,7	45,8±5,9	47,8±5,6

Gruppo sano: SOD 1914±119 UI/grHb; CAT 9,7±1,3 x 10⁴ UI/grHb; GPx 43,1±4,1 UI/grHb.**Figura 3**

Attività degli enzimi eritrocitari SOD, CAT e GPx valutate subito prima l'inizio del 1° e del 15° trattamento iperbarico. Dopo la prolungata esposizione all'O₂ si assiste ad un decremento dell'attività della SOD (-21,1%) e della CAT(-20,8%); l'attività della GPx non subisce modificazioni apprezzabili

a 15 sedute iperbariche (60 minuti/giorni) a causa di patologie legate all'ipossia e che non ricevevano supplementazione di antiossidanti.

Attraverso la valutazione degli idroperossidi nei campioni di plasma, non è stato evidenziato alcun accumulo di ROM nei pazienti prima di cominciare la OTI. Tuttavia, al termine della 1^a seduta si osserva una condizione di leggero stress ossidativo e dopo 15 sessioni iperbariche si raggiunge una situazione di medio-alto stress ossidativo. Questi dati sembrano indicare che, quando l'esposizione all'O₂ è prolungata, i sistemi di difesa antiossidante non riescono a mantenere i livelli plasmatici di ROM entro il range di riferimento. Il significativo accumulo di ROM è stato confermato anche dalla presenza di un incremento dei livelli plasmatici di MDA come indice di perossidazione delle lipoproteine.

Per quanto riguarda la risposta antiossidante in vivo ai ripetuti trattamenti iperbarici, non sono state evidenziate modificazioni significative nel sistema di difesa antiossidante non-enzimatico; infatti, alla 15^a OTI i livelli di GSH, α -tocoferolo e retinolo sono per lo più comparabili con quelli trovati al 1° trattamento. In accordo con precedenti

studi su modelli animali (14), si è osservato un incremento del GSH plasmatico ed eritrocitario subito dopo la 1^a esposizione all'O₂, probabilmente come risposta adattativa allo stress ossidativo; tuttavia questa evidenza non è stata confermata alla fine della 15^a sessione quando si assiste ad un decremento dei livelli di GSH.

Differenze maggiori sono state trovate a carico del sistema di difesa antiossidante enzimatico. In genere, un aumento della produzione di radicali porta in risposta ad un incremento dei livelli degli enzimi antiossidanti; infatti la CAT e la GPx mostrano attività aumentate al termine dell'esposizione all'O₂, sia al 1° che al 15° trattamento. L'attività della SOD apparentemente rimane invariata alla fine della seduta iperbarica, ma esperimenti preliminari sembrano indicare che l'enzima presenta un massimo di attività a 30 minuti di esposizione all'O₂. In maniera interessante, prima del 15° trattamento si è osservato un decremento nelle attività della SOD e della CAT (-20% circa) rispetto alla 1^a esposizione, mentre la GPx non subisce modificazioni apprezzabili.

La diminuzione dell'attività degli enzimi antiossidanti è

stata descritta in diverse situazioni in vivo (15, 16) ed è stato proposto che la specie maggiormente coinvolta nell'inattivazione della SOD e della CAT è l'ossigeno singoletto. In particolare, Escobar e collaboratori (17) hanno dimostrato che gli enzimi SOD e CAT possono essere inattivati rapidamente dall'ossigeno singoletto e dai radicali perossilici e, quando esposti a concentrazioni simili di ossigeno singoletto, ci si può aspettare una parallela inattivazione di entrambi gli enzimi. Queste osservazioni sembrano ben correlare con i nostri risultati che evidenziano un decremento delle attività della SOD e della CAT in presenza di livelli aumentati di ROM plasmatici.

Ulteriori studi sono già in corso al fine di investigare la possibile relazione tra le modificazioni chimiche degli enzimi causate dalle specie reattive dell'ossigeno e la conseguente inattivazione delle proteine che può ridurre in maniera significativa la concentrazione degli enzimi. Inoltre, è già in corso un nuovo studio clinico per la valutazione della risposta antiossidante in pazienti sottoposti a OTI prolungata ma in questo caso supplementati con antiossidanti orali per l'intera durata del trattamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 1996;334:1642-1648.
2. Leach RM, Rees PJ, Wilmshurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ* 1998;317:1140-1143.
3. Bakker DJ. Hyperbaric oxygen therapy: past, present and future indications. *Adv Exp Med Biol* 1992;317:95-105.
4. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 1986;48:703-719.
5. Narkowicz CH, Vial JH, McCartney P. Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Comm* 1993;19:71-80.
6. Harabin AL, Braisted JC, Flynn ET. Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1990;69:328-335.
7. Etlik O, Tomur A, Dundar K, Erdem A, Gundogan NU. The effect of antioxidant vitamins E and C on lipoperoxidation of erythrocyte membranes during hyperbaric oxygenation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1997;8:269-277.
8. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 1999;428:83-89.
9. Cornelli U, Terranova R, Luca S, Cornelli M, Alberti A. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J Nutr* 2001;131:3208-3211.
10. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-310.
11. Beutler, E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York; 1984.
12. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1986;154:536-541.
13. Catignani GL. An HPLC method for the simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in plasma or serum. *Methods Enzymol* 1986;123:215-219.
14. Shang F, Gong X, Egtesadi S, Meydani M, Smith D, et al. Vitamin C prevents hyperbaric oxygen-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced up-regulation of glutathione in guinea pigs. *J Nutr Biochem* 2002;13:307-313.
15. Fernandez V, Llesuy S, Solari L, Kipreos K, Videla LA, et al. Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 1988;5:77-84.
16. Llesuy S, Evelson P, Gonzalez-Flecha B, Peralta J, Carreras MC, et al. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med* 1994;16:445-451.
17. Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA. Sod and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 1996;20:285-290.