

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN  
Zakład Neurochemii  
Pracownia Farmakoneurochemii

Marcin Gamdzyk

**Hiperbaria tlenowa oraz postkondycjonowanie  
łagodną hipoksją hipobaryczną jako strategie  
terapeutyczne w doświadczalnym modelu asfiksji  
okołoporodowej**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem dr hab. n. med. Elżbiety  
Salińskiej

Warszawa, 2016



*Pani dr hab. n. med. Elżbiecie Salińskiej, promotorce niniejszej pracy, składam serdeczne podziękowania za pomoc i wsparcie udzielone w trakcie pisania rozprawy oraz za opiekę naukową podczas całego okresu pracy.*

*Pani Apolonii Ziembowicz dziękuję za nieocenioną pomoc przy wykonywaniu doświadczeń.*

*Panu Profesorowi Jerzemu Łazarewiczowi dziękuję za cenne uwagi i wskazówki oraz wszelką pomoc.*

Wyniki opisane w niniejszej rozprawie zostały częściowo wykorzystane w następujących publikacjach:

Gamdzyk M, Makarewicz D, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. (2014) Hypobaric hypoxia postconditioning reduces brain damage and improves antioxidative defense in the model of birth asphyxia in 7-day-old rats. *Neurochem Res.* 39(1):68-75.

Badania przedstawione w tej pracy zostały sfinansowane przez grant Narodowego Centrum Nauki nr N N401 003935 oraz ze środków statutowych Zakładu Neurochemii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

## Wykaz ważniejszych skrótów

ADHD	zespół nadpobudliwości ruchowej i deficytu uwagi (ang. attention defficit hyperactivity disorder)
AIF	czynnik indukujący apoptozę (ang. apoptosis-inducing factor)
AMPA	kwask -alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksalopropionowy (ang. alfa-amino-3 hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)
AMPK	kinaza aktywowana 5'AMP (ang. 5' AMP-activated protein kinase)
AP-1	czynnik transkrypcyjny (ang. activator protein 1)
ATA	atmosfera absolutna
ATP	adenozynotrifosforan (ang. Adenosine triphosphate)
Bcl-2	białko inhibitorowe apoptozy (B cell lymphoma antigen-2)
CAT	katalaza (ang. catalase)
CICR	indukowany przez wapń wyrzut wapnia (ang. calcium induced calcium release)
cGMP	cykliczny monofosforan guanozyny
COX-2	cyklooksygenaza 2 (ang. cyclooxygenase 2)
CREB	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP response element-binding protein)
Cu-Zn SOD1	cytoplazmatyczna, cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa
DCF	dichlorofluoresceina
EC-SOD, SOD3	zwnątrzkomórkowa, cynkowo-miedziowa dysmutaza ponadtlenkowa
EEG	badanie elektroencefalograficzne mózgu
ENN	encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna
EPO	erytropoetyna
GABA	kwask $\gamma$ -aminomasłowy (ang. $\gamma$ -aminobutyric acid)
GDNF	czynnik troficzny pochodzenia glejowego (ang. glial cell-derived neurotrophic factor)

GLAST	transporter glutaminianu (ang. GLutamate ASpartate Transporter)
GLT-1	transporter glutaminianu
GPx	peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)
GSH	glutation zredukowany
GSSG	glutation utleniony
GST	s-transferaza glutationu (glutathione S-transferase)
HBO	hiperbaria tlenowa (ang. hyperbaric oxygen)
HH	hipoksja hipobaryczna (ang. hypobaric hypoxia)
H-I	hipoksja-ischemia
Hsp90	białko szoku cieplnego 90 (ang. heat –shock protein 90)
IP3R	receptor trifosforanu inozytolu (ang. inositol 1,4,5-trisphosphate receptor)
JAK	kinazy janusowe (ang. janus kinases)
MAPK	kinaza białka aktywowanego przez mitogen (ang. mitogen-activated protein kinases)
MCAO	okluzja tętnicy środkowej mózgu (ang. middle cerebral artery occlusion)
MCB	monochlorobiman
mGLUR I	receptor metabotropowy dla glutaminianu grupy pierwszej (ang. Metabotropic glutamate receptor)
Mn SOD2	mitochondrialna, manganowa dysmutaza ponadtlenkowa
mPTP	megakanaly mitochondrialne (ang. mitochondrial permeability transition pores )
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NCX	wymiennik sodowo-wapniowy
NF- $\kappa$ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGFI-A	czynnik transkrypcyjny (ang. nerve growth factor inducible genes)
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartate acid)
NO	tlenek azotu (ang. nitric oxide)

NOS	syntaza tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase)
Nrf-2	czynnik transkrypcyjny (ang. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PARP	polimeraza poli-ADP-rybozy (ang. Poly (ADP-ribose)-Polymerase)
PBS	bufor fosforanowy (ang. phosphate buffered saline)
PFA	paraformaldehyd
PI3K	3- kinaza fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PKB(akt)	kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)
PKC	kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
PMCA	pompa wapniowa Ca <sup>2+</sup> - ATPazy błony plazmatycznej (ang. plasma membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase, PMCA)
PND-21	21 dzień po urodzeniu (ang. postnatal day 21)
RFA	reaktywne formy azotu
RFT	reaktywne formy tlenu
RFU	jednostki względne fluorescencji (ang. relative fluorescence units)
RIP	postkondycjonowanie ischemiczne na odległość (ang. remote ischemic postconditioning)
RIPC	prekondycjonowanie ischemiczne na odległość (ang. remote ischemic preconditioning)
RISK	kinazy wczesnej protekcji (ang. reperfusion injury salvage kinase)
RyR	receptor rianodynowy
SAFE	ang. survivor activating factor enhancement
STAT	przebieg sygnału i aktywator transkrypcji (ang. Signal Transducer and Activator of Transcription)
SIRT1	NAD <sup>+</sup> -zależna deacetylaza
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)
TTBS	roztwór soli buforowany Trisem, z dodatkiem Tween-20 (ang. tris-buffered saline with Tween-20)
TTC	chlerek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy (ang. triphenyl tetrazolium chloride)

TUNEL	znakowanie końców dUTP za pomocą terminalnej deoksynukleotydylotransferazy (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)



## Spis treści

<b>Streszczenie.....</b>	<b>12</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>18</b>
<b>1.Wstęp.....</b>	<b>23</b>
1. 1. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna (ENN) jako najczęstsza przyczyna zgonów u płodów i noworodków .....	23
1.1.1. Przyczyny występowania ENN.....	23
1.1.2.Konsekwencje ENN.....	24
1.1.3. Mechanizm powstawania uszkodzenia mózgu w ENN .....	26
1.2. Stres oksydacyjny jako jeden z głównych elementów uszkodzenia neuronów po przebytej ENN .....	28
1.2.1. Reaktywne formy tlenu .....	29
1.2.2 Enzymy antyoksydacyjne i nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne .....	32
1.2.3. Podatność niedojrzałego mózgu na uszkodzenie wywołane stresem oksydacyjnym	35
1.3. Poszukiwanie skutecznych terapii ENN .....	36
1.3.1. Hipotermia jako jedyna stosowana klinicznie forma terapii w ENN.....	36
1.3.2. Kondycjonowanie jako metoda indukcji endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych.....	39
1.3.3. Postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną .....	42
1.3.4 Hiperbaria tlenowa .....	44
<b>2.Założenia i cel pracy .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Materiał i metody .....</b>	<b>52</b>
3.1. Zwierzęta.....	52
3.2. Grupy doświadczalne .....	52
3.3. Model hipoksji-ischemii (H-I, eksperymentalny model asfiksji okołoporodowej).....	52

3.4. Postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną (HH) .....	53
3.5. Hiperbaria tlenowa (HBO).....	53
3.6. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I .....	54
3.6.1. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I na podstawie stosunku masy półkul mózgowych .....	54
3.6.2. Ocena wielkości martwicy mózgu .....	54
3.6.3. Histologiczna ocena uszkodzenia mózgu.....	54
3.6.4. Ocena procesów apoptotycznych.....	55
3.7. Badania behawioralne - test otwartego pola .....	55
3.8. Oznaczenia biochemiczne .....	56
3.8.1. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT).....	56
3.8.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD).....	57
3.8.3. Oznaczanie poziomu białek SOD1 i SOD2 metodą western blot .....	58
3.8.4. Oznaczenie zawartości glutationu zredukowanego (GSH).....	58
3.8.5. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (Gpx) .....	59
3.8.6. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT).....	60
3.9. Analiza statystyczna.....	60
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>61</b>
4.1. Zastosowanie HBO lub postkondycjonowania HH zmniejsza uszkodzenie mózgu szczurzych osesków poddanych H-I .....	61
4.1.1. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na ubytek masy ischemicznej półkuli mózgowej .....	61
4.1.2. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na stopień martwicy mózgu po H-I .....	62
4.1.3. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołane H-I uszkodzenie neuronów w sektorze CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej .....	64
4.1.4. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołaną przez H-I apoptozę obserwowaną w sektorze CA1 hipokampa .....	66
4.2. Wpływ HBO lub HH na zmiany behawioralne wywołane przez H-I .....	69

4.3. Zastosowanie terapii HBO lub postkondycjonowania HH zmniejsza stres oksydacyjny wywołany H-I .....	73
4.3.1. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołane H-I zmiany poziomu reaktywnych form tlenu w mózgach szczurów .....	73
4.3.2. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany aktywności SOD obserwowane w mózgach szczurów po H-I.....	74
4.3.3. Wpływ zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH na wywołane przez H-I zmiany ekspresji różnych izoform SOD w mózgach 7 dniowych szczurów .....	76
4. 3.3.1. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na zmiany ekspresji SOD1 .....	76
4.3.3.2. Wpływ HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany ekspresji SOD2 .....	77
4.3.4. Wpływ zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH na zmiany stężenia GSH obserwowane w mózgu 7 -dniowych szczurów po H-I .....	79
4.3.5. Wpływ HH lub HBO na zmiany aktywność GPx wywołane przez H-I.....	81
4.3.6. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany aktywność katalazy obserwowane po H-I.....	82
<b>5.Dyskusja.....</b>	<b>84</b>
5.1.Potencjał neuroprotekcyny HBO oraz HH w modelu ENN u siedmiodniowych szczurów .....	84
5.2.Model ENN.....	84
5.3. HBO i HH zmniejszają uszkodzenie mózgu po H-I .....	86
5.4.HBO i HH zmniejszają liczbę komórek apoptotycznych po przebytej H-I .....	88
5.5. HBO i HH zmniejszają stres oksydacyjny spowodowany H-I.....	91
5.6.Behawioralne aspekty wpływu hipoksji–ischemii i neuroprotekcynowego działania HBO i HH w modelu ENN.....	92
5.7. Odmienny wpływ HBO oraz HH na zwiększoną aktywność SOD po przebytej H-I .....	95
5.8.Wpływ HBO i HH na aktywność enzymów usuwających H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	99
5.9. Rola równowagi aktywności enzymów antyoksydacyjnych w uszkodzeniu mózgu po H-I .....	101
5.10. Podsumowanie mechanizmów działania HBO oraz HH.....	105
<b>6. Podsumowanie wyników i wnioski .....</b>	<b>107</b>
<b>Piśmiennictwo.....</b>	<b>109</b>

## Streszczenie

Okołoporodowa hipoksja-ischemia (H-I) uważana jest za fundamentalny problem neonatologii. Konsekwencją przebytej H-I jest w różnym stopniu nasilona encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna (ENN). Statystyki pokazują, że w krajach wysoko rozwiniętych ENN stwierdza się u 2-4 na 1000 żywo urodzonych, donoszonych noworodków. W ciężkiej postaci, na skutek znacznych zaburzeń w rozwoju bądź śmierci mózgowej, dochodzi do zgonu dziecka. W sytuacji długotrwanie utrzymującej się H-I, dochodzi do zaburzeń rozwoju z mózgowym porażeniem dziecięcym, zaburzeniami poznawczymi lub/i padaczką włącznie. Wiadomo, że odroczonym skutkiem przebytych komplikacji okołoporodowych mogą być zaburzenia funkcji poznawczych, pamięci i niepełnosprawność intelektualna.

Powszechnie stosowanym eksperymentalnym modelem ENN jest model H-I siedmiodniowych szczurów. Symuluje on patologię neuronów na poziomie molekularnym, występującą w przebiegu ENN. Na skutek H-I dochodzi do zaburzenia metabolizmu energetycznego komórek, spada produkcja ATP, pojawia się kwasica, a w konsekwencji w nadmiarze uwalniany jest glutaminian. Wzrost stężenia glutaminianu powoduje nadmierną aktywację receptorów NMDA, które są receptorami glutaminianergicznymi sprzężonymi z kanałem wapniowym przepuszczalnym dla  $Ca^{2+}$ . Nadmierne pobudzenie receptorów NMDA wiąże się z napływem jonów wapnia do komórek nerwowych, co indukuje ekscytotoksyczne zmiany zwyrodnieniowe o charakterze nekrotyczno-apoptycznym. Konsekwencją powyższych zdarzeń jest uszkodzenie mitochondriów, pojawienie się stresu oksydacyjnego i śmierć neuronów. Rozwija się zapalenie i obrzęk mózgu, a obraz dopełnia uszkodzenie bariery krwi-mózg.

Stres oksydacyjny jest niezwykle ważnym elementem patogenezы wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia komórek nerwowych. W normalnych warunkach, mechanizmy obronne komórek, które utrzymują niski poziom reaktywnych form tlenu (RFT), zapobiegają stresowi oksydacyjnemu. Jednak podczas hipoksji-ischemii rodniki tlenowe są produkowane w nadmiarze, nie są odpowiednio neutralizowane i usuwane,

przez co osiągają stężenia toksyczne, co skutkuje zaburzeniami funkcji komórkowych oraz uszkodzeniem błon lipidowych, białek i DNA. Komórkowy system ochrony przed RFT stanowią przede wszystkim glutation oraz enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza. SOD, występująca u ssaków w trzech głównych formach: cytoplazmatycznej cynkowo-miedziowej (SOD1), mitochondrialnej manganowej (SOD2) oraz zewnątrzkomórkowej cynkowo-miedziowej (SOD3), katalizuje reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu cząsteczkowego. Z kolei enzymami odpowiedzialnymi za utrzymanie niskich stężeń toksycznego w wysokich stężeniach nadtlenku wodoru w komórkach są GPx i katalaza. Glutation bierze udział w detoksykacji nadtlenku wodoru, nadtlenków organicznych i innych reaktywnych form tlenu oraz w odtwarzaniu uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych składników komórki.

Podobnie jak w przypadku udaru mózgu poszukiwania skutecznych terapii neuroprotektoryjnych dla hipoksji-ischemii wciąż nie przynoszą sukcesu i do tej pory, poza hipotermią, nie ma innych terapii czy leków, które mogłyby być z powodzeniem stosowane w klinice neonatologicznej. W związku z tym, uwaga eksperymentatorów w większym stopniu skupia się na metodach alternatywnych, wywołujących pewną tolerancję mózgu na H-I. Do takich alternatywnych form terapii zalicza się hiperbarię tlenową (HBO) oraz postkondycjonowanie łagodną hipoksją hipobaryczną (HH).

W poprzednich latach wykazano, że zastosowanie nieuszkodzającego stresora w mózgu - na przykład krótkiego łagodnego epizodu niedokrwienia po uszkodzającym niedokrwieniu mózgu - może mieć działanie neuroprotektoryjne. Zjawisko to nazwano postkondycjonowaniem i do tej pory nie zdefiniowano mechanizmów nim rządzących. Znane są protektoryjne właściwości postkondycjonowania hipoksyjnego *in vitro* oraz *in vivo* w niedokrwieniu mięśnia sercowego. Podobne nadzieje są wiązane z postkondycjonowaniem hipoksyjnym mózgu. Postkondycjonowanie przypadków udaru mózgu czy asfiksji okołoporodowej nieuszkodzającą ischemią lub klasyczną hipoksją może być, ze zrozumiałych przyczyn, trudne do wprowadzenia w praktyce klinicznej. Dlatego w opisanych w tej rozprawie badaniach zastosowano postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną (HH) - stwarzając warunki zmniejszonego ciśnienia tlenu porównywalne do warunków panujących na wysokości 5000 m n.p.m., lub 10%

stężenia tlenu w warunkach normobarycznych - powodującą względnie łagodne niedotlenienie.

Drugą alternatywną formą terapii stosowaną w tej pracy jest tlenowa terapia hiperbaryczna (HBO). HBO polega na zastąpieniu wdychanego powietrza tlenem podawanym pod zwiększonym ciśnieniem. Hiperbaryczna terapia tlenowa stosowana jest obecnie najczęściej w leczeniu zatrucia tlenkiem węgla, oparzeń, trudno gojących się ran, zatorów gazowych oraz nagłego niedosłuchu. Neuroprotektoryjne działanie hiperbarii tlenowej zostało wykazane w wielu badaniach na doświadczalnych modelach globalnego niedokrwienia mózgu u różnych gatunków zwierząt, jednak ze względu na nieujednolicone procedury, raporty kliniczne nie dają jednoznacznej odpowiedzi, co do efektu protekcyjnego.

Dane z literatury fachowej wskazują na neuroprotektoryjne działanie zarówno HBO jak i HH w niedokrwieniu mózgu u dojrzałych zwierząt oraz niedotlenieniu okołoporodowym, jednak mechanizm tego zjawiska jest wciąż niejasny i pozostaje obiektem badań. Są przesłanki uzasadniające hipotezę roboczą, że jednym z mechanizmów neuroprotektoryjnego działania HBO i HH może być działanie modulujące stres oksydacyjny wywołany przez H-I.

Celem podjętych badań było:

- określenie neuroprotektoryjnego potencjału HBO oraz postkondycjonowania HH w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów
- zbadanie parametrów stresu oksydacyjnego, którego złagodzenie może być jednym z potencjalnych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania HBO oraz postkondycjonowania HH w H-I mózgu osesków szczura.

Neuroprotektoryjne działanie HBO i HH określono na podstawie oceny ich wpływu na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych modelowej ENN, oraz na zachowanie się zwierząt po przebytej hipoksji - ischemii. Behawior zwierząt badano w teście otwartego pola. W celu oceny wpływu HBO oraz HH na spowodowane przez HI zmiany parametrów stresu oksydacyjnego postanowiono zbadać: zmiany poziomu RFT, zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalaza) oraz zmiany

poziomu GSH. Dodatkowo zbadano ekspresję białek SOD1 oraz SOD2 w homogenatach pochodzących z mózgu szczurów poddanych zabiegom HBO lub HH.

Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno terapia HBO jak i postkondycjonowanie HH znacząco zmniejszają uszkodzenia mózgu wywołane H-I. Neuroprotekcynny efekt działania badanych zabiegów manifestował się poprzez zmniejszenie ubytku masy półkuli ipsilateralnej oraz zmniejszenie powierzchni martwicy mózgu. Ponadto HBO oraz HH częściowo zapobiegły zmianom morfologicznym hipokampa uwidocznionym przy pomocy barwienia fioletem krezyłu. Zarówno HBO jak i HH zmniejszały poziom dezorganizacji neuronów w sektorze CA1 hipokampa oraz znacząco zmniejszały ubytki komórek w korze mózgowej. Dodatkowo oba testowane podejścia terapeutyczne hamowały śmierć komórek na drodze apoptozy i nekrozy po przebytej H-I. W badanym oknie terapeutycznym, do 6 godzin po H-I, testowane postępowania skutkowały neuroprotekcją. Jednak w przypadku postkondycjonowania HH najlepsze rezultaty dawało rozpoczęcie terapii 1 godzinę po H-I. W przypadku HBO opóźnienie rozpoczęcia terapii miało mniejszy wpływ na jej skuteczność niż w przypadku HH.

HBO i HH zastosowane po H-I poprawiły niektóre parametry lokomotoryczne u szczurów w teście otwartego pola. Szczury poddane H-I przebyły krótszy dystans oraz były w sposób istotny statystycznie mniej ruchliwe niż zwierzęta z grupy kontrolnej. Poddanie szczurów HBO 1 godzinę po H-I skutkowało zwiększeniem przebytego dystansu oraz przywróceniem ruchliwości do poziomu zwierząt kontrolnych. Zmiany te były statystycznie znamienne w stosunku do parametrów zanotowanych dla zwierząt nie poddanych żadnej terapii. Postkondycjonowanie HH również poprawiało niektóre parametry lokomotoryczne szczurów, jednak w przypadku postkondycjonowania HH istniało mniejsze przełożenie neuroprotekcji odkrytej w badaniach morfologicznych i biochemicznych na neuroprotekcję funkcjonalną.

Zastosowanie zarówno HBO jak i postkondycjonowania HH zmniejszyło obserwowany po H-I wzrost poziomu RFT w półkuli ipsilateralnej. Po H-I odnotowano wzrost aktywności SOD, wskazujący na obronną reakcję organizmu. Zastosowanie HH skutkowało dalszym wzrostem aktywności SOD, co prawdopodobnie pozwoliło na szybszą neutralizację RFT. Natomiast zastosowanie HBO zmniejszyło aktywność SOD,

co, wobec obserwowanych efektów neuroprotekcyjnych, może wskazywać na mniejszą produkcję RFT. Przy pomocy metody western blot zbadano wpływ zastosowanych terapii na zaobserwowane po H-I zmiany ekspresji dwóch izoform SOD. Zbadano ekspresję cytoplazmatycznej izoformy SOD1 oraz izoformy mitochondrialnej SOD2. W mózgach zwierząt poddanych H-I zaobserwowano około 3,5-krotny wzrost ekspresji białka SOD1 w półkulach ipsilateralnych względem grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano zmian ekspresji w półkulach kontralateralnych. U zwierząt, u których zastosowano HBO począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po H-I, ekspresja białka SOD1 w porównaniu do zwierząt niepoddanych żadnej terapii zdecydowanie malała. U zwierząt, które po H-I poddano sesjom HH nie zanotowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji SOD1. W mózgach zwierząt poddanych H-I zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji białka SOD2 w półkulach ipsilateralnych, o 25% względem grupy kontrolnej. Zastosowanie terapii HBO po H-I powodowało częściowy powrót ekspresji białka SOD2 do poziomu grupy kontrolnej, w konsekwencji ekspresja SOD2 nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy kontrolą a grupami poddanymi działaniu HBO. Efekt ten był taki sam, niezależnie od czasu rozpoczęcia terapii. Poddanie zwierząt postkondycjonowaniu HH począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po przebytej H-I spowodowało znamienne statystycznie wzrost ekspresji SOD2 w każdej z tych grup, w porównaniu do grupy H-I. Obserwowany wzrost aktywności SOD po zastosowaniu HH prawdopodobnie wiąże się ze zwiększoną ekspresją SOD2, co wskazuje na istotną rolę tego enzymu w mechanizmie neuroprotekcji po zastosowaniu HH.

Zastosowanie zarówno HBO jak i HH przywróciło wyjściowy poziom stężenia GSH w półkulach ipsilateralnych po H-I. Glutathion jest substratem dla reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową. HH zastosowana 1 godzinę po H-I dodatkowo podwyższała aktywność peroksydazy glutationowej, jednak nie był to wynik znamienne statystycznie. Z kolei HBO skutkowało niewielkim spadkiem aktywności tego enzymu. H-I skutkowało podwyższeniem aktywności katalazy w półkulach ipsilateralnych. Zastosowanie postkondycjonowania HH nie zmieniało podwyższonej aktywności katalazy, natomiast poddanie zwierząt HBO skutkowało obniżeniem aktywności katalazy, co ponownie wskazuje na odmienne mechanizmy działania zastosowanych terapii.



Te dane pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- terapia HBO oraz postkondycjonowanie HH posiadają podobny potencjał neuroprotekcyny w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów
- jednym z mechanizmów neuroprotekcynnego działania HBO i HH może być działanie zmniejszające stres oksydacyjny wywołany przez H-I:

-neuroprotekcynne działanie HH prawdopodobnie związane jest z szybszym i efektywniejszym neutralizowaniem RFT, osiąganym przez dodatkowe uaktywnienie enzymów antyoksydacyjnych - SOD i GPx

-neuroprotekcynne działanie HBO może być związane z mechanizmami redukującymi powstawanie RFT w mózgu po H-I - objawem tego jest obserwowany spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przy równoczesnym zmniejszeniu uszkodzenia mózgu.

## Abstract

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is considered to be a fundamental problem of neonatology. HI may lead to hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). Statistics show that even in developed countries HIE is diagnosed in 2-4 per 1000 live birth, full-term newborns. In severe cases, as a result of significant developmental disorders and brain damage, HIE may lead to death of the newborn. Long lasting HI can result in cerebral palsy, cognitive impairment and epilepsy. It is well documented, that the delayed effects of perinatal complications may include impaired cognitive and intellectual function and memory problems.

Seven day old rat HI model is a widely used experimental model of HIE. It simulates neurons pathology at the molecular level, which occurs during HI. HI results in abnormal energy metabolism, decrease of ATP production, acidosis, and consequently excessive release of glutamate. Increased concentration of glutamate causes excessive activation of NMDA receptors, which are glutamatergic receptors coupled with calcium channel permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ . Overstimulation of NMDA receptors is associated with the influx of calcium ions into the nerve cells, which induces excitotoxic degeneration of a necrotic/apoptotic character. Consequences of these events include mitochondrial damage, oxidative stress and neuronal death. In turn inflammation, brain edema and damage to the blood-brain barrier develop.

Oxidative stress is a very important component of ischemia-induced pathogenesis of neuronal cells. Under normal conditions, the defensive mechanisms of the cell that maintain low concentration of reactive oxygen species (ROS) prevent oxidative stress. However, during hypoxia-ischemia, oxygen radicals are produced in excess, they are not adequately neutralized and removed. Thereby they reach toxic concentrations, resulting in cellular dysfunction and damage to lipid membranes, proteins and DNA. Natural protection against ROS is guaranteed by glutathione and antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase. SOD, which is present in mammal cells in three major forms: cytoplasmic copper-zinc (SOD1), mitochondrial manganese (SOD2) and extracellular copper-zinc (SOD3), catalyzes the

conversion of superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and oxygen. GPx and catalase are enzymes responsible for maintaining low hydrogen peroxide levels, which is toxic in high concentrations. Glutathione is involved in the detoxification of hydrogen peroxide, organic peroxides and other reactive oxygen species and in regeneration of damaged cell components.

Likewise in the case of stroke, seek for effective, pharmacological therapy for hypoxia-ischemia is thus far unsuccessful. Apart from hypothermia, no other treatments or drugs that can be successfully used in neonatal clinic are known. Therefore, efforts of some experimenters have switched towards alternative methods, which induce brain tolerance for HI. These alternative methods include hyperbaric oxygen therapy (HBO) and mild hypobaric hypoxia postconditioning (HH).

In the past, it was shown that applying non damaging stressor to the brain - such as brief episode of mild ischemia after initial, damaging cerebral ischemia - might have a neuroprotective effect to the brain. This phenomenon is called postconditioning and so far mechanisms governing it had not been well defined. Protective properties of hypoxic postconditioning *in vitro* and *in vivo* in myocardial ischemia were reported. Similar hopes are associated with hypoxic postconditioning of the brain. Postconditioning of stroke or perinatal asphyxia patients with non damaging ischemia, or even with classic hypoxia may be, for obvious reasons, difficult, if not impossible to implement in clinical settings. Therefore, in this study hypobaric hypoxia postconditioning (HH) was used. Conditions of reduced oxygen pressure were created, comparable to conditions at an altitude of 5000 m above sea level, or 10% normobaric concentration of oxygen, which caused relatively mild hypoxia.

Second alternative form of therapy used in this study was hyperbaric oxygen therapy (HBO). HBO is defined as breathing 100% oxygen at a pressure higher than atmospheric pressure. Hyperbaric oxygen therapy is currently used mostly for the treatment of carbon monoxide poisoning, burns, wounds difficult to heal, gas embolism and sudden hearing loss. Neuroprotective effect of HBO has been shown in many studies in experimental models of global cerebral ischemia in different animals, but due to the non-standardized procedures, clinical reports do not give a definite conclusion about HBO protective effect.

Data obtained from the literature suggests, that both HBO and HH have a neuroprotective effect in cerebral ischemia in mature animals and in perinatal hypoxia, but the mechanism of this phenomenon is still unclear and is the subject of research. Working hypothesis states that one of the mechanisms of neuroprotective action of HBO and HH can be associated with modulating effect of oxidative stress induced by HI.

The aim of the research was to:

- determine neuroprotective potential of HBO and HH in neonatal rat HI model
- examine the parameters of oxidative stress, which can be one of the potential factors of neuroprotective action of HBO and HH in HI model.

The neuroprotective effect of HBO and HH was determined based on their effects on brain damage of rats subjected to HI model, and based on the behavior of the animals that underwent HI. Behavior of animals was tested in the open field test. To evaluate the effect of HBO and HH on oxidative stress caused by HI, ROS production, changes in the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, catalase) and changes of GSH level were measured. Additionally the expression of SOD1 and SOD2 proteins in homogenates from rat brains after HBO or HH exposure was investigated.

The study showed, that both HBO and HH postconditioning significantly reduced brain damage caused by HI. The neuroprotective effect of the tested methods was manifested by reduced weight loss of ipsilateral hemisphere and a reduction of necrosis. HBO and HH partially prevented morphological changes in the hippocampus, which was visualized using cresyl violet staining. Both HBO and HH in part prevented disorganization of neurons in the CA1 region of the hippocampus and significantly reduced cell loss in cerebral cortex. In addition, both of the tested therapeutic approaches inhibited apoptotic and necrotic cell death in hippocampus. In the studied therapeutic window, up to 6 hours after HI, tested procedures resulted in neuroprotection. However, HH postconditioning gave best results when the treatment was initiated 1 hour after HI. Delay of initiation of the therapy had smaller effect on HBO efficacy than it had on HH postconditioning.

HBO and HH improved some parameters of locomotor activity of rats after HI in the open field test. The rats subjected to HI have traveled shorter distance and had

statistically significant lower mobility than animals in control group. Subjecting rats to HBO 1 hour after HI resulted in an increase in the distance traveled and restoration of mobility to the level of control animals. These changes were statistically significant in relation to the parameters recorded for animals not subjected to any treatment. HH postconditioning also improved some parameters of locomotor activity in rats, but HBO protection discovered in morphological and biochemical studies was better translated to neuroprotection on functional level than HH.

Use of both HBO and HH decreased ROS level in ipsilateral hemispheres observed in HI animals. HI resulted in increased SOD activity, indicating that a defensive reaction was initiated. Use of HH resulted in further increase in SOD activity, which probably allowed more efficient neutralization of ROS. However, using HBO decreased SOD activity, which regarding observed neuroprotective effects, may indicate lower production of ROS. Effects of the applied treatments on the observed changes in the expression of two isoforms of SOD were measured using a western blot technique. Expression of cytoplasmic isoform SOD1 and mitochondrial isoform SOD2 was examined. In the brains of animals subjected to HI, approximately 2.5-fold increase in relation to control group in the expression of SOD1 protein in ipsilateral hemispheres was measured. There were no changes in the expression of SOD1 in contralateral hemispheres. In animals that received HBO therapy starting 1, 3 or 6 hours after HI, SOD1 protein level decreased as compared to animals not treated. Animals which were subjected to HH postconditioning after HI sessions had no statistically significant changes in expression of SOD1. Animals subjected to HI had 25% lower level of the SOD2 protein expression in the ipsilateral hemisphere, compared to the control group. This result was statistically significant. Use of HBO after HI resulted in a partial return of SOD2 protein level to the level observed in control group. SOD2 expression did not differ significantly between the control and HBO treated groups. This effect was similar regardless of the time of initiation of the therapy. Exposure of animals to HH starting 1, 3 or 6 hours after HI resulted in a statistically significant increase in the expression of SOD2 in each of these groups, compared to HI group. The observed increase in SOD activity after exposure to HH conditions may be associated with increased expression of SOD2, indicating important role of this enzyme in the mechanism of neuroprotection of HH.

The use of both HBO and HH restored concentrations of GSH in the ipsilateral hemispheres after HI to the baseline levels observed in control animals. Glutathione is a substrate in a reaction catalyzed by glutathione peroxidase. HH applied 1 hour after HI additionally increased the activity of glutathione peroxidase, but it was not a statistically significant result. By contrast, HBO resulted in a slight decrease in the activity of this enzyme. HI resulted in an increase in catalase activity in the ipsilateral hemispheres. The use of HH postconditioning did not alter the increased activity of catalase, and animals that underwent HBO exposure had slightly reduced activity of catalase, which again points to different mechanisms evoked by HBO and HH.

Obtained data allowed for following conclusions:

- HBO and HH have similar neuroprotective potential in neonatal rat HI model
- one of the mechanisms of neuroprotective effects of HBO and HH may be associated with reduction of oxidative stress induced by HI:
  - neuroprotective action of HH is probably associated with faster and more efficient neutralization of ROS, achieved through additional activation of antioxidant enzymes - SOD and GPx
  - neuroprotective effect of HBO may be related to the mechanisms that reduce formation of ROS in the brain after HI – it is manifested by the observed decrease in antioxidant enzymes activity, accompanied by reduction of brain damage.

## **1. Wstęp**

### **1. 1. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienne (ENN) jako najczęstsza przyczyna zgonów u płodów i noworodków**

Niedotlenienie okołoporodowe, zwane także asfiksją okołoporodową, uważane jest za najczęstszą przyczynę zgonów u płodów i noworodków. Konsekwencją przebytej asfiksji okołoporodowej jest różnie nasilona ENN. Amerykańskie Towarzystwo Pediatryczne (American Academy of Pediatrics – AAP) wraz z Amerykańską Akademią Położnictwa i Ginekologii (American College of Obstetrics and Gynecology – ACOG) zalecają, by używać jedynie terminu ENN zamiast zamiennie stosowanych „uraz okołoporodowy” czy „asfiksja okołoporodowa lub perinatalna” (Szejniuk i Szymankiewicz, 2008). Powyższe wytyczne zostały wprowadzone, gdyż określenie ENN jako jedyne oddaje w pełni istotę patologii niedotlenienia. Oznacza ono stan kliniczny noworodka bez względu na czas wystąpienia niedotlenienia i nie wskazuje na dokładną przyczynę, jak i dalsze rokowanie w przypadku ewentualnych powikłań neurologicznych. Częstość występowania ENN stopnia ciężkiego w USA szacuje się na 2-4 przypadki na 1000 żywych urodzeń (Vannucci i Perlman, 1997). Nie określono dotąd częstości występowania ENN w Polsce. Mimo, iż należy ona do dość rzadko występujących patologii, wiąże się z wieloma ciężkimi i poważnymi powikłaniami neurologicznymi, wpływającymi na dalszy rozwój psychomotoryczny dziecka (Tonse i Raju, 2000; Yeo i Tudehope, 1994).

#### **1.1.1. Przyczyny występowania ENN**

Głównymi czynnikami wpływającymi na zwiększone ryzyko pojawienia się ENN są stany związane ze zmniejszoną rezerwą tlenową, zarówno z przyczyn matczynych, płodowych czy łożyskowych, jak również ich kombinacji (Badawi i wsp., 1998). Wśród pierwszych z nich wymienić należy zatrucia ciążowe, zakażenia wewnątrzrodniowe (Grether i Nelson, 1997), choroby upośledzające wentylację minutową matki (gorączka, astma, niewydolność krążenia), zmniejszające perfuzję i dystrybucję tlenu (wady serca, arytmie, niedokrwistości, choroby układowe), cukrzyca, toczeń rumieniowaty trzewny, niekontrolowane nadciśnienie tętnicze lub niedociśnienie oraz warunki socjoekonomiczne matki (Badawi i wsp., 1998). Do najistotniejszych przyczyn łożyskowych zalicza się upośledzoną dyfuzję tlenu przez łożysko w wyniku

zmniejszenia się jego powierzchni czynnej, zawały łożyskowe, upośledzenie drożności naczyń doprowadzających. Czynniki łożyskowe często związane są z łożyskiem przodującym lub jego przedwczesnym oddzieleniem się (Adamson i wsp., 1995), co prowadzi zazwyczaj do wykonania cięcia cesarskiego w trybie pilnym, które również zwiększa ryzyko wystąpienia ENN (Ito i wsp., 2003). Przyczyny płodowe ENN obejmują małą masę urodzeniową (Badawi i wsp., 1998), niewykształcony układ oddechowy w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie, wady wrodzone, bloki metaboliczne, nieprawidłowości w zapisie kardiokograficznym (KTG) i obecność smółki w płynie owodniowym (Adamson i wsp., 1995). Zmiany w mózgu powstałe w wyniku powyższych mechanizmów zależą nie tylko od ciężkości samej ENN, ale również od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w czasie porodu (Naulty i wsp., 1994) oraz stanu ogólnego noworodka w pierwszych godzinach po porodzie, gdzie czynnikami ryzyka uszkodzenia mózgu są drgawki, hipotonia i hipoglikemia (Simon, 1999; Gadzinowski i Szymankiewicz, 2002). Skutki ENN występują częściej wśród wcześniaków (20%) niż noworodków donoszonych (12%) (Lavrijsen i wsp., 2005), co związane jest z niedojrzałością mózgu i jego zwiększoną wrażliwością na niedotlenienie. Spośród wcześniaków i noworodków z bardzo małą masą urodzeniową około 60% doświadcza asfiksji (Perlman, 2006).

Nie bez znaczenia dla występowania ENN jest również sama specyfika porodu. Czynnikiem komplikującym akcję porodową u człowieka jest specyfika dróg rodnych kobiety, wynikająca z przystosowania do pionowego sposobu poruszania się, a także bardzo duży stosunek obwodu głowy noworodka do reszty ciała. Utrudnia to przechodzenie głowy przez drogi rodne powodując, że czas ekspozycji płodu na skurcze macicy może trwać wiele godzin, doprowadzając do długiego sumarycznie okresu zaciskania pępowiny i następczego niedotlenienia płodu. (Dąmbska, 1990).

### **1.1.2. Konsekwencje ENN**

W ciężkiej postaci ENN, na skutek znacznych zaburzeń w rozwoju, niewydolności wielonarządowej, aspiracyjnego zapalenia płuc, infekcji układowych i śmierci mózgowej dochodzi najczęściej do zgonu dziecka. Ponad 1 milion noworodków umiera każdego roku z powodu obrażeń związanych z asfiksją okołoporodową (Lawn i wsp., 2005). Statystyki pokazują, że nawet w krajach wysoko rozwiniętych, noworodki z



encefalopatią są dość często spotykane w klinice, i stanowią spory odsetek dzieci przyjmowanych na noworodkowy oddział intensywnej opieki medycznej. Spośród nich 10-15% umiera na OIOM-ie, niektórzy autorzy śmiertelność z przyczyn ENN określają nawet na 20%, z czego najczęściej zgon następuje w pierwszym miesiącu życia (Vanucci i Perlman, 1997). U 10-15% noworodków z ENN rozwija się dziecięce porażenie mózgowie, u 25% stwierdza się trwałe uszkodzenie mózgu a u ok. 40% pojawiają się różnego rodzaju zaburzenia neurologiczne, takie jak ślepotą, głuchota, epilepsja, ogólne opóźnienie rozwoju lub problemy lokomotoryczne (Perlman i wsp., 2006). Okołoporodowa hipoksja-ischemia (H-I) to jedna z głównych przyczyn nabytych uszkodzeń mózgu u rozwijających się dzieci, skutkująca powikłaniami w późniejszym życiu (Johnston i wsp., 2001; Volpe, 2001; Dixon i wsp., 2002; Levene i Evans, 2005). Wiadomo, że odroczonym skutkiem przebytych komplikacji okołoporodowych mogą być zaburzenia funkcji poznawczych, pamięci i upośledzenie funkcji intelektualnych (Bona 1997; Hagberg i wsp. 1993). Warto zaznaczyć, że związek przyczynowo-skutkowy ENN i występowania dziecięcego porażenia mózgowego nie jest do końca pewny. Jedynie u 10% dzieci z porażeniem mózgowym, stwierdzono niedotlenienie w okresie okołoporodowym (Lavrijsen i wsp., 2005). Najczęściej były to ciężkie przypadki ENN powikłane niewydolnością wielonarządową.

Szacuje się, iż długoterminowe skutki ENN występują u 80% dzieci z ciężką postacią ENN niezależnie od rasy czy płci (Yeo i Tudehope, 1994) i u 50% dzieci ze stopniem umiarkowanym ENN przebytej w okresie noworodkowym (Schneider, 1993). Noworodki z umiarkowaną postacią ENN, niezależnie od dysfunkcji motorycznych, wydają się wykazywać szeroki zakres deficytów związanych z funkcjami poznawczymi, czyniąc prognozowanie u dzieci w okresie noworodkowym bardzo trudnym. Ponieważ niedobory są często subtelne i odległe w czasie od pierwotnego uszkodzenia, zaburzenia funkcji poznawczych prawdopodobnie nie są w należyтым stopniu diagnozowane u dzieci po przebytej umiarkowanej ENN (Armstrong-Wells i wsp., 2010). W przypadku lekkiego stopnia ENN, większość dzieci nie ujawnia znacznych odchyłeń neurologicznych, jednak w czasie dziewięcioletniej obserwacji stwierdzono, iż 35% z nich miało problemy w nauce w okresie szkolnym (Schneider, 1993). Pomyślnego rokowania można się spodziewać u noworodków, które przeszły jedynie stadium umiarkowanej ENN trwające nie dłużej niż pięć dni i nie doznały ENN stopnia ciężkiego (Jeffrey i Perlman, 2006). Natomiast trudności z karmieniem w

wyniku zaburzonego odruchu ssania i połykania, częste i trudne w opanowaniu napady padaczkowe oraz nieprawidłowy zapis EEG w siódmym dniu po urodzeniu, sugerują istnienie nieprawidłowości neurologicznych i znamionują częstsze zaburzenia w późniejszym rozwoju psychomotorycznym dziecka (Simon, 1999).

### **1.1.3. Mechanizm powstawania uszkodzenia mózgu w ENN**

U podłoża okołoporodowego, niedotlenieniowo-niedokrwiennego uszkodzenia mózgu leży przerwanie krążenia łożyskowego i upośledzenie wymiany gazowej, co prowadzi do deficytów tlenu oraz substratów energetycznych w ośrodkowym układzie nerwowym. Zmniejszone stężenie tlenu powoduje „przełączenie” metabolizmu na mało wydajny tryb beztlenowy, co prowadzi do nagromadzenia mleczanów, a to z kolei utrudnia utrzymanie homeostazy komórkowej. Rozpoczyna się złożony proces patologiczny, który rozwija się po początkowym uszkodzeniu. Początkowa faza uszkodzenia jest bezpośrednio związana z hipoksją w komórkach, która uruchamia kaskadę wewnątrzkomórkowych zdarzeń prowadzących do śmierci komórki.

W wyniku niedoboru tlenu dochodzi do zakłócenia fosforylacji oksydacyjnej, spada produkcja adenosynotryfosforanów (ATP) i zaburzeniu ulega działanie pompy sodowo-potasowej. Konsekwencją powyższej kaskady zdarzeń jest gromadzenie się jonów sodu i chloru w komórce, prowadzące do zatrzymania w niej wody z jej następczym obrzękiem (Walters, 1998). Stan ten prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej neuronów i komórek glejowych oraz uwolnienia glutaminianu, będącego aminokwasem pobudzającym (Novelli i wsp., 1998). Zależne od energii mechanizmy wychwyty zwrotnego nie działają wydajnie i glutaminian kumuluje się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co skutkuje przedłużoną depolaryzacją neuronów i zaburzeniami jonowymi oraz osmotycznymi, uruchamiającymi ciąg dalszych reakcji mogących prowadzić do śmierci komórki (Łazarewicz, 2000). Wzrost stężenia glutaminianu powoduje aktywację receptorów NMDA, które są receptorami glutaminianergicznymi sprzężonymi z kanałem wapniowym przepuszczalnym dla  $Ca^{2+}$  (McDonald i wsp., 1992). W wyniku pobudzenia przez glutaminian receptorów AMPA i przedłużonej depolaryzacji, ulega zniesieniu zależny od napięcia blok magnezowy kanału NMDA. Z kolei pobudzenie receptorów NMDA wzmagają napływ jonów wapnia do komórki, następuje przeładowanie neuronów wapniem, zaburzeniom ulega przekaz informacji w

komórce – wszystko to indukuje ekscytotoksyczne zmiany zwyrodnieniowe o charakterze nekrotyczno-apoptycznym (Łazarewicz i Salińska, 2003; Walters, 1998). Na występujący w przebiegu ekscytotoksyczności wtórny wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia kwasu glutaminowego składa się wyrzut kwasu glutaminowego z zakończeń synaptycznych pobudzonych neuronów, glutaminian uwalniany z komórek ulegających lizie oraz spowolnienie lub odwrócenie zwrotnego pobierania glutaminianu spowodowane depolaryzacją. Wtórnie uwolniony glutaminian może powodować depolaryzację dalszych neuronów – jest to efekt zwany „pętlą glutaminianergiczną”, potęgujący nekrozę wokół pierwotnego ogniska zwyrodnienia neuronów (Łazarewicz i Salińska, 2003).

W niedojrzałym mózgu glutaminian jest ważnym czynnikiem troficznym pośredniczącym w jego prawidłowym rozwoju i plastyczności. Te właściwości niedojrzałego mózgu znacznie przyczyniają się do zwiększenia jego podatności na ekscytotoksyczność, co ma zasadnicze znaczenie dla uszkodzenia tego narządu.

Pobudzenie receptorów metabotropowych dla glutaminianu mGluR I oraz spowodowany aktywacją receptorów NMDA wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  w cytozolu indukuje wyrzut wapnia z zasobów w retikulum endoplazmatycznym (ER) za pośrednictwem receptorów inozytolo(1,4,5)trifosforanowych (IP3R) i rianodynowych (RyR) – to zjawisko mobilizacji wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych ER, wzmacniające sygnał wapniowy, określa się jako indukowany przez wapń wyrzut wapnia (calcium induced calcium release- CICR). Napływ jonów wapnia do neuronów jest ponadto wzmagany przez zahamowanie aktywności energozależnych ATPaz. Spada wydajność pompy wapniowej  $Ca^{2+}$  - ATPazy błony plazmatycznej (ang. plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase, PMCA) usuwającej jony  $Ca^{2+}$  z komórki. Odwróceniu ulega też tryb pracy wymiennika sodowo-wapniowego (NCX).

Ważną rolę w usuwaniu nadmiaru jonów  $Ca^{2+}$  z cytoplazmy odgrywają mitochondria. Są one buforem wapniowym o stosunkowo niskim powinowactwie i dużej pojemności. Pobieranie jonów wapnia przez te organelle zachodzi na zasadzie uniportu napędzanego przez potencjał mitochondrialny. Buforowanie przez mitochondria wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  ma znaczenie regulacyjne i ochronne, ale w określonych warunkach, patologia mitochondriów może

stać się kluczowym elementem mechanizmu zwyrodnienia neuronów (Ankarcrona i wsp., 1995). Przeładowanie mitochondriów wapniem owocuje ich deenergizacją i aktywacją procesu formowania megakanałów (mitochondrial permeability transition pores – mPTP) w błonach mitochondrialnych, oraz uwalnianiem  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondriów. Efektem tego jest uszkodzenie i dysfunkcja mitochondriów oraz dalszy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. mPTP to pory białkowe przepuszczalne dla cząsteczek o masie do 1500 Daltonów, formowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w patologicznych warunkach niedokrwienia, np. podczas udaru. Ten mechanizm, przebiegając ostro w warunkach deenergizacji komórek, przyczynia się do nekrotycznej śmierci neuronów. Z kolei, kiedy proces ten zachodzi powoli, przy utrzymaniu prawidłowej gospodarki energetycznej komórki, może stać się jednym z mechanizmów indukujących apoptozę (Berridge i wsp., 1998).

Pod wpływem jonów wapnia aktywacji ulega szereg enzymów katabolicznych, takich jak endonukleazy, proteazy (kalpajny) i fosfolipazy (Perlman i wsp., 2007). Aktywacja tych enzymów wywołuje uszkodzenie błon komórkowych oraz zmiany w cytoszkieletu komórki, a także prowadzi do uszkodzenia DNA. Zwiększa się również stres oksydacyjny i uwalnianie rodników tlenowych, syntetazy tlenku azotu (NO) (Islam i wsp., 1995) i kaspazy oraz czynników apoptozy z mitochondriów (Blomgren i wsp., 2006). Dochodzi do obrzęku cytotoksycznego komórki i jeszcze większego uwalniania glutaminianu, powodując zamknięcie błędnego koła. Skutkiem opisanych wyżej zjawisk rozwija się zapalenie, martwica i obrzęk mózgu. Obrazu dopełnia uszkodzenie bariery krew-mózg.

## **1.2. Stres oksydacyjny jako jeden z głównych elementów uszkodzenia neuronów po przebytej ENN**

Stres oksydacyjny jest niezwykle ważnym elementem patogenezy wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia komórek nerwowych, w którym pośredniczy wapń. Zaburzenia homeostazy wapnia i niekontrolowany wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach aktywuje produkcję reaktywnych form tlenu, co dodatkowo potęguje zaburzenia homeostazy wapnia (Salińska i Łazarewicz, 2012).

Powyższe procesy są odpowiedzialne za fazę wczesną uszkodzenia neuronów, głównie w korze i zwojach podstawy (Tonse i Raju, 2000). Regionami najbardziej wrażliwymi na niedotlenienie są hipokamp (Ungethüm i wsp., 1996) i komórki

prążkowia (Burns i Kumar, 2003). Stwierdzono, iż neurony w sektorze CA1 hipokampa i neurony leżące okołokomorowo oraz rozwijający się oligodendroglej cechują się zwiększoną podatnością na uszkodzające działanie aminokwasów pobudzających, jakim jest glutaminian. Powyższy fakt może tłumaczyć późniejsze trudności w nauce i zapamiętywaniu u dzieci z ENN w wywiadzie z okresu noworodkowego.

Faza opóźniona uszkodzenia neuronów jest związana z reperfuzją i wtórnym uszkodzeniem mózgu (Tonse i Raju, 2003) a jej stopień zależy od długości i nasilenia asfiksji, temperatury ciała, stopnia rozwoju noworodka i ilości substratów metabolicznych. Faza ta pojawia się w późniejszym czasie od uszkodzenia (godziny i dni) i nie towarzyszą jej zmiany pH (Lorek i wsp., 1994; Vanucci i wsp., 2004). U podłoża jej patomechanizmu leży powstawanie dodatkowej ilości wolnych rodników tlenowych i hydroksylowych, przy współistniejącym niskim stężeniu tlenu dostępnego dla oksydazy cytochromowej. Utrudnione przejmowanie elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów powoduje uwalnianie rodników tlenowych i dalsze uszkodzenia śródbłonna naczyń (Perlman i wsp., 2004). Proces ten dodatkowo pogłębia istniejącą patologię i prowadzi do utrwalenia obrzęku oraz wtórnego zniszczenia neuronów.

### **1.2.1. Reaktywne formy tlenu**

Nadmierna produkcja i uwalnianie reaktywnych form tlenu (RFT) – w tym wolnych rodników - prowadzi do stresu oksydacyjnego, jednego z głównych elementów uszkodzenia neuronów po przebytych niedotlenieniu okołoporodowym (Walters, 1998). Stres oksydacyjny to stan zaburzenia równowagi biochemicznej pomiędzy produkcją i działaniem reaktywnych form tlenu (w tym wolnych rodników) a ich unieczynnianiem, który skutkuje uszkodzeniem elementów komórki (Sies, 1991). Wolne rodniki to bardzo reaktywne związki z nieparzystą liczbą elektronów na najbardziej zewnętrznej orbicie. Powstają one w sposób naturalny w stanie fizjologicznym podczas transportu elektronów w fosforylacji oksydacyjnej, również podczas auto-oksydacji niektórych neuroprzekaźników (norepinefryna, dopamina).

Prawidłowemu metabolizmowi w komórkach organizmu towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu i ich pochodnych – są one ubocznym produktem wielu reakcji redoks. W normalnych warunkach, mechanizmy obronne komórek, które utrzymują

niski poziom stężenia RFT, zapobiegają stresowi oksydacyjnemu. Jednak podczas hipoksji-ischemii rodniki tlenowe są produkowane w nadmiarze, nie są odpowiednio neutralizowane i usuwane, przez co osiągają stężenia toksyczne, co skutkuje zaburzeniami funkcji komórkowych oraz uszkodzeniem błon lipidowych, białek i DNA.

Najważniejsze RFT, ze względu na ich efekty biologiczne w mózgu to anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i rodnik hydroksylowy ( $OH\cdot$ ). Anionorodnik ponadtlenkowy powstaje w mitochondriach podczas jednoelektronowych utlenień w łańcuchu oddechowym, w retikulum endoplazmatycznym w wyniku reakcji katalizowanych przez oksydazę cytochromu P-450, oraz w wyniku procesów enzymatycznych aktywowanych w warunkach ekscytotoksyczności, jak przemiany kwasu arachidonowego na drodze cyklooksygenazy lub lipooksygenazy (Chan, 1998). Nadtlenek wodoru powstaje w mózgu w reakcji dysmutazy ponadtlenkowej, jako produkt uboczny oksydazy monoaminowej, hydroksylazy tyrozynowej i L-amino oksydazy oraz w wyniku autooksydacji kwasu askorbinowego i katecholamin. Rodnik hydroksylowy powstaje w reakcjach Fentona i Habera-Weissa (Lazarewicz i Salińska, 2003).

Wolne rodniki pojawiające się w wyniku hipoksji-ischemii pochodzą z różnych źródeł. Przede wszystkim, jak już wspomniano, brak tlenu uniemożliwia przejście elektronów do oksydazy cytochromowej w łańcuchu oddechowym, co prowadzi do powstania wolnych rodników. Inne ich źródła są związane ze zwiększonym stężeniem wapnia w cytozolu, a dokładniej z reakcją fosfolipazy A z kwasem arachidonowym, z działaniem oksydazy ksantynowej i syntazy tlenu azotu. Komórki mikrogleju również mogą być źródłem wolnych rodników. Zwiększone wytwarzanie wolnych rodników w komórce występujące w stanach zaburzonego metabolizmu, niedotlenienia lub niedokrwienia, prowadzi do uszkodzenia podstawowych struktur komórkowych. Reaktywne pochodne tlenu łatwo reagują z komórkowymi makromolekułami, takimi jak lipidy, białka i DNA, prowadząc do zniszczenia błon komórkowych, niewłaściwej aktywacji lub inaktywacji enzymów, zmian w ich strukturze, oraz do uszkodzenia nici DNA. Wolne rodniki mogą reagować z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi lipidów błonowych, co skutkuje tworzeniem kolejnych wolnych rodników w reakcji łańcuchowej, powodującej nieodwracalne uszkodzenia w komórkach. RFT mogą

również indukować apoptotyczną śmierć komórki poprzez aktywację specyficznych genów śmierci.

Obecność różnych RFT oraz wolnych rodników wewnątrz i na zewnątrz komórek czy tkanek powoduje wiele zmian patologicznych. Ostatecznymi skutkami działania nadmiernej ilości wolnych rodników tlenowych w komórkach organizmu są: mutacje, metaboliczne dysfunkcje, przyspieszone starzenie tkanek (Fridovich, 1978).

Stres oksydacyjny jest elementem wielu stanów patologicznych i chorób ośrodkowego układu nerwowego, np. stwardnienia zanikowego bocznego (Boillee i wsp., 2006), choroby Parkinsona (Miller i wsp., 2009), zaburzenia afektywnego dwubiegunowego (Wang, 2007), czy choroby Alzheimerera (Christen, 2000).

Oprócz RFT, duże spustoszenie po H-I powodują również reaktywne formy azotu (RFA). Powstają one przy udziale tlenku azotu (NO), który sam również zalicza się do RFA. NO ma udział w mechanizmie ekscytotoksyczności, uszkadza strukturę łańcucha DNA oraz mitochondria, może indukować zarówno nekrotyczną jak i apoptotyczną śmierć neuronów (Łazarewicz i Salińska, 2003). NO jest syntetyzowany z L-argininy i tlenu cząsteczkowego przez syntazę tlenku azotu. W mózgu istnieją 3 formy syntazy tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase - NOS): konstytutywna forma neuronalna (nNOS), konstytutywna forma endotelialna (eNOS) i indukowalna forma (iNOS) występująca w astrocytach i komórkach mikrogleju. Obie formy konstytutywne są aktywowane wapniem, a iNOS jest stymulowana przez produkty procesów zapalnych, takie jak cytokiny oraz przez lipopolisacharyd (LPS). Kluczową rolę w mechanizmach zwyrodnienia neuronów przypisuje się nNOS i iNOS (Strosznajder i Chalimoniuk, 2001). W patologicznych warunkach hipoksji-ischemii, wzrost stężenia wapnia w cytozolu wywołany nadmierną aktywacją receptorów NMDA wywołuje zwiększoną aktywność eNOS, co prowadzi do rozszerzenia naczyń. Wzrost poziomu nNOS skutkuje tworzeniem NO, który może dyfundować do neuronów, a w warunkach stresu oksydacyjnego w obecności dużej ilości anionorodnika ponadtlenkowego powstaje szczególnie toksyczna RFA, nadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) (Dickey i wsp., 2011). Może on wchodzić w liczne reakcje, oddziaływać z białkami inaktywując je (np. transporter glutaminianu) lub degradując, może być też induktorem apoptozy (Dawson i wsp., 1993).

### 1.2.2 Enzymy antyoksydacyjne i nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne

Komórkowe układy antyoksydacyjne można podzielić na enzymatyczne i nieenzymatyczne. Na układ enzymatyczny składają się enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR) i katalaza (CAT). Do nieenzymatycznych elementów obrony antyoksydacyjnej zalicza się witaminę E (tokoferole i tokotrienole), witaminę C (kwas askorbinowy),  $\beta$ -karoten, układ tioredoksyny (tioredoksyna i reduktaza tioredoksyny) oraz glutation (GSH) (Kim i wsp., 2015).

Pierwszą linię obrony przed RFT stanowi dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) katalizująca reakcję przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu cząsteczkowego. U ssaków występują trzy główne formy SOD – cytoplazmatyczna cynkowo-miedziowa (Cu-Zn SOD, SOD1), mitochondrialna manganowa (Mn SOD, SOD2) oraz zewnątrzkomórkowa cynkowo-miedziowa (EC-SOD, SOD3) (Fridovich, 1997). RFT są stale produkowane w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, co czyni te organelle szczególnie narażone na utleniające działanie RFT – stąd obecność specyficzniej występującej w mitochondrium formy dysmutazy ponadtlenkowej (Raha i Robinson, 2000). Nieprawidłowe działanie dysmutaz w komórkach organizmu prowadzi do rozwoju wielu patologii (Oberley i wsp., 2000; Visner i wsp., 1990; Zelko i wsp., 2002).  $O_2^{\cdot-}$  mimo, że powstaje w dużych ilościach, nie jest szczególnie toksycznym rodnikiem, jednakże, jak już wcześniej wspomniano, pod wpływem jego reakcji z tlenkiem azotu powstaje bardzo silny oksydant – nadtlenoazotyn ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Groves, 1999).

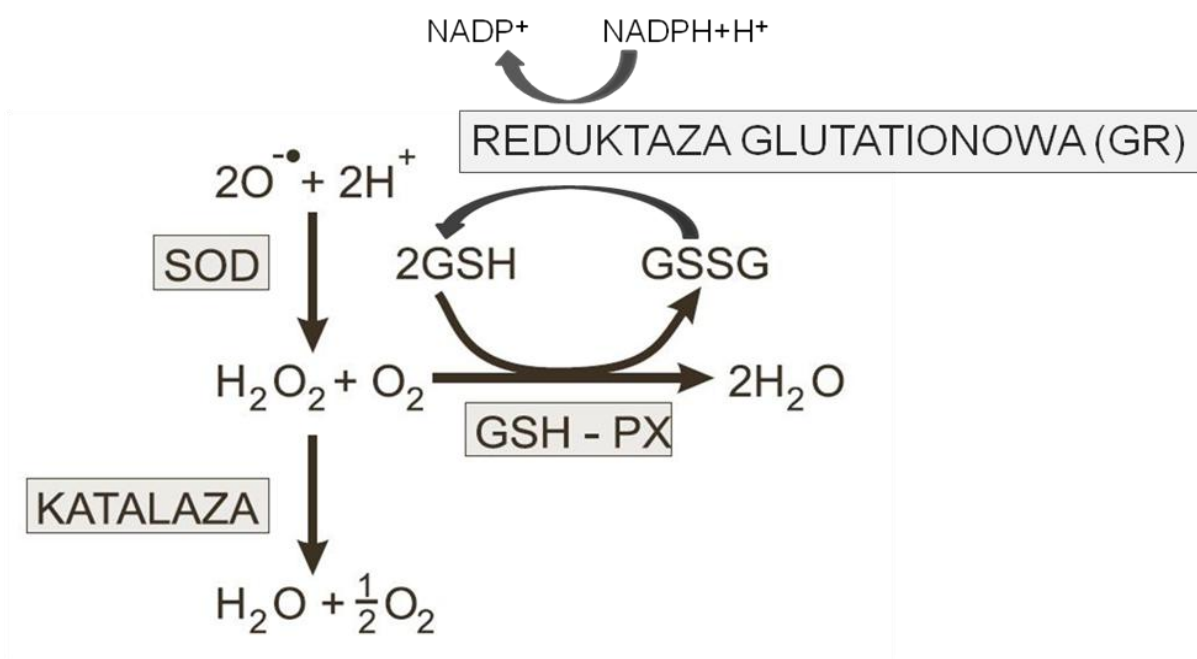
$H_2O_2$  jest naturalnym produktem metabolizmu komórkowego, jednak ze względu na swoje właściwości utleniające, jest związkiem toksycznym dla komórek organizmu, ponieważ może uszkadzać białka, lipidy, cukry oraz DNA. Działanie to jest ułatwione, ponieważ  $H_2O_2$  łatwo dyfunduje przez błony biologiczne i może się pojawiać w innych kompartmentach komórki niż te, w których powstaje (Antunes i Cadenas, 2000; Chance i wsp., 1979; Halliwell i wsp., 2000; Imlay i wsp., 1988; Schubert i Wilmer, 1991). Nadtlenek wodoru w pH 7,0 (obojętnym) łatwo utlenia grupy tiolowe, imidiazolowe, fenolowe, tioestrowe oraz indolowe (Radi i wsp., 1991). Powoduje również utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych w procesie



peroksydacji lipidów, co powoduje zaburzenia struktury błony komórkowej i zmiany jej płynności (Halliwell i wsp., 1999).

Wyżej wymienione właściwości  $H_2O_2$  decydują o tym, że jest on uważany za związek toksyczny. Szczególnie toksyczny jest powstający w reakcji nadtlenu wodoru z anionorodnikiem nadtlenu (reakcja Haber-Weissa, Haber i Weiss, 1934) oraz interakcji  $H_2O_2$  z jonami żelaza (reakcja Fentona) - rodnik hydroksylowy ( $OH\cdot$ ). Jest on najbardziej reaktywnym wolnym rodnikiem – przypisuje mu się udział w uszkodzeniu neuronów w schorzeniach neurozwyrodnieniowych (Coyle i Puttfarcken, 1993). Może on zainicjować proces peroksydacji lipidów w błonach komórkowych, który może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony plazmatycznej neuronów, doprowadzając do śmierci komórki (Olanow, 1993). Mózg jest szczególnie podatny na uszkodzenia związane z peroksydacją lipidów ze względu na dużą zawartość kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (Sinet i wsp., 1979).

Utrzymanie niskich stężeń nadtlenu wodoru w komórkach ( $10^{-9}$ – $10^{-7}$  M) jest możliwe dzięki aktywności katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx), które go usuwają. W fizjologicznych warunkach oba te enzymy kontrolują stężenie  $H_2O_2$  w komórkach, tak żeby nie dochodziło do jego nagromadzenia, co mogłoby prowadzić do toksycznych oddziaływań.



Ryc.1 Schemat reakcji katalizowanych przez enzymy antyoksydacyjne (źródło: opracowanie własne)

Peroksydaza glutationowa redukuje zarówno nadtlenek wodoru, jak i nadtlarki organiczne. GPx odpowiada za katabolizm większości nadtlenu wodoru powstającego w komórkach (Comhair i Erzurun, 2005; Flohe, 1978; Rhee i wsp., 2005). Ma ona większe niż katalaza powinowactwo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, co wskazuje na szczególną jej rolę w detoksykacji tego związku, gdy jego stężenie w komórce jest małe. Przy dużym stężeniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rośnie rola katalazy (Boon i wsp., 1997; Carpena i wsp., 2005; Scandalios, 1992; Switala i Loewen, 2002). Według niektórych badań peroksydaza glutationowa jest w mózgu człowieka siedem razy aktywniejsza od katalazy. Nadto GPx jest zlokalizowana w cytozolu, natomiast katalaza w peroksysomach i w niewielkich ilościach w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, co sugeruje większą rolę peroksydazy w usuwaniu nadmiaru nadtlenu wodoru (Marklund i wsp., 1982). Wydaje się, że inaczej niż w innych organach, katalaza odgrywa w mózgu rolę drugoplanową w tym zakresie (Halliwell, 1992 oraz Marklund i wsp., 1982).

Substratem w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową jest zredukowany glutation (GSH) – za sprawą grupy tiolowej –SH ważny nieenzymatyczny element obrony antyoksydacyjnej. Pod wpływem reakcji peroksydacji GSH ulega utlenieniu do

dwusiarczku (disulfidu) glutationu (GSSG). Reduktaza glutationowa odtwarza zredukowaną formę glutationu kosztem utleniania NADPH. Antyoksydacyjne działanie glutationu wiąże się z detoksykacją nadtlenu wodoru, nadtlenków organicznych i innych reaktywnych form tlenu, a także egzo- i endogennych związków elektrofilnych oraz z możliwością chelatowania niebezpiecznych jonów metali (Pastore i wsp., 2003; Winiarska, 2000). Glutation poza zmiataniem RFT i regeneracją innych antyoksydantów uczestniczy także w odtwarzaniu uszkodzonych składników komórki, DNA, białek i lipidów błon komórkowych uszkodzonych w procesach peroksydacyjnych (Pastore i wsp., 2003). Ponadto związek bierze udział w utrzymaniu prawidłowego potencjału redoks komórek (Cotgreave i Gerdes, 1998), co ma znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu (Ghibelli i wsp., 1998), w procesach wzrostu i różnicowania się komórek (Pastore i wsp., 2003; Poot i wsp., 1995) oraz apoptozy (Hall, 1999). Badania wskazują, że w ośrodkowym układzie nerwowym glutation pełni rolę swoistego neuromodulatora neurotransmisji glutaminianergicznej (Chiueh i Rauhala, 1999; Cooper i Kristal, 1997; Guo i wsp., 1992; Janaky i wsp., 1999; Lorenc, 2003). W typowej komórce eukariotycznej dominuje postać zredukowana glutationu (GSH), postać utleniona (GSSG) stanowi mniej niż 1% całkowitej puli. Zaburzenie tych proporcji może świadczyć o istnieniu stresu oksydacyjnego. Glutation występuje w cytoplazmie, mitochondriach i w jądrze w wysokich stężeniach, dochodzących do 10 mM. Procesom patologicznym może towarzyszyć zarówno obniżenie, jak i wzrost stężenia GSH w określonych tkankach. Obniżenie poziomu GSH stwierdza się w przebiegu wielu schorzeń. Najlepiej udokumentowane obserwacje dotyczą chorób neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, choroba Alzheimer), cukrzycy i powikłań cukrzycowych oraz chorób spowodowanych niedoborami immunologicznymi (np. AIDS)(Wu i wsp., 2004). Poziom GSH obniża się także u ludzi w procesie starzenia (Augustyniak i Skrzydlewska, 2004).

### **1.2.3. Podatność niedojrzałego mózgu na uszkodzenie wywołane stresem oksydacyjnym**

Niedojrzały układ nerwowy jest szczególnie narażony na uszkodzenia wolnorodnikowe wywołane niedotlenieniem i niedokrwieniem. Szczególnie wysokie ryzyko rozwoju uszkodzeń wolnorodnikowych w mózgu, a zwłaszcza w mózgu młodych organizmów, wynika m. in. z najwyższego w organizmie zapotrzebowania na tlen, którego znaczący procent przekształca się w wolne rodniki. To ryzyko wynika również z dużej zawartości

w mózgu metali przejściowych, zwłaszcza żelaza – mózg niedojrzałych organizmów zawiera więcej wolnego żelaza niż mózg dorosłych osobników (większe ryzyko zajścia reakcji Fentona), oraz z wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych będących substratami dla powstawania rodników lipidowych. Ponadto mózg, a w szczególności niedojrzały mózg, cechuje się stosunkowo niewielką aktywnością antyoksydacyjną. Mózg ludzki stanowi tylko 2% masy ciała, a zużywa 20% tlenu i 25% glukozy zużywanych przez całe ciało. Ponad 90% tlenu dostarczanego do mózgu jest wykorzystywane przez mitochondria do produkcji ATP. Dostarczanie tlenu do mitochondriów jest kluczowe w utrzymaniu oddychania tlenowego komórek i produkcji energii. Przywrócenie odpowiedniego poziomu tlenu to krytyczny czynnik w ratowaniu mózgu po niedokrwieniu (Mink i Dutka, 1995).

### **1.3. Poszukiwanie skutecznych terapii ENN**

#### **1.3.1. Hipotermia jako jedyna stosowana klinicznie forma terapii w ENN**

Klasyczna strategia postępowania z niedotlenionym noworodkiem często jest niewystarczająca i pozostawia ślady w postaci deficytów neurologicznych. Podobnie jak w przypadku udaru mózgu, poszukiwania skutecznych leków neuroprotektoryjnych wciąż nie przynoszą sukcesu i do tej pory nie ma środka, który mógłby być z powodzeniem stosowany w klinice neonatologicznej. Znamienne, że większość substancji o potencjale neuroprotektoryjnym, na etapie badań eksperymentalnych powodowało różne skutki uboczne z zaburzeniami rozwoju mózgu włącznie (Johnston i wsp., 2011). Leki takie nie mogą być stosowane w terapii noworodków. Dlatego ciągle poszukuje się alternatywnych metod bezpiecznej i możliwej do zastosowania w warunkach klinicznych terapii, minimalizującej skutki niedotlenienia okołoporodowego.

Szeroka rozbieżność w efektywności strategii leczenia pomiędzy badaniami przedklinicznymi a praktyką kliniczną może być przypisana trudnościom wynikającym z prób przeniesienia wyników badań na zwierzętach do opieki klinicznej. Analizując zakończone już badania kliniczne w tej dziedzinie można zauważyć, że tylko niewielka część strategii terapeutycznych została wybrana w oparciu o wiarygodne, udokumentowane wyniki badań eksperymentalnych na młodych zwierzętach; działanie ochronne niektórych leków zakładano jedynie w oparciu o ich właściwości farmakokinetyczne u dorosłych zwierząt; niektóre formy terapii wybierano dlatego, że

lekarze byli z nimi zaznajomieni stosując je w innych chorobach; inne terapie na zbyt wczesnym etapie badań próbowano przenieść z laboratorium do praktyki klinicznej, ignorując różnice w fizjologii i patologii występujące w modelach gryzoni i u ludzkich pacjentów (Iwata i Iwata, 2010).

Jak dotąd hipotermia jest jedyną skuteczną, coraz szerzej stosowaną formą terapii dla niedotlenionych noworodków (Wachtel i Hendricks-Muñoz, 2011). Badania sugerują, że hipotermia wydłuża czas okna terapeutycznego, i niektóre środki podane w tym czasie mogą zwiększać neuroprotekcję (Edwards i wsp., 2010; Gluckman i wsp., 2005). Wysiłki badawcze są teraz w dużej mierze skupione na badaniach przedklinicznych leków, które działają synergistycznie lub addytywnie z hipotermią. W tym kontekście badane są między innymi: N-acetylocysteina, ksenon, erytropoetyna, melatonina oraz leki przeciwpadaczkowe (Lawn i wsp., 2005; Jatana i wsp., 2006; Ma i wsp., 2005; Kelen i Robertson, 2010).

Obecnie coraz więcej badań poświęconych jest wybiórczej hipotermii mózgowej, jako nowej metodzie zapobiegania uszkodzeniu neuronów. Te pionierskie sposoby neuroprotekcji zostały poddane jak dotychczas niewielu badaniom klinicznym i niemożliwe jest dokładne określenie stopnia ich skuteczności, jak i ewentualnych powikłań. Prawdopodobnymi teoriami tłumaczącymi korzystne działanie hipotermii są obniżenie metabolizmu i zużycia energii, dzięki czemu zmniejszają się: wyrzut aminokwasów pobudzających, zaburzenia przepływu jonów, przepuszczalność śródbłonna, obrzęk, uszkodzenie bariery krew-mózg i apoptoza spowodowana przez ENN (Vanucci, Perlman, 1997). Wydaje się, że chłodzenie hamuje wiele ścieżek prowadzących do śmierci komórki i może modyfikować niektóre ścieżki komórkowe prowadzące do apoptozy. Obniżenie temperatury ciała prowadzi do zmniejszenia zapotrzebowania metabolicznego komórek - oszacowano, że zmniejszenie temperatury o jeden stopień Celsjusza spowalnia metabolizm mózgowy o 5%. Hipotermia może również chronić neurony poprzez normalizację pobierania glutaminianu, oraz przez zmniejszenie produkcji toksycznego tlenu azotu i wolnych rodników (Dickey i wsp., 2011)

W 2006 roku w USA wprowadzono do codziennej praktyki metodę zwaną The Olympic Cool-Cap System, sprawdzoną do tej pory w badaniu randomizowanym przez

Gluckmana i wsp. (2005). W trakcie leczenia noworodków o umiarkowanym lub ciężkim stopniu ENN (stwierdzonym na podstawie zapisu EEG), stosowano hipotermię, obniżając temperaturę fizjologiczną o 3-4°C, czyli do 33-34°C. Następnie po upływie 72 godzin rozpoczynano stopniowe ocieplanie organizmu, trwające 6-8 godzin. Spośród noworodków leczonych metodami konwencjonalnymi, 66% zmarło lub doznało ciężkiego uszkodzenia mózgu w okresie 18 miesięcy w porównaniu do 55% leczonych metodą cool-cap. Nie stwierdzono jednak korzyści z leczenia metodą cool-cap noworodków z najcięższym stopniem ENN. Badanie to odnosi się jedynie do krótkoterminowych obserwacji i ukazuje skuteczność leczenia hipotermią w przypadku umiarkowanej ENN. Inną metodą jest innowacyjna jeszcze hipotermia całego ciała (whole-body cooling), przebiegająca na podobnej zasadzie jak cool-cap, jednakże z szybszym uzyskiwaniem niższej temperatury organizmu. W badaniu Shankarana i wsp. (2005) porównano efekty terapii noworodków z ciężką ENN, leczonych metodami klasycznymi i hipotermią całego ciała. Okazało się, że 62% noworodków leczonych konwencjonalnie w porównaniu z 44% leczonymi hipotermią, doznało ciężkich powikłań ENN lub zmarło.

W fazie badań doświadczalnych znajdują się również metody stosowania allopurinolu, wysokich dawek fenobarbitalu oraz siarczanu magnezu. Van Bel i wsp. (1998) przeprowadzili zestawienie efektów terapii 22 noworodków, z których połowa otrzymywała allopurinol, a pozostali pacjenci placebo. Ponieważ lek ten usuwa wolne rodniki tlenowe, wiązano z nim nadzieję na skuteczność terapeutyczną w stanach niedotlenienia. Badania na zwierzętach wykazały skuteczność allopurinolu nawet przy podaniu w czasie opóźnionej fazy uszkodzenia neuronów w przebiegu ENN (Palmer i wsp., 1993). Van Bel i wsp. (1998) stwierdzili poprawę mózgowego przepływu krwi oraz zwiększoną przeżywalność noworodków z ENN leczonych allopurinolem w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza retrospektywna przeprowadzona przez Nelsona i Grethera (1995) dotycząca stosowania siarczanu magnezu u kobiet w ciąży wykazała działanie ochronne przed ewentualnym występowaniem porażenia mózgowego u noworodków urodzonych przedwcześnie. Lek ten stosowany jest standardowo u ciężarnych w stanie przedrzucawkowym, głównie ze względu na działanie jonów magnezu mających zapobiegać rozwojowi rzucawki ciężarnych. Trwają również badania nad możliwością neuroprotekcijnego działania siarczanu magnezu i jego rolą w

zapobieganiu uszkodzeniom ośrodkowego układu nerwowego płodu (Gathwala i wsp., 2010; Bhat i wsp., 2009).

### **1.3.2. Kondycjonowanie jako metoda indukcji endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych**

W związku z brakiem skutecznej farmakoterapii, rosnące zainteresowanie skupia się na zaangażowaniu endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych w H-I, które prowadzą do indukcji tolerancji mózgu poprzez pre- lub postkondycjonowanie. Pre- oraz postkondycjonowanie definiuje się jako ekspozycję na działanie nieuszkodzającego czynnika stresowego odpowiednio- przed lub po epizodzie ischemicznym.

Kondycjonowanie ischemiczne to zjawisko po raz pierwszy opisane w 1986 roku w sercu, gdzie krótkie, nieuszkodzające epizody niedokrwienne zastosowane przed uszkadzającą ischemią zwiększały odporność mięśnia sercowego na uszkodzenie (Murry i wsp., 1986). Zjawisko to nazwano prekondycjonowaniem ischemicznym. Efekt zwiększonej odporności na ischemię udało się uzyskać u wszystkich testowanych gatunków zwierząt, to jest u psa (Murry i wsp., 1986; Gross i Auchampach, 1992), myszy (Sumeray i Yellon, 1998), szczura (Li i Klöner, 1992), świni (Schott i wsp., 1990), królika (Cohen i wsp., 1991), makaka (Yang i wsp., 2010) i gołębia (Rischara i McKean, 1998). Zjawisko to zaobserwowano również u człowieka- w wielu narządach, w tym w sercu, nerkach i mózgu (Yellon i Downey, 2003).

Korzystne efekty prekondycjonowania ischemicznego w terapii udaru są bardzo dobrze udokumentowane (Kirino 2002; Pignataro i wsp., 2009; Sanders i wsp., 2010). Udowodniono, że również prekondycjonowanie hipoksyjne skutkuje protekcją w modelu hipoksji-ischemii u szczura (Gustavsson i wsp., 2005; Sanders i wsp., 2010; Vannucci i wsp., 1998), a mechanizm protekcji obejmuje wzrost stężenia glikogenu i ATP (Brucklacher i wsp., 2002), wzrost ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) (Feng i wsp., 2010) oraz redukcję apoptozy (Cantagrel i wsp., 2003). Co istotniejsze wykazano, że prekondycjonowanie hipoksją hipobaryczną chroni szczury przed ostrą hipoksją (Stroev i wsp., 2004) oraz indukuje tolerancję na ischemię u szczura (Gong i wsp., 2011) i gerbila (Duszczyk i wsp., 2009).

Jednak z oczywistych przyczyn prekondycjonowanie wydawało się niepraktyczne i trudne do wprowadzenia w praktyce klinicznej. Później okazało się, że indukowanie krótkich epizodów łagodnego niedokrwienia i reperfuzji w sercu i mózgu, po przedłużonej, uszkodzającej ischemii, ma działanie ochronne porównywalne do prekondycjonowania. Zjawisko to analogicznie nazwano postkondycjonowaniem ischemicznym (Pignataro i wsp., 2008). Po raz pierwszy zostało ono opisane w mięśniu sercowym, i polegało na przerywaniu reperfuzji na wczesnym etapie fazy reperfuzyjnej po uszkodzeniu niedokrwienym. W ten sposób uzyskano protekcję na poziomie 44% (Zhao i wsp., 2003). Te wydawać by się mogło nieprawdopodobne wyniki, zostały powtórzone w kilku laboratoriach (Skyschally i wsp., 2009), na eksperymentalnych ischemiach u szczura (Obal i wsp., 2005), myszy (Kin i wsp., 2005), królika (Królikowski i wsp., 2006), świni (Iliodromitis i wsp., 2006) oraz w warunkach *in vitro* (Dosenko i wsp., 2006).

Ze względu na fakt, że metoda ta może być stosowana po incydencie niedokrwienia, świetnie nadawała się do badań klinicznych człowieka w niedokrwieniu mięśnia sercowego (Thibault i wsp., 2007), gdzie ma miejsce mechaniczne sterowanie reperfuzją. W badaniu przeprowadzonym u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (ang. ST elevation myocardial infarction - STEMI) wykazano, że postkondycjonowanie ischemiczne w bardzo znaczący sposób zmniejsza ognisko martwicy w mięśniu sercowym (Staat i wsp., 2005).

Postkondycjonowanie wydaje się obiecującą strategią terapeutyczną również w ischemicznym uszkodzeniu mózgu. Na podstawie licznych badań stwierdzono, że mechanizmy niedokrwienego uszkodzenia mózgu mają wiele cech wspólnych z mechanizmami niedokrwienia mięśnia sercowego. Należy tu wymienić: występowanie uszkodzenia poreperfuzyjnego (Kinouchi i wsp., 1991), zaangażowanie szlaków nekrotycznych związanych z kalpainą (Yamashima, 2000), szlaków apoptotycznych związanych z cytochromem c/kaspazą (Chen i wsp., 1998), szlaków kinaz aktywowanych mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinases – MAPK) (Noshita i wsp., 2002), szlaków kinazy białkowej C (ang. protein kinase c - PKC) (Shimohata i wsp., 2007) oraz szlaków kinazy białkowej B (Akt) (Zhao i wsp., 2005). W zwierzęcych modelach udaru postkondycjonowanie ischemiczne zmniejsza rozmiar martwicy w ogniskowym (Zhao i wsp., 2006; Xing i wsp., 2008; Pignataro i wsp.,



2008) i globalnym (Wang i wsp., 2008) niedokrwieniu mózgu. W modelu udaru i zawału mięśnia sercowego po postkondycjonowaniu ischemicznym stwierdzono poprawę we wskaźnikach metabolicznych mózgu, przepływie mózgowym i długotrwałą protekcję (Zhao, 2007). Otwiera się więc ogromny potencjał dla neuroprotekcji noworodków z ENN, zwłaszcza w świetle innych badań, których wyniki pokazują, że w modelach udaru postkondycjonowanie ischemiczne, zainicjowane nawet 3 i 6 godzin po wyjściowym niedokrwieniu poprawia metabolizm mózgu, normalizuje mózgowy przepływ krwi i zapewnia długoterminową ochronę (Ren i wsp., 2008). Okazało się również, że postkondycjonowanie redukuje rozmiar martwicy, jeśli wykona się je natychmiast po reperfuzji lub 3 godziny po reperfuzji (Ren i wsp., 2008). Taka interwencja jest strategią trudną, acz teoretycznie możliwą do zrealizowania w warunkach klinicznych, która mogłaby być stosowana w czasie reanimacji lub w ciągu pierwszych kilku godzin po porodzie noworodka z rozwijającą się encefalopatią spowodowaną okołoporodowym niedotlenieniem/niedokrwieniem. Postkondycjonowanie ischemiczne zostało w 2009 roku nazwane nową drogą ochrony mózgu przed udarem, lecz potrzebne są dalsze badania na różnych modelach zwierzęcych (Zhao i wsp., 2009).

Okazało się, że podobne efekty można uzyskać stosując hipoksję. Opisano protekcyjne właściwości postkondycjonowania hipoksyjnego w kardiomiocytach szczura *in vitro* (Sun i wsp., 2005; Wang i wsp., 2006) oraz w mózgu myszy *in vivo* i w neuronach *in vitro* (Leconte i wsp., 2009). Według najnowszych badań, zarówno pre- jak i postkondycjonowanie hipoksyjne zmniejszają uszkodzenie mózgu w szczurzym modelu hipoksji – ischemii (Galle i Jones, 2013). Podobne nadzieje są związane z postkondycjonowaniem hipoksją hipobaryczną.

W tym miejscu warto wspomnieć o pre- oraz postkondycjonowaniu na odległość (RIPC- ang. remote ischemic preconditioning, prekondycjonowanie ischemiczne na odległość; RIP- ang. remote ischemic postconditioning, postkondycjonowanie ischemiczne na odległość). Jest to metoda indukcji tolerancji na niedokrwienie, uzyskana za pomocą pre-lub postkondycjonowania organu/narządu innego niż ten dotknięty uszkodzeniem niedokrwieniowym (Loukogeorgakis i wsp., 2007). W chwili pisania niniejszej rozprawy przebiega kilka badań klinicznych nad możliwością wykorzystania tej metody w chorobach serca, nerek i mózgu (Veighey i MacAllister,

2012). Liu i współpracownicy (Liu i wsp., 2014) wykazali skuteczność RIP u szczura w modelu niedokrwienia mózgu. Zaciskanie tętnicy udowej skutkowało zmniejszeniem obszaru martwicy oraz obrzęku mózgu. Mechanizm prawdopodobnie obejmuje efekt antyapoptotyczny poprzez wzrost ekspresji białka Bcl-2, oraz redukcję odpowiedzi zapalnej. Stwierdzono spadek ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B.

### **1.3.3. Postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną**

Postkondycjonowanie przypadków udaru mózgu czy asfiksji okołoporodowej nieuszkodzającą ischemią czy nawet klasyczną hipoksją może być, ze zrozumiałych przyczyn, trudne do wprowadzenia w praktyce klinicznej. Dlatego interesującą alternatywą wydaje się zastosowanie postkondycjonowania hipoksją hipobaryczną (HH) - stwarzając warunki zmniejszonego ciśnienia tlenu porównywalne do warunków panujących na wysokości 5000 m n.p.m., lub 10% stężenia tlenu w warunkach normobarycznych - powodującą względnie łagodne niedotlenienie. Hipoksja hipobaryczna to wystandaryzowana technika postkondycjonowania mogąca mieć zastosowanie w klinice - jest już używana w baroterapii oraz w treningu pilotów wojskowych i himalaistów. W przeciwieństwie do innych technik implementujących hipoksję, takich jak oddychanie mieszkanką ze zubożoną zawartością tlenu, warunki hipobaryczne uzyskane w komorze hipobarycznej symulują naturalne warunki panujące na dużych wysokościach nad poziomem morza. Korzyści płynące z przebywania w takich warunkach znane są od dawna (Rybnikova i wsp., 2012). Najnowsze wyniki wskazują na potencjał neuroprotektoryjny HH u dorosłych szczurów w modelu ostrej hipoksji - postkondycjonowanie HH zwiększa przeżywalność neuronów w obszarze CA1 hipokampa oraz poprawia parametry zwierząt w testach behawioralnych (Rybnikova i wsp., 2012).

Do tej pory nieznane są mechanizmy rządzące postkondycjonowaniem HH. Istnieją pewne dane z badań nad postkondycjonowaniem ischemicznym serca oraz mózgu sugerujące, że neuroprotektoryjne mechanizmy postkondycjonowania mogą w dużej części pokrywać się z mechanizmami aktywowanymi przez prekondycjonowanie (Yang i wsp., 2004). Biorąc pod uwagę wyniki prac nad kondycjonowaniem ischemicznym oraz mając na względzie podobieństwo zjawisk pre- oraz postkondycjonowania HH, można przypuszczać, że mechanizm ich działania jest w

pewnej części wspólny. Złożony mechanizm postkondycjonowania HH prawdopodobnie obejmuje działanie adenozyiny, erytropoetyny (EPO), tlenu azotu, reaktywnych form tlenu, cytokin, białek anti-apoptotycznych oraz molekuł sygnałowych takich jak kinaza ERK, RISK i Akt (Rybnikova i wsp., 2012). Wykazano, że mechanizm prekondycjonowania HH jest związany ze wzrostem ekspresji białek anti-apoptotycznych z rodziny Bcl-2 oraz czynników transkrypcyjnych CREB, NF- $\kappa$ B, NGFI-A (Rybnikova i wsp., 2009; Rybnikova i wsp., 2008; Rybnikova i wsp., 2007; Rybnikova i wsp., 2006; Rybnikova i wsp., 2005; Rybnikova i wsp., 2002). Te czynniki transkrypcyjne aktywowane przez HH w korze mózgowej i hipokampie szczura zmieniają ekspresję genów, których produkty są zaangażowane w mechanizmy regulujące apoptozę oraz przeżycie neuronów.

Podobnie jak w przypadku prekondycjonowania ischemicznego, najważniejszym, bezpośrednim efektem w postkondycjonowaniu wydaje się być zahamowanie tworzenia megakanałów mitochondrialnych (Argaud i wsp., 2005; Gateau-Roesch i wsp., 2006). Podczas niedokrwienia tworzenie megakanałów mitochondrialnych jest hamowane przez kwasotę, jak się przypuszcza poprzez blokowanie wiązania wapnia do cyklofilin. Podczas reperfuzji pH szybko wzrasta do 7.4 i zanim aktywacji ulegnie kinaza białkowa C (PKC), niezbędny element w transdukcji sygnału, tworzą się megakanały, co skutkuje nekrozą ischemicznych tkanek. Postkondycjonowanie pozwala na podtrzymanie lekko kwaśnego środowiska przy jednoczesnym natlenowaniu tkanek, dzięki czemu możliwa jest aktywacja PKC przy zablokowanych megakanałach. Gdy ścieżka sygnałowa PKC zostaje aktywowana, komórki są w stanie zahamować tworzenie mPTP, hamując nekrozę (Cohen i wsp., 2007; Cohen i wsp., 2008). Po przywróceniu dopływu tlenu do ischemicznej/niedotlenionej tkanki tworzą się RFT. Ze względu na postkondycjonowanie, pH wzrasta tylko częściowo. To pozwala na aktywację receptora adenozyiny A2b, a następnie sygnalizacji kinazy fosfatidyloinozytolu 3 (PI3K), RISK (ang. Reperfusion Injury Salvage Kinase) i ERK (ang. extracellular-signal-regulated kinases), co skutkuje hamowaniem tworzenia megakanałów nawet po zaprzestaniu postkondycjonowania.

Sugeruje się, że kondycjonowanie aktywuje trzy główne szlaki: szlak cyklicznego monofosforanu guanozyny/cGMP - zależna kinaza białkowa

(cGMP/PKG)(Burley i wsp., 2007), wspomniany szlak RISK (Hausenloy i wsp., 2004) oraz szlak SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) (Lecour, 2009). W mitochondrium szlaki te prowadzą do aktywacji zależnego od ATP kanału potasowego, co skutkuje zamknięciem mPTP. Pre- oraz postkondycjonowanie inicjuje złożoną odpowiedź genową oraz białkową odpowiedzialną za późniejszą fazę protekcji (transkrypcja genów antyapoptotycznych i antyzapalnych) (Konstantinov i wsp., 2005 oraz Murphy i wsp., 2010). Wśród licznych mediatorów tych procesów są: wspomniane wcześniej kinaza białkowa C (PKC) i kinazy fosfatydyloinozytolu 3(PI3K), kinaza białkowa B (PKB, Akt), oraz kinaza tyrozynowa, kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (MAP1/2), wewnątrzkomórkowe kinazy Erk1/2, kinaza JAK. Aktywują one czynniki transkrypcyjne STAT1/3, NF- $\kappa$ B, AP-1, Nrf-2, oraz HIF-1 $\alpha$  (Breivik i wsp., 2010). Ostatnie prace nad prekondycjonowaniem ischemicznym mózgu wskazują na rolę kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), wisfatyny (Nampt), kinazy aktywowanej 5'AMP (ang. adenosine monophosphate-activated protein kinase- AMPK) oraz białek SIRT1 i Hsp90 w modulacji nabywania tolerancji na uszkodzenie niedokrwienne (Thomson i wsp., 2013; Thomson i wsp. 2014; Morris-Blanco i wsp., 2014).

Dowodem na udział czynników humoralnych w mechanizmie hartowania serca jest poczyniona obserwacja, pokazująca, że protekcja może być przeniesiona za pomocą transfuzji surowicy krwi od królika hartowanego ischemicznie do królika niehartowanego (Dickson i wsp., 1999). Czynniki protekcyjne były odporne na wysoką temperaturę (Patel i wsp., 2002; Shimizu i wsp., 2009). Ten czynnik może też brać udział w mechanizmie postkondycjonowania na odległość. Sugeruje się, że HH może wpływać na aktywność osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (Rybnikova i wsp., 2007).

Wciąż niewiele wiadomo na temat mechanizmów rządzących postkondycjonowaniem HH, a większość hipotez na ten temat to jedynie spekulacje.

#### **1.3.4 Hiperbaria tlenowa**

Drugą alternatywną formą terapii stosowaną w prezentowanych badaniach jest tlenowa terapia hiperbaryczna (HBO- Hyperbaric Oxygen Therapy). Terapia hiperbarią tlenową polega na zastąpieniu wdychanego powietrza 100-procentowym tlenem podawanym pod zwiększonym ciśnieniem. Warunki takie uzyskuje się w komorach hiperbarycznych. Zgodnie z aktualnymi definicjami o leczeniu HBO mówimy w

sytuacji, gdy 100-procentowy tlen stosowany jest pod ciśnieniem co najmniej 2 atmosfer absolutnych (ATA) przez okres co najmniej 1 godziny. Ze względu na toksyczne działanie tlenu podawanego pod ciśnieniem większym niż 3 atmosfery, w hiperbarycznej terapii tlenowej stosuje się ciśnienia rzędu 2 – 2.8 atmosfery. HBO znajduje zastosowanie w leczeniu schorzeń ostrych: choroby dekompresyjnej, zatorów powietrznych i gazowych (efekt wysokiego ciśnienia), agresywnych infekcji tkanek miękkich (obejmujących zgorzel gazową oraz martwicze zapalenie powięzi) - poprzez działanie przeciwbakteryjne, zatrucia tlenkiem węgla, oparzeń, zespołu zmiażdżeń, trudno gojących się ran oraz nagłego niedosłuchu. Stosowana jest również w leczeniu schorzeń przewlekłych: owrzodzenia w przebiegu stopy cukrzycowej, popromiennego uszkodzenia pęcherza moczowego, popromiennej osteonekrozy żuchwy, odbytnicy, nawracającego zapalenia kości i szpiku kostnego. Mimo, że HBO jest stosowana w klinice od lat 60-tych XX wieku, brak jest doniesień o poważnych zatruciach tlenem. Kliniczne badanie retrospektywne obejmujące 80000 pacjentów leczonych HBO wykazało tylko 2 przypadki wystąpienia drgawek (Yildiz i wsp., 2004).

Pierwsze opisy prób klinicznego wykorzystania wysokich ciśnień sięgają XVII wieku, kiedy to anglikański duchowny Henshaw wybudował pierwszą komorę hiperbaryczną. Uważał on, że wysokie ciśnienia można stosować w leczeniu schorzeń ostrych, a niskie (niższe od atmosferycznego) w leczeniu schorzeń przewlekłych. Przez długi okres, z uwagi na obawy przed zjawiskami toksyczności tlenu, stosowano tylko hiperbarię powietrzną. Dopiero prace Dragera z początku XX wieku pozwoliły na zastosowanie w terapii hiperbarycznej tlenu i powstanie tlenoterapii hiperbarycznej. Gwałtowny rozwój HBO rozpoczął się w latach 60. XX wieku, a związany był z publikacjami pionierskich prac Boeremy i Brummelkampa (Brummelkamp i wsp., 1961 oraz 1963), w których udowodniono znaczące zmniejszenie śmiertelności przy zastosowaniu HBO w leczeniu zgorzeli gazowej i innych agresywnych infekcji tkanek miękkich oraz zatruc tlenkiem węgla.

Mechanizm działania HBO opiera się na dwóch zjawiskach: fizyczno-fizjologicznym oraz biochemiczno-komórkowym. Efekt fizyczno-fizjologiczny polega na zmniejszeniu objętości pęcherzyków powietrza (zgodnie z prawem Boyle'a) – ta właściwość HBO wykorzystywana jest głównie przy zatorach powietrznych i w schorzeniach związanych z nurkowaniem (choroba dekompresyjna) - oraz na

zwiększeniu ilości tlenu rozpuszczonego w osoczu. Wzrasta prężność tlenu we krwi tętniczej a ponadfizjologiczna zawartość tego pierwiastka powoduje, że promień jego dyfuzji zostaje znacznie wydłużony i rozpuszczony w osoczu tlen może docierać do obszarów, do których nie docierają erytrocyty. Dodatkowo same erytrocyty stają się bardziej elastyczne, zwiększa się ich odkształcalność (van Hulst i wsp., 2003) i mogą łatwiej penetrować mikrokrażenie uszkodzonych tkanek (Khandelwal i Kaide, 2010). Jest to szczególnie istotne w sytuacji, gdy ma miejsce obrzęk i oksygenacja tkanek jest upośledzona.

W warunkach normobarycznych, podczas oddychania powietrzem atmosferycznym (20,95% tlenu przy ciśnieniu 1 ATA) wysycenie hemoglobiny tlenem wynosi 97% a jego zawartość w osoczu to około 0,3% (0,3 ml tlenu/100 ml krwi). W tych warunkach ciśnienie parcjalne tlenu w pęcherzykach płucnych wynosi około 90-100 mmHg. Podczas oddychania 100% tlenem przy ciśnieniu 2,5 ATA wysycenie hemoglobiny wzrasta do 100%, a zawartość tlenu w osoczu osiąga poziom 5,62%. Ciśnienie parcjalne tlenu w tych warunkach wzrasta do 2000 mmHg, czyli około 20-krotnie w stosunku do normobarii (Daugherty i wsp., 2004). Duża różnica ciśnień parcjalnych tlenu pomiędzy naczyniami włosowatymi a tkankami ułatwia dyfuzję tlenu do miejsc gdzie istnieje duże zapotrzebowanie na tlen, np. w warunkach urazu niedokrwiennego.

Korzystny efekt hiperoksji w HBO obejmuje: redukcję obrzęku, hamowanie procesu toczenia się (ang. rolling) i adhezji granulocytów do komórek śródbłonka- poprzez zmniejszenie produkcji i ekspresji beta-2 integryny oraz E- i P-selektyny, hamowanie peroksydacji lipidów, stymulację proliferacji fibroblastów, neowaskularyzację, efekt przeciwbakteryjny, ujemny wpływ na produkcję tlenku azotu oraz na syntezę cytokin. Złożony mechanizm działania HBO jest wynikiem nie tylko dostarczania tlenu do niedotlenionych tkanek, ale także efektem wielu złożonych procesów komórkowych. HBO zmniejsza obrzęk w obrębie uszkodzonych narządów głównie dzięki zjawisku osmozy tlenowej. Wysokie ciśnienie parcjalne tlenu w naczyniach włosowatych powoduje przesunięcie płynów z przestrzeni pozanaczyniowej do wewnątrznaczyniowej. Wazokonstrykcja (skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych) jako reakcja na hiperoksję jest związana z hamowaniem produkcji tlenku azotu i jego dezaktywacją oraz produkcją prostaglandyn na drodze przemian kwasu arachidonowego niezależnych od cyklooksygenazy przy udziale anionu

nadtlenkowego. Anion nadtlenkowy hamuje także aktywność cykazy guanylowej, a przez to produkcję cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) i zależny od cGMP rozkurcz naczyń. Uważa się, że HBO stymuluje produkcję rodników ponadtlenkowych w mózgu, a te reagują z NO około 1000 razy szybciej niż tempo autooksydacji NO oraz 3,5 razy szybciej niż dysmutacja rodnika ponadtlenkowego. Skutkuje to spadkiem stężenia NO w tkankach i co za tym idzie osłabieniem jego wazodylatacyjnego działania. Prowadzi to do wazokonstrykcji i zmniejszenia przepływu krwi przez mózg (Zhilyaev i wsp., 2003). Mimo wazokonstrykcji naczyń dostarczanie tlenu do tkanek nie jest zaburzone ze względu na kilkukrotny wzrost promienia dyfuzji tlenu (przy 2,8 ATA wzrost 6-krotny) (Piechocki i wsp., 2011). Uznaje się, że efekt wynikający ze zwiększonej dostawy tlenu do tkanki przewyższa efekt związany z ograniczeniem perfuzji w wyniku zwężenia naczyń (Doboszyński i Orłowski, 1977).

Wazokonstrykcja skutkuje zmniejszeniem mózgowego przepływu krwi i zapobiega wazodylatacji naczyń w uszkodzonej tkance, zmniejszając tym samym wynaczynianie płynów. Dzięki temu HBO jest w stanie zmniejszyć objętość krwi w mózgu, a co za tym idzie zapobiec wzrostowi ciśnienia śródczaszkowego. HBO zmniejsza je również dzięki redukcji obrzęku mózgu (Lim i wsp., 2001). Trzeba zaznaczyć, że istnieją doniesienia wskazujące na to, że zwężenie światła naczyń dotyczy tylko tkanek normoksyjnych, a nie tkanek dotkniętych wcześniej hipoksją (Khandelwal i Kaide, 2010) oraz dane sugerujące, że pod wpływem HBO w zdrowych tkankach istnieje tendencja do wazokonstrykcji i zmniejszenia mózgowego przepływu krwi, podczas gdy w uszkodzonych tkankach pojawia się tendencja do wzrostu mózgowego przepływu krwi (Bergo i wsp., 1993).

Produkcja wolnych rodników to potencjalny efekt niepożądany HBO, jednak powszechnie uważa się, że przy stosowanych ciśnieniach do około 3 ATA, oraz pojedynczych krótkich sesjach, nie jest to efekt istotnie szkodliwy dla komórek (Blenkarn i wsp., 1969; Huang i wsp., 2000). Są opinie, że umiejętnie prowadzona terapia HBO chroni tkanki przed toksycznym działaniem rodników tlenowych (Zhang i Gould, 2014; Thomas i wsp., 1991; Burg i wsp., 1987). Postuluje się, że ten korzystny efekt jest wynikiem działania kilku mechanizmów. HBO hamuje peroksydację lipidów w błonach komórkowych dzięki temu, że zapobiega kluczowemu etapowi w peroksydacji lipidów - konwersji dehydrogenazy ksantynowej do oksydazy ksantynowej (Thom, 1990). HBO zakłóca sekwestrację neutrofilów na uszkodzonym

śródbłonku i zmniejsza uszkodzenie poreperfuzyjne (Thom, 1993; Zamboni i wsp., 1989) oraz zapewnia wystarczającą ilość tlenu tkankom w czasie reperfuzyj, co skutkuje aktywacją enzymów (peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej) i detoksykacją reaktywnych form tlenu (Ferrari i wsp., 1995). Istnieją prace, z których wynika, że HBO ma ciekawą właściwość polegającą na tym, że jej użycie powoduje umiarkowany stres oksydacyjny w zdrowych tkankach, natomiast zmniejsza go w tkankach dotkniętych patologią (Thom i Elbuken, 1991).

Neuroprotekcyjne działanie hiperbarii tlenowej zostało wykazane w wielu badaniach na doświadczalnych modelach globalnego i ogniskowego niedokrwienia mózgu u różnych gatunków zwierząt (Krakovsky i wsp., 1998; McDonahg i wsp., 2004; Liu i wsp., 2006; Sun i wsp., 2008; Veltkamp i wsp., 2000). HBO zwiększa przeżywalność neuronów oraz poprawia wyniki testów behawioralnych w modelu niedokrwienia przodomózgowia u gerbila (Małek i wsp., 2013). Mechanizm obserwowanej neuroprotekcji wiąże się najprawdopodobniej ze zwiększonym dopływem tlenu do tkanek mózgu. Wykazano też, że hiperbaryczna terapia tlenowa zmniejsza uszkodzenia bariery krew-mózg oraz obrzęk mózgu (Veltkamp i wsp., 2005) oraz inicjuje procesy naprawcze w naczyniach krwionośnych (Zhang i wsp., 2005). HBO zwiększa poziom mózgowego ATP w modelu ostrego niedokrwienia mózgu i w ogniskowym uszkodzeniu mózgu u szczura (Shiokawa i wsp., 1986), oraz zmniejsza wywołany niedokrwieniem wzrost poziomu glukozy, kwasu pirogronowego i glutaminianu (Badr i wsp., 2001).

Jednak mimo pozytywnych wyników na zwierzęcych modelach niedokrwienia mózgu, możemy mówić o mniej licznych sukcesach w zastosowaniach klinicznych HBO w tej grupie stanów patologicznych (Golden i wsp., 2002; Neubauer, 1998, Rockswold i wsp., 1992 Rockswold i wsp., 2001; Sukoff, 2001; Hutchison i wsp., 1963; Nighoghossian i wsp., 1995). HBO znalazła zastosowanie w chorobach neurologicznych, takich jak: mózgowy zator powietrzny (Droghetti i wsp., 2002), stan wegetatywny (Xie i Wang, 2003), globalne niedokrwienie mózgu spowodowane przez zatrzymanie akcji serca (Rosenthal, 2003), ogniskowe niedokrwienie mózgu (Lou i wsp., 2004; Flynn i Auer, 2002; Burt i wsp., 1987), ostre uszkodzenie rdzenia kręgowego (Huang i wsp., 2003; Ishihara i wsp., 2001; Asamoto i wsp., 2000), urazowe uszkodzenie mózgu (Clifton, 1995; Golden i wsp., 2002; Rockswold i wsp., 1992;



Rockswold i wsp., 2001). Bezpieczeństwo HBO zostało przetestowane we wszystkich grupach wiekowych i u obu płci, w tym u noworodków (Zhou i wsp., 2002; Liebelt, 1999; Keenan i wsp., 1998) i u kobiet w ciąży (Brown i wsp., 1992; VanHoesen i wsp., 1989). Mechanizm neuroprotekcyny HBO obejmuje poprawę metabolizmu mózgu (Golden i wsp., 2002; Badr i wsp., 2001), redukcję przepuszczalności bariery krew-mózg i obrzęku mózgu (Mink i wsp., 1995), zmniejszenie ciśnienia śródczaszkowego (Brown i wsp., 1988), tłumienie reakcji zapalnych (Yin i wsp., 2002), oraz zapobieganie apoptotycznej śmierci komórek (Calvert i wsp., 2003; Yin i wsp., 2003). Niektórzy sugerują, że ten efekt może być związany ze zmianą ekspresji białka HIF1 $\alpha$  (Poli i Veltkamp, 2009) oraz wpływem HBO na cięcie PARP (polimerazy poli ADP-rybozy) (Calvert i wsp., 2003). HBO może zwiększać ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 (Zhang i wsp., 2005). U pacjentów z poważnymi obrażeniami mózgu hiperbaria tlenowa zmniejsza poziom kwasu mlekowego w płynie mózgowo-rdzeniowym (Rockswold i wsp., 2001). Oprócz tego stwierdzono, że prekondycjonowanie HBO wytwarza tolerancję na ischemię (Xiong i wsp., 2000).

Raporty kliniczne nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dotyczące efektu protekcyjnego terapii hiperbarycznej po niedokrwieniu mózgu ze względu na nieujednolicone procedury. Różnice w czasie rozpoczęcia terapii po ischemii, długość i ilość sesji hiperbarycznych – to wszystko powoduje, że trudno o jednoznaczne konkluzje.

## **2. Założenia i cel pracy**

Pomimo znacznych postępów w technologii monitorowania ciąży i bezpiecznego prowadzenia porodu oraz rosnącej wiedzy na temat patologii płodu, asfiksja okołoporodowa oraz ENN pozostają fundamentalnym problemem neonatologii, którego skutkiem jest znaczna śmiertelność i długoterminowe konsekwencje o charakterze neurologicznym. Dane z literatury wskazują na neuroprotektoryjne działanie zarówno HBO jak i HH w niedokrwieniu mózgu u dojrzałych zwierząt oraz niedotlenieniu okołoporodowym, jednak mechanizm tego zjawiska jest wciąż niejasny i pozostaje obiektem badań. Ponadto specyfika ośrodkowego układu nerwowego w rozwoju powoduje, że wyniki badań z wykorzystaniem różnych modeli doświadczalnych niedokrwienia i niedotlenienia mózgu zwierząt dorosłych nie w pełni przekładają się na poznanie patomechanizmu hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu noworodków. Są przesłanki uzasadniające hipotezę roboczą, że jednym z mechanizmów neuroprotektoryjnego działania HBO i HH może być działanie modulujące stres oksydacyjny wywołany przez H-I.

Ogólnymi celami niniejszej pracy było:

- określenie neuroprotektoryjnego potencjału HBO oraz postkondycjonowania HH w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów
- zbadanie parametrów stresu oksydacyjnego, którego złagodzenie może być jednym z potencjalnych mechanizmów neuroprotektoryjnego działania HBO oraz postkondycjonowania HH w H-I mózgu osesków szczura.

W celu zbadania neuroprotektoryjnego działania HBO oraz HH postanowiono:

- ocenić wpływ HBO oraz HH na uszkodzenie mózgu osesków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii
- zbadać okno terapeutyczne pozwalające na skuteczne zastosowanie badanych terapii (badane okno - 1 do 6 godzin po H-I)
- ocenić wpływ zastosowania HBO oraz HH na zmiany zachowań zwierząt po przebyciu H-I

Dla określenia roli modulacji stresu oksydacyjnego w mechanizmie neuroprotekcijnego działania HBO i HH, postanowiono zbadać ich wpływ na spowodowane przez HI:

- zmiany w poziomie syntezy RFT
- zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, katalaza)
- zmiany stężenia GSH.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Zwierzęta

W doświadczeniach użyto siedmiodniowych szczurów szczepu Wistar, obu płci, o masie średniej około 15g (12-18g). Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni IMDIK. Trzymane były w standardowych warunkach z matką, w warunkach stałego dziennego okresu oświetlenia (fotoperiodu) 12:12, w temperaturze 22°C. Oseski pozostawały w miocie i były karmione do 21 dnia życia. Na wszystkie procedury, w których były wykorzystywane zwierzęta otrzymano zgodę lokalnej komisji etycznej (uchwała nr 46/2007 z dnia 5.12.2007 oraz nr 22/2012 z dnia 2.04.2012 r).

#### 3.2. Grupy doświadczalne

Na potrzeby doświadczeń utworzono następujące grupy doświadczalne:

grupa 1 – kontrola, zwierzęta poddane pozorowanej operacji

grupa 2 – zwierzęta poddane hipoksji-ischemii (H-I)

grupa 3- zwierzęta poddane H-I oraz hiperbarii tlenowej (H-I+HBO) zainicjowanej 1, 3 lub 6 h od H-I

grupa 4- zwierzęta poddane H-I oraz postkondycjonowaniu hipoksją hipobaryczną (H-I+HH) zainicjowaną 1, 3 lub 6 h po H-I

grupa 5 - zwierzęta poddane hiperbarii tlenowej (kontrola+HBO)

grupa 6- zwierzęta poddane hipoksji hipobarycznej (kontrola+HH)

Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3			Grupa 4			Grupa 5	Grupa 6
Kontrola (66)	H-I (86)	H-I+ HBO (198)			H-I+ HH (200)			kontrola+ HBO (38)	kontrola+ HH (38)
		1h	3h	6h	1h	3h	6h		
		po hipoksji, 60 min dziennie przez 3 dni			po hipoksji, 60 min dziennie przez 3 dni				

Tab.1 Grupy doświadczalne wykorzystane w eksperymentach. W nawiasach podano liczbę zwierząt w poszczególnych grupach.

#### 3.3. Model hipoksji-ischemii (H-I, eksperymentalny model asfiksji okołoporodowej)

H-I została wywołana zgodnie z adaptacją modelu Levine'a opisaną przez Rice'a i wsp. (1981). 7-dniowe zwierzęta były pobierane z miotu, poddawane narkozie wziewnej halotanem w stężeniu 4% w czasie indukcji narkozy, 0.5-1.5% w czasie jej

podtrzymywania, podawanym w mieszance gazowej zawierającej tlen z podtlenkiem azotu w stosunku 0,6:1. Po wypreparowaniu lewej tętnicy szyjnej wspólnej następowało podwiązanie jej w dwóch miejscach za pomocą nici chirurgicznej i przecięcie między podwiazkami (indukcja ischemii). Czas zabiegu na pojedynczym osesku wynosił 4,5- 7 minut. Po nasączeniu rany anestetykiem miejscowym (lignokainą) rana była zszywana, a zwierzęta odstawiane do klatki z matką na okres 1 godziny. Po tym okresie zwierzęta były ponownie separowane od matki i eksponowane na warunki hipoksyjne przez 75 min. w termostатовanej komorze (35,5 - 36°C) ze stałym przepływem mieszanki gazowej zawierającej 7.4% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. U zwierząt z grupy kontrolnej przeprowadzano procedurę wyeksponowania lewej tętnicy szyjnej wspólnej bez jej przecinania. Po zabiegu zwierzęta były odstawiane do klatki z matką, z dostępem do wody i pożywienia *ad libitum*, w warunkach sztucznego oświetlenia (12:12 h). W kolejnym etapie zwierzęta były umieszczane w komorze hiperbarycznej, lub komorze hipobarycznej (temperatura w komorach wynosiła 22-24°C) – w zależności od grupy terapeutycznej, począwszy od 1, 3 lub 6 godzin po epizodzie niedotlenienia na okres 60 minut. Czynność ta była powtarzana przez 3 kolejne dni, w odstępie 24h. Zwierzęta z grupy kontrolnej i grupy H-I zostały w tym czasie również odseparowane od matki i oddychały powietrzem atmosferycznym o normalnym składzie.

#### **3.4. Postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną (HH)**

Zwierzęta umieszczane były w komorze hipobarycznej podłączonej do pompy próżniowej (N035 AN18 f Neuberger (Freiburg, Germany), na 60 minut, z zapewnieniem wymiany gazów z otoczeniem. Łagodna hipoksja hipobaryczna (HH) była indukowana przez obniżenie ciśnienia do poziomu 0,47 ATA (odpowiednik 10% zawartości tlenu w warunkach normobarycznych lub ciśnienia parcjalnego tlenu na wysokości około 5000 m n.p.m.). Obniżanie ciśnienia w komorze przeprowadzano stopniowo przez okres 10 minut. W zależności od grupy doświadczalnej, pierwsza ekspozycja na warunki hipoksyjne miała miejsce 1, 3 lub 6 h po hipoksj- ischemii.

#### **3.5. Hiperbaria tlenowa (HBO)**

W doświadczeniach z użyciem hiperbarii tlenowej zwierzęta umieszczane były w miniaturowej komorze hiperbarycznej przeznaczonej dla małych zwierząt (Model B-11 Animal Research Chamber, Reimers Systems, USA) na 60 minut, i poddawane działaniu 100% tlenu pod ciśnieniem 2.5 ATA. Zarówno kompresja, jak i dekompresja

następowała z prędkością 0,5 ATA/min. Komora ciśnieniowa była wentylowana co 15 min w celu usunięcia CO<sub>2</sub>. W zależności od grupy doświadczalnej, pierwsza ekspozycja na warunki hiperbaryczne miała miejsce 1, 3 lub 6 h po hipoksji- ischemii.

### **3.6. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I**

#### **3.6.1. Ocena uszkodzenia mózgu po H-I na podstawie stosunku masy półkul mózgowych**

Dwa tygodnie po H-I (PND 21) oseski były usypiane letalną dawką vetbutalu a następnie dekapitowane. Po wyizolowaniu półkule mózgowe były rozdzielane wzdłuż szczeliny podłużnej mózgu i ważone z dokładnością do 0.1 mg. Uszkodzenie półkuli ipsilateralnej (po stronie operowanej- lewej) było wyrażane jako procentowy niedobór masy półkuli ipsilateralnej w stosunku do masy półkuli kontralateralnej (nieoperowanej).

#### **3.6.2. Ocena wielkości martwicy mózgu**

Do tego celu wykorzystano metodę barwienia chlorkiem 2,3,5-trójfenylotetrazoliny (TTC). Mózgi 12-dniowych (5 dni po H-I) zwierząt zostały pocięte na skrawki o grubości 2 mm i wybarwione 1% roztworem TTC. Skrawki umieszczane były w roztworze TTC, bez dostępu światła w temp. 37°C na okres 8 minut, a następnie przenoszone do 10% roztworu paraformaldehydu (PFA). W dalszej kolejności skrawki były skanowane za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare). Metoda wybarwiania oparta jest na fakcie, że żywe tkanki barwią się na czerwono pod wpływem reakcji TTC z dehydrogenazami, enzymami aktywnymi w żywej tkance. W martwej tkance dehydrogenazy są degradowane lub denaturowane i tracą swą aktywność, dlatego tkanka dotknięta martwicą nie wybarwia się. Zabarwione skrawki pochodzące od zwierząt poddanych terapii były porównane ze skrawkami pochodzącymi od zwierząt kontrolnych, nie poddanych terapii. Pole martwicy obliczano za pomocą programu ImageJ (Wayne Rasband, USA), dzieląc pole powierzchni obrysowanego, niewybarwionego fragmentu skrawka półkuli ipsilateralnej przez pole powierzchni obrysowanej półkuli kontralateralnej i wyrażano w procentach.

#### **3.6.3. Histologiczna ocena uszkodzenia mózgu**

14-dniowe szczury (7 dni po H-I) usypiano vetbutalem, a następnie utrwalano mózgi przez perfuzję dosercową 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w PBS. Po

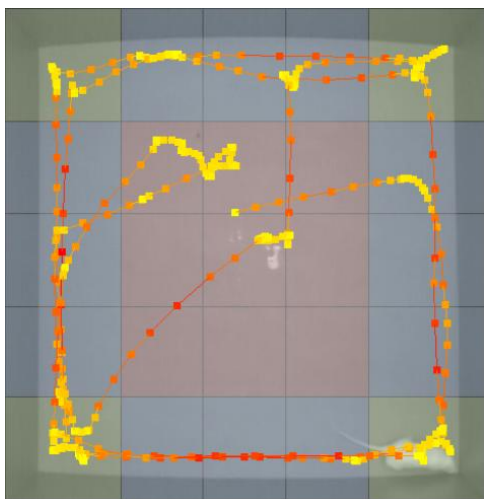
dekapitacji mózgi umieszczano w 4% PFA. Po tygodniu mózgi przenoszono do 99,9 % etanolu, następnie zatapiano w parafinie i obszar pochodzący z tylnej części hipokampa (pomiędzy -2,2 a -3,5 mm od bregmy) krojono za pomocą mikrotomu na skrawki grubości 10  $\mu$ m. Skrawki były odparafinowywane poprzez zatopienie w ksylenie (3x 5 minut), a następnie w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (95, 90, 80, 70%). Kolejnym krokiem było przepłukanie w PBS. Tak przygotowane skrawki barwiono fioletem krezylu, a następnie oceniano uszkodzenie w sektorze CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej przy użyciu mikroskopu.

#### **3.6.4. Ocena procesów apoptotycznych**

Do oceny procesów apoptotycznych użyto metody barwienia TUNEL. Do barwienia wykorzystano skrawki grubości 10  $\mu$ m, które uzyskano stosując procedurę opisaną w punkcie 3.6.3. Po odparafinowaniu skrawki poddano działaniu Proteinazy K przez 15 minut. Po tym etapie następowało właściwe znakowanie końców dUTP za pomocą terminalnej deoksynukleotydylotransferazy (TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche, Szwajcaria). Dla każdego zwierzęcia analizowane było co najmniej 5 przekrojów z centralnej części CA1 hipokampa. Neurony były liczone w polu o długości 0,15 mm z użyciem programu do wizualizacji AxioVision (Carl Zeiss, Aalen, Niemcy).

#### **3.7. Badania behawioralne - test otwartego pola**

Badania te zostały przeprowadzone w 35 dniu życia zwierząt (28 dni po H-I). Szczury były umieszczane pojedynczo na dnie areny do testu otwartego pola o ścianach koloru szarego, wymiarach 60x60 cm, oświetlonej słabym światłem rozproszonym. Zwierzęta umieszczane były na samym środku wybiegu. Zachowanie zwierząt było nagrywane przez 30 minut bez ingerencji eksperymentatora. Następnie na ekranie monitora podzielono pole wybiegu na 25 wirtualnych kwadratów oraz zdefiniowano 3 obszary-środek, rogi i boki. Potem za pomocą programu EthoVision (Noldus, USA) nastąpiło zakwalifikowanie poszczególnych aktów zachowania (wskaźników eksploracyjnych) i ich zliczenie. Dane przedstawiono jako: średni przebyty dystans, czas spędzony w centrum, czas spędzony w rogach, liczba wejść do strefy centralnej oraz stopień ruchliwości (rozumiany jako ruch w miejscu oraz lokomocja). Dane pochodzące od zwierząt poddanych H-I były porównywane z danymi zwierząt z grupy kontrolnej oraz z grupy poddanej HBO lub HH po H-I.



Ryc.2 Przykładowa ścieżka przebyta przez szczura w teście otwartego pola z widocznym podziałem na strefy – centralna (czerwony), boczna (niebieski) i rogi (zielony).

### 3.8. Oznaczenia biochemiczne

3 h po ostatniej sesji hipo-/hiperbarycznej, czyli 51 h po H-I, szczury były dekapitowane, a z półkul ipsilateralnych oraz kontralateralnych do badań biochemicznych pobierane były kora mózgowa i hipokamp. Tkanki analizowane były wspólnie. Stężenie roztworu białka w homogenatach było oznaczane za pomocą metody Bradford'a.

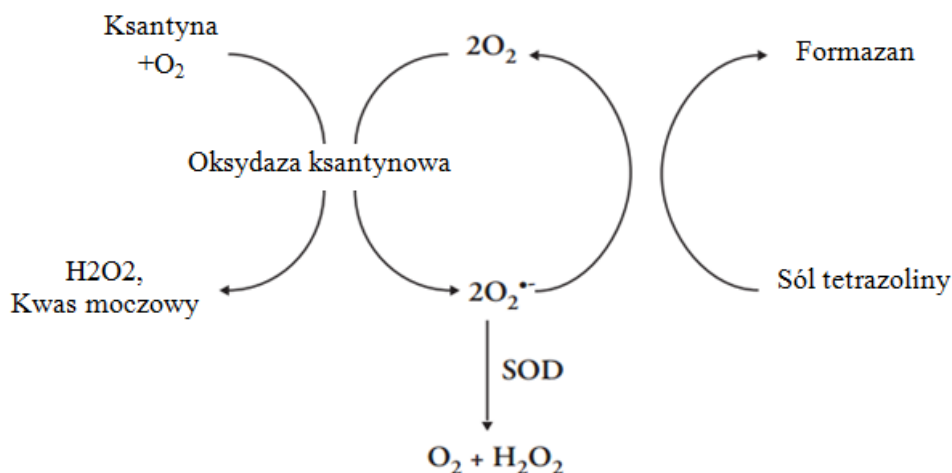
#### 3.8.1. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)

Poziom RFT w półkulach mózgowych był oznaczany za pomocą diocjanu 2,7-dichlorofluoresceiny (DCF-DA), który jest deestryfikowany do dihydrodichlorofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF), a następnie ta forma ulega utlenieniu przez RFT do silnie fluoryzującej dichlorofluoresceiny (DCF). Półkule były homogenizowane oddzielnie w zimnym 40 mM buforze Tris-HCl o pH 7.4. Homogenaty były inkubowane na płytce 96-dołkowej z 25 μM DCF-DA przez 30 minut w temp. 37°C. Następnie odczytano fluorescencję DCF za pomocą wielofunkcyjnego czytnika mikroplatek (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy długości fali – wzbudzenia 488 nm i emisji 530 nm. Umowne jednostki fluorescencji (RFU) były przeliczane na mg białka w homogenacie.



### 3.8.2. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Tkanki z prawych i lewych półkul były homogenizowane oddzielnie w 20 mM buforze HEPES o pH 7.2, zawierającym 1 mM EGTA, 210 mM mannitolu i 70 mM sacharozy na 1g tkanki. Homogenaty były następnie wirowane przy 1500 x g przez 5 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Aktywność enzymu wyrażona została jako ilość jednostek enzymatycznych na miligram białka (U/mg białka). Metoda wykorzystuje sól tetrazoliny do detekcji rodników ponadtlenkowych generowanych przez oksydazę ksantynową i hipoksantynę. Jony ponadtlenkowe powstają z przekształcenia ksantyny i tlenu cząsteczkowego do kwasu moczowego i nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) przez oksydazę ksantynową (XOD). Anion ponadtlenkowy następnie przekształca sól tetrazoliny do formazanu. Dodanie SOD do tej reakcji obniża poziom jonów ponadtlenkowych, obniżając tym samym szybkość tworzenia formazanu. Aktywność SOD w próbach mierzona jest jako procentowa inhibicja szybkości tworzenia formazanu. Jednostka enzymatyczna SOD jest definiowana jako ilość enzymu potrzebna do zahamowania reakcji powstawania formazanu o 50%, co manifestuje się poprzez zahamowanie zmiany absorbancji w próbce. Absorbancję mierzono przy pomocy spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy długości fali 450 nm. Do obliczenia aktywności enzymu wykorzystano krzywą standardową.



Ryc.3. Schemat metody oznaczania aktywności SOD (źródło: opracowanie własne)

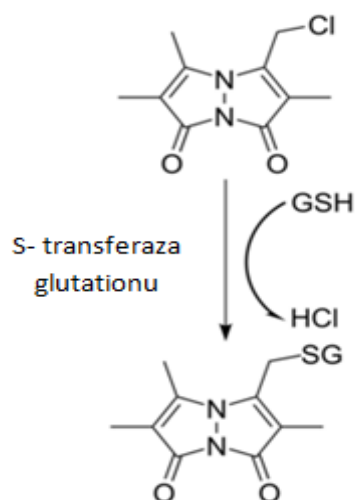
### **3.8.3. Oznaczanie poziomu białek SOD1 i SOD2 metodą western blot**

Wyizolowane mozgi były homogenizowane w buforze PBS zawierającym 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 0,1 mM PMSF i 100 mM NaCl, oraz mieszaninę inhibitorów proteaz. Stężenie roztworu białka w homogenatach zostało oznaczone za pomocą metody Bradford'a. Próbkki zostały przygotowane w taki sposób, aby w 25  $\mu$ l homogenatu było 50 $\mu$ g białka. Tak przygotowane próby nanoszono na żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono przy 150 V przez 75 minut. Następnie przeprowadzano transfer białek na membranę nitrocelulozową. Po transferze membrany blokowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w TTBS przez 60 minut. W kolejnym etapie membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi dla badanych białek (SOD1 -mysie przeciwciało monoklonalne, SOD2 – królicze przeciwciało poliklonalne, oba firmy Santa Cruz, w rozcieńczeniu 1:100). Po odpłukaniu w TTBS inkubowano membrany z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fosfatazą alkaliczną. Prażki były wywoływane za pomocą zestawu Vector Blue Alkaline Phosphatase (AP) Substrate Kit (Vector Laboratories, USA), skanowane za pomocą Image Scanner III (GE Healthcare) a następnie densytometrowane za pomocą programu ImageQuant. Zmiany w ekspresji białek przedstawiano jako procent kontroli. Jako standard wewnętrzny stosowano aktynę (Abcam, w rozcieńczeniu 1:500).

### **3.8.4. Oznaczenie zawartości glutationu zredukowanego (GSH)**

Tkanki z prawych i lewych półkul były homogenizowane oddzielnie w 25 mM buforze HEPES o pH 7.4, zawierającym 250 mM sacharozy. Następnie homogenaty były wirowane przy 1000 x g przez 5 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Glutathione Assay Kit, Fluorimetric (Sigma-Aldrich, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Metoda do oznaczenia stężenia GSH wykorzystuje monochlorobiman (MCB), który swobodnie przenika przez błony komórkowe. Wolny, niezwiązany MCB wykazuje minimalną fluorescencję, lecz po związaniu ze zredukowanym glutationem powstaje silnie fluorescencyjny addukt, co pozwala na detekcję GSH. Reakcja MCB z GSH jest katalizowana przez s-transferazę glutationu (GST). Poziom fluorescencji powstałego

adduktu odczytywano przy pomocy fluorymetru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy długości fali – wzbudzenia 390 nm i emisji 478 nm. Wynik uzyskany z wykorzystaniem krzywej standardowej przeliczano na nanomole GSH w miligramie białka w homogenacie.



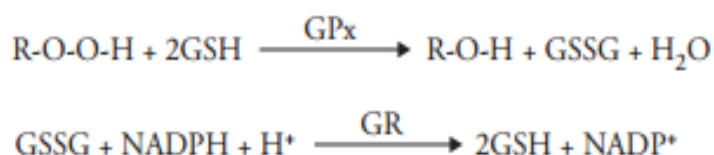
Ryc.4. Schemat przedstawiający reakcję monochlorobimanu z GSH w wyniku której powstaje fluorescencyjny addukt (źródło: opracowanie własne)

### 3.8.5. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej (Gpx)

Tkanki z prawych i lewych półkul były homogenizowane oddzielnie w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 7.5, zawierającym 5mM EDTA i 1mM DTT na 1g tkanki. Następnie homogenaty były wirowane przy 10000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczona przez producenta. Metoda polega na pomiarze Gpx w sposób pośredni korzystając z reakcji sprzężonej z reduktazą glutationową. Utleniony glutation (GSSG) powstający podczas redukcji wodoronadtlenków przez Gpx, jest przetwarzany do formy zredukowanej przy udziale NADPH i reduktazy glutationowej.

Utlenieniu NADPH do NADP<sup>+</sup> towarzyszy spadek absorbancji przy długości fali 340 nm. W warunkach, w których aktywność Gpx jest czynnikiem ograniczającym

szybkość reakcji, spadek absorbancji przy 340 nm jest wprost proporcjonalny do aktywności GPx w próbce. Absorbancję mierzono z wykorzystaniem spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy). Aktywność GPx w próbce obliczano za pomocą krzywej standardowej i wyrażano w nmol/min/mg białka.



Ryc.5. Schemat przedstawiający reakcje, na których oparta jest metoda oznaczania aktywności Gpx (źródło: opracowanie własne)

### 3.8.6. Oznaczenie aktywności katalazy (CAT)

Tkanki z prawych i lewych półkul były homogenizowane oddzielnie w 50 mM ortofosforanie potasu o pH 7.0, zawierającym 1 mM EDTA. Następnie homogenaty były wirowane przy 10000 x g przez 15 minut w temp. 4°C. Supernatant był pobierany do oznaczeń, które wykonano przy użyciu Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, USA), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Metoda wykorzystuje peroksydacyjną aktywność katalazy i jest oparta na reakcji katalazy z metanolem przy optymalnym stężeniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ilość powstającego formaldehydu jest mierzona kolorymetrycznie, 4-Amino-3-hydrazyno-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald) jest wykorzystywany jako chromogen. Purpald tworzy specyficzny związek heterocykliczny z aldehydami, który podczas utleniania zmienia barwę na fioletową. Zmiany absorbancji monitorowano przy użyciu spektrofotometru (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Niemcy) przy długości fali 540 nm. Aktywność katalazy obliczono z wykorzystaniem krzywej standardowej i wyrażano w nmol/min/mg białka.

### 3.9. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Dunnetta. Różnice były uznawane za istotne statystycznie gdy p było mniejsze niż 0,05.

## **4. Wyniki**

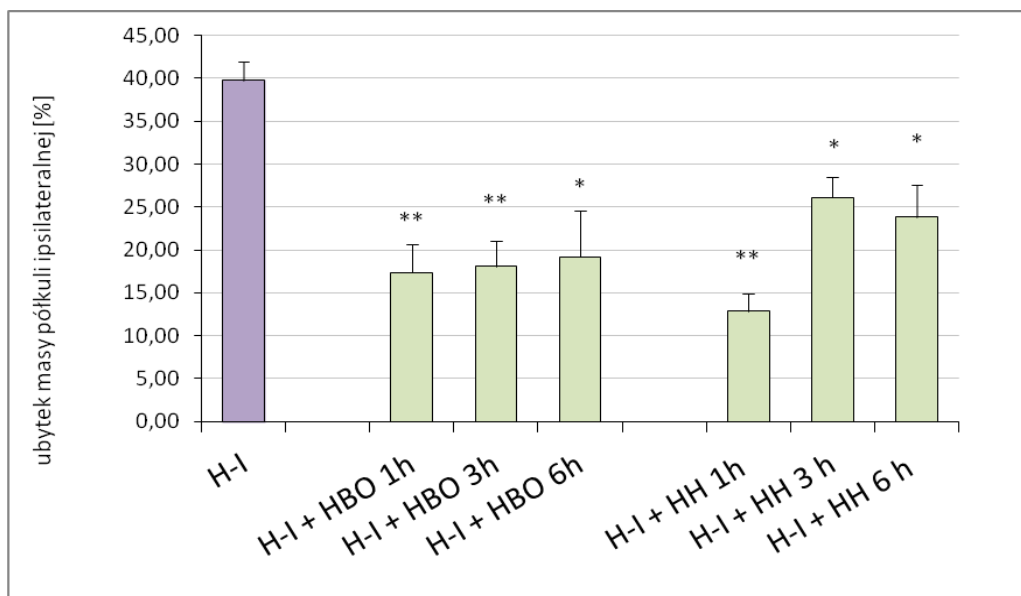
### **4.1. Zastosowanie HBO lub postkondycjonowania HH zmniejsza uszkodzenie mózgu szczurzych osesków poddanych H-I**

#### **4.1.1. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na ubytek masy ischemicznej półkuli mózgowej**

Ekspozycja noworodków szczurzych na warunki hipoksyjno-ischemiczne w modelu ENN wywołała w mózgowiu badanych zwierząt uszkodzenie w rejonie unaczynionym przez końcowe odgałęzienia lewej tętnicy szyjnej wspólnej. Na skutek H-I masa półkul ipsilateralnych spadała średnio o blisko 40% w stosunku do masy półkul kontralateralnych (ryc.6). Zastosowanie 60 minutowych sesji hiperbarii tlenowej rozpoczętych 1, 3 lub 6 godzin po H-I i kontynuowanych w następnych 2 dniach w znaczący sposób zredukowało ubytek masy półkul ipsilateralnych do poziomu, odpowiednio 17.4% ( $p<0,01$ ), 18.1% ( $p<0,01$ ) i 19.2% ( $p<0,05$ ). Obserwowana protekcja jedynie w nieznaczny sposób zależna była od czasu rozpoczęcia terapii.

Postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną przez 3 kolejne dni również zmniejszyło w sposób znamieny ubytek masy półkuli ipsilateralnej, ale efekt protekcji zależny był od czasu rozpoczęcia postkondycjonowania. Najmniejszy ubytek masy obserwowano, gdy postkondycjonowanie HH rozpoczęto godzinę po H-I. Obserwowany ubytek masy wynosił wtedy 12.9 % ( $p<0,01$ ), natomiast zainicjowanie HH w późniejszym czasie skutkowało nieco mniejszą neuroprotekcją - postkondycjonowanie HH rozpoczęte 3 lub 6 godzin po H-I redukowało ubytek odpowiednio do 26.1% ( $p<0,05$ ) oraz 23.8 % ( $p<0,05$ ) w odniesieniu do półkuli kontralateralnej i wartości te nie różniły się od siebie w sposób znaczący statystycznie.

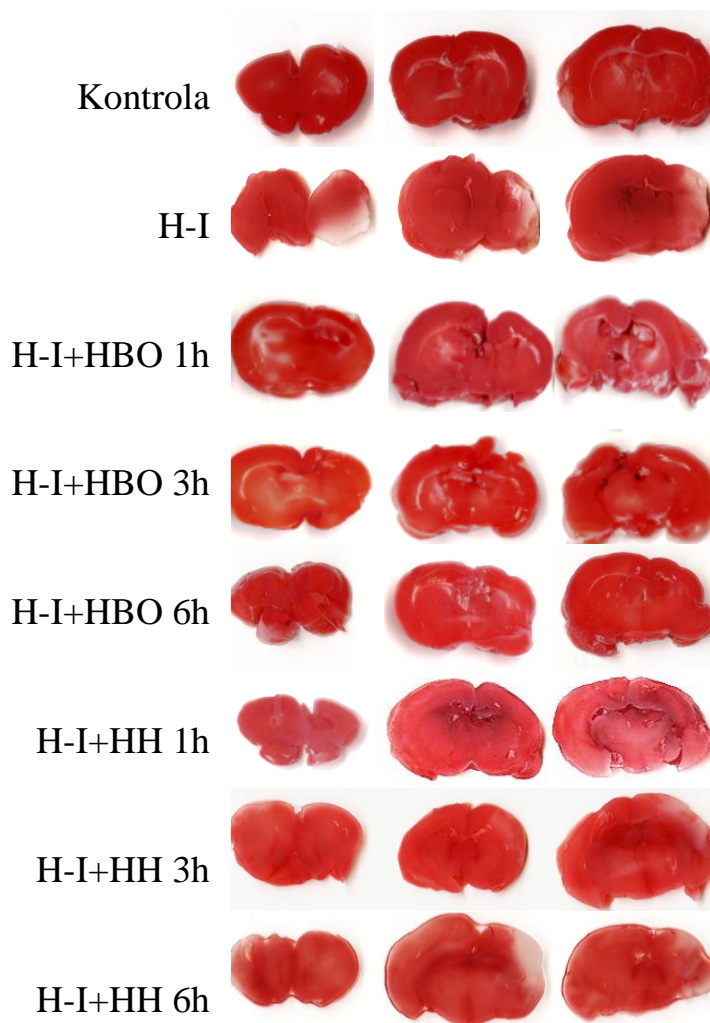
Przedstawione wyniki pokazują, że efektywność postkondycjonowania HH w zapobieganiu uszkodzenia mózgu jest najwyższa, gdy HH jest zainicjowana w krótkim czasie po H-I (najmniejsze uszkodzenie obserwowane przy zastosowaniu HH 1 godzinę po H-I). Natomiast hiperbaria tlenowa zastosowana w różnych czasach aż do 6 godzin po H-I skutkowała neuroprotekcją na podobnym poziomie. Wskazywać by to mogło na dłuższe okno terapeutyczne dla HBO.



Ryc.6 Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na procentowy ubytek masy półkuli ipsilateralnej w stosunku do masy półkuli kontralateralnej. Ubytek masy analizowano 14 dni po hipoksji-ischemii. Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  S.E.M. n = 9-11, różnice istotne statystycznie, różne od H-I: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

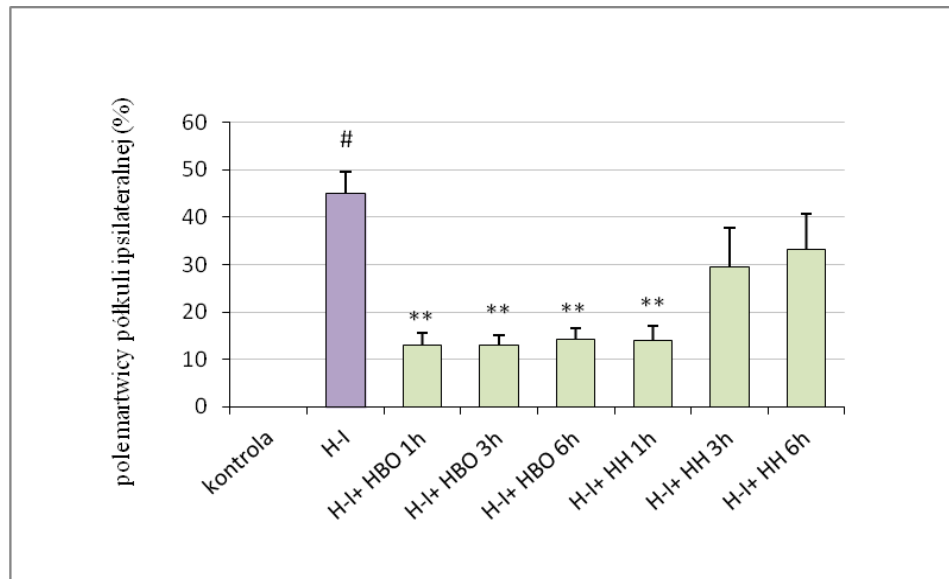
#### 4.1.2. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na stopień martwicy mózgu po H-I

Barwienie TTC umożliwiające wyodrębnienie martwych obszarów tkanki wykazało, że powierzchnia martwicy po H-I w półkuli ipsilateralnej osiąga poziom 45,0% półkuli kontrolnej (kontralateralnej) (ryc. 7)



Ryc.7. Skrawki mózgowie wybarwione TTC. Przedstawiono typowe/reprezentatywne dla danych grup obrazy.

Terapia HBO rozpoczęta 1, 3 lub 6 godzin po H-I zmniejszyła obszar martwicy w sposób statystycznie znamiennej do poziomu, odpowiednio 13.0%, 12.9% oraz 14.3% ( $p < 0,01$ ). Postkondycjonowanie HH zainicjowane 1 godzinę po H-I zredukowało obszar martwicy półkuli ipsilateralnej do poziomu 13.9% ( $p < 0,01$ ), natomiast rozpoczęcie postkondycjonowania 3 lub 6 godzin po H-I zmniejszało ten obszar do 29.6% oraz 33.3%, jednakże wyniki te nie różniły się statystycznie od obserwowanych po samej H-I (ryc.8).



Ryc.8. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na pole martwicy półkuli ipsilateralnej w skrawkach mózgowych szczura mierzone 5 dni po H-I. Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  S.E.M, n= 4-5, różnice istotne statystycznie \*\* - różne od H-I,  $p < 0.01$ , # - różne od kontroli,  $p < 0,001$

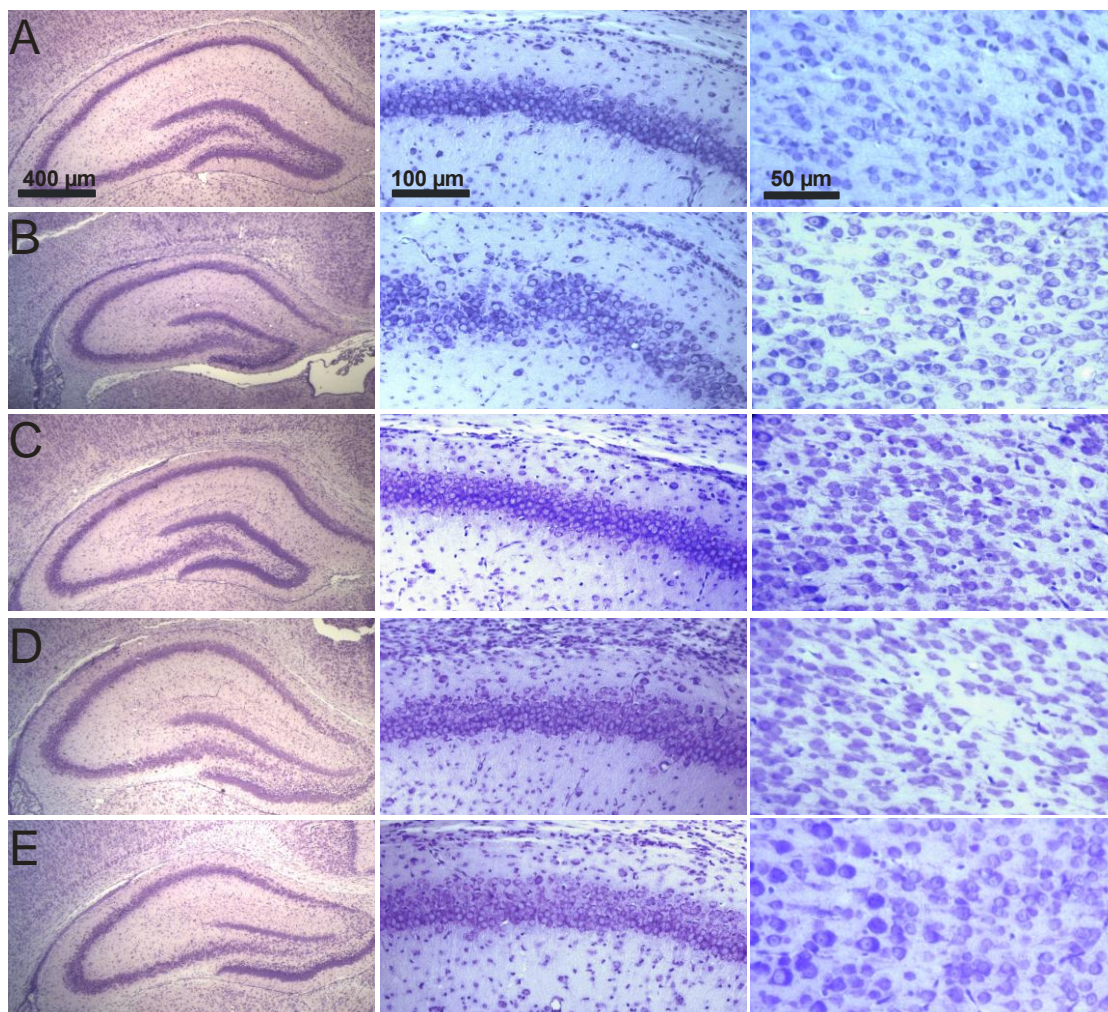
#### 4.1.3. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołane H-I uszkodzenie neuronów w sektorze CA1 hipokampa oraz w korze mózgowej

Hipokamp szczura jest zbudowany z neuronów piramidalnych, ułożonych w warstwę 3-6 komórek. Warstwy te są rozmieszczone w czterech obszarach, określanych jako pola lub sektory CA1–CA4. Sektor CA1 jest szczególnie wrażliwy na H-I, a zachodzące w nim zmiany odzwierciedlają uszkodzenie tkanki mózgu. Podobnie na H-I reagują niektóre rejony kory mózgowej. W następnym etapie zbadano wpływ HBO oraz HH na zmiany morfologiczne w tych obszarach mózgu.

W uszkodzonej przez H-I ipsilateralnej półkuli mózgu szczurów zaobserwowano zmniejszenie rozmiaru hipokampa, jak również uszkodzenie i dezorganizację neuronów w sektorze CA1 hipokampa. Zaobserwowano też znaczny ubytek komórek w korze mózgowej (ryc. 9B i 10B). Natomiast nie zaobserwowano zmian patologicznych w półkulach kontralateralnych.

HBO zainicjowana zarówno 1, 3 jak i 6 godzin po H-I zapobiegła zmianom w hipokampie oraz znacząco zmniejszyła ubytki komórek w korze mózgowej (ryc.9). Wyniki wskazują, że im wcześniej zwierzęta poddano działaniu HBO, tym obserwowana neuroprotekcja była większa.

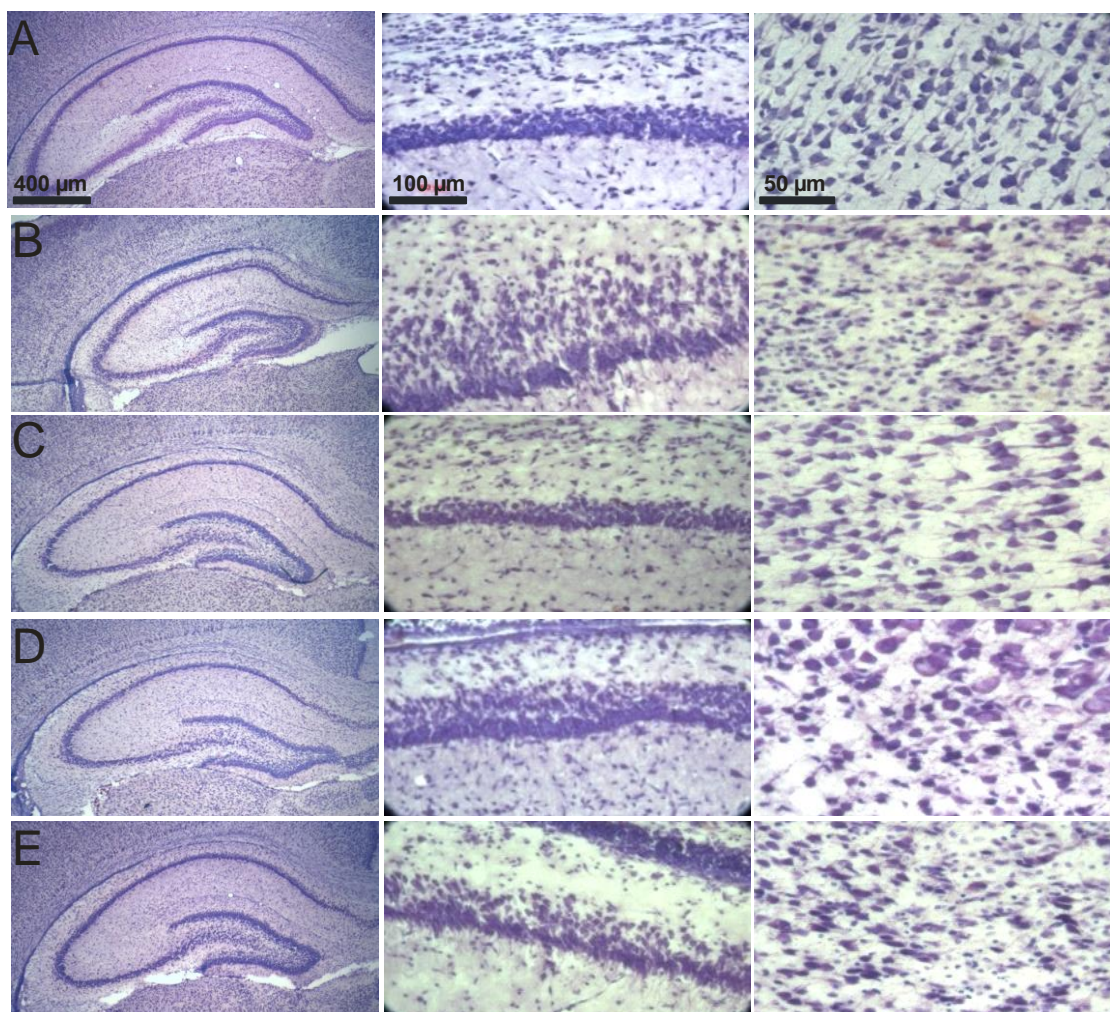




Ryc.9. Wpływ HBO na morfologię całości hipokampa, morfologię sektora CA1 hipokampa oraz morfologię kory mózgowej (w kolejności od lewej do prawej) w półkuli ipsilateralnej szczura 7 dni po H-I. A)kontrola, B)H-I, C) H-I+HBO 1h, D) H-I+HBO 3h, E) H-I+HBO 6h. Przedstawiono typowe/reprezentatywne dla danych grup obrazy.

Opóźnione rozpoczęcie terapii miało w przypadku HBO mniejszy wpływ na stopień neuroprotekcji niż w przypadku HH. Postkondycjonowanie HH zainicjowane 1 godzinę po H-I zapobiegło zmianom w sektorze CA1 hipokampa i znacząco zmniejszyło ubytek komórek w korze mózgowej (ryc.10). HH zainicjowana 3 lub 6 godzin po H-I również zmniejszała zmiany w badanych obszarach półkuli ipsilateralnej, jednak nadal obserwowano dezorganizację neuronów w sektorze CA1 hipokampa. Wskazuje to na mniejsze działanie protekcyjne HH rozpoczętej w czasie późniejszym niż 1 godzina po H-I.





Ryc.10. Wpływ postkondycjonowania HH na morfologię całości hipokampa, morfologię sektora CA1 hipokampa oraz morfologię kory mózgowej (w kolejności od lewej do prawej) w półkuli ipsilateralnej szczura 7 dni po H-I. A) kontrola, B) H-I, C) H-I+HH 1h, D) H-I+HH 3h, E) H-I+HH 6h. Przedstawiono typowe/reprezentatywne dla danych grup obrazy.

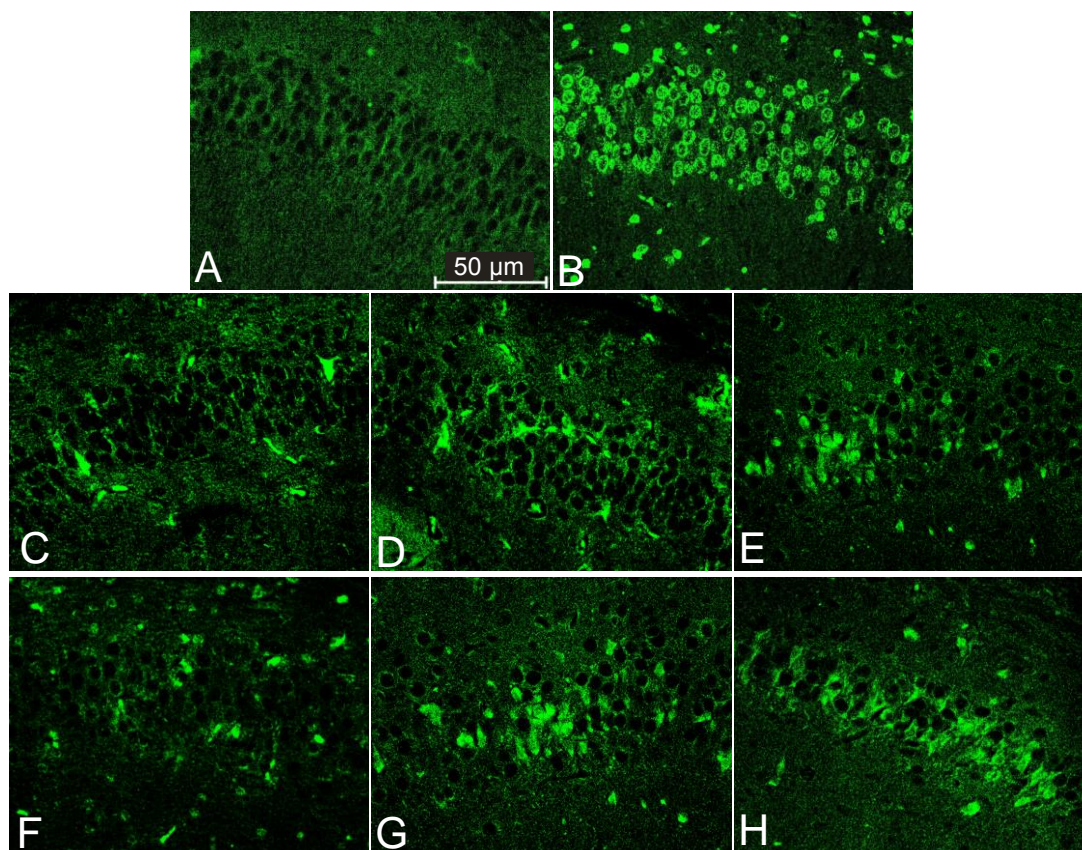
#### 4.1.4. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołaną przez H-I apoptozę obserwowaną w sektorze CA1 hipokampa

W tych badaniach skupiono się na ocenie ilości komórek o charakterze apoptotycznym w sektorze CA1 hipokampa. Barwienie TUNEL w grupie kontrolnej skutkowało wybarwieniem pojedynczych komórek w sektorze CA1 hipokampa obserwowanym w obu półkulach. Średnio apoptozie ulegało ok. 1-2 komórek w badanym fragmencie

skrawka (ryc.11), co było zapewne skutkiem występowania tzw. apoptozy rozwojowej. W półkulach kontralateralnych zwierząt poddanych H-I również obserwowano pojedyncze komórki apoptotyczne.

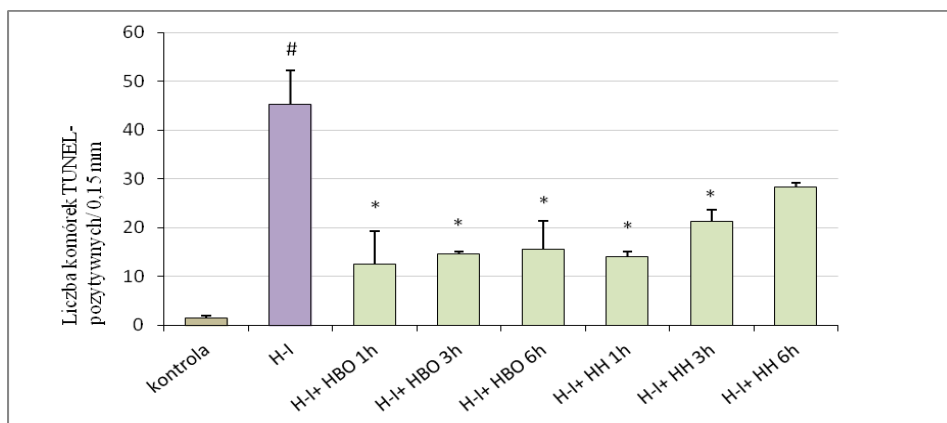
W półkulach ipsilateralnych zwierząt poddanych H-I liczba komórek apoptotycznych w obserwowanym 150  $\mu$ m odcinku sektora CA1 hipokampa wynosiła średnio  $45 \pm 7$ . Zastosowanie terapii hiperbarycznej w znamienny sposób ograniczyło liczbę komórek o charakterze apoptotycznym. Zarówno HBO rozpoczęte 1, 3 jak i 6 godzin po H-I skutkowało zmniejszeniem w badanym obszarze liczby komórek, które uległy apoptozie średnio do odpowiednio,  $12 \pm 6$ ,  $14 \pm 3$  i  $15 \pm 5$  ( $p < 0,05$ ) (ryc.12). Spadek liczby komórek apoptotycznych w każdej z grup był znamienny statystycznie w porównaniu do grupy H-I.

Zastosowanie postkondycjonowania HH również spowodowało zmniejszenie zmian apoptotycznych w badanym sektorze CA1 hipokampa. W skrawkach tkanki mózgowej pochodzącej od zwierząt postkondycjonowanych HH począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po H-I zliczono odpowiednio, średnio  $14 \pm 1$ ,  $21 \pm 3$  oraz  $28 \pm 2$  komórek wykazujących zmiany apoptotyczne. Jednakże spadek liczby komórek, które uległy apoptozie był znamienny statystycznie w porównaniu do grupy H-I jedynie w grupach, w których postkondycjonowanie rozpoczęto 1 lub 3 godziny po H-I ( $p < 0,05$ ).



Ryc.11. Zdjęcia przedstawiające wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na apoptozę komórek w sektorze CA1 hipokampa półkuli ipsilateralnej mózgu szczura 7 dni po H-I w skrawkach wybarwionych metodą TUNEL. A) kontrola, B) H-I, C) H-I+HBO 1h, D) H-I+HBO 3h, E) H-I+HBO 6h, F- H-I+HH 1h, G- H-I+HH 3h, H- H-I+HH 6h.





Ryc.12. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na liczebność komórek apoptotycznych w sektorze CA1 hipokampa półkuli ipsilateralnej w skrawkach mózgowych szczura 7 dni po H-I. Wyniki przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  S.E.M.  $n= 4-5$ , różnice istotne statystycznie \* - różne od H-I,  $p < 0.05$ , # - różne od kontroli,  $p < 0,001$

Poddanie zwierząt kontrolnych warunkom HBO lub HH (kontrola+HBO i kontrola+HH) nie miało wpływu ani na obraz morfologiczny hipokampa ani też na ilość komórek reagujących w teście TUNEL.

#### 4.2. Wpływ HBO lub HH na zmiany behawioralne wywołane przez H-I

Aby zbadać czy obserwowane efekty neuroprotekcyjne po zastosowanych w tych badaniach terapiach mają przełożenie na lepszą kondycję behawioralną zwierząt, przeprowadzono test otwartego pola.

Do badań behawioralnych w otwartym polu użyto zwierząt z grupy kontrolnej, grupy hipoksyjno-ischemicznej oraz zwierząt ze skrajnych grup czasowych, tj. szczurów poddanych HBO lub postkondycjonowaniu HH 1 lub 6 godzin po H-I.

Badania aktywności ruchowej w otwartym polu szczurów poddanych hipoksji- ischemii wykazały, że niektóre parametry oceny zachowania się tych zwierząt są zmienione. Szczury poddane hipoksji-ischemii przebyły dystans o 17% mniejszy ( $p < 0,05$ ) oraz wykazywały zmniejszoną o 22% ( $p < 0,05$ ) ruchliwość podczas 30 minutowego testu w porównaniu z grupą kontrolną, poddaną pozorowanej operacji (tab.2).

W grupie zwierząt poddanych działaniu HBO począwszy od 1 lub 6 godziny po H-I, dystans przebyty przez zwierzęta wzrósł o odpowiednio 25% ( $p < 0,05$ ) i 16%, a ich ruchliwość była większa o 39% ( $p < 0,05$ ) i 24%, w porównaniu do grupy nie poddanej terapii.

Postkondycjonowanie HH nie skutkowało znaczącymi zmianami przebytego dystansu. Jedynie w grupie, w której postkondycjonowanie HH rozpoczęto 6 godzin po H-I, zaobserwowano zwiększenie ruchliwości zwierząt w otwartym polu o 26%, jednak wynik ten nie był znamieny statystycznie.

Szczury poddane hipoksji-ischemii wykazywały zmniejszoną o 22% częstość wejść do uznawanej za niebezpieczną strefy centralnej w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Przebywały też w strefie centralnej o 22% krócej, natomiast o 22% więcej czasu spędzały w rogach pola. O ile można zaobserwować tendencje, to jednak wyniki te nie różniły się w sposób znamieny statystycznie od wyników zwierząt z grup kontrolnych. Poddanie zwierząt po H-I działaniu HBO, powodowało wyraźne, aczkolwiek nieznamienne statystycznie, tendencje do przywrócenia tych parametrów do poziomu zbliżonego do tego, jaki obserwowano przed H-I, czyli do zwiększenia liczby wejść i czasu przebywania w strefie centralnej oraz zmniejszenia czasu przebytego w rogach. Nie można powiedzieć tego samego o grupie zwierząt poddanych postkondycjonowaniu HH, których wyniki nie różnią się w sposób znaczący od wyników zwierząt nie poddanych postkondycjonowaniu.

Osobno przeanalizowano parametry zachowania się zwierząt w ciągu pierwszych i ostatnich pięciu minut testu. Wyniki w tych krańcowych interwałach czasowych wykazały podobne, lecz silniejsze tendencje niż wyniki całościowe.

Szczury poddane hipoksji-ischemii przebyły średnio w ciągu pierwszych 5 minut testu dystans 2119 centymetrów, o 17% mniej ( $p < 0,05$ ) niż dystans przebyty w analogicznym okresie testu przez szczury z grupy kontrolnej (2568 centymetrów) oraz były od nich o 24% mniej ruchliwe ( $p < 0,05$ ) (tab.3).

Zarówno po zastosowaniu HBO jak i postkondycjonowania HH dystans przebyty przez zwierzęta oraz ich ruchliwość rosły, w grupach postkondycjonowanych HH znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

W ostatnich 5 minutach testu u zwierząt z grupy poddanej H-I ewidentnie zmalała aktywność lokomotoryczna – były o 58% mniej ruchliwe ( $p < 0,05$ ) i przebyły o 40% krótszy dystans ( $p < 0,05$ ) niż zwierzęta z grupy kontrolnej (tab.4). We wszystkich grupach, w których stosowana była terapia, z wyjątkiem grupy postkondycjonowanej HH 1 godzinę po H-I, wzrosła aktywność lokomotoryczna w porównaniu do grupy poddanej H-I bez postkondycjonowania, zaś ruchliwość wzrosła znamienne w grupach leczonych HBO ( $p < 0,05$ ).

Zarówno w pierwszych jak i ostatnich 5 minutach testu zwierzęta poddane H-I rzadziej o odpowiednio 34% i 70% ( $p < 0,05$ ) wchodziły do strefy centralnej oraz o odpowiednio 42% i 30% krócej w niej przebywały (tab.3 i 4). Zastosowanie HBO 1 lub 6 godzin po H-I skutkowało zwiększeniem liczby wejść do strefy centralnej o odpowiednio 34% ( $p < 0,05$ ) i 33% (pierwsze 5 minut testu) oraz o 296% i 200% (ostatnie 5 minut testu) ( $p < 0,05$ ) w analogicznych etapach testu a także zwiększało czas przebywania w centrum pola i zmniejszało czas przebywania w rogach. Podobne tendencje uzyskano w grupach postkondycjonowanych HH, jednak brak jest w nich wyników różniących się znamienne statystycznie od grupy H-I w analogicznych okresach testu.

0-30 minut					
	całowita droga [cm]	czas w rogach [s]	czas w centrum [s]	liczba wejść do centrum	wysoka ruchliwość [s]
kontrola	8086,3	796,2	199,2	42,3	265,6
H-I	6724,8 <sup>#</sup>	970,6	155,7	33,2	207,9 <sup>#</sup>
H-I+HBO 1h	8379,4 <sup>*</sup>	788,7	197,6	45,9	289,1 <sup>*</sup>
H-I+HBO 6h	7779,9	851,3	179,8	41,0	257,9
H-I+HH 1h	6429,6	808,0	179,6	29,7	224,5
H-I+HH 6h	7102,5	982,1	95,9	34,0	262,2

Tab.2. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na aktywność lokomotoryczną i parametry zachowania szczurów w teście otwartego pola 28 dni po H-I, zmierzony w ciągu 30 minut. n =5-6, <sup>#</sup> - różne od kontroli,  $p < 0,05$ , <sup>\*</sup> - różne od H-I,  $p < 0,05$

0-5 minut					
	całowita droga [cm]	czas w rogach [s]	czas w centrum [s]	liczba wejść do centrum	wysoka ruchliwość [s]
kontrola	2567,8	122,4	36,6	12,2	100,2
H-I	2119,1 <sup>#</sup>	143,3 <sup>#</sup>	21,3	8,0 <sup>#</sup>	76,4 <sup>#</sup>
H-I+HBO 1h	2340,0	122,0	38,4 <sup>*</sup>	10,7 <sup>*</sup>	92,7
H-I+HBO 6h	2492,5	128,8	24,4	10,7	97,5
H-I+HH 1h	2530,8 <sup>*</sup>	133,3	26,4	10,2	102,0 <sup>*</sup>
H-I+HH 6h	2691,3 <sup>*</sup>	132,8	19,0	9,5	114,7 <sup>*</sup>

Tab.3. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na aktywność lokomotoryczną i parametry zachowania szczurów w teście otwartego pola 28 dni po H-I, zmierzony w pierwszym (0-5 min) interwale czasowym. n=5-6, <sup>#</sup> - różne od kontroli, p<0.05, <sup>\*</sup> - różne od H-I, p<0.05

25-30 minut					
	całowita droga [cm]	czas w rogach [s]	czas w centrum [s]	liczba wejść do centrum	wysoka ruchliwość [s]
kontrola	771,1	175,8	24,8	4,5	21,7
H-I	464,4 <sup>#</sup>	208,2	17,3	1,3 <sup>#</sup>	9,1 <sup>#</sup>
H-I+HBO 1h	889,1 <sup>*</sup>	136,7	25,5	5,3 <sup>*</sup>	24,0 <sup>*</sup>
H-I+HBO 6h	734,7	129,1	25,3	4,0 <sup>*</sup>	17,4 <sup>*</sup>
H-I+HH 1h	416,2	147,0	24,3	1,7	17,5
H-I+HH 6h	564,3	165,6	11,4	3,4	14,1

Tab.4. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na aktywność lokomotoryczną i parametry zachowania szczurów w teście otwartego pola 28 dni po H-I, zmierzony w ostatnim (25-30 min) interwale czasowym. n=5-6, <sup>#</sup> - różne od kontroli, p<0.05, <sup>\*</sup> - różne od H-I, p<0.05



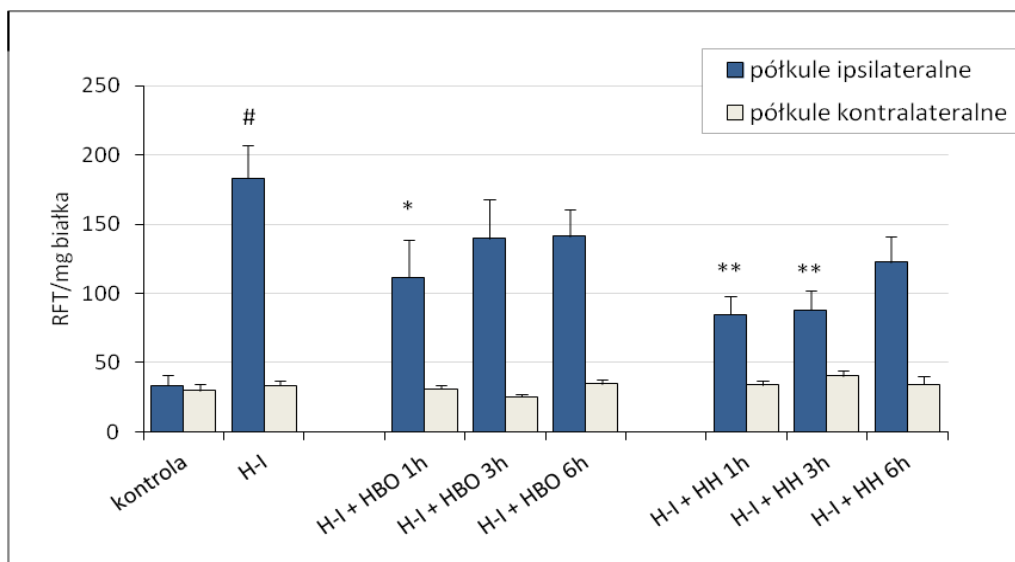
### **4.3. Zastosowanie terapii HBO lub postkondycjonowania HH zmniejsza stres oksydacyjny wywołany H-I**

#### **4.3.1. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na wywołane H-I zmiany poziomu reaktywnych form tlenu w mózgach szczurów**

Poddanie 7 dniowych szczurów H-I powodowało blisko 5,5- krotny (546% kontroli) wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w półkulach ipsilateralnych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. U tych samych zwierząt nie zanotowano zmian poziomu RFT w półkulach kontralateralnych (ryc.13). Poddanie zwierząt kontrolnych warunkom HBO (kontrola+HBO) lub HH (kontrola+HH) nie miało wpływu na poziom RFT w żadnej z półkul mózgowych (wyniki nie umieszczone w pracy).

Zastosowanie terapii HBO zapoczątkowanej 1, 3 lub 6 godzin po H-I skutkowało zahamowaniem wzrostu poziomu RFT o odpowiednio 39%, 24% i 23%. Jednakże jedynie wtedy, gdy terapia rozpoczęta była 1 h po H-I zastosowanie HBO hamowało wytwarzanie RFT w sposób znamieny statystycznie. Jakkolwiek odnotować należy tendencję spadkową, to jednak zahamowanie wzrostu RFT obserwowane przy zapoczątkowaniu terapii w późniejszych czasach nie było statystycznie znamienne w porównaniu do poziomu RFT obserwowanego u zwierząt nie poddanych terapii.

Po postkondycjonowaniu HH rozpoczętym 1 lub 3 godziny po H-I również zaobserwowano znaczny spadek poziomu RFT, w porównaniu do zwierząt nie poddanych terapii. Spadek wynosił odpowiednio 54% i 52% ( $p < 0,01$ ). W grupie, gdzie HH zapoczątkowano po 6 godzinach od H-I poziom RFT wykazywał tendencję spadkową o 33%, ale wynik ten nie był znamieny statystycznie.



Ryc.13. Wpływ zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH na zmiany poziomu RFT w mózgu szczurów poddanych H-I. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 6-8; różnice istotne statystycznie: różne od H-I \* -  $p < 0.05$  ; \*\* -  $p < 0,01$ ; # - różne od kontroli,  $p < 0,001$

#### 4.3.2. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany aktywności SOD obserwowane w mózgach szczurów po H-I

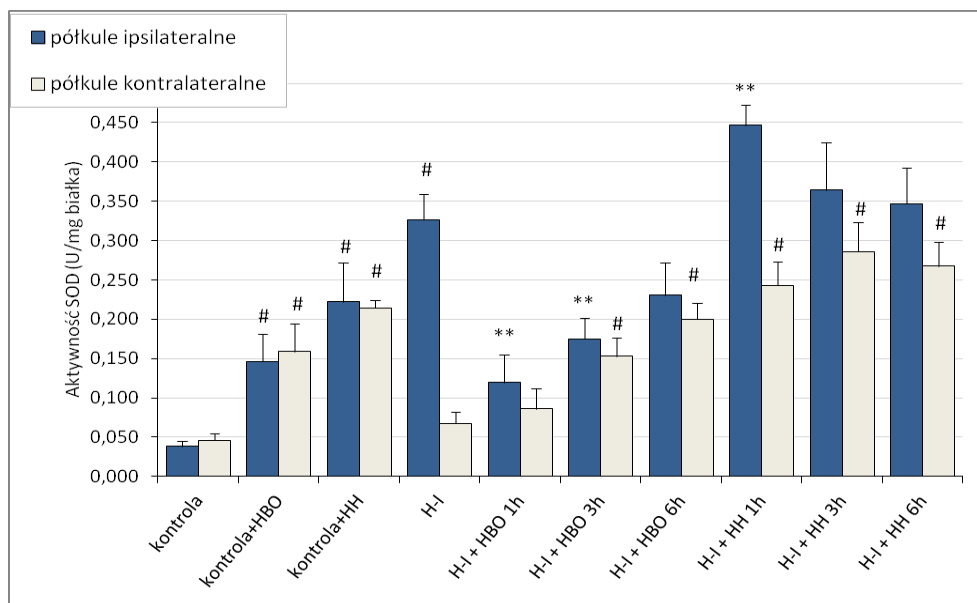
Dla ustalenia efektu HBO oraz HH na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w mózgach zwierząt kontrolnych przeprowadzono badania w których poddano zwierzęta kontrolne 60 minutowym sesjom terapeutycznym przez 3 dni. Badania te wykazały ponad 3-krotny wzrost aktywności SOD w grupie hiperbarycznej oraz ponad 5-krotny wzrost w grupie poddanej hipoksji hipobarycznej. Wzrost aktywności SOD obserwowany był w obu półkulach.

U zwierząt poddanych jedynie H-I aktywność SOD w półkulach ipsilateralnych wzrosła 8,5-krotnie (846% kontroli) w stosunku do zwierząt kontrolnych (Ryc.14). Nie obserwowano jednak wzrostu aktywności w półkulach kontralateralnych.

W grupach zwierząt poddanych HBO po hipoksji-ischemii stwierdzono spadek aktywności SOD w półkulach ipsilateralnych. U zwierząt u których terapię HBO rozpoczęto 1 lub 3 godziny po H-I aktywność SOD w półkulach ipsilateralnych spadła o odpowiednio 63% i 46% w stosunku do grupy H-I i spadek ten był znamieny statystycznie. Spadek aktywności SOD zanotowano również w grupie poddanej HBO począwszy od szóstej godziny po H-I, jednakże nie był on znamieny statystycznie. W półkulach kontralateralnych zwierząt poddanych H-I a następnie terapii HBO obserwowano spadek aktywności SOD jedynie w przypadku rozpoczęcia terapii 1 godz.

po H-I. Spadek ten był poniżej poziomu grupy kontrolnej+HBO, a w pozostałych dwóch grupach poziom był taki sam jak w kontroli+HBO.

Pomiary aktywności SOD w ipsilateralnych półkulach mózgow zwierząt poddanych po H-I postkondycjonowaniu HH wykazywały dalszą tendencję wzrostową w porównaniu do obserwowanej u szczurów nie poddanych żadnej terapii. W grupie gdzie HH zainicjowana została 1 godzinę po H-I wzrost aktywności SOD wynosił 36% w porównaniu do grupy H-I i był istotny statystycznie. Aktywność SOD mierzona w mózgu zwierząt postkondycjonowanych począwszy od 3 lub 6 godziny po H-I, również była wyższa w porównaniu do grupy H-I o odpowiednio 11% i 6%, jednakże nie różniła się od niej statystycznie.



Ryc.14. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na aktywność SOD. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 6-8; różnice istotne statystycznie \*\* - różne od H-I,  $p < 0.01$ , #- różne od kontroli,  $p < 0,001$

Przedstawione wyniki mogą wskazywać na różne mechanizmy neuroprotekcji wywołanej postkondycjonowaniem HH i HBO.

#### 4.3.3. Wpływ zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH na wywołane przez H-I zmiany ekspresji różnych izoform SOD w mózгах 7- dniowych szczurów

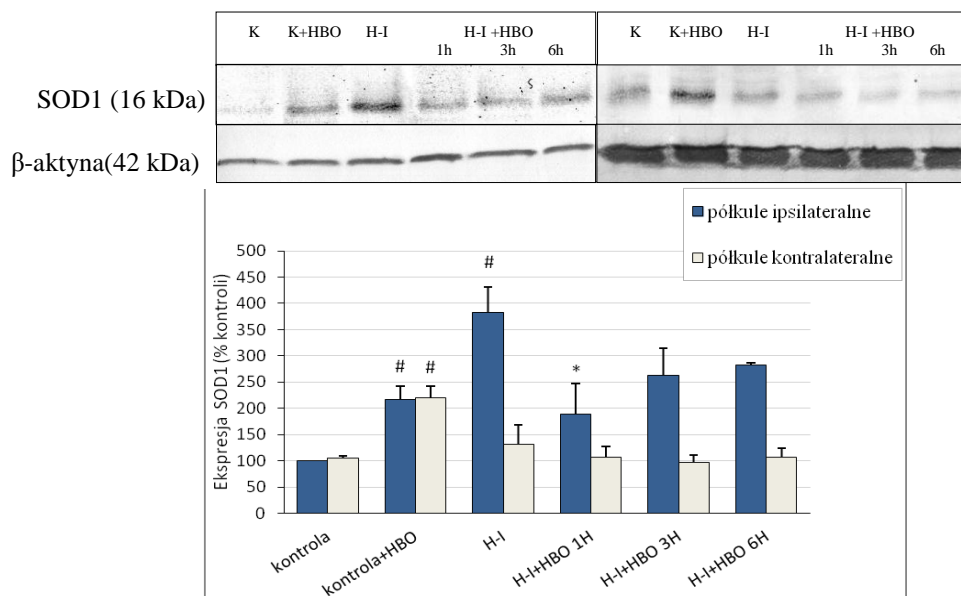
Następnie zbadano wpływ zastosowanych terapii na zaobserwowane zmiany w ekspresji dwóch izoform SOD zachodzące po H-I. Zbadano ekspresję cytoplazmatycznej izoformy SOD 1 oraz izoformy mitochondrialnej SOD2.

##### 4. 3.3.1. Wpływ HBO oraz postkondycjonowania HH na zmiany ekspresji SOD1

Ekspresja SOD1 na poziomie białka została zbadana za pomocą techniki western blot. W mózгах zwierząt poddanych H-I zaobserwowano wzrost ekspresji białka SOD1 w półkulach ipsilateralnych o ponad 250% względem grupy kontrolnej (ryc.15). Nie zaobserwowano zmian ekspresji w półkulach kontralateralnych.

Następnym etapem było zbadanie wpływu tlenu w warunkach hiperbarii na ekspresję SOD. Poddanie zwierząt kontrolnych trzem godzinnym sesjom HBO (kontrola+HBO) skutkowało wzrostem ekspresji SOD1 o ponad 117% w półkulach ipsilateralnych oraz o 120% w półkulach kontralateralnych ( $p < 0,01$ ).

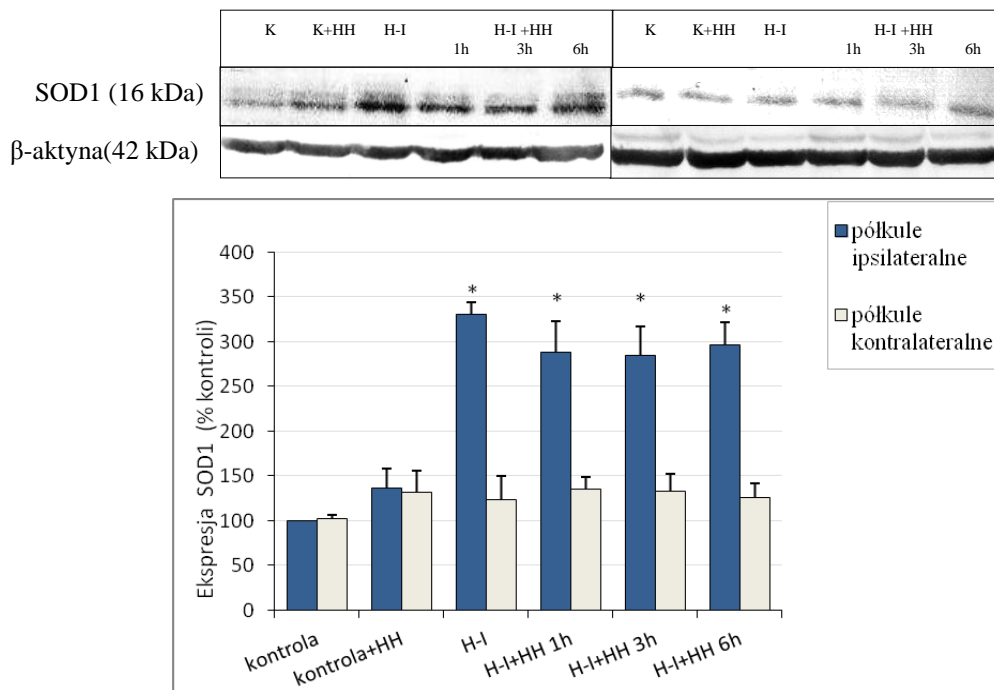
U zwierząt, u których zastosowano HBO począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po H-I ekspresja białka SOD1 w porównaniu do zwierząt nie poddanych żadnej terapii malała odpowiednio do poziomu 188% ( $p < 0,05$ ), 263% i 282% kontroli (ryc.15). Wartości te zbliżone były do obserwowanych w grupie kontrolnej poddanej HBO.



Ryc.15. Wpływ HBO na ekspresję SOD1 w mózgu 7- dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 4; różnice istotne statystycznie \*-

różne od H-I,  $p < 0,05$ ; # - różne od kontroli,  $p < 0,01$ . Przedstawione bloty pokazują ekspresję SOD1 i aktyny w półkulach ipsilateralnych (lewa strona) oraz kontralateralnych (prawa). K- kontrola.

Poddanie zwierząt kontrolnych przez 3 dni 60 minutowej hipoksji hipobarycznej skutkowało niewielkim wzrostem ekspresji SOD1 w półkulach ipsilateralnych o około 37 % w porównaniu do kontroli, oraz o 32% w półkulach kontralateralnych. Wzrost ten nie był znamieny statystycznie. Zastosowanie postkondycjonowania HH u zwierząt poddanych H-I począwszy od 1, 3 lub 6 godziny po urazie, nie wpłynęło znacząco na obserwowany po H-I wzrost ekspresji SOD1 (ryc.16).

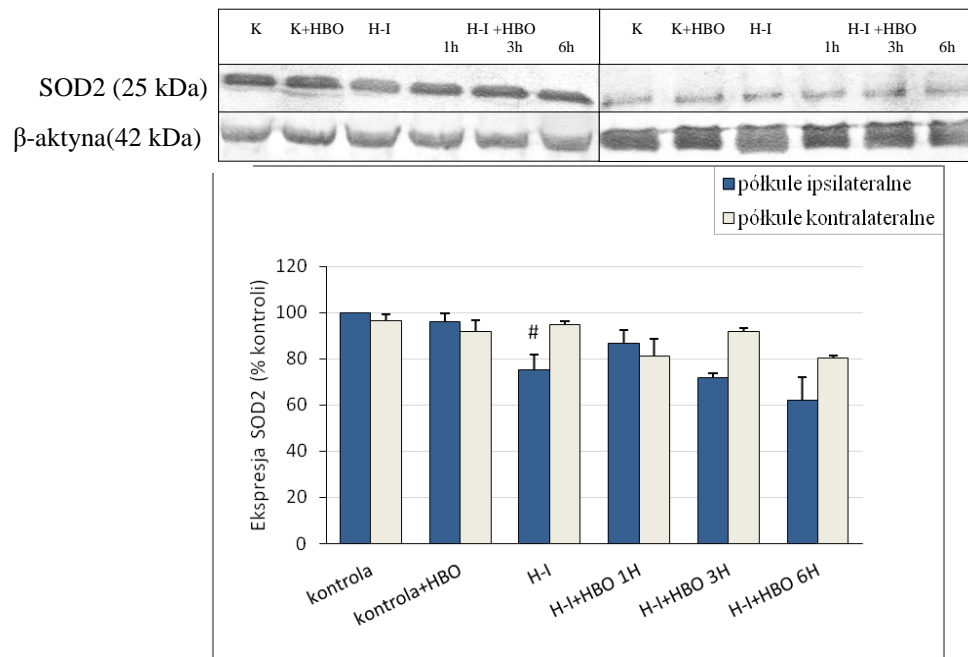


Ryc.16. Wpływ postkondycjonowania HH na ekspresję SOD1 w mózgu 7- dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ; różnice istotne statystycznie \* - różne od kontroli,  $p < 0,05$ , Przedstawione bloty pokazują ekspresję SOD1 i aktyny w półkulach ipsilateralnych (lewa strona) oraz w półkulach kontralateralnych (prawa) .

#### 4.3.3.2. Wpływ HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany ekspresji SOD2

W mózgach zwierząt poddanych H-I zaobserwowano spadek ekspresji białka SOD2 w półkulach ipsilateralnych o 25% względem grupy kontrolnej ( $p < 0,01$ ). Zastosowanie

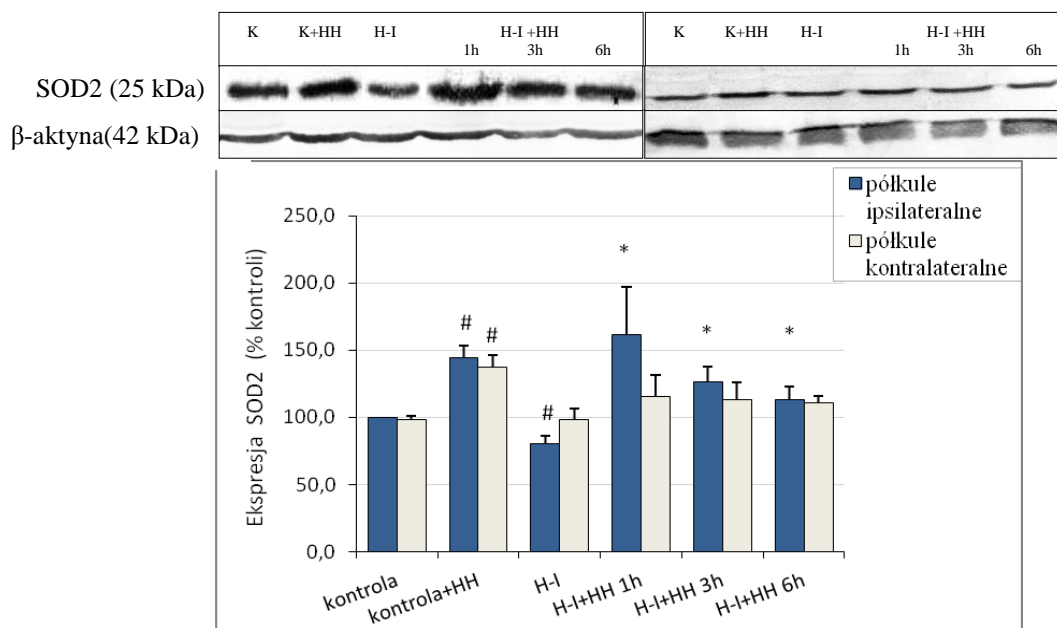
terapii HBO 1 godzinę po H-I powodowało powrót ekspresji białka SOD2 do poziomu 87% grupy kontrolnej, skutkiem czego ekspresja SOD2 nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy tymi dwoma grupami. Efekt ten był taki sam niezależnie od czasu rozpoczęcia terapii (ryc.17). Poddanie zwierząt kontrolnych trzem sesjom hiperbarii tlenowej nie skutkowało wyraźnymi różnicami ekspresji SOD2 pomiędzy grupami.



Ryc.17. Wpływ zastosowania HBO na ekspresję SOD2 w mózgu 7- dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 4; różnice istotne statystycznie # - różne od kontroli, p < 0,01. Przedstawione bloty pokazują ekspresję SOD2 i aktyny w półkulach ipsilateralnych (lewa strona) oraz kontralateralnych (prawa).

Natomiast zastosowanie postkondycjonowania HH u zwierząt kontrolnych (kontrola+HH) skutkowało wzrostem ekspresji SOD2 w porównaniu do kontroli o 44% (p<0,05) w półkulach ipsilateralnych oraz o 37% (p<0,05) w półkulach kontralateralnych.

Poddanie zwierząt postkondycjonowaniu HH począwszy od 1, 3 lub 6 godzin po przebytej H-I spowodowało wzrost ekspresji SOD2 o odpowiednio 102, 58 i 42% (dla wszystkich grup p<0,05) w porównaniu do grupy H-I (ryc.18).



Ryc.18. Wpływ postkondycjonowania HH na ekspresję SOD2 w mózgu 7- dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 4-6; różnice istotne statystycznie, # -różne od kontroli,  $p < 0,05$ , \*- różne od H-I,  $p < 0,05$  n=4. Przedstawione bloty pokazują ekspresję SOD2 i aktywny w półkulach ipsilateralnych (lewa strona) oraz kontralateralnych (prawa).

Przedstawione wyniki mogą sugerować, iż w obserwowany wzrost aktywności SOD po H-I bardziej zaangażowana jest cytoplazmatyczna forma SOD. Spadek aktywności SOD po terapii HBO jest prawdopodobnie związany ze zmniejszeniem ekspresji SOD1, co może sugerować, że neuroprotekcynny efekt HBO bardziej związany jest z tą cytoplazmatyczną izoformą SOD. Natomiast w przypadku protekcji wywołanej postkondycjonowaniem HH znaczenie może mieć wzrost ekspresji formy mitochondrialnej.

#### 4.3.4. Wpływ zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH na zmiany stężenia GSH obserwowane w mózgu 7 -dniowych szczurów po H-I

Aktywność SOD wiąże się z tworzeniem nadtlenu wodoru, który jest następnie usuwany głównie przez peroksydazę glutationową. Oprócz  $H_2O_2$  substratem w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową jest zredukowany glutation (GSH) -

ważny element obrony antyoksydacyjnej biorący oprócz tego udział w neutralizacji nadtlenu organicznych i innych reaktywnych form tlenu.

Poziom GSH mierzony w homogenatach mózgow szczurów kontrolnych wynosił średnio  $30 \pm 5$  nmol/mg białka. H-I wywoływała spadek zawartości GSH, w półkulach ipsilateralnych o 52% oraz o 25% w półkulach kontralateralnych w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc.19).

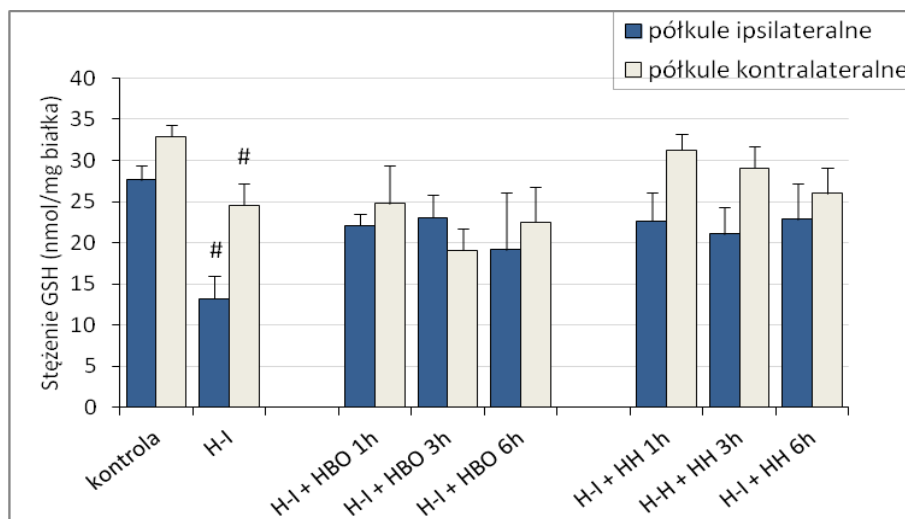
Podanie zwierząt po H-I działaniu HBO lub postkondycjonowaniu HH w obu przypadkach powodowało przywrócenie stężenia GSH do poziomu zbliżonego do tego, jaki obserwowano przed H-I. Po zastosowaniu HBO wartości stężenia GSH w półkulach ipsilateralnych wynosiły odpowiednio 80%, 83% i 69% poziomu kontroli, jednakże nie różniły się one statystycznie od wartości zanotowanej dla grupy kontrolnej. Stężenie GSH w półkulach kontralateralnych również nie różniło się statystycznie od grupy kontrolnej.

Zastosowanie postkondycjonowania HH również sprawiło, że stężenie GSH w obu półkulach powróciło do wartości zbliżonych do tych sprzed H-I i dla półkul ipsilateralnych wynosiło odpowiednio 82%, 76%, 83% wartości kontrolnych, a dla półkul kontralateralnych 95%, 88% i 79 % dla HH zainicjowanej odpowiednio 1, 3 lub 6 godzin po H-I. Wartości te nie różniły się statystycznie od wartości kontrolnych.

Zmiany stężenia GSH w półkulach kontralateralnych po zastosowaniu zarówno HBO jak i HH były nieznamiennie statystycznie w porównaniu do zwierząt nie poddanych terapii.

Podanie zwierząt kontrolnych warunkom HBO (kontrola+HBO) lub HH (kontrola+HH) nie miało wpływu na stężenie GSH (wyniki nie umieszczone w pracy).





Ryc.19. Wpływ hiperbarii tlenowej oraz postkondycjonowania HH na stężenie glutationu zredukowanego (GSH) w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 6; różnice istotne statystycznie # - różne od kontroli,  $p < 0.05$

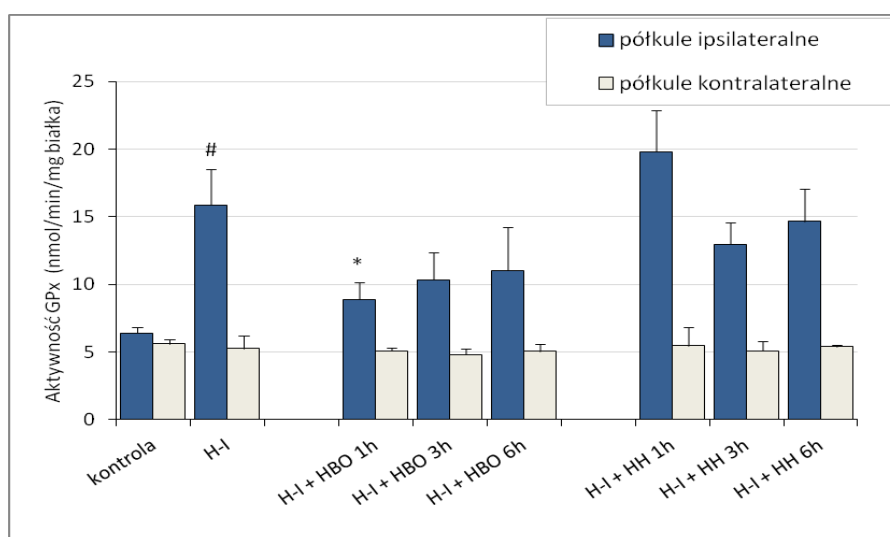
#### 4.3.5. Wpływ HH lub HBO na zmiany aktywność GPx wywołane przez H-I

GPx wraz z katalazą odpowiada za katabolizm nadtlenu wodoru powstającego w komórkach. GPx w reakcji w której uczestniczy GSH, redukuje nadtlenek wodoru do wody, może również redukować wodoronadtlenki organiczne.

W moich doświadczeniach aktywność GPx zmierzona w mózgach szczurów kontrolnych wynosiła średnio  $6,4 \pm 0,44$  nmol/min/mg białka. Aktywność GPx w półkulach ipsilateralnych po H-I wzrastała blisko 2,5- krotnie (ryc.20). Nie zaobserwowano natomiast zmian aktywności GPx w półkulach kontralateralnych. Poddanie zwierząt kontrolnych warunkom HBO (kontrola+HBO) lub HH (kontrola+HH) nie miało wpływu na aktywność GPx (wyniki nie umieszczone w pracy).

W grupach zwierząt poddanych terapii hiperbarycznej zaobserwowano spadek aktywności GPx w półkulach ipsilateralnych w porównaniu do grupy H-I. W grupie, w której terapię rozpoczęto 1 godz. po H-I, spadek ten był istotny statystycznie i wynosił 44%. W pozostałych grupach odnotowano 35(3h) i 30% (6h) spadek, jednakże nie był on znamieny statystycznie.

Inaczej niż w przypadku terapii HBO, aktywność peroksydazy glutationowej mierzona w półkulach ipsilateralnych zwierząt poddanych postkondycjonowaniu HH nie wykazywała jednorodnej tendencji w stosunku do aktywności mierzonych u szczurów po H-I. Tendencja ta zależna była od czasu rozpoczęcia postkondycjonowania. W grupie gdzie HH zainicjowana została 1 godzinę po H-I wzrost aktywności GPx wynosił 25%, natomiast w grupach, w których HH zainicjowano odpowiednio 3 i 6h po H-I, aktywność GPx spadła o 18 i 8% w stosunku do grupy ischemicznej. W żadnej z tych grup nie była to zmiana znamiennej statystycznie.



Ryc.20. Wpływ hiperbarii tlenowej oraz postkondycjonowania HH na aktywność peroksydazy glutationowej. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM, n = 6-8; różnice istotne statystycznie # - różne od kontroli,  $p < 0,05$ , \*- różne od H-I,  $p < 0,05$

#### 4.3.6. Wpływ zastosowania HBO lub postkondycjonowania HH na zmiany aktywność katalazy obserwowane po H-I

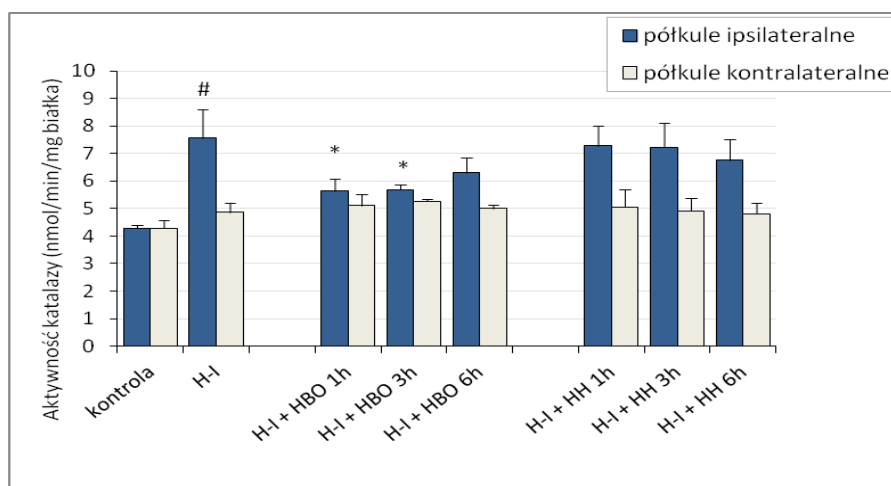
Aktywność katalazy zmierzona w mózгах szczurów kontrolnych wynosiła średnio  $4,28 \pm 0,12$  nmol/min/mg białka. Pomiarы aktywności katalazy w mózгах zwierząt poddanych H-I wykazały zmiany jedynie w półkulach ipsilateralnych. Aktywność ta wzrastała o 77% w porównaniu do wartości kontrolnych ( $p < 0,05$ , ryc.21).

Poddanie zwierząt kontrolnych warunkom HBO (kontrola+HBO) lub HH (kontrola+HH) nie miało wpływu na aktywność katalazy w żadnej z półkul mózgowych (wyniki nie umieszczone w pracy).

W grupach zwierząt poddanych terapii hiperbarycznej miał miejsce spadek aktywności katalazy mierzonej w półkulach ipsilateralnych. W grupach, w których terapia HBO zainicjowana została odpowiednio, 1 lub 3 godziny po H-I aktywność ta spadła o 25% i 24% w porównaniu do grupy H-I i zmiany te były istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ ). W grupie, w której terapię HBO rozpoczynano 6 godzin po H-I aktywność katalazy spadła, nieznamienne statystycznie, o 16%.

Aktywność katalazy u zwierząt poddanych postkondycjonowaniu HH nie wykazywała zmian w stosunku do aktywności katalazy notowanej w mózgu zwierząt po przebytej H-I, których nie poddano terapii. Brak efektu był niezależny od czasu rozpoczęcia postkondycjonowania.

Sugeruje to mniejsze znaczenie katalazy w neuroprotektoryjnym mechanizmie postkondycjonowania HH.



Ryc.21. Wpływ hiperbarii tlenowej oraz postkondycjonowania HH na aktywność katalazy w mózgu 7-dniowych szczurów. Wyniki przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$ ; różnice istotne statystycznie \* - różne od H-I,  $p < 0.05$ , # - różne od kontroli,  $p < 0,05$

## **5.Dyskusja**

### **5.1.Potencjał neuroprotekcyny HBO oraz HH w modelu ENN u siedmiodniowych szczurów**

Jak to już omówiono we Wstępie, wyniki poprzednio opublikowanych badań wykazały, że HBO posiada potencjał neuroprotekcyny (Zhang i wsp., 2005).

Nową obserwacją zawartą w tej pracy jest wykazanie po raz pierwszy, że postkondycjonowanie HH działa neuroprotekcynie w zwierzęcym modelu ENN. Wyniki moich badań potwierdziły, że zarówno HBO i HH działają ochronnie na mózgi noworodków szczurzych poddanych hipoksji-ischemii. Próba wyjaśnienia tego efektu dostarczyła danych wskazujących na odrębne mechanizmy uruchamiane przez HBO i HH. Co prawda mechanizm protekcyny obu testowanych podejść prawdopodobnie opierał się na wzroście stężenia GSH i zmniejszeniu poziomu RFT w badanych tkankach, to jednak są przesłanki do twierdzenia, że drogi prowadzące do uzyskania tego efektu były różne.

### **5.2.Model ENN**

Niedojrzały mózg ludzki jest podatny na uszkodzenie wywołane hipoksją/ischemią. Zmiany patologiczne dotyczą głównie hipokampa oraz kory mózgowej – struktur kluczowych dla procesów kognitywnych i zachowania. Powszechnie uznany i stosowany model H-I 7-dniowych szczurów symuluje procesy komórkowe i zmiany patologiczne obserwowane u noworodków po H-I, takie jak nadmierna aktywacja systemu glutaminianergicznego oraz wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Vannucci i Vannucci, 1997). W zastosowanym w tej pracy modelu obserwuje się śmierć komórek nerwowych w korze mózgowej, hipokampie, prążkowie i wzgórzu, a także uszkodzenie istoty białej (Cheng i wsp., 1998; Puka-Sundvall i wsp., 2000).

Model zwierzęcy ludzkiej asfiksji okołoporodowej, który zastosowałem podejmując badania neuroprotekcynnego działania hiperbarii tlenowej oraz postkondycjonowania hipoksją hipobaryczną, jest odmianą powszechnie stosowanego od 1960 roku modelu Levine'a (Levine, 1960). Został on zmodyfikowany i przystosowany do badań na oseskach szczurzych przez Rice'a i wsp. (1981). W tym modelu siedmiodniowe szczury, po uprzednim podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej poddawane są ekspozycji na warunki hipoksyjne. Na podstawie porównania różnych parametrów opisujących i określających stopień rozwoju mózgu, takich jak zaawansowanie procesu mielinizacji i etap rozwoju poszczególnych struktur mózgowych przyjmuje się, że siedmiodniowy szczur odpowiada stopniem rozwoju mózgu 32-34 tygodniowemu płodowi ludzkiemu (Vanucci i wsp., 1997). Dodatkowo symuluje to warunki, w jakich znajdują się noworodki urodzone przedterminowo, których mózgi, jeszcze nie w pełni rozwinięte, są szczególnie narażone na procesy neurodegeneracyjne (Hagberg i wsp. 1997, Nyakas i wsp. 1996). Ponadto wykazano, że w 7 dniu po urodzeniu u osesków szczurzych utrzymuje się niski poziom transporterów glukozy, co podczas H-I prowadzi do gwałtownego spadku stężenia glukozy i substratów energetycznych (Yager i wsp., 1992).

Wybór tego właśnie modelu w celu indukowania hipoksyjnego uszkodzenia mózgu u niedojrzałych szczurów wynika z faktu, że posiada on wiele istotnych zalet przy niewielkiej ilości wad. Zaletą jest fakt, że przy pewnej wprawie, zabieg podwiązania tętnicy szyjnej wspólnej przeprowadza się szybko i precyzyjnie. Ponadto jest on stosunkowo tani, mało inwazyjny i daje duże możliwości pozyskiwania materiału do opracowań statystycznych. Model ten cechuje się niską, bliską zeru, śmiertelnością zwierząt oraz brakiem konwulsji czy komplikacji krążeniowo-oddechowych. Jego kolejną zaletą jest fakt, że jest on powszechnie stosowany do testowania potencjalnych substancji neuroprotekcynnych. Testowano na nim między innymi: edaravon, czynniki neurotroficzne, np. GDNF, deksametazon, magnez, osteopontynę, EPO, antyoksydanty, komórki macierzyste i modulatory kanałów  $K^{(+)}$ -ATP (Sameshima i Ikenoue, 2013). Jednakże oprócz wielu zalet model ten nie pozbawiony jest pewnych wad. W modelu asfiksji okołoporodowej uzyskujemy tylko jednostronne uszkodzenie mózgowia, przy braku uszkodzenia innych organów, co jest rzadko obserwowane w patologii ludzkiej. Pewnym ograniczeniem modelu jest brak możliwości wielokrotnego rejestrowania

niektórych parametrów np. niemożliwe jest wielokrotne pobieranie próbek krwi. Za korzystną cechę stosowanego modelu należy uznać fakt, że nie powoduje on u badanych zwierząt żadnych poważnych, ubocznych zaburzeń zdrowotnych, co pozwala badać odroczone skutki asfiksji okołoporodowej (Dell' Anna i wsp., 1991). Stosowanie półkuli nie objętej uszkodzeniem jako wewnętrznej kontroli umożliwia standaryzację wyników. Mimo to obserwuje się dość znaczną zmienność wyników u poszczególnych zwierząt, co można jednak skorygować przez zwiększenie ich liczebności w grupach doświadczalnych. Model asfiksji okołoporodowej jest dobrze scharakteryzowany pod względem hemodynamiki, metabolizmu energetycznego i przemiany białek (Hagberg i wsp., 1997). Ponadto wykazano, że zapis EEG szczura poddanego eksperymentalnej hipoksji-ischemii jest zgodny ze wzorem otrzymanym w warunkach klinicznych po przebytej asfiksji okołoporodowej (Sampath i wsp., 2014). Wszystkie te czynniki powodują, że model ten jest szeroko stosowany i uznany za odpowiedni do badania skuteczności nowych metod zapobiegania uszkodzeniom mózgu u noworodków.

### **5.3. HBO i HH zmniejszają uszkodzenie mózgu po H-I**

W moich badaniach zaobserwowałem, że H-I powoduje duży ubytek komórek nerwowych oraz atrofię tkanek w półkuli ipsilateralnej, skutkującą ubytkiem masy tej półkuli przy zachowaniu prawidłowej i niezmienionej struktury półkuli kontralateralnej, co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy (Calvert i wsp., 2002). Co prawda dokładna sekwencja zdarzeń zachodzących po H-I nie jest do końca znana, ale zauważalna martwica mózgu pojawia się 24 godziny po H-I, natomiast jak zaobserwowałem w 7 dniu po H-I da się zauważyć wyraźne zmniejszenie objętości prążkowania, hipokampa i kory mózgowej w półkuli ipsilateralnej, co również jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Hossain i wsp., 2004).

Badanie efektywności zastosowania HBO oraz postkondycjonowania HH jako zabiegów neuroprotekcyjnych wymagało więc porównania makroskopowych oraz morfologicznych zmian w mózгах szczurów kontrolnych i poddanych eksperymentalnej terapii.

W moich badaniach H-I u szczurów spowodowała częściową martwicę półkul ipsilateralnych, znaczący ubytek masy tych półkul, dodatkowo znaczna część komórek w sektorze CA1 hipokampa uległa wybarwieniu metodą TUNEL, co sugeruje, że w tym

obszarze mózgu półkuli ipsilateralnej komórki uległy apoptozie lub nekrozie. Uszkodzenie na poziomie komórkowym w hipokampie i korze mózgowej zostało potwierdzone za pomocą badań morfologicznych. Zastosowanie zarówno HBO jak i postkondycjonowania HH skutkowało znaczącą neuroprotekcją, co wyrażało się tym, że obie metody zainicjowane 1, 3 i 6 godzin po H-I zmniejszały ubytek masy półkul ipsilateralnych, redukowały obszar martwicy oraz zmniejszały liczbę komórek apoptotycznych. Zarówno w przypadku HBO jak i postkondycjonowania HH neuroprotekcję na poziomie komórkowym w hipokampie i korze mózgowej potwierdzono za pomocą badań morfologicznych.

Neuroprotekcja wywołana HBO była na podobnym poziomie niezależnie od czasu rozpoczęcia terapii, do 6 godzin po H-I. Podobne wnioski płyną ze szczegółowych badań Wanga i wsp. (2008), którzy testowali okno terapeutyczne dla HBO w podobnym do stosowanego przez mnie układzie eksperymentalnym. Różnice polegały na tym, że we wspomnianych badaniach użyto innego szczepu szczurów (Sprague–Dawley), wydłużono czas niedotlenienia z 75 do 120 minut, za to zwiększając zawartość tlenu w mieszance hipoksyjnej z 7,4 do 8%, a terapię hiperbaryczną stosowano przy ciśnieniu 2 ATA przez 7 kolejnych dni. Z tych badań wynika, że okno terapeutyczne dla HBO może być wydłużone nawet do 12 godzin po H-I, a dodatkowo skuteczność w tej grupie czasowej nie różni się istotnie od grupy, w której HBO zaczęto stosować 3 godziny po H-I. HBO zastosowana do 12 godzin po H-I zmniejszała ubytek komórek w sektorze CA1 hipokampa oraz poprawiała wyniki zwierząt w testach behawioralnych. Porównywalną neuroprotekcję z 7 – dniowym cyklem HBO zaobserwowałem w moich badaniach, stosując wyższe o 0,5 ATA ciśnienie przez 3 dni. Najlepsze wyniki dawało rozpoczęcie terapii HBO 1 godzinę po H-I, choć okno terapeutyczne wyniosło 6 godzin. Do podobnych wniosków doszli Liu i wsp. (2006), którzy na podstawie badań histologicznych oraz behawioralnych określili optymalny czas okna terapeutycznego na 6 godzin. Wang i wsp. (2014) wykazali skuteczność HBO w modelu MCAO (ang. middle cerebral artery occlusion, okluzja tętnicy środkowej mózgu) u dojrzałych szczurów, zastosowanej 1 godzinę po uszkodzeniu, w przeciwieństwie do HBO użytej 12 godzin po MCAO. Mechanizm protekcji był związany ze zmniejszeniem przepuszczalności bariery krew- mózg.

Przeglądając dostępną literaturę nie znalazłem opisów prób stosowania postkondycjonowania HH w modelu H-I; moja praca jest zapewne pierwszym takim podejściem. Postkondycjonowanie HH w moich badaniach było najbardziej skuteczne, gdy zostało zastosowane 1 godzinę po H-I. Dane z badań nad postkondycjonowaniem serca, nerek i wątroby istotnie wskazują, że najlepsze efekty uzyskuje się, gdy postkondycjonowanie jest inicjowane w jak najkrótszym czasie po uszkodzeniu (Vorobiev i wsp., 2013; Zhao, 2009). Z drugiej strony pojawiają się doniesienia o większej skuteczności postkondycjonowania ischemicznego mózgu w modelu udaru (Ren i wsp., 2008) oraz postkondycjonowania hipoksją hipobaryczną w modelu ostrej hipoksji (Vorobiev i wsp., 2013) u szczura, zastosowanych w późniejszym czasie po uszkodzeniu. Różnice te mogą być wynikiem stosowania przez wspomnianych autorów innych modeli niż ten stosowany w moich badaniach oraz mogą wynikać z faktu, że badania te prowadzono na zwierzętach dorosłych. Duża część wiedzy na temat mechanizmów niedotlenieniowo-niedokrwiennego uszkodzenia mózgu oraz jego potencjalnej terapii, pochodzi z badań na modelach eksperymentalnych udaru u zwierząt dorosłych. Nie ma jednak bezpośredniego przełożenia z badań nad dorosłymi organizmami na noworodki, co wynika z paradoksu, iż niedojrzały mózg jest ogólnie uważany za bardziej odporny na uszkodzenia związane z H-I (Painter, 1995), jednak na wczesnym etapie rozwojowym niektóre grupy neuronów wykazują zwiększoną podatność na takie uszkodzenie na skutek m.in. zwiększonej gęstości receptorów dla pobudzających aminokwasów na ich powierzchni, większej wrażliwości na działanie RFT i reaktywnych form azotu (RFA) czy spadku poziomu transporterów glukozy w mózgu (Hagberg i wsp., 2004 oraz Lai i Yang, 2011).

#### **5.4.HBO i HH zmniejszają liczbę komórek apoptotycznych po przebytej H-I**

Nekroza to rodzaj śmierci komórki występujący nagle w odpowiedzi na poważne uszkodzenie, związane z zaburzeniem homeostazy jonowej. Apoptoza to proces opóźnionej śmierci komórki, zachodzący w wyniku aktywacji określonych genów, któremu nie towarzyszy reakcja zapalna. Mimo, iż ich obrazy morfologiczne różnią się od siebie, procesy nekrozy i apoptozy są częścią kontinuum nekrotyczno-apoptotycznego, a niektóre ich mechanizmy mogą być wspólne. Różne mechanizmy uszkodzenia są aktywowane w zależności od stopnia uszkodzenia mózgu (Banasiak i wsp., 2000; Berger i Garnier, 2000; Blomgren i wsp., 2001; Bonfoco i wsp., 1995;



Edwards i Mehmet, 1996; Martin, 2001). Dane sugerują, że śmierć neuronów w wyniku hipoksji-ischemii zachodzi zarówno na drodze nekrozy, jak i apoptozy – zarówno zależnej od kaspazy, jak i niezależnej, związanej z czynnikiem wyzwalającym apoptozę (ang. AIF – apoptosis inducing factor). Wydaje się, że hipoksja sama w sobie nie wywołuje apoptozy, lecz czyni to w sposób pośredni przez zubożenie zasobów energetycznych komórki i zaburzenie homeostazy jonowej, które aktywują ścieżki apoptotyczne (Banasiak i wsp., 2000).

H-I w moich badaniach skutkowało apoptozą w komórkach hipokampa półkuli ipsilateralnej. Potwierdzeniem moich rezultatów są wyniki prac innych autorów (Liu i wsp., 2013). W półkulach kontrolnych oraz kontralateralnych zauważyłem pojedyncze komórki apoptotyczne, związane prawdopodobnie z apoptozą rozwojową (Oppenheim, 1991). Zarówno zastosowanie HBO jak i HH znacząco zmniejszyło liczebność komórek apoptotycznych w obszarze CA1 hipokampa. Znane są inne wyniki, które wskazują na antyapoptotyczne właściwości terapii HBO (Li i wsp., 2009). W tym przypadku stosowano prekondycjonowanie HBO w modelu MCAO, co skutkowało hamowaniem mitochondrialnych szlaków apoptozy, zmniejszeniem aktywności kaspazy i poziomu cytochromu c w cytozolu oraz zwiększeniem ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2. W badaniu przeprowadzonym przez Liu i wsp. (2013) komórki apoptotyczne w hipokampie 48 godzin po H-I stanowiły około połowę wszystkich komórek hipokampa. Po zastosowaniu HBO 1 godzinę po H-I, przy ciśnieniu 2,5 ATA przez 90 minut stanowiły one już mniej niż 15%. Z kolei pojedyncza, rozpoczęta godzinę po H-I terapia HBO przy ciśnieniu 3 ATA przez 1 godzinę zmniejszyła liczbę komórek wybarwionych metodą TUNEL w korze mózgowej i hipokampie w półkuli ipsilateralnej 18 i 24 godziny po H-I (Calvert i wsp., 2003). Co prawda wymienieni wyżej autorzy badali apoptozę we wcześniejszym etapie niż ja w mojej pracy, ale uzyskane przez nich wyniki są porównywalne do zaprezentowanych w tej rozprawie. W przytaczanych wyżej publikacjach terapię rozpoczynano 1 godzinę po H-I, w mojej rozprawie pokazałem, że neuroprotekcję na podobnym poziomie można uzyskać nawet, gdy HBO zacznie stosować się w trzeciej, czy nawet szóstej godzinie po H-I. Ilość komórek apoptotycznych w tych grupach była tylko niewiele większa niż w grupie, w której terapię HBO rozpoczynano 1 godzinę po H-I.

Cheng i wsp. (1998) na podstawie badań stwierdzili, że w korze mózgowej i hipokampie półkuli ipsilateralnej mózgu szczura stopniowo wzrasta liczba komórek apoptotycznych po hipoksji-ischemii, a ich największą liczbę można znaleźć 24 godziny po uszkodzeniu. Liczne badania z wykorzystaniem różnych metod, m.in. mikroskopii elektronowej, elektroforezy DNA, barwienia bromkiem etydyny, barwienia na obecność kaspazy 3, potwierdziły występowanie apoptozy w mózgu młodych szczurów po H-I (Calvert i wsp., 2002; Nakajima i wsp., 2000; Northington i wsp., 2001; Pulera i wsp., 1998). Dodatkowo apoptoza utrzymywała się w fazie opóźnionej uszkodzenia mózgu, nawet 7 dni po H-I, co sugeruje, że może to być odpowiedni punkt uchwytu dla terapii. Właśnie w takim punkcie czasowym, jako optymalnym, następowało barwienie TUNEL w moich badaniach. Pulera i wsp. (1998) wykazali, że barwienie TUNEL było pozytywne w populacji tych samych komórek, w których zauważono ewidentne cechy apoptozy na poziomie ultrastrukturalnym.

Z badań przeprowadzonych przez Zhao i wsp. wynika, że postkondycjonowanie blokuje apoptozę, w obszarze bezpośrednio otaczającym ognisko martwicy, czyli w półcieniu, 2 dni po udarze (Zhao i wsp., 2006). Postkondycjonowanie ischemiczne zmniejsza uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu, co jest kluczowym etapem w kaskadzie prowadzącej do apoptozy (Wang i wsp., 2008). W moich wynikach pokazałem, że również postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną w modelu H-I blokuje apoptozę w hipokampie szczurów. Wymienione wyżej wyniki oraz wyniki zawarte w tej rozprawie sugerują, że postkondycjonowanie może zmniejszać uszkodzenie niedotlenieniowo-niedokrwiennie poprzez zmniejszenie produkcji RFT i blokowanie apoptozy.

Postkondycjonowanie HH rozpoczęte 1 godzinę po H-I blokowało apoptozę w hipokampie w podobnym stopniu, co HBO. Im później rozpoczęte postkondycjonowanie HH, tym bardziej spada zdolność do hamowania śmierci komórkowej. Komórek apoptotycznych było więcej w grupie, w której postkondycjonowanie HH rozpoczęto w 3 lub 6 godzinie po H-I, niż w której rozpoczęto 1 godzinę po H-I.

## 5.5. HBO i HH zmniejszają stres oksydacyjny spowodowany H-I

Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują, że H-I wywołuje stres oksydacyjny w korze mózgowej i hipokampie, o czym świadczy znaczący, 5,5-krotny wzrost poziomu RFT w półkulach ipsilateralnych.

Niedokrwienne uszkodzenie komórek mózgowych prowadzi do produkcji nadmiernych ilości wolnych rodników, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), rodniki tlenu azotu ( $NO^{\cdot}$ ) i rodniki hydroksylowe ( $^{\cdot}OH$ ), co wykazano zarówno w eksperymentach *in vivo* jak i *in vitro* (Ohsawa i wsp., 2007; Kumar i wsp., 2008). Reaktywne formy tlenu (RFT), w tym wolne rodniki, zwiększają uszkodzenie mózgu inicjując peroksydację lipidów błon komórkowych oraz uszkadzając DNA i białka (Kumar i wsp., 2008).

Peroksydacja lipidów błonowych może zaburzać strukturę i funkcję błon biologicznych, zwłaszcza mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i błony plazmatycznej neuronów, doprowadzając do śmierci komórek. RFT mogą oddziaływać na strukturę i funkcję białek poprzez modyfikację ich aktywności, wpływ na płynność błon plazmatycznych, oraz przez modyfikację ich struktury. Niezwykle niebezpiecznym skutkiem stresu oksydacyjnego może być uszkodzenie nici DNA, które może być indukowane przez rodniki hydroksylowe. Może dojść do utleniania zasad purynowych i pirymidynowych, uszkodzenia reszt pentozowych, rozerwania wiązań glikozydowych oraz rozerwania łańcucha w miejscu wiązań fosfodiesterowych. Efektem uszkodzenia DNA może być śmierć neuronów (Łazarewicz i Salińska, 2003).

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że wzrost poziomu reaktywnych form tlenu towarzyszy hipoksji-ischemii i przyczynia się do uszkodzenia niedojrzałego mózgu. Moje rezultaty są potwierdzeniem danych, uzyskanych przez innych autorów, opisujących wzrost poziomu RFT po H-I w tym samym modelu (Revuelta i wsp., 2015, Rong i wsp., 2013; Pan i wsp., 2012). Wzrost poziomu RFT po H-I był opisywany również w innych modelach hipoksji-ischemii, a neurotoksyczność RFT wiązana była ze zmniejszeniem skuteczności systemu antyoksydacyjnego (Bågenholm i wsp., 1998). Obserwowany przeze mnie ogólny wzrost produkcji RFT, sugeruje wzrost peroksydacji lipidów w komórkach hipokampa i kory mózgowej. Autorzy znanych mi prac notowali wzrost lipoperoksydacji w innych modelach H-I, takich jak prenatalna hipoksja u świń

oraz świnek morskich (Andersen i wsp., 1996; Maulik i wsp., 1998; Mishra i wsp., 1989; Numagami i wsp., 1997; Razdan i wsp., 1993).

Mechanizm odpowiedzialny za wzrost stresu oksydacyjnego w późniejszej fazie uszkodzenia może obejmować indukcję enzymów produkujących wolne rodniki, takich jak cyklooksigenaza 2 (COX-2) oraz syntaza tlenku azotu (Ohtsuki i wsp., 1996). Poza tym odkryto, że w hipokampie w fazie późnej uszkodzenia ischemicznego, mechanizmy wychwytu zwrotnego glutaminianu w komórkach glejowych (GLT-1 i GLAST) oraz w neuronach (EAAC1) wykazują osłabione działanie (Raghavendra Rao i wsp., 2000). Ich dysfunkcja pogłębia proces uszkodzenia neuronów, ponieważ glutaminian, zalegając w szczelinach synaptycznych, potęguje stres oksydacyjny wywołany ekscytotoksycnością.

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że zarówno HBO, jak i HH zastosowane po H-I zmniejszają poziom RFT w korze mózgowej i hipokampie półkul ipsilateralnych. Spadek poziomu RFT jest niezależny od tego, kiedy rozpoczynano ekspozycję na warunki hiperoksyjne lub hipoksyjne, lecz jest nieco większy w grupach, w których ekspozycję na HBO lub HH rozpoczynano 1 godzinę po H-I. Spadek stresu oksydacyjnego po zastosowaniu HBO potwierdzono również w innych modelach udaru mózgu (Sun i wsp., 2014, Ostrowski i wsp., 2006), natomiast w przypadku HH jest to pierwsze takie doniesienie. Poddanie zwierząt kontrolnych HH nie zwiększyło poziomu RFT w mózgu szczurów, co jest zgodne z wynikami Arthura i wsp. (2004).

### **5.6. Behawioralne aspekty wpływu hipoksji–ischemii i neuroprotekcijnego działania HBO i HH w modelu ENN**

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, mających na celu określenie, czy neuroprotekcja wywołana przez HBO oraz HH wiąże się także z poprawą funkcjonalną, zbadano zachowanie się szczurów w otwartym polu. Wiadomo, że odroczonym skutkiem przebytej w okresie okołoporodowym hipoksji-ischemii są problemy o charakterze kognitywnym (Marlow i wsp., 2005; Gonzalez i Miller, 2006; Rennie i wsp., 2007), zaburzenia sensoromotoryczne, oraz upośledzenie sprawności ruchowej (Bona i wsp. 1997). Z kolei niektóre dane z literatury sugerują, że poanoksyjne zaburzenia zachowania u rozwijających się szczurów mogą dotyczyć przede wszystkim zmian w aktywności ruchowej zwierząt, obserwowanych tylko w okresie młodzieńczym

(Schoorman i Traber, 1989). Na ogół testy behawioralne u rozwijających się młodych zwierząt nie są powszechnie stosowane. Jednak przytoczone powyżej publikacje dały przesłanki dla podjęcia w tej pracy badań nad wpływem hipoksji-ischemii, przebytej w okresie okołoporodowym, na zachowanie się 5-tygodniowych szczurów, oraz potwierdzenie na poziomie funkcjonalnym neuroprotekcijnego działania HBO i HH, wykazanego wcześniej przy pomocy badań morfologicznych. Do testów wybrano zwierzęta postkondycjonowane HH oraz poddane HBO 1 oraz 6 godzin po H-I. W celu zmniejszenia liczby zwierząt pominięto, jako pośrednie, grupy, w których terapię rozpoczynano 3 godziny po H-I.

Model H-I wywołuje deficyty kognitywne, objawiające się zaburzeniami długoterminowej pamięci przestrzennej w teście Morris'a (Pereira i wsp., 2007; Almlı i wsp., 2000), pamięci związanej z rozpoznawaniem obiektów (Pereira i wsp., 2008) i pamięci awersyjnej w teście unikania inhibicyjnego (ang. inhibitory avoidance task) (Arteni i wsp., 2003) oraz deficyty motoryczne, objawiające się gorszymi wynikami w teście rota rod, circling (Yesilirmak i wsp., 2008) i w teście odruchów postawnych. H-I uszkadza pamięć, ponieważ neurony hipokampa są wrażliwe na tego typu uszkodzenie, a hipokamp jest zaangażowany w regulację i wczesne procesy formowania pamięci (Rehni i wsp., 2008).

Test otwartego pola jest przydatnym narzędziem do badania zachowań lękowych oraz do badania aktywności lokomotorycznej zwierząt. Przeprowadzone przeze mnie badania aktywności ruchowej szczurów poddanych hipoksji-ischemii w otwartym polu wykazały, że niektóre parametry oceny zachowania tych zwierząt są zmienione. Szczury poddane H-I bez zastosowania jakiegokolwiek terapii, wykazywały zmniejszoną aktywność lokomotoryczną, miarą której były ruchliwość oraz całkowity dystans przebyty przez badane zwierzęta w porównaniu do szczurów kontrolnych poddanych pozorowanej operacji. Dane literaturowe dotyczące aktywności zwierząt po H-I nie są spójne. Istnieją doniesienia o zmniejszonej aktywności szczurów po przebytej H-I (Carletti i wsp., 2012), o braku deficytów lokomotorycznych (Miguel i wsp., 2015, Ikeda i wsp., 2001; Balduini i wsp., 2000), a nawet wzmianki o zwiększonej aktywności szczurów po H-I, mające sugerować etiologię ADHD. Testy te były jednak wykonywane głównie u starszych szczurów (Rojas i wsp., 2013), a dodatkowo w większości testów szczury umieszczano w otwartym polu na 5 minut, a nie jak w

niniejszej pracy na 30 minut. Czas trwania testu został wydłużony, aby otrzymać pełniejszy obraz reakcji zwierząt – za pomocą standardowego testu trwającego 5 minut można zmierzyć jedynie bezpośrednią i natychmiastową reakcję na nowe środowisko (Spruijt i wsp., 2014). Różnice w wynikach testów mogą wynikać również z tego, że wykonywano je w różnych punktach czasowych po H-I, co biorąc pod uwagę dynamiczny rozwój młodych szczurów może mieć duże znaczenie.

Mniej wejść do strefy centralnej oraz krótsze w niej przebywanie, w porównaniu do czasu przebywania w rogach aparatu obserwowane u zwierząt po H-I w moich badaniach mogą sugerować zwiększony poziom lęku u szczurów po H-I. Po umiejscowieniu w aparacie do otwartego pola, gryzonie spontanicznie i naturalnie preferują obrzeża areny i unikają obecności w centralnej części otwartego pola. Szczury poruszają się w pobliżu ścian - zachowanie takie nazywa się tigmotaksją. Wzrost czasu spędzonego przez zwierzę w polu centralnym oraz wzrost stosunku lokomocji w polu środkowym do ogólnej lokomocji świadczą o spadku poziomemu lęku. Zachowania lękowe w otwartym polu są wywoływane przez izolację od grupy oraz agorafobię, czyli lęk przed otwartą przestrzenią (Pruet i Belzung, 2003). W badaniach innych autorów również pokazano, że H-I powoduje zwiększenie występowania zachowań lękowych w teście otwartego pola (Carletti i wsp., 2012).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, zwierzęta, które po H-I zostały poddane HBO uzyskały wyniki testu podobne do zdrowych zwierząt z grupy kontrolnej. Wskazuje to, że HBO zapobiega deficytom lokomotorycznym u niedojrzałych szczurów po H-I, co jest najpewniej wynikiem obserwowanego zmniejszenia uszkodzenia mózgu, a co za tym idzie poprawy stanu neurologicznego (Badr i wsp., 2001). Podobne obserwacje poczyniono u zwierząt dorosłych, u których HBO jest w stanie zmniejszyć deficyty w testach behawioralnych po ischemii (Chang i wsp., 2000; Kawamura i wsp., 1990). W moich badaniach lepsze wyniki w teście uzyskały zwierzęta poddane HBO 1 godzinę po H-I, jednak różnica w stosunku do zwierząt poddanych HBO 6 godzin po H-I jest niewielka i nieznamienne statystycznie.

U zwierząt postkondycjonowanych HH zanotowano nieco gorsze wyniki niż u zwierząt po terapii HBO, jednak w przypadku niektórych parametrów wyniki te były wciąż lepsze niż wyniki zwierząt niekondycjonowanych. Dotyczy to głównie wyników w

ciągu pierwszych i ostatnich 5 minut testu. Moje wyniki to pierwsze takie doniesienie – w literaturze nie znalazłem wyników badań, które podejmowałyby behawioralny aspekt wpływu HH na uszkodzenie mózgu. Brak jest różnic znamiennej statystycznie pomiędzy grupą postkondycjonowaną od 1 godziny oraz 6 godziny po H-I.

Mimo iż zwierzęta z poszczególnych grup doświadczalnych łączono w bloki, wyniki pochodzą z niezależnych eksperymentów, w których nawet drobne różnice zewnętrzne (oświetlenie, wilgotność powietrza, temperatura otoczenia), a także różnice w habituacji zwierząt do warunków eksperymentalnych, mogły wpłynąć na poziom lęku i zachowanie ruchowe zwierząt. Duże odchylenia w teście, a co za tym idzie mała istotność statystyczna wyników, może wynikać również z faktu, iż jak wskazali Ten i wsp. (2004) na podstawie badań u myszy, tylko zwierzęta z ciężkim uszkodzeniem mózgowia po H-I wykazują istotne statystycznie różnice w wynikach w stosunku do zwierząt kontrolnych w teście otwartego pola i rota-rod. Odchylenia w przedstawionych wynikach eksperymentów mogą wynikać ze zróżnicowania stopnia uszkodzenia mózgu u szczurów w przeprowadzonym eksperymencie. Nie można też zapominać, że w zastosowanym w tej pracy modelu asfiksji, u badanych zwierząt uszkodzeniu ulega tylko jedna półkula mózgowa. Aktywność drugiej, zdrowej półkuli może w jakimś stopniu kompensować zaburzenia behawioralne, stąd każda otrzymana znamienna różnica w zachowaniach zwierząt ma istotne znaczenie.

Uogólniając i podsumowując wyniki z testu otwartego pola, można powiedzieć, że szczury po H-I wykazywały pewne deficyty w porównaniu do zwierząt kontrolnych, a potencjał neuroprotekcyny HBO i HH został potwierdzony na poziomie funkcjonalnym mózgu. Zwierzęta poddane HH uzyskały nieco gorsze wyniki niż zwierzęta poddane HBO. Może to oznaczać, iż w przypadku HBO istnieje większe przełożenie neuroprotekcji odkrytej w badaniach morfologicznych i biochemicznych na neuroprotekcję funkcjonalną.

### **5.7. Odmienny wpływ HBO oraz HH na zwiększoną aktywność SOD po przebytej H-I**

Anionorodnik nadtlenkowy sam w sobie nie jest szczególnie niebezpieczny, jednak może on reagować z NO tworząc  $\text{ONOO}^-$  - niebezpieczną RFT (Mruk i wsp., 2002). Dlatego tak ważna jest efektywnie działająca dysmutaza nadtlenkowa, katalizująca

reakcję przekształcenia anionorodnika nadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) i tlenu cząsteczkowego.

Wzrost stężenia anionorodnika nadtlenkowego może stymulować aktywność dysmutazy nadtlenkowej poprzez aktywację allosteryczną (Misra i Fridovich, 1972), i/lub poprzez bezpośrednią aktywację transkrypcji genów SOD i wzrost ich ekspresji. Aktywność SOD zaczyna wzrastać bezpośrednio po H-I. Weis i wsp. (2011) odnotowali wzrost aktywności SOD już godzinę oraz dwie godziny po H-I w korze mózgowej i hipokampie. Aktywność GPx w tych badaniach również rosła, ale nieznamienne statystycznie, natomiast aktywność katalazy nie zmieniała się.

Ponad 8,5- krotny wzrost aktywności SOD po H-I w analizowanych przez mnie tkankach półkul ipsilateralnych wskazuje na uruchomienie wewnątrzkomórkowych mechanizmów obronnych w celu neutralizacji nadmiernej ilości anionorodnika nadtlenkowego powstającego po H-I.

Inni autorzy znanych mi prac, stosując inne modele, wykryli podobne tendencje w poischemicznej aktywności SOD. Sutherland i wsp. (1991) oraz Liu i wsp. (1993) odnotowali istotny statystycznie i postępujący wzrost aktywności SOD w mózgu, obserwowany do 7 dni po niedokrwieniu u dorosłych szczurów poddanych 10-minutowej ischemii. Candelario- Jalil i wsp. (2001) również stwierdzili wzrost aktywności SOD w hipokampie utrzymujący się do 3 dni po ischemii oraz spadek aktywności reduktazy glutationowej oraz poziomu zredukowanego glutationu (GSH). Aktywność SOD wzrastała w sposób znamieny statystycznie 72 godziny po 20 minutowym, globalnym niedokrwieniu mózgu szczura w badaniu Namby i wsp. (2001). Z przytoczonych wyżej rezultatów wynika, że aktywność SOD wzrasta po epizodzie niedokrwienym i utrzymuje się na wysokim poziomie dłużej niż dwie doby po ischemii, tak jak pokazano również w tej rozprawie. Jest to prawdopodobnie reakcja obronna tkanek mózgu na stres oksydacyjny, sugerująca jednocześnie, że stres ten utrzymuje się nawet do kilku dni po wyjściowym uszkodzeniu. Podobne rezultaty do moich uzyskano również w badaniu przeprowadzonym przez Mrcic-Pelcic i wsp. (Mrcic-Pelcic i wsp., 2004) w modelu 20-minutowego, globalnego niedokrwienia mózgu dorosłego szczura. Eksperymenty te pokazały, że 24 godziny po niedokrwieniu aktywność SOD wzrastała około trzykrotnie, 48 godzin po niedokrwieniu wzrastała



około czterokrotnie, a po 168 godzinach (7 dniach) wracała do poziomu wyjściowego przed niedokrwieniem.

W moich badaniach poddanie szczurów terapii HBO w różnych czasach po przebytej H-I zwiększyło aktywność SOD w półkulach kontralateralnych, natomiast w ipsilateralnych zmniejszyło. Terapia hiperbaryczna spowodowała prawdopodobnie spadek poziomu wolnych rodników tlenowych, głównie anionorodnika ponadtlenkowego, w uszkodzonych tkankach oraz wzrost w tkankach zdrowych. Inne wyniki od moich uzyskano w modelu 20-minutowego, globalnego niedokrwienia mózgu dorosłego szczura, gdzie zastosowanie HBO zwiększało aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, a efekt ten był widoczny zwłaszcza 7 dni po reperfuzji. Z danych literaturowych wynika, że w większości przypadków zastosowanie HBO po uszkodzeniu mózgu skutkowało, inaczej niż w moich badaniach, wzrostem aktywności SOD (Mrsic-Pelcic i wsp., 2004, Wang i wsp., 2014). Rozbieżności te mogą wynikać z różnic w stosowanych modelach oraz w wieku zwierząt. Z kolei w literaturze znaleźć można wiele przykładów badań, w których, podobnie jak w pokazanych przeze mnie wynikach, aktywność SOD po zastosowaniu HBO w zdrowych tkankach wzrastała (Korkmaz i wsp., 2008, Oter i wsp., 2005, Mrsic-Pelcic i wsp., 2004).

HBO i HH miały odmienny wpływ na aktywność SOD w półkulach ipsilateralnych. Ujmując wyniki jakościowo, zaobserwowano tendencję do dalszego wzrostu aktywności SOD po H-I pod wpływem postkondycjonowania HH, natomiast tendencja po terapii HBO była odwrotna – skutkowała ona spadkiem aktywności SOD. Innymi słowy, wzrost aktywności SOD po H-I był hamowany pod wpływem HBO. Tendencje te były zależne od czasu rozpoczęcia ekspozycji na dane warunki i były tym silniejsze, im wcześniej tę ekspozycję rozpoczynano. Wzrost aktywności SOD był największy, gdy postkondycjonowanie HH inicjowano 1 godzinę po H-I, również hamowanie wzrostu aktywności SOD było najsilniejsze, gdy HBO zaczynano w tym samym czasie. Podobne dane dotyczące postkondycjonowania pochodzą z badań nad postkondycjonowaniem ischemicznym, którego zastosowanie po niedokrwieniu mózgu (przodomózgowia) u szczura zwiększało aktywność SOD i katalazy (Danielisova i wsp., 2006). Brak natomiast w literaturze doniesień na temat aktywności SOD po postkondycjonowaniu HH w modelu H-I – zatem wyniki przedstawione w tej pracy są pierwszym doniesieniem na ten temat.

Natomiast zarówno HH (kontrola+HH) i HBO (kontrola+HBO) u zdrowych zwierząt kontrolnych powodowały wzrost aktywności SOD, odpowiednio, ponad 5-krotny oraz ponad 3-krotny. Wynik ten częściowo znajduje potwierdzenie w literaturze – HBO stymuluje aktywność dysmutazy ponadtlenkowej u zdrowych organizmów (Oury i wsp., 1992). Oter i wsp. (Oter i wsp., 2005) uzyskali 2-krotny wzrost aktywności SOD w mózgu szczura po dwugodzinnej ekspozycji na 2,5 ATA HBO. Natomiast w przypadku stosowania HH, nieliczne doniesienia mówią o spadku aktywności SOD po hipoksji hipobarycznej (Kislin i wsp., 2013; Maiti i wsp., 2006). Ta odmienność od wyników prezentowanych w tej rozprawie może wynikać z dłuższej i częstszej ekspozycji na warunki hipoksyjne w przytaczanych wyżej badaniach oraz z faktu, że eksperymenty te przeprowadzono u szczurów dojrzałych.

Nie jest do końca zrozumiałe, jak HBO zwiększa aktywność SOD – czy bezpośrednio wpływa na transkrypcję enzymu, czy też ma pośredni wpływ poprzez produkcję anionorodnika ponadtlenkowego (Oury i wsp., 2002). W celu sprawdzenia, czy zmiany aktywności SOD wynikają ze zmian ekspresji SOD, wykonałem badanie western blot dla białek SOD1 i SOD2. Z wyników wyłania się wniosek, iż do wzrostu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej po postkondycjonowaniu HH w dużym stopniu przyczynia się wzrost ekspresji mitochondrialnej formy SOD2, zaś spadek aktywności dysmutazy po terapii HBO jest w dużej mierze efektem malejącej ekspresji formy cytoplazmatycznej SOD1. Forma cytoplazmatyczna była również w dużym stopniu odpowiedzialna za wzrost ogólnej aktywności SOD po H-I. Dodatkowo w moich badaniach wykazałem, że HBO u zdrowych zwierząt kontrolnych zwiększa ekspresję SOD1 o ponad 100%, zaś postkondycjonowanie HH zwiększa ekspresję zarówno SOD1 (o 37%), jak i SOD2 (o 44%).

Podobne do moich wyniki uzyskali autorzy, którzy udowodnili, że hiperoksja stymuluje ekspresję mRNA dla SOD w mózgu szczura (Freiberger i wsp., 2004 oraz 2006) oraz, że HBO może bezpośrednio indukować transkrypcję i translację SOD w korze mózgowej szczura (Korkmaz i wsp., 2008).

Przedstawione wyniki mogą sugerować, iż cytoplazmatyczna forma SOD jest bardziej zaangażowana w mechanizmy neuroprotekcji uruchamiane terapią HBO, zaś forma mitochondrialna odgrywa większą rolę w mechanizmach postkondycjonowania HH.

## 5.8. Wpływ HBO i HH na aktywność enzymów usuwających H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Dysmutaza ponadtlenkowa jest efektywna w zwalczaniu stresu oksydacyjnego tylko wtedy, gdy towarzyszy jej wysoka aktywność peroksydazy glutationowej i katalazy. Wynika to z faktu, że aktywność SOD obok samej dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, prowadzi także do powstania nadtlenu wodoru, który później musi być usunięty właśnie przez GPx i katalazę (Halliwell, 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który w przeciwieństwie do anionorodnika ponadtlenkowego może łatwo przenikać przez błony komórkowe, jest stale produkowany przez komórki, a głównym jego źródłem w mózgu są właśnie reakcje katalizowane przez SOD (Khan i Black, 2003). Stwierdzono, że obszar hipokampa, w którym gromadzi się najwięcej H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po H-I odpowiada obszarowi mózgu, w którym występuje największe uszkodzenie. Stwierdzono tam również obecność w dużej ilości produktów peroksydacji lipidów.

Wyniki moich badań pokazują odmienny dla obu badanych grup (tj. HBO i HH), wpływ na aktywność GPx. Po zastosowaniu HBO we wszystkich 3 punktach czasowych po H-I, zaobserwowano spadek aktywności GPx, jednak największy spadek dotyczył grupy poddanej HBO 1 godzinę po H-I, i w tej grupie spadek ten był znamieny statystycznie. Odmienne, po postkondycjonowaniu HH aktywność GPx nie wykazywała tendencji do zmiany (postkondycjonowanie HH rozpoczęte 3 oraz 6h po H-I) lub miała tendencję do wzrostu (postkondycjonowanie rozpoczęte 1 godzinę po H-I). Zmiany aktywności GPx w grupach postkondycjonowanych nie były statystycznie istotne. Zaobserwowane tendencje są podobne, jak w omówionym wcześniej badaniu aktywności SOD.

Dringen i Hamprecht (1997) pokazali, że w astrocytach GPx i katalaza są w stanie wzajemnie się uzupełniać w detoksykacji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jednak nadtlenek wodoru może działać w wysokich stężeniach (>100uM) jak „samobójczy substrat”, dezaktywując nieodwracalnie katalazę (Lardinois i wsp., 1996). GPx jest o wiele bardziej odporna i przy wysokich stężeniach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a zapewne taka sytuacja ma miejsce po H-I, aktywność GPx zapobiega inaktywacji katalazy (Tappel, 1984; Pigeolet i wsp., 1990). Sugeruje się, że GPx i katalaza działają w kooperacji przy usuwaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w taki sposób, że GPx, mający wysokie powinowactwo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, działa przy niskich stężeniach, natomiast katalaza o niskim powinowactwie do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, działa przy wysokich stężeniach nadtlenu wodoru (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Wyniki przedstawione w tej rozprawie sugerują, iż HBO zapobiega tworzeniu się RFT i dlatego nie obserwuje się wzrostu aktywności katalazy, a nawet lekki jej spadek. Po postkondycjonowaniu HH nie zaobserwowałem większych zmian w aktywności katalazy, co może świadczyć o mniejszej roli tego enzymu w usuwaniu ROS oraz w neuroprotekcijnym działaniu HH.

Zredukowany glutation, będący substratem dla GPx, pełni ważną rolę w usuwaniu RFT w neuronach, zmniejszając stres oksydacyjny. Niski poziom GSH może być czynnikiem zwiększającym uszkodzenie mózgu po hipoksji-ischemii (Jain i wsp., 1991). Wyniki prac Candelario-Jalil i wsp. (2001) sugerują, że w okresie 48-72 godziny po ischemii można mówić o obniżeniu wydajności antyoksydacyjnej w hipokampie, co związane jest ze spadkiem zawartości GSH. W rezultacie spadku poziomu GSH w mózgu, spada aktywność peroksydazy glutationowej (Barker i wsp., 1996).

W moich badaniach stężenie GSH po H-I również spadało, ale aktywność GPx rosła. To wskazuje na aktywny udział tej drogi w usuwaniu wolnych rodników i zużywanie GSH przy prawdopodobnej niewydolności reduktazy glutationu i niezdolności do zregenerowania zredukowanego glutationu, być może z powodu niedoboru NADPH. Co więcej, reduktaza glutationowa mogła zostać częściowo zdezaktywowana przez rodniki tlenowe (Huang i Philbert, 1996). Spadek aktywności reduktazy glutationowej w wyniku ischemii stwierdzono u szczura w modelu MCAO (Yaidikar i wsp., 2014; Yang i wsp., 2013) i w modelu obustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej (Pujari i wsp., 2011) oraz w modelu niedokrwienia przodomózgowia u gerbila (Candelario-Jalil i wsp., 2001). W czasie stresu oksydacyjnego nasileniu ulega proces glutationylacji białek, co również mogło przyczynić się do spadku poziomu GSH w uszkodzonych półkulach mózgowych (Ghezzi, 2013).

Zarówno HBO jak i HH zastosowane w moich badaniach przywracają wyjściowy poziom stężenia GSH. Przywrócony poziom GSH przy niezmienionej aktywności GPx po postkondycjonowaniu HH wskazuje na szybszą regenerację GSH, tzn. jego redukcję przy udziale reduktazy glutationowej, co może sugerować wzrost aktywności tego enzymu. Z kolei przywrócony poziom GSH przy malejącej aktywności GPx sugeruje mniejszą ilość H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do zredukowania. Taka sytuacja prawdopodobnie ma miejsce po terapii HBO.

### **5.9. Rola równowagi aktywności enzymów antyoksydacyjnych w uszkodzeniu mózgu po H-I**

Toksyczność nadtlenu wodoru dla rozwijających się neuronów i oligodendrocytów jest dobrze udokumentowana (Richter-Landsberg i Vollgraf, 1998; Whittemore i wsp., 1995; Mischel i wsp., 1997). Uważa się jednak, że  $H_2O_2$  jest o wiele mniej toksyczny niż rodniki hydroksylowe. Istnieją też doniesienia o tym, że  $H_2O_2$  może indukować prekondukcjonowanie neuronów *in vitro* oraz *in vivo* (Furuichi i wsp., 2005; Puisieux i wsp., 2004). W badaniach na myszach pokazano, że przy takim samym stopniu uszkodzenia, mózg niedojrzałych zwierząt kumuluje więcej  $H_2O_2$  niż mózg zwierząt dorosłych (Lafemina i wsp., 2006). To ważne odkrycie, ponieważ poziom  $H_2O_2$  może być języczkiem u wagi, decydującym o życiu lub śmierci komórki oraz może determinować rozwój uszkodzenia mózgu po H-I (Lafemina i wsp., 2006).

W normalnym stanie fizjologicznym istnieje określona, subtelna równowaga pomiędzy aktywnością enzymów produkujących (SOD) i neutralizujących (GPx, katalaza)  $H_2O_2$ . Ta równowaga zostaje zachwiana podczas uszkodzenia mózgu. Po uszkodzeniu ischemicznym należałoby oczekiwać reakcji kompensacyjnej na wzrost produkcji  $H_2O_2$  i aktywności SOD, czyli odpowiednio proporcjonalnego wzrostu aktywności GPx. Taka sytuacja ma miejsce w mózgu dojrzałych, dorosłych zwierząt (Guegan i wsp., 1998). Natomiast u młodych osobników sytuacja jest odmienna, tzn. wzrost aktywności GPx jest u nich mniejszy niż u dorosłych osobników. Kiedy wzrost aktywności GPx jest niewystarczająco duży by usunąć nadtlenek wodoru, pojawia się uszkodzenie mózgu (Buonocore i Groenendaal., 2007; Dringen i wsp., 2005).

Jak wykazano w badaniach na zmodyfikowanych genetycznie zwierzętach, nadekspresja SOD1 skutkuje neuroprotekcją po poddaniu dorosłych transgenicznych szczurów (Chan i wsp., 1998) i myszy (Kinouchi i wsp., 1998) eksperymentalnej ischemii, natomiast u młodych, 7-dniowych zwierząt zwiększa uszkodzenie mózgu (Fullerton i wsp., 1998 oraz Ditelberg i wsp., 1996). U dorosłych zwierząt z nadekspresją SOD1 zmniejszony stres oksydacyjny skutkuje mniejszym uwalnianiem cytochromu c z mitochondriów, a co za tym idzie mniejszą aktywacją kaspaz i redukcją apoptozy. Efekt ten może utrzymywać się przez co najmniej 3 dni po ischemii (Fujimura i wsp., 2000 oraz Sugawara i wsp., 2002). Zwiększona ekspresja SOD1 może również hamować apoptozę poprzez hamowanie ścieżki MAPK/ERK, gdyż aktywacja

kinazy ERK może przyczyniać się do apoptotycznej śmierci komórki (Noshita i wsp., 2002).

Z kolei nadekspresja SOD1 u młodych zwierząt może zwiększać stres oksydacyjny. Wykazano, że nadekspresja SOD1 u młodych myszy transgenicznych prowadziła do zachwiania równowagi pomiędzy produkcją a rozkładem  $H_2O_2$  po ischemii. Nie obserwowano znaczącego kompensacyjnego wzrostu aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej u tych zwierząt (Fullerton i wsp., 1998). Ten brak równowagi w aktywności enzymów prowadzi do akumulacji  $H_2O_2$ , co przyczynia się do śmierci komórek i potęguje uszkodzenie mózgu u myszy transgenicznych po H-I. To odkrycie ma zasadnicze znaczenie dla projektowania strategii terapeutycznych, ponieważ leczenie, które przynosi rezultaty w leczeniu H-I w dojrzałym mózgu może mieć odwrotny efekt w mózgu niedojrzałym.

W badaniach przedstawionych w tej rozprawie uzyskano wzrost aktywności GPx o 147%, oraz katalazy o 78% w stosunku do wzrostu aktywności SOD o 756% w półkulach ipsilateralnych po H-I. Różne efekty nadekspresji SOD1 w mózgu na różnych etapach rozwojowych tłumaczy się właśnie tym, że o ile w mózgu dorosłych zwierząt ma miejsce odpowiednio duży, adaptacyjny wzrost aktywności GPx i katalazy (Przedborski i wsp., 1992), o tyle w niedojrzałych mózgach wzrost aktywności GPx i katalazy jest niewystarczający, jak pokazałem w tej rozprawie oraz czego potwierdzeniem są wyniki uzyskane przez Weisa (Weis i wsp., 2011), lub brak go wcale jak u Fullertona (Fullerton i wsp., 1998) i Sheldona (Sheldon i wsp., 2004). Taka sytuacja skutkuje zachwianiem równowagi pomiędzy aktywnością enzymów neutralizujących wolne rodniki tlenowe i produkujących nadtlenek wodoru a enzymami go unieczynniającymi. W konsekwencji dochodzi do tworzenia nadmiernych ilości RFT, które z kolei mogą dalej reagować z cząsteczkami takimi jak NO,  $O_2^{\cdot-}$  czy jonami żelaza tworząc bardziej toksyczne formy tlenu, takie jak rodnik hydroksylowy czy nadtlenoazotyn (Mruk i wsp., 2002). Może to skutkować pogłębieniem nierównowagi prowadzącej do dysproporcji w aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz dalej zwiększać stres oksydacyjny w komórkach hipokampa i kory mózgowej za sprawą nagromadzenia  $H_2O_2$  i innych toksycznych form tlenu.

Istnieją liczne dowody na toksyczność  $H_2O_2$  wobec neuronów. Neurony pochodzące od płodów z zespołem Downa, czyli nadekspresjonujące SOD1, produkują więcej RFT, w tym  $H_2O_2$ , co skutkuje ich śmiercią. Można temu zapobiec dodając katalazę do ich środowiska (Busciglio i Yankner, 1995). Neurony w pierwotnej hodowli komórkowej narażone na duże stężenia  $H_2O_2$  ulegają uszkodzeniu i umierają (Whittemore i wsp., 1995; Mischel i wsp., 1997). Badania nad apoptozą potwierdziły, że  $H_2O_2$  jest wczesnym sygnałem śmierci komórki (Hockenbery i wsp., 1993).

Hipotezę o kluczowej roli równowagi enzymów antyoksydacyjnych w uszkodzeniu niedojrzałego mózgu popierają wyniki uzyskane przez Bauda i wsp. (Baud i wsp., 2004), którzy wykazali, że niedojrzałe oligodendrocyty szczura są bardziej wrażliwe na  $H_2O_2$  oraz mniej efektywnie go degradują niż dojrzałe oligodendrocyty. Jest to prawdopodobnie związane z około 3-krotnym wzrostem aktywności i ekspresji GPx w dojrzałych komórkach. Wspierają tę hipotezę także doniesienia o mniejszym uszkodzeniu mózgu po H-I u niedojrzałych myszy transgenicznych nadekspresjonujących GPx niż u myszy typu dzikiego (Sheldon i wsp., 2004) oraz o odporności hodowli neuronów pochodzących od myszy z nadekspresją GPx na uszkodzenie związane ze stresem oksydacyjnym (McLean i wsp., 2005). Amstad i współpracownicy (1991 i 1994) udowodnili, że równowaga pomiędzy SOD1 a GPx i katalazą wpływa na podatność komórek naskórka myszy na uszkodzenie wywołane stresem oksydacyjnym, oraz pokazali, że nawet małe zmiany w stosunku fizjologicznych aktywności SOD1 do GPx1 mają dramatyczny wpływ na odporność tych komórek na uszkodzenie DNA i śmierć. Wiedza o roli nagromadzenia  $H_2O_2$  w propagacji niedotlenieniowo- niedokrwiennego uszkodzenia mózgu pozostaje niepełna. Konieczne są zatem dalsze badania nad neuromodulacyjną rolą tej formy tlenu.

Wrażliwość komórek na stres oksydacyjny, bardziej niż od aktywności poszczególnych enzymów z osobna, zależy od stanu równowagi pomiędzy enzymami produkującymi  $H_2O_2$  a enzymami go usuwającymi (Michiels i wsp., 1994; Muchova i wsp., 2001). Kilku eksperymentatorów donosiło o niekorzystnym wpływie nierównowagi pomiędzy SOD1 a katalazą/GPx w mózgu, co sugeruje, że stosunek aktywności tych enzymów może być bardziej istotny niż ich aktywność bezwzględna (Brooksbank i Balazs, 1984; Elroy-Stein i wsp., 1986; Singh i wsp., 1990; de Haan i wsp., 1996). W erytrocytach osób z zespołem Downa stosunek SOD/ (GPx+ CAT) jest wyższy niż w komórkach

osób zdrowych, co skutkuje zwiększoną produkcją nadtlenu wodoru (Garaiova i wsp., 2004; Mehar Sulthana i wsp., 2012). Komórki trisomiczne nadekspresjonujące SOD, są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny, pomimo, że aktywność SOD jest u nich zwiększona, co wynika prawdopodobnie z braku kompensacyjnego wzrostu aktywności GPx i katalazy. Również stosunek SOD/GPx jest podwyższony w fibroblastach osób z zespołem Downa (Teksen i wsp., 1998). Ponadto stwierdzono wzrost aktywności SOD nieskompensowany wzrostem aktywności GPx w korze mózgowej płodów z tą chorobą (Brooksbank i Balazs, 1984). Podwyższony stosunek SOD/GPx w mózgu występuje również u osób po krwotoku podpajęczynówkowym, co jest wynikiem zachwiania równowagi pomiędzy aktywnością tych enzymów (Gaetani i wsp., 1998). Stosunek ten wzrasta również w procesie starzenia w mózgu (Cristiano i wsp., 1995). Zmieniony stosunek SOD/(GPx+CAT) oddziałuje na ekspresję genów poprzez wpływ na dostępność i wiązanie się czynników transkrypcyjnych do DNA (de Haan i wsp., 1995).

Zmiany stosunku SOD/GPx mogą być traktowane jako nie tylko przyczyna lub skutek pewnych zaburzeń, ale także jako wskaźnik stopnia ryzyka zapadnięcia na niektóre choroby. Wykazano np., że może to być odpowiedni wskaźnik oceny ryzyka zapadnięcia pacjentów z rakiem płuc na popromienne zapalenie płuc (Park i wsp., 2007).

Poziom SOD1 u myszy i szczura uzyskuje maksymalną wartość w okresie pourodzeniowym (Aspberg i Tottmar, 1992, de Haan i wsp., 1994). Aktywność katalazy również okazała się być wyższa u niedojrzałych osobników niż u dorosłych zwierząt (Del Maestro i McDonald, 1987; Moreno i wsp., 1995; Hamby-Mason i wsp., 1997). Natomiast w przypadku peroksydazy glutationowej stwierdzono nawet 70% wzrost aktywności w mózgu szczura pomiędzy urodzeniem a dojrzałością (Brannan et al., 1981, Aspberg i Tottmar, 1992). Sugeruje się, że zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych po urodzeniu, to skutek mechanizmów kompensacyjnych mających na celu ochronę noworodka przed stresem oksydacyjnym, uruchamianych po przejściu płodu z relatywnie hipoksyjnego środowiska macicy do relatywnie hiperoksyjnego środowiska zewnętrznego. W tym czasie stężenie tlenu wzrasta około czterokrotnie (Khan i Black, 2003). Większa wrażliwość niedojrzałego mózgu na zachwianie równowagi aktywności enzymów antyoksydacyjnych może być skutkiem tego, że jak wynika z badań Weisa (Weis i wsp., 2011), zmiany aktywności poszczególnych



enzymów antyoksydacyjnych w czasie rozwoju niedojrzałego mózgu nie korelują ze sobą, a co za tym idzie nie odpowiadają wzrastającej aktywności metabolizmu tlenowego w rozwijającym się mózgu.

#### **5.10. Podsumowanie mechanizmów działania HBO oraz HH**

Mechanizmy ochronne uruchamiane przez postkondycjonowanie mózgu są w dużej części nieznane. W odróżnieniu od prekondycjonowania, które pozwala zaadaptować mózg do uszkodzenia ischemicznego, postkondycjonowanie nie może być badane w oderwaniu od samego zjawiska niedokrwienia/niedotlenienia. W celu poznania mechanizmów postkondycjonowania, bada się tkanki pochodzące od zwierząt po przebytej H-I i postkondycjonowaniu i porównuje wyniki do zwierząt kontrolnych, niekondycjonowanych. Zaobserwowane zmiany patofizjologiczne, na poziomie komórkowym i molekularnym w mózgu po postkondycjonowaniu, są prawdopodobnie wynikiem nakładających się efektów postkondycjonowania i H-I, a nie efektu samego postkondycjonowania. W związku z tym, trudnym zadaniem jest odróżnienie protekcyjnych mechanizmów postkondycjonowania od konsekwencji wynikających z samej neuroprotekcji (Zhao, 2009). Wyniki tej pracy sugerują, że neuroprotekcyjny efekt HH jest prawdopodobnie związany z uaktywnianiem enzymów antyoksydacyjnych, co wyrażało się poprzez wzrost aktywności SOD i GPx oraz w konsekwencji efektywniejszym neutralizowaniem RFT.

Oczywistym następstwem zastosowania HBO w przedstawionych w tej pracy badaniach było zwiększenie stężenia tlenu rozpuszczonego w osoczu, a co za tym idzie natlenowania tkanek w obszarach mózgu dotkniętych wywołaną doświadczalnie hipoksją-ischemią. Wzrost ciśnienia parcjalnego tlenu w rejonach objętych niedotlenieniem mógł przyczynić się do zmniejszenia zmian w procesach metabolicznych w uszkodzonej półkuli. Duże znaczenie zwiększonej ilości tlenu rozpuszczonego w osoczu wynika z faktu, że podczas niedokrwienia oddawanie tlenu w naczyniach włosowatych w dużej mierze odbywa się dzięki mikrocyrkulacji osocza (Theilen i wsp., 1994). Zwiększona podaż tlenu mogła doprowadzić do poprawy metabolizmu energetycznego w strefie półcienia, zmniejszając jej podatność na dodatkowe zmiany wywołane depolaryzacją błon komórkowych (Hossmann, 1996). To z kolei nie dopuściło do poszerzenia się ogniska zwyrodnienia neuronów. W tej

rozprawie wykazany został antyapoptotyczny efekt zastosowania terapii HBO po H-I. Sugeruje się, że neuroprotekcyjne działanie HBO jest przynajmniej w części związane z hamowaniem apoptozy, zarówno na drodze zależnej od kaspazy 3, jak również na drodze związanej z AIF. Te czynniki nie były przedmiotem badań w tej rozprawie. Jednakże w moich badaniach wykazałem, że zastosowanie HBO po H-I w obrębie okna terapeutycznego (do 6 godz. po H-I) w znacznym stopniu zmniejsza stres oksydacyjny, który jest jednym z głównych czynników inicjujących procesy apoptozy. Wszystkie wymienione wyżej czynniki przyczyniają się do tego, że działanie HBO może być związane z mechanizmami redukującymi powstawanie RFT w komórkach mózgu.

## 6. Podsumowanie wyników i wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Zarówno terapia hiperbaryczna jak i postkondycjonowanie hipoksją hipobaryczną zmniejszają uszkodzenie mózgu u 7- dniowych szczurów oraz hamują śmierć komórek na drodze apoptozy i nekrozy po przebytej H-I.
2. W badanym oknie terapeutycznym (do 6 godzin po H-I) testowane postępowania skutkowały neuroprotekcją. Jednak w przypadku postkondycjonowania HH najlepsze rezultaty dawało rozpoczęcie terapii 1 godzinę po H-I. W przypadku HBO opóźnienie rozpoczęcia terapii miało mniejszy wpływ na jej skuteczność niż w przypadku HH.
3. HBO i HH zastosowane po H-I poprawiają niektóre parametry lokomotoryczne u szczurów w teście otwartego pola.
4. Zastosowanie HBO lub postkondycjonowania HH zmniejsza obserwowany po H-I wzrost poziomu RFT w półkuli ipsilateralnej.
5. Wzrost aktywności SOD obserwowany po H-I wskazuje na istotną rolę tego białka w mechanizmie neuroprotekcji. Zastosowanie HH skutkuje wzrostem aktywności SOD, co prawdopodobnie pozwala na szybszą neutralizację RFT. Natomiast zastosowanie HBO zmniejsza aktywność SOD, co może wskazywać na mniejszą produkcję RFT.
6. Obserwowany wzrost aktywności SOD po zastosowaniu HH prawdopodobnie wiąże się ze zwiększoną ekspresją SOD2, co wskazuje na istotną rolę tego enzymu w mechanizmie neuroprotekcji po zastosowaniu HH.
7. Zastosowanie zarówno HBO jak i HH przywraca wyjściowy poziom stężenia GSH w półkulach ipsilateralnych po H-I. HH nie zmienia w sposób znamieny statystycznie podwyższonej aktywności peroksydazy glutationowej, z kolei HBO skutkuje niewielkim spadkiem aktywności tego enzymu.
8. H-I skutkuje podwyższeniem aktywności katalazy w półkulach ipsilateralnych. Zastosowanie postkondycjonowania HH nie zmienia podwyższonej aktywności

katalazy, natomiast poddanie zwierząt HBO skutkuje obniżeniem aktywności katalazy, co ponownie wskazuje na odmienne mechanizmy działania zastosowanych terapii.

Te dane pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- terapia HBO oraz postkondycjonowanie HH posiadają podobny potencjał neuroprotektoryjny w modelu H-I u siedmiodniowych szczurów
- jednym z mechanizmów neuroprotektoryjnego działania HBO i HH może być działanie zmniejszające stres oksydacyjny wywołany przez H-I:

-neuroprotektoryjne działanie HH prawdopodobnie związane jest z szybszym i efektywniejszym neutralizowaniem RFT, osiąganym przez dodatkowe uaktywnianie enzymów antyoksydacyjnych - SOD i GPx

-neuroprotektoryjne działanie HBO może być związane z mechanizmami redukującymi powstawanie RFT w mózgu po H-I - objawem tego jest obserwowany spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przy równoczesnym zmniejszeniu uszkodzenia mózgu.

## **Piśmiennictwo**

- 1) Adamson SJ, Alessandri LM, Badawi N, Burton P, Pemberton PJ (1995) Predictors of neonatal encephalopathy in full term infants. *BMJ* 311: 598-602.
- 2) Almlı CR, Levy TJ, Han BH, Shah AR, Gidday JM, Holtzman DM (2000) BDNF protects against memory deficits following neonatal hypoxia–ischemia. *Exp Neurol* 166: 99–114.
- 3) Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti P (1991) The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry*. 30: 9305–9313.
- 4) Amstad P, Moret R, Cerutti P (1994) Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J. Biol. Chem.*, 269: 1606–1609.
- 5) Andersen CB, Marro PJ, Ohnishi T, Zhu A, Delivoria-Papadopoulos M (1996). Effect of allopurinol on free radical formation during cerebral hypoxia in newborn piglets. *Pediatr. Res.*, 39A–43A.
- 6) Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*.15(4):961-73.
- 7) Antunes F, Cadenas E (2000) Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett*. 475: 121–126
- 8) Argaud L, Gateau-Roesch O, Raısky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005). Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 111: 194-197.
- 9) Armstrong-Wells J, Bernard TJ, Boada R, Manco-Johnson M. (2010) Neurocognitive outcomes following neonatal encephalopathy. *NeuroRehabilitation*;26(1):27-33.
- 10) Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003) Neonatal cerebral hypoxia–ischemia causes lateralized memory impairment in the adult rat. *Brain Res* 973:171–178.

- 11) Arthur PG, Lim SC, Meloni BP, Munns SE, Chan A, Knuckey NW (2004) The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. *Brain Res* 1017:146–154
- 12) Asamoto S, Sugiyama H, H Doi, M Iida, T Nagao, Matsumoto K (2000) Hyperbaric oxygen (HBO) therapy for acute traumatic cervical spinal cord injury, *Spinal Cord*. 38: 538–540.
- 13) Aspberg A, Tottmar O (1992) Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture of feral brain cells. *Dev Brain Res*;66:55-58
- 14) Augustyniak A, Skrzydlewska E (2004) Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Post. Hig. Med. Dośw.* 58: 194–201
- 15) Badawi N, Kurinczuk JJ (1998) Antepartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ* 317(7172): 1549-1553.
- 16) Badawi N, Kurinczuk JJ (1998) Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ* 317(7172): 1554-1558.
- 17) Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH (2001) Effect of hyperbaric oxygen on striatal metabolites: a microdialysis study in awake freely moving rats after MCA occlusion., *Brain Res*. 916: 85–90.
- 18) Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH (2001) Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280 R766–R770.
- 19) Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. (2000) Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*.859:318–325.
- 20) Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. (2000) Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62: 215–249.
- 21) Barker JE, Heales S, Cassidy A, Bolan JP, Land JM, Clark JB (1996) Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res*. 716, 118–122.

- 22) Berger R, Garnier Y (2000) Perinatal brain injury. *J Perinat Med* 28: 261–285
- 23) Bergo GW, Engelsens B, Tyssebotn I (1993) Unilateral frontal decortications changes cerebral blood flow distribution during hyperbaric oxygen exposure in rats. *Aviat Space Environ Med* 64: 1023–1031
- 24) Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci.* 18;24(7):1531-40.
- 25) Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* Oct 15;395(6703):645-8.
- 26) Bhat MA, Charoo BA, Bhat JI, Ahmad SM, Ali SW, Mufti MU. (2009) Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics* May;123(5):e764-9.
- 27) Bagenholm R, Nilsson U, Göteborg C, Kjellmer I (1998) Free radicals are formed in the brain of fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr. Res.* 43, 271–275.
- 28) Blenkarn GD, Schanberg SM, Saltzman HA (1969) Cerebral amines and acute hyperbaric oxygen toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 166: 346–353
- 29) Blomgren K, Hagberg H (2006), Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006 Feb 1;40(3):388-97.
- 30) Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, and Hagberg H. (2001) Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J Biol Chem* 276: 10191–10198
- 31) Boillee S, Velde VC, Cleveland DW. (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52: 39–59.
- 32) Bona E, Johansson BB, Hagberg H. (1997) Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatric Research.* Nov;42(5):678-83
- 33) Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-

methyl-D aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162–7166.

34)Boon EM, Downs A, Marcey D (1997) Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase. *Reviews on structure and function of catalases*. w: *Biomolecules at Kenyon*, David Marcey

35)Brannan TS, Maker HS, Raes IP (1981) Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *J Neurochem* 36:307–309.

36)Breivik L, E Helgeland, E Aarnes, J Mrdalj, AK Jonassen (2010) Remote postconditioning by humoral factors in effluent from ischemic preconditioned rat hearts is mediated via PI3K/Akt-dependent cell-survival signaling at reperfusion, *Basic Research in Cardiology*, vol. 106, 135– 145.

37)Brooksbank BWL, Balazs R. (1984) Superoxide dismutase, GPx and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Dev Brain Res* 16:37-44

38)Brown DB, G Mueller, F Golich (1992) Hyperbaric oxygen treatment for carbon monoxide poisoning in pregnancy: a case report, *Aviat. Space Environ. Med.* 63 1011–1014.

39)Brown JA, MC Preul, Taha A (1988) Hyperbaric oxygen in the treatment of elevated intracranial pressure after head injury, *Pediatr. Neurosci.* 14: 286–290.

40)Brucklacher RM, Vannucci RC, Vannucci SJ (2002) Hypoxic preconditioning increases brain glycogen and delays energy depletion from hypoxia-ischemia In the immature rat. *Dev Neurosci.* 24:411-417

41)Brummelkamp WH, Hogendijk J, Boerema I (1961) Treatment of anaerobic infections (clostridial myositis) by drenching the tissues with oxygen under high atmospheric pressure. *Surgery*;49:299-302.

42)Brummelkamp WH, Boerema I, Groningen L, Hoogendyk MD Amsterdam (1963) Treatment of clostridial infections with hyperbaric oxygen drenching. A report on 26 cases. *The Lancet* 281: 235 - 238

43)Buonocore G, Groenendaal F (2007) Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12:287-295



- 44)Burg JG, Kapp JP, Smith RR (1987) Effects of HBO on infarcts in gerbils. *Surg Neurol* 28:265
- 45)Burley DS, Ferdinandy P, GF Baxter (2007). “Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 152, 855–869
- 46)Burns DK, Kumar V (2003) *Uogólniona encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna*. [w:] Robbins Patologia, red. Olszewski W. T., Wyd. Med. Urban & Partner, Wrocław.
- 47)Burt JT, Kapp JP, Smith RR (1987) Hyperbaric oxygen and cerebral infarction in the gerbil, *Surg. Neurol.* 28 265–268.
- 48)Busciglio J, Yankner BA. (1995) Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down syndrome neurons in vivo. *Nature* 378:776-779
- 49)Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH (2003) Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia–ischemia rat model, *J. Appl. Physiol.* 95: 2072–2080.
- 50)Calvert J, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, Parent A, Zhang J (2002) Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res* 951: 1–8.
- 51)Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martinez G, Leon OS (2001). Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci. Res.* 41 (3), 233–241.
- 52)Cantagrel S, Krier C, Ducrocq S, Bodard S, Payen V, Laugier J, Guilloteau D, Chalon S, (2003), Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in rat model of immature brain hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett.* 347:106-110
- 53)Carletti JV, Deniz BF, Miguel PM, Rojas JJ, Kolling J, Scherer EB, de Souza Wyse AT, Netto CA, Pereira LO (2012) Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+) -ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Res.*37:1624-30.
- 54)Carpena X., Wiseman B., Deemagarn T., Singh R., Switala J., Ivancich A., Fita I., Loewen P.C. (2005) A molecular switch and electronic circuit modulate catalase activity in catalase-peroxidases. *EMBO Rep.* 6: 1156–1162

- 55) Chan PH (1998) Oxygen radical mechanisms In cerebral ischemia and reperfusion. *Monogr. Clin. Neurosci.* 16 :14-27
- 56) Chan K, Delfert Mavelli I, Ciriolo M, Rotilio G, De Sole P, Castorino M, Stabile A (1982) Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 286–290.
- 57) Chan P, Kawase M, Murakami K., Chen S., Li Y., Calagui B., Reola L., Carlson E., Epstein C (1998). Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J. Neurosci.* 18: 8292–8299.
- 58) Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev* 59: 527–605
- 59) Chang CF, KC Niu, BJ Hoffer, Y Wang, Borlongan CV (2000) Hyperbaric oxygen therapy for treatment of postischemic stroke in adult rats, *Exp. Neurol.* 166 298–306.
- 60) Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914–28
- 61) Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, and Holtzman DM. (1998) Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 101: 1992–1999.
- 62) Chiueh CC, Rauhala P (1999) The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic. Res.* 31: 641–650
- 63) Christen Y (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71: 621S–629S.
- 64) Clifton GL (1995) Hypothermia and hyperbaric oxygen as treatment modalities for severe head injury, *New Horiz.* 3: 474–478.

- 65)Cohen MV, Yang X-M, Downey JM (2007). The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 115: 1895-1903.
- 66)Cohen MV, Liu GS, and Downey JM. (1991) Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* 84: 341-349
- 67)Cohen MV, Yang X-M, Downey JM (2008). Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol* 103: 464-471.
- 68)Comhair SA, Erzurun SC (2005) The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 72–79
- 69)Cooper AJ, Kristal BS (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378: 793–802
- 70)Cotgreave IA, Gerdes RG (1998) Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*242: 1–9
- 71)Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262:689-95.
- 72)Cristiano F, de Haan JB, Iannello RC (1995) Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mech Ageing Dev* 80:93–105
- 73)Danielisová V, Némethová M, Gottlieb M, Burda J (2006) The changes in endogenous antioxidant enzyme activity after postconditioning. *Cell Mol Neurobiol.* 26(7-8):1181-91.
- 74)Daugherty WP, Levasseur JE, Sun D (2004)Effects of hyperbaric oxygen therapy on cerebral oxygenation and mitochondrial function following moderate lateral fluid-percussion injury in rats. *J Neurosurg*; 101: 499–504
- 75)Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci.* 13(6):2651-61.

- 76) Dąbwska M (1990). Uszkodzenia przed i okołoporodowe układu nerwowego. W *Neuropatologia kliniczna*, red. J. Dymecki i J. Kulczycki. Instytut Psychiatrii i Neurologii. Warszawa, 49-51
- 77) de Haan JB, Tymms MJ, Cristiano F, Kola I. (1994) Expression of copper/zinc superoxide dismutase and GPx in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates. *Pediatr Res*; 35:188-196
- 78) de Haan JB, Cristiano F, Iannello R (1996) Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to GPx activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet*;5:283-292
- 79) de Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I. (1995) Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int*; 35: 1281-97.
- 80) Del Maestro R, McDonald W (1987) Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Mech Ageing Dev* 41:29–38.
- 81) Dickey EJ, S Long, Hunt RW (2011) Hypoxic Ischemic Encephalopathy—What Can We Learn from Humans? *J Vet Intern Med* 25:1231–1240
- 82) Dickson EW, C Reinhardt, F. Renzi, R. Becker, Heard O (1999) Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 8:123–129
- 83) Dixon G, Badawi N, Kurinczuk J, Keogh J, Silburn S, Zubrick S, Stanley F (2002). Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics* 109: 26–33.
- 84) Ditelberg J, Sheldon R, Epstein C, Ferriero D (1996). Brain injury after perinatal hypoxia–ischemia is exacerbated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Pediatr. Res.* 39, 204–208.
- 85) Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaya LV, Zagoriy VY, Moibenko AA, Vaage J (2006) Proteasome inhibitors eliminate protective effect of postconditioning in cultured neonatal cardiomyocytes. *Fiziol Zh* 52:15–24
- 86) Dringen R, Hamprecht B (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759:67–75.

- 87) Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J (2005) Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research* 79:157-165, 2005
- 88) Droghetti L, M. Giganti, A. Memmo, Zatelli R (2002) Air embolism: diagnosis with single-photon emission tomography and successful hyperbaric oxygen therapy, *Br. J. Anaesth.* 89 775–778.
- 89) Duszczyk M, Ziembowicz A, Gadamski R, Wieronska JM, Smialowska M, Lazarewicz JW (2009) Changes in the NPY immunoreactivity in gerbil hippocampus after hypoxic and ischemic preconditioning. *Neuropeptides* 43(1):31-39
- 90) Edwards AD and Mehmet H (1996) Apoptosis in perinatal hypoxic ischaemic cerebral damage. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22: 494–498.
- 91) Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, Strohm B, Thoresen M, Whitelaw A, Azzopardi D. (2010) Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data.
- 92) Elroy-Stein O, Bernstein Y, Groner Y (1986) Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J* 5:615-622
- 93) Feng Y, Rhodes PG, Bhatt AJ (2010) Hypoxic preconditioning provides neuroprotection and increases vascular endothelial growth factor A, preserves the phosphorylation of Akt-Ser-473 and diminishes the increase in caspase-3 activity in neonatal rat hypoxic-ischemic model. *Brain Res.* 1325:1-9
- 94) Ferrari R, Ceconi C, Cunnello S, (1985) Oxygen-mediated damage during ischemia and reperfusion: role of the cellular defense against oxygen. *J Mol Cell Cardiol* 17: 937.
- 95) Flohe L (1978) Glutathione peroxidase: fact and fiction. *Ciba Found Symp.* 65: 95–122
- 96) Flynn EP, Auer RN (2002) Eubalic hyperoxemia and experimental cerebral infarction, *Ann. Neurol.* 52 566–572.
- 97) Freiburger J, Coulombe K, Suliman H (2004) Superoxide dismutase responds to hyperoxia in rat hippocampus. *Undersea Hyperb Med* 31:227–232

- 98)Freiberger JJ, Suliman HB, Sheng H (2006) A comparison of hyperbaric oxygen versus hypoxic cerebral preconditioning in neonatal rats. *Brain Res* 1075:213–222
- 99)Fridovich I (1997) Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515–18517
- 100)Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875–880
- 101)Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH, (2000). The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci.* 20 (8), 2817–2824.
- 102)Fullerton H, Ditelberg J, Chen S, Sarco D, Chan P, Epstein C, Ferriero D (1998) Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann. Neurol.* 44, 357–364.
- 103)Furuichi T, Liu W, Shi H, Miyake M, Liu KJ (2005) Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons. *J Neurosci Res* 79:816–824
- 104)Gadzinowski J, Szymankiewicz M (2002) *Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna*. [w:] *Podstawy neonatologii*, red. Gadzinowski J., Szymankiewicz M. Wyd. Uniw. Med. im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań.
- 105)Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez y Baen R, Borasio E, Marzatico F (2009) Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery* 89: 748-754.
- 106)Galle AA, Jones NM (2013) The neuroprotective actions of hypoxic preconditioning and postconditioning in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res* 1498:1-8
- 107)Garaiová I, Muchová J, Šustrová M, Blažíček P, Sivoňová M, Kvasnička P, Püeschel S, Ďuračková Z (2004) The relationship between antioxidant systems and some markers of oxidative stress in persons with Down syndrome. *Biologia (Bratislava)*; 59:781-788.
- 108)Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M (2006). Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70: 264-273.

- 109)Gathwala G, Khera A, Singh J, Balhara B (2010) Magnesium for neuroprotection in birth asphyxia. *J Pediatr Neurosci.* 5(2):102-4.
- 110)Ghezzi P (2013) Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1830(5):3165-72
- 111)Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P, Ciriolo MR (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J*; 12: 479–486
- 112)Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365: 663-670.
- 113)Golden ZL, Neubauer R, Golden CJ, Greene L, Marsh J, Mleko A (2002) Improvement in cerebral metabolism in chronic brain injury after hyperbaric oxygen therapy, *Int. J. Neurosci.* 112 119–131.
- 114)Gong SJ, Chen LY, Zhang M, Gong JX, Ma YX, Zhang JM, Wang YJ, Hu YY, Sun XC, Li WB, Zhang Y (2012) Intermittent Hypobaric Hypoxia Preconditioning Induced Brain Ischemic Tolerance by Up-Regulating Glial Glutamate Transporter-1 in Rats. *Neurochem Res.* 37: 527-37.
- 115)Gonzalez F, Miller S (2006). Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 91, F454–F459.
- 116)Grether JK, Nelson KB (1997) Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 278: 207-211.
- 117)Gross GJ, Auchampach JA (1992). Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70: 223-233.
- 118)Groves JT (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive, and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol*, 3:226–35.
- 119)Guegan C, Ceballos-Picot I, Nicole A, Kato H, Onteniente B, Sola B (1998) Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. *Exp Neurol* 154:371–380
- 120)Guo N, McIntosh C, Shaw C (1992) Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience*, 51: 835–842

- 121)Gustavsson M, Anderson MF, Mallard C, Hagberg H (2005) Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats. *Pediatr Res* 57:305-309
- 122)Haber F, Weiss J (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond.* 147:332–351.
- 123)Hagberg H, Dammann O, Mallard C, Leviton A (2004) Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol.* 28:389-395
- 124)Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M (1997), Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl.*422:85-8.
- 125)Hagberg B, Hagberg G, Olow I (1993) The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VI. Prevalence and origin during the birth year period 1983-1986.*Acta Paediatrica.* 82(4):387-93.
- 126)Hall AG (1999) The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 29: 238–245
- 127)Hall AG (1999) Glutathione and the regulation of cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 457: 199–203
- 128)Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine.*,3rd ed. New York, Oxford University Press
- 129)Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, 486: 10–13
- 130)Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609–1623
- 131)Halliwell B, (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- 132)Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Antioxidant defence enzymes: the glutathione peroxidase family. In: *Free radicals in biology and medicine*, Ed 3, pp 140–146, 170–172. Oxford, UK: Oxford UP.



- 133)Hamby-Mason R, Chen JJ, Schenker S, Perez A, Henderson GI (1997) Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1063–1072.
- 134)Hausenloy DJ, Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway, *Cardiovascular Research*, 61: 448–460
- 135)Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-25
- 136)Hossain M, Russell J, O'Brien R, Lathera J (2004) Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic–ischemic injury in neonatal brain. *J. Neurosci.* 24: 4187–4196.
- 137)Hossmann KA (1996) Peri-infarct depolarizations, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8 195–208.
- 138)Huang J, Philbert MA (1996). Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbations of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* 711: 184–192.
- 139)Huang KL, Wu JN, Lin HC (2000) Prolonged exposure to hyperbaric oxygen induces neuronal damage in primary rat cortical cultures. *Neurosci Lett* 293: 159–162
- 140)Huang L, Mehta MP, Nanda A, Zhang JH (2003) The role of multiple hyperbaric oxygenation in expanding therapeutic windows after acute spinal cord injury in rats, *J. Neurosurg.* 99 :198–205.
- 141)Hutchison JH, Kerr MM, Williams KG (1963). Hyperbaric oxygen in the resuscitation of the newborn. *Lancet* 13: 1019–1022
- 142)Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara YX, Ikenoue T (2001) Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic–ischemic brain insult in rats, *Behav. Brain Res.* 118: 17–25.
- 143)Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT (2006) Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* 101:502–7
- 144)Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240: 640–642

- 145)Ishihara H, M Kanamori, Y Kawaguchi, R Osada, K Ohmori, H Matsui (2001) Prediction of neurologic outcome in patients with spinal cord injury by using hyperbaric oxygen therapy, *J. Orthop. Sci.* 6: 385–389.
- 146)Islam N, Aftabuddin M, Moriwaki A (1995) Detection of DNA damage induced by apoptosis in the rat brain following incomplete ischemia. *Neurosci Lett.* 188: 159-162.
- 147)Ito BA, Al-Hawsawi ZM, Khan AH (2003) Hypoxic ischemic encephalopathy. Incidence and risk factors in North Western Saudi Arabia. *Saudi Med. J.* 24(2): 147-153.
- 148)Iwata O, Iwata S (2011) Filling the evidence gap: How can we improve the outcome of neonatal encephalopathy in the next 10 years?, *Brain & Development* 33(3):221-8
- 149)Jain A, Martenson J, Stole E, Auld PAM, Meister A (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1913–1917
- 150)Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA (1999) Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J. Neurochem.*73: 889–902
- 151)Jatana M, I Singh, A Singh, Jenkins D (2006), Combination of systemic hypothermia and n-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats *Pediatr Res*, 59: 684–689
- 152)Jeffrey M, Perlman MB (2006) Summary Proceedings From the Neurology Group on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics.* 117(3): 28-33.
- 153)Johnston M, Trescher W, Ishida A, Nakajima W (2001). Neurobiology of hypoxic–ischemic injury in the developing brain. *Pediatr. Res.* 49: 735–741.
- 154)Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F (2011) Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 10(4):372-82
- 155)Jeffrey M, Perlman MB (2006) Summary Proceedings From the Neurology Group on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics.* 117(3): 28-33
- 156)Kawamura S, N Yasui, M Shirasawa, H Fukasawa (1990) Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats, *Surg. Neurol.* 34: 101–106

- 157)Keenan HT, SL Bratton, D Norkool, TV Brogan, NB Hampson (1998) Delivery of hyperbaric oxygen therapy to critically ill, mechanically ventilated children, *J. Crit. Care* 13: 7–12.
- 158)Kelen D, Robertson N (2010) Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy, *Early Human Development* 86: 369–377
- 159)Khan JY, Black SM (2003) Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes.*Pediatr Res.* 54(1):77-82.
- 160)Khandelwal S, Kaide C (2010) *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide*, 7e
- 161)Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*: 24(4):325-40.
- 162)Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J (2005) Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 67:124–33
- 163)Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11158–62
- 164)Kinouchi H, Kamii H, Mikawa S, Epstein CJ, Yoshimoto T, Chan PH.(1998) Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD-1 transgenic mice. *Cell Mol Neurobiol*, 18(6):609-20.
- 165)Kirino T (2002) Ischemic tolerance, *J Cereb Blood Flow Metab.* 22:128301296
- 166)Kislin MS, Stroev SA, Glushchenko TS, Tiul'kova EI, Pelto-Huikko M, Samoïlov MO (2013) Hypoxic preconditioning modifies the activity of pro- and antioxidant systems in rat hippocampus. *Biomed Khim.*59(6):673-81.
- 167)Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK (2005) The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans, *Physiological Genomics*, 19: 143–150

- 168)Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Topal T, Uysal B, Ozler M, Ay H, Akin A. (2008) Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res.* 33(1):160-6.
- 169)Krolikowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS (2006) Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* 53:174–82
- 170)Krakovsky M, Rogatsky G, Zarchin N, Mayevsky A (1998) Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rats. *Surg Neurol.* 49(4):412-6.
- 171)Kumar A, Mittal R, Khanna H, Basu S (2008) Free radical injury and blood–brain barrier permeability in hypoxic–ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 122, e722–e727.
- 172)Lafemina MJ, Sheldon RA, Ferriero DM (2006) Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res.* 59(5):680-3.
- 173)Lavrijsen SW (2005) Severe Umbilical Cord Acidemia and Neurological Outcome in Preterm and Full-Term Neonates. *Biol. Neonate.* 88: 27-34.
- 174)Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG (1996) Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295:222–238.
- 175)Lawn JE, Cousens S, Zupan J (2005) 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet.* 2005; 365:891-900.
- 176)Leconte C, Tixier E, Freret T, Toutain J, Saulnier R, Boulouard M, Roussel S, Schumann-Bard P, Bernaudin M. (2009) Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke.*40(10):3349-55
- 177)Lecour S (2009) Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47:32–40
- 178)Levene MI, Evans, DJ (2005). Neurological problems in the newborn: hypoxic–ischaemic brain injury. In: Rennie, J.M. (Ed.), *Robertson’s Textbook of Neonatology.* Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, 1128– 1148.

- 179) Li JS, Zhang W, Kang ZM, Ding SJ, Liu WW, Zhang JH, Guan YT, Sun XJ (2009) Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain. *Neuroscience* 159:1309–1315.
- 180) Li Y, Kloner RA (1992) Cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 26: 226-231,
- 181) Liebelt EL (1999) Hyperbaric oxygen therapy in childhood carbon monoxide poisoning, *Curr. Opin. Pediatr.* 11 259–264.
- 182) Lim J, Lim WK, Yeo TT (2001) Management of haemorrhagic stroke with hyperbaric oxygen therapy – a case report. *Singapore Med J* 42: 220–223
- 183) Liu MN, Zhuang SQ, Zhang HY, Qin ZY, Li XY. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* (2006) Long-term effects of early hyperbaric oxygen therapy on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Jun*;8(3):216-20.
- 184) Liu X.H, Kato H, Nakata N, Kogure K, Kato K (1993) An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 625: 29–37.
- 185) Liu XH, Zhao YL, Ma QM, Zhou XH, Wang Y. (2006) Optimal therapeutic window of hyperbaric oxygenation in neonatal rat with hypoxic-ischemic brain damage. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 44(3):177-81.
- 186) Liu Q, Zhou S, Wang Y, Qi F, Song Y, Long S. (2014) A feasible strategy for focal cerebral ischemia-reperfusion injury: remote ischemic postconditioning. *Neural Regen Res.* 9(15):1460-3.
- 187) Liu XH, Yan H, Xu M, Zhao YL, Li LM, Zhou XH, Wang MX, Ma L (2013) Hyperbaric oxygenation reduces long-term brain injury and ameliorates behavioral function by suppression of apoptosis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Int.* 62(7):922-30.
- 188) Lorek A, Takei Y, Cady EB (1994) Delayed cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr. Res.* 36: 699-706.
- 189) Lorenc E (2003) Glutathion. *Metabolizm i biologiczna rola w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN).* W: *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w*

terapii, red.: L. Włodek. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003, 163–212

190)Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G (2004) Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats, *Stroke* 35: 578–583

191)Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ. (2004) Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation* 116:1386–1395

192)Łazarewicz JW (2000) Pobudzające aminokwasy w niedokrwieniu mózgu. W: Pobudzające aminokwasy. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN. Przegorzały 2000, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000, 109-120

193)Łazarewicz JW, Salińska E (2003) Ekscytotoksyczność jako mechanizm neurodegeneracji i cel dla strategii terapeutycznych. XX Szkoła Zimowa Instytutu Farmakologii PAN, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2003, 9-27

194)Ma D, M Hossain, A Chow, M Arshad, R Battson, R Sanders (2005) Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia *Ann Neurol*, 58:182–193

195)Maiti P, Singh SB, Sharma AK, Muthuraju S, Banerjee PK, Ilavazhagan G. (2006) Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int.*49(8):709-16.

196)Marklund SL, WestmanBNG, Lundgren E, Roos G (1982). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42: 1955-1961.

197)Marlow N, Rose A, Rands C, Draper E (2005) Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 90, F380–F387.

198)Martin LJ (2001) Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med* 7: 455–478

- 199)Maulik D, Numagami Y, Ohnishi S, Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M. (1998) Direct measurement of oxygen free radicals during in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain. *Brain Res.* 798, 166–172.
- 200)McDonagh M, Helfand M, Carson S, Russman BS (2004) Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury: a systematic review of the evidence. *Arch Phys Med Rehabil.* 85(7):1198-204.
- 201)McDonald JW, Trescher WH, Johnston MV (1992) Susceptibility of brain to AMPA induced excitotoxicity transiently peaks during early postnatal development. *Brain Res.* 583: 54-70.
- 202)McLean CW, Mirochnitchenko O, Claus CP, Noble-Hauesselein LJ, Ferriero DM (2005) Overexpression of glutathione peroxidase protects immature murine neurons from oxidative stress. *Dev Neurosci* 27:169–175
- 203)Meher Sulthana S, Nandha Kumar B, Vishnu Bhat K, Ramachandra Rao MG (2012) Antioxidant enzyme activity in children with Down syndrome. *Current Pediatric Research*; 16:43-49
- 204)Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 17: 235–248.
- 205)Miguel PM, Schuch CP, Rojas JJ, Carletti JV, Deckmann I, Martinato LH, Pires AV, Bizarro L, Pereira LO. (2015) Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behav Neurosci.* 129(3):309-20
- 206)Miller RJ, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY (2009) Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34: 55–65
- 207)Mink RB, Dutka AJ (1995) Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow. *Stroke* 26: 2307–2312
- 208)Mischel RE, Kim YS, Sheldon RA, Ferriero DM (1997) Hydrogen peroxide is selectively toxic to immature murine neurons in vitro. *Neurosci Lett* 231:17–20
- 209)Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M, (1999) Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res. Bull.* 48, 233–238.

- 210) Misra H, 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.
- 211) Moreno S, Mugnaini E, Ceru MP (1995) Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 43:1253–1267.
- 212) Morris-Blanco KC, Cohan CH, Neumann JT, Sick TJ, Perez-Pinzon MA (2014) Protein kinase C epsilon regulates mitochondrial pools of Nampt and NAD following resveratrol and ischemic preconditioning in the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34(6):1024-32.
- 213) Mrsić-Pelčić J, Pelčić G, Vitezić D, Antončić I, Filipović T, Simonić A, Zupan G (2004) Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats. *Neurochem Int.* 44(8):585-94.
- 214) Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY (2002) Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 65(4):305-11.
- 215) Muchova J, Šustrova M, Garaiova I, Liptakova A, Blazisek P, Kvascicka P, Pueschel S, Ďurackova Z (2001) Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Rad. Biol. Med.* 31: 499–508.
- 216) Murphy T, Walsh PM, Doran PP, Mulhall KJ (2010) Transcriptional responses in the adaptation to ischaemiareperfusion injury: a study of the effect of ischaemic preconditioning in total knee arthroplasty patients, *Journal of Translational Medicine* 8, artykuł 46
- 217) Murry C, Jennings R, Reimer K. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124–36.
- 218) Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV (2000) Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 20: 7994–8004



- 219)Namba K, Takeda Y, Sunami K, Hirakawa M (2001) Temporal profiles of the levels of endogenous antioxidants after four-vessel occlusion in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 13 (2): 131–137.
- 220)Naulty CM, Long LB, Pettet G (1994) Prevalence of prematurity, low birthweight, and asphyxia as perinatal risk factors in a current population of children with cerebral palsy. *Am. J. Perinatol.* 11(6): 377-381.
- 221)Neubauer RA, James P (1998) Cerebral oxygenation and the recoverable brain. *Neurol Res.* 20: S33–S36
- 222)Nighoghossian N, Trouillas P, Adeleine P (1995) Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke. A double-blind pilot study. *Stroke* 26: 1369–1372
- 223)Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ (2001) Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia- ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 21: 1931–1938
- 224)Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, Lewen A, Omar G, Chan PH (2002) Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 22:7923–30
- 225)Novelli A, Reilly J.A. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451(1-2): 205-212.
- 226)Numagami Y, Zubrow A, Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M (1997). Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J. Neurochem.* 69, 1542–1547.
- 227)Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W (2005) The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg* 101:1252–60
- 228)Oberley TD, Zhong W, Szweda LJ, Oberley LW (2000) Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. *Prostate* 44: 144–155

- 229)Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 13, 688–694.
- 230)Ohtsuki T, Kitagawa K, Yamagata K, Mandai K, Mabuchi T, Matsushita K, Yanagihara T, Matsumoto M (1996) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA in gerbil hippocampal neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 736 (1/2), 353–356.
- 231)Olanow CW (1993)A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16(11):439-44. Review.
- 232)Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501.
- 233)Ostrowski RP, Tang J, Zhang JH (2006) Hyperbaric oxygen suppresses NADPH oxidase in a rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke.* 37(5):1314-8.
- 234)Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H (2005) Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem.* 38(8):706-11.
- 235)Oury TD, Schaeffer LM, Fattman CL, Augustine C, Weck KE, Watkins SC (2002) Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia. *Am J Physiol*;283:L777–84.
- 236)Painter MJ (1995) Animal models of perinatal asphyxia: contributions, contradictions, clinical relevance,” *Seminars in Pediatric Neurology*, 2:37–56.
- 237)Pan R, Rong Z, Yun S, Yuan C, Li-Wen Ch, Wei-Hua L (2012) Sodium Pyruvate Reduced Hypoxic-Ischemic Injury to Neonatal Rat Brain, *Pediatr Res.Pediatr Res.* 72(5): 479–489
- 238)Park EM, Ramnath N, Yang GY, Ahn JY, Park Y, Lee TY, Shin HS, Yu J, Ip C, Park YM (2007) High superoxide dismutase and low glutathione peroxidase activities in red blood cells predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis. *Free Radic Biol Med.* 15;42(2):280-7.
- 239)Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333: 19–39

- 240)Patel HH, Moore A, Hsu K, Gross GJ (2002) Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34:1317– 1323
- 241)Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87:101–108.
- 242)Pereira LO, Strapasson ACP, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008) Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in females, but not in males, rats after hypoxia– ischemia. *Brain Res* 1218:257–266. 10.
- 243)Perlman JM (2004) Brain injury in the term infant. *Semin. Perinatol.* 28(6): 415-424.
- 244)Perlman JM (2006) Intervention strategies for neonatal hypoxic–ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 28:1353–65.
- 245)Perlman JM (2007) Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury. *J. Perinatol.* 27: 39-46.
- 246)Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase- ,and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51:283–297.
- 247)Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez A, Ashley M, Xiong Z (2008) In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(2):232–41.
- 248)Poli S, Veltkamp R (2009) Oxygen therapy in acute ischemic stroke - experimental efficacy and molecular mechanisms. *Current Molecular Medicine.*9(2):227-41.
- 249)Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ(1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 163: 555–560
- 250)Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):3-33.

- 251)Przedborski S, Jackson-Lewis V, Kostic V, Carlson E, Epstein C, Cadet J (1992) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *J. Neurochem.* 58, 1760–1767.
- 252)Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gele P, Lhermitte M, Lebuffe G, Bordet R (2004) Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Brain Res* 1027:30–37
- 253)Pujari RR, Vyawahare NS, Kagathara VG (2011) Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Indian J Exp Biol.* 49(8):627-33.
- 254)Puka-Sundvall M, Hallin U, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Blomgren K, and Hagberg H.(2000) NMDA blockade attenuates caspase-3 activation and DNA fragmentation after neonatal hypoxia- ischemia. *Neuroreport* 11: 2833–2836.
- 255)Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, (1998) Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke.* 29(12):2622-30.
- 256)Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 4244–4250
- 257)Raghavendra Rao VL, Rao AM, Dogan A, Bowen KK, Hatcher J, Rothstein JD, Dempsey RJ (2000). Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 36 (6): 531–537.
- 258)Raha S, Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease, and aging. *Trends Biochem Sci* 25:502–8.
- 259)Razdan B, Marro P, Tammela O, Goel R, Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M (1993) Selective sensitivity of synaptosomal membrane function to cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res.* 600: 308–314.

- 260)Rehni AK, Singh TG, Jaggi AS, Singh N (2008) Pharmacological preconditioning of the brain: a possible interplay between opioid and calcitonin gene related peptide transduction systems, *Pharmacol. Rep.* 60: 904–913.
- 261)Ren C, Gao X, Niu G, Yan Z, Chen X, Zhao H (2008) Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS ONE* 2008;3:e3851.
- 262)Ren C, Gao X, Steinberg G, Zhao H (2008) Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience* 151:1099–103.
- 263)Rennie, J, Hagmann, C, Robertson, N (2007) Outcome after intrapartum hypoxic ischaemia at term. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12: 398–407.
- 264)Revuelta M, Arteaga O, Montalvo H, Alvarez A, Hilario E, Martinez-Ibargüen A (2015) Antioxidant Treatments Recover the Alteration of Auditory-Evoked Potentials and Reduce Morphological Damage in the Inferior Colliculus after Perinatal Asphyxia in Rat. *Brain Pathol.* 2015
- 265)Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS (2005) Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 619–626
- 266)Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat, *Annals of Neurology* Vol 9, No.2 February
- 267)Richter-Landsberg C, Vollgraf U (1998) Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res* 244:218–229
- 268)Rischar F, McKean T (1998). Ischemia and ischemic preconditioning in the buffer-perfused pigeon heart. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 119: 59-65.
- 269)Rockswold GL, Ford SE, Anderson DC (1992) Results of a prospective randomized trial for treatment of severely brain injured patients with hyperbaric oxygen. *J Neurosurg* 76:929–934

- 270)Rockswold SB, Rockswold GL, Vargo JM (2001)Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg.* 2001, 94(3):403-11.
- 271)Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, Netto CA, Pereira LO. (2013) Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol.*241:25-33.
- 272)Rong Z, Pan R, Y Xu, C Zhang, Y Cao, D Liu (2013) Hesperidin pretreatment protects hypoxia–ischemic brain injury in neonatal rat, *Neuroscience*, 255: 292–299
- 273)Rosenthal RE, Silbergleit R, Hof PR, Haywood Y, Fiskum G (2003) Hyperbaric oxygen reduces neuronal death and improves neurological outcome after canine cardiac arrest, *Stroke* 34: 1311–1316.
- 274)Rybnikova E, Vorobyeva M, Pivina S, Samoilova M (2012) Postconditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia *Neuroscience Letters* 513:100–105
- 275)Rybnikova E, Glushchenko T, Tyulkova E, Baranova K, Samoilov M (2009) Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus, *Neurosci. Res.* 65: 360–366.
- 276)Rybnikova E, Gluschenko T, Tulkova E, Churilova A, Baranova K, Jaroshevich O, Samoilov M (2008) Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappaB in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia, *J. Neurochem.* 106: 1450– 1458.
- 277)Rybnikova E, Mironova V, Pivina S, Tulkova E, Ordyan N, Nalivaeva N, Turner A, Samoilov M (2007) Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 32(7):813-23
- 278)Rybnikova E, Sitnik N, Gluschenko T, Tjulkova E, Samoilov M (2006) The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats, *Brain Res.* 1089: 195–202.

- 279) Rybnikova E, Vataeva L, Tyulkova E, Gluschenko T, Otellin V, Pelto-Huikko M, Samoilov (2005) Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia, *Behav. Brain Res.* 160: 107–114.
- 280) Rybnikova E, Tulkova E, Pelto-Huikko M, Samoilov M (2002) Mild preconditioning hypoxia modifies NGFI-A mRNA expression in the rat brain induced by severe hypoxia, *Neurosci. Lett.* 329: 49–52.
- 281) Sameshima H, Ikenoue T (2013) Hypoxic-Ischemic Neonatal Encephalopathy: Animal Experiments for Neuroprotective Therapies, *Stroke Research and Treatment* Volume 2013. 2013:659374
- 282) Sampath D, White AM, Raol YH. (2014) Characterization of neonatal seizures in an animal model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Epilepsia.* 55(7):985-93.
- 283) Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, Ma D, Edwards AD, Hagberg H, Maze M (2010) Preconditioning and postinsult therapies for perinatal hypoxic-ischemic injury at term. *Anesthesiology.* 113(1):233-49.
- 284) Scandalios JG (1992) *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems.* New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- 285) Schneider H (1993) Significance of intrapartum asphyxia for the onset of fetal brain damage. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 53(6): 369-378.
- 286) Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, and Schaper W. (1990) Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66: 1133-1142.
- 287) Schubert J, Wilmer JW (1991) Does hydrogen peroxide exist 'free' in biological systems? *Free Radic. Biol. Med.* 11: 545–555
- 288) Schuurman T, Traber J (1989). Effects of nimodipine on behaviour of old rats, w Nimodipine and Central Nervous System Function: new Vistas str. 195- 208. Eds. J. Traber and W. H. Gispen. Schattauer, Stuttgart
- 289) Shankaran S, Lupton AR (2005) Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *The New Engl. J. Med.* 353: 1574-1584.

- 290) Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Tauber MG, Ferriero DM (2004) Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res* 56:656–662
- 291) Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ (2009). “Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection,” *Clinical Science*, 117: 191–200.
- 292) Shimohata T, Zhao H, Steinberg GK (2007) Epsilon PKC may contribute to the protective effect of hypothermia in a rat focal cerebral ischemia model. *Stroke* 38:375–80
- 293) Shiokawa O, Fujishima M, Yanai T (1986) Hyperbaric oxygen therapy in experimentally induced acute cerebral ischemia. *Undersea Biomed Res*; 13: 337–344
- 294) Sies H (1991). *Oxidative Stress II: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press.
- 295) Simon NP (1999) Long-term neurodevelopmental outcome of asphyxiated newborns. *Clin. Perinatol.* 26(3): 767-778.
- 296) Sinet PM, Lejeune J, Jerome H. (1979) Trisomy 21 (Down’s syndrome). Glutathione peroxidase, hexose monophosphate shunt and IQ. *Life Sciences* 24: 29–33.
- 297) Singh R, Pathak DN. (1990) Lipid peroxidation and GPx, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl<sub>3</sub>-induced epileptogenic foci in rat brain. *Epilepsia* 1 : 15-26
- 298) Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G (2009) Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol* 104: 469-483.
- 299) Spruijt BM, Peters SM, de Heer RC, Pothuizen HH, van der Harst JE. (2014) Reproducibility and relevance of future behavioral sciences should benefit from a cross fertilization of past recommendations and today's technology: "Back to the future". *J Neurosci Methods*. 234:2-12
- 300) Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L’Huillier I (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation* 112: 2143-2148.



- 301)Stroev SA, Tjulkova EI, Gluschenko TS, Rybnikova EA, Samoilov MO, Pelto-Huikko M (2004), The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning In rats. *Neurosci Lett.* 370:224-229
- 302)Strosznajder JB, Chalimoniuk M (2001) Tlenek azotu w starzeniu i chorobach neurodegeneracyjnych. W: *Mózg a starzenie*. Red. Strosznajder JB, Mossakowski MJ, CUN PAN, Warszawa, 2001: 51-66
- 303)Sugawara T, Noshita N, Lewen A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH (2002). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* 22 (1): 209–217.
- 304)Sukoff MH (2001) Effects of hyperbaric oxygenation. *J Neurosurg* 95: 544–546  
Sumeray MS and Yellon DM. (1998) Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol* 93: 384-390
- 305)Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(4):H1900-8.
- 306)Sun L, Marti HH, Veltkamp R. (2008) Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia. *Stroke.* 39(3):1000-6.
- 307)Sun L, Wolferts G, Veltkamp R (2014) Oxygen therapy does not increase production and damage induced by reactive oxygen species in focal cerebral ischemia, *Neuroscience Letters.* 577: 1–5
- 308)Sutherland G, Bose R, Louw D, Pinsky C (1991) Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in rat. *Neurosci. Lett.* 128 (2): 169–172.
- 309)Switala J, Loewen PC (2002) Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* 401: 145–154

- 310)Szejniuk W, Szymankiewicz M, (2008) Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienne u noworodków, *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, tom 1, zeszyt 2: 85-93
- 311)Tappel AL (1984) Selenium–glutathione peroxidase: properties and synthesis. *Curr Top Cell Regul* 24:87–97.
- 312)Teksen F, Sayli BS, Aydin A, Sayal A, Iisimer A (1998). Antioxidative metabolism in Down syndrome. *Biol. Trace Element Res.* 63: 123–127.
- 313) Ten VS, Wu EX, Tang H, Bradley-Moore M, Fedarau MV, Ratner VI, Stark RI, Gingrich JA, Pinsky DJ. (2004) Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. *Stroke.* 35(9):2183-8
- 314)Theilen H, Schroeck H, Kuschinsky W(1994) Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 1055–1061.
- 315)Thibault H, Piot C, Ovize M. (2007) Postconditioning in man. *Heart Fail Rev* 12: 245–8. Thom SR. (1993) Functional inhibition of neutrophil B3 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide mediated brain injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 123: 248
- 316)Thom SR, Elbuken ME (1991) Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 10:413–426
- 317)Thom SR (1990) Antagonism of CO-mediated brain lipid peroxidation by hyperbaric oxygen. *Toxicol Appl Pharmacol* 105: 340.
- 318)Thomas MP, Brown LA, Sponseller DR (1991) Myocardial infarcts size reduction by synergistic effect of hyperbaric oxygen and recombinant tissue plasminogen activator. *Am Heart J* 130: 791.
- 319)Thompson JW, Dave KR, Saul I, Narayanan SV, Perez-Pinzon MA. (2013) Epsilon PKC increases brain mitochondrial SIRT1 protein levels via heat shock protein 90 following ischemic preconditioning in rats. *PLoS One.* Sep 13;8(9):e75753
- 320)Thompson JW, Narayanan SV, Koronowski KB, Morris-Blanco K, Dave KR, Perez-Pinzon MA. (2014) Signaling pathways leading to ischemic mitochondrial neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr.* 47(1-2):101-10

- 321)Tonse NK Raju (2000) Okołoporodowa encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna. [w:] Neonatologia, red. Gadzinowski J, Vidyasagar D, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań.
- 322)Ungethüm U (1996) Effects of perinatal asphyxia on the mesostriatal/mesolimbic dopamine system of neonatal and 4-week-old male rats. *Exp. Brain Res.* 112(3): 403-410.
- 323)Van Bel F, Shadid M, Moison RM (1998) Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics* 101(2): 185-193.
- 324)VanHoesen KB, Camporesi EM, Moon RE, Hage ML, Piantadosi CA (1989) Should hyperbaric oxygen be used to treat the pregnant patient for acute carbon monoxide poisoning? A case report and literature review, *JAMA* 261:1039–1043.
- 325)van Hulst RA, Haitisma JJ, Klein J, (2003) Oxygen tension under hyperbaric conditions in healthy pig brain. *Clin Physiol Funct Imaging*; 23: 143–148
- 326)Vannucci R, Vannucci S (1997). A model of perinatal hypoxic–ischemic brain damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 835: 234–249.
- 327)Vannucci RC, Perlman JM (1997) Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100(6):1004-1014.
- 328)Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ (1998) Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates. *J Neurochem* 71:1215–1220
- 329)Vannucci SJ, Hagberg H (2004) Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 207:3149-54.
- 330)Veighey K, MacAllister Raymond J (2012) Clinical Applications of Remote Ischemic Preconditioning. *Cardiology Research and Practice*, 2012:620681
- 331)Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, Heiland S, Bieber K, Marti HH, Nagel S, Schwab S, Schwaninger M. (2005) Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*.36(8):1679-83.

- 332)Veltkamp R, Warner DS, Domoki F, Brinkhous AD, Toole JF, Busija DW (2000) Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 853(1):68-73.
- 333)Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HH (1990) Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem.* 265: 2856–2864
- 334)Volpe J, (2001) Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr. Res.* 50: 553–562.
- 335)Vorobiev MG, Rybnikova EA, Samoilov MO (2013) Changes in the Severity of Hypoxic Brain Damage in Rats Due to Hypoxic Postconditioning, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 43
- 336)Wachtel EV, Hendricks-Muñoz KD (2011) Current management of the infant who presents with neonatal encephalopathy. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 41:132-153
- 337)Wang F, Liang W, Lei C, Kinden R, Sang H, Xie Y, Huang Y, Qu Y, Xiong L (2014) Combination of HBO and Memantine in Focal Cerebral Ischemia: Is There a Synergistic Effect? *Mol Neurobiol.* 52(3):1458-66
- 338)Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, Xie M, Yu XH (2008) Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res.* 30;1222:87-94.
- 339)Wang J, Shen J, Gao Q, Ye Z, Yang S, Liang H (2008) Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke* 39:983–90.
- 340)Wang HC, Zhang HF, Guo WY, Su H, Zhang KR, Li QX, Yan W, Ma XL, Lopez BL, Christopher TA, Gao F (2006) Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation. *Apoptosis.* 11(8):1453-60.
- 341)Wang JF (2007) Defects of mitochondrial electron transport chain in bipolar disorder: implications for mood-stabilizing treatment. *Can J Psychiatry* 52: 753–762

- 342)Wang J.Y., Shen J, Gao Q, Ye ZG, Yang SY, Liang HW, Bruce IC, Luo BY, Xia Q (2008) Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats, *Stroke* 39: 983–990.
- 343)Walters FJM (1998) Intracranial pressure and cerebral blood flow. *Update Anaesth.* 8(4): 1-4.
- 344)Weis S, Schuncka R, Pettenuzzo L, Krolowa R, Mattéa C, Manfredini V, Peralbad R, Vargas R, Dalmaz C, Angela TS, Netto CA (2011). Early biochemical effects after unilateral hypoxia–ischemia in the immature rat brain *Int. J. Devl Neuroscience* 29:115–120
- 345)Whittemore ER, Loo DT, Watt JA, Cotman CW (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* 67:921-932
- 346)Winiarska K (2000) Glutation: niezwykle funkcje pospolitego peptydu. *Post. Biochem.*, 46: 318–326
- 347)Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489–492
- 348)Xie K, Wang P (2003) Clinical study on effect of HBO plus electric stimulation on treatment for the vegetative state, *Acta Neurochir. Suppl.* 87:19–21.
- 349)Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, Zhang S (2008) Ischemic post-conditioning protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion, *J. Neurochem.* 105: 1737– 1745.
- 350)Xiong L, Zhu Z, Dong H, Hu W, Hou L, Chen S (2000) Hyperbaric oxygen preconditioning induces neuroprotection against ischemia in transient not permanent middle cerebral artery occlusion rat model, *Chin. Med. J. (Engl.)* 113:836–839.
- 351)Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC (1992) Cerebral energy metabolism during hypoxia–ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol* 262:H672–H677
- 352)Yaidikar L, Byna B, Thakur SR (2014) Neuroprotective effect of punicalagin against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative brain injury in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 23(10):2869-78

- 353) Yamashima T (2000) Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62:273–95
- 354) Yang YX, Chen YT, Zhou XJ, Hong CL, Li CY, Guo JY. (2013) Beta-asarone, a major component of *Acorus tatarinowii* Schott, attenuates focal cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *BMC Complement Altern Med.* 25;13:236.
- 355) Yang X-M, Liu Y, Liu Y, Tandon N, Kambayashi J, Downey JM (2010). Attenuation of infarction in cynomolgus monkeys: preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* 105: 119-128.
- 356) Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV (2004). Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 44: 1103-1110.
- 357) Yellon D, Downey J (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83:1113–51.
- 358) Yeo CL, Tudehope DI (1994) Outcome of resuscitated apparently stillborn infants: a ten year review. *J. Paediatr. Child Health* 30(2): 129-133.
- 359) Yesilirmak D, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, Duman N, Ozkan H (2008) Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury, *Brain Res.* 1210:56–62.
- 360) Yildiz S, Aktas S, Cimsit M (2004) Seizure incidence in 80,000 patient treatments with hyperbaric oxygen. *Aviat Space Environ Med* 75:992–994
- 361) Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH (2002) Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model, *Brain Res.* 926: 165–171.
- 362) Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calver JW, Parent AD, Nanda A, Zhang JH (2003) Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23: 855–864.
- 363) Zamboni WA, Roth AC, Russel RC (1989) The effect of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischemia. *J Reconstr Microsurg* 5: 343

- 364)Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002)Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the Cu,ZnSOD (sod1), Mn-SOD (sod2), and EC-SOD (sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*33: 337–349
- 365)Zhang JH, Lo T, Mychaskiw G, Colohan A (2005) Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology.* 12(1):63-77.
- 366)Zhang Q, Gould LJ (2014) Hyperbaric oxygen reduces matrix metalloproteinases in ischemic wounds through a redox-dependent mechanism. *J Invest Dermatol.* 134(1):237-46.
- 367)Zhao H (2009) Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:873–85.
- 368)Zhao H (2007) The protective effect of ischemic postconditioning against ischemic injury: from the heart to the brain.*J Neuroimmune Pharmacol.* 2(4):313-8.
- 369)Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK, (2006) Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26: 1114–1121.
- 370)Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, Sun G, Schaal DW, Sapolsky RM, Steinberg GK (2005) Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25:9794–806
- 371)Zhao Z, Corvera J, Halkos M, Kerendi F, Wang N, Guyton R, (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.*AmJ Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H579–588.
- 372)Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (2006) Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res.* 70:200–11
- 373)Zhilyaev SY, Moskvin AN, Platonova TF (2003) Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol.* 33:783–787
- 374)Zhou XZ, Feng ZC, Li H, Shi J, Zhong CX, Liu L (2002) Comparison of the intervention methods for perinatal brain injury, *Di. Yi. Jun. Yi. Da. Xue. Xue. Bao.* 22: 442–443