

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Rada M. Jeremić

**Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni
potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom
modelu traumatske povrede mozga**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Rada M. Jeremić

**Effect of hyperbaric oxygenation on the
regenerative potential of brain tissue in an
experimental model of traumatic brain injury**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

1. *Dr Predrag Brkić, vanredni profesor*
Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. *Dr Sanja Dacić, docent*
Institut za fiziologiju i biohemiju "Ivan Đaja", Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. *Dr Marina Đelić, vanredni profesor*
Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. *Dr Irena Lavrnja, naučni savetnik*
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu
3. *Dr Oto Barak, redovni profesor*
Zavod za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana, u okviru projekta resornog Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (br. 200110 i br. 451-03-47/2023-01/200007). Eksperimentalni deo je urađen na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se koautorima rada, koji je proizašao iz ove doktorske disertacije:

1. prof. dr Predragu Brkiću, doc. dr Sanji Dacić i naučnom savetniku dr Sanji Peković na osmišljavanju koncepta rada, kao i na pomoći pri izvođenju operativne procedure i primeni terapijskog protokola,
2. doc. dr Sanji Dacić na pomoći u sprovođenju imunohistohemijskih i imunofluorescentnih analiza i mikroskopiji,
3. naučnom savetniku dr Sanji Peković na osmišljavanju prikazivanja rezultata i pomoći pri pisanju teksta rada,
4. naučnom savetniku Ireni Lavrnji, naučnom savetniku Ivani Bjelobabi, prof. dr Marini Đelić, prof. dr Predragu Brkiću i doc. dr Sanji Dacić na pregledanju i korigovanju rukopisa,
5. prof. dr Predragu Brkiću i doc. dr Sanji Dacić na superviziji i mentorstvu.

Posvećeno mojoj porodici

DEJSTVO HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA REGENERATIVNI POTENCIJAL MOŽDANOG TKIVA U EKSPERIMENTALNOM MODELU TRAUMATSKE POVREDE MOZGA

Traumatsko oštećenje mozga nastaje usled dejstva spoljašnje sile i predstavlja globalni zdravstveni problem, koji narušava zdravlje velikog broja ljudi. Zbog kompleksnosti događaja u tkivu nakon povrede i dalje se traga za adekvatnim terapijskim protokolima.

U ovoj tezi ispitivan je uticaj hiperbarične oksigenacije (HBO) na regenerativne procese u kortikalnom tkivu koje okružuje mesto povrede i na proces adultne neurogeneze u neurogenim zonama mozga adultnih pacova nakon ablacije desnog senzomotornog korteksa (ASK).

Urađena su odgovarajuća imunohistohemijska i imunofluorescentna bojenja, analiza genske ekspresije i imunoblot analize.

ASK stimuliše stvaranje glijalnog ožiljka i polarizaciju mikroglije i astrocita ka proinflatornom fenotipu. Deset HBO tretmana nakon ASK smanjuje gliozu i stimuliše polarizaciju mikroglije i astrocita ka antiinflatornom fenotipu. Korišćeni HBO tretman stimuliše adultnu neurogenezu oko mesta lezije i u subventikularnoj zoni (SVZ). HBO smanjenjem neuroinflamacije stimuliše migraciju neuroblasta iz SVZ i rostralnog migratornog puta ka mestu lezije i ubrzava njihovu maturaciju. Dodatno, HBO tretman stimuliše stvaranje progenitora neurona oko mesta povrede. ASK pokazuje specifičan uticaj na zubatu vijugu (DG) uzrokujući ćelijsku smrt neurona u subgranularnoj zoni (SGZ), kao i u unutrašnjoj i srednjoj trećini granularnog sloja DG hipokampusa. HBO tretman smanjuje osetljivost zrelih neurona granularnog sloja DG na ASK. Takođe, HBO tretman sprečava gubitak novonastalih nezrelih neurona u SGZ i sprečava degeneraciju njihovih dendrita. Dok ASK smanjuje broj ćelija koje proliferišu u SGZ, HBO tretman nakon povrede povećava broj ovih ćelija. Ovakvi rezultati ukazuju na moguću upotrebu HBO kao adjuvantnog tretmana u lečenju povreda mozga.

Ključne reči: traumatsko oštećenje mozga, ablacija senzomotornog korteksa, hiperbarična oksigenacija, astrociti, mikroglija, adultna neurogeneza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj:

EFFECT OF HYPERBARIC OXYGENATION ON THE REGENERATIVE POTENTIAL OF BRAIN TISSUE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TRAUMATIC BRAIN INJURY

Traumatic brain injury is the results of external impact and is a global health problem that affects the health of many people. Due to the complexity of the events in the tissue after the injury, appropriate therapeutic protocols are still lacking.

In this study, the influence of hyperbaric oxygenation (HBO) on the regeneration processes in the cortical tissue around the lesion site and on the process of adult neurogenesis in the neurogenic zones of the adult rat brain after ablation of the right sensorimotor cortex (SCA) was investigated.

Appropriate immunohistochemical and immunofluorescent staining, gene expression, and immunoblot analysis were performed.

SCA stimulates glial scar formation and polarization of microglia and astrocytes toward a proinflammatory phenotype. Ten HBO treatments after SCA reduce gliosis and stimulate polarization of microglia and astrocytes towards an anti-inflammatory phenotype. HBO treatment stimulates adult neurogenesis around the lesion site and in the subventricular zone (SVZ). By reducing neuroinflammation, HBO stimulates the migration of neuroblasts from the SVZ and rostral migratory stream to the lesion site and accelerates their maturation. In addition, HBO treatment stimulates the formation of neuronal progenitor cells around the injury site. SCA shows a specific effect on the dentate gyrus (DG), causing cell death of neurons in the subgranular zone (SGZ) and in the inner and middle third of the granular layer of the DG hippocampus. HBO treatment reduces the vulnerability of mature neurons in the granular layer of the DG to SCA. Moreover, HBO treatment prevents the loss of newly formed immature neurons in the SGZ and the degeneration of their dendrites. At the same time, SCA reduces the number of proliferating cells in the SGZ, and HBO treatment after injury increases the number of these cells. These results justify the use of HBO as an adjuvant treatment for brain injury.

Key words: traumatic brain injury, sensorimotor cortex ablation, hyperbaric oxygenation, astrocytes, microglia, adult neurogenesis

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Physiological sciences

UDC number:

1. UVOD	1
1.1. <i>Traumatsko oštećenje mozga</i>	2
1.1.1. Definicija, epidemiologija i klasifikacija	2
1.1.2. Patofiziologija traumatskog oštećenja mozga	3
1.2. <i>Eksperimentalni modeli traumatskog oštećenja mozga.....</i>	8
1.3. <i>Reparativni procesi i povreda mozga.....</i>	8
1.3.1. Mikroglia	9
1.3.2. Astrociti i povreda mozga	10
1.4. <i>Adultna neurogeneza</i>	12
1.4.1. Adultna neurogeneza u subgranularnoj zoni dentatnog girusa	13
1.4.2. Neuralne stem ćelije u subventrikularnoj zoni.....	16
1.4.3. Adultna neurogeneza i traumatsko oštećenje mozga	19
1.5. <i>Hiperbarična oksigenacija.....</i>	20
2. CILJEVI	23
3. MATERIJAL I METODE	25
3.1. <i>Eksperimentalne životinje.....</i>	26
3.2. <i>Eksperimentalne grupe</i>	26
3.3. <i>Model traumatskog oštećenja mozga - hirurška procedura</i>	27
3.4. <i>Protokol hiperbarične oksigenacije</i>	28
3.5. <i>Dizajn eksperimenta.....</i>	28
3.6. <i>Histološka analiza tkiva.....</i>	30
3.6.1. Priprema tkiva za histološka bojenja.....	30
3.6.2. Imunohistohemijska bojenja preseka	30
3.6.3. Imunofluorescentna bojenja preseka	31
3.6.4. Fluoro-žad B bojenje.....	31
3.6.5. Analiza mikroskopskih preparata	33
3.7. <i>Analiza genske ekspresije.....</i>	36
3.7.1. Priprema tkiva za analizu genske ekspresije	36
3.7.2. Izolacija ribonukleinske kiseline (RNK)	36
3.7.3. Sinteza komplementarne dezoksiribonukleinske kiseline (cDNK)	37
3.7.4. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real time RT-PCR).....	37
3.8. <i>Detekcija proteina od interesa - Western blot.....</i>	38
3.8.1. Priprema tkiva za analizu ekspresije proteina.....	38
3.8.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku	38

3.8.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina	39
3.8.4. Transfer proteina sa gela na membranu	40
3.8.5. Imunoblot analiza.....	40
3.9. Statistička analiza	41
4. Rezultati	42
4.1. Uticaj ASK i HBO tretmana na prisustvo i aktivnost mikroglije oko mesta povrede	43
4.1.1. ASK dovodi do aktivacije mikroglije oko mesta povrede dok HBO tretman podstiče promenu fenotipa mikroglije od M1 - proinflamatornog ka M2- antiinflamatornom tipu	43
4.2. Uticaj ASK i HBO tretmana na fenotip i morfologiju astrocita oko mesta povrede	45
4.2.1. HBO tretman podstiče polarizaciju astrocita u smeru antiinflamatornog A2 fenotipa astrocita nakon ASK.....	45
4.2.2. Morfometrijska analiza astrocita	46
4.3. Uticaj ASK i HBO tretmana na procese neurogeneze i neuroregeneracije oko mesta povrede i u SVZ	48
4.3.1. Neuralni odgovor na HBO tretman nakon ASK.....	48
4.3.2. Hiperbarična oksigenacija dovodi do regeneracije povredom oštećenih neurofilamenata	51
4.3.3. Ekspresija <i>Dcx</i> gena nakon 10 uzastopnih tretmana hiperbaričnom oksigenacijom.....	53
4.4. Uticaj ASK i HBO tretmana na adultnu neurogenezu u hipokampusu	58
4.4.1. ASK dovodi do degeneracije neurona u granularnom sloju DG hipokampusa.....	58
4.4.2. HBO tretman sprečava gubitak neurona izazvan ASK u granularnom sloju DG.....	59
4.4.3. Identifikacija neurona koji prolaze kroz proces degeneracije u DG hipokampusa nakon ASK.....	63
4.4.4. Proliferacija DCX/Ki67-pozitivnih nezrelih neurona u SGZ	73
4.4.5. Western blot analiza DCX	75
5. DISKUSIJA.....	77
6. ZAKLJUČCI.....	89
7. LITERATURA	91

1. UVOD

1.1. Traumatsko oštećenje mozga

1.1.1. Definicija, epidemiologija i klasifikacija

Traumatsko oštećenje mozga (engl. *Traumatic Brain Injury*, TBI) nastaje usled dejstva spoljašnje sile, a podrazumeva izmene moždanih funkcija ili prisustvo vizualnih, laboratorijskih i radioloških pokazatelja, koji govore u prilog prisutne povrede mozga (Menon i sar., 2010). TBI može biti posledica udarca u glavu, eksplozije, penetrantnih povreda i dejstva sila inercije (Kaur i Sharma, 2017).

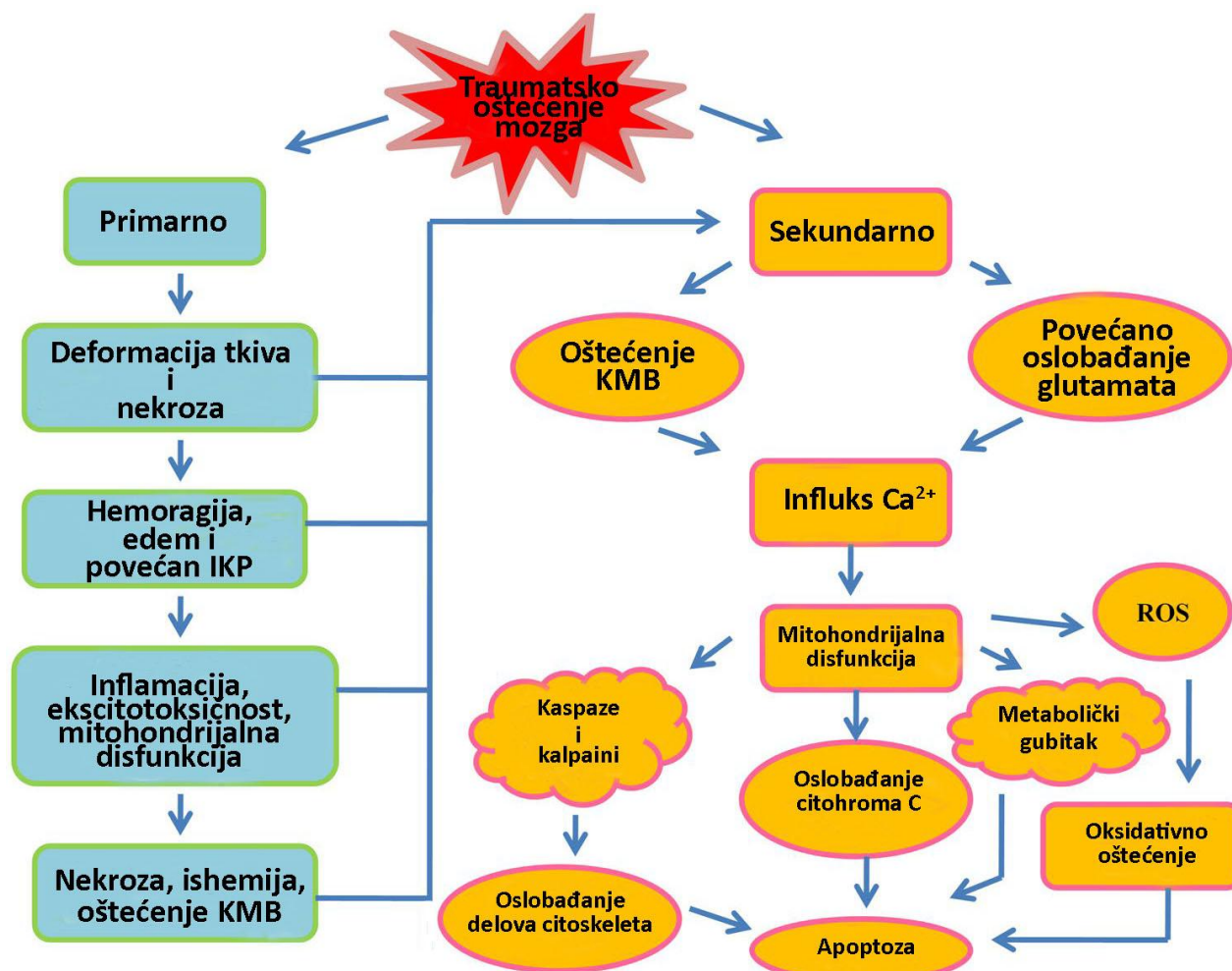
U zavisnosti od trajanja i intenziteta spoljašnje sile, kao i od regiona mozga koji je zahvaćen povredom, TBI ispoljava spektar različitih kliničkih simptoma (Dixon, 2017). Akutni simptomi TBI (mučnina, vrtoglavica i glavobolja) mogu da se povuku nakon nekoliko dana/nedelja od povrede. Sa druge strane, teške povrede mozga mogu dovesti do nastanka dugotrajnih bihevioralnih i kognitivnih deficita (Thapa i sar., 2021), koji mogu nastati danima, nedeljama, pa čak i mesecima nakon povrede (Corrigan i sar., 2013). Kako posledice TBI često nisu odmah vidljive, TBI se još naziva i „tihom epidemijom“ (Rusnak, 2013; Peeters i sar., 2015). Takođe, smatra se da TBI predstavlja rizik za nastanak demencije, Parkinsonove bolesti i moždanog udara (Jamjoom i sar., 2021).

Poznato je da TBI najčešće dovodi do invaliditeta i smrtnog ishoda (Dewan i sar., 2018), naročito u slabo i srednje razvijenim zemljama (Rubiano i sar., 2015). Zajedno sa povredama kičmene moždine, TBI predstavlja globalni zdravstveni problem koji narušava zdravlje i dovodi do velikih troškova zdravstvenog sistema (Feigin i sar., 2019). U svetu više od 50 miliona ljudi godišnje doživi neki oblik TBI (Maas i sar., 2017). Tokom života postoje tri rizična perioda javljanja TBI. Najčešće se događaju kod starijih od 65 godina, zatim kod dece do 4. godine starosti i na kraju kod adolescenata i mladih odraslih (između 15. i 24. godine starosti) (Galgano i sar., 2017). U opštoj populaciji postoje razlike u učestalosti TBI u zavisnosti od pola, pa se TBI češće javlja kod muškaraca u odnosu na žene (Capizzi i sar., 2020). Uprkos merama prevencije, standardizovane stope incidencije u odnosu na uzrast su još uvek u porastu. Vodeći uzroci TBI su saobraćajne nesreće, padovi i nasilje (Feigin i sar., 2019).

Klinički, TBI se može klasifikovati na osnovu rezultata Glazgovske skale kome (engl. *Glasgow Coma Scale*) u tri kategorije: 1. laku (skor od 13 do ≤ 15), 2. umereno tešku (od 9 do ≤ 12) i 3. vrlo tešku (≤ 8) (Bodanapally i sar., 2015). Smrtnost prilikom teške TBI je $>30\%$, a kod čak 60% pacijenata ostavlja posledice koje narušavaju njihov kvalitet života (Maas i sar., 2017). Obzirom da je simptomatologija TBI raznovrsna i da simptomi variraju od blažih do fatalnih, pacijenti između ostalog mogu imati i posttraumatsku amneziju (Parker i sar., 2022). Kako je pokazano da oštećenje hipokampusa sprečava formiranje novih sećanja (Terranova i sar., 2019), pretpostavlja se da povrede korteksa indirektno utiču na morfologiju i broj neurona u zubatoj vijugi - dentatnom girusu, DG (lat. *gyrus dentatus*), koji je sastavni deo hipokampusa.

1.1.2. Patofiziologija traumatskog oštećenja mozga

Oštećenje neurona prouzrokovano povredom mozga može nastati kao posledica primarnog ili sekundarnog oštećenja (Ng i Lee, 2019). Dok je primarno oštećenje mehaničkog porekla i nastaje akutno, u trenutku traume, sekundarno oštećenje predstavlja posledicu primarnog i javlja se kasnije u odnosu na vreme dejstva inicijalnog udara (Slika 1.1) (Peković i sar., 2006).



Slika 1.1. Shematski prikaz patofiziologije traumatskog oštećenja mozga. Povreda mozga nastaje kao posledica dejstva spoljašnje mehaničke sile koja dovodi do privremenog ili permanentnog oštećenja psiholoških i kognitivnih funkcija zajedno sa poremećajima stanja svesti. Molekularni događaji, koji se dešavaju tokom primarnog oštećenja često progrediraju u odloženo i prolongirano sekundarno oštećenje koje može da traje godinama. Skraćenice: intrakranijalni pritisak (IKP); krvno-moždana barijera (KMB); reaktivne kiseonične vrste (ROS); kalcijum (Ca^{2+}). Preuzeto i modifikovano prema Thapa i sar., 2021.

1.1.2.1. Primarno oštećenje mozga

Primarno oštećenje mozga karakterišu sledeći patofiziološki događaji: povećanje intrakranijalnog pritiska, smanjen protok krvi, krvarenje, oštećenje krvno-moždane barijere (KMB), nastanak edema, ćelijska smrt i neurovaskularna oštećenja (Bodanapally i sar., 2015; Thapa i sar., 2021). U sklopu primarnog oštećenja mogu se javiti fokalne i/ili difuzne lezije (difuzna aksonalna lezija) (Bodanapally i sar., 2015; Ng i Lee, 2019). Oba tipa primarnog oštećenja mozga mogu biti prisutna kod istog pacijenta (Capizzi i sar., 2020).

Fokalna lezija mozga je ireverzibilna i nastaje kao posledica permanentnog gubitka neurona na mestu mehaničkog oštećenja (engl. *coup* fenomen) (Andriessen i sar., 2010). Nekrotično polje (jezgro povrede; engl. *core*), koje se stvara prilikom primarnog oštećenja, sadrži neurone koji su podlegli degeneraciji, ćelije gliste i oštećene krvne sudove (Ng i Lee, 2019). Takođe, do primarnog oštećenja može da dođe i u tkivu mozga nasuprot mestu inicijalnog udara (engl. *contre-coup*). *Contre-coup* nastaje kao posledica pomeranja mozga unutar lobanje i kontakta moždanog parenhima sa kostima lobanje (Capizzi i sar., 2020).

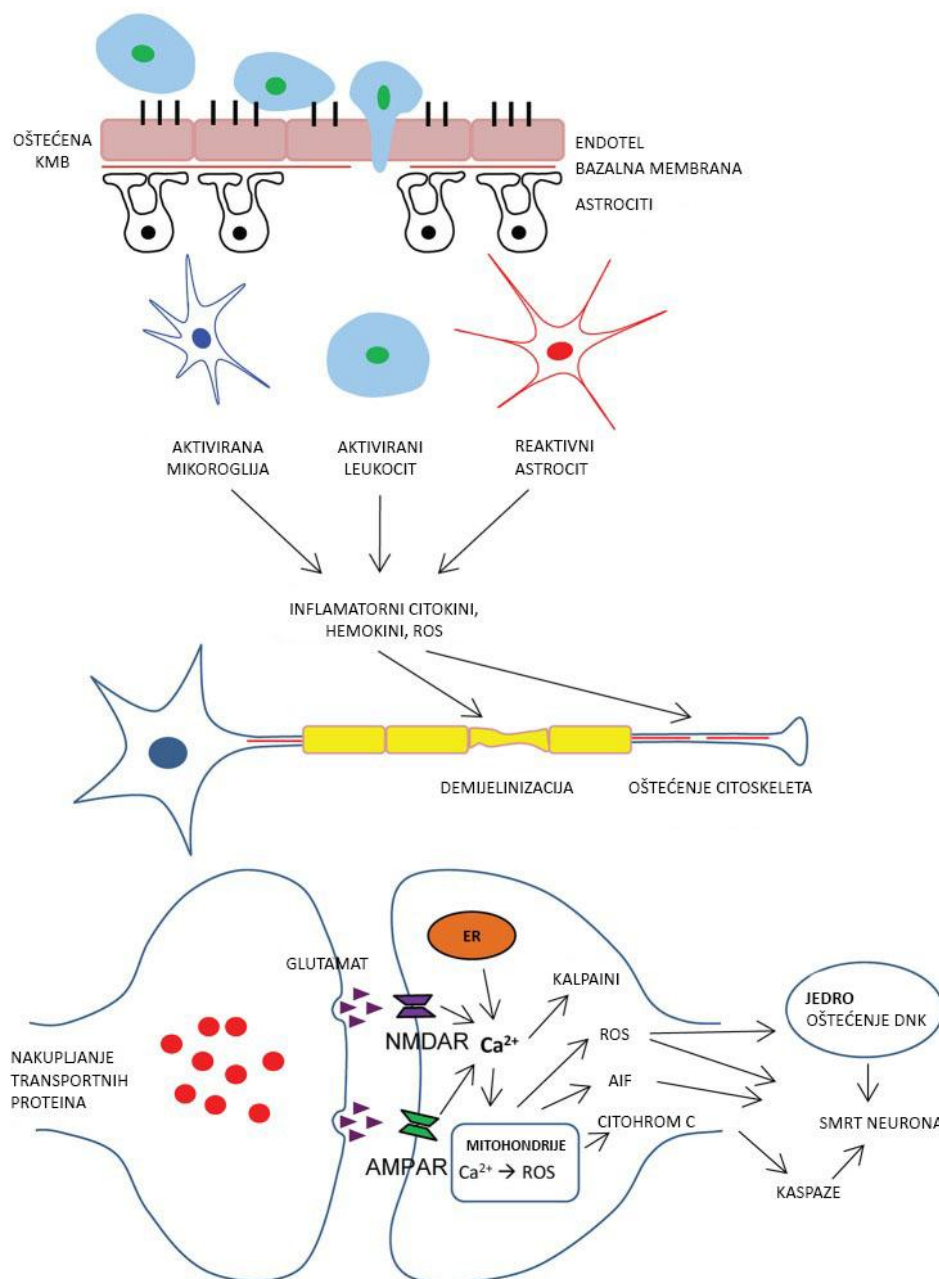
Difuzna lezija mozga obuhvata čak 70% povreda mozga. Za razliku od fokalnih povreda, glavni mehanizam difuzne povrede mozga su beskontaktne sile brzog usporavanja i ubrzanja, koje uzrokuju pomeranje i istezanje u moždanom tkivu. Snažne sile inercije oštećuju aksone, oligodendrocite i male krvne sudove (Si i Lee, 2019; Velho i sar., 2020) i dovode do edema mozga i ishemijskog oštećenja mozga prvenstveno u dubokoj beloj masi i subkortikalnom tkivu (Si i Lee, 2019).

1.1.2.2. Sekundarno oštećenje mozga

Neuroni koji se nalaze oko mesta lezije („*penumbra area*“), a koji nisu direktno zahvaćeni primarnim, mehaničkim oštećenjem su ugroženi zbog kaskade događaja koja nastaje pri sekundarnom oštećenju mozga (Bodanapally i sar., 2015). Ova kaskada obuhvata ekscitotoksičnost, oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju, oštećenje mitohondrija, neuroinflamaciju, oštećenja aksona i ćelijsku smrt (Ladak i sar., 2019; Ng i Lee, 2019). Svi procesi koji čine kaskadu događaja su međusobno isprepletani (Rakhit i sar., 2021).

Narušavanje integriteta KMB, koje se dešava pri primarnom oštećenju mozga, dovodi do oštećenja do tada neoštećenog moždanog parenhima nastankom citotoksičnog ili vazogenog edema, inflamacije i posledične degeneracije neurona (Price i sar., 2016). Sve ovo uzrokuje dodatno oštećenje KMB, koje predstavlja jedan od najvažnijih faktora rizika za visoki morbiditet i mortalitet nakon TBI (Cash i Theus, 2020).

Sekundarne povrede napreduju vremenom i mogu trajati mesecima i godinama nakon inicijalnog oštećenja, dovode do degeneracije primarno neoštećenih neurona i remete normalnu funkciju mozga (Peković i sar., 2006). Ovakve karakteristike sekundarnog oštećenja mozga dovele su do toga da se sekundarno oštećenje posmatra kao hronična nezarazna bolest (Kaur i Sharma, 2018). Imajući u vidu kompleksnost sekundarnog oštećenja (Slika 1.2) i posledice do kojih dovodi, upravo su molekularni mehanizmi koji čine sekundarno oštećenje, meta terapijskih procedura koje se koriste za lečenje TBI.



Slika 1.2. Shematski prikaz molekularnih mehanizama traumatskog oštećenja mozga. Oštećena KMB postaje propustljiva za leukocite. Aktivirani leukociti, mikroglia i astrociti sintetišu inflamatorne citokine, hemokine i reaktivne kiseonične vrste, koji doprinose demijelinizaciji i dovode do oštećenja citoskeleta aksona. Zatim, dolazi do bubrenja aksona i akumulacije transportnih proteina u aksonskim završecima. Ovakvo progresivno oštećenje aksona dovodi do degeneracije neurona. Visoke koncentracije glutamata i aspartata u sinaptičkoj pukotini aktiviraju NMDA i AMPA receptore na postsinaptičkoj membrani i posledično povećavaju influks Ca^{2+} . Takođe, dolazi i do oslobađanja Ca^{2+} iz endoplazminog retikuluma. Povećana unutarćelijska koncentracija Ca^{2+} dovodi do aktivacije kalpaina, koji učestvuje u dezorganizaciji aksonskog citoskeleta. Disfunkcija mitohondrija dovodi do oslobađanja ROS, AIF i citohrom C, što na kraju uzrokuje ćelijsku smrt. Postoje dva tipa ćelijske smrti: zavisna i nezavisna od kaspaze. Skraćenice: krvno-moždana barijera (KMB); reaktivne kiseonične vrste (ROS); α -amini-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat (AMPA); N-metil-d-aspartat (NMDA); α -amini-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat receptor (AMPA); N-metil-d-aspartat receptor (NMDAR); faktor koji indukuje apoptozu (AIF); endoplazmin retikulum (ER). Preuzeto i modifikovano prema Ng i Lee, 2019.

Patofiziologija sekundarnog oštećenja mozga

Ekscitotoksičnost

Tokom 24h od povrede, dolazi i do oslobađanja ekscitatornih aminokiselina, naročito glutamata, iz presinaptičkih završetaka (Ng i Lee, 2019). Visoka koncentracija glutamata se održava i do nekoliko nedelja nakon povrede mozga (Jamjoom i sar., 2021). Sa druge strane, pokazano je da astrociti smanjuju ekspresiju receptora za preuzimanje glutamata (Karve i sar., 2016). Do ekscitotoksičnosti dolazi kada se oslobođeni glutamat veže za metabotropne i jonotropne receptore na postsinaptičkom završetku. Aktivacija jonotropnih NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA (α -amini-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat) receptora, čija je ekspresija povećana nakon povrede mozga, dovodi do otvaranja jonskih kanala i influksa jona kalcijuma (Ca^{2+}) (Thapa i sar., 2021). Aktivacija metabotropnih receptora dovodi do oslobađanja Ca^{2+} iz njegovih unutarćelijskih depoa u citosol (Ng i Lee, 2019). Kao zajednički rezultat aktivacije obe vrste receptora povećava se unutarćelijska koncentracija Ca^{2+} (Slika 1.2).

Takođe, nakon TBI dolazi do nesklada između potreba mozga za kiseonikom (O_2) i mogućnosti snabdevanja. Smanjen protok krvi i edem endotela dovode do hipoksije koja se najčešće dešava u toku prvih 24h od trenutka povrede. Zatim, dolazi do prelaska metabolizma mozga sa aerobnog na anaerobni, tokom koga se stvara nedovoljna količina adenozin trifosfata (ATP). Sve ovo dovodi do disfunkcije Na^+/K^+ -ATPaze i kulminira influksom Ca^{2+} (Velho i sar., 2020).

Ca^{2+} učestvuje u različitim unutarćelijskim signalnim putevima, koji imaju za cilj da aktiviraju kataboličke enzime: fosfolipaze, proteaze i nukleaze. Na kraju, dolazi do oštećenja ćelijske i mitohondrijalne membrane i fragmentacije dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), što posledično uvodi ćeliju u apoptozu ili nekrozu (Weber, 2012).

Reaktivne kiseonične vrste

Povećanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} dovodi do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i azot-monoksida (NO), što dovodi do nastanka oksidativnog stresa (Ismail i sar., 2020). Pored toga, sinteza NO nakon TBI je povećana kako zbog smanjenog protoka krvi u mozgu, tako i zbog povećane aktivnosti NO sintaze (Villalba, 2014; Thapa i sar., 2021). ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju, disfunkciju proteina i oštećuju DNK (Mittler, 2017). Najznačajniji ROS koji se formira nakon povrede mozga je superoksidni anjon (Ng i Lee, 2019). Interakcija između NO i superoksidnog anjona dovodi do formiranja 4-hidroksinonenala (Ng i Lee, 2019), koji dodatno utiče na signalne puteve uključene u procese autofagije, proliferacije i ćelijske smrti (Csala i sar., 2015). Konstantno oslobađanje ROS i odvijanje lipidne peroksidacije ima negativne efekte na protok krvi u mozgu i na plastičnost mozga (Thapa i sar., 2021).

Disfunkcija mitohondrija

Povreda mozga posledično dovodi do disfunkcije mitohondrija, koja se karakteriše depolarizacijom mitohondrijalne membrane, smanjenom sintezom ATP i povećanim oslobađanjem ROS (Hiebert i sar., 2015; Thapa i sar., 2021). Disfunkcija mitohondrija, koja se ogleda u nemogućnosti kontrolisanja koncentracije Ca^{2+} i regulisanja metaboličkih funkcija, nastaje kao posledica povećane permeabilnosti oštećene mitohondrijalne membrane (Ladak, 2019; Thapa i sar., 2021). Oštećena mitohondrijalna membrana zatim dovodi do kompromitovanja respiratornog lanca i procesa oksidativne fosforilacije (Thapa i sar., 2021). Oksidativna fosforilacija je otežana kako zbog povećanog stvaranja ROS, tako i zbog

produžene aktivnosti Ca^{2+} -zavisnih mPTP (engl. *mitochondrial permeability transition pore*) (Ladak, 2019). Takođe, mitohondrije imaju značajnu ulogu i u apoptozi nakon TBI. Naime, nakon povrede dolazi do bubrenja mitohondrija, što dovodi do oslobađanja proteina u citosol i njihovog vezivanja za proteine inhibitore apoptoze (Hiebert i sar., 2015). Pored toga, dolazi i do formiranja apoptozoma u čiji sastav ulaze citohroma C, prokaspaza-9 i faktor aktivacije apoptotske proteaze (Apaf-1) (Akamatsu i Hanafy, 2020).

Oštećenje aksona

Prilikom TBI dolazi do narušavanja integriteta aksona primarnom aksotomijom ili delimičnim oštećenjem aksona, koje kasnije dovodi do progresivne disfunkcije i degeneracije aksona (Jamjoun i sar., 2021). Prilikom oštećenja aksona mogu da se jave dva tipa promena. Prvi tip predstavlja progresivno oticanje aksona što dovodi do oštećenja sinapse i posledičnog gubitka funkcije neurona. Drugi tip promena su aksonalni varikoziteti koji nastaju zbog oštećenja mikrotubula (Fрати i sar., 2017; Bruggeman i sar., 2021).

Neuroinflamacija

Povreda mozga dovodi do aktivacije humoralnog i ćelijskog imunog odgovora (Morganti-Kossmann i sar., 2019). Ranije se smatralo da se inflamatorna reakcija nakon povrede odvija zahvaljujući medijatorima sa periferije, koji prolaze kroz oštećenu KMB (Simon i sar., 2017). Sada je poznato da inflamatorni odgovor nakon povrede predstavlja interakciju između centralnih i perifernih ćelijskih komponenti, kao i da zavisi od genetike, pola i starosti osobe, mehanizma i težine povrede i primenjenih terapijskih procedura (Simon i sar., 2017; Zheng i sar., 2022). Inflamacija nakon povrede može biti korisna, zbog uklanjanja debrisa i podsticanja regeneracije, i/ili štetna, dovodeći do smrti neurona i progresivne neurodegeneracije (Simon i sar., 2017). Neuroinflamacija može biti akutna, subakutna i hronična (Simon i sar., 2017; Morganti-Kossmann i sar., 2019). Kod teških povreda mozga prolongirana neuroinflamacija loš je prognostički faktor i može biti uzrok nastanka Alchajmerove bolesti, hronične traumatske encefalopatije ili Parkinsonove bolesti zbog akumulacije β -amiloida, tau proteina i α -sinukleina (Morganti-Kossmann i sar., 2019). Održavanju hronične neuroinflamacije najviše doprinosi oštećenje KMB. Pokazano je na eksperimentalnim modelima da akutni tretmani koji uzrokuju normalizovanje KMB dovode do boljih ishoda nakon povrede mozga (van Vilet i sar., 2020).

Nekoliko minuta nakon povrede mikroglia i ćelije imunog sistema generišu signale koji iniciraju inflamatornu kaskadu (Postolache i sar., 2020). Kako je patogen odsutan, imuni odgovor na povredu se smatra sterilnim i nastaje u prisustvu mnogih molekularnih obrazaca oštećenja (engl. *damage-associated molecular pattern molecules*, DAMPs) (Zheng i sar., 2022). Nekoliko minuta nakon povrede dolazi do oslobađanja DAMPs, koji utiču na sekreciju hemokina i citokina od strane rezidentnih ćelija. Naime, ovi molekuli privlače leukocite, koji infiltriraju mesto lezije zahvaljujući povećanoj ekspresiji adhezionih molekula na endotelu krvnih sudova mozga (Wei i sar., 2015, Sulhan i sar., 2020). Leukociti dovode do dodatnog oštećenja KMB sintezom ROS, aktivacijom proteolitičkih enzima, sekrecijom citokina i hemokina (Sulhan i sar., 2020).

Neutrofili se prvi pojavljuju na mestu lezije i to tokom 24h od povrede, što potvrđuju i kliničke studije koje su pokazale da nakon povrede dolazi do povećanja apsolutnog broja neutrofila (Morganti-Kossmann i sar., 2019). Povreda dovodi i do rane aktivacije rezidualne mikroglije, koja zajedno sa infiltriranim monocitima, dominira od trećeg do petog dana nakon povrede. U ovom vremenskom periodu oni ispoljavaju svoju odbrambenu i reparativnu funkciju. Na kraju mesto lezije infiltriraju T i B limfociti (Postolache i sar., 2020). Nakon

povrede dolazi do povećane sinteze kako proinflamatornih (TNF α , IL-1 β , IL-6), tako i antiinflamatornih citokina (IL-10) (Sulhan i sar., 2020).

1.2. Eksperimentalni modeli traumatskog oštećenja mozga

S obzirom na heterogenu kliničku prirodu TBI, razvijeni su brojni životinjski modeli povrede mozga. Oni se koriste za rasvetljavanje molekularnih mehanizama, koji se dešavaju tokom same povrede, ali i da se utvrde potencijalne mete različitih terapijskih procedura (Xiong i sar., 2013; Xiaotang i sar., 2018). Iako su mozgovi nekih životinja po anatomiji i fiziologiji bliži ljudima, zbog etičkih i finansijskih razloga, u istraživanjima TBI uglavnom se koriste eksperimentalni modeli na glodarima (Bryda, 2013). Ovi modeli dele se na fokalne, difuzne i bezkontakne (Najeem i sar., 2018). Najčešće se, za ispitivanje promena izazvanih TBI, koriste perkusiona povreda tečnošću (engl. *fluid percussion injury*, FPI) (Ma i sar., 2019) i model kontrolisanog kortikalnog udarca (engl. *cortical impact injury*, CCI) (Zhao i sar., 2023), koji uglavnom imitiraju fokalnu, ređe difuznu povredu mozga. U FPI modelu povreda se nanosi primenom pulsa pritiska tečnosti na netaknutu duru kroz kraniotomiju. Upravo položaj kraniotomije određuje da li se modeluje fokalna povreda korteksa ili se kombinuju fokalne kortikalne i difuzne subkortikalne povrede.

Specifični model traumatskog oštećenja mozga, ablacija senzomotornog korteksa (ASK), korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji je detaljno okarakterisan u velikom broju studija, koje su fokusirane na funkcionalni oporavak nakon povrede (Goldstein, 2003; Brkić i sar., 2012; Lavrnja i sar., 2014). ASK je model fokalnog, traumatskog oštećenja mozga koji dozvoljava istraživaču izvođenje eksperimentalnih lezija, ujednačenih po veličini i dubini, u senzomotornom korteksu (Szele i sar., 1995). Senzomotorni korteks, koji inerviše oblast zadnjih ekstremiteta, lokalizovan je u medijalnom delu parijetalnog režnja (Goldstein i sar., 2003). Ova vrsta povrede imitira kliničko stanje uklanjanja dela moždanog tkiva, do koga dolazi ili prilikom hirurškog odstranjivanja tumora mozga ili pri TBI (de Freitas i sar., 2012). Kako je lezija koja nastaje nakon ASK, posledica stvarnog uklanjanja tkiva, patološki procesi kao što su inflamatorni odgovor i reaktivna gliozna su ograničeni (Pearlson i Robinson, 1981; Szele i sar., 1995), a sekundarni procesi, koji su inače naglašeni u drugim tipovima povreda, kao što su ishemija (Pulsinelli i sar., 1982; Saunders i sar., 1995), potres mozga (Povlishock i sar., 1992) i povrede izazvane strujom (Szele i sar., 1995) su minimalizovani (Goldstein i sar., 2003). Prednosti ovakvog tipa povrede su sposobnost kontrolisanja veličine lezije i inicijalnog motornog deficita (Goldstein i sar., 2003).

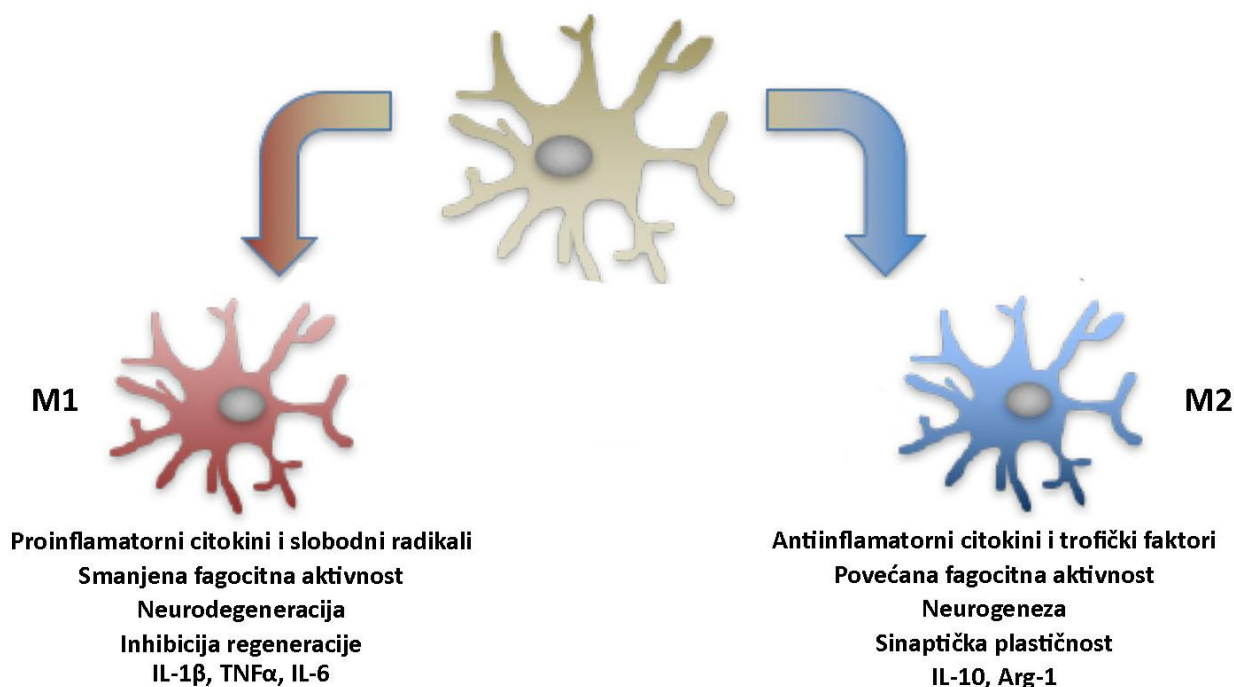
1.3. Reparativni procesi i povreda mozga

Danas je poznato da reparativni procesi nisu karakteristika samo perifernog nervnog sistema, već se javljaju i u centralnom nervnom sistemu (CNS) (Ngwenya i Danzer, 2019). Generalno proces oporavka tkiva se sastoji od međusobno isprepletanih procesa inflamacije, proliferacije i remodelovanja (Kumar i sar., 2016). Sa druge strane, neuronalna plastičnost predstavlja strukturne i funkcionalne promene mozga, koje su nastale kao odgovor na mnogobrojne unutrašnje i spoljašnje stimuse (Puderbaugh i Emmady, 2023). Kako se pored neurona u CNS nalaze i ćelije glije (astrociti, mikroglia, oligodendrociti) povreda mozga otežava fiziološko funkcionisanje i jednih i drugih ćelija (Mira i sar., 2021).

1.3.1. Mikroglija

Mikroglija, ćelije mijeloidnog porekla, su najzastupljenije ćelije imunog sistema u mozgu i imaju ulogu kako u razvoju mozga, tako i u održavanju homeostaze (Willis i sar., 2020). Pored toga, ove ćelije predstavljaju specijalne fagocite CNS sa važnim funkcijama u bolestima mozga (Guttenplan i Liddelow, 2019; Willis i sar., 2020). Mikroglija prva reaguje na povredu mozga, pri čemu na mestu lezije dolazi do nakupljanja i proliferacije ovih ćelija (Kumar i sar., 2016). Aktivirana mikroglija povećava ekspresiju citokina i na taj način uzrokuje aktivaciju astrocita (Escartin i sar., 2019).

Još uvek su aktivne debate o postojanju polarizacije mikroglije, odnosno da li mikroglija podleže M1/M2 klasifikaciji makrofaga (Slika 1.3) (Morganti-Kossmann i sar., 2019). Ranije se smatralo da aktivirana mikroglija ima dva fenotipa, koja se razlikuju po načinu aktivacije i funkcionalnim karakteristikama: proinflamatorni (M1) ili antiinflamatorni (M2) (Morganti i sar., 2016). M1 fenotip nastaje klasičnom aktivacijom pod dejstvom interferona γ (INF- γ) i/ili lipopolisaharida (LPS) (Colonna i Butovsky, 2017). M2 fenotip ima 3 podtipa. M2a fenotip nastaje alternativnom aktivacijom pod uticajem interleukina IL-4 i IL-13. M2b nastaje alternativnom aktivacijom i predstavlja prelazni tip, koji nastaje pod dejstvom imunih kompleksa i povezan je sa memorijskim imunim odgovorom. Kao odgovor na delovanje IL-10, mikroglija ispoljava deaktivirani M2c fenotip (Simon i sar., 2017; Fernandez-Arjona i sar., 2019). Trenutno se sve više veruje u postojanje mešovitog fenotipa mikroglije, koji u isto vreme ispoljava proinflamatorne i antiinflamatorne karakteristike (Morganti-Kossmann i sar., 2019).



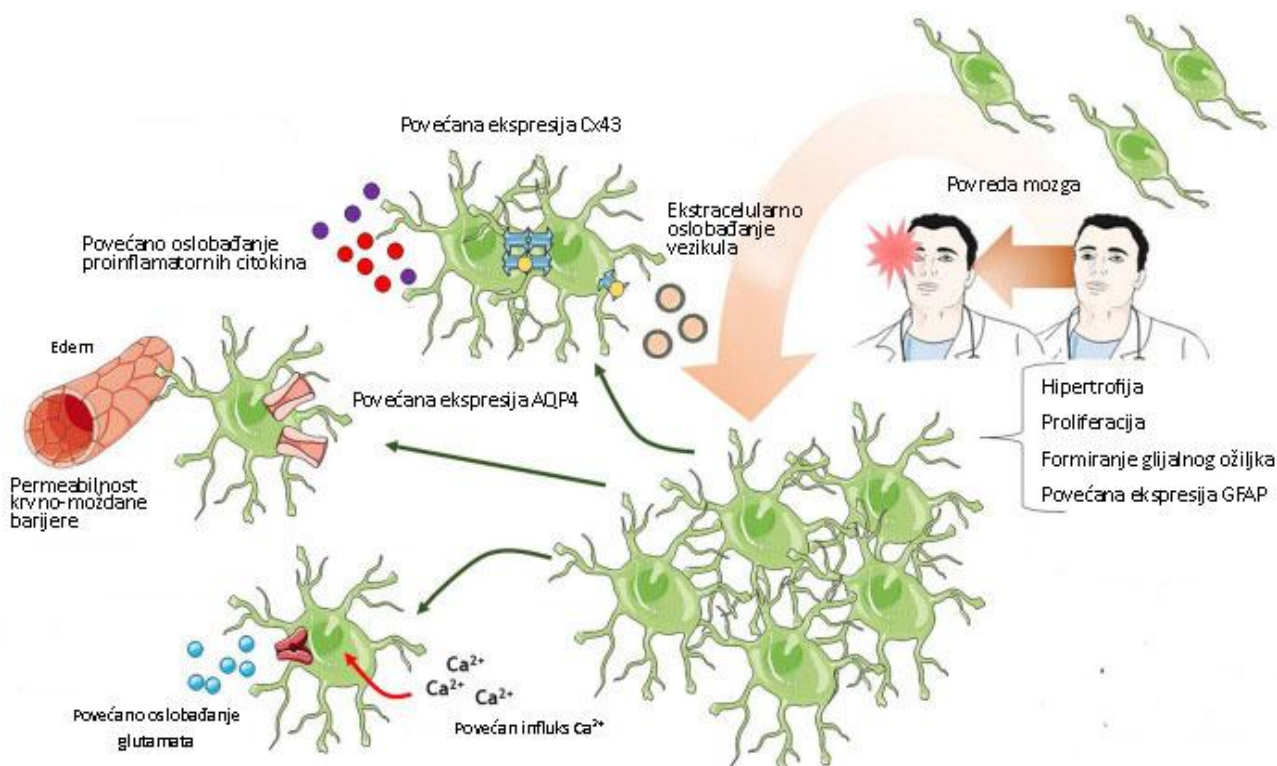
Slika 1.3. Shematski prikaz fenotipske plastičnosti mikroglije/makrofaga. M1 tip sintetiše proinflamatorne citokine i slobodne radikale, koji potenciraju hroničnu neuroinflamaciju, oksidativni stres i neurodegeneraciju, a u isto vreme ne inhibiraju regeneraciju. M2 fenotip, koji karakteriše ekspresija arginaze-1 i interleukina-10, sintetiše antiinflamatorne citokine i trofičke faktore, koji smanjuju inflamaciju. Takođe, imaju povećanu fagocitnu aktivnost i poboljšavaju reparaciju stimulišući neurogenezu, regeneraciju aksona, sinaptičku plastičnost i angiogenezu. Skraćenice: interleukin (IL); faktor nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF); arginaza (Arg). Preuzeto i modifikovano prema Simon i sar., 2017.

Pretkliničke studije su pokazale da fenotipska polarizacija mikroglije varira vremenom i da pokazuje izvesne razlike u različitim eksperimentalnim modelima povrede. Pokazano je da nakon povrede mozga u akutnoj fazi mikroglija ima karakteristike mešovito fenotipa, dok u hroničnoj fazi dominira M1 tip (Morganti-Kossmann i sar., 2019).

1.3.2. Astrociti i povreda mozga

Astrociti, kao najzastupljeniji predstavnici ćelija glije, u fiziološkim uslovima pružaju potporu neuronima (Sofroniew, 2015). Učestvujući u održavanju homeostaze imaju sposobnost brze modifikacije u zavisnosti od potreba ćelija koje okružuju (Yang i Wang, 2015). Pored toga, astrociti učestvuju u kontroli protoka krvi u mozgu, preuzimaju višak glutamata (Yang i Wang, 2015), obezbeđuju izvore energije i faktore rasta, učestvuju u formiranju tripartitne sinapse (Zhou i sar., 2020, Mira i sar., 2021). Morfološki, astrociti mogu biti fibrozni ili protoplazmatični (Božić i sar., 2021). Fibrozni astrociti se nalaze u beloj masi i imaju tanke, dugačke i slabo razgranate nastavke, dok su protoplazmatični astrociti prisutni u sivoj masi i imaju brojne, kratke, razgranate nastavke (Acáz-Fonseca i sar., 2016).

Reaktivna astroglioza je odbrambena reakcija astrocita na prisustvo nekog patološkog stimulusa i karakteriše se aktivacijom astrocita u vidu hipertrofije i proliferacije (Slika 1.4) (Zamanian i sar., 2012; Mira i sar., 2021). Mikroglija i imunološke ćelije koje prolaze kroz KMB dodatno reaktiviraju astrocite (Liddlow i sar., 2017), koji prolaze kroz morfološke (hipertrofija tela i glavnih nastavaka, polarizacija astrocita ka mestu povrede) i funkcionalne promene (Escartin i sar., 2019). U cilju vizualizacije reaktivnih astrocita ispituje se promena njihove morfologije i pojačana ekspresija glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Liddlow i Barres, 2017). Ovaj citoskeletni protein je prisutan i u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata koji su imali povredu mozga (Escartin i sar., 2019) i koristi se kao biomarker za brojna neurološka stanja, posebno tokom traumatskih oštećenja mozga/kičmene moždine i moždanog udara. Aktivacija astrocita, pri čemu nastaju A1 i A2 reaktivni astrociti, može da bude klasična ili alternativna. A1 reaktivni astrociti podstiču neuroinflamaciju, a A2 imaju protektivnu ulogu (Suk, 2016). Ova činjenica je važna zbog pronalaska terapijske procedure, koja će dovesti do podsticanja antiinflamatornih, a neutralisanja proinflamatornih karakteristika astrocita u saniranju povrede (Zhou, 2020).



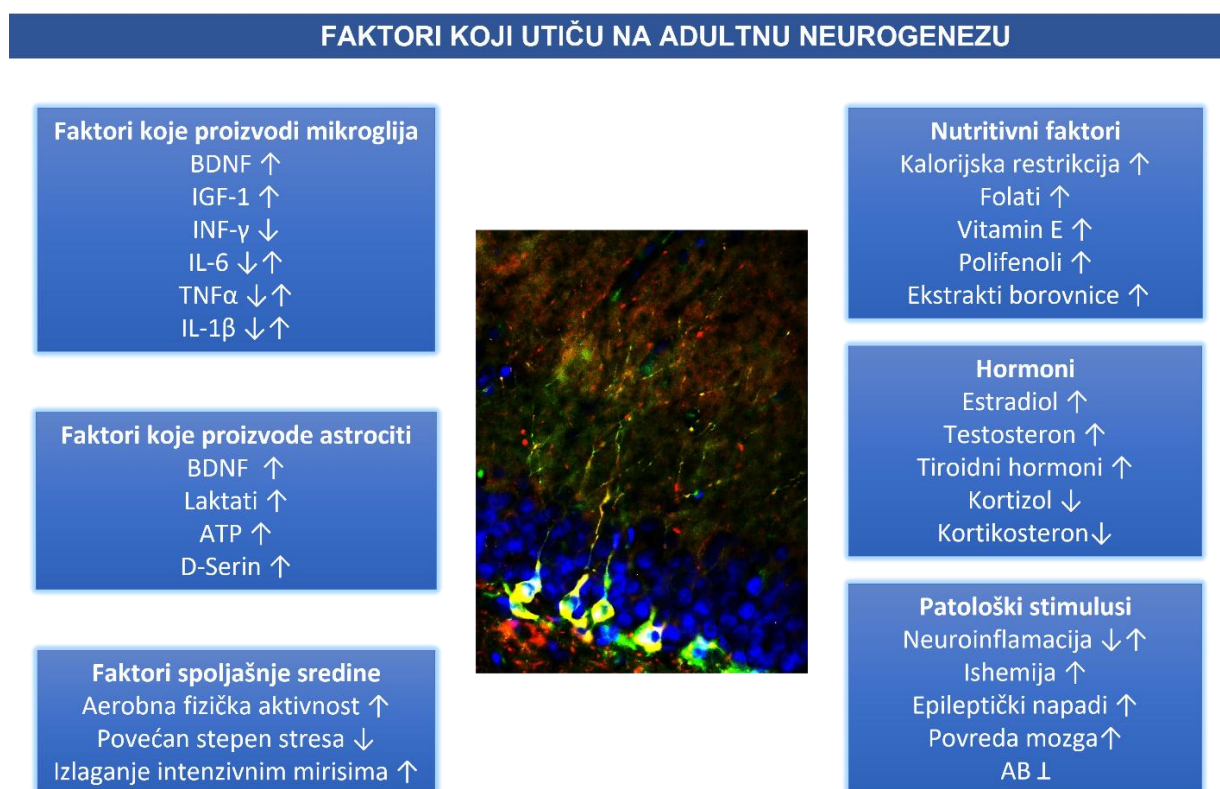
Slika 1.4. Odgovor astrocita na povredu. Nakon traumatskog oštećenja mozga dolazi do aktivacije astrocita. Naime, dolazi do hipertrofije i proliferacije astrocita, pri čemu se formira glijalni ožiljak, fizička barijera između povrede i zdravog tkiva. Astroците karakterišu sledeće promene: povećan influx Ca^{2+} , smanjena ekspresija transportera za glutamat i njegovo smanjeno preuzimanje, povećano oslobađanje proinflamatornih citokina, povećana ekspresija akvaporina i koneksina-43. Ove promene dovode do nastanka oštećenja krvno-moždane barijere i posledičnog razvoja edema. Skraćenice: akvaporin 4 (AQP4); koneksin-43 (Cx43); kalcijum (Ca^{2+}). Preuzeto i modifikovano prema Mira i sar., 2021.

Morfološke promene astrocita zavise od tipa i težine povrede, kao i od mesta lezije (Li i sar., 2021). Takođe, reakcija astrocita na povredu zavisi i od njihove udaljenosti od mesta povrede. Naime, sa udaljavanjem astrocita smanjuje se uticaj spoljašnjeg stimulusa, a samim tim i reakcija astrocita. Svi astrociti koji se nalaze u blizini lezije hipertrofišu, ali samo polovina usmerava svoje nastavke ka mestu lezije (Escartin i sar., 2019). Blaga do umerena povreda indukuje hipertrofiju tela i nastavaka astrocita, kao i povećanu ekspresiju GFAP. Teška reaktivna astrogliozna se karakteriše još izraženijom hipertrofijom, većom ekspresijom GFAP i proliferacijom i migracijom astrocita ka mestu lezije (Li i sar., 2021). Hipertrofija astrocita se predominantno javlja kao posledica njihovog oticanja/bubrenja. Dok povećana ekspresija akvaporina 4 (AQP4) i njihovo širenje ćelijskom membranom pogoršava citogeni edem, u vazogenom edemu ima korisnu ulogu, ali još uvek nepoznatog mehanizma (Hsu i sar., 2015). Nakon povrede mozga, primećeno je da se astrociti izdužuju i formiraju permanentni i kompaktni glijalni ožiljak (Escartin i sar., 2019). Prolazak proteina plazme, fibrinogena i imunoglobulina G (IgG), kroz oštećenu KMB indukuje inflamaciju i formiranje ožiljka (Muradashvili i Lominadze, 2013). Glijalni ožiljak može da stimuliše regeneraciju aksona oslobađajući faktore rasta, ali i da inhibira regeneraciju oslobađajući inhibitore rasta aksona, koji su nepovoljni za neurogenezu i regeneraciju tkiva nakon povrede mozga (Chen, 2019). Astrociti koji formiraju glijalni ožiljak ispoljavaju veći stepen proliferacije od hipertrofiranih astrocita koji su udaljeni od mesta lezije (Escartin i sar., 2019).

1.4. Adultna neurogeneza

Naučnici su se dugo pridržavali teorije da u adultnom mozgu ne dolazi do nastajanja novih neurona. Naime, verovalo se da samo tokom prenatalnog i ranog postnatalnog razvoja neuralne stem ćelije (engl. *neural stem cell*, NSC) proliferišu i generišu zrele neurone (Yoo i Blackshaw, 2018). Sada se zna da adultna neurogeneza predstavlja proces formiranja novih neurona tokom odraslog životnog doba (Moreno-Jimenez i sar., 2021). Iako se o procesu adultne neurogeneze sisara raspravlja više decenija, sam termin je tek nedavno prihvaćen (Ghosh, 2019).

Adultna neurogeneza se odvija u privilegovanim, neurogenim regionima mozga, koji zahvaljujući specifičnim karakteristikama vanćelijskog matriksa obezbeđuju okruženje koje je neophodno za proliferaciju i diferencijaciju NSC (Tucić i sar., 2021). U zavisnosti od uslova sredine u kojoj se nalaze NSC mogu biti aktivne ili u stanju mirovanja (Ibrayeva i sar., 2021). Zahvaljujući tome što se neaktivne NSC nalaze u G0 ili G2 fazi ćelijskog ciklusa, one mogu da se aktiviraju i da uđu u sledeću fazu ćelijskog ciklusa (Otsuki i Brand, 2018). Tačni uslovi pod kojima se neometano odvija adultna neurogeneza u privilegovanim regionima mozga su još uvek nedovoljno ispitani. Shodno tome, mnogi fiziološki i patološki faktori (Slika 1.5) mogu da stimulišu ili inhibiraju proces adultne neurogeneze (Amanollahi i sar., 2023).



Slika 1.5. Faktori koji utiču na adultnu neurogenezu. Iako su uslovi pod kojima se odvija adultna neurogeneza još uvek nedovoljno ispitani, pokazano je da na ovaj proces utiču različiti faktori. Dele se na faktore koje proizvodi mikroglija, faktore koje proizvode astrociti, faktore spoljašnje sredine, nutritivne faktore, hormone i patološke stimulse. Na mikrografiji se uočavaju nezreli neuroni obeleženi dablkortinom (DCX, marker nezrelih neurona) i DAPI (marker za vizualizaciju jedra). ↑ - stimuliše adultnu neurogenezu, ↓ - inhibira adultnu neurogenezu, ↑↓ - efekat na neurogenezu zavisi od doze, ⊥ - kontradiktorni rezultati. Skraćenice: neurotrofni faktor sintetisan u mozgu (BDNF); insulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1); interferon- γ (INF- γ); faktor nekroze tumora α (TNF- α); interleukin 6(IL-6); interleukin 1b (IL-1b); adenzin trifosfat (ATP); Alchajmerova bolest (AB).

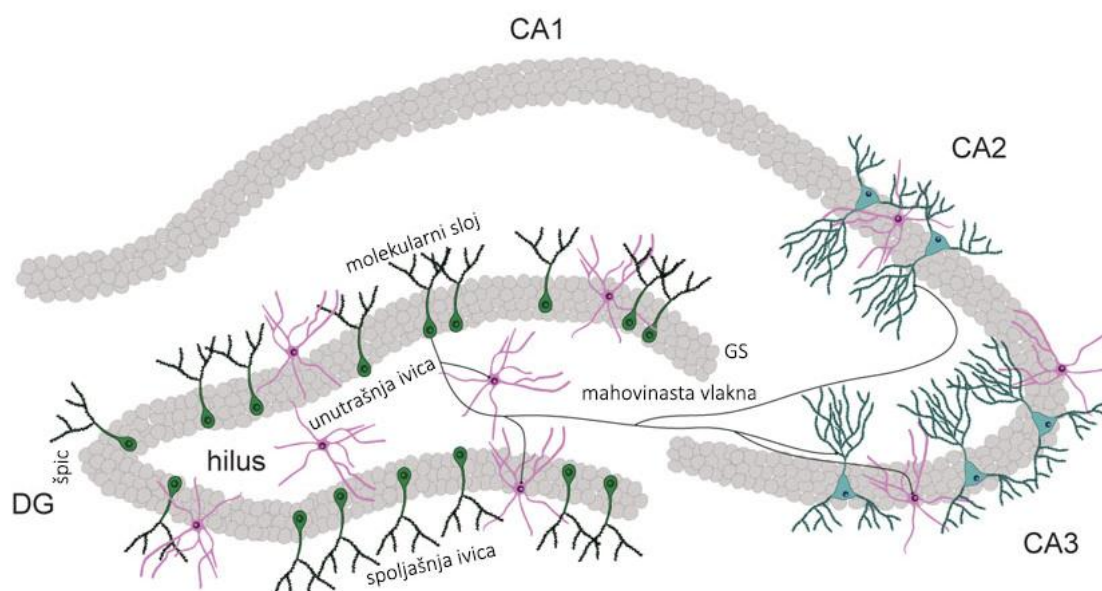
NSC se nalaze u dva glavna, neurogena regiona mozga: u subgranularnoj zoni (SGZ) DG hipokampusa i u subventrikularnoj zoni (SVZ) lateralnih komora (Nogueira i sar., 2022). NSC u SGZ proizvode ekscitatorne granularne ćelije DG, koje se integrišu u već postojeće neuronske krugove granularnog sloja (Ribeiro i sar., 2021). NSC u SVZ stvaraju nove neuroblaste, koji migriraju ka mirisnoj kvržici – olfaktornom bulbusu, OB (lat. *bulbus olfactorius*) i diferenciraju se u interneurone (Lim i Alvarez-Buylla, 2016). Pored SGZ i SVZ, adultna neurogeneza je pokazana i u još nekim delovima mozga, kao što su amigdala, neokorteks, strijatum i hipotalamus (Jorgensen, 2018; Yoo i Blackshaw, 2018). Adultna neurogeneza u ovim regionima je niskog stepena ili nastaje kao posledica fiziološkog odgovora na različite uzroke (Qin i sar., 2015).

1.4.1. Adultna neurogeneza u subgranularnoj zoni dentatnog girusa

Hipokampus je smešten u medijalnom delu temporalnog lobusa i predstavlja deo limbičkog sistema (Knierim, 2015; Fares i sar., 2019). Dorzalni hipokampus kontroliše kognitivne funkcije, a ventralni hipokampus reguliše emocije, kao što su raspoloženje, anksioznost, ponašanje zasnovano na stresu i strahu (Strange i sar., 2014). Pored toga, hipokampus igra suštinsku ulogu u procesu obrade informacija, učenja i formiranja epizodne i prostorne memorije (Terranova i sar., 2019).

Hipokampus sadrži DG i *hipokampus proper* (CA1, CA2 i CA3 region) (Slika 1.6) (Christian i sar., 2020). DG ima laminarnu građu i sastoji se od molekularnog sloja, granularnog sloja (GS) i hilusa (Tuncdemir i sar., 2019). U sastav GS ulaze špic, suprapiramidalna (unutrašnja) i infrapiramidalna (spoljašnja) ivica, čija je podela nastala u odnosu na njihovu lokaciju u poređenju sa CA3 regionom (Toni i Schinder, 2015). GS je podeljen na spoljašnju, srednju i unutrašnju trećinu i na SGZ u kojoj se nalaze NSC (Kempermann i sar., 2003). Granularne ćelije predstavljaju gusto zbijene neurone, koji su najvećoj meri smešteni u GS. Granularni neuroni igraju najznačajniju ulogu u fiziološkim funkcijama koje se pripisuju hipokampusu (Lopez-Rojas i Kreutz, 2016). Međutim, GS nije jedino mesto gde se granularne ćelije mogu pronaći. Naime, granularne ćelije se još nazivaju i semilunarne ili ektopične. Ovi nazivi su nastali kao posledica njihove lokalizacije izvan GS, semilunarne granularne ćelije se nalaze u molekularnom sloju, dok su ektopične granularne ćelije pozicionirane u hilusu (Scharfman, 2016).

Tokom neurogeneze, novonastali granularni neuroni prvo formiraju sinapse sa inhibitornim GABA interneuronima, zatim sa glutaminergičkim mahovinastim ćelijama u hilusu i sa neuronima u entorinalnom korteksu (Cope i Gould, 2019). Aksoni granularnih neurona (mahovinasta vlakna) (Slika 1.6) prolaze kroz hilus do CA3 regiona, u kome formiraju glutaminergičke sinapse sa piramidalnim neuronima. CA3 piramidalni neuroni prave sinapse sa CA1 piramidalnim ćelijama, čiji aksoni izlaze iz hipokampusa (Kempermann, 2022). Takođe, ovi neuroni šalju signale i mahovinastim ćelijama (ekscitatorni hilarni neuroni), piramidalnim neuronima u CA2 regionu, inhibitornim interneuronima u CA3 regionu i celom DG (Cope i Gould, 2019).

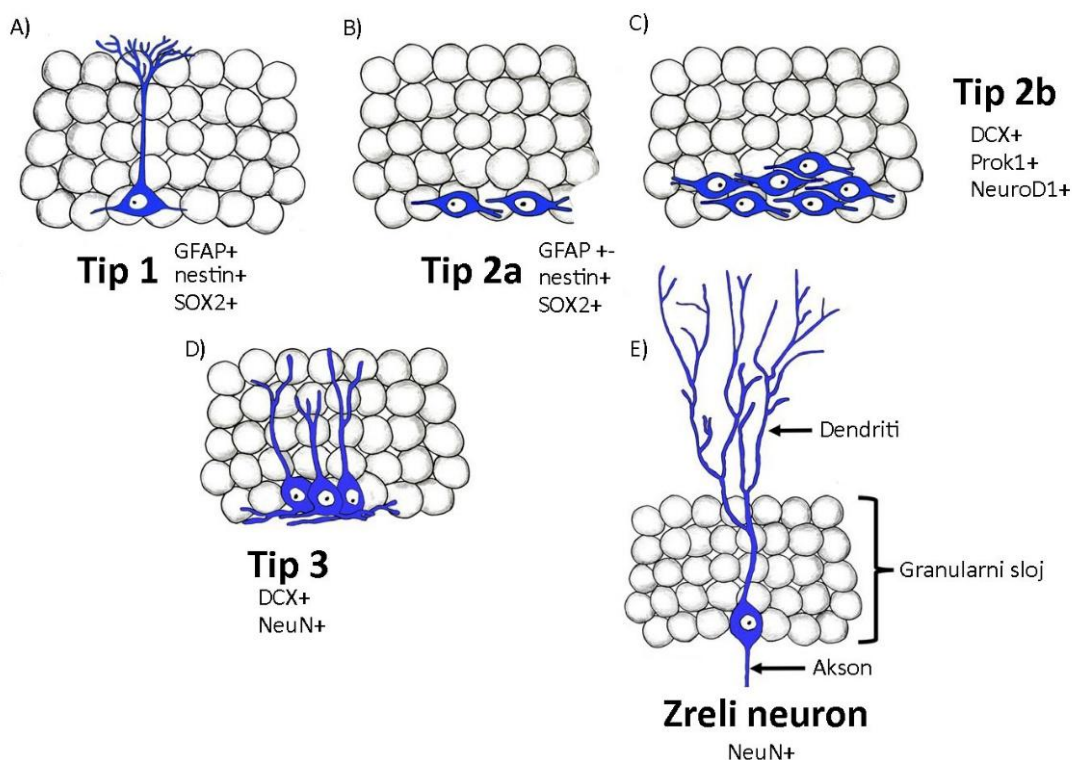


Slika 1.6. Shematski prikaz građe hipokampusa. Hipokampus sadrži DG i hipokampus proper (CA1, CA2 i CA3 region, sa piramidalnim neuronima, plavo obojene ćelije). DG se sastoji od molekularnog sloja, granularnog sloja (GS) i hilusa. GS čine ekscitatorne granularne ćelije (zeleno obojene), a sastoji se od špica, suprapiramidalne (unutrašnje) i infrapiramidalne (spoljašnje) ivice. Mahovinasta vlakna su aksoni granularnih ćelija, koji prolaze kroz hilus do CA3 i CA2 regiona, u kome formiraju glutamerni sinapse sa piramidalnim neuronima. Skraćenice: cornu ammonis 1,2,3 (CA1, CA2, CA3); granularni sloj (GS); dentatni girus (DG). Preuzeto i modificirano prema Cope i Gould, 2019.

Najznačajnija karakteristika DG je da se novi neuroni u ovom regionu mozga stvaraju tokom celog života. Smatra se da adulta hipokampalna neurogeneza značajno povećava funkcionalnost hipokampusa time što povećava neuralnu plastičnost DG (Walgrave i sar., 2021). U hipokampusu odraslih, NSC se nalaze u SGZ DG, koja se nalazi između GS i hilusa (Toda i Gage, 2018). Nakon aktivacije, NSC se razvijaju u neuronske progenitore, koji migriraju radialno u GS DG, u kome se nakon diferencijacije integrišu u postojeću neuronsku mrežu (Anacker i Hen, 2017).

NSC imaju sposobnost samoobnavljanja (Cope i Gould, 2019) i pokazuju karakteristike multipotentnosti (Toda i Gage, 2018). Ove ćelije prolaze kroz različite faze tokom procesa adultne neurogeneze. Proces formiranja potpuno integriranih, zrelih granularnih neurona od NSC može trajati mesecima (Anacker i Hen, 2017). Tokom ovog perioda, ćelije proliferišu, diferenciraju se, sazrevaju, migriraju, integrišu se u neuronska kola ili umiru putem apoptoze (Abbott i Nigussie, 2020). U slučaju smrti neurona mikroglia ih fagocituje, čime pokazuje jednu od mnogobrojnih funkcija koje su neophodne za održavanje neurogene niše (de Miranda i sar., 2016).

Ćelije slične radialnoj gliji (engl. *radial glia-like cells*) (tip 1 ćelije) u DG se karakterišu brzo deobom i od njih nastaju intermedijarne progenitorske ćelije (tip 2a i tip 2b), koje mogu da proliferišu i da se diferenciraju. Tip 2b ćelije postaju neuroblasti (tip 3 ćelije), koji migriraju, diferenciraju se i sazrevaju u granularne neurone (Slika 1.7) (Toda i Gage, 2018; Cope i Gould, 2019).



Slika 1.7. Shematski prikaz formiranja novih neurona u DG hipokampusa. (A) *Tip 1* ćelije, ćelije slične radijalnoj gliji, imaju trouglasto telo i apikalni nastavak koji se proteže do unutrašnjeg molekularnog sloja. Imaju sposobnost proliferacije. (B) *Tip 2a* ćelije imaju kratke i debele nastavke, koji su orijentisani u pravcu SGZ. Pripadaju grupi interemedijarnih progenitora, koji proliferišu. (C) Iako *tip 2b* ćelije imaju sličan oblik kao *tip 2a*, one imaju neuronski fenotip i ne mogu da proliferišu. (D) *Tip 3* neuroblasti prolaze kroz proces sazrevanja u smeru neurona. (E) Zreli neuron. Skraćenice: dablkortin (DCX); glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP); polno determinišući region 2 Y (SOX2); engl. neuronal nuclear protein (NeuN), prokineticin 1 (Prok1), engl. neuronal differentiation 1 (NeuroD1). Preuzeto i modifikovano prema Abbott i Nigussie, 2019.

Tokom navedenih procesa, NSC menjaju svoj oblik i markere, koje eksprimiraju na površini ćelijske membrane. Pored granularnih neurona DG i astrociti mogu da generišu NSC (Toda i Gage, 2018). Identifikacija tipa NSC se odvija na osnovu njihove lokacije, morfologije i ekspresije različitih markera na njihovoj površini (Zhao i van Praag, 2020).

Tip 1 ćelije imaju specifičnu morfologiju, koju karakteriše trouglasto telo i apikalni nastavak. Ovaj nastavak prolazi kroz granularni sloj i stiže do unutrašnjeg molekularnog sloja, gde se grana (Abbott i Nigussie, 2020). Ove ćelije eksprimiraju GFAP, nestin i SOX2 (Kempermann i sar., 2015). Pored toga, ove ćelije eksprimiraju BMPs (engl. *bone morphogenic proteins*) koji su neophodni za regulisanje brzine sazrevanja (Goncalves i sar., 2016).

Tip 2 ćelije imaju dva podtipa: 2a i 2b. *Tip 2a* ćelije predstavljaju heterogenu populaciju ćelija koja ima karakteristike glije. Imaju kratke, a debele nastavke, koji su orijentisani u pravcu SGZ (Llorens-Martin i sar., 2016). Iako *tip 2b* ćelije imaju sličan oblik kao *tip 2a*, one imaju neuronski fenotip i ne mogu da proliferišu (Abbott i Nigussie, 2020). Tipično, *tip 2* ćelije se karakterišu ekspresijom GABA_A receptora (Jin i sar., 2016). Smatra se da je GABA signal neophodan za diferencijaciju ovih ćelija u neurone (Dieni i sar., 2013; Snyder, 2019). *Tip 2a*

ćelije eksprimiraju iste glijalne markere kao tip 1 ćelije, osim što mogu, ali ne moraju da eksprimiraju GFAP (Kempermann i sar., 2015). Ćelije tipa 2b eksprimiraju dabl kortin (DCX) koji je ključan za diferencijaciju i migraciju neurona (Shanchez-Huerta i sar., 2016) i Prok1 (prokineticin 1) i NeuroD1 (engl. *neuronal differentiation 1*) važne za specifičan razvoj granularnih ćelija (Kempermann i sar., 2015; Niklison-Chirou i sar., 2020).

Tip 3 ćelije zauzimaju vertikalni položaj u odnosu na SGZ. Karakteriše ih prisustvo dendrita koji se prostiru do molekularnog sloja, i aksona koji idu do hilusa. Ove ćelije eksprimiraju iste markere kao ćelije tipa 2b, ali i relin, CREB i neurotrofni faktor sintetisan u mozgu (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF*), koji su specifični za ovu ćelijsku liniju. Sazrevanjem, nezreli granularni neuroni podležu kompleksnom grananju dendrita i produženju dužine aksona (Abbott i Nigussie, 2020). Na početku ovi neuroni primaju spore GABA signale, zatim depolarizujuće i trofičke GABA signale, a na samom kraju procesa sazrevanja brze GABA i glutaminičke signale (Snyder, 2019). Tokom faze sazrevanja neuroni smanjuju ekspresiju DCX, a počinju da eksprimiraju NeuN, marker zrelih neurona (Kempermann i sar., 2015).

Sve uloge novonastalih neurona nisu još uvek poznate. Za sada se zna da funkcija ovih neurona zavisi od vrste, starosti jedinice, tipova zadataka koji treba da se reše, kao i od količine vremena koju je neophodno utrošiti za rešavanje tih zadataka. U poslednje vreme, adultna neurogeneza se povezuje i sa zaboravljanjem. Smatra se da bi došlo do skladištenja novih informacija treba da dođe do brisanja starih uz očuvanje sposobnosti razlikovanja novih i starih informacija (Kempperman, 2022).

1.4.2. Neuralne stem ćelije u subventrikularnoj zoni

SVZ predstavlja najveću germinativnu zonu u adultnom mozgu i nalazi se ispod endodima lateralne komore u prednjem telencefalonu (Slika 1.8 A) (Schweyer i sar., 2019; Favarolo i sar., 2022). SVZ čine ćelije koje oblažu bočne zidove lateralnih komora (Fontan-Lozano i sar., 2020). Kako ne postoji jasna granica između komora i SVZ u poslednje vreme se insistira na nazivu ventrikularna-subventrikularna zona (V-SVZ) (Lim i Alvarez-Buylla, 2016). V-SVZ predstavlja neurogeni region mozga u kome dolazi do nastanka neuroblasta koji migriraju ka OB i od kojih nastaju periglomerularni i glomerularni interneuroni, koji se integrišu u već postojeće neuronske krugove u OB (Meller i sar., 2023). Novonastali neuroni su odgovorni za precizno razlikovanje mirisa (Obernier i Alvarez-Buylla, 2019). V-SVZ se sastoji od NSC, prolazno amplifikujućih ćelija, neuroblasta, mikroglije, endodimskih i endotelnih ćelija (Shah i sar., 2018). Adultna neurogeneza u V-SVZ u fiziološkim uslovima zahteva očuvan sloj endodimalnih ćelija (Lim i Alvarez-Buylla, 2016).

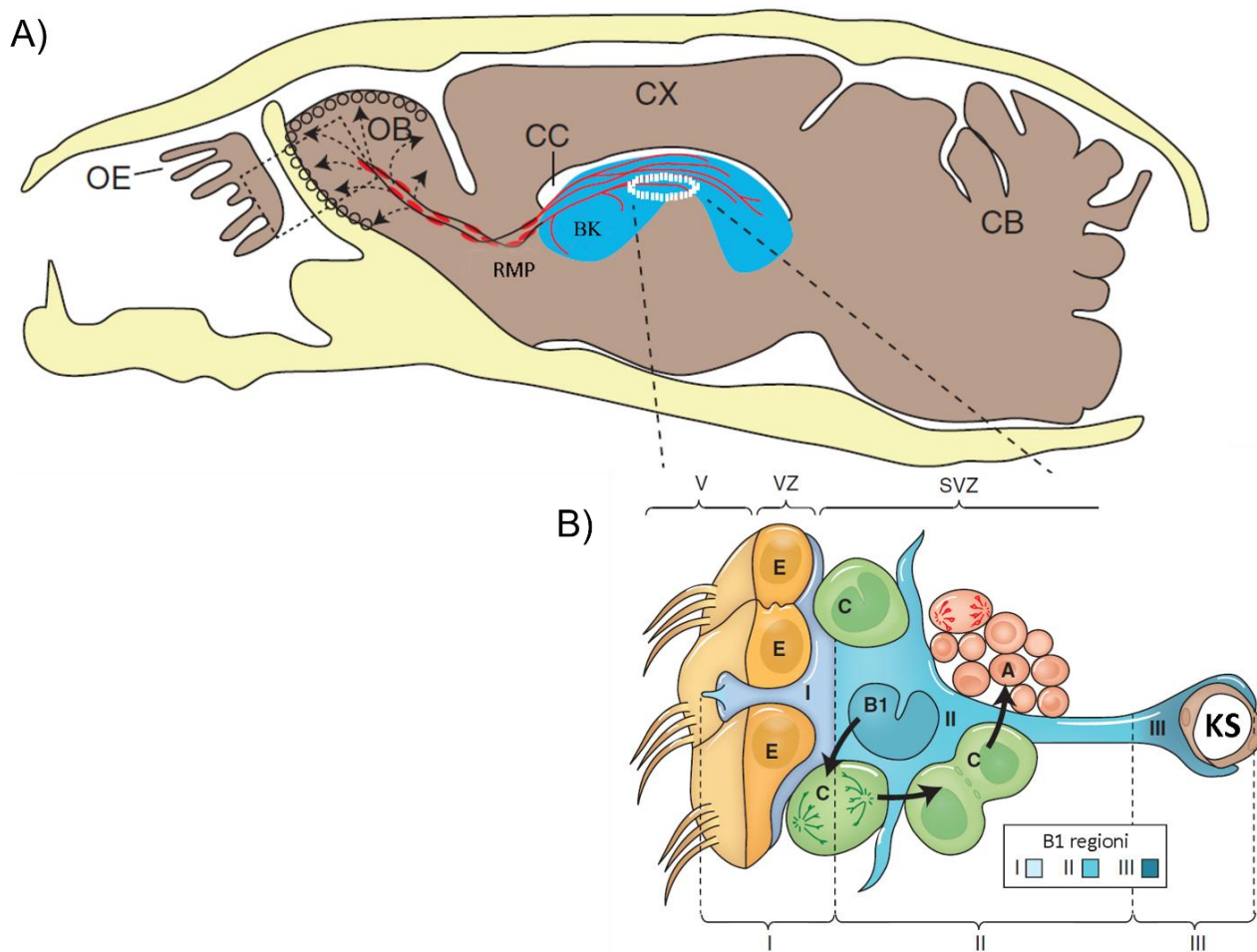
Danas se smatra da su NSC u V-SVZ specijalni astrociti (B1 ćelije), koji nastaju od radijalne glije. Ove ćelije eksprimiraju markere koji su karakteristični za astrocite: GFAP i transporter za glutamat i aspartat (Xie i sar., 2020). NSC u V-SVZ stvaraju nove interneurone, a u manjoj meri astrocite i prekursore oligodendrocita. B1 ćelije mogu biti aktivne ili neaktivne. Ako su u aktivnom stanju, pored astrocitinih markera, eksprimiraju i intermedijarni filament nestin (Lim i Alvarez-Buylla, 2016). B1 ćelije su pozicionirane ispod endodimskih ćelija (Fontan-Lozano i sar., 2020). Na apikalnom kraju ove ćelije imaju nepokretnu ciliju, preko koje su u kontaktu sa cerebrospinalnom tečnošću. Na bazalnom delu B1 ćelije imaju dugačak nastavak sa završnim stopalom (Slika 1.8. B), koje je u kontaktu sa krvnim sudovima mozga (Obernier i sar., 2018). Od B1 ćelija asimetričnom deobom nastaju prolazno amplifikujući progenitori (tip C), koji su lokalizovani u neposrednoj blizini krvnih sudova. Tipovi C ćelija simetričnom deobom produkuju DCX-pozitivne neuroblaste (tip A).

Tipovi A ćelija su organizovani u vidu agregata zaštićenih GFAP-pozitivnim ćelijama, tangencijalno migriraju kroz rostralni migratorni put (RMP) ka OB (Fontan-Lozano i sar., 2020). Kada stignu u OB većina ovih ćelija radijalno migrira ka granularnom sloju i diferencira se u GABA inhibitorne interneurone. U manjem procentu, ove ćelije migriraju i ka periglomerularnom sloju, gde nastaju novi dopaminergički neuroni (Schweyer i sar., 2019).

Kao što je već rečeno, RMP se sastoji od astrocita, koji se nalaze u formaciji glijalne cevi i od neuroblasta, koji se tangencijalno kreću kroz cev ka OB (Xie i sar., 2018). Astrociti glijalne tube imaju bipolarnu morfologiju i upravo oni usmeravaju kretanje neuroblasta kroz glijalnu tubu (O'Donnell i sar., 2018). RMP ima 3 kraka: vertikalni, lakatni i horizontalni krak. Vertikalni krak se proteže od SVZ i predstavlja descendenti deo koji se nalazi ispod žuljevitog tela (lat. *corpus callosum*, *CC*). Lakatni krak se nastavlja na vertikalni i uključuje rostralnu krivinu usmerenu ka OB. Horizontalni krak predstavlja poslednji deo RMP, a nalazi se u OB (Hirako i sar., 2016). U početku se smatralo da RMP predstavlja samo anatomske povezanosti V-SVZ i OB. Međutim, s obzirom da je pokazano prisustvo NSC i da neuroblasti u RMP zadržavaju sposobnost proliferacije, sada se zna da i RMP ima karakteristike neurogene niše (Lim i Alvarez-Buylla, 2016).

Pored neuroblasta, B1 ćelije mogu da produkuju oligodendrocitne prekursore, odnosno da generišu C ćelije koje eksprimiraju markere oligodendrocita (Obernier i Alvarez-Buylla, 2019). Ovi prekursori, zatim, migriraju ka *CC* i strijatumu (lat. *corpus striatum*) (Fontan-Lozano i sar., 2020). Takođe, V-SVZ sadrži i B2 astrocite, koji nisu u direktnom kontaktu sa bočnom komorom, ali izoluju neuroblaste i na taj način pomažu da se oblikuje niša (Obernier i sar., 2018; Obernier i Alvarez-Buylla, 2019).

Na osnovu pozicije B1 ćelija, V-SVZ se deli na 3 regiona. Prvi region sadrži apikalni nastavak B1 ćelija i tela endodimalnih ćelija. Drugi region sadrži telo B1 ćelija, koje je u kontaktu sa C i A ćelijama. Treći region sadrži bazalne nastavke sa završnim stopalima (Slika 1.8) (Lim i Alvarez-Buylla, 2016).



Slika 1.8. Shematski prikaz sagitalnog preseka adultnog mozga glodara i ćelija koje ulaze u sastav ventrikularne-subventrikularne zone (V-SVZ). A) Subventrikularna zona se nalazi neposredno uz lateralne zidove bočnih komora (plavo). Neuroblasti organizovani u agregate formiraju duge lance (crvene linije), koji grade kompleksnu mrežu isprepletanih puteva unutar SVZ. Ovi putevi u prednjoj SVZ se povezuju sa rostralnim migratornim putem, koji pomaže novim neuronima da stignu do olfaktornog bulbusa. Kada stignu u OB ćelije migriraju radijalno u glomerularni ili periglomerularni sloj. B) B1 ćelije proliferišu i od njih nastaju prolazno amplifikujućii progenitori (C ćelije). Od C ćelija nastaju neuroblasti (A ćelije), koji zatim migriraju duž RMP ka OB. V-SVZ se deli na 3 regiona: I region sadrži apikalni nastavak B1 ćelije i telo endodimalne ćelije, II region sadrži telo B1, a III region sadrži bazalne nastavke sa završnim stopalima. Skraćenice: olfaktorni epitel (OE); olfaktorni bulbus (OB); žuljevito telo (lat. corpus callosum, CC); korteks (CX); cerebelum (CB); bočna komora (BK); rostralni migratorni put (RMP); ventrikula (V); ventrikularna zona (VZ); subventrikularna zona (SVZ); endodimalne ćelije (E); krvni sud (KS). Preuzeto i modifikovano prema Lim i Alvarez-Buylla, 2016.

Ependimalne ćelije su epitelnog porekla i oblažu zidove komora (Ji i sar., 2022). Postoje dva tipa endodimalnih ćelija: mnogobrojne ćelije sa velikim brojem cilija i malobrojne ćelije sa dve cilije. Ove ćelije učestvuju u formiranju niše za NSC (Shah i sar., 2018). Endotelne ćelije V-SVZ sintetišu faktore koji utiču na migraciju i maturaciju neuroblasta. Direktni kontakt između NSC i endotelnih ćelija održava B1 ćelije u stanju mirovanja (Fontan-Lozano i sar., 2020).

Različiti faktori regulišu adultnu neurogenezu u V-SVZ. Poznato je da je insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *Insulin-like Growth Factor 1*, IGF-1), koga sintetišu ćelije horoidnog pleksusa i endotelne ćelije, neophodan za nesmetano odvijanje adultne neurogeneze i proliferaciju B1 ćelija (Chidambaram i sar., 2022). Prisustvo nepokretnog apikalnog nastavka i ekspresije VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) na apikalnom nastavku B1 ćelije neophodno je za nesmetano odvijanje adultna neurogeneze (Lim i Alvarez-Buylla, 2016).

1.4.3. Adultna neurogeneza i traumatsko oštećenje mozga

Sa ciljem da se imitira što više patoloških stanja mozga razvijen je veliki broj pretkliničkih modela. U svakom modelu moguće je podesiti težinu bolesti, ali nažalost svi modeli imaju svoja ograničenja i nijedan model ne imitira u potpunosti patologiju mozga kod ljudi (Paterno i sar., 2017). Samim tim različiti eksperimentalni modeli povrede mozga izazivaju drugačije odgovore SGZ i V-SVZ.

Proces adultne neurogeneze u V-SVZ je stimulisan nakon povrede mozga, osim u slučajevima kada povreda direktno zahvata SVZ ili RMP (Chang i sar., 2016). Povreda mozga indukuje migraciju pojedinačnih neuroblasta iz SVZ i RMP, kao i migraciju lanaca RMP ka mestu lezije (Chang i sar., 2016). Ovi neuroblasti generišu funkcionalne neurone na mestu lezije. Povećano kretanje neuroblasta ka mestu lezije dovodi do reparacije oštećenog regiona i obezbeđuje funkcionalni oporavak nakon povrede (Purvis i sar., 2022). Pored neuroblasta, i prekursori oligodendrocita mogu da migriraju na mesto lezije, čime doprinose procesu saniranja povrede (Fontan-Lozano i sar., 2020). Takođe, postoje i studije koje ukazuju da dolazi i do aktivacije NSC koje potiču iz regiona u kome je došlo do oštećenja (Nemirovich-Danchenko i Khodanovich, 2019). U poslednje vreme se pominje i sposobnost malignih transformacija NSC iz SVZ koje dovode do nastanka glioblastoma (Lee i sar., 2018).

Parenhimski modeli povrede mozga dovode do gubitka nezrelih neurona, ali i do stimulacije proliferacije NSC u SGZ i povećane sinteze neurotrofnih faktora (Redell i sar., 2020). Postoji veliki broj istraživanja o uticaju povrede korteksa na adultnu hipokampalnu neurogenezu. Zaključci izvedeni na osnovu rezultata tih studija su prilično složeni i naizgled kontradiktorni (Gao i Chen, 2013; Ibrahim i sar., 2016; Wang i sar., 2016; Marzano i sar., 2022). Važan faktor koji doprinosi ovakvoj raznolikosti rezultata je korišćenje različitih eksperimentalnih modela traumatskog oštećenja mozga. Naime, različiti modeli pokazuju drugačije efekte na samo odvijanje procesa adultne neurogeneze. U cilju boljeg razumevanja efekta povrede mozga na proces stvaranja novih neurona i proučavanja ovog procesa kao jednog od mehanizama oporavka mozga nakon povrede, neophodno je proučiti efekte različitih modela traumatskog oštećenja mozga na hipokampalnu neurogenezu.

Akutno povećanje proliferacije NSC je povezano sa aberantnom migracijom novonastalih neurona ka hilusu ili molekularnom sloju DG, što posledično dovodi do sinaptičke reorganizacije i nastanka hronične epilepsije nakon povrede (Shetty, 2014). Takođe, nakon povrede mozga dolazi i do gubitka interneurona u hipokampusu, što govori u prilog pokazanoj hiperekscitabilnosti granularnih neurona DG, koja nastaje kao posledice promene GABAeričke i glutaminičke sinaptičke transmisije (Paterno i sar., 2017; Frankowski i sar., 2019).

1.5. Hiperbarična oksigenacija

Hiperbarična oksigenacija (HBO) predstavlja terapijsku proceduru u kojoj pacijent intermitentno udiše 100% kiseonik (O_2) pod pritiskom višim od atmosferskog (1 ATA=101,3 kPa) (Ahmadi i Khalatbary, 2021). Od prvog pominjanja hiperbarične terapije u XVII veku (Jones i sar., 2023) do prve primene HBO kao pomoćne terapije prošla su II veka (De Wolde i sar., 2021). Danas zahvaljujući ubrzanju zarastanja rana, stimulaciji angiogeneze, ispoljavanju antimikrobnog efekta i mogućnosti upotrebe u urgentnim stanjima, HBO se koristi kao odobrena terapijska procedura u lečenju mnogih zaraznih i nezaraznih bolesti (Ortega i sar., 2021; Lerche i sar., 2022). HBO pronalazi svoju primenu kao terapija izbora i kao pomoćna terapija (Lerche i sar., 2022). Udruženje za podvodnu i hiperbaričnu medicinu (engl. *The Undersea and Hyperbaric Medical Society*, UHMS) je postavilo 14 indikacija za primenu HBO (De Wolde i sar., 2021). Naime, HBO je odobrena kao terapija u sledećim stanjima: trovanje ugljen monoksidom, gasna embolija i dekompresiona bolest (Sen i Sen, 2021). HBO tretmani se primenjuju u hiperbaričnim komorama za jednu ili više osoba (Kirby i sar., 2019).

Terapijske efekte HBO postiže stvaranjem pozitivnog gradijenta difuzije O_2 , povećavanjem njegove koncentracije u krvi i smanjenjem veličine mehurića gasa (Jones, 2023). Na ovaj način HBO olakšava difuziju O_2 u smeru oštećenog tkiva (Hentia i sar., 2018). Hiperbarični uslovi dozvoljavaju O_2 da prodre duboko u ishemijske regione, što može dovesti do smanjenja lezije, do koje dolazi nakon povrede mozga (Peković i sar., 2018). Takođe, intermitentno izlaganje hiperbaričnom kiseoniku dovodi do aktivacije ćelijskih mehanizama koji se javljaju i za vreme hipoksije, što je poznato kao hiperoksija-hipoksija paradoks (Woo i sar., 2020; Maroon, 2022). Naime, u oba slučaja, tokom hipoksije i hiperoksije, dolazi do povećane produkcije ROS (Ortega i sar., 2021). ROS iniciraju sintezu različitih faktora rasta npr. hipoksijom indukovani faktor (*HIF*), vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, *VEGF*), koji stimulišu proces angiogeneze u oštećenim tkivima, kao i proliferaciju i mobilizaciju stem ćelija (Hadanny i Efrati 2020; Paderno i sar., 2021). Danas se smatra da povećana difuziona distanca O_2 u oštećenim tkivima olakšava njihovu reparaciju i da je posledično odgovorna za bolji oporavak (Efrati i Ben-Jacob, 2014).

Pored korisnih efekata, HBO terapija ako se ne upotrebljava na odgovarajući način može da ima i štetne efekte. Pre upotrebe HBO kao terapijske procedure, neophodno je primeniti individualni pristup prema svakom pacijentu. Naime, potrebno je razmoriti sve potencijalno štetne efekte koje HBO terapija može da izazove i proceniti da li će ova terapija doprineti oporavku pacijenta (De Wolde i sar., 2021). U literaturi postoje podaci koji ukazuju da u zavisnosti od vrednosti primenjenog pritiska i trajanja tretmana, HBO može da dovede do neželjenih efekata u zdravom tkivu (Bitterman, 2009). Upravo je zbog toga još uvek ograničena upotreba HBO i nije prihvaćena širom sveta (Paderno i sar., 2021). Sa tim u vezi, mnoge studije su se bavile ispitivanjem toksičnosti O_2 i stepena oksidativnog stresa uzrokovanog HBO (De Wolde i sar., 2021). Naime, pokazano je da prekomerno izlaganje visokom pritisku O_2 može da dovede do oštećenja DNK, metaboličkih poremećaja, endotelne disfunkcije, neurotoksičnosti i plućne toksičnosti (Chen, 2019). Da bi se izbegli neželjeni efekti visoke koncentracije O_2 potrebno je kontrolisati parametre HBO tretmana, poput pritiska i trajanja.

Hiperbarična oksigenacija i traumatsko oštećenje mozga

Mnogo se radi na pronalaženju adekvatnog tretmana u lečenju povreda mozga. Farmakoterapija ne obezbeđuje ozdravljenje u dovoljnoj meri, a hirurški zahvati služe kao procedura za spašavanje života pacijenta, ne garantujući saniranje posledica povrede. Obzirom na kompleksnost TBI (ishemija, hipoksija, cerebralni edemi), pretpostavlja se da bi primena različitih terapijskih procedura ipak dala najbolje rezultate (Capizzi, 2020). Većina terapijskih protokola koji se primenjuju neposredno nakon TBI je bazirana na smirivanju akutne patofiziologije i usmerena ka sprečavanju razvoja sekundarnog oštećenja mozga putem održavanja adekvatnog protoka krvi i prevencije nastanka hipoksije (Rakhit i sar., 2021).

Poznato je da se zahtevi mozga za kiseonikom povećavaju tokom akutne faze povrede, što ukazuje na to da je mitohondrijama neophodno obezbediti dodatnu količinu kiseonika da bi se u mozgu opet uspostavio aerobni metabolizam (Velho i sar., 2020). Rezultati pretkliničkih studija koje su koristile različite modele TBI su pokazali da HBO deluje pozitivno na funkcionalne i kognitivne ishode (Lim i sar., 2013; Kraitsy i sar., 2014). Naime, dolazi do poboljšanja motornih funkcija, lokomotorne koordinacije i neurološke funkcije. Između ostalog, pokazano je da protokoli sa kontinuiranom primenom HBO tokom 3 ili 5 dana nakon povrede, s tim da su započeti tokom prva 24h od trenutka povrede, ispoljavaju bolje efekte u popravljanju neurološkog deficita nego primena samo jednog tretmana u toku 24h (Daly i sar., 2018). Trenutno nedostaju kliničke studije koje će pokazati kako HBO primenjena odmah nakon TBI utiče na saniranje povrede.

U lečenju TBI, HBO se upotrebljava kao pretretman ili kao pomoćna terapija (Feigin i sar., 2019; Margulies i Hicks, 2009). Upotreba HBO u terapijskom protokolu za TBI bazirana je na smanjenju sekundarnog oštećenja s obzirom da je primarno oštećenje permanentno (Chen i sar., 2022). Klinički je dokazano da HBO smanjuje incidencu kognitivnih oštećenja, poboljšava prognozu bolesti i smanjuje mortalitet (Chen i sar., 2022). Takođe, pokazano je neuroterapeutsko dejstvo HBO kod svih pacijenata bez obzira na težinu hronične TBI (Hadannyi sar., 2018; Daly i sar., 2018). Naime, pokazano je da čak i upotreba HBO najmanje 3 godine nakon TBI, dovodi do povećanja regionalnog protoka krvi, strukturnih i funkcionalnih promena u mozgu (Lu i sar., 2021).

Unazad nekoliko decenija se govori o mogućim mehanizmima delovanja HBO nakon TBI. HBO protokoli koji su u upotrebi u eksperimentalnim istraživanjima pokazuju varijacije u vrednostima primenjenog pritiska, u dužini trajanja i započinjanja tretmana (Daly i sar., 2018). Ali bez obzira na to, pretkliničke studije na različitim eksperimentalnim modelima TBI, povreda kičmene moždine i neurodegenerativnih bolesti pokaze su da HBO ispoljava neuroprotektivni efekat (Ahmadi i Khalatbary, 2021) koji se ogleda u smanjenju veličine lezije, težine oštećenja i količine vode u mozgu (Daly i sar., 2018). Potencijalni mehanizmi putem kojih HBO ispoljava svoje neuroprotektivne efekte nakon TBI su: 1) sprečavanje razvoja sekundarne povrede, 2) redukovanje degeneracije neurona i smanjenje apoptoze regulacijom oksidativnog/antioksidativnog statusa i redukcijom oksidativnog stresa, 3) redukcija reaktivne mikrogliozе i astogliozе i stvaranja glijalnog ožiljka, 4) smanjenje neuroinflamacije, 5) poboljšavanje funkcionalnog oporavka, potenciranjem sinaptogeneze i neuronalne plastičnosti, 6) stimulacija angiogeneze i neurogeneze (Pekovic i sar., 2018). Još je pokazano i da upotreba HBO kao pretretmana na eksperimentalnom modelu primarnih neurona pacova dovodi do transfera mitohondrija iz astrocita u neurone koji su osetljivi na inflamaciju i čime se sprečava smrt neurona (Lippert i Borlongan, 2019).

Iako se o potencijalnim mehanizmima raspravlja jako dugo, još uvek nisu razjašnjeni svi signalni putevi i faktori koji učestvuju u njima. Poznato je da HBO primenjen nakon TBI povećava ekspresiju sinaptofizina, markera sinaptogeneze (Brkić i sar., 2012).

2. CILJEVI

Traumatsko oštećenje mozga (TBI) je veliki zdravstveni i finansijski problem u savremenom svetu. U zavisnosti od sile koja nanosi povredu i regiona mozga koji je zahvaćen povredom, javlja se širok spektar kliničkih simptoma zbog čega ne postoji univerzalna terapija. Hiperbarična oksigenacija (HBO) je terapijska procedura koja se upotrebljava kao adjuvantna terapija u lečenju TBI. Još uvek nisu pokazani svi molekularni mehanizmi putem kojih HBO dovodi do oporavka nakon povrede mozga.

U ovoj tezi ispitivan je odgovor različitih struktura mozga na dejstvo HBO tretmana nakon uklanjanja velikog dela korteksa mozga (ablacija senzomotornog korteksa, ASK). Korišćen je intermitentni HBO tretman koji je započet 5h nakon povrede mozga i primenjivan je tokom 10 uzastopnih dana. Nakon TBI regrutuju se makrofagi iz cirkulacije, aktiviraju rezidentne ćelije mikroglije i astrociti, promoviraju astroglia i stvaranje glijalnog ožiljka, koji može da stimuliše ili inhibira regeneraciju aksona, neurogenezu i regeneraciju tkiva nakon povrede mozga. Da bi se ispitao efekat ASK i primenjenog HBO tretmana na ove procese postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitati uticaj ASK i HBO tretmana na ćelije mikroglije u korteksu i odrediti fenotip aktivirane mikroglije oko mesta povrede.
2. Identifikovati fenotip astrocita oko mesta lezije i ispitati uticaj HBO tretmana na morfološke karakteristike astrocita i stvaranje glijalnog ožiljka.
3. Analizirati neuronalni odgovor na ASK i HBO tretman na osnovu ekspresije nestina markera neuralnih stem ćelija i antiinflamatornog citokina IL-10, u korteksu oko mesta povrede i u subventrikularnoj zoni lateralnih komora (SVZ), koja je mesto adultne neurogeneze. Ispitati gensku ekspresiju molekula markera neuronalne plastičnosti (*Dcx*).
4. Ispitati uticaj ASK na citoskeletnu mrežu unutar aksona i analizirati efekat HBO tretmana na neurofilamente nakon povrede.
5. Ispitati uticaj ASK i HBO tretmana na proces adultne neurogeneze oko mesta lezije i u SVZ, kao i na migraciju i maturaciju neuroblasta u SVZ i rostralnom migratornom putu.
6. Ispitati uticaj ASK i HBO tretmana na nezrele neurone u subgranularnoj zoni (SGZ), na zrele granularne neurone zubate vijuge (DG) i proteinsku ekspresiju molekula markera neuronalne plastičnosti (*DCX*).

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom je sprovedeno u Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Korišćeni su mužjaci pacova *Wistar* soja, stari 10 nedelja i prosečne telesne mase 250 g na početku eksperimenta. Pacovi su dobijeni iz vivarijuma Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Životinje su čuvane u grupnim, providnim kavezima od pleksiglasa (dimenzija 55x35x30 cm), obloženim šuškom, sa žičanom rešetkom postavljenom odozgo. Čuvane su u konstantnim ambijentalnim uslovima: temperatura 23 ± 2 °C; relativna vlažnost 50-60% i 12-to časovni ciklus svetlo-tama (od 8 h do 20 h). Tokom trajanja eksperimenta, voda i hrana su bile slobodno dostupne (lat. *ad libitum*). Istraživanje je urađeno u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja u Republici Srbiji i odobreno je od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja Univerziteta u Beogradu (rešenje broj 61206-2915/2-20, datum izdavanja: 22.09.2020. godine).

3.2. Eksperimentalne grupe

Za potrebe ovog istraživanja korišćeno je 56 životinja koje su nasumično razvrstane u pet grupa (Tabela 3.1). Fiziološku kontrolu (FK) su činile intaktne životinje, koje nisu bile izložene operativnoj proceduri ili tretmanu hiperbaričnom oksigenacijom. Kontrolnu grupu lažno operisanih životinja - *Sham* kontrola (SHAM) su činile životinje koje su prošle ceo operativni postupak, ali bez potpunog otvaranja lobanje i uklanjanja nervnog tkiva, već je samo napravljen rez na kosti lobanje prema koordinatama kraniotomije. *Sham* + HBO grupu (SHBO) su činile životinje koje su bile podvrgnute istoj operativnoj proceduri kao i životinje u grupi *Sham*, ali su za razliku od njih, posle operativne procedure bile izložene tretmanu hiperbarične oksigenacije. Grupu Lezija (L) su činile životinje kojima je metodom sukcionne ablacije odstranjen deo desnog senzomotornog korteksa prednjeg mozga. Lezija + HBO grupu (LHBO) su činile životinje, koje su nakon ablacije senzomotornog korteksa, izložene tretmanu hiperbarične oksigenacije.

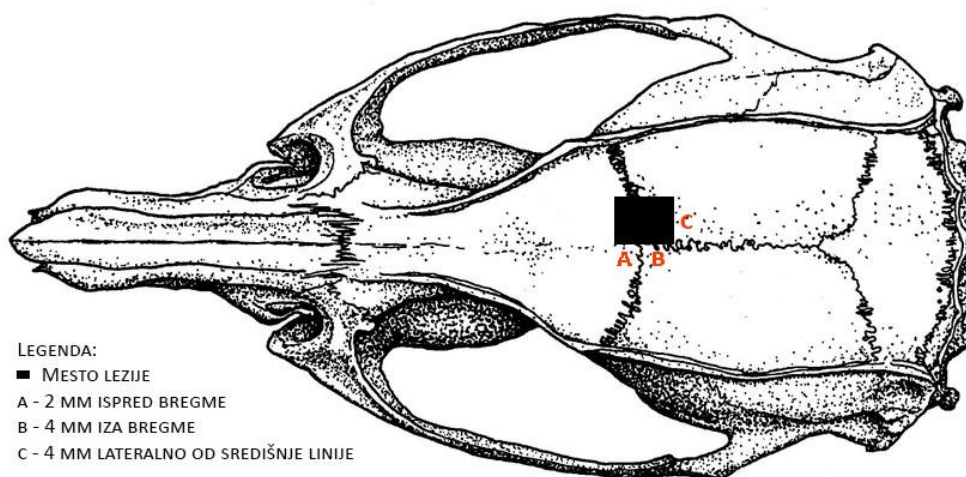
Tabela 3.1. Eksperimentalne grupe.

Grupa	FK	SHAM	SHBO	L	LHBO
Povreda (ASK)	-	.*	.*	+	+
HBO tretman	-	-	+	-	+

* - napravljen rez na kosti lobanje prema koordinatama kraniotomije, bez uklanjanja tog dela kosti i povrede nervnog tkiva. Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); Sham kontrola (SK); Sham + HBO (SHBO); Lezija (L); Lezija + HBO (LHBO).

3.3. Model traumatskog oštećenja mozga - hirurška procedura

Pre operacije pacovi su u skladu sa njihovom telesnom masom anestetizirani intraperitonealnom injekcijom *Zoletil®50* (*Virbac*, Karo, Francuska) dozom od 50 mg/kg. Nakon opuštanja tonusa mišića, životinje su fiksirane u stereotaksičkom aparatu (*Stelting: Stoelting Europe*, Dablin, Irska, www.stoeltingco.com). Po brijanju glave, skalpelom je napravljen rez na koži. Nakon uklanjanja potkožnog tkiva, utvrđene su koordinate kraniotomije (Slika 3.1) u odnosu na bregmu i središnju liniju: 2 mm ispred bregme, 4 mm iza bregme i 4 mm lateralno od središnje linije (Brkić i sar., 2012), koje su odgovarale položaju desnog senzomotornog korteksa pacova prema anatomskom atlasu (Paxinos i Watson 1998). Prema navedenim koordinatama stomatološkom bušilicom napravljen je otvor na lobanji i taj deo kosti je sklonjen. Tvrdna ovojnica je zasečena sa 3 strane i prebačena preko ivica kosti lobanje. Nakon toga, pristupilo se hirurškom odstranjivanju senzomotornog korteksa prednjeg mozga pacova metodom sukcione ablacije, koja predstavlja usisavanje sive moždane mase kroz tanki polipropilenski nastavak pomoću vakuma, sve do pojave bele mase. Posle prestanka krvarenja, tvrda ovojnica je vraćena na svoje mesto kao i isečeni deo kosti, koji je zatim fiksiran uz pomoć flastera u istom položaju u kome je bio pre operacije. Na kraju, koža je ušivena korišćenjem hirurškog konca (0, *Coated VICRYL®*, *Violet (Polyglactin 910)*, *Johnson & Johnson Intl*, Brisel, Belgija).



Slika 3.1. Shematski prikaz koordinata kraniotomije. *Kraniotomija je izvedena korišćenjem stomatološke bušilice, prema sledećim koordinatama: 2 mm ispred bregme, 4 mm iza bregme i 4 mm lateralno od središnje linije. Preuzeto i modifikovano prema Paxinos i Watson, 1998.*

3.4. Protokol hiperbarične oksigenacije

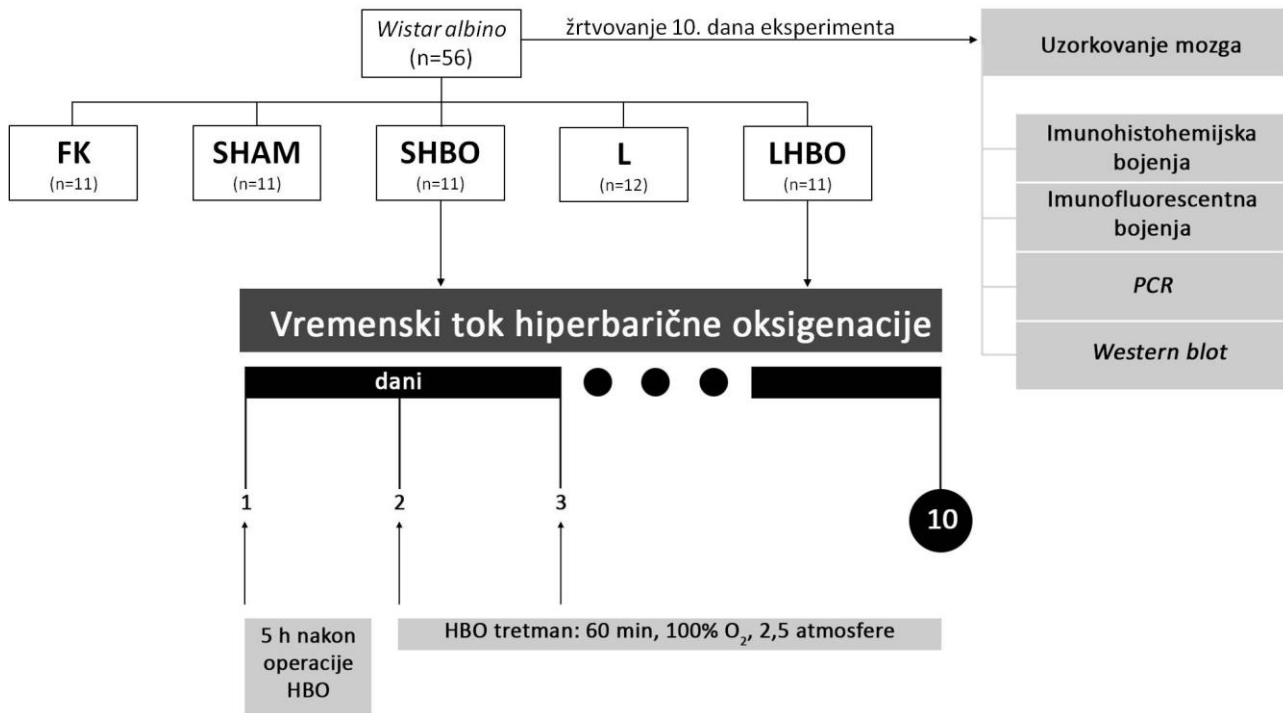
U cilju oporavka životinja i smanjenja mogućnosti nastanka barotraume bubne opne, tek 5h nakon operacije i spontanog buđenja iz anestezije, životinje su izložene prvom tretmanu u hiperbaričnoj komori (Slika 3.2). Pacovi su izlagani 100% kiseoniku u hiperbaričnoj komori za životinje (*Holywell Neopren*, Beograd, Srbija) prema protokolu: 2,5 apsolutne atmosfere (ATA) tokom 60 minuta sa periodima kompresije i dekompresije od po 10 minuta, jednom dnevno tokom 10 uzastopnih dana (Slika 3.3).



Slika 3.2. Hiperbarična komora za eksperimentalne životinje. Izgled hiperbarične komore za male i velike eksperimentalne životinje u Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan”.

3.5. Dizajn eksperimenta

Dizajn eksperimenta je prikazan na Slici 3.3. Životinje iz svih grupa žrtvovane su 10. dana eksperimenta. Izolovani su mozgovi i pripremljeni za dalje analize.

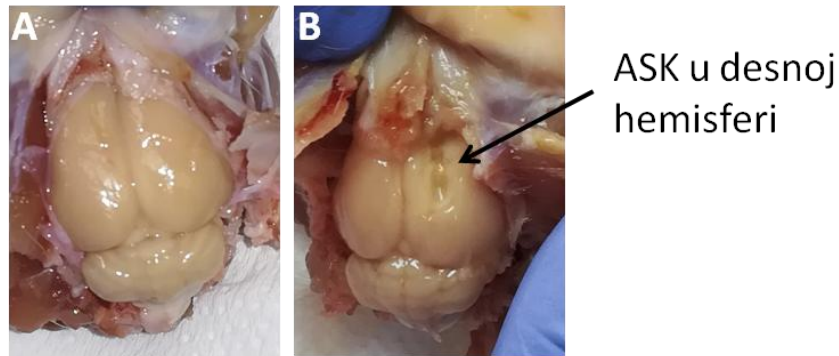


Slika 3.3. Shematski prikaz dizajna eksperimenta i vremenski tok HBO tretmana. *Wistar albino* pacovi ($n=56$) su nasumično podijeljeni u 5 grupa. FK su činile intaktne životinje, SHAM životinje kojima je napravljen rez na kosti, SHBO su SHAM životinje koje su još izložene tretmanu hiperbarične oksigenacije, L životinje kojima je izvedena sukciona ablacija senzomotornog korteksa, LHBO kao L, ali su još bile izložene tretmanu hiperbarične oksigenacije. Protokol hiperbarične oksigenacije: pacovi su izlagani 100% kiseoniku u 2,5 apsolutne atmosfere (ATA) tokom 60 minuta sa periodima kompresije i dekompresije od po 10 minuta, jednom dnevno tokom 10 uzastopnih dana. 10. dana od početka eksperimenta sve životinje su žrtvovane dekapitacijom. Nakon dekapitacije, životinjama su izolovani mozgovi, koji su dalje korišćeni za imunohistohemijska i imunofluorescentna bojenja, PCR i Western blot. Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); Sham kontrola (SK); Sham + HBO (SHBO); Lezija (L); Lezija + HBO (LHBO); hiperbarična oksigenacija (HBO); kiseonik (O₂); metoda lančane reakcije polimeraze (PCR).

3.6. Histološka analiza tkiva

3.6.1. Priprema tkiva za histološka bojenja

Nakon žrtvovanja i disekcije životinja, izolovani su celi mozgovi (Slika 3.4.), koji su potom fiksirani u 4% paraformaldehidu (PFA) tokom noći na +4 °C. Potom su dehidratirani u seriji rastvora saharoze rastuće koncentracije: 10%, 20% i 30% (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Nemačka). Na kraju, mozgovi su zamrznuti u izopentanu na -80 °C (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Nemačka) i čuvani u zamrzivaču na -80 °C do sečenja.



Slika 3.4. Izolovani mozgovi životinja nakon dekapitacije. Na slici su prikazani izolovani mozgovi lažno operisanih životinja - Sham (A) i životinja sa ASK (B). Na slici B, mesto lezije je obeleženo strelicom. Skraćenice: sukciona ablacija senzomotornog korteksa (ASK).

Na kriotomu (*Leica Instruments*, Manhajm, Nemačka) su sečeni preseci debljine 25 μm , koji su lepljeni na želatinizirane mikroskopske pločice (*Gerhard Menzel, Thermo Fisher Scientific*, Braunšvajg, Nemačka). Želatiniziranje podrazumeva potapanje pločica u 0,5% rastvor želatina (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, Misuri, SAD) u koji je dodat 0,05% hrom kalijum sulfat (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Nemačka). Pločice su sušene na sobnoj temperaturi tokom više časova, nakon čega su čuvane u zamrzivaču na -20 °C.

3.6.2. Imunohistohemijska bojenja preseka

Pre početka bojenja, pločice su tokom 20 minuta temperirane na sobnoj temperaturi. Preseci su aktivirani potapanjem pločica u 0,01 M fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline, PBS*). Sastav korišćenih pufera i rastvora dat je u Tabeli 3.2. Demaskiranje antigena je vršeno u vreloom (80 °C) citratnom puferu (pH=6) do njegovog hlađenja. Nakon ispiranja u PBS (sva ispiranja u PBS rađena su 3 puta po 5 minuta), blokirana je endogena peroksidaza potapanjem pločica u 0,3% rastvoru vodonik peroksida (*Centrohem*, Beograd, Srbija) u metanolu (*Moss Hemoss*, Beograd, Srbija) u trajanju od 20 minuta. Nakon ispiranja u PBS, pločice su inkubirane 1 sat u 5% normalnom magarećem serumu (engl. *normal donkey serum, NDS; Sigma*, Minhen, Nemačka) da bi se blokiralo nespecifično vezivanje sekundarnog antitela. Potom, pločice su inkubirane u rastvoru primarnog antitela preko noći na +4 °C. Spisak korišćenih primarnih antitela prikazan je u Tabeli 3.3. Sledećeg dana, nakon ispiranja u PBS, pločice su inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom za koje je vezan enzim peroksidaza rena (*HRP*). Spisak korišćenih sekundarnih antitela prikazan je u Tabeli 3.4. U cilju detekcije stvorenog imunokompleksa, a nakon ispiranja u PBS, na preparate je dodat 3,3'-diaminobenzidin (*DAB*;

Dako, Glostrup, Danska). HRP katalizuje konverziju hromogenog supstrata DAB u obojeni produkt čime je omogućena vizualizacija antigen-antitelo kompleksa. Reakcija je prekinuta ispiranjem u tekućoj i destilovanoj vodi, nakon čega su preseki dehidratirani po 5 min u seriji alkohola (etanol; *Moss Hemoss*, Beograd, Srbija): 70%, 96%, 100% i posvetljeni u ksilolu (*Moss Hemoss*, Beograd, Srbija). Pločice su montirane medijumom za pokrivanje (*DPX, Sigma-Aldrich*, Minhen, Nemačka). Za potvrdu specifičnosti dobijenih bojenja, korišćeni su kontrolni preseki koji su prolazili sve navedene korake, osim inkubacije u primarnom antitelu zbog čega na ovim presecima nije uočeno bojenje. Preseci su analizirani na *Carl Zeiss AxioVert* mikroskopu (*Axio Observer Microscope Z1, ZEISS*, Getingen, Nemačka).

3.6.3. Imunofluorescentna bojenja preseka

Kolokalizacija različitih ćelijskih markera je obavljena primenom dvojnog ili trojnog imunofluorescentnog bojenja. Pre početka bojenja, pločice su 20 minuta temperirane na sobnoj temperaturi. Preseci su aktivirani potapanjem pločica u 0,01 M PBS (sastav korišćenih rastvora i pufera dat je u Tabeli 3.2). Nakon demaskiranja antigena u vreloom 0,1 M citratnom puferu (pH=6) i ispiranja u PBS, nespecifično vezivanje sekundarnog antitela sprečeno je inkubacijom preparata u 5% rastvoru NDS i 0,5% Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*, Darmštadt, Nemačka) u trajanju od 1 sata. Preparati su inkubirani u primarnim antitelima tokom noći na +4 °C. Spisak korišćenih primarnih antitela prikazan je u Tabeli 3.3. Nakon ispiranja u PBS pločice su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom koje je obeleženo fluorescentnom bojom. Spisak korišćenih sekundarnih antitela je prikazan u Tabeli 3.4. Ovaj postupak, od blokiranja nespecifičnog vezivanja do inkubacije sa odgovarajućim sekundarnim antitelom, se ponavljao još jednom ili dva puta u zavisnosti da li je rađeno dvojno ili trojno imunofluorescentno bojenje. Jedra ćelija su obojena inkubacijom pločica u 4',6-diamidin-2-fenilindolu (*DAPI; Invitrogen*, Njujork, SAD) u trajanju od 25 minuta. Nakon dužeg ispiranja u PBS (6 puta po 5 minuta), preparati su pokriveni medijumom za montiranje (*Mowiol; Sigma-Aldrich*, Štajnhajm, Nemačka). Preseci su analizirani na *Carl Zeiss AxioVert* mikroskopu sa *AxioCam* monohromatskom kamerom na sledećim uveličanjima: 5x, 10x, 20x, 40x i 63x. Za Slikanja sa 63x objektivom korišćen je *ApoTome* softver. Kolokalizacija na Slikama odrađena je upotrebom *AxioVision Rel. 4.6* programa, koji ide uz *Zeiss Axiovert* mikroskop.

3.6.4. Fluoro-žad B bojenje

Za obeležavanja neurona koji su podlegli procesu degeneracije, rađeno je dvojno imunofluorescentno bojenje fluoro-žadom B (engl. *Fluoro-Jade*, FJB) i neuronskim nuklearnim antigenom (engl. *neuronal nuclear antigen*, NeuN), koji je marker većine neurona u CNS. FJB bojenje je rađeno metodom koju su uveli Schmued i Hopkins (Schmued i Hopkins, 2000). Imunofluorescentno bojenje za NeuN je rađeno na isti način kao u prethodno opisanom protokolu za imunofluorescentno bojenje. Ukratko, pločice su, nakon blokiranja nespecifičnog vezivanja sekundarnog antitela i ispiranja u PBS, inkubirane prvo u primarnom (anti-NeuN antitelu), a potom u odgovarajućem sekundarnom antitelu (spisak korišćenih primarnih i sekundarnih antitela je dat u Tabeli 3.3. i 3.4). Nakon ispiranja u vodi rađeno je FJB bojenje. Pločice su inkubirane 5 minuta u 1% rastvoru natrijum-hidroksida (NaOH), a zatim po 2 minuta u 80% rastvoru etanola, pa u destilovanoj vodi. Potom su preparati inkubirani 5 minuta u 0,06% rastvoru kalijum-permanganata (KMnO₄), nakon čega su ispirani 2 minuta u destilovanoj vodi. Neuroni u procesu degeneracije su obeleženi tokom 20 minuta inkubacije pločica u 0,0004% rastvoru FJB. Preseci su zatim ispirani u destilovanoj vodi 3 puta po 2 minuta. Pločice su 5 minuta sušene na 50 °C, prosvetljene u ksilolu i montirane sa DPX. Obojeni preseki su montirani i analizirani na *Carl Zeiss AxioVert* mikroskopu.

Tabela 3.2. Sastav rastvora i pufera korišćenih u imunohistohemijskim i imunofluorescentnim bojenjima.

Naziv	Sastav i proizvođač
4% PFA	40 g paraformaldehida (<i>Sigma-Aldrich</i> , Sent Luis, Misuri, SAD) 500 ml dH ₂ O 500 ml 0,2 M fosfatnog pufera 1 M NaOH (<i>Merck</i> , Darmštadt, Nemačka) pH 7,4
0,2 M fosfatni pufer	0,2 M NaH ₂ PO ₄ (<i>Alkaloid AD</i> , Skoplje, Makedonija) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (<i>Superlab</i> , Beograd, Srbija) pH 7,4
PBS	8,7 g NaCl (<i>Zorka Pharma-Hemija</i> , Šabac, Srbija) 50 ml 0,2 M fosfatnog pufera dopunjeno do 1 l dejonizovanom vodom
Citratni puffer	1 g limunske kiseline (<i>Lachema</i> , Neratovice, Češka) 6,10 g Tri-Na-citrata (<i>Kemika</i> , Zagreb, Hrvatska) 500 ml dH ₂ O pH 6
Rastvor moviola	9,6 g moviola (<i>Sigma-Aldrich CHEMIE</i> , Štajnhajm, Nemačka) 24 ml glicerola (<i>Sigma-Aldrich</i> , Sent Luis, Misuri, SAD)

Tabela 3.3. Primarna antitela korišćena za imunohistohemijsko (IH) i imunofluorescentno bojenje (IF) i western blot (WB).

Antitelo	Poreklo	Razblaženje	Proizvođač
DCX	koza	1:200 IH, IF 1:500 WB	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Kruz, Kalifornija, SAD
GFAP	zec	1:500 IF	<i>DAKO</i> , Glostrup, Danska
Nestin	miš	1: 100 IF	<i>Sigma Aldrich</i> , Sent Luis, Misuri, SAD
NeuN	miš	1:200 IF	<i>Milipore</i> , Burlington, Masačusets, SAD
SMI32	miš	1:1000 IF	<i>BioLegend</i> , San Dijego, SAD
MAP1b	koza	1:200 IF	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Kruz, Kalifornija, SAD
IL-10	koza	1:100 IF	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Kruz, Kalifornija, SAD
ED1	miš	1:100IF	<i>Abcam</i> , Kembridž, Masačusets, SAD
TNF- α	koza	1:100 IF	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Kruz, Kalifornija, SAD
β -tubulin	koza	1:2000 WB	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Kruz Kalifornija, SAD
TUJ1	miš	1:400 IF	<i>Abcam</i> , Kembridž, Masačusets, SAD
Ki67	zec	1:100	<i>Vector Laboratories</i> , Burlingame, Kalifornija, SAD

Tabela 3.4. Sekundarna antitela korišćena za imunohistohemijska (IH) i imunofluorescentna (IF) bojenja i western blot (WB).

Usmereno	Konjugovano sa	Poreklo	Proizvođač	Razblaženje
protiv kože	HRP	Magarac	<i>Santa Cruz</i>	1:200 IH 1:5000 WB
protiv zeca	HRP	Magarac	<i>Santa Cruz</i>	1:5000 WB
protiv miša	HRP	Magarac	<i>Dako</i>	1:3000 WB
protiv kože	Alexa Flour 488	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF
protiv kože	Alexa Flour 555	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF
protiv zeca	Alexa Flour 488	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF
protiv zeca	Alexa Flour 555	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF
protiv miša	Alexa Fluor 488	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF
protiv miša	Alexa Fluor 555	Magarac	<i>Invitrogen</i>	1:200 IF

3.6.5. Analiza mikroskopskih preparata

Kvantifikacija ćelija

Kvantifikacija obojenih ćelija nakon imunohistohemijskih i imunofluorescentnih bojenja je rađena na 3 nasumično izabrana koronalna preseka u nivou hipokampusu, tj. oko 3,5 mm kaudalno od bregme (Bregma -3,5 mm, Slika 3.5.) za svaku životinju.

Brojanje ćelija

Kvantifikacija DCX imunoreaktivnih ćelija je izvedena u subgranularnoj zoni unutrašnje i spoljašnje ivice desnog dentatnog girusa (MooN i sar., 2014) kao što je obeleženo na Slici 3.5. Ćelije su kvantifikovane na 3 preseka DG po životinji (n=6, osim u grupi L n=7).

Mikrografije su snimane mikroskopom *Carl Zeiss AxioVert (Zeiss, Gottingen, Nemačka)* pod istim uslovima na uveličanju 40x. DCX-pozitivne ćelije su ručno prebrojane od strane dva nezavisna posmatrača koji nisu znali iz koje grupe životinja preparat potiče. *ImageJ open source* softver (*National Institutes of Health, SAD; <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>*) je korišćen za utvrđivanje dužine subgranularne zone (obeležena crvenom linijom na Slici 3.5). Broj obeleženih ćelija je izražen po 1 mm dužine subgranularne zone.

Pored DCX-pozitivnih ćelija, Ki67-pozitivne i DCX/Ki67-pozitivne ćelije su, takođe, kvantifikovane duž cele subgranularne zone dentatnog girusa na 3 preseka po životinji (n=6) u svim ispitivanim grupama. Dva nezavisna posmatrača su ručno prebrojala jednostruko i dvostruko pozitivne ćelije na odgovarajućim kanalima *Adobe Photoshop Creative Cloud (version 14)*. Na osnovu prebrojanih ćelija izračunati su i prikazani procenti jednostruko i dvostruko pozitivnih ćelija.

Sa ciljem kvantifikacije Ki67-pozitivnih ćelija po vidnom polju pod uveličanjem 5x dva nezavisna posmatrača su ručno prebrojala Ki67-pozitivne ćelije u korteksu oko mesta lezije

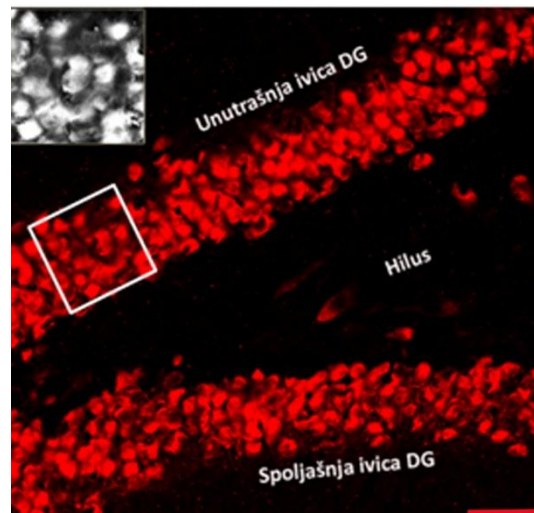
na 3 preseka po životinji (n=5) u grupama L i LHBO u *Adobe Photoshop Creative Cloud* (version 14).



Slika 3.5. Koronalni presek mozga na 3,5 mm kaudalno od bregme u nivou hipokampusa. Repräsentativna mikrografija koronalnog preseka mozga nakon imunohistohemijskog bojenja na DCX. U DG hipokampusa uočavaju se DCX pozitivne ćelije lokalizovane u SGZ. Ove ćelije su brojane posebno za spoljašnju i unutrašnju ivicu DG (obeleženo crvenom linijom). Broj ćelija je iskazan po 1 mm dužine SGZ koja je na slici označena crvenom linijom. Skala 100 μ m. Skraćenice: dabl kortin (DCX), subgranularna zona (SGZ), dentatni girus (DG).

Merenje intenziteta fluorescentnog bojenja

Neobrađene imunofluorescentne mikrografije su snimane mikroskopom *Carl Zeiss AxioVert* uvek pod istim uslovima sa objektivom uveličanja 20x. Kvantifikacija NeuN imunoreaktivnih ćelija je urađena u regionima od interesa veličine 180 x 180 piksela (Slika 3.6, umetnuti deo), koji su definisani unutar spoljašnje i unutrašnje ivice desnog dentatnog girusa, 3 preseka zone od interesa po životinji (6 životinja po grupi, osim u grupi L 7). Nakon konverzije mikrografije regiona od interesa u osmobitnu sliku, analiza je nastavljena u *ImageJ open-source* softveru. Slike su dalje korišćene za merenje gustine integrisane fluorescencije (engl. *integrated fluorescence density, IFD*). IFD je izračunat odvojeno za unutrašnju i spoljašnju ivicu dentatnog girusa.



Slika 3.6. Kvantifikacija intenziteta NeuN fluorescence. *Beli kvadrat pokazuje region od interesa čija konvertovana mikrografija u osmobaritnu sliku je prikazana kao umetni deo u levom gornjem uglu. Objašnjenje u tekstu. Skala 100 μ m. Skraćenice: dentatni girus (DG).*

Rekonstrukcija neurona

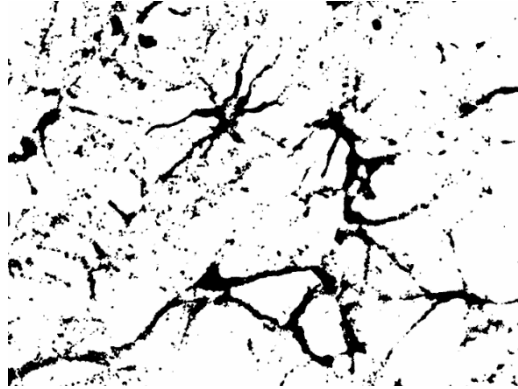
U cilju grafičke obrade pojedinačnih, odabranih neurona, koji su smešteni u subgranularnoj zoni DG uz spoljašnju ivicu granularnog sloja, napravljene su mikrografije pod uveličanjem 40x. Analizirano je ukupno 5 neurona po životinji u FK, L i LHBO grupi (n=6, osim u L grupi n=7). Mikrografije su nakon obrade u *ImageJ open-source* softveru pretvorene u binarne slike (Slika 3.7). Izbrojan je broj tačaka granjanja, broj dendritskih terminala i segmenata u cilju procene dendritske arborizacije u svakom pojedinačnom neuronu. Pretvaranja binarne slike u skeletonizovanu vršeno je uz pomoć alata, koji se zove engl. *Measure Skeleton Length* u *ImageJ open-source* softveru. Nakon pretvaranja binarne slike u skeletonizovanu uz pomoć ovog alata izmerena je ukupna dužina dendrita. Prosečna dužina segmenta je izračunata kao odnos između ukupne dužine dendrita i broja segmenata (Puškaš i sar., 2015).



Slika 3.7. Binarna slika neurona subgranularne zone dentatnog girusa. *Za analizu dendritske arborizacije, reprezentativne mikrografije neurona odgovarajućih grupa su pretvorene u binarne slike u *ImageJ open-source* softveru. Pretvaranja binarne slike u skeletonizovanu vršeno je uz pomoć *Measure Skeleton Length* u *ImageJ open-source* softveru. Određivani su sledeći parametri: broj tačaka granjanja, broj dendritskih terminala i segmenata, kao i ukupna dužina dendrita i prosečna dužina segmenta. Uveličanje 40x.*

Kvantifikacija astrocита

Kvantifikacija prosečne dužine nastavaka po astrocitu je urađena na reprezentativnim mikrografijama napravljenim pod uveličanjem 63x. Fluorescentne mikrografije GFAP-pozitivnih astrocита pretvorene su u skeletonizovane slike u *ImageJ open-source* (Marques i sar., 2023).



Slika 3.8. Reprezentativna mikrografija astrocита ispod mesta lezije u L grupi. Za analizu prosečne dužine nastavaka po astrocitu mikrografije su prvo obrađene u *ImageJ* programu primenom *MaxEntropy* algoritma, a zatim pretvorene u skeletonizovane slike. Određivana je prosečna dužina nastavaka po astrocitu. Uveličanje 63x.

3.7. Analiza genske ekspresije

3.7.1. Priprema tkiva za analizu genske ekspresije

Iz svake grupe životinja po 3 mozga je izdvojeno za analizu genske ekspresije. Nakon dekapitacije i izolacije mozгова, izolovano je moždano tkivo 2 mm oko ivica lezije i zaleđeno u tečnom azotu na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. U grupama kod kojih nema lezije (FK, SK, SHBO) izolovano je moždano tkivo sa dela korteksa koji odgovara koordinatama lezije.

3.7.2. Izolacija ribonukleinske kiseline (RNK)

Izolovani delovi tkiva su izmereni, iseckani i homogenizovani na ledu u TRIzol reagensu (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD*) u zapreminskom odnosu 1:10 (1 ml TRIzola na 100 mg tkiva). Nakon 5 minuta inkubacije u toku koje dolazi do liziranja ćelija, korišćena je fenol-hloroform metoda izolacije RNK (Rio i sar., 2010). Uzorcima je dodat hloroform (*Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija*) u zapreminskom odnosu 1:5 (0,2 ml hloroforma na 1 ml TRIzola). Uzorci su zatim centrifugirani na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 15 minuta pri brzini 12 000 x g. Dobijaju se tri faze. Donja faza sadrži DNK, srednja proteine, a gornja, vodena faza koja sadrži RNK izdvojena je u novu mikrotubu. Uzorci su vorteksovani po dodatku izopropanola (*Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija*) u zapreminskom odnosu 1:1, pa skladišteni na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom noći. Sledećeg dana su uzorci centrifugirani na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 15 minuta pri brzini 12 000 x g. Dobijeni talog sadrži RNK. Talog je dva puta po 5 minuta centrifugiran na temperaturi $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pri brzini 7 500 x g u 75% rastvoru etanola u vodi tretiranoj dietil-pirokarbonatom (DEPC, 0,0001% DEPC u dejonizovanoj vodi, autoklavirano), koji je inhibitor RNKaze. Nakon odlivanja supernatanta, talog je prosušen na vazduhu i

rastvoren u UltraPure vodi (*Invitrogen*, Njujork, SAD). Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 260 nm. Za svaki uzorak određivan je stepen čistoće pomoću odnosa apsorbanci na talasnim dužinama od 260 i 280 nm, odnosno 260 i 230 nm. Vrednosti odnosa apsorbanci između 1,8 i 2,0 ukazuju da uzorci nisu kontaminirani proteinima i drugim organskim jedinjenjima.

3.7.3. Sinteza komplementarne dezoksiribonukleinske kiseline (cDNK)

Za sintezu komplementarne DNK (cDNK) metodom reverzne transkripcije korišćen je komplet „*High Capacity cDNA Reverse Transcription*“ (*Applied Biosystems*, Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Pre reverzne transkripcije uzorci su tretirani DNazom I (*Sigma-Aldrich*, Darmštadt, Nemačka). cDNK je sintetisana prema sledećem protokolu: uzorku koji sadrži 1 µg RNK do 10 µl zapremine dodata je UltraPure voda, a do 20 µl zapremine Master Mix smeša reagenasa (Tabela 3.5). Zatim, uzorci su izlagani termalnom ciklusu: 25 °C tokom 10 minuta, 37 °C tokom 2 sata i 85 °C tokom 5 minuta.

Tabela 3.5. Sastav Master Mix smeše po uzorku.

Reagens	Zapremina (µl)
25× dNTP (100 mM)	0,8
10× nasumični prajmeri	2
Enzim <i>MultiScribe™</i> reverzna transkriptaza	1
10× pufer za reverznu transkripciju	2
UltraPure voda	4,2

3.7.4. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (real time RT-PCR)

Nivo genske ekspresije Dcx određen je na aparatu „*QuantStudio™ 3 Real-time PCR System*“ (*Applied Biosystems*, Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) u 10x razblaženim uzorcima cDNK. Naime, nivo genske ekspresije je određivan korišćenjem *SYBR Green* metode, koja se zasniva na obeležavanju umnožene ciljne sekvence u cDNK fluorescentnom bojom. Dobijeni rezultati su analizirani *QuantStudio™ Design and Analysis* softverom korišćenjem *Ct* vrednosti i vrednosti praga fluorescentnog signala. Sastav smeše uzorka je prikazan u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Sastav reakcione smeše uzorka.

Hemikalija	Zapremina (µl)
cDNK	2
QTM SYBR Green PCR Master Mix (<i>Applied Biosystem</i> , Foster City, CA, SAD)	5
UltraPure voda (<i>Invitrogen</i> , Karlsbad, CA, SAD)	2
Sense prajmer za gen od interesa (<i>Invitrogen GMBH</i> , Karlsruhe, Nemačka)	0,5
Antisense prajmer za gen od interesa (<i>Invitrogen GMBH</i> , Karlsruhe, Nemačka)	0,5

Neophodni uslovi za odvijanje lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu su: aktivacija „hot start” enzima Taq polimeraze, vezivanje prajmera za DNK, elongacija sintetisane DNK i merenje fluorescentnog signala. Aktivacija Taq polimeraze je rađena tokom 10 minuta na 95 °C i praćena je sa 40 termalnih ciklusa. Vezivanje prajmera za DNK lanac je vršeno tokom 30 sekundi na određenoj temperaturi optimalnoj za svaki prajmer. Elongacija sintetisane DNK je rađena tokom 5 sekundi na 72 °C. Merenje dobijenog florescentnog signala je izvođeno na 72 °C tokom 5 sekundi.

Lista korišćenih prajmera prikazana je u Tabeli 3.7. Nivo genske ekspresije *Dcx* je izražen u odnosu na nivo ekspresije *CycA*, kontrolnog gena čija se ekspresija nije promenila tokom eksperimentalnih procedura. Za određivanje nivoa ekspresije DCX korišćena je $2^{-\Delta Ct}$ metoda računanja. Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu urađena je za gen od interesa sa 3 uzoraka po eksperimentalnoj grupi.

Tabeli 3.7. Lista korišćenih prajmera.

Prajmer	Sekvence 5' → 3'
<i>CycA</i>	<i>f</i> AGCATGTGGTCTTTGGGAAGGTG <i>r</i> CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
<i>Dcx</i>	<i>f</i> TAAATTGTGCCCTGGCTGAC <i>r</i> TGTCATGGAAAGCCACAGAA

3.8. Detekcija proteina od interesa - *Western blot*

Za otkrivanje prisustva proteina od interesa u izolovanim uzorcima koristi se *Western blot* metoda (engl. *western blot*, WB) u kojoj je moguće da se na osnovu jačine dobijenog signala odredi nivo ekspresije praćenog proteina u različitim uzorcima/grupama.

3.8.1. Priprema tkiva za analizu ekspresije proteina

Nakon žrtvovanja i dekapitacije životinja, iz svake eksperimentalne grupe su izdvojena po 2 mozga (Zhou i sar, 2013). Za dalje analize izolovani su hipokampusi i zaleđeni u tečnom azotu na -80 °C. U grupama kojima nije urađena ASK (FK, SK, SHBO) izolovan je deo korteksa koji odgovara koordinatama lezije. Tkivo je mehanički usitnjeno i homogenizovano u 10 ml RIPA pufera, kome je dodat proteazni i fosfatazni inhibitor (*Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets*, *Thermo Scientific*, Rokfold, Illinois, SAD), a uzorci su čuvani na - 80 °C.

3.8.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku

Koncentracija proteina u homogenizovanim uzorcima hipokampusa ili korteksa prednjeg mozga je određena metodom po Pirsu (engl. *Pierce*). Ova metoda se se zasniva na osobini bicinoninske kiseline da detektuje Cu^{1+} koji nastaje redukcijom Cu^{2+} u prisustvu proteina u alkalnoj sredini. Korišćen je komercijalni set *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Rokford, Illinois, SAD). Metoda je rađena na mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarića. Reakciona smeša se sastojala od 10 μ l uzorka, 115 μ l ddH₂O i 125 μ l boje. U kontrolnim bunarićima umesto uzorka sipana je destilovana voda. Razvijanje boje se odvijalo u vodenom kupatilu na +37 °C u trajanju od 2 h. Apsorbance su očitane na *ELISA* čitaču na

talasnoj dužini od 570 nm. Standardna kriva je konstruisana na osnovu srednje apsorbance standarda goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), koji je sastavni deo komercijalnog seta. Sva preračunavanja su vršena u *Excel, MS Office*. Koncentracija proteina prisutnih u homogenizovanim uzorcima korteksa prednjeg mozga i hipokampusu svedena je na 2 µg/µl u 1% RIPA puferu, kako bi zapremine svih uzoraka, koji se nalivaju na gel, bile jednake.

3.8.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Za elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini korišćen je mini sistem za elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (*Bio-Rad Laboratories*, Herkujiz, Kalifornija, SAD). Razdvajanje je izvedeno u poliakrilamidnom gelu sa natrijumdodecil sulfatom (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*; *Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Nemačka). Korišćeni su 10% gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrovanje, čiji su sastavi prikazani u Tabeli 3.8. Uzorci su pripremljeni u 2x koncentrovanom puferu za uzorke (*2x Laemmli Sample Buffer*; *Bio Rad, Hercules*, Kalifornija, SAD) u odnosu 1:1, uz dodatak 5% β-merkaptotetanol (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Proteini su denaturisani u ključaloj vodi u trajanju od 5 min, nakon čega su jednake količine proteina nanošene na gel. U svaki od bunarića naliveno je po 20 µl uzorka (ukupno 20 µg proteina po bunariću). Kao standard za određivanje molekularne težine korišćen je obojeni marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*, Ilnus, Litvanija). Elektroforeza se odvijala pod konstantnim naponom (100 V/120 V) na sobnoj temperaturi u puferu za elektroforezu, čiji je sastav prikazan u Tabeli 3.9.

Tabela 3.8. Gelovi korišćeni u elektroforetskom razdvajanju proteina.

Naziv	Sastav	Proizvođač
Gel za koncentrovanje	30% bisakrilamid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Hajdelberg, Nemačka
	10% SDS	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	10% amonijum persulfat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	1% tetrametiletilendiamin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
Gel za razdvajanje	30% bisakrilamid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	1,5 M Tris pH 8,8	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Nemačka
	10% SDS	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	10% amonijum persulfat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
	1% tetrametiletilendiamin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka

Skraćenice: natrijumdodecil sulfat (SDS).

Tabela 3.9. Puferi i rastvori korišćeni tokom *Western blot*.

Naziv	Sastav	Proizvođač
Running pufer	192 mM glicin 25 mM Tris pH 8,3 0,1% SDS	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka <i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Nemačka <i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
Transfer pufer	20% methanol 192 mM glicin 25 mM Tris pH 8,3	<i>Moss Hemos</i> , Beograd, Srbija <i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka <i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Nemačka
TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% Tween 20 Podesiti pH 7,4	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Nemačka <i>Zorka Pharma-Hemija</i> , Šabac, Srbija <i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka
Luminol	Za 100 ml radnog rastvora: 1 ml luminola 0,44 ml p-kumarinske kiseline u DMSO 10 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5 88,6 ml Mili-Q H ₂ O	<i>Sigma-Aldrich</i> , Darmstadt, Nemačka

Skraćenice: Tris pufer sa dodatkom Tween 20 (TBST)

3.8.4. Transfer proteina sa gela na membranu

Proteini razdvojeni na osnovu molekulske mase prebacuju se na membranu. Poliviniliden-fluoridna membrana (*engl. polyvinylidene fluoride, PVDF; Merck Millipore*, Darmstadt, Nemačka) se prvo aktivira potapanjem u metanol 20 s, ispere u dejonizovanoj vodi 2 min, nakon čega se do upotrebe drži u puferu za transfer (sastav prikazan u Tabeli 3.9). Za transfer proteina je korišćen sistem *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, SAD)*. Transfer proteina se odvijao sat vremena na sobnoj temperaturi na konstantnom naponu od 100 V.

3.8.5. Imunoblot analiza

Nakon transfera koji je potvrđen bojenjem membrana u Ponceau S (*Cell Signalling Technology*, Masačusets, SAD), membrane su ispirane, 3 puta po 10 minuta, u TBST puferu (*Tris-buffer saline Tween-20*, sastav pufera naveden u Tabeli 3.9), a zatim inkubirane 1 h u rastvoru 5% BSA (*Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Nemačka). Inkubacija sa primarnim antitelima se odvijala tokom noći na +4 °C, nakon čega su membrane ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST i inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim HRP. Spisak korišćenih primarnih i sekundarnih antitela i njihova razblaženja dati su u Tabelama 3.3. i 3.4. Potom membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST i stavljene 2 minuta u radni rastvor luminola (sastav radnog rastvora Tabela 3.9.). Membrane su slikane pomoću *iBright CL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD)*.

Trake za svako antitelo su odabrane prema očekivanoj molekulske težini navedenoj u uputstvu proizvođača antitela. Kvantifikacija traka je urađena u ImageJ softveru denzitometrijskom metodom na osnovu 3 nezavisna eksperimenta. Kvantifikovani signali su

normalizovani prema optičkoj gustini signala β -tubulina. Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

3.9. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka korišćen je SPSS (engl. *Statistical Package for the Social Sciences; IBM, version 22.0, Armonk, Njujork, SAD*). Normalnost raspodele podataka testirana je upotrebom *Shapiro-Wilk* testa. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike između eksperimentalnih grupa za parametre imunohistohemijske i imunoblot analize, kao i RT-PCR u zavisnosti od broja ispitivanih grupa određena je jednostrukom *ANOVA* sa odgovarajućim *post-hoc* testom (engl. *Tukey's multiple comparison test*) i t-testom za nezavisne uzorke. Razlike unutar grupa su ispitivane upotrebom t-testa za nezavisne uzorke. Statistički značajne vrednosti su smatrane kada je $p < 0,05$, a visoko statistički značajne ako je $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

4. RESULTATI

Prema postavljenim ciljevima istraživanja ispitivan je uticaj hiperbarične oksigenacije (HBO) na aktivaciju glijskih ćelija (mikroglije i astrocita) i regenerativne procese u kortikalnom tkivu oko mesta povrede. Pored toga, ispitivan je i uticaj ablacije senzomotorne kore prednjeg mozga pacova (ASK) i HBO tretmana na procese neurogeneze u neurogenim zonama mozga adultnih pacova (SVZ, subventrikularna zona oko lateralnih komora i hipokampus).

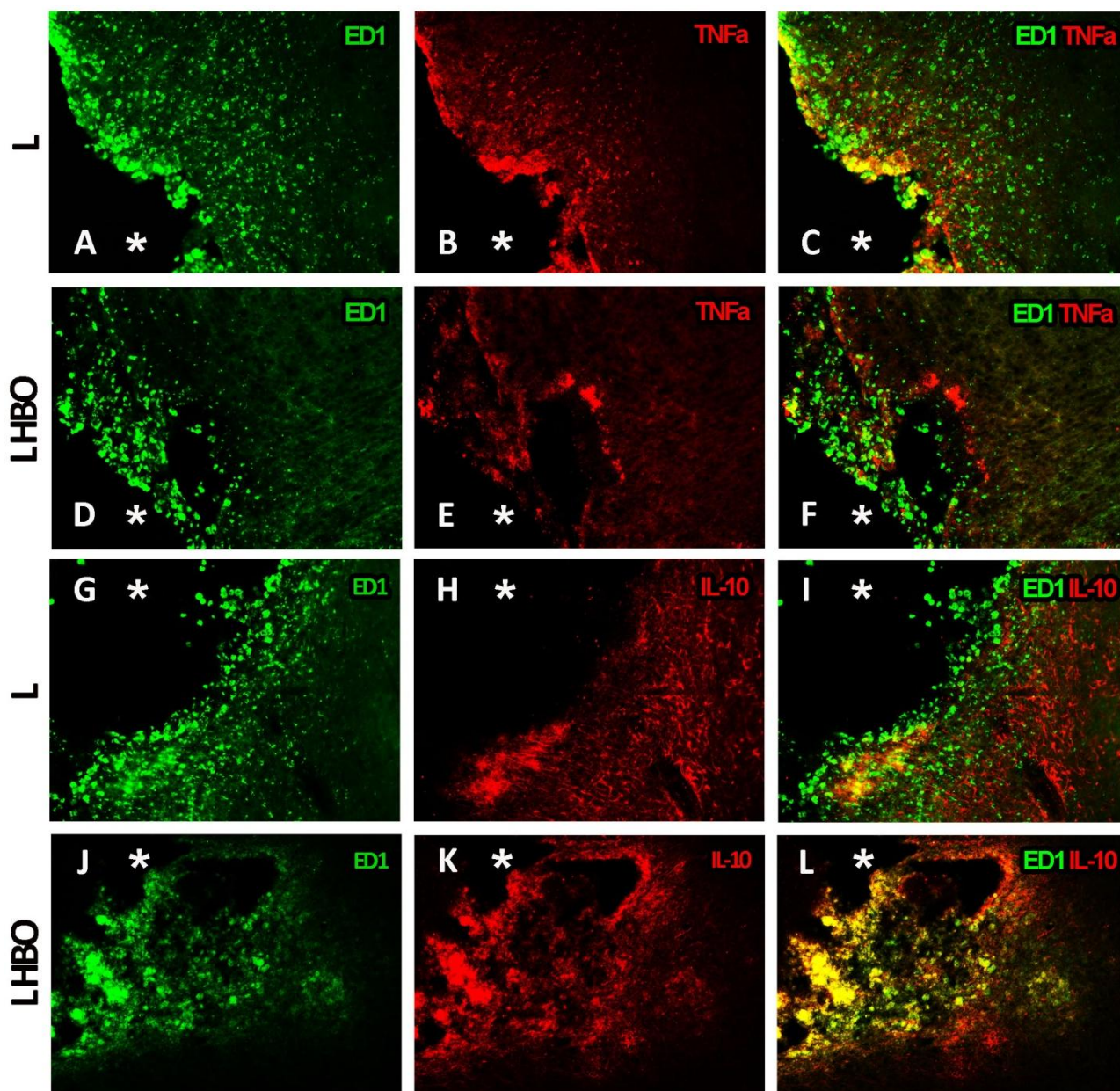
4.1. Uticaj ASK i HBO tretmana na prisustvo i aktivnost mikroglije oko mesta povrede

Za obeležavanje aktiviranih ćelija mikroglije korišćeno je antitelo ED1 (zelena fluorescencija). S obzirom da postoje dva tipa aktivirane mikroglije: proinflamatorni (M1) i antiinflamatorni (M2), identifikacija tipa aktivirane ED1-pozitivne mikroglije je urađena na osnovu ekspresije citokina TNF- α i IL-10. Naime, mikroglija koja eksprimira proinflamatorni citokin TNF- α predstavlja M1, a ona koja eksprimira antiinflamatorni citokin IL-10 predstavlja M2 tip. Promene u ekspresiji ovih markera proinflamatornog (TNF- α , crvena fluorescencija) i antiinflamatornog odgovora (IL-10, crvena fluorescencija) praćene su primenom specifičnih antitela.

4.1.1. ASK dovodi do aktivacije mikroglije oko mesta povrede dok HBO tretman podstiče promenu fenotipa mikroglije od M1 - proinflamatornog ka M2-antiinflamatornom tipu

Deset dana nakon ASK, u širokom regionu oko mesta povrede zapaža se veliki broj ED1-pozitivnih mikroglijskih ćelija (zelena fluorescencija, Slike 4.1.A,G). Bojenje na TNF- α pokazalo je prisustvo ovog citokina u korteksu, naročito oko mesta lezije (crvena fluorescencija, Slika 4.1.B). Preklapanje ispitivanih markera potvrdilo je prisustvo ED1/TNF- α -pozitivnih ćelija (žuto, Slika 4.1.C), uz samu ivicu lezije, koje pripadaju proinflamatornom M1 tipu aktivirane mikroglije. U isto vreme deset dana nakon povrede praćena je i ekspresija IL-10 (crvena fluorescencija, Slika 4.1.H). Koekspresija ED1 i IL-10 (žuto, Slika 4.1.I) pokazuje da je antiinflamatorni tip ED1/IL-10-pozitivne mikroglije prisutan oko mesta povrede, ali u manjoj meri nego proinflamatorni tip (Slika 4.1.C).

Sa druge strane, nakon 10 uzastopnih HBO tretmana na presecima mozgova životinja, koje pripadaju LHBO grupi, primećuje se da su ED1-pozitivne mikroglijske ćelije (zelena fluorescencija, Slike 4.1.D,J) uglavnom ograničene na region oko mesta povrede. Ekspresija TNF- α uočava se samo u delu korteksa, u uskom regionu oko mesta lezije (crvena fluorescencija, Slika 4.1.E). Istovremeno, zapaža se povećana ekspresija IL-10 oko mesta povrede (crvena fluorescencija, Slika 4.1.K). Prisustvo ED1/TNF- α -pozitivnih ćelija (žuto, Slika 4.1.F) bilo je zanemarljivo u odnosu na ED1/IL-10-pozitivne ćelije (žuto, Slika 4.1.L), što ukazuje na dominantno prisustvo antiinflamatornog M2 tipa mikroglije nakon HBO tretmana.



Slika 4.1. Deset uzastopnih HBO tretmana podstiče promenu polarizacije mikroglije u smeru antiinflamatornog (M2) tipa. Reprezentativne mikrografije imunofluorescentnog bojenja mikroglije (ED1, zeleno) i TNF- α (crveno) u korteksu operisanih (A-C) i LHBO (D-F) životinja, odnosno mikroglije (ED1, zeleno) i IL-10 (crveno) u korteksu operisanih (G-I) i LHBO (J-L) životinja. Čelije mikroglije deset dana nakon povrede više ekspimiraju TNF- α (ED1/TNF- α -pozitivne ćelije, žuto, C) u odnosu na IL-10 (ED1/IL-10-pozitivne ćelije, žuto, I), što govori u prilog polarizacije mikroglije u smeru M1 (proinflamatornog tipa). Nakon HBO tretmana, dominantno je prisustvo M2 antiinflamatornog tipa (ED1/IL-10-pozitivne ćelije, žuto, L) u odnosu na M1 proinflamatorni tip (ED1/TNF- α -pozitivne ćelije, žuto, F). * - mesto lezije. Uveličanje 10x. Skraćenice: lezija (L); lezija+HBO (LHBO).

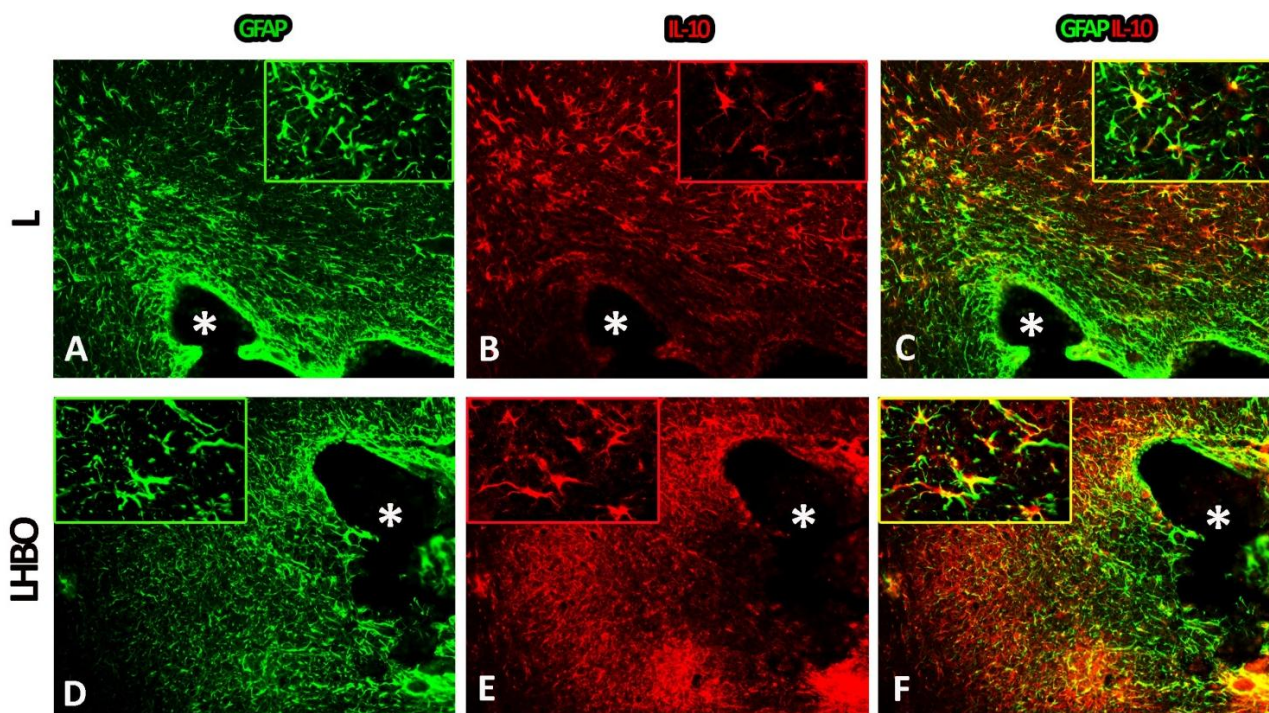
4.2. Uticaj ASK i HBO tretmana na fenotip i morfologiju astrocita oko mesta povrede

Za proučavanje morfologije astrocita, rađeno je fluorescentno bojenje sa antitelima na GFAP (marker astrocita, zelena imunofluorescencija). U fiziološkim uslovima u korteksu velikog mozga prisutni su protoplazmastični astrociti malog ćelijskog tela i brojnih, tankih citoplazmatskih nastavaka. Nakon povrede mozga dolazi do astroglioze, astrociti postaju reaktivni i menjaju morfologiju, povećavaju telo, a nastavci su im zadebljali. Imajući u vidu da reaktivni astrociti mogu da ispolje dva fenotipa: A1 (neurotoksični) i A2 (neuroprotektivni), u ovom istraživanju identifikacija tipa astrocita je urađena na osnovu prisutne ekspresije antiinflamatornog citokina IL-10 (marker A2 tipa astrocita, crvena imunofluorescencija).

4.2.1. HBO tretman podstiče polarizaciju astrocita u smeru antiinflamatornog A2 fenotipa astrocita nakon ASK

Desetog dana nakon ASK oko mesta povrede uočava se astroglioza i prisustvo mnogobrojnih reaktivnih astrocita, koji pojačano ekspimiraju GFAP (Slika 4.2.A,C). Morfologija ovih ćelija je promenjena u odnosu na protoplazmastične astrocite u kontrolnoj grupi. Naime, reaktivni astrociti su ćelije velikog tela i zadebljelih nastavaka (Slika 4.2.A,C). Dvojno fluorescentno bojenje sa antitelima na GFAP i antiinflamatorni citokin IL-10 (Slika 4.2.C) pokazalo je da su oko mesta lezije prisutni GFAP-pozitivni, IL-10-negativni astrociti (Slika 4.2.A-C), dok su astrociti dalji od mesta povrede bili GFAP/IL-10-pozitivni (Slika 4.2.A-C insert). Astrociti u L grupi, neposredno uz mesto povrede, imaju pretežno proinflamatorni fenotip. Neposredno ispod mesta lezije astrociti su organizovani u vidu astroglijalnog ožiljka, koji predstavlja kompaktnu granicu oko mesta povrede. Ovi astrociti su izduženi, isprepletanih nastavaka i postavljeni paralelno u odnosu na samu leziju. Sa udaljavanjem od mesta lezije astrociti pokazuju razgranatu morfologiju (Slika 4.2.A) i povećavaju ekspresiju IL-10 (Slika 4.2.B,C).

Sa druge strane deset HBO tretmana nakon ASK daje drugačiju sliku. GFAP bojenje pokazuje prisustvo brojnih reaktivnih astrocita oko mesta povrede (Slika 4.2.D), ali su ove ćelije razgranate, zvezdaste morfologije. Takođe, uočena je jača imunoreaktivnost na IL-10 u širokom regionu oko mesta lezije (Slika 4.2.E). Dominantno je prisustvo astrocita koji ispoljavaju antiinflamatorni GFAP/IL-10-pozitivni fenotip (žuto, Slika 4.2.F). Dobijeni rezultati ukazuju da HBO tretman menja morfologiju astrocita uočenu u glijalnom ožiljku kod L grupe, kao i da podstiče polarizaciju astrocita u smeru antiinflamatornog, A2 tipa.



Slika 4.2. HBO tretman favorizuje A2 tip astrocita nakon ASK. *Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja astrocita (GFAP, zeleno) i IL-10 (crveno) u korteksu operisanih (A-C) i LHBO tretiranih (D-F) životinja. GFAP-pozitivni astroцити око места lezije u grupama lezija (A) i LHBO (D). Razlikovanje neurotoksičnog (A1) od neuroprotektivnog (A2) tipa astrocita je vizualizovano pomoću IL-10 u grupama L (B) i LHBO (E). Koekspresija oba markera je pokazala da je A2 tip astrocita dominantno prisutan na presecima životinja koje pripadaju LHBO grupi. Na većem uveličanju (insert), primećuju se morfološke razlike astrocita u L i LHBO grupi. * - mesto lezije. Uveličanje: 10x, insert 63x. Skraćenice: lezija (L); lezija+HBO (LHBO).*

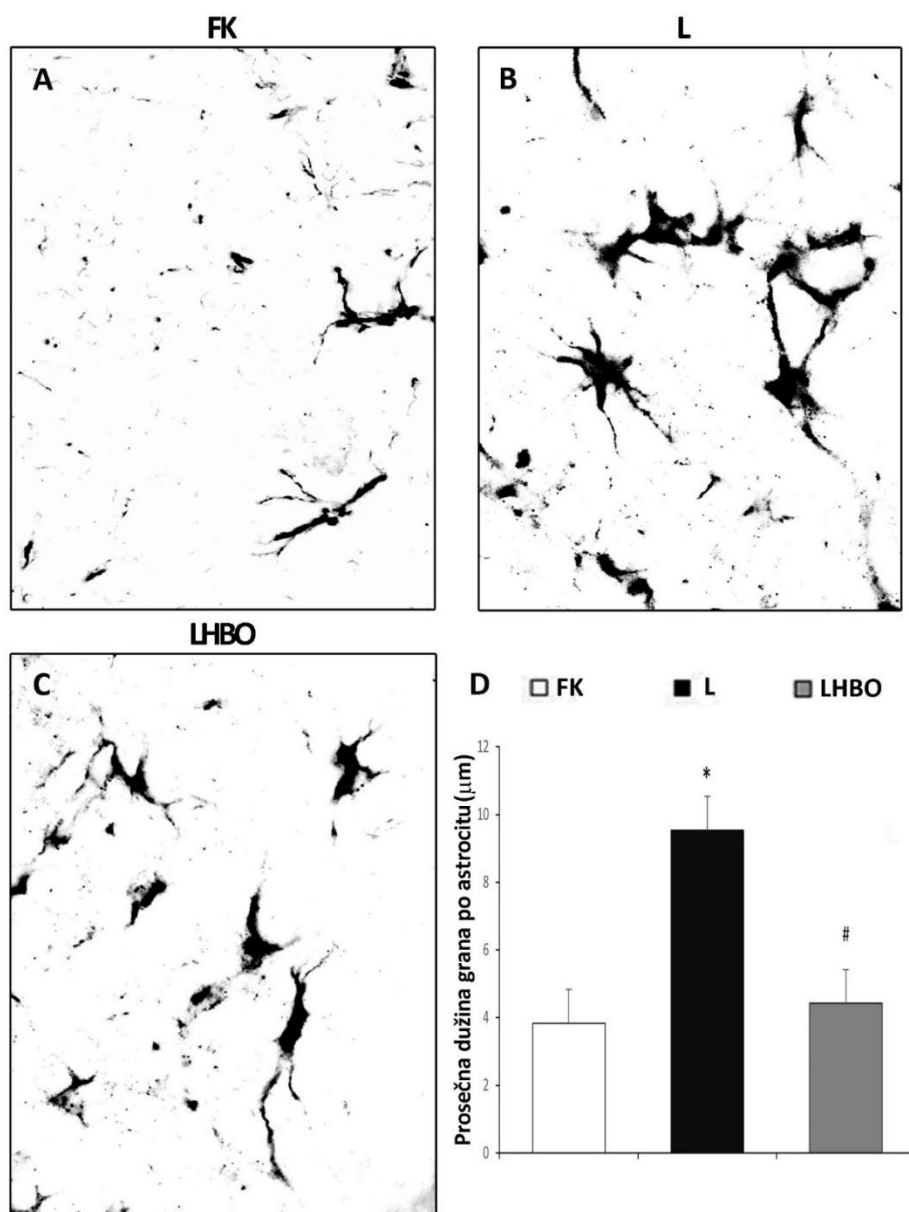
4.2.2. Morfometrijska analiza astrocita

S obzirom da su uočene razlike u morfologiji astrocita u ovim grupama, morfometrijskom analizom određena je prosečna dužina nastavaka po astrocitu.

Protoplazmatični astroцити u kontrolnoj grupi se karakterišu mirujućom morfologijom, imaju malo telo i tanke, razgranate nastavke (Slika 4.3.A). Nasuprot tome, reaktivni astroцити prisutni u glijalnom ožiljku u L grupi imaju veliko telo i jako dugačke, debele nastavke (Slika 4.3.B). Sa druge strane, reaktivni astroцити LHBO grupe (Slika 4.3.C) imaju manja tela u odnosu na reaktivne astroците L grupe, a veća tela u odnosu na astroците koji pripadaju kontrolnoj grupi. Takođe, astroцити LHBO grupe imaju razgranatije nastavke, koji po dužini podsećaju na astroците kontrolne grupe.

Kvantifikacija dobijenih rezultata za prosečnu dužinu nastavaka astrocita prikazana je na grafiku (Slika 4.3.D). U poređenju sa FK ($3,83 \pm 1,20 \mu\text{m}$, beli stubić), ASK je izazvala statistički značajan ($p < 0,001$) porast (za 59,81%) u prosečnoj dužini nastavaka po astrocitu ASK ($9,53 \pm 2,10 \mu\text{m}$, crni stubić). Reaktivni astroцити u LHBO grupi imaju statistički značajno manje vrednosti ($4,42 \pm 1,92 \mu\text{m}$, sivi stubić) prosečne dužine nastavaka po astrocitu u odnosu na reaktivne astroците u L grupi. Sa druge strane, ne postoji statistički značajna razlika vrednosti prosečne dužine nastavaka po astrocitu između FK i LHBO grupe ($p = 0,764$).

Ovi podaci ukazuju da HBO tretman sprečava značajno menjanje morfologije astrocita nakon ASK.



Slika 4.3. HBO tretman omogućava očuvanje morfologije astrocita nakon ASK. Reprezentativne mikrografije GFAP-pozitivnih astrocita u korteksu na koronalnim presecima kontrolnih (A), operisanih (B) i HBO tretiranih (C) životinja. (D) Kvantifikacija prosečne dužine nastavaka astrocita pokazala je promenu morfologije ovih ćelija nakon ASK. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom (* $p < 0,001$ FK vs. L, # $p < 0,001$ LHBO vs. L). Uveličanje 63x. Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); lezija+HBO (LHBO).

4.3. Uticaj ASK i HBO tretmana na procese neurogeneze i neuroregeneracije oko mesta povrede i u SVZ

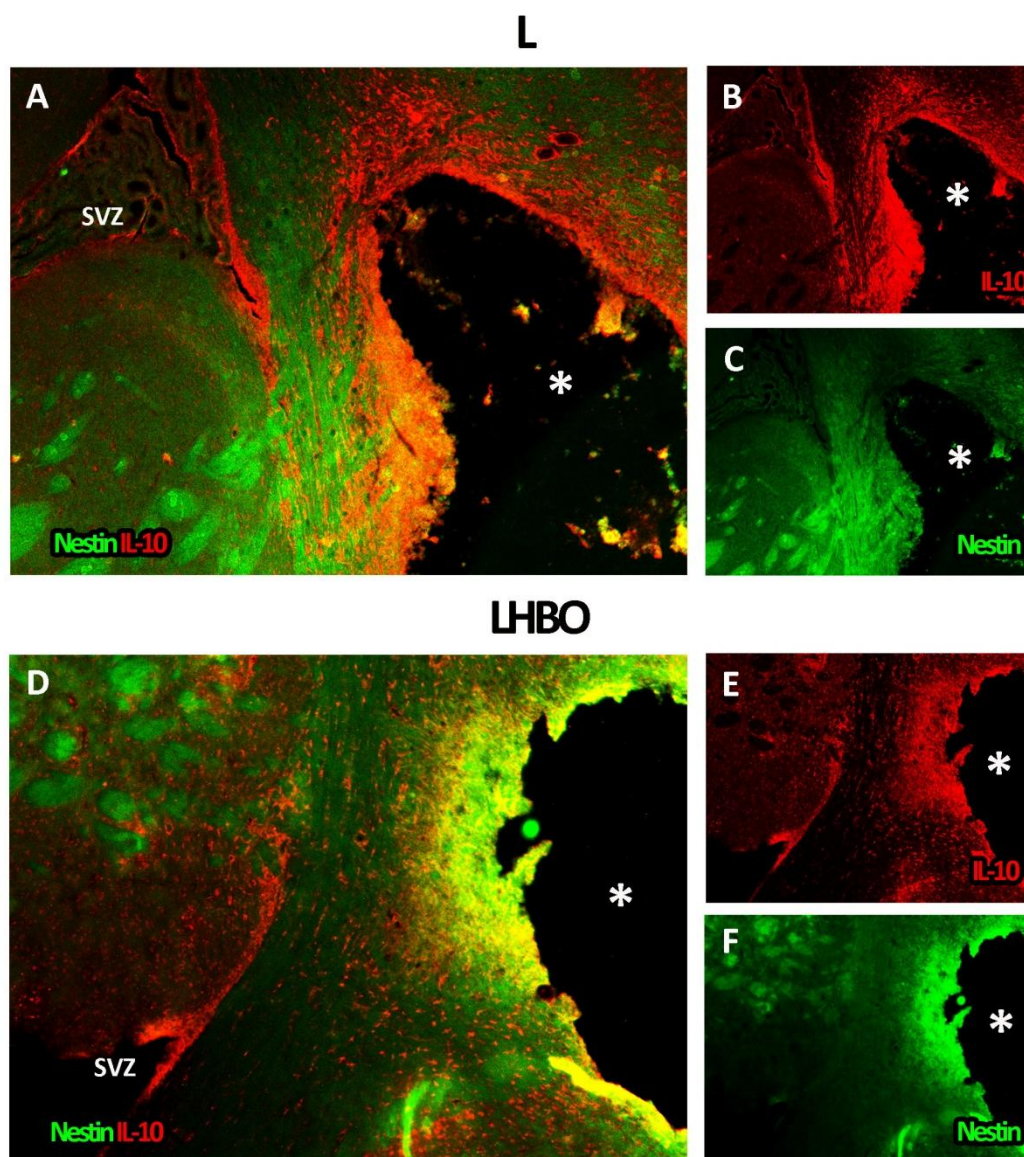
4.3.1. Neuralni odgovor na HBO tretman nakon ASK

Da bismo ispitali neuralni odgovor na 10 sukcesivnih HBO tretmana nakon ASK, koristili smo nestin (zelena florescencija), marker neuralnih stem ćelija (NSC) i IL-10 (crvena florescencija), za koji je pokazano da, osim toga što je antiinflamatorni citokin, reguliše i proces adultne neurogeneze. Pratili smo ekspresiju navedenih markera u delu korteksa oko mesta povrede, kao i u SVZ lateralnih komora (mesto adultne neurogeneze).

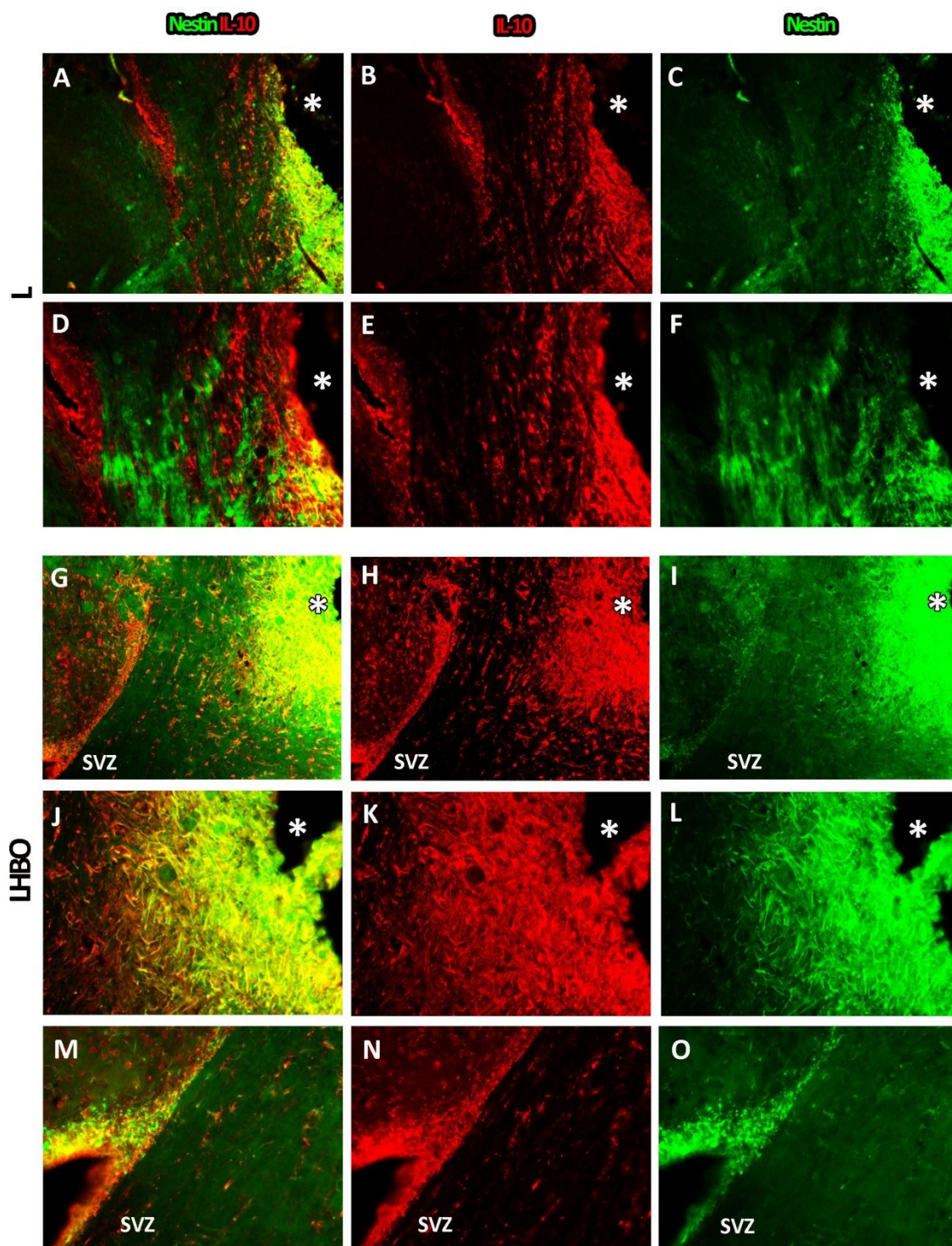
Kao što je i prethodno pokazano, ASK povećava ekspresiju IL-10 oko mesta povrede (Slika 4.4.B). Takođe je uočena i ekspresija nestina u istom regionu (Slika 4.4.C). Koekspresijom ovih markera pokazano je prisustvo brojnih nestin/IL-10-pozitivnih ćelija u korteksu oko mesta lezije (Slika 4.4.A). U isto vreme, u SVZ prisutan je veliki broj IL-10-pozitivnih, ali nestin-negativnih ćelija. (Slika 4.4.A-C).

Tretman HBO nakon ASK povećava ekspresiju i IL-10 (Slika 4.4.E) i nestina (Slika 4.4.F), kao i broj nestin/IL-10-pozitivnih neuralnih stem ćelija oko mesta lezije u odnosu na L grupu. U SVZ uočava se ekspresija IL-10 (Slika 4.4.E) i nestina (Slika 4.4.F). Rostralni migratorni put (RMP), koji se sastoji od nestin/IL-10-pozitivnih ćelija se proteže od SVZ do mesta lezije (Slika 4.4.D-F).

Na većem uveličanju se posebno dobro vidi da nakon HBO (Slika 4.5.G-L), dolazi do povećane koekspresije nestina i IL-10 oko mesta lezije u odnosu na L grupu (Slika 4.5.A-F). Povećan broj nestin/IL-10-pozitivnih neurona prisutan je u i subventrikularnoj zoni u LHBO grupi (Slika 4.5.M-O). Takođe, u LHBO grupi se primećuje povećano prisustvo pojedinačnih neuralnih stem ćelija, koje su nestin/IL-10-pozitivne, između RMP i mesta lezije (Slika 4.5.G,M) u odnosu na L grupu (Slika 4.5.A,D) što ukazuje da tretman sa HBO nakon ASK može da podstakne endogene NSC da migriraju u region oko mesta povrede, kao i da IL-10 ima značajnu ulogu u regulaciji ovog procesa.



Slika 4.4. HBO dovodi do povećane ekspresije IL-10 i nestina oko mesta lezije i u subventrikularnoj zoni (SVZ). Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nestina (zeleno) i IL-10 (crveno) u korteksu operisanih (A-C) i LHBO tretiranih (D-F) životinja. (A-C) IL-10-pozitivne i nestin-negativne neuralne stem ćelije prisutne su u SVZ nakon ASK. Takođe, oko mesta lezije nakon ASK prisutan je veliki broj i nestin/IL-10-pozitivnih ćelija. (D-F) Tretman HBO nakon ASK povećao je broj nestin/IL-10-pozitivnih neuralnih stem ćelija oko mesta lezije i u SVZ. Nestin/IL-10-pozitivne ćelije formiraju migratorni put, koji se proteže od SVZ do mesta lezije. * - mesto lezije. Uveličanje 10x. Skraćenice: lezija (L); lezija+HBO (LHBO), SVZ (subventrikularna zona).



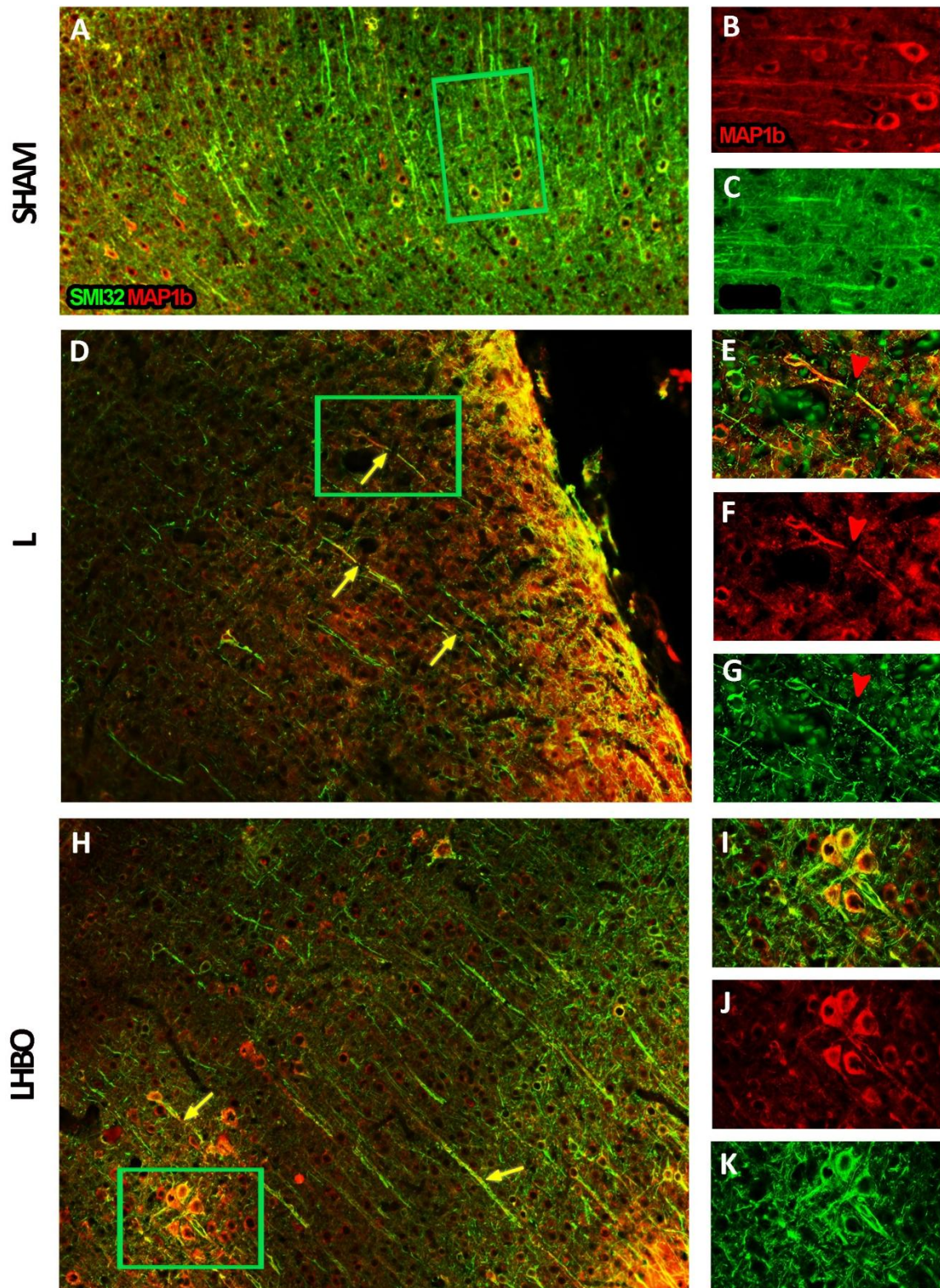
Slika 4.5. Hiperbaričnom oksigenacijom podstaknut neuralni odgovor nakon AKS. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nestina (zeleno) i IL-10 (crveno) u korteksu operisanih (A-F) i LHBO tretiranih (G-O) životinja. Povećano prisustvo nestin/IL-10-pozitivnih neurona oko mesta lezije (G-L) u odnosu na L grupu (A-F). U LHBO grupi je povećana koekspresija nestina i IL-10 u subventrikularnoj zoni (M-O). Nasuprot L grupi (A,D), u LHBO grupi se primećuje povećano prisustvo pojedinačnih nestin/IL-10-pozitivnih neuronalnih stem ćelija između rostralnog migratornog puta i mesta lezije (G,M). * - mesto lezije. Uveličanje: 20x (A-C,G-I), 40x (D-F, J-O). Skraćenice: subventrikularna zona (SVZ).

4.3.2. Hiperbarična oksigenacija dovodi do regeneracije povredom oštećenih neurofilamenata

Za ispitivanje citoskeletnih promena u neuronima nakon ASK i HBO tretmana koristili smo imunofluorescentno bojenje na nefosforilisane lance neurofilamenata (marker SMI32) (obeležava ćelijska tela neurona i dendrite prvenstveno piramidalnih neurona III, V i VI sloja korteksa). Takođe, koristili smo i protein povezan sa mikrotubulama (*engl. Microtubule-Associated Protein 1b*, MAP1b), za koji se zna da je neophodan za razvoj i regeneraciju aksona.

Među kontrolnim grupama nisu bile primećene razlike nakon primenjenog dvojnog bojenja citoskeletnih proteina. Za poređenje sa promenama uočenim u L i LHBO grupi prikazani su rezultati SHAM kontrolne grupe životinja. U kontroli bojenje na SMI32 uočavaju se tanka, ravna vlakna u neuritima i tanak sloj oko tela nervnih ćelija (zelena fluorescenca, Slika 4.6.A,C). Isti obrazac bojenja pokazan je i sa MAP1b (crvena fluorescenca, Slika 4.6.A,B).

Nakon povrede dolazi do oštećenja i fragmentacije aksona neurona (Slika 4.6.D-G, strelice). Na presecima je prisutan prekid kontinuiteta aksona (Slika 4.6.E-G, glava stelice). Sa druge strane, pod uticajem HBO primećeno je smanjeno oštećenje aksona i prisustvo regeneracije nastavaka (Slika 4.6.H-K, strelice). Takođe, nakon HBO tretmana uočen je povećan broj MAP1b/SMI32-pozitivnih ćelija (Slika 4.6.H, I).

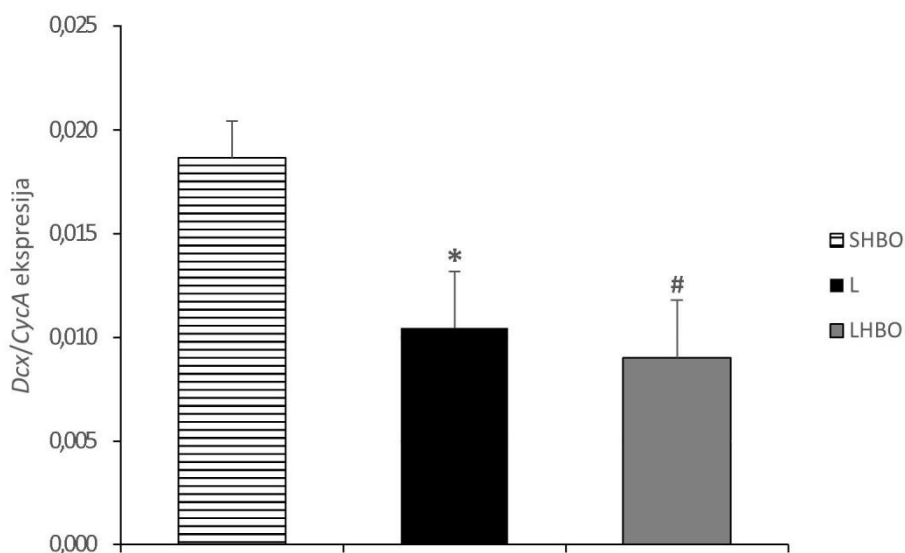


Slika 4.6. HBO dovodi do regeneracije povredom oštećenih nastavaka neurona. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja SMI32 (zeleno) i MAP1b (crveno) u korteksu kontrolnih (A-C), operisanih (D-G) i LHBO tretiranih (H-K) životinja. (A-C) Ekspresija SMI32 i MAP1b u neuritima i ćelijskim telima neurona u korteksu SHAM životinja. (D) Deset dana nakon povrede oko mesta lezije uočavaju se neuroni sa oštećenim aksonima (strelice) i narušen kontinuitet aksona (E-F). (H-K) Deset sukcesivnih HBO tretmana smanjuje oštećenja nastavaka. Pravougaonici na slikama D i H obeležavaju mesta prikazana na većem uveličanju.

Uveličanje: 20x (A-D, H), 40 (E-G, I-K). Skraćenice: lezija (L); lezija+HBO (LHBO); SHAM kontrola (SHAM).

4.3.3. Ekspresija *Dcx* gena nakon 10 uzastopnih tretmana hiperbaričnom oksigenacijom

U cilju ispitivanja procesa neurogeneze u korteksu nakon HBO tretmana ispitivana je ekspresija *Dcx*, markera adultne neurogeneze (Grafikon 4.1). Kako prilikom imunohistohemijskih i imunofluorescentnih analiza nije uočena razlika između kontrolnih grupa, sva genska ispitivanja su urađena u odnosu na SHBO kontrolnu grupu. Ekspresija *Dcx* gena je statistički značajno manja u eksperimentalnim grupama u odnosu na SHBO (* $p < 0,05$ SHBO vs. L, # $p < 0,05$ SHBO vs. LHBO). U LHBO grupi nije pokazana statistički značajna razlika u ekspresiji gena od interesa u odnosu na L grupu desetog dana nakon povrede ($p = 0,860$).



Grafikon 4.1. Ekspresija *Dcx* gena u ispitivanim grupama. Ekspresija *Dcx* je smanjena u L i LHBO grupi u odnosu na SHBO. Statistički značajna razlika između kontrolnih grupa i eksperimentalnih (* $p < 0,05$ SHBO vs. L, # $p < 0,05$ SHBO vs. LHBO). Skraćenice: dabl kortin (DCX); SHAM kontrola (SHAM); Lezija (L); lezija+HBO (LHBO).

4.3.4. HBO tretman povećava proliferaciju ćelija i maturaciju nezrelih neurona nakon povrede mozga

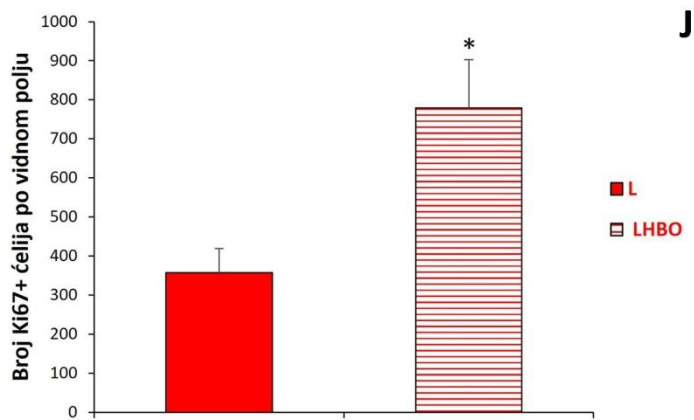
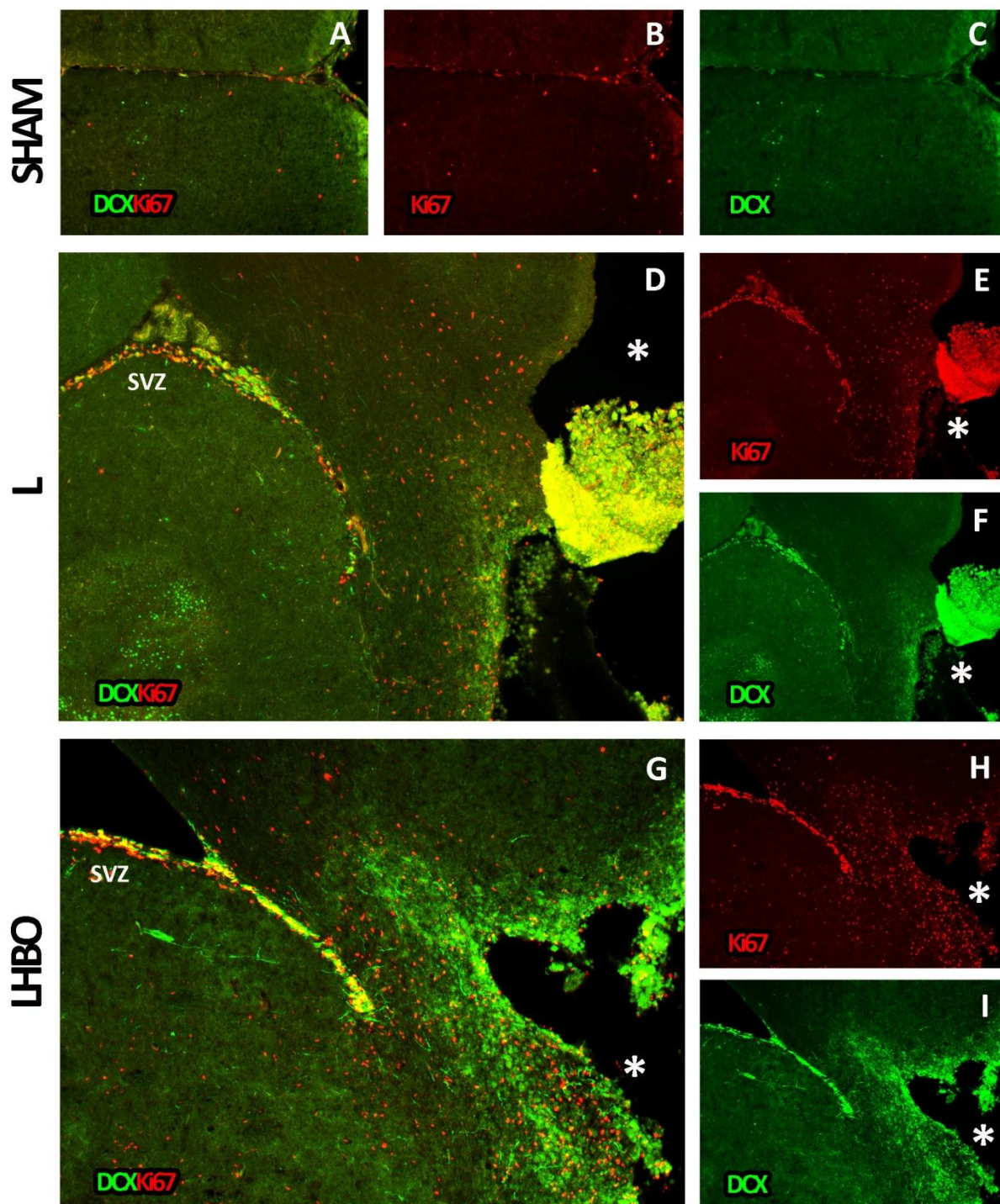
Da bismo kvantifikovali broj ćelija koje proliferiraju koristili smo marker proliferacije Ki67 (crvena fluorescencija), a za vizualizaciju neuroblasta dvojno smo obojili ove preparate koristeći uz Ki67 i marker DCX (zeleno fluorescencija).

Budući da kod sve tri kontrolne grupe: FK, SHAM i SHBO nije bilo razlike u ekspresiji DCX proteina, prikazani su rezultati samo za SHAM grupu, koja je korišćena kao kontrola i u analizi ekspresije *Dcx* gena. U korteksu se uočavaju samo sporadične DCX-pozitivne (zeleno fluorescencija, Slika 4.7. A,C) i Ki67-pozitivne ćelije (zeleno fluorescencija, Slika 4.7. B,C).

ASK povećava proliferaciju ćelija u korteksu oko mesta povrede (crvena fluorescencija, Slika 4.7.D,E). Takođe, u korteksu životinja L grupe prisutne su i brojne DCX-pozitivne ćelije

oko mesta lezije (zelena fluorescenca, Slika 4.7.D,F). Preklapanje ova dva markera najveće je u SVZ i RMP.

U LHBO grupi dolazi do povećanja ukupnog broja Ki67-pozitivnih ćelija (crvena fluorescenca, Slika 4.7.G,H) u odnosu na L grupu što je pokazano i kvantifikacijom broja ćelija u ove dve eksperimentalne grupe. Naime, HBO tretman statistički značajno povećava broj Ki67-pozitivnih ćelija (778.8 ± 123.94) (L vs. LHBO $p < 0,001$), dvostruko u odnosu na broj ćelija uočen u L grupi ($357,6 \pm 61.17$) (Slika 4.7.J). Ove ćelije mogu odgovarati mikroglijji, astrocitima i neuroblastima. Praćenje DCX imunofluorescence pokazalo je povećanu ekspresiju ovog proteina u ispitivanim regionima (zelena fluorescenca, Slika 4.7.G,I). Preklapanje korišćenih markera (Ki67/DCX-pozitivne ćelije) je najviše uočljivo u SVZ i migratornom putu, što govori u prilog postojanju neuroblasta u tom regionu (žuto, Slika 4.7. G).



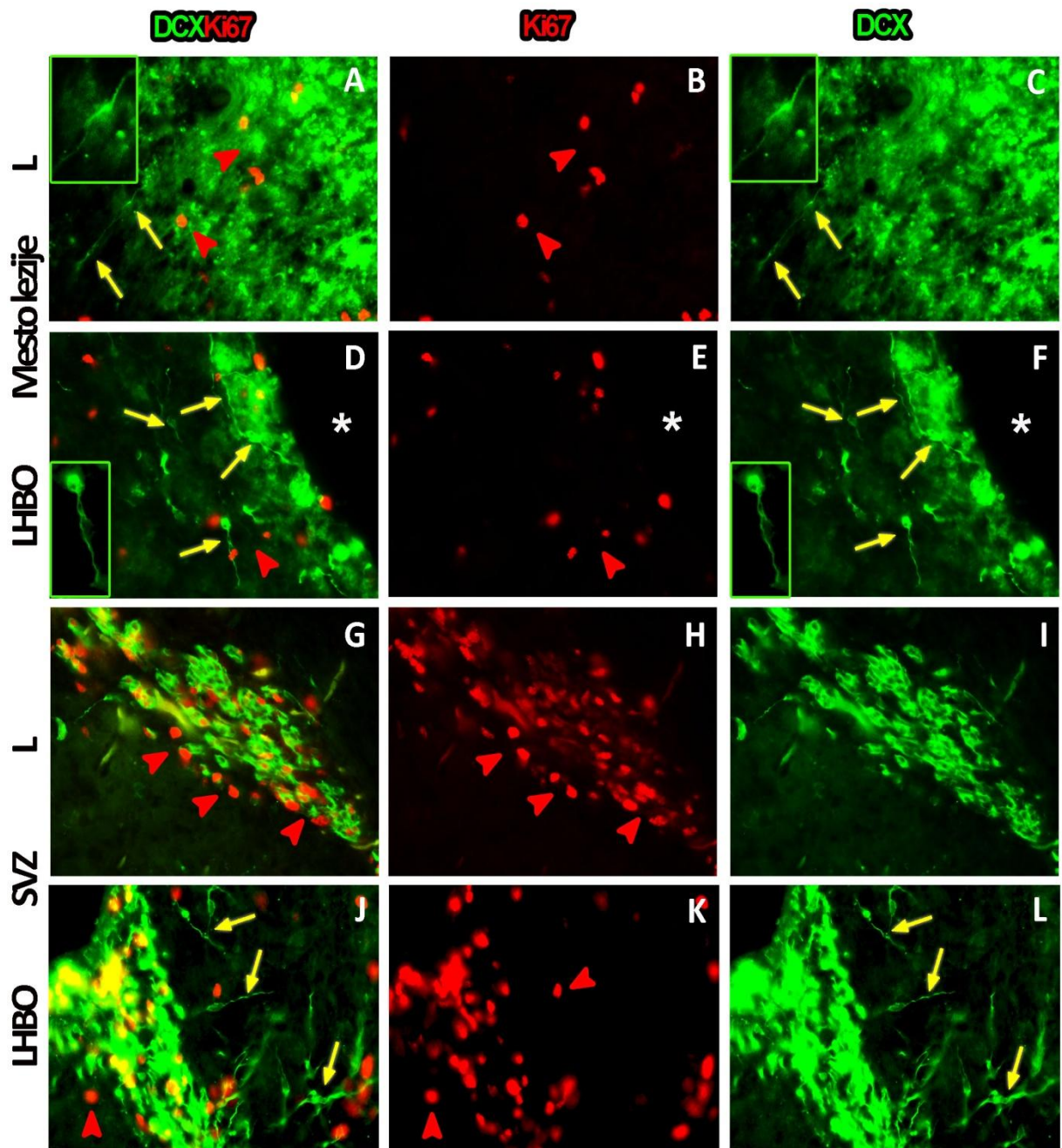
Slika 4.7. Efekat ASK i HBO tretmana na broj Ki67- i DCX-pozitivnih ćelija u korteksu i SVZ. Reprezentativne mikrografije imunofluorescentnog bojenja DCX (zeleno) i Ki67 (crveno) kod kontrolnih (A-C), operisanih (D-F) i LHBO tretiranih (G-I) životinja. (A-C) U kontrolnim grupama uočeno je prisustvo malog broja neuroblasta. (D-F) ASK povećava broj Ki67-pozitivnih ćelija u korteksu oko mesta lezije gde se uočavaju DCX-pozitivne i Ki67-pozitivne ćelije. (G-I) U LHBO grupi dolazi do povećanja broja Ki67-pozitivnih ćelija u odnosu na L grupu. Pored toga, u širokom regionu oko mesta povrede zapaža se izrazito povećanje DCX imunoreaktivnosti. Preklapanje Ki67 sa DCX imunofluorescencom (žuto) je dominantno u SVZ i migratornom putu, kao i oko mesta povrede. (J) Nakon HBO tretmana dolazi do statistički značajnog dvostrukog povećanja broja Ki67-pozitivnih ćelija (L vs. LHBO $p < 0,001$) u odnosu na broj ćelija koji je uočen u L grupi. * - mesto lezije. Uveličanje 5x. Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); lezija+HBO (LHBO); rostralni migratorni put (RMP); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO), subventrikularna zona (SVZ).

Budući da u korteksu kontrolnih grupa životinja nisu primećene DCX/Ki67-pozitivne ćelije u daljoj analizi poređenje je rađeno između L i LHBO grupe.

Na većem uveličanju oko mesta povrede nakon ASK se uočava mali broj DCX-pozitivnih, mladih, bipolarnih neurona (Slika 4.8.A,C, strelice) sa malim telima i tankim nastavcima (Slika 4.8.A,C, insert). Nakon HBO tretmana broj ovih DCX-pozitivnih mladih unipolarnih i bipolarnih neurona oko mesta lezije se značajno povećava (Slika 4.8.D,F, strelice). Ovi neuroni imaju mnogo krupnija tela i duže nastavke (Slika 4.8.D,F, insert).

U SVZ nakon ASK na početku migratornog puta uočava se veliki broj okruglih progenitorskih ćelija koje su gusto napakovane u „grozdastu“ strukturu (Slika 4.8.G-I). Neki od ovih progenitora su samo DCX-pozitivni (zeleno), a neki su DCX/Ki67-pozitivni (žuto), dok je veći broj njih samo Ki67-pozitivan (crveno, Slika 4.8.G-I, crveni vrh strelice). Nakon 10 HBO tretmana u SVZ na početku migratornog puta (Slika 4.8.J-L) broj progenitora koji su DCX/Ki67-pozitivni (žuto) je povećan. Međutim, ono što je posebno važno zapažanje je da se već na samom početku puta uočava veliki broj mladih DCX-pozitivnih neurona (zeleno), koji se odvajaju od puta. Većina od njih je unipolarna, ali ima i bipolarnih, pa čak i multipolarnih (Slika 4.8.J,L, strelice).

Dobijeni rezultati ukazuju da HBO tretman ne samo da povećava proliferaciju ćelija, već povećava neurogenezu oko mesta povrede i ubrzava maturaciju progenitora neurona u SVZ i migratornom putu od SVZ do mesta povrede.



Slika 4.8. HBO tretman povećava broj nezrelih neurona oko mesta povrede i ubrzava njihovu maturaciju u SVZ. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja DCX (zeleno) i Ki67 (crveno) kod operisanih (A-C, G-I) i LHBO tretiranih (D-F, J-L) životinja. (A-C) Nakon ASK u korteksu se uočava prisustvo DCX-pozitivnih, bipolarnih neurona manje veličine (strelice, insert). (D-F) Nakon HBO tretmana prisutno je više mladih DCX-pozitivnih unipolarnih i bipolarnih neurona (strelice). (G-I) U SVZ, nakon ASK, prisutne su gusto napakovane okrugle progenitorske ćelije. Jedan deo ovih progenitora je samo DCX-pozitivan (zeleno), drugi DCX/Ki67-pozitivan (žuto), a najveći deo samo Ki67-pozitivan (crveni vrh strelice). (J-L) Nakon 10 HBO tretmana povećano je prisustvo DCX/Ki67-pozitivnih (žuto) progenitora. U LHBO grupi prisutni su mladi DCX-pozitivni neuroni (zeleno, J,L), koji se odvajaju od RMP. Uveličanje: 40x. Skraćenice: lezija (L); lezija+HBO (LHBO).

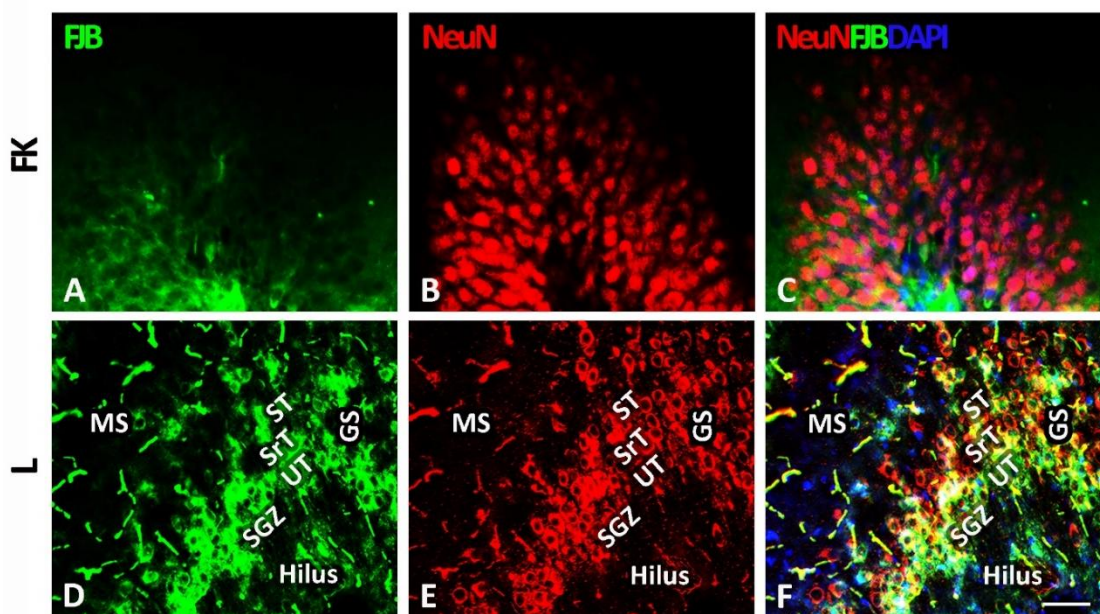
4.4. Uticaj ASK i HBO tretmana na adultnu neurogenezu u hipokampusu

4.4.1. ASK dovodi do degeneracije neurona u granularnom sloju DG hipokampusa

Da bismo okarakterisali smrt neurona u DG i odredili lokaciju ćelija koje podležu degeneraciji, koristili smo dvostruko imunofluorescentno bojenje za FJB (marker degenerisanih neurona; Slika 4.9.A,D – zelena fluorescencija) i NeuN (marker zrelih neurona; Slika 4.9.B,E – crvena fluorescencija). S obzirom da je granularni sloj DG podeljen na trećine: spoljašnju (ST), srednju (SrT) i unutrašnju (UT), ispod koje je subgranularna zona gde se nalaze neuralne stem ćelije, pratili smo uticaj ASK na degeneraciju neurona preko distribucije FJB-pozitivnih neurona u ovim specifičnim podslojevima.

Nakon analize dobijenih Slika FJB i NeuN bojenjem, u FK nisu uočeni neuroni koji su podlegli degeneraciji ni u jednom regionu DG (Slika 4.9.A-C). Nasuprot tome, ASK je izazvala intenzivnu neurodegeneraciju u DG (Slika 4.9.D-F) na koju ukazuje povećanje FJB-imunoreaktivnosti (Slika 4.9.D,F). Pokazana je specifična distribucija FJB- i NeuN-pozitivnih neurona u SGZ i podslojevima DG (Slika 4.9.D-F). Preklapanje ova dva markera (Slika 4.9.F, žuto), pokazalo je da su ćelije koje degenerišu upravo neuroni i omogućilo njihovu lokalizaciju prevashodno u unutrašnjoj i srednjoj trećini granularnog sloja. Takođe, prisustvo ovih neurona je pokazano i u SGZ. Sa druge strane, FJB/NeuN-pozitivni neuroni su retko viđeni u spoljnoj trećini granularnog sloja DG. Mali broj FJB/NeuN-pozitivnih neurona je pronađen u molekularnom sloju DG i u hilusu (Slika 4.9. F).

Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da ASK pokazuje specifičan uticaj na DG uzrokujući ćelijsku smrt neurona pretežno u unutrašnjoj trećini granularnog sloja i u SGZ DG hipokampusa.



Slika 4.9. ASK indukuje smrt neurona pretežno u unutrašnjoj i srednjoj trećini granularnog sloja i u subgranularnoj zoni dentatnog girusa. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nervnih ćelija (NeuN, crveno), jedara (DAPI, tamno plavo) i ćelija u degeneraciji (FJB, zeleno) u DG hipokampusa kontrolnih (A-C) i operisanih (D-F) životinja. (A, C) U FK, FJB bojenje je bilo slabo, a samim tim FJB-pozitivne ćelije su bile retko prisutne. (B, E) Ekspresija NeuN u neuronima granularnog sloja DG u grupama FK i L. (D) Povećana FJB-imunoreaktivnost nakon ASK ukazuje na povećanu ćelijsku degeneraciju. Kolokalizacija ova dva

bojenja prikazana je na (C) i (F) zajedno sa DAPI bojenjem koje je omogućilo vizualizaciju jedara. (F) Preklapanje sva tri bojenja (žuto) potvrdilo je da su upravo neuroni ćelije koje podležu degeneraciji. Naglašena FJB-imunoreaktivnost nakon ASK (D, F) je najviše zastupljena u unutrašnjoj i srednjoj trećini granularnog sloja i SGZ, što ukazuje da su neuroni ovih regiona naročito osetljivi na povredu. FJB/NeuN-pozitivni neuroni su retko prisutni u molekularnom sloju DG i u hilusu. Skala 50 μ m. Skraćenice: dentatni girus (DG), fiziološka kontrola (FK); lezija (L); molekularni sloj (MS); granularni sloj (GS); spoljna (ST), srednja (SrT) i unutrašnja trećina (UT) granularnog sloja; subgranularna zona DG (SGZ); fiziološka kontrola (FK); lezija (L).

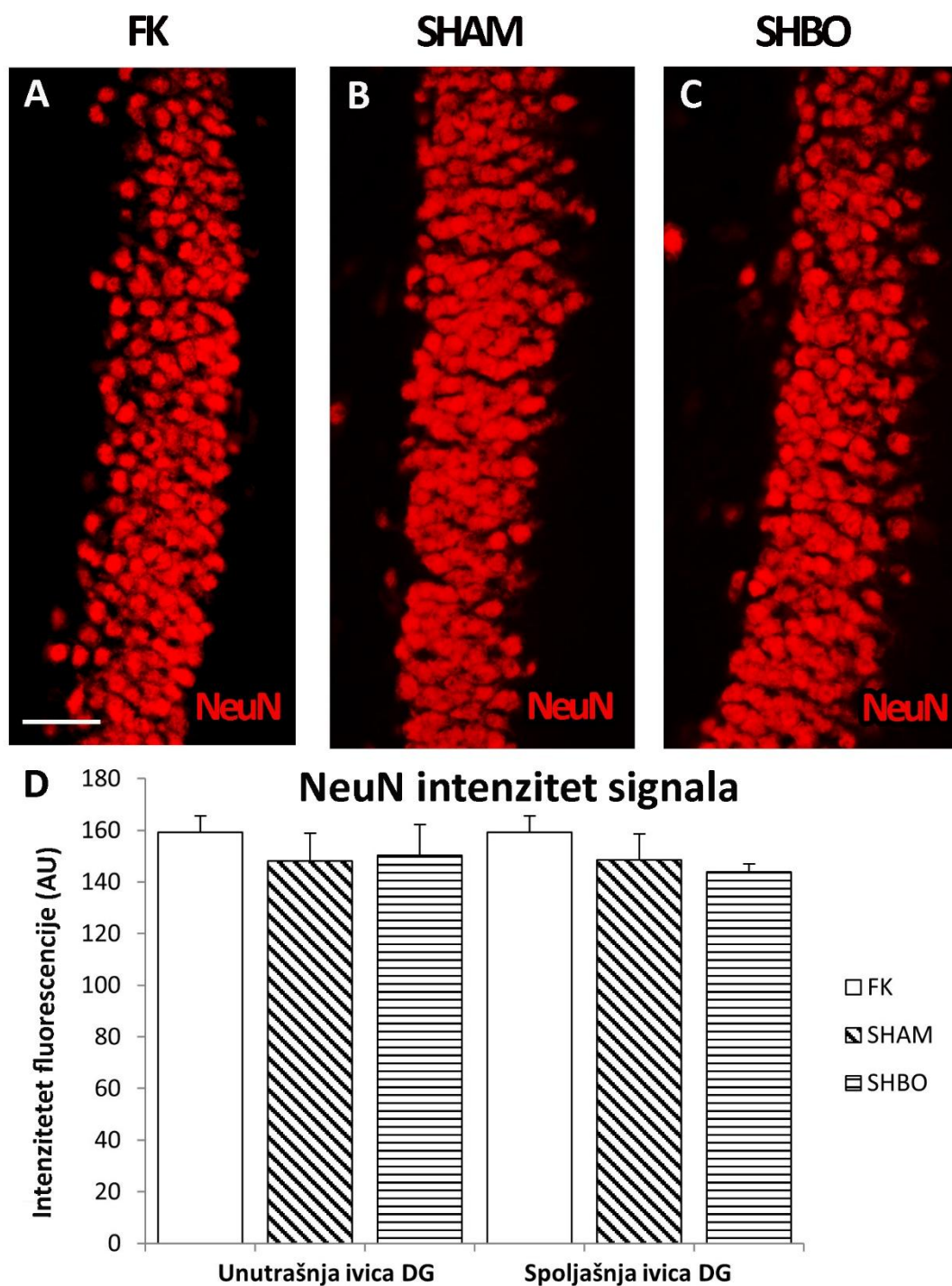
4.4.2. HBO tretman sprečava gubitak neurona izazvan ASK u granularnom sloju DG

U cilju provere efekta HBO tretmana na uočeni gubitak granularnih neurona u DG hipokampusa izazvan ASK, urađeno je imunofluorescentno bojenje na NeuN. Potom je određen intenzitet NeuN bojenja za i unutrašnju i spoljašnju ivicu DG (opis metode je dat u poglavlju Materijal i metode, 3.6.5. Analiza preparata).

Ekspresija NeuN proteina kod kontrolnih grupa

U sve tri kontrolne grupe FK (Slika 4.10.A), SHAM (Slika 4.10.B) i SHBO (Slika 4.10.C) nije došlo do gubitka NeuN-pozitivnih neurona DG. Određene su vrednosti intenziteta NeuN fluorescencije za unutrašnju i spoljašnju ivicu DG u svakoj grupi i dobijeni rezultati su prikazani na grafiku (Slika 4.10.D). Kvantifikacija intenziteta fluorescencije (arbitrarne jedinice, AU) unutrašnje (147,95 \pm 10,77) i spoljašnje ivice (148,56 \pm 9,99) u SHAM kontroli, unutrašnje (150,38 \pm 11,82) i spoljašnje ivice (143,80 \pm 3,03) u SHBO grupi, kao i unutrašnje (159,21 \pm 6,18) i spoljašnje ivice (153,79 \pm 4,56) u FK grupi nije polazala statistički značajnu razliku (unutrašnja ivica: FK vs. SHAM $p=0,206$; FK vs. SHBO $p=0,430$; SHAM vs. SHBO $p=0,989$; spoljašnja ivica: FK vs. SHAM $p=0,718$; FK vs. SHBO $p=0,147$; SHAM vs. SHBO $p=0,783$).

U FK grupi, kvantifikacija (Slika 4.10. beli stubići) intenziteta fluorescencije između unutrašnje (159,21 \pm 6,18) i spoljašnje ivice (153,79 \pm 4,56) DG nije pokazala statistički značajnu razliku ($p=0,114$). Shodno tome, sva poređenja dobijenih vrednosti u drugim grupama su napravljena u odnosu na intenzitet fluorescencije unutrašnje ivice DG hipokampusa FK grupe.



Slika 4.10. Ekspresija NeuN proteina u unutrašnjoj i spoljašnjoj ivici DG hipokampusa kontrolnih životinja. Reprerativne mikrografije imunofluorescentnog bojenja nervnih ćelija (NeuN, crveno) u DG. Ekspresija NeuN u granularnom sloju DG hipokampusa FK (A), SHAM (B) i SHBO (C) životinja. (D) Intenzitet fluorescencije (arbitrarne jedinice, AU) kvantifikovan je u unutrašnjoj i spoljašnjoj ivici FK (beli stubić), SHAM (crni stubići, kose linije) i SHBO (sivi stubići, horizontalne linije). Vrednosti intenziteta fluorescencije u kontrolnim grupama nisu pokazale statistički značajne razlike. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti unutar grupe je ispitivan upotrebom T testa za nezavisne uzorke. Nivo značajnosti između grupa je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom. Skala 50 μ m (A-C). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO); dentatni girus (DG).

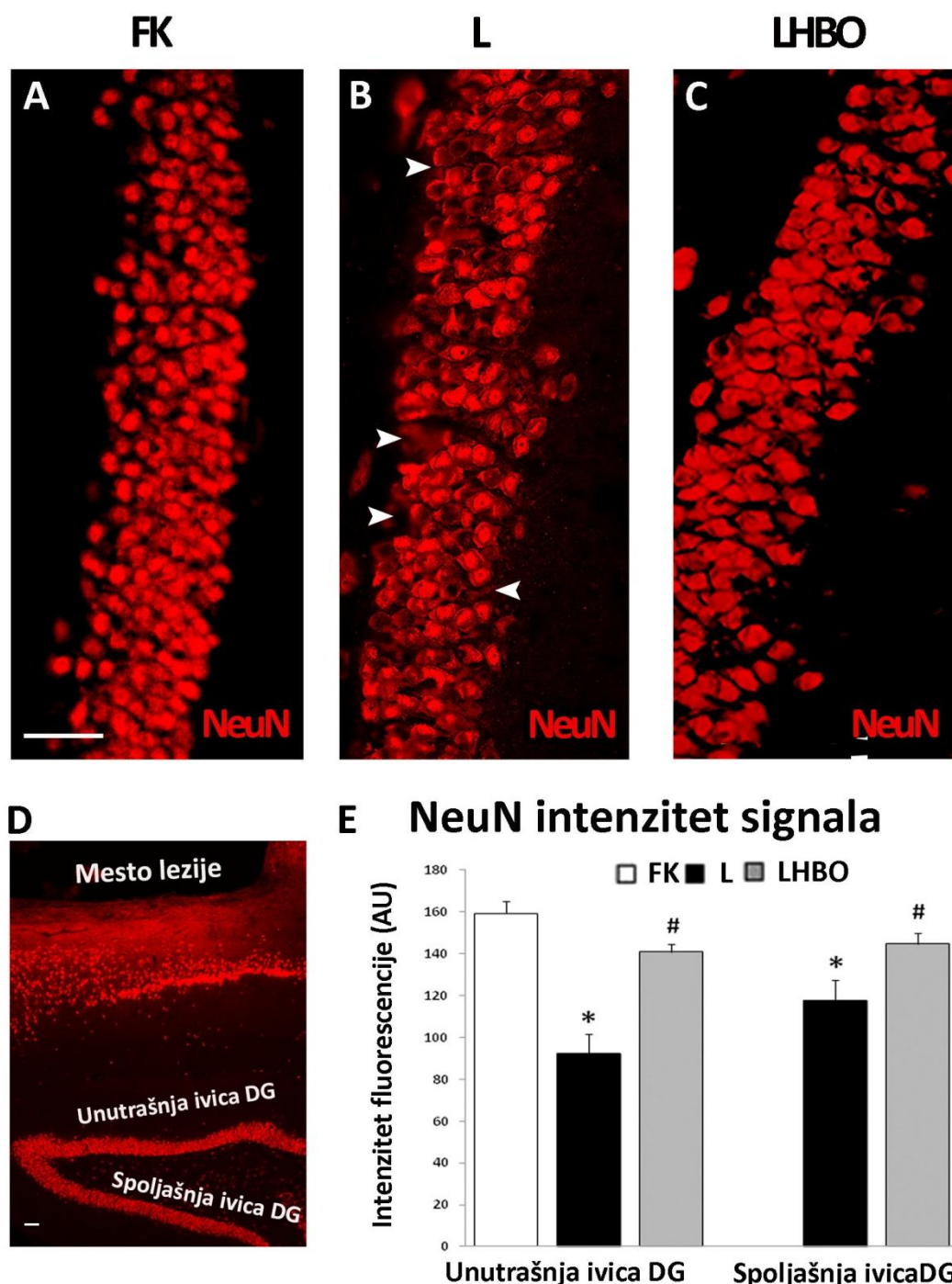
Uticaj HBO tretmana na ekspresiju NeuN u DG nakon ASK

U poređenju sa FK (Slika 4.11.A), ablacija korteksa izazvala je značajan gubitak NeuN-pozitivnih neurona (Slika 4.8.B, vrhovi strelica) u granularnom sloju DG. Međutim, 10 uzastopnih HBO tretmana smanjilo je gubitak neurona nakon ASK (Slika 4.11.C).

Uočeno smanjenje ekspresije NeuN nakon povrede mozga može da ukaže na degeneraciju neurona u hipokampusu glodara. Stoga je kvantifikovan intenzitet NeuN imunofluorescencije u unutrašnjoj (suprapiramidalnoj) i spoljašnjoj (infrapiramidalnoj) ivici DG hipokampusa (Slika 4.11.D) na koronalnim presecima mozgovog životinja FK, L i LHBO grupe. Dobijeni rezultati su prikazani na grafiku (Slika 4.11.E). ASK je izazvala značajno smanjenje (za 41,85%, $p < 0,001$) intenziteta fluorescencije ($92,59 \pm 9,25$, Slika 4.11.E, crni stubić) unutrašnje ivice DG u poređenju sa FK ($159,21 \pm 6,18$, Slika 4.11.E, beli stubić). Međutim, nakon 10 tretmana HBO, neurodegeneracija koja je indukovana ASK bila je statistički značajno manje izražena (za 11,49%, $p < 0,01$) ($140,93 \pm 3,92$, sivi stubić) u odnosu na FK.

Smanjenje intenziteta fluorescencije u spoljašnjoj ivici DG nakon ASK je bilo manje izraženo u odnosu na ono uočeno u unutrašnjoj ivici, ali i dalje statistički značajno (za 26,02%, $p < 0,001$) ($117,78 \pm 9,52$, Slika 4.11.E, crni stubić) u odnosu na FK ($159,21 \pm 6,18$, Slika 4.11.E, beli stubić). Sa druge strane, u LHBO grupi, efekat ASK je umanjeno HBO tretmanom (za 9,04%), ali vrednost intenziteta fluorescencije ($144,82 \pm 5,02$) (Slika 4.11.E, sivi stubić) nije se statistički značajno razlikovala između LHBO i FK grupe ($p = 0,227$).

Tumačeni zajedno, ovi rezultati sugerišu da ASK, sudeći po značajnom gubitku ekspresije NeuN, izaziva izraženo propadanje neurona u unutrašnjoj i spoljašnjoj ivici DG. Nasuprot tome, HBO skoro u potpunosti sprečava smanjenje ekspresije NeuN.



SLIKA 4.11. Efekat ASK i HBO tretmana na ekspresiju NeuN u granularnom sloju DG hipokampusa. *Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nervnih ćelija (NeuN, crveno) u DG. (A) Ekspresija NeuN u granularnom sloju DG hipokampusa FK životinja. (B) Gubitak NeuN-pozitivnih granularnih neurona (vrhovi strelica) nakon ASK zapažen je u granularnom sloju DG. (C) Nasuprot tome, HBO tretman je smanjio gubitak NeuN-pozitivnih neurona indukovanih ASK. (D) Reprezentativna mikrofografija imunofluorescentnog bojenja koronalnog preseka mozga u nivou povrede senzomotornog korteksa. Uočava se ekspresija NeuN u hipokampusu i DG ispod mesta lezije. (E) Intenzitet fluorescencije (arbitrarne jedinice, AU) kvantifikovan je u unutrašnjoj i spoljašnjoj ivici FK (beli stubići), L (crni stubići) i LHBO (sivi stubići). Nakon ASK, dolazi do statistički značajnog smanjenja intenziteta signala u odnosu na FK u unutrašnjoj, kao i u spoljašnjoj ivici DG hipokampusa. Nakon HBO tretmana intenzitet fluorescencije je bio sličan FK. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom. (**

$p < 0,001$ FK vs. L, # $p < 0,001$ L vs. LHBO). Skala 50 μm (A-D). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); lezija+HBO (LHBO); dentatni girus (DG).

4.4.3. Identifikacija neurona koji prolaze kroz proces degeneracije u DG hipokampusa nakon ASK

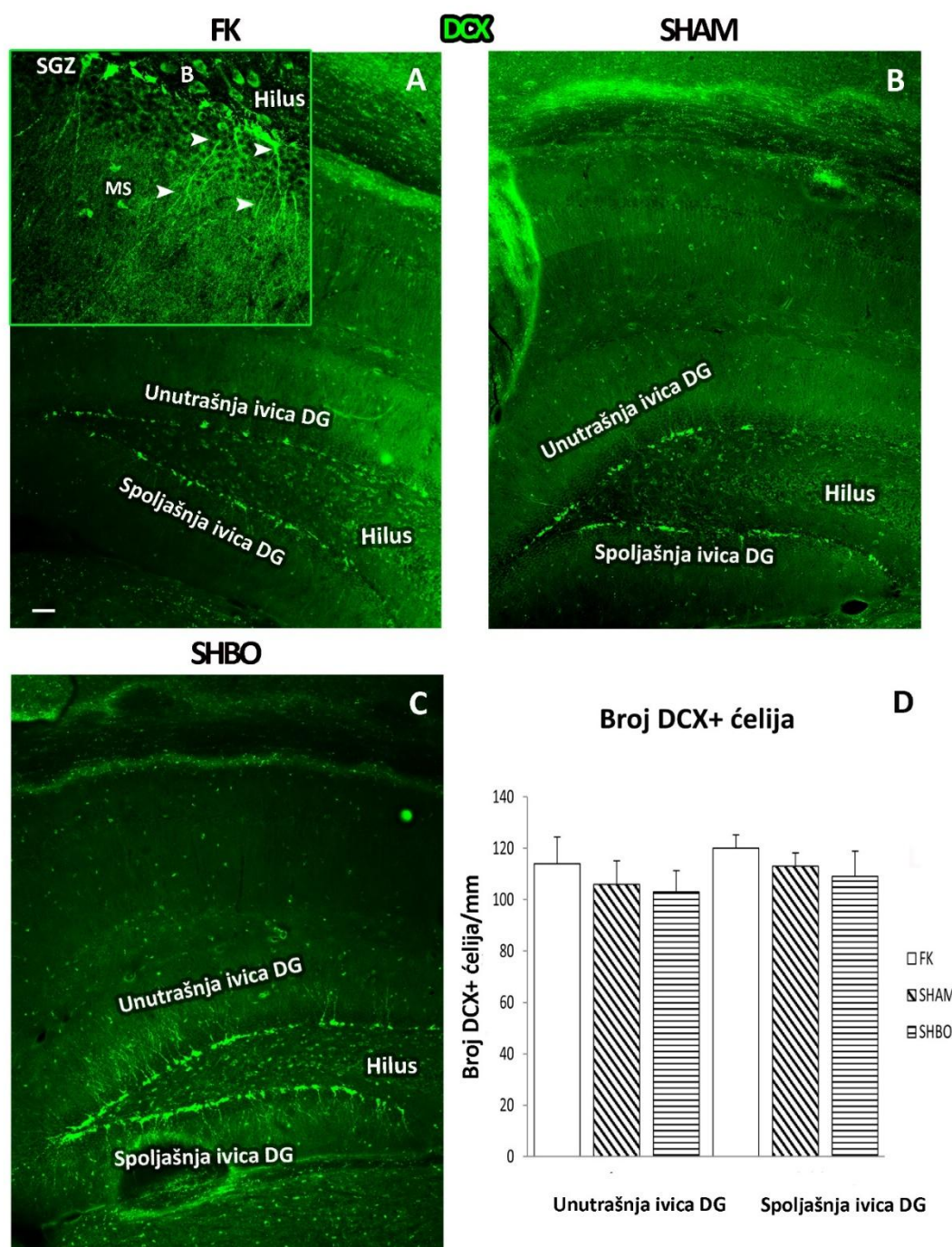
S obzirom da su brojni FJB-pozitivni neuroni otkriveni u SGZ, gde se nalaze NSC, urađena je identifikacija FJB-pozitivnih ćelija.

4.4.3.1. HBO sprečava gubitak novonastalih DCX-pozitivnih nezrelih neurona u granularnom sloju DG hipokampusa nakon ASK

Praćen je broj DCX-pozitivnih neurona u granularnom sloju DG hipokampusa i to nezavisno u spoljašnjoj i unutrašnjoj ivici DG (opis metode je dat u poglavlju Materijal i metode, 3.6.5. Analiza preparata).

Kvantifikacija DCX-pozitivnih ćelija kod kontrolnih grupa

U poređenju sa FK (Slika 4.12.A), u SHAM (Slika 4.12.B) i SHBO (Slika 4.12.C) grupi nije došlo do gubitka DCX-pozitivnih neurona. Izbrojane su DCX-pozitivne ćelije u spoljašnjoj i unutrašnjoj ivici DG tri kontrolne grupe. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 4.9.D gde je uočljivo da nema statistički značajnih razlika (unutrašnja ivica: FK vs. SHAM: $114 \pm 10,31$ vs. $106 \pm 9,07$, $p = 0,582$; FK vs. SHBO: $114 \pm 10,31$ vs. $103 \pm 8,22$, $p = 0,323$; SHAM vs. SHBO: $106 \pm 9,07$ vs. $103 \pm 8,22$, $p = 0,991$; spoljašnja ivica FK vs. SHAM: $120 \pm 5,14$ vs. $113 \pm 5,11$, $p = 0,520$; FK vs. SHBO: $120 \pm 5,14$ vs. $109 \pm 9,91$, $p = 0,169$; SHAM vs. SHBO: $113 \pm 5,11$ vs. $109 \pm 9,91$, $p = 0,945$) među ispitivanim kontrolnim grupama, pa su sva poređenja u daljim analizama rađena u odnosu na FK grupu i to njenu unutrašnju ivicu. Naime, broj DCX-pozitivnih ćelija u unutrašnjoj ($114 \pm 10,31$) i spoljašnjoj ($120 \pm 5,14$) ivici DG kod FK grupe nije se statistički značajno razlikovao ($p = 0,191$), pa su poređenja broja DCX-pozitivnih ćelija operisanih i HBO tretiranih životinja napravljena u odnosu na unutrašnju ivicu DG FK životinja (Slika 4.12.D, beli stubić).



Slika 4.12. Broj DCX-pozitivnih ćelija u unutrašnjoj i spoljašnjoj ivici DG hipokampusa kontrolnih životinja. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nezrelih nervnih ćelija (DCX, zeleno) u DG hipokampusa na koronalnim presecima životinja FK (A), SHAM (B) i SHBO (C) grupa. Kvantifikacija DCX-pozitivnih ćelija po mm dužine SGZ kod sve tri kontrolne grupe nije pokazala statistički značajnu razliku u broju ovih ćelija. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti unutar grupe je ispitivan upotrebom t-testa za nezavisne uzorke. Nivo značajnosti između grupa je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom. Skala 100 μ m (A-C). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO); dentatni girus (DG).

Uticaj HBO tretmana na broj DCX-pozitivnih ćelija u DG nakon ASK

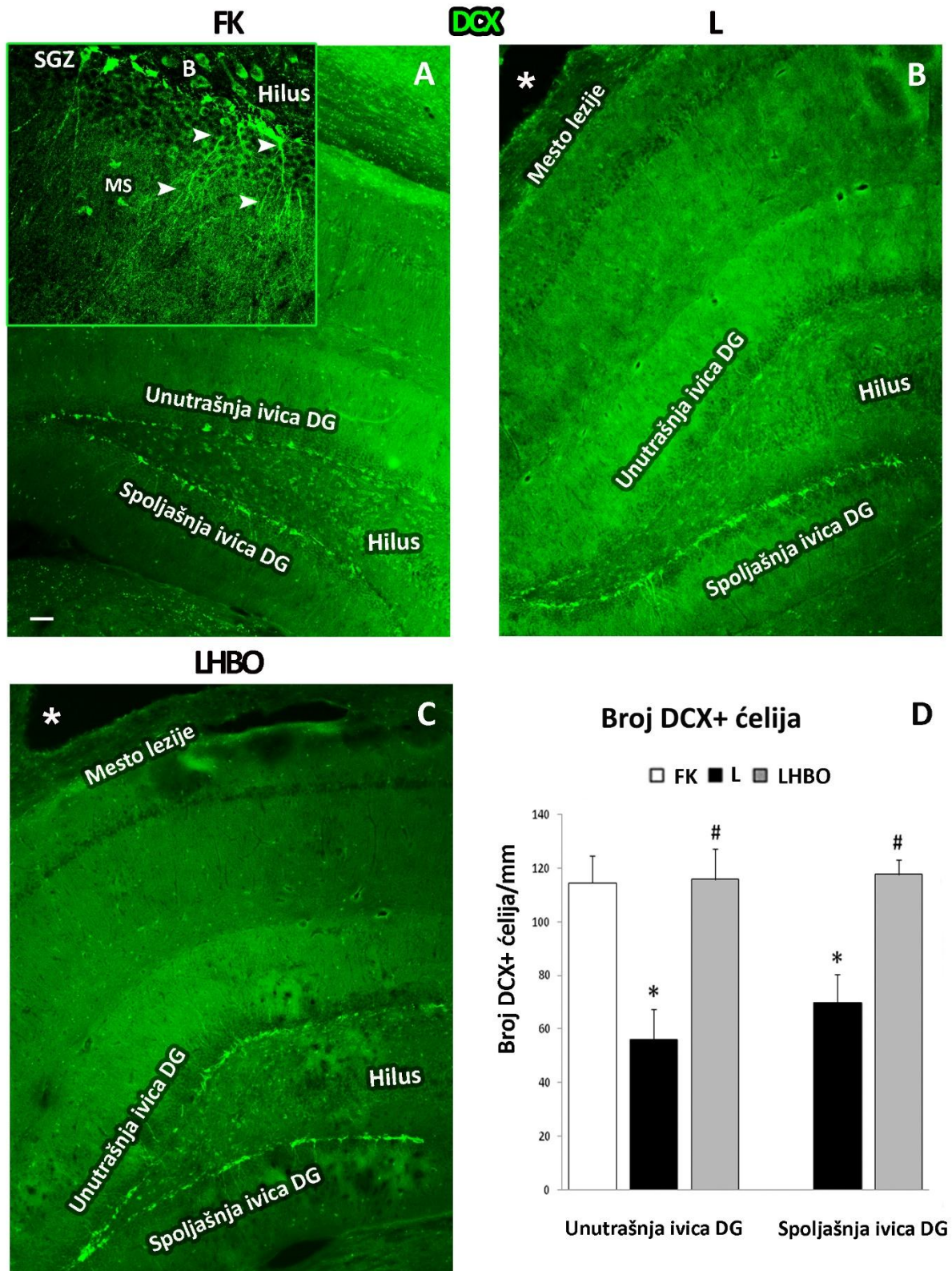
U fiziološkim uslovima intenzivna ekspresija DCX viđena je u ćelijama u SGZ unutrašnje i spoljašnje ivice DG, kao i u hilusu (Slika 4.13.A). Na većem uveličanju (Slika 4.13.A, *insert*) uočeno je da DCX-pozitivni neuroni imaju razgranate dendrite (vrhovi strelica), koji se prostiru kroz granularni sloj, od SGZ do molekularnog sloja. DCX-pozitivne ćelije uočene u hilusu najverovatnije su progenitori i korpaste ćelije.

Poređenjem sa FK grupom (Slika 4.13.A) ekspresija DCX je vidno smanjena nakon ASK naročito u unutrašnjoj ivici DG (Slika 4.13.B).

Kvantifikacija dobijenih rezultata prikazana je na grafiku (Slika 4.13.D). U poređenju sa FK ($114 \pm 10,31$, beli stubić), ASK je izazvala statistički značajan ($p < 0,001$) gubitak DCX-pozitivnih nezrelih neurona, naročito u unutrašnjoj ivici (za 50,90%) ($56 \pm 11,03$, crni stubić). U manjoj meri, ali ipak statistički značajno (za 38,90%, $p < 0,001$), ASK je dovela do gubitka DCX-pozitivnih neurona i u spoljašnjoj ivici DG ($70 \pm 10,58$, crni stubić).

Međutim, 10 uzastupnih HBO tretmana sprečilo je gubitak novonastalih nezrelih DCX-pozitivnih neurona u SGZ nakon ablacije korteksa (Slika 4.13.C). Broj DCX-pozitivnih neurona u unutrašnjoj ($116 \pm 11,48$) i spoljašnjoj ($118 \pm 5,63$) ivici DG hipokampusa (Slika 4.13.D, sivi stubići) je bio sličan broju DCX-pozitivnih neurona u FK.

Ovi podaci ukazuju da su novonastali neuroni posebno ranjivi na ASK, dok je HBO tretman sprečio ove efekte ASK i zaštitio novonastale neurone.

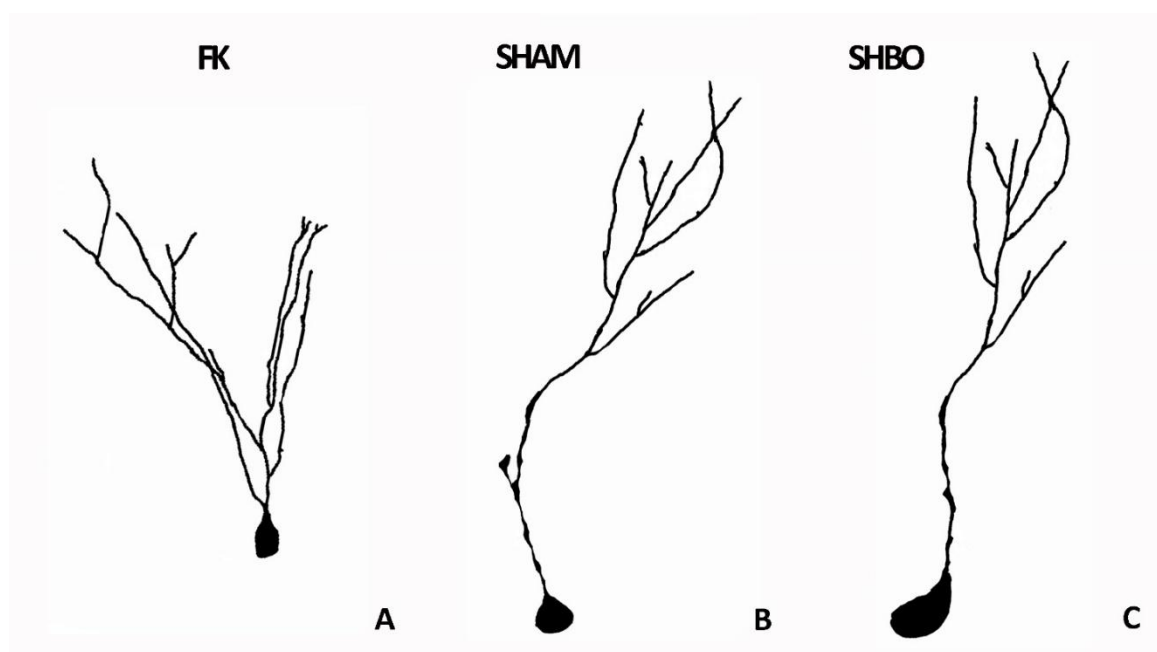


Slika 4.13. HBO sprečava gubitak DCX-pozitivnih novonastalih, nezrelih neurona u SGZ DG hipokampusa nakon ASK. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nezrelih nervnih ćelija (DCX, zeleno) u DG hipokampusa na koronalnim presecima kontrolnih (A), operisanih (B) i HBO tretiranih (C) životinja. (A) Na mikrofografiji FK životinja videna je intenzivna ekspresija DCX u ćelijama SGZ unutrašnje i spoljašnje ivice DG. Na većem uveličanju (insert), primećuje se da novostvoreni, nezreli DCX-pozitivni neuroni imaju razgranate dendrite (vrhovi strelica), koji se prostiru se od SGZ do molekularnog sloja. Pored toga, DCX-imunoreaktivnost je prisutna u progenitorima i košarastim ćelijama (A, insert) u hilusu. (B) ASK

je smanjila ekspresiju DCX, smanjenje imunofluorescencije je naročito izraženo u unutrašnoj ivici DG ispod mesta lezije (zvezdica). (C) Posle 10 HBO tretmana nakon ASK, nivo ekspresije DCX bio je sličan FK. (D) DCX-pozitivni neuroni kvantifikovani su u unutrašnoj i spoljašnoj ivici DG hipokampusa. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom (* $p < 0,001$ FK vs. L, # $p < 0,001$ FK vs. LHBO). Skala 100 μm (A–C). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); lezija+HBO (LHBO); dentatni girus (DG); subgranularna zona (SGZ); molekularni sloj (MS).

4.4.3.2. HBO tretman sprečava ASK degeneraciju dendrita nezrelih DCX-pozitivnih neurona u SGZ

Analiza mikrografija pojedinačnih neurona nije pokazala morfološke razlike između neurona kontrolnih grupa (Slika 4.14).



Slika 4.14. Rekonstruisani neuroni kontrolnih grupa. Rekonstruisani neuroni u FK (A) SHAM (B) i SHBO (C). Uveličanje: 63x. Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO).

U poređenju sa FK, u SHAM i SHBO grupi nije došlo do statistički značajnih promena u ukupnoj dužini dendrita, prosečnoj dužini segmenata i broju tačaka grananja ($p > 0,05$), pa su sva poređenja u daljim analizama rađena u odnosu na neurone FK grupe (Tabela 4.1).

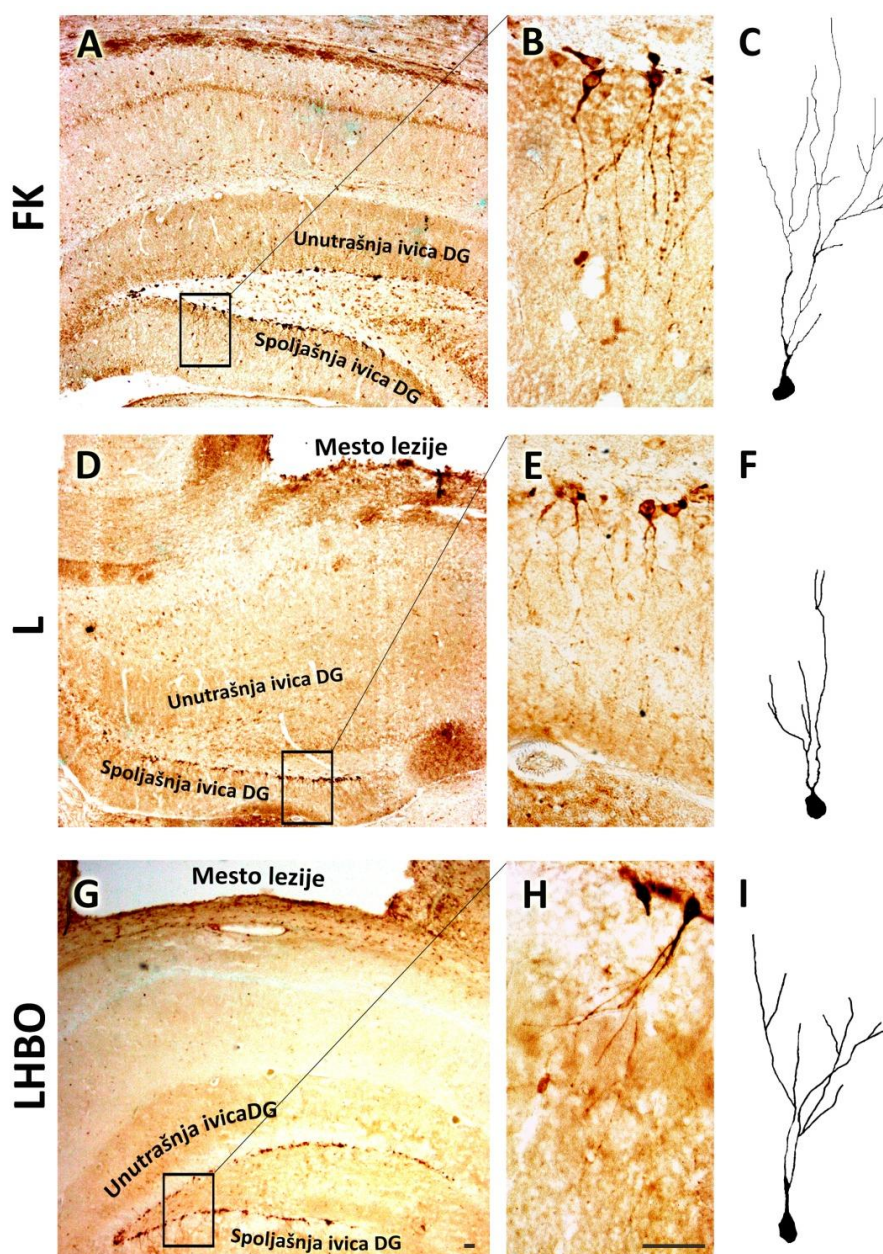
Tabela 4.1. Broj tačaka grananja, ukupna dužina dendrita i prosečna dužina segmenta u DCX pozitivnim neuronima FK, L i LHBO grupe.

	FK	SHAM	SHBO	<i>p</i>		
				FK vs. SHAM	FK vs. SHBO	SHAM vs. SHBO
UDD	260,81±24,59	270,63±11,64	256,97±25,46	0,940	0,998	0,827
PDS	18,80±1,68	19,72±1,32	19,30±1,55	0,976	0,998	0,999
TG	6,64±0,96	6,53±0,29	6,14±0,36	0,997	0,529	0,737

Sve vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom. Skraćenice: ukupna dužina dendrita u μm (UDD); prosečna dužina segmenta u μm (PDS); tačke grananja (TG); fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO).

Analiza svetlosnih mikroskopija koronalnih preseka potvrdila je značajan gubitak DCX-pozitivnih ćelija u unutrašnoj ivici DG ispod mesta lezije (Slika 4.15.D) u poređenju sa FK (Slika 4.15.A), kao što je uočeno i nakon fluorescentnog bojenja. Takođe, ASK je dovela do morfoloških promena nezrelih neurona u SGZ i unutrašnje i spoljašnje ivice (Slika 7.15.E,F). Reprezentativne mikrografije DG napravljene pod većim uveličanjima su otkrile da su dendriti DCX-pozitivnih neurona u SGZ bili oštećeni nakon ASK i da su pretrpeli značajne morfološke promene. Naime, ASK je izazvala ekstremno smanjenje dendritske kompleksnosti SGZ neurona, koje se manifestovalo skraćanjem dužine dendrita i smanjenjem dendritskom arborizacijom (Slika 4.15.E,F) u odnosu na neurone FK (Slika 4.15.B,C).

HBO tretman sprečava morfološke promene neurona koje su izazvane ASK (Slika 4.15.G,H, I). Nezreli neuroni u LHBO grupi morfološki podsećaju na neurone koji su karakteristični za FK.



Slika 4.15. HBO tretman sprečava degeneraciju dendrita nezrelih DCX-pozitivnih neurona u SGZ nakon ASK. Reprezentativne mikrografije imunohistohemijskog bojenja nezrelih nervnih ćelija (DCX) u DG hipokampusa na koronalnim presecima kontrolnih (A,B), operisanih (D,E) i HBO tretiranih (G,H) životinja. (A,B) Na kontrolnim presecima, DCX-pozitivni nezreli neuroni se nalaze u SGZ i njihovi dendriti se granaju u unutrašnjoj i srednjoj trećini granularnog sloja sve do molekularnog sloja. (C) Rekonstruisani neuron u FK. (D,E) ASK dovodi do gubitka neurona u unutrašnjoj ivici DG. (E) Veće (40x) uvećanje SGZ u spoljašnjoj ivici DG pokazuje značajne morfološke promene neurona, koje se manifestuju smanjenjem dendritske arborizacije. (F) Rekonstruisani neuron nakon ASK. (G,H) HBO tretman štiti DCX-pozitivne neurone i sprečava degeneraciju dendrita. (I) Rekonstruisani neuron nakon HBO tretmana. Pravougaonici na slikama A, D i G obeležavaju mesta prikazana na većem uvećanju. Skale: (A,B,D,E,G,H)-50 μ m. Skraćenice: dentatni girus (DG).

Da bi se uporedili uočeni efekti ASK i HBO na arborizaciju dendrita, određene su ukupne dužine dendrita, prosečne dužine segmenata i broj tačaka grananja neurona smeštenih u spoljašnjoj ivici DG (Tabela 4.2). U L grupi je značajno smanjena ukupna dužina dendrita (za 43,16%, $p < 0,001$) i broj tačaka grananja (za 60,54%, $p < 0,001$) i samim tim povećana prosečna dužina segmenta (za 35,43%, $p < 0,001$) u odnosu na FK. Ovi rezultati su pokazali dramatično smanjenje dendritske arborizacije nezrelih neurona u SGZ nakon ASK.

U LHBO grupi, u poređenju sa FK, ukupna dužina dendrita je takođe smanjena, ali u manjem obimu (za 17,92%, $p < 0,05$). U ovoj grupi smanjen je i broj tačaka grananja (za 23,43%, $p < 0,001$). Međutim, vrednosti prosečne dužine segmenta su bile slične u ove dve grupe ($p > 0,05$).

U L grupi, u poređenju sa LHBO, ukupna dužina dendrita je statistički značajno manja (za 30,75%, $p < 0,001$). U istoj grupi smanjen je broj grananja (za 48,43%, $p < 0,05$). Vrednosti prosečne dužine segmenta su bile statistički značajno manje u grupi LHBO u poređenju sa L grupom (za 26,29%, $p < 0,01$).

Sve ukupno, ovi rezultati sugerišu da ASK smanjuje broj novonastalih neurona u DG, ali i da dovodi do značajnog oštećenja razvoja dendrita i dendritske arborizacije. Nasuprot tome, HBO tretman ublažava ove promene i štiti morfologiju novonastalih neurona.

Tabela 4.2. Broj tačaka grananja, ukupna dužina dendrita i prosečna dužina segmenta u DCX pozitivnim neuronima FK, L i LHBO grupe.

	FK	L	LHBO	<i>p</i>		
				L vs. FK	LHBO vs. FK	LHBO vs. L
UDD	260,81±24,5 9	148,24±20,6 9	214,08±26,5 8	<0,001	<0,05	<0,001
PDS	18,80±1,68	25,46±4,04	20,16±3,41	<0,001	0,907	<0,01
TG	6,64±0,96	2,62±0,50	5,08±0,38	<0,001	<0,001	<0,05

Sve vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom. Skraćenice: ukupna dužina dendrita u μm (UDD); prosečna dužina segmenta u μm (PDS); tačke grananja (TG); fiziološka kontrola (FK); lezija (L); lezija+HBO (LHBO).

4.4.3.3. HBO tretman sprečava gubitak DCX/TUJ1-pozitivnih neurona u granularnom sloju DG nakon ASK

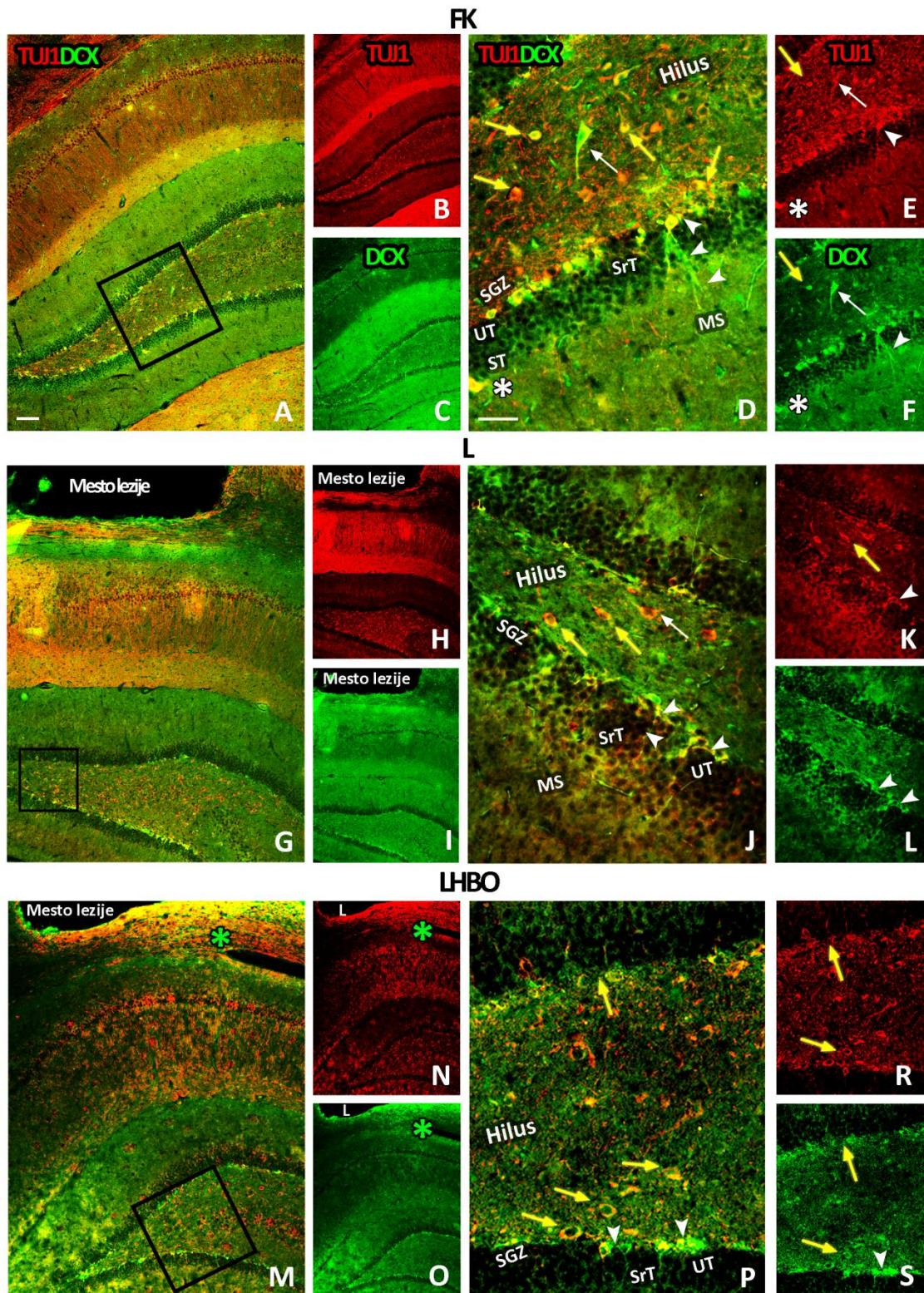
Za potvrdu prethodno navedenih rezultata, urađeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje markerima za rane neurone: DCX (zelena fluorescencija), marker ranih nezrelih neurona DG i beta-III tubulin (TUJ1, crvena fluorescencija), koji se eksprimira nakon DCX u prekursorskim ćelijama tokom adultne neurogeneze i obeležava postmitotičke neurone (Slika 4.16).

Ekspresija DCX i TUJ1 u FK grupi (Slika 4.16.A-C) posmatrana je u hipokampusu i delu korteksa čije koordinate odgovaraju mestu lezije kod operisanih grupa životinja. Kolokalizacija ova dva proteina pokazala je da se DCX/TUJ1-pozitivni nezreli neuroni uglavnom nalaze u SGZ unutrašnje i spoljašnje ivice DG (Slika 4.16.A). Kvadratom su obuhvaćeni delovi DG koji su prikazani na većem uveličanju (Slika 4.16.D-F) što je omogućilo

da se uoče DCX/TUJ1-pozitivne ćelije i u unutrašnjoj trećini granularnog sloja DG. Dendriti ovih ćelija se protežu prema srednjoj i spoljašnjoj trećini granularnog sloja (Slika 4.16.D-F, vrhovi strelica). Treba napomenuti da su naročito tela neurona bila intenzivno obojena i sa DCX i sa TUJ1 (Slika 4.16.D-F), što nije slučaj sa dendritima, koji su bili samo DCX-pozitivni (Slika 4.16.D,F, vrhovi strelica). Samo nekoliko DCX/TUJ1-pozitivnih ćelija je bilo lokalizovano u spoljašnjoj trećini granularnog sloja i u molekularnom sloju (Slika 4.16.D-F, bele zvezdice). U hilusu su detektovane slabo obojene DCX/TUJ1-pozitivne ćelije sa velikim telima (Slika 4.16.D-F, bele strelice). Takođe, detektovane su i ćelije okrugle/ovalne morfologije, koje su uglavnom bile TUJ1-pozitivne (Slika 4.16.D-F, žute strelice).

ASK je smanjila DCX/TUJ1-imunoreaktivnost u SGZ (Slika 4.16.G-I) i to uglavnom u unutrašnjoj ivici DG ispod mesta lezije. Prisutni DCX/TUJ1-pozitivni neuroni su imali izmenjenu morfologiju, koja se karakterisala skraćenim i manje razgranatim dendritima, kao što je uočljivo na većem uveličanju DG (Slika 4.16.J-L, vrhovi strelica). U hilusu, TUJ1-pozitivni neuroni okrugle/ovalne morfologije bili su i dalje dominantni (Slika 4.16.J,K, žute strelice).

Deset uzastopnih tretmana HBO sprečilo je gubitak DCX/TUJ1-pozitivnih nezrelih neurona, koji su uglavnom smešteni u SGZ unutrašnje i spoljašnje ivice DG (Slika 4.16.M-O). Treba napomenuti da se pri većem uveličanju, pored neurona, koji se karakterišu okruglom/ovalnom morfologijom i koji su bili samo TUJ1-pozitivni, uočavaju i morfološki slični DCX/TUJ1-pozitivni neuroni (Slika 4.16.P-S, žute strelice). Štaviše, ovi DCX/TUJ1-pozitivni neuroni su prvenstveno bili lokalizovani na granici hilusa i granularnog sloja. Ovi podaci ukazuju da su novonastali neuroni posebno osetljivi na ASK i to naročito u unutrašnjoj ivici DG ispod mesta lezije. Takođe, treba napomenuti da je nakon tretmana HBO došlo do intenzivnog povećanja DCX/TUJ1-imunoreaktivnosti, koja je bila rasprostranjena široko oko mesta lezije (Slika 4.16.M-O, zelene zvezdice).



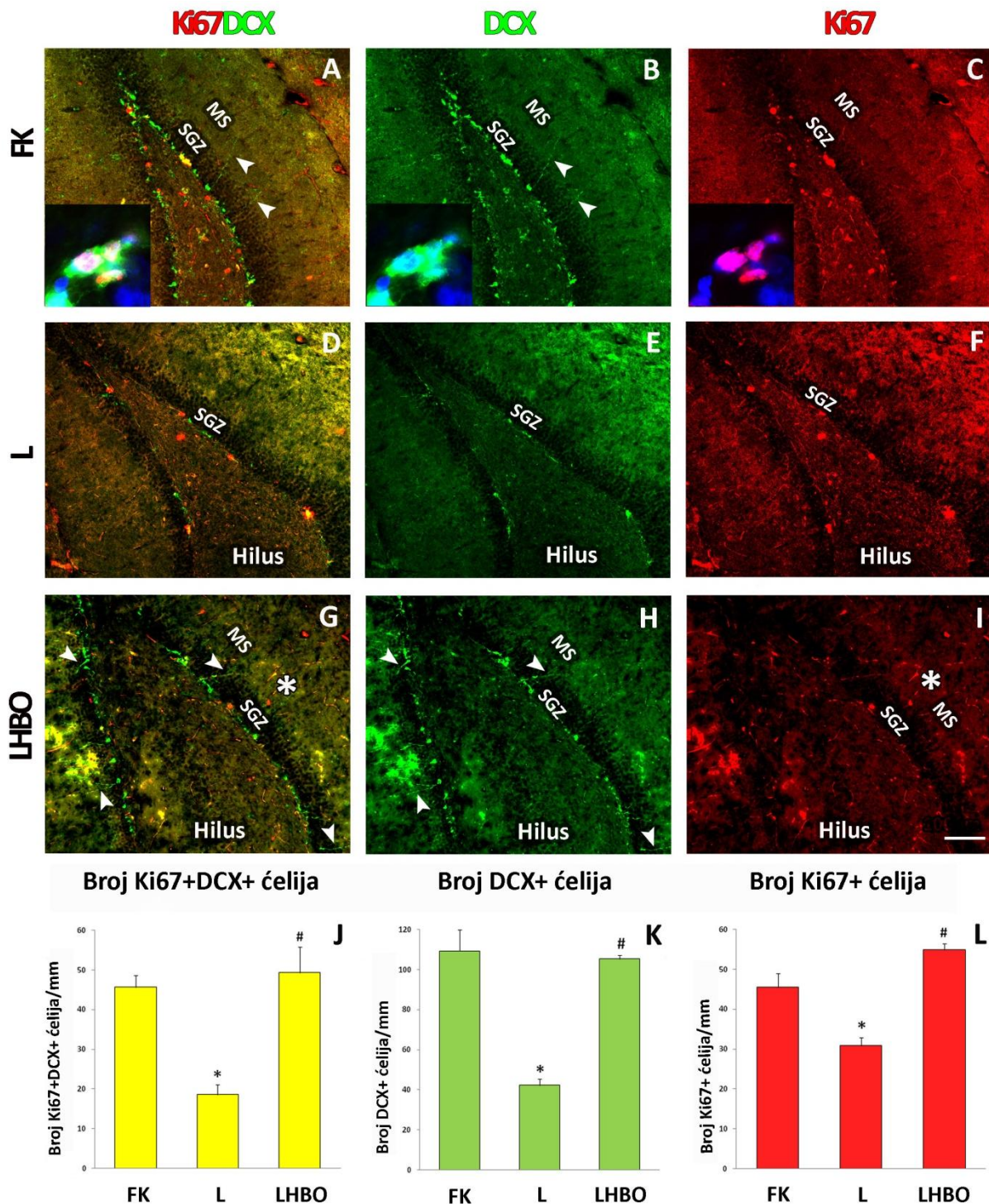
Slika 4.16. Ekspresija DCX i TUJ1 (beta-III tubulin) u DG hipokampusa FK, L i LHBO grupe. Reprezentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja novonastalih, nezrelih nervnih ćelija (DCX, zeleno; TUJ1, crveno) u DG hipokampusa na koronalnim presecima kontrolnih (A-F), operisanih (G-L) i HBO tretiranih operisanih (M-S) životinja. (A-C) Na slikama DG FK grupe napravljenim na malom uveličanju (5x) uočava se ekspresija DCX samo u SGZ i molekularnom sloju DG, dok je TUJ1, pored hilusa DG, široko rasprostranjen u hipokampusu i korteksu. (D-F) Slike DG FK na većem uveličanju (40x) su prikazale prisustvo DCX/TUJ1-pozitivnih ćelija (žuto) u SGZ i UT granularnog sloja. Ovi neuroni sadrže dendrite koji se protežu

prema SrT i ST granularnog sloja (vrhovi strelica). Takođe, primećeno je i da se nekoliko DCX/TUJ1-pozitivnih ćelija nalazil u ST granularnog sloja i u molekularnom sloju (bele zvezdice). U hilusu su lokalizovane intenzivno obojene DCX/TUJ1-pozitivne ćelije sa velikim ćelijskim telima (bele strelice) i druge sa okruglom/ovalnom morfologijom (žute strelice), koje su uglavnom bile TUJ1-pozitivne. (G-I) Slike koronalnih preseka mozga životinja L grupe na malom uveličanju (5x) pokazale su smanjenu ekspresiju DCX u DG, ali i pojavu DCX-pozitivnih ćelija u korteksu ispod mesta lezije. Ekspresija TUJ1 bila je slična kao u kod FK grupe. (J-L) Veće uveličanje (40x) DG u L grupi, ukazuje da je ASK smanjio broj DCX/TUJ1-pozitivnih nezrelih neurona u SGZ u poređenju sa FK (D-F). (M-O) Nakon HBO tretmana, primećeno je da je DCX/TUJ1-imunoreaktivnost prevashodno izražena oko mesta lezije (zelene zvezdice), dok je veće uveličanje (P-S) koekspresiju ovih markera potvrdilo i u SGZ (vrhovi strelica) i u hilusu (žute strelice). Pravougaonici obeležavaju mesta gde su napravljene slike većih uveličanja. Skala 100 μm (A,G,M); 50 μm (D,J,P). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); L+HBO (LHBO); molekularni sloj (MS); spoljna (ST), srednja (SrT) i unutrašnja trećina (UT) granularnog sloja; subgranularna zona DG (SGZ).

4.4.4. Proliferacija DCX/Ki67-pozitivnih nezrelih neurona u SGZ

Da bi se kvantifikovao broj proliferišućih ćelija neuronskog porekla u SGZ DG hipokampusa urađeno je dvostruko imunofluorescentno bojenje sa Ki67 (marker ćelijske deobe, crvena fluorescencija) i DCX (marker nezrelih neurona, zelena fluorescencija). Broj proliferišućih ćelija kvantifikovan je celom dužinom SGZ u FK, L i LHBO grupi. Izbrojane ćelije su bile ili Ki67/DCX-pozitivne (žuto, Slika 4.17.A,D,G,J), DCX-pozitivne (zeleno, Slika 4.17.B,E,H,K) ili Ki67-pozitivne (crveno, Slika 4.17.C,F,I,L). Primećeno je da je većina ćelija, u svim ispitivanim grupama, bila DCX-pozitivna. Bez obzira na ispitivanu grupu, Ki67-pozitivne ćelije bile su locirane pretežno u SGZ i hilusu. Kao što je očekivano, Ki67 signal je bio ograničen na jedra ćelija (crveno, Slika 4.17.A,C, insert). Nasuprot tome, DCX signal je pronađen uglavnom u citosolu (zeleno, Slika 4.17.A,B, insert) i ćelijskim nastavcima, koji se protežu od SGZ do molekularnog sloja (zeleno, Slika 4.17.A,B,G,H, vrhovi strela). Važno je napomenuti da je HBO povećala broj neurona, čiji se nastavci prostiru do molekularnog sloja (Slika 4.17.G,H), za razliku od L grupe (Slika 4.17.D,E), na čijim se koronalnim presecima mozga to samo povremeno viđalo. Štaviše, HBO tretman je povećao broj Ki67-pozitivnih ćelija u SGZ, hilusu i molekularnom sloju (Slika 4.17.I, zvezdica).

Kvantifikovanjem broja pozitivnih ćelija pokazano je da je ASK radikalno smanjila broj svih izbrojanih ćelija. U poređenju sa FK, smanjen je broj Ki67-pozitivnih ćelija koje koeksprimiraju DCX za 58,7% (žuto, Slika 4.17.J), zatim broj DCX-pozitivnih ćelija za 61,47% (zeleno, Slika 4.17.K) i na kraju broj Ki67-pozitivnih ćelija za 31,11% (crvena fluorescencija, Slika 4.17.L). Za razliku od ASK, nakon HBO, broj DCX-pozitivnih progenitora, koji eksprimiraju Ki67, neznatno je povećan (6,52%) u poređenju sa FK (žuto, Slika 4.17.J), dok je broj Ki67-pozitivnih ćelija povećan za 22,22% (crvena fluorescencija, Slika 4.17.L). Broj DCX-pozitivnih ćelija u LHBO grupi je bio blago smanjen (3,67%) u odnosu na FK. Nakon određivanja broja pozitivnih ćelija, određen je udeo progenitora, koji eksprimiraju Ki67 u svim ispitivanim grupama. U svim grupama životinja, FK, L i LHBO, skoro isti broj DCX-pozitivnih ćelija koeksprimirao je Ki67 (42,2%, 45,2% i 46,7%). Udeo je najveći u LHBO grupi, u kojoj su skoro polovinu svih DCX-pozitivnih ćelija činili proliferišući nezreli neuroni (Ki67/DCX-pozitivni). Ovi rezultati sugerišu da je ASK smanjila broj proliferišućih i broj ukupnih progenitora, koji eksprimiraju DCX, kao i broj svih Ki67-pozitivnih ćelija. Nasuprot tome, HBO tretman je povećao broj ćelija koje proliferišu nakon povrede.

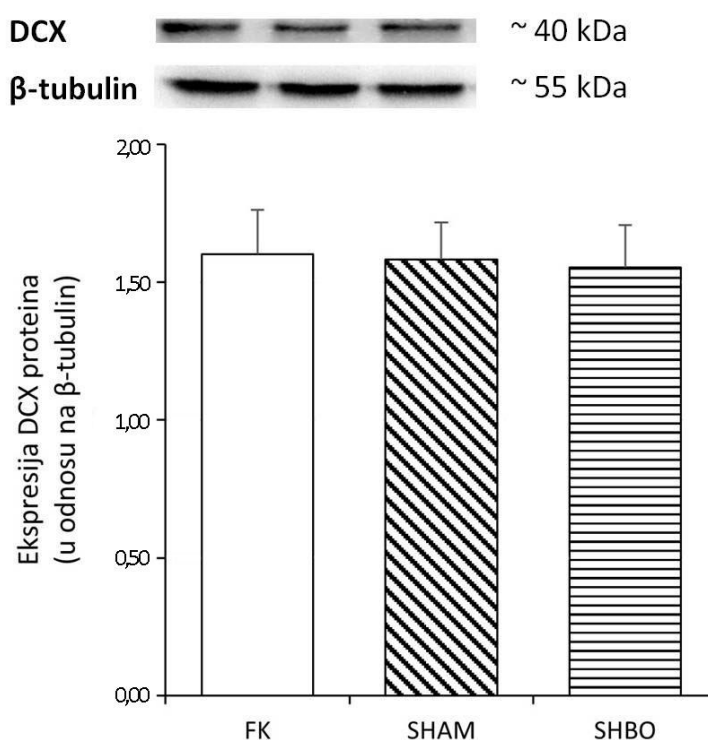


Slika 4.17. Efekat ASK i HBO tretmana na ćelijsku proliferaciju u DG hipokampusa. Reprerzentativne mikrofografije imunofluorescentnog bojenja nezrelih nervnih ćelija (DCX, zeleno) i proliferišućih ćelija (Ki67, crveno) u DG hipokampusa na koronalnim presecima kontrolnih (A-C), operisanih (D-F) i HBO tretiranih (G-I) životinja. Koronalni preseki FK životinja su obojeni sa DAPI (tamno plavo; A-C, insert) u cilju vizualizacije jedara ćelija. Ki67 signal je ograničen na ćelijsko jedro (crveno; A,C insert). Nasuprot tome, DCX signal je uglavnom bio lociran u citosolu i nastavcima (zeleno; A,B, insert), koji se prostiru od SGZ do molekularnog sloja (A,B, vrhovi strelica). ASK je smanjila ekspresiju DCX (E, zeleno) i Ki67 (F, crveno) u SGZ, kao i koekspresiju Ki67/DCX (D, žuto). Nasuprot tome, HBO je povećao broj DCX-pozitivnih neurona sa nastavcima koji se protežu do molekularnog sloja (G,H strelice) i povećao broj Ki67-pozitivnih ćelija u SGZ, hilusu i molekularnom sloju (I, crvena fluorescencija, zvezdica). (J-L) Ki67/DCX-, DCX- i Ki67-

pozitivne ćelije su prebrojane duž cele SGZ DG. Dok ASK drastično smanjuje broj svih izbrojanih ćelija ASK, nakon HBO tretmana, broj proliferišućih nezrelih neurona bio je sličan broju ćelija primećenom u FK. Međutim, u LHBO grupi, proliferacija ukupnih Ki67-pozitivnih ćelija je značajno povećana u odnosu na FK. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom (* $p < 0,001$ FK vs. L, # $p < 0,001$ L vs. LHBO). Skala 50 μ m (A-I). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); lezija (L); L+HBO (LHBO); molekularni sloj (MS); subgranularna zona DG (SGZ).

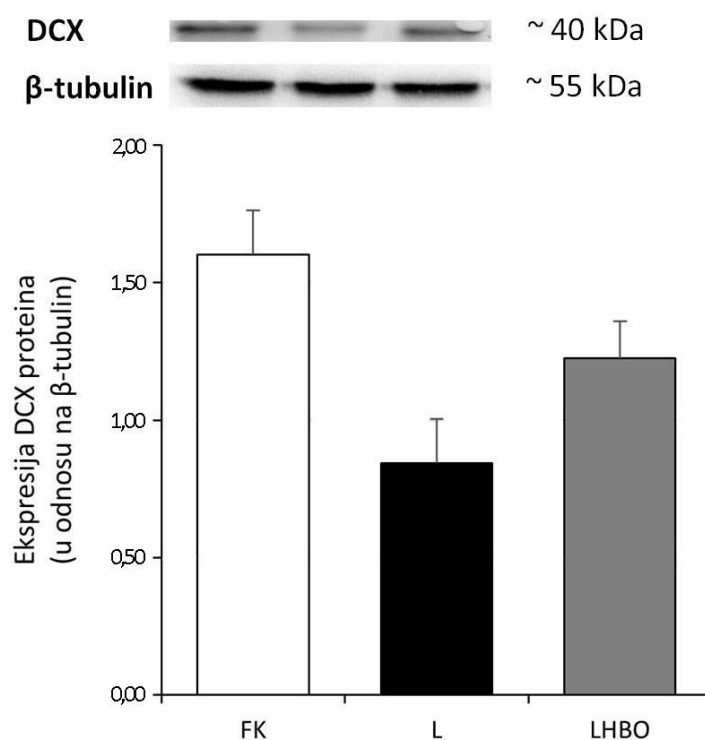
4.4.5. Western blot analiza DCX

Imunoblot analiza ekspresije DCX proteina u desnom hipokampusu je pokazala da nije došlo do značajne promene njegove ekspresije između ispitivanih kontrolnih grupa (FK vs. SHAM $p=1,00$; FK vs. SHBO $p=1,00$; SHAM vs. SHBO $p=1,00$) (Slika 4.18), pa su sva kasnija poređenja urađena u odnosu na FK.



Slika 4.18. Imunoblot analiza ekspresije DCX proteina u hipokampusu FK, SHAM i SHBO. Nije pokazana statistički značajna razlika u nivou ekspresije DCX proteina između ispitivanih grupa. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom (FK vs. SHAM $p=1,00$; FK vs. SHBO $p=1,00$; SHAM vs. SHBO $p=1,00$). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO).

Takođe, ni u grupama L i LHBO nije došlo do statistički značajne promene ekspresije DCX proteina u odnosu na FK (Slika 4.19).



Slika 4.19. Imunoblot analiza ekspresije DCX proteina u hipokampusu FK, operisanih i HBO tretiranih životinja. Nije pokazana statistički značajna razlika u nivou ekspresije DCX proteina između ispitivanih grupa. Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Nivo značajnosti je ispitivan jednostrukom ANOVA sa Turkey post hoc testom (FK vs. L $p=0,104$; FK vs. LHBO $p=0,701$; L vs. LHBO $p=0,694$). Skraćenice: fiziološka kontrola (FK); SHAM kontrola (SHAM); SHAM + HBO (SHBO); lezija (L); L+HBO (LHBO).

5. DISKUSIJA

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju odgovor mikroglije, astrocita i neurona oko mesta lezije na ablaciju senzomotornog korteksa (ASK) i primenjeni tretman hiperbaričnom oksigenacijom (HBO). Takođe, jedan deo rezultata posvećen je ispitivanju procesa adultne neurogeneze u subgranularnoj (SGZ) i subventikularnoj zoni (SVZ) posle ASK i HBO tretmana u eksperimentalnom modelu povrede mozga.

Trenutni terapijski protokoli za TBI uključuju farmakoterapiju, hirurške procedure, kognitivnu i fizikalnu terapiju, ali i dalje ne dovode do potpunog izlečenja (Thapa i sar., 2021; Heredia i sar., 2021). Još uvek se traga za procedurama koje će dovesti do kompletnog neurološkog i histološkog oporavka povređenog tkiva. Smatra se da bi pravovremena primena terapijskih procedura koje deluju u isto vreme na više mehanizama sekundarnog oštećenja dala najbolje rezultate (Heredia i sar., 2021). Od farmakoterapije najčešće se koriste: antiinflamatorni lekovi, antioksidansi, inhibitori kaspaza, eritropoetin (Heredia i sar., 2021). Neuroinflamacija ima važnu i dvojak uлогу u patofiziologiji TBI. Uključuje aktivaciju lokalnih ćelija mikroglije i regrutovanje imunih ćelija iz cirkulacije, kao i proizvodnju inflamatornih citokina (Bergold, 2016). Neuroinflamacija je štetna, jer doprinosi povredi mozga nakon TBI, ali sa druge strane je neophodna za uklanjanje štetnih supstanci nakon TBI, kao što je npr. debris ćelija. Pored toga, predstavlja izvor antiinflamatornih citokina i faktora rasta (Russo i McGavern, 2016). Zbog toga je razjašnjavanje uloge osnovnih molekularnih mehanizama neuroinflamacije u patologiji TBI izuzetno važno za pronalaženje potencijalnih, novih terapijskih mesta nakon TBI.

Ćelije mikroglije mogu se brzo aktivirati kao odgovor na patološke promene u centralnom nervnom sistemu (CNS) (Chiu i sar., 2016). Poslednjih godina otkrivena su dva polarizaciona stanja aktivirane mikroglije, fenotip M1 i fenotip M2 (Oruhuela i sar., 2016), baš kao i kod makrofaga u ostalim tkivima (Sica i Mantovani, 2012). Dok je fenotip M1 povezan sa oslobađanjem nekoliko proinflamatornih citokina među kojima je i faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α), fenotip M2 je odgovoran za oslobađanje antiinflamatornih citokina, npr. interleukina-10 (IL-10), ali je povezan i sa procesima neuralne regeneracije, kao što su neurogeneza, angiogeneza, oligodendrogenaza i remijelinizacija (Loane i Kumar, 2016). Kako je akutna neuroinflamacija povezana i sa regenerativnim procesima, primena antiinflamatornih lekova nakon TBI može da dovede čak i do pogoršanja simptoma (Bergold, 2016).

Nakon ASK, modela povrede koji je korišćen u ovoj tezi, dolazi do aktivacije mikroglije i promene njene morfologije. Ovi rezultati pokazuju povećanje koekspresije ED1 i TNF- α nakon traumatskog oštećenja mozga, a smanjenje koekspresije ED1 i IL-10, što govori u prilog polarizaciji mikroglije nakon TBI. Naime, u ovom istraživanju nakon TBI dominira proinflamatorni (M1) fenotip mikroglije. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Kumara i saradnika koja je pokazala da mikroglija koja je izolovana 7 dana nakon kontrolisanog kortikalnog udarca (CCI) ispoljava M1 fenotip. Prema ovim autorima M2 mikroglija je prisutna prvih nekoliko dana, da bi nakon 7 dana bila zamenjena sa M1 fenotipom (Kumar i sar., 2016), što se verovatno dogodilo i u istraživanju sprovedenom u sklopu ove doktorske disertacije, s obzirom da je imunohistološka analiza rađena nakon poslednjeg HBO tretmana, odnosno 10. dana posle ASK. Na osnovu ovoga dolazi se do zaključka da rani M2 odgovor posle nekog vremena postaje disfunkcionalan. Dodatno, u literaturi je pokazano da u akutnoj fazi povrede postoji i mešoviti fenotip mikroglije, koja eksprimira i M1 i M2 markere nakon CCI modela moždane povrede (Morganti-Kossmann i sar., 2019).

Sa druge strane, na presecima mozga životinja, koje pripadaju LHBO grupi, uočene su ED1/IL-10-pozitivne ćelije, koje odgovaraju antiinflamatornom (M2) fenotipu mikroglije. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Lima i saradnika koja je pokazala da HBO dovodi do smanjenja neuroinflamacije. U grupi životinja koje su tretirane HBO nakon povrede mozga

pokazan je manji stepen mikroglioze u odnosu na netretiranu grupu (Lim i sar., 2017). Takođe, pokazano je da protektivni efekat HBO, nakon povrede mozga, direktno ili indirektno utiče na fenotipizaciju i aktivaciju mikroglije. Naime, dobro je poznato da je jedan od puteva aktivacije mikroglije preko receptora TLR4 (engl. *Toll-like receptor 4*), kao i to da endogeno sekretovani Gal-3 (*galectin-3* protein) parakrinim dejstvom dovodi do ushodne regulacije i ekspresije ovog receptora (Lim i sar., 2017). Sa druge strane, studija Wu i saradnika dokazala je da je HBO snizila ekspresiju Gal-3 i TLR 4 i na taj način smanjila aktivaciju mikroglije (Wu i sar., 2018). Dobijeni podatak ukazuje i na indirektni efekat HBO na sprečavanje aktivacije ćelija mikroglije (Xing i sar., 2018). Ovi literaturni podaci su u skladu sa rezultatima ove teze, koji takođe pokazuju manji broj aktiviranih, ED1-pozitivnih ćelija mikroglije nakon HBO tretmana.

HBO tretman primenjen nakon povrede mozga povećava ekspresiju IL-10. Naime, oko mesta lezije u LHBO grupi uočeno je povećanje koekspresije ED1/IL-10, a smanjenje koekspresije ED1/TNF- α proteina. Ovi rezultati ukazuju da HBO dovodi do polarizacije mikroglije i da nakon HBO tretmana dominira M2 u odnosu na M1 fenotip. HBO, osim što smanjuje reaktivnu mikrogliozu oko mesta lezije, utiče i na morfologiju mikroglije. Mikroglija nakon HBO tretmana ispoljava sličnu morfologiju kao za vreme mirovanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Lima i saradnika, koja je pokazala da HBO značajno inhibira aktivaciju mikroglije i proizvodnju proinflamatornih citokina nakon povrede mozga. Naime, navedeni autori su pokazali da HBO inhibirajući ekspresiju TNF- α , poboljšava funkcionalne ishode nakon traumatskog oštećenja mozga i preporučili HBO tretman kao potencijalni tretman za ponašanja slična depresiji, a koja su indukovana povredom mozga (Lim i sar., 2017). Takođe, studija Wanga i saradnika, koja je ispitivala uticaj HBO na polarizaciju mikroglije nakon intracerebralne hemoragije, pokazala je sniženu aktivnost M1 mikroglije i smanjenu ekspresiju proinflamatornih citokina (TNF- α i IL-1 β) (Wang i sar, 2019). Liang i saradnici (Liang i sar., 2021) su pratili nivo ekspresije markera arginaza 1 (Arg1) i potvrdili su da HBO terapija utiče na povećanje broja M2 makrofaga. Dodatno, Loane i saradnici su pokazali da mikroglija može biti i hronično aktivirana u korteksu, talamusu i žuljevitom telu (lat. *corpus callosum*). Aktivirana mikroglija može da bude prisutna, čak i do godinu dana nakon povrede mozga. Nažalost, hronična aktivacija mikroglije ostavlja različite posledice. Naime, udružena je sa progresivnom ekspanzijom lezije, gubitkom neurona i demijelinizacijom (Loane i sar., 2014). Sa druge strane, studija koja se bavila uticajem HBO pretretmana na pacove sa indukovanom intracerebralnom hemoragijom, pokazala je da HBO pretretman predstavlja izvesni vid prevencije od nastanka neuroinflamacije i oštećenja nakon TBI, obzirom da je doprineo smanjenju ekspresije M1 fenotipa (Wang i Bil, 2019).

Povrede CNS izazivaju aktivaciju i proliferaciju astrocita. U procesu reaktivne astroglioze reaktivni astrociti uvećavaju ćelijska tela (hipertrofija) i povećavaju složenost protoplazmatičnih nastavaka. Mešanje astrocitnih nastavaka sa oligodendrocitima, meningealnim ćelijama, mikroglijom i fibroblastima postepeno se razvija u strukturu nalik na (glijalni) ožiljak, koja predstavlja fizičku prepreku regeneraciji aksona u CNS i sprečava oporavak nakon TBI (Favcett i Asher, 1999). Kao jedan od markera reaktivne glioze koristi se intermedijarni filament GFAP (Acas-Fonseca i sar., 2016). U ovom istraživanju nakon ASK došlo je do aktivacije astrocita i njihove akumulacije oko mesta lezije u vidu GFAP-pozitivnog glijalnog ožiljka. Predložena su tri mehanizma za koja se smatra da su odgovorni za nastanak povećanog broja astrocita nakon povrede: 1) dediferencijacija GFAP-pozitivnih astrocita i njihova proliferacija, 2) proliferacija NG2-pozitivnih progenitora, koji se nalaze širom mozga i 3) migriranje progenitora iz subventrikularne zone (Buffo i sar., 2008). Sa druge strane, Chang i saradnici su pokazali da je većina reaktivnih astrocita nakon povrede ipak lokalnog porekla (Chang i sar., 2016). Astrociti aktivacijom prolaze kroz set morfoloških, transkripcionih i funkcionalnih promena, koje dovode do njihove transformacije (Eskartin i

sar., 2021). Preterano aktivirani astrociti nisu u mogućnosti da regulišu koncentraciju neurotoksina i dodatno pogoršavaju situaciju nakon povrede (Rodrigues i sar., 2011). Povećan broj GFAP-pozitivnih ćelija oko mesta lezije prikazan u ovoj doktorskoj tezi je u saglasnosti sa literaturnim rezultatima (Zhang i sar., 2012). Ovome u prilog govore i pretkliničke studije koje su pokazale da miševi kojima nedostaje GFAP ispoljavaju nepravilno odvijanje astroglioze, kao i hroničnu disfunkciju krvno-moždane barijere (KMB) nakon fokalne povrede mozga (Burda i sar., 2016).

U ovoj tezi, GFAP-pozitivni astrociti u L grupi, neposredno oko mesta lezije, su u isto vreme i IL-10 negativni, što ukazuje na prisutvo proinflatornog fenotipa astrocita. U literaturi još uvek nije pokazano da li samo jedan tip reaktivnih astrocita formira glijalni ožiljak ili učestvuju i A1 i A2 reaktivni astrociti. Naime, pretpostavlja se da najviše učestvuje A2 tip, jer ovi astrociti sekretuju neurotrofičke faktore koji omogućavaju regeneraciju aksona, ali sa druge strane pokazano je i prisustvo A1 tipa, koje se objašnjava njihovom ulogom u ograničavanju oštećenog tkiva (Fan i Huo, 2021).

Sa druge strane intermitentan HBO tretman, primenjen u toku 10 dana nakon povrede mozga, dovodi do aktivacije manjeg broja astrocita, ali i do pomeranja polarizacije reaktivnih astrocita u smeru antiinflatornog A2 fenotipa. Rezultati ove doktorske disertacije su u skladu sa studijom Liu i saradnika koji su pokazali da HBO tretman značajno poboljšava kognitivne funkcije i inhibira proliferaciju astrocita (Liu i sar., 2013). Nedavno, Xiu i saradnici su pokazali da se inhibicija astroglioze odvija nishodnom regulacijom ERK1/2 (kinaza regulisana ekstracelularnim signalom 1/2) signalnog puta posredovanog faktorom rasta trombocita (PDGF-BB) (Xiu i sar., 2023). Takođe, pokazali su da HBO tretman, pored inhibicije proliferacije ćelija glije, stimuliše regeneraciju sinapsi i neurona i posledično olakšava zarastanje rana. Dodatno, Xing i saradnici su zaključili da astrociti pozitivno reaguju na O₂ kao stimulus i da upravo to opravdava potencijalnu kliničku primenu HBO u terapiji TBI (Xing i sar., 2018). Da je poželjno uključiti HBO u terapijski protokol govori u prilog i činjenica da primena HBO odmah nakon povrede, ali i odložena primena HBO značajno redukuju reaktivnu astogliozu kod miševa nakon povrede mozga (Baratz-Goldstein i sar., 2017).

Što se tiče morfoloških karakteristika astrocita analiziranih u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazali smo da GFAP-pozitivni astrociti u L grupi imaju veliko telo i dugačke nastavke u odnosu na astrocite, kontrolnih i LHBO grupe. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Zou i saradnika (Zou i sar., 2019), koji su pokazali da A1 astrociti imaju hipertrofirano telo i dugačke nastavke. Kako su u našoj studiji u LHBO grupi astrociti i IL-10-pozitivni, oni imaju hipertrofirano telo, ali kraće nastavke, koji su po dužini slični nastavcima astrocita u FK grupi. Studija Althammer i saradnika je pokazala da sa promenom ekspresije ćelijskih markera, pri čemu dolazi do povećane ekspresije markera za A1 tip, astrociti pokazuju morfološke promene u vidu povećanja površine, volumena, dužine filamenata i veličine tela (Althammer i sar., 2020).

Na osnovu dobijenih rezultata i literaturnih podataka može se zaključiti da u korišćenom modelu povrede mozga pacova HBO tretman ispoljava svoje pozitivne efekte preko IL-10, kao jednog od mehanizama preko kojih deluje. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studija koje su pokazale da IL-10 redukuje zapaljenja nakon povrede mozga i kičmene moždine (Zhang i sar., 2015; Nakajima i sar., 2017). Naime, IL-10 smanjuje astrogliozu time što direktno inhibira TNF- α (Peruzzaro i sar., 2019). U studiji Peruzzaro i saradnika pokazano je da transplantacija mezenhimalnih matičnih ćelija dizajniranih da prekomerno eksprimiraju IL-10 može da smanji inflamaciju i da na taj način utiče na oporavak oštećenog područja. Ovo se objašnjava promenom fenotipa makrofaga sa proinflatornog, u fenotip za oporavak, čime se naglašava mogućnost upotrebe IL-10 u terapiji TBI (Peruzzaro i sar., 2019). Takođe, istraživanje Chen i saradnika je potvrdilo da HBO

obezbeđuje neuroprotekciju i promoviše funkcionalni oporavak nakon TBI ublažavajući inflamaciju povećanom proizvodnjom IL-10 u moždanom tkivu (Chen i sar., 2014). Oni su pokazali da je nedostatak IL-10 pogoršao povredom mozga izazvane motorne i kognitivne ispade. Naime, nedostatak IL-10 je doveo do povećane apoptoze, inflamacije i poništio je terapijske efekte HBO kod miševa nakon TBI. Nesumnjiv je značaj IL-10 u sprečavanju širenja zapaljenja, kao i u procesu oporavka neurona. Gotovo odmah nakon povrede neurona, IL-10 mRNA je povišeno eksprimirana, dok koncentracija citokina raste rapidno u prvih 2h od povrede, nakon čega se postepeno i u manjoj meri povećava u toku 24h (Gracia i sar., 2017). Utvrđeno je da se nakon subkutane injekcije IL-10, u prvom satu nakon traume, značajno redukuje cerebralni edem i poboljšava oporavak motornih i kognitivnih funkcija (Gracia i sar., 2017). U prilog tome govore i rezultati istraživanja na miševima kod kojih ne postoji ekspresija IL-10. Kod ovakvih eksperimentalnih životinja primena HBO nije dala rezultate u redukciji edema, smanjenju veličine lezije i očuvanju motornih i kognitivnih funkcija. Ista primena terapije kod divljeg tipa miševa, pokazala je znatno poboljšanje navedenog, što se slaže sa dobijenim rezultatima (Chen, 2014).

Nestin je citoskeletni protein koji pripada grupi intermedijarnih filamenata. Eksprimira se u nediferenciranim ćelijama CNS tokom razvića, ali i u adultnom dobu. Marker je za matične/progenitorske ćelije u CNS (Suzuki i sar., 2010). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je oko mesta lezije i u SVZ prisutna nestin-imunoreaktivnost u L grupi. Kako se zna da je ekspresija nestina povećana nakon povrede mozga, nestin se koristi i kao marker reaktivne astroglioze (Božić i sar., 2021). Rezultati ove disertacije su u skladu sa studijom koja je pokazala da su nakon eksperimentalnog modela povrede CCI, nestin-pozitivne ćelije prisutne u uskom pojasu oko mesta povrede (Park i sar., 2021). S obzirom da su oko mesta lezije prisutne nestin-pozitivne ćelije pretpostavljamo da ove ćelije predstavljaju reaktivne astrocite ili neuroblaste. Rezultati ove disertacije pokazuju da je nakon ASK prisutna koekspresija nestin/IL-10 oko mesta lezije. Park i saradnici su pokazali da nisu sve nestin-pozitivne ćelije u isto vreme i GFAP-pozitivne, što bi odgovaralo hipotezi ove disertacije da nestin-pozitivne ćelije mogu predstavljati i reaktivne astrocite i neuroblaste (Park i sar., 2021). Da bi se ovakva hipoteza potvrdila, trebalo bi u budućim istraživanjima ispitati ekspresiju GFAP kod nestin-pozitivnih ćelija nakon ASK.

Na presecima mozgova životinja iz LHBO grupe primećena je izraženija ekspresija nestina oko mesta lezije i u SVZ. Ovi rezultati su u skladu sa studijom u kojoj je ispitivan uticaj električne stimulacije prethodno povređenog tkiva mozga. Naime, autori su pokazali da električna stimulacija povređenog tkiva nakon CCI povećava broj nestin-pozitivnih ćelija u ipsilateralnom korteksu. Ove ćelije se pružaju od ivica povređenog tkiva i zalaze duboko u korteks (Park i sar., 2021). Autori ove studije smatraju da električna stimulacija, kao tretman, simultano olakšava migraciju NSC ka povređenom korteksu i ekspresiju nestina od strane GFAP-pozitivnih astrocita što ide u prilog zaključku da HBO tretman korišćen u doktorskoj tezi olakšava reparaciju oštećenog tkiva i proces adultne neurogeneze oko mesta lezije, dovodeći do pojačane ekspresije nestina nakon ASK.

U SVZ primećen je veliki broj nestin-pozitivnih ćelija, koje su usmerene ka mestu lezije. Povećana ekspresija nestina nakon povrede u SVZ nastaje kao posledica stimulacije adultne neurogeneze, a nestin-pozitivne ćelije predstavljaju neuroblaste. Ovi rezultati su u skladu sa studijom sprovedenom na eksperimentalnom modelu moždanog udara u kojoj je pokazano da je adultna neurogeneza nakon povrede, takođe, povećana u SVZ (Nemproirovich-Danchenko i Khodanovic, 2019). Dodatno, u studiji koja je koristila isti model povrede kao u ovoj tezi, ali na drugim eksperimentalnim životinjama (miševima), uočeno je prolazno povećanje stepena proliferacije u obe SVZ (ipsilateralnoj i kontralateralnoj) i posledično povećanje broja neuroblasta (Saha i sar., 2013). Mnogobrojna istraživanja su pokazala da nakon povrede dolazi do migracije neuroblasta iz ipsilateralne SVZ ka oštećenom, ali i ka neoštećenom

korteksu (Ramaswamy i sar., 2005; Saha i sar., 2013; Kaneko i sar., 2017; Bressan i Saghatelian, 2021). Migracija neuroblasta ka neoštećenom korteksu se objašnjava činjenicom da kontralateralni korteks preuzima funkciju oštećenog korteksa (Ramaswamy i sar., 2005). Takođe, migracija neuroblasta ka mestu lezije je moguća i iz kontralateralne SVZ. Neuroblasti iz kontralateralne SVZ migriraju preko srednje linije ka ipsilateralnom žuljevitoj telu, pa sve do mesta lezije (Wan i sar., 2016). Međutim, u studiji Saha i saradnika iako je pokazana povećana proliferacija u kontralateralnoj SVZ, nije uočena migracija ovih ćelija ka oštećenom korteksu (Saha i sar., 2013).

Sa druge strane, HBO tretman nakon ASK dovodi do dodatne stimulacije proliferacije NSC u SVZ zoni gde je prisutan veliki broj nestin/IL-10 pozitivnih NSC. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Yang i saradnika koji su nakon povrede mozga pacova pokazali da HBO tretman stimuliše neurogenezu u SVZ i ukazali na povezanost stimulisane neurogeneze sa poboljšanjem neuroloških funkcija. Takođe, pokazali su da inhibicija receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGFR) suprimira proliferaciju NSC indukovanu HBO tretmanom *in vitro* i potvrdili da HBO stimuliše proliferaciju NSC aktivacijom VEGF/ERK signalnog puta (Yang i sar., 2017). Hu i saradnici su pokazali da čak i odloženi tretman HBO dovodi do stimulacije neurogeneze i poboljšava neurološke funkcije putem ROS/HIF/ β -katenin osovine (Hu i sar., 2014).

HBO tretman, ispitivan u ovoj tezi, nakon ASK stimuliše migraciju NSC ka mestu lezije, kao i maturaciju neuroblasta i njihovu diferencijaciju u zrele neurone. Naime, HBO tretman menja morfologiju prekursorskih ćelija u morfologiju zrelih ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Shandley i saradnika, koja je pokazala kognitivno poboljšanje pacijenata sa lakim i umereno teškim TBI nakon HBO tretmana, a koje je u korelaciji sa stepenom mobilizacije NSC (Shandley i sar., 2017). Dalje, u studiji koju su sprovedli Wang i saradnici, a koja se bavila ispitivanjem efekta HBO tretmana nakon hipoksično-ishemičnog oštećenja mozga, pokazano je da HBO stimuliše migraciju i diferencijaciju NSC. Naime, na mestu lezije u tretiranoj grupi pokazano je prisustvo novonastalih neurona, oligodendrocita i mijelina (Wang i sar., 2009).

Zanimljivo zapažanje je da produkcija i migracija novih neurona može trajati čak i mesecima nakon povrede. Naime, dugogodišnja istraživanja su pokazala da trajanje procesa adultne neurogeneze zavisi od modela povrede, koji je korišćen za ispitivanje produkcije i migracije neuroblasta (Nemirovich-Danchenko i Khodanovic, 2019). U studiji, koja je koristila CCI model povrede na miševima, pokazano je da neuroblasti migriraju već prvog dana, pri čemu migracija dostiže vrhunac sedmog dana nakon povrede. Migracija neuroblasta u ovom slučaju trajala je čak dvadeset jedan dan (Wu i sar., 2023). Nasuprot tim rezultatima, Saha i saradnici su pokazali da migracija neuroblasta nakon ASK, počinje drugog dana od povrede, a traje i do 2 meseca nakon povrede (Saha i sar., 2013). Zatim, studija Goingsa i saradnika pokazala je da su neuroblasti, koji su obeleženi retrovirusnim vektorom i koji su migrirali iz SVZ, prisutni na mestu lezije 3 nedelje nakon povrede (Goings i sar., 2004).

U studiji Sahe i saradnika pokazano je da nakon povrede postoji i više načina migracije. Naime, neuroblasti mogu da migriraju u lancima ili pojedinačno (Saha i sar., 2013). Nakon povrede, neuroblasti nastavljaju da se kreću kao agregati u sklopu rostralnog migratornog puta (RMP). Po izlasku iz RMP, neuroblasti ulaze u belu masu (žuljevito telo), gde se još uvek kreću u vidu agregata, ali je primećena migracija i pojedinačnih neuroblasta. Kada stignu u korteks, svi neuroblasti se razdvajaju i pojedinačno migriraju ka mestu lezije (Saha i sar., 2013). Pojedinačne NSC, koje su nestin/IL-10-pozitivne, primećene su i nakon HBO tretmana. Ove ćelije se kreću izvan RMP i usmerene su ka mestu lezije. Kaneko i saradnici su pokazali da su nakon povrede lanci, kojima se neuroblasti kreću u vidu agregata, oštećeni i da se zbog toga neuroblasti karakterišu bidirekcionim kretanjem (Kaneko i sar., 2017). Mana neuroblasta, koji

se kreću pojedinačno, upravo je odsustvo snažne usmerenosti neuroblasta ka mestu lezije, koja ih karakteriše kada se kreću u lancima (Kaneko i sar., 2017).

Migracija neuroblasta se dešava zahvaljujući kontaktu neuroblasta sa okolnim ćelijama, ali i interakciji sa proteinima, koji su sekretovani od strane ćelija u povređenom regionu (Kaneko i sar., 2017; Bressan i Saghatelian, 2021). Bitno je napomenuti da se migracija ne odvija kontinuirano, već su periodi migracije isprekidani stacionarnim fazama tokom kojih je pokretan jedino vodeći nastavak neuroblasta (Bressan i Saghatelian, 2021). Smatra se da postoji više vrsta interakcije neuroblasta sa astrocitima. Navodi se da je Slit-Robo interakcija jedna od njih. Slit je molekul koga sintetišu neuroblasti, a vezuje se za Robo receptore na astrocitima. Zaista, posle vezivanja Slit1 za Robo2 receptore, astociti formiraju glijalnu cev, koja omogućava usmerenu i brzu migraciju neuroblasta (Kaneko i sar., 2010). Nakon povrede, u većini slučajeva tokom migracije neuroblasti su u kontaktu sa krvnim sudovima i GFAP-pozitivnim reaktivnim astrocitima (Saha i sar., 2013). Neuroblasti koristeći Slit-Robo interakciju nakon povrede dovode do toga da reaktivni astrociti pružaju svoje nastavke van RMP (Kaneko i sar., 2018). Pored Slit molekula, navodi se da i SDF-1 (engl. *stromal cell derived factor-1*), koga sintetišu endotelne ćelije, nakon povrede dovodi do aktivacije signalnog puta u reaktivnim astrocitima što uzrokuje pokretanja neuroblasta (Saha i sar., 2013). Takođe, u procesu migracije učestvuju hemoatraktanti: protein-1 (sintetišu ga mikroglija i astrociti), osteopontin (sintetiše ga mikroglija/makrofagi) i BDNF (sintetišu ga astrociti) (Kaneko i sar., 2017; Wu i sar., 2023). Na kraju, smatra se da neuroblasti migriraju duž glijalne tube upravo vođeni BDNF gradijentom, čija je koncentracija veća na mestu lezije nego u SVZ (Wu i sar., 2023).

Wang i saradnici su predložili potencijalni mehanizam putem koga HBO tretman u trajanju od 21 dana stimuliše proliferaciju i migraciju NSC ka mestu oštećenja u CNS. Naime, na modelu prolazne ishemijske mozga su pokazali da je za migraciju NSC odgovorno vezivanje SDF-1 za hemokinski receptor 4. Između ostalog, pokazali su da je ekspresija BDNF u tkivu oko povrede veća u HBO tretiranoj nego u netretiranoj grupi (Wang i sar., 2022). Pored toga, primena infuzija, koje sadrže neurotrofičke faktore i faktore rasta, dovodi do povećanja broja V-SVZ neuroblasta i novih neurona u povređenom mozgu (Lindvall i Kokaia, 2015). Naime, direktno ubrizgavanje BDNF na mesto lezije dovodi do usmeravanja neuroblasta ka mestu lezije i maturacije neuroblasta na samom mestu lezije. Sa druge strane, pokazano je da inhibicija matriksnih metaloproteinaza (MMP) smanjuje migraciju neuroblasta ka mestu lezije, što znači da su i MMP uključene u regulisanje migracije neuroblasta (Lee i sar., 2006).

Još uvek nije tačno definisano šta se dešava sa progenitorima na mestu lezije. Naime, studija Saha i saradnika pokazala je da se većina progenitora na mestu lezije diferencira u oligodendrocite i astrocite, a manji broj u zrele neurone (Saha i sar., 2013). Dalje, pokazano je da dolazi do predominantno glijalne diferencijacije V-SVZ ćelija nakon povrede mozga odraslog miša (Chang i sar., 2016). Istraživanje procesa adultne neurogeneze nakon CCI sprovedeno na miševima, pokazalo je da postoji dinamika odgovora SVZ na povredu. Naime, prvo dolazi do rane aktivacije B ćelija, što je praćeno smanjenjem broja nestin/GFAP-pozitivnih ćelija. Zatim, dolazi do kasnog odgovora, koji se karakteriše značajnim povećanjem broja neuroblasta (A tip) 30 dana nakon povrede (Battistini i sar., 2023). Ova studija je opovrgla dosadašnje tumačenje da dolazi do povećanja broja C ćelija (prolazno amplifikujućih progenitora) (Thomesen i sar., 2014). HBO stimuliše diferencijaciju NSC u neurone i oligodendrocite, a smanjuje broj astrocita *in vitro* regulacijom Wnt3/ β -katenin i BMP2 (engl. *bone morphogenic proteins*) signalnih puteva (Chen i sar., 2019). Nažalost, veliki broj pretkliničkih studija je pokazao da novonastali neuroni imaju nisku stopu preživljavanja. Naime, Nemirocih-Danchenko i Khodanovic su pokazali da većina neurona nakon ishemijske strijatuma umire, verovatno zbog nepovoljnih uslova u oštećenom tkivu (Nemirovich-Danchenko i Khodanovic, 2019).

Sa druge strane, Meng i saradnici su pokazali da HBO, nakon TBI, smanjujući ekspresiju TLR4 dovodi do smanjenja stepena apoptoze neurona. Pretpostavlja se da inhibicija TLR4/NF-kB signalnog puta može biti jedan od mehanizama kojim se ispoljava neuroprotektivno dejstvo hiperbarične oksigenacije (Meng i sar., 2016). Pored toga, navodi se da HBO inhibira glutamin-sintetazu, redukujući koncentraciju glutamina i glutamata (Chen i sar., 2016). Studija Xing i saradnika je pokazala da HBO smanjuje apoptozu povećanjem ekspresije Bcl-2 (antiapoptotskog gena) uz istovremenu nižu ekspresiju Bax (proapoptotskog gena) (Xing i sar., 2018).

Za otkrivanje oštećenja aksona povredom neoštećenih neurona u ovoj tezi su korišćeni SMI32 (obeležava neurofilamente i može biti marker povrede aksona) i MAP1b, protein povezan sa mikrotubulama, koji je neophodan za razvoj i regeneraciju aksona. Dvojno imunofluorescentno bojenje je pokazalo da povreda mozga dovodi do oštećenja citoskeleta aksona. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom Wu i saradnika, koji su pokazali da nakon teške TBI dolazi do povećane ekspresije SMI32 (Wu i sar., 2021). Naime, oni su pokazali da dolazi do povećanog intenziteta fluorescence SMI32 u korteksu miša nakon CCI. Takođe, Zhang i saradnici su pokazali da nakon povrede dolazi do ushodne regulacije MAP1b. Ovakav rezultat su objasnili činjenicom da u adultnom mozgu nakon ishemije dolazi započinje oporavak tkiva (Zhang i sar., 2016).

Sa druge strane intermitentni HBO tretman u prvih deset dana nakon povrede pokazuje povećanu koekspresiju SMI32 i MAP1b, što odgovara regeneraciji aksona. Ovaj rezultat je u skladu sa studijom koja je pokazala da HBO tretman smanjuje oštećenja aksona (Sri Dewi Untari i sar., 2021). Rezultati te studije su pokazali da HBO tretman dovodi do povećane aktivnosti glutationa i ekspresije IL-1 β . Smatra se da je ovo jedan od mehanizama putem kojeg HBO ispoljava protektivno dejstvo. Naime, primenjeni HBO tretman stimuliše regeneraciju oštećenog tkiva i oporavlja motorne funkcije (Brkić i sar., 2012). Povećan broj MAP1b/SMI32-pozitivnih neurona u regionu oko mesta povrede nakon HBO tretmana pozitivno korelira sa prethodno zapaženim oporavkom motornih deficita (Brkić i sar., 2012).

Istraživanja na genskom nivou nisu pokazala statistički značajnu razliku u ekspresiji *Dcx* oko mesta lezije između ispitivanih grupa. Naime, ni HBO tretman ni ASK nisu uticali na ekspresiju ovog markera novonastalih nezrelih neurona. Navedeni rezultati su u skladu sa studijom Lv i saradnika, koji su pokazali da nakon akutne ishemijske lezije stijatuma ne dolazi do promene ekspresije *Dcx* ni u ipsilateralnom ni u kontralateralnom stijatumu (Lv i sar., 2018).

Za ispitivanje uticaja ASK i HBO na proliferaciju ćelija oko mesta lezije i u SVZ urađeno je dvojno bojenje sa Ki67 i DCX. U korteksu nakon ASK primećen je mali broj DCX-pozitivnih bipolarnih neurona, ali i postojanje Ki67-pozitivnih ćelija, koje su DCX-negativne, što ukazuje da su još neke ćelije u fazi proliferacije. Rezultati ove disertacije nakon HBO tretmana govore o povećanju broja DCX-pozitivnih uni- i bipolarnih neurona i u tom kontekstu možemo da govorimo o povećanoj adultnoj neurogenezi oko mesta lezije. Još uvek je aktuelna debata o izvoru NSC od kojih nastaju novi neuroni u korteksu.

U SVZ nakon ASK na samom početku migratornog puta se nalaze okrugli progenitori dominantno Ki67-pozitivni, organizovani u „grozdastu“ strukturu. Rezultati su u skladu sa studijom Yang i saradnika koji su u istom eksperimentalnom modelu TBI pokazali 7. dana nakon povrede statistički značajan porast BrdU-pozitivnih ćelija u ipsilateralnoj SVZ (u odnosu na kontralateralnu SVZ). Prisutna razlika u broju ćelija se gubi do 14. dana (Yang i sar., 2010). Kao što je pokazano u ovoj tezi, 10. dana nakon ASK prisutan je veliki broj Ki67-pozitivnih ćelija. Može se samo pretpostaviti da se broj ćelija koje proliferišu nakon ASK smanjuje do 14. dana. Nakon primenjenog HBO tretmana dolazi do povećanja broja proliferišućih ćelija koje su i DCX-pozitivne. Na samom početku RMP mladi DCX-pozitivni

neuroni se odvajaju od puta što je prvi put pokazano u ovoj doktorskoj disertaciji. Ovi neuroni se morfološki razlikuju po broja nastavaka. Prisutni su uni-, bi- i multipolarnih neuroni, koji se odvajaju od RMP. Ovakav rezultat ukazuje na uticaj HBO tretmana na ubrzanje maturacije progenitora neurona u SVZ i RMP, koji se prostire od SVZ do mesta povrede.

S obzirom da je adultna neurogeneza u hipokampusu ograničena samo na jedan deo hipokampalne formacije (Kot i sar., 2022), ispitivani su mehanizmi pomoću kojih hiperbarična oksigenacija prevazilazi oštećenja adultne neurogeneze u DG, a koja su indukovana povredom korteksa.

Dobijeni rezultati pokazuju da ASK posledično dovodi do degeneracije neurona u DG i to uglavnom u unutrašnjoj trećini granularnog sloja unutrašnje ivice, koja se nalazi ispod mesta lezije. Obeležavanje ćelija specifičnim markerima potvrđuje da su uglavnom nezreli neuroni u SGZ podložni degeneraciji. Pored toga, pokazano je i da povreda dovodi do smanjenog grananja dendrita pošteđenih neurona. Za obeležavanje i detekciju ćelija koje proliferišu, zajedno sa DCX, markerom neuronskih progenitora, korišćen je endogeno eksprimirani marker Ki67. Naime, pokazano je da ASK radikalno smanjuje broj svih proliferišućih ćelija u SGZ, a naročito onih koje pripadaju neuronalnoj lozi. Najupečatljiviji rezultat ovog istraživanja je pokazana protektivna uloga HBO (Jeremić i sar., 2023). Naime, HBO štiti neurone od degeneracije nakon ASK i u unutrašnjoj i u spoljašnjoj ivici granularnog sloja DG. Takođe, HBO sprečava degeneraciju dendrita i značajno smanjuje gubitak novonastalih nezrelih neurona i uzrokuje povećanu proliferaciju svih ćelija nakon ASK.

Iz metodoloških razloga, mnoge studije koje se bave ispitivanjem efekta povrede korteksa na hipokampus su fokusirane na ćelije koje podležu degeneraciji, zatim na promene u procesu neurogeneze i druge morfološke promene koje se mogu vizualizovati imunološkim bojenjima ili drugim standardnim morfološkim tehnikama. Nekada su promene u samoj morfologiji ćelija suptilne i ne mogu se detektovati klasičnom imunohistohemijom analizom, pa se pribegava teksturalnim analizama da bi ih vizualizovali. U skladu sa time, koristi se i tehnika određivanja fraktalnih i teksturalnih parametara (engl. *Gray level co-occurrence matrix*, GLCM), koja je u našem ranijem istraživanju, pokazala da ASK dovodi do suptilnih morfoloških promena granularnih neurona u DG (Pantić i sar., 2020).

ASK dovodi do oštećenja granularnih neurona DG, na šta ukazuje smanjena NeuN-imunoreaktivnost, koja je prethodno korišćena u cilju predviđanja degeneracije neurona u hipokampusu glodara nakon različitih povreda mozga (Collombet i sar., 2006). Gubitak neurona je najizraženiji u delu granularnog sloja ispod mesta lezije. Ove promene u granularnom sloju verovatno dodatno doprinose oštećenju lokomotorne koordinacije, koje je izazvano povredama korteksa (Brkić i sar., 2012; Lavrnja i sar., 2014). Nakon što je pokazano da ASK dovodi do značajnog gubitka neurona u hipokampusu, koji se manifestuje tanjim granularnim slojem, dalji eksperimenti su sprovedeni u cilju određivanja tačnog dela granularnog sloja koji je pod najvećim uticajem ASK. Pokazano je da ASK dovodi do specifičnog oštećenja hipokampusa, koje pogađa pretežno neurone u unutrašnjoj trećini unutrašnje ivice granularnog sloja. Prikazani rezultati su u skladu sa rezultatima drugih studija na različitim životinjskim modelima povrede mozga, koji su, takođe, pokazali da su neuroni u hipokampusu posebno osetljivi na povrede mozga (Colicos i Dash, 1996; Grady i sar., 2003; Winston i sar., 2013; Gao i sar., 2008; 2011; Winston i sar., 2013).

Sa druge strane, nedavno je pokazano da upotreba CCI, eksperimentalnog modela TBI, dovodi do gubitka neurona pretežno u CA3 regionu hipokampusa (Parga Becerra i sar., 2021). Takođe, u istoj studiji, pokazano je i očuvanje neurona u granularnom sloju DG, s tim što NeuN-pozitivne ćelije u ovom regionu nisu kvantifikovane. Rezultati kvantifikacije intenziteta fluorescencije NeuN bojenja u suprapiramidalnoj (unutrašnjoj) i infrapiramidalnoj (spoljašnjoj) ivici hipokampalnog DG prikazani u ovoj tezi, nisu u skladu sa tim rezultatima.

Naime, nakon ASK uočen je veliki gubitak neurona, kako u unutrašnjoj (42%), tako i u spoljašnjoj (26%) ivici DG. Sa druge strane, nakon HBO tretmana ovaj efekat ASK na granularni sloj DG se skoro u potpunosti smanjuje. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije u kojoj je pokazano da tretman HBO sprečava degeneraciju neurona u granularnom sloju DG (Baratz-Goldstein i sar., 2017).

Pokazano je da eksperimentalni modeli (Colicos i Dash, 1996; Kelly, 2004; Witgen i sar., 2005), težina povrede (Markgraf i sar., 2001.; Hellmich i sar., 2005), kao i starost životinja (Tong i sar., 2002) utiču na distribuciju i broj ćelija koje su zahvaćene procesom degeneracije u hipokampusu. Mnoge studije su pokazale da u zavisnosti od težine povrede dolazi i do vremenski zavisne stimulacije neurogeneze u neurogenim zonama (Ngwenya i Danzer, 2019; Ton i sar., 2020). Zanimljivo je da model povrede korišćen u ovom radu, koji izaziva relativno veliku povredu, pokazuje slično oštećenje adultne hipokampalne neurogeneze, kao i modeli umerenije povrede npr. CCI (Gao i sar., 2008; Yu i sar., 2008).

Kombinacija FJB bojenja sa dvojnim imunofluorescentnim bojenjem specifičnih ćelijskih markera, pokazala je da su pod uticajem ASK uglavnom novonastali neuroni, lokalizovani u SGZ. Da bi se potvrdilo da li ovi progenitori pripadaju neuronskoj lozi, korišćen je DCX, marker novonastalih nezrelih neurona (Couillard-Despres i sar., 2005). Kvantifikacija ćelija, koje eksprimiraju DCX, pokazuje da je broj DCX-pozitivnih nezrelih neurona, nakon ASK, u unutrašnjoj ivici smanjen (za preko 50%) u odnosu na FK. Takođe, primećeno je da je broj DCX-pozitivnih ćelija u manjoj meri, ali ipak vredno pažnje, u spoljašnjoj ivici smanjen (za oko 40%) u poređenju sa FK. Ova zapažanja su u skladu sa rezultatima drugih studija, koji su takođe potvrdili da su upravo DCX-pozitivni nervni progenitori u ipsilateralnom DG ti koji su indirektno podložni povredama mozga i posledično ćelijskoj smrti (Gao i sar., 2008; Yu i sar., 2008; Wang i sar., 2016). Važno je napomenuti da je imunohistohemijska analiza preseka pokazala da pošteđeni DCX-pozitivni nezreli neuroni, uprkos svom preživljavanju, pokazuju značajne promene morfologije, koje su indukovane povredom. Ove promene morfologije se manifestuju skraćivanjem dendrita i smanjenjem dendritske arborizacije. Dobijeni rezultati su u skladu sa studijom u kojoj je vizualizovano prisustvo abnormalnog grananja dendrita nakon povrede mozga (Villasana i sar., 2015). Takođe, pokazano je da TBI indukuje gubitak sinapsi tokom 48h nakon povrede u ipsilateralnom hipokampusu (Jamjoom i sar., 2021). Oštećenje dendrita, praćeno smanjenjem broja dendritskih trnova/spina, može predstavljati potencijalni anatomski supstrat za barem delimično objašnjenje razvoja posttraumatskog deficita pamćenja (Gao i sar., 2011; Winston i sar., 2013). Sa druge strane, deset uzastopnih tretmana HBO deluju protektivno na DCX-pozitivne progenitore, koji se nalaze u neurogenoj zoni DG. Naime, HBO sprečava gubitak DCX-pozitivnih progenitora i povredom izazvano narušavanje njihove morfologije. Ovi rezultati pokazuju da HBO poseduje potencijal da prevaziđe štetne efekte ASK i da zaštiti novonastale neurone od morfološkog propadanja i ćelijske smrti.

Analiza ekspresije *Dcx* u hipokampusu nije pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa. To ukazuje na to da su promene suptilnije i više morfološke prirode. Sa ciljem da identifikujemo tip neurona, koji prolaze kroz proces degeneracije u SGZ, urađeno je dvojno imunofluorescentno bojenje sa DCX, kao markerom ranih, nezrelih, novonastalih neurona i beta-III tubulinom (TUJ1), koji obeležava novonastale, postmitotičke neurone, a eksprimira se posle DCX tokom adultne hipokampalne neurogeneze (Von Bohlen Und Halbach, 2007; Korzhevskii i sar., 2011). Nakon povrede, smanjena DCX/TUJ1-imunoreaktivnost u SGZ unutrašnje ivice DG ispod mesta lezije potvrđuje prethodno pomenuta zapažanja da ASK indukuje selektivnu smrt nezrelih neurona. Takođe, uočeno je da se razvoj novonastalih DCX/TUJ1-pozitivnih neurona dešava ne samo u SGZ, već i u unutrašnjoj i spoljašnjoj trećini granularnog sloja. Na mikrografijama napravljenim pod većim uveličanjem, primećemo je da su u hilusu, pored neurona sa okruglom/ovalnom morfologijom, koji su samo TUJ1-pozitivni, prisutni i DCX/TUJ1-pozitivni neuroni. DCX/TUJ1-

pozitivni neuroni se nalaze na granici između hilusa i granularnog sloja, kao i duboko u hilusu. Takođe, pokazano je da ovi neuroni postoje u svim ispitivanim grupama. Pretpostavlja se da su TUJ1-pozitivne ćelije okruglog/ovalnog oblika, u stvari neuroblasti koji nastaju u hilusu, a zatim, migriraju u SGZ i unutrašnji deo granularnog sloja. Migracija ovih progenitora iz hilusa se dešava sa ciljem povećanja populacije neuronskih progenitora. Značajan deo ovih progenitora diferencira se unutar hilusa u proliferativne neuroblaste i nezrele neurone, verovatno preko prelaznih ćelijskih linija, koje eksprimiraju markere i astrocita i neurona (Namba i sar., 2005). HBO sprečava gubitak DCX/TUJ1-pozitivnih nezrelih neurona, koji se nalaze u SGZ unutrašnje i spoljašnje ivice granularnog sloja. Takođe, HBO povećava pojavu progenitora u hilusu. Štaviše, nakon HBO, DCX/TUJ1-imunoreaktivnost je raspoređena oko samog mesta lezije, što ukazuje da HBO između ostalog povećava i broj neuronskih progenitora oko mesta lezije. Međutim, još uvek nije poznato da li ovi neuroni proliferišu lokalno, na mestu povrede i/ili migriraju duž migratornih puteva. Prema nekim autorima ovi migratorni putevi se protežu od neurogenih regiona, SVZ ili SGZ, do mesta lezije (Masuda i sar., 2007; Zheng i sar., 2013).

Broj DCX/Ki67-pozitivnih ćelija, nakon ASK, posebno u unutrašnjoj ivici DG ispod mesta lezije je statistički značajno smanjen u odnosu na FK. Nakon ASK, frakcije prekursora, koji se aktivno dele (Ki67/DCX-pozitivni) i ukupnih progenitora, koji eksprimiraju DCX, značajno su smanjene (za 60%) u ipsilateralnom DG. Zanimljivo je da je broj ćelija obeleženih samo sa Ki67 smanjen u manjoj meri, što ukazuje da neke populacije ćelija nisu pogođene ASK. Ove ćelije su uglavnom locirane u hilusu, a većina njih je DCX-negativna, što ukazuje da su verovatno glijalnog porekla. To se slaže sa rezultatima studije (Colicos i sar., 1996), koja je pokazala da povreda mozga ne utiče na broj astrocita i oligodendrocita. Takođe, smatra se da iz GFAP-pozitivnih progenitora (Liu i sar., 2010) u SGZ mogu nastati neuronalni progenitori, koji se kasnije razvijaju u granularne neurone. Za razliku od ASK, primena HBO povećava proliferaciju svih ćelija u DG, pri čemu procenat DCX/Ki67-pozitivnih proliferišućih, nezrelih neurona predstavlja oko 50% svih progenitora koji eksprimiraju DCX. Ti rezultati su u skladu sa studijom (Wei i sar., 2015) u kojoj je zapaženo da HBO promovira proliferaciju NSC i štiti procese učenja i pamćenja kod neonatalnog hipoksično-ishemijskog oštećenja mozga.

Traumatsko oštećenje mozga predstavlja kompleksni tip povrede sa širokim spektrom simptoma i različitim stepenom invaliditeta (Peković i sar., 2006). S obzirom da efikasne metode za lečenje i saniranje posledica povrede još uvek ne postoje, traganje za novim pristupima je i dalje u fokusu brojnih istraživanja. Trenutno je u žiži interesovanja ispitivanje efekata HBO na tkivo mozga u modelima različitih povreda mozga i moždanih poremećaja (Wei i sar., 2015; Zhou i sar., 2016; Fischer i sar., 2022). Kako je mehanizam dejstva HBO još uvek nedovoljno ispitan, neophodno ga je dodatno razjasniti u cilju potencijalne primene HBO kao adjuvantne terapije u tretmanu povreda mozga (Zhou i sar., 2016). Kako bi se prišlo korak bliže rasvetljenju dejstva HBO, u prethodnom radu (Peković i sar., 2018) pokušali smo da sumiramo potencijalne molekularne mehanizme, koji se nalaze u osnovi korisnih efekata HBO na funkcionalni oporavak nakon povrede mozga. Prema rezultatima različitih studija, molekularni mehanizmi i signalni putevi, koji radeći ili paralelno ili zajedno, doprinose reparaciji povređenog mozga su: 1) smanjenje sekundarne povrede, 2) povećanje oksigenacije tkiva, 3) smanjenje degeneracije neurona, 4) smanjenje apoptoze, 5) regulisanje oksidativnog/antioksidativnog statusa, 6) smanjenje oksidativnog stresa, 7) smanjenje reaktivne glioze (mikrogliozna, astrogliozna) i glijalnog ožiljka, 8) smanjenje inflamacije, 9) poboljšanje neuronalne plastičnosti, 10) promovisanje sinaptogeneze, neurogeneze i angiogeneze. Shodno tome, HBO pokretanjem svih ovih molekularnih procesa podstiče uspostavljanje lokalnog okruženja, koje stimuliše neurogenezu, čime se omogućava oporavak tkiva i oštećenih funkcija mozga. Mu i saradnici su sugerisali da aktivacija nekoliko signalnih puteva i faktora transkripcije, među kojima su Wnt, faktori koji su indukovani hipoksijom

(HIFs) i CREB (engl. *cAMP response element-binding*), ima važnu ulogu u HBO indukovanoj neurogenezi (Mu i sar., 2011). Pored toga, Yang i saradnici su predložili da aktivacija faktora rasta vaskularnog endotela može biti još jedan potencijalni mehanizam putem kojeg HBO utiče na neurogenezu (Yang i sar., 2017). Nedavno objavljena studija (Ye i sar., 2022) pokazala je da HBO slabi piroptozu, koja predstavlja novi, još uvek nedovoljno istraženi način ćelijske smrti NSC. Smatra se da HBO slabi piroptozu blokiranjem duge nekodirane RNK, koja indukuje piroptozu. Pored toga, rezultati još jedne studije (Wang i sar., 2022) su pokazali da je HBO omogućila ne samo migraciju NSC, već i diferencijaciju u neurone i integraciju u neuronska kola nakon povrede mozga. Štaviše, oni su istakli da je faktor 1, koji je proizveden u stromalnim ćelijama, uključen u regulaciju neurogeneze nakon povrede mozga.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata ove doktorske disertacije može se zaključiti da:

1. ASK, model fokalne povrede mozga, stimuliše aktivaciju mikroglije. Desetog dana nakon ASK ove ćelije uglavnom eksprimiraju TNF- α i oko mesta povrede dominantan je proinflamatorni M1 fenotip. Deset tretmana HBO smanjuje reaktivnu mikrogliozu, ćelije mikroglije su morfološki sličnije mirujućoj mikrogliji i dominantno eksprimiraju antiinflamatorni citokin IL-10 što ukazuje da HBO tretman pomera polarizaciju mikroglije ka antiinflamatornom M2 fenotipu.

2. ASK stimuliše stvaranje glijalnog ožiljka koji ograničava mesto povrede u korteksu. Reaktivni astrociti imaju hipertrofirano telo i dugačke nastavke, IL-10 su negativni i pripadaju proinflamatornom A1 fenotipu astrocita. HBO tretman smanjuje stvaranje glijalnog ožiljka nakon ASK i dovodi do stvaranja sredine koja je pogodna za oporavak povređenog tkiva. U LHBO grupi astrociti su GFAP/IL-10-pozitivni, pripadaju antiinflamatornom A2 fenotipu. Imaju hipertrofisano telo, ali kraće nastavke, koji po dužini nalikuju nastavcima astrocita u kontrolnoj grupi što je potvrđeno i morfometrijskom analizom ovih ćelija.

3. Primenjeni HBO tretman smanjuje oštećenja citoskeleta i degeneraciju nervnih ćelija izazvane ASK i doprinosi očuvanju morfologije neurona.

4. ASK dovodi do supresije adultne neurogeneze oko mesta lezije i SVZ, dok HBO tretman stimuliše procese neurogeneze oko mesta lezije i u SVZ. HBO povećava proliferaciju NSC, stimuliše migraciju neuroblasta ka mestu lezije i ubrzava maturaciju ovih ćelija u SVZ i migratornom putu od SVZ do mesta povrede.

5. ASK pokazuje specifičan uticaj na DG uzrokujući ćelijsku smrt neurona pretežno u unutrašnjoj trećini granularnog sloja i u SGZ DG hipokampusu. HBO tretman sprečava gubitak novonastalih nezrelih neurona i zrelih neurona u granularnom sloju DG i sprečava degeneraciju dendrita nezrelih neurona u SGZ. HBO tretman povećava broj ćelija koje proliferišu nakon povrede.

Imajući u vidu sve dobijene rezultate može se zaključiti da kontinuirani HBO tretman pokazuje neuroprotektivni efekat i stimuliše adultnu neurogenezu u neurogenim zonama mozga. HBO kao adjuvantni tretman u lečenju TBI ispoljava pozitivne efekte, koji potvrđuju korist HBO u sanaciji povreda mozga. Sve to ukazuje da HBO zaslužuje da ima mesto u terapijskim protokolima za lečenje TBI.

7. LITERATURA

- Abbott L, Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol.* 2020;49(1):3-16.
- Acaz-Fonseca E, Avila-Rodriguez M, Garcia-Segura L, Barreto G. Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol.* 2016;144:5-26.
- Ahmadi F, Khalatbary A. A review on the neuroprotective effects of hyperbaric oxygen therapy. *Med Gas Res.* 2021;11(2):72-82.
- Akamatsu Y, Hanafy K. Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics.* 2020;17(2):446-456.
- Althammer F, Ferreira-Neto H, Rubaharan M, Roy R, Patel A, Murphy A, Cox D, Stern J. Three-dimensional morphometric analysis reveals time-dependent structural changes in microglia and astrocytes in the central amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus of heart failure rats. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):221.
- Amanollahi M, Jameie M, Heidari A, Rezaei N. The Dialogue Between Neuroinflammation and Adult Neurogenesis: Mechanisms Involved and Alterations in Neurological Diseases. *Mol Neurobiol.* 2023;60(2):923-959.
- Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(6):335-346.
- Andriessen T, Jacobs B, Vos P. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2010;14(10):2381-92.
- Baratz-Goldstein R, Toussia-Cohen S, Elpaz A, Rubovitch V, Pick C. Immediate and delayed hyperbaric oxygen therapy as a neuroprotective treatment for traumatic brain injury in mice. *Mol Cell Neurosci.* 2017;83:74-82.
- Battistini J, Mastroianni V, Nicolis di Robilant V, Saraulli D, Marinelli S, Farioli Vecchioli S. Role of Running-Activated Neural Stem Cells in the Anatomical and Functional Recovery after Traumatic Brain Injury in p21 Knock-Out Mice. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2911.
- Bergold PJ. Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol.* 2016; 275(3):367-380.
- Bitterman H. Bench-to-bedside review: Oxygen as a drug. *Critical Care.* 2009;13(1):205.
- Bodanapally U, Sours C, Zhuo J, Shanmuganathan K. Imaging of Traumatic Brain Injury. *Radiol Clin North Am.* 2015;53(4):695-715.
- Bozic I, Savic D, Lavrnja I. Astrocyte phenotypes: Emphasis on potential markers in neuroinflammation. *Histol Histopathol.* 2021;36(3):267-290.
- Bressan C, Saghatelian A. Intrinsic Mechanisms Regulating Neuronal Migration in the Postnatal Brain. *Front Cell Neurosci.* 2021;14:620379.
- Brkic P, Stojiljkovic M, Jovanovic T, Dacic S, Lavrnja I, Savic D, Parabucki A, Bjelobaba I, Rakic L, Pekovic S. Hyperbaric oxygenation improves locomotor ability by enhancing neuroplastic responses after cortical ablation in rats. *Brain Inj.* 2012;26(10):1273-84.
- Bruggeman G, Haitsma I, Dirven C, Volovici V. Traumatic axonal injury (TAI): definitions, pathophysiology and imaging-a narrative review. *Acta Neurochir (Wien).* 2021;163(1):31-

44.

- Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013;110(3):207-11
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn A, Mori T, Götz M. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3581-6.
- Burda J, Bernstein A, Sofroniew M. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2016;275(0 3):305-315.
- Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Med Clin North Am*. 2020;104(2):213-38.
- Cash A, Theus M. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3344.
- Chang E, Adorjan I, Mundim M, Sun B, Dizon M, Szele F. Traumatic Brain Injury Activation of the Adult Subventricular Zone Neurogenic Niche. *Front Neurosci*. 2016;10:332.
- Chen C, Yang Y, Yao Y. HBO Promotes the Differentiation of Neural Stem Cells via Interactions Between the Wnt3/ β -Catenin and BMP2 Signaling Pathways. *Cell Transplant*. 2019;28(12):1686-1699.
- Chen C, Zhong X, Smith D, Tai W, Yang J, Zou Y, Wang L, Sun J, Qin S, Zhang C. Astrocyte-Specific Deletion of Sox2 Promotes Functional Recovery After Traumatic Brain Injury. *Cereb Cortex*. 2019;29(1):54-69.
- Chen W, Liang X, Nong Z, Li Y, Pan X, Chen C, Huang L. The Multiple Applications and Possible Mechanisms of the Hyperbaric Oxygenation Therapy. *Med Chem*. 2019;15(5):459-471.
- Chen X, Duan X, Xu L, Zhao J, She Z, Chen W, Zheng Z, Jiang G. Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. *Neuroscience*. 2014;266:235-43.
- Chen Y, Li D, Wang Z, Xu W, Li R, Zhang J. Glutamate metabolism of astrocytes during hyperbaric oxygen exposure and its effects on central nervous system oxygen toxicity. *Neuroreport*. 2016;27(2):73-9.
- Chen Y, Wang L, You W, Huang F, Jiang Y, Sun L, Wang S, Liu S. Hyperbaric oxygen therapy promotes consciousness, cognitive function, and prognosis recovery in patients following traumatic brain injury through various pathways. *Front Neurol*. 2022;13:929386.
- Chidambaram S, Velloso F, Rothbard D, Deshpande K, Cajuste Y, Snyder K, Fajardo E, Fiser A, Tapinos N, Levison S, et al. Subventricular zone adult mouse neural stem cells require insulin receptor for self-renewal. *Stem Cell Reports*. 2022;17(6):1411-1427.
- Chiu C, Liao Y, Yang L, Wang J, Tweedie D, Karnati H, Greig N, Wang J. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2016;272:38-49.
- Christian K, Ming G, Song H. Adult neurogenesis and the dentate gyrus: Predicting function from form. *Behav Brain Res*. 2020;379:112346.

- Colicos M, Dash P. Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits. *Brain Res.* 1996;739(1-2):120-31.
- Collombet J, Masqueliez C, Four E, Burckhart M, Bernabé D, Baubichon D, Lallement G. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neurosci Lett.* 2006;398(3):337-42.
- Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:441-468.
- Cope E, Gould E. Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell.* 2019;24(5):690-705.
- Corrigan J, Hammond F. Traumatic brain injury as a chronic health condition. *Arch Phys Med Rehabil.* 2013;94(6):1199-201.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn H, Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005;21(1):1-14.
- Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, Puskás F, Száraz P, Szelényi P, Bánhegyi G. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):826-38.
- Daly S, Thorpe M, Rockswold S, Hubbard M, Bergman T, Samadani U, Rockswold G. Hyperbaric Oxygen Therapy in the Treatment of Acute Severe Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *J Neurotrauma.* 2018;35(4):623-629.
- de Freitas H, da Silva V, Giraldo-Guimarães A. Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats. *Behav Brain Funct.* 2012;8:58.
- de Miranda A, Zhang C, Katsumoto A, Teixeira A. Hippocampal adult neurogenesis: Does the immune system matter? *J Neurol Sci.* 2017;372:482-495.
- De Wolde S, Hulskes R, Weenink R, Hollmann M, Van Hulst R. The Effects of Hyperbaric Oxygenation on Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis. *Biomolecules.* 2021;11(8):1210.
- Dewan M, Rattani A, Gupta S, Baticulon R, Hung Y, Punchak M, Agrawal A, Adeleye A, Shrimme M, Rubiano A, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2018;1-18.
- Dieni C, Nietz A, Panichi R, Wadiche J, Overstreet-Wadiche L. Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *J Neurosci.* 2013;33(49):19131-42.
- Dixon K. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2017;28(2):215-225.
- Efrati S, Ben-Jacob E. Reflections on the neurotherapeutic effects of hyperbaric oxygen. *Expert Rev Neurother* 2014;14:233-6.
- Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan J, Petzold G, Serrano-Pozo A, Steinhäuser C,

- Volterra A, Carmignoto G, Agarwal A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):312-325.
- Escartin C, Guillemaud O, Carrillo-de Sauvage M. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*. 2019;67(12):2221-2247.
- Fan Y, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int*. 2021;148:105080.
- Fares J, Bou Diab Z, Nabha S, Fares Y. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int J Neurosci*. 2019;129(6):598–611.
- Favaloro F, DeLeo A, Delgado A, Doetsch F. miR-17~92 exerts stage-specific effects in adult V-SVZ neural stem cell lineages. *Cell Rep*. 2022;41(10):111773.
- Fawcett J, Asher R. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):377-91.
- Feigin V, Nichols E, Alam T, Bannick M, Beghi E, Blake N, Culpepper W, Dorsey E, Elbaz A, Ellenbogen R, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18(5):459-480.
- Fernández-Arjona M, Grondona J, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos M. Microglial Morphometric Parameters Correlate With the Expression Level of IL-1 β , and Allow Identifying Different Activated Morphotypes. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:472.
- Fischer I, Shohat S, Levy G, Bar E, Trangle S, Efrati S, Barak B. Hyperbaric Oxygen Therapy Alleviates Social Behavior Dysfunction and Neuroinflammation in a Mouse Model for Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11077.
- Fontán-Lozano Á, Morcuende S, Davis-López de Carrizosa M, Benítez-Temiño B, Mejías R, Matarredona ER. To Become or Not to Become Tumorigenic: Subventricular Zone Versus Hippocampal Neural Stem Cells. *Front Oncol*. 2020;10:602217.
- Frankowski J, Kim Y, Hunt R. Selective vulnerability of hippocampal interneurons to graded traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2019;129:208-216.
- Fрати A, Cerretani D, Fiaschi A, Frати P, Gatto V, La Russa R, Pesce A, Pinchi E, Santurro A, Fraschetti F, et al. Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2600.
- Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao L. Traumatic brain injury: Current treatment strategies and future endeavors. *Cell Transplant*. 2017;26(7):1118–30.
- Gao X, Chen J. Moderate traumatic brain injury promotes neural precursor proliferation without increasing neurogenesis in the adult hippocampus. *Exp Neurol*. 2013;239:38-48.
- Gao X, Deng P, Xu ZC, Chen J. Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus. *PLoS One*. 2011;6(9):e24566.
- Gao X, Deng-Bryant Y, Cho W, Carrico KM, Hall ED, Chen J. Selective death of newborn neurons in hippocampal dentate gyrus following moderate experimental traumatic brain injury. *J Neurosci Res*. 2008;86(10):2258-70.

- Garcia J, Stillings S, Leclerc J, Phillips H, Edwards N, Robicsek S, Hoh B, Blackburn S, Doré S. Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries. *Front Neurol.* 2017;8:244.
- Ghosh H. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *J Exp Neurosci.* 2019;13:1179069519856876.
- Goings G, Sahni V, Szele F. Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res.* 2004;996(2):213-26.
- Goldstein L. Model of recovery of locomotor ability after sensorimotor cortex injury in rats. *ILAR J.* 2003;44(2):125-9.
- Gonçalves J, Bloyd C, Shtrahman M, Johnston S, Schafer S, Parylak S, Tran T, Chang T, Gage F. *Nat Neurosci.* 2016;19(6):788-91.
- Grady M, Charleston J, Maris D, Witgen B, Lifshitz J. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *J Neurotrauma.* 2003;20(10):929-41.
- Guttenplan K, Liddelow S. Astrocytes and microglia: Models and tools. *J Exp Med.* 2019;216(1):71-83.
- Hadanny A, Abbott S, Suzin G, Bechor Y, Efrati S. Effect of hyperbaric oxygen therapy on chronic neurocognitive deficits of post-traumatic brain injury patients: retrospective analysis. *BMJ Open.* 2018;8(9):e023387.
- Hadanny A, Efrati S. The Hyperoxic-Hypoxic Paradox. *Biomolecules.* 2020;10(6):958.
- Hellmich H, Capra B, Eidson K, Garcia J, Kennedy D, Uchida T, Parsley M, Cowart J, DeWitt D, Prough D. Dose-dependent neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res.* 2005;1044(2):144-54.
- Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean D, Săndesc D, Bosco G. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Behav.* 2018(5):e00959.
- Heredia M, Sánchez-Robledo V, Gómez I, Criado J, Fuente A, Devesa J, Devesa P, Riobobos A. Cell Proliferation in the Piriform Cortex of Rats with Motor Cortex Ablation Treated with Growth Hormone and Rehabilitation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5440.
- Hiebert J, Shen Q, Thimmesch A, Pierce J. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Med Sci.* 2015;350(2):132-8.
- Hirako A, Sun J, Furukawa S, Takeuchi T, Sugiyama A. Effect of methotrexate on rostral migratory stream in newborn rats. *J Vet Med Sci.* 2016;77(12):1565-71.
- Hsu Y, Tran M, Linninger A. Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders. *Croat Med J.* 2015;56(5):401-21.
- Hu Q, Liang X, Chen D, Chen Y, Doycheva D, Tang J, Tang J, Zhang J. Delayed hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 α / β -catenin pathway in middle cerebral artery occlusion rats. *Stroke.* 2014;45(6):1807-14.
- Ibrahim S, Hu W, Wang X, Gao X, He C, Chen J. Traumatic Brain Injury Causes Aberrant

- Migration of Adult-Born Neurons in the Hippocampus. *Sci Rep*. 2016;6:21793.
- Ibrayeva A, Bay M, Pu E, Jörg D, Peng L, Jun H, Zhang N, Aaron D, Lin C, Resler G, et al. Early stem cell aging in the mature brain. *Cell Stem Cell*. 2021;28(5):955-966.e7.
- Ismail H, Shakkour Z, Tabet M, Abdelhady S, Kobaisi A, Abedi R, Nasrallah L, Pintus G, Al-Dhaheri Y, Mondello S, et al. Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Novel Anti-Oxidants Such as Mitoquinone and Edaravone. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(10):943.
- Jamjoom A, Rhodes J, Andrews P, Grant S. The synapse in traumatic brain injury. *Brain*. 2021;144(1):18-31.
- Jeremic R, Pekovic S, Lavrnja I, Bjelobaba I, Djelic M, Dacic S, Brkic P. Hyperbaric Oxygenation Prevents Loss of Immature Neurons in the Adult Hippocampal Dentate Gyrus Following Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5):4261.
- Ji W, Tang Z, Chen Y, Wang C, Tan C, Liao J, Tong L, Xiao G. Ependymal Cilia: Physiology and Role in Hydrocephalus. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:927479.
- Jiang Y, Chen Y, Huang C, Xia A, Wang G, Liu S. Hyperbaric oxygen therapy improves neurological function via the p38-MAPK/CCL2 signaling pathway following traumatic brain injury. *Neuroreport*. 2021;32(15):1255-1262.
- Jin J, Kim S, Liu X, Zhang H, Zhang C, Seo J, Kim Y, Sun T. miR-17-92 Cluster Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis, Anxiety, and Depression. *Cell Rep*. 2016;16(6):1653-1663.
- Jones M, Kaighley B; Nathaniel H, Wyatt H. *Hyperbaric, Physics*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448104/>
- Jorgensen C. Adult mammalian neurogenesis and motivated behaviors. *Integr Zool*. 2018;13(6):655-72.
- Kaneko N, Herranz-Pérez V, Otsuka T, Sano H, Ohno N, Omata T, Nguyen H, Thai T, Nambu A, Kawaguchi Y, et al. New neurons use Slit-Robo signaling to migrate through the glial meshwork and approach a lesion for functional regeneration. *Sci Adv*. 2018;4(12):eaav0618.
- Kaneko N, Marín O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu J, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, et al. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*. 2010;67(2):213-23.
- Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J Neurochem*. 2017;141(6):835-847.
- Karve I, Taylor J, Crack P. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):692-702.
- Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2017;16(8):1224-38.
- Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(8):1224-1238.
- Kelly K. Modeling traumatic brain injury and posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Curr*.

2004;4(4):160-1.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage F. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003;130(2):391-9.

Kempermann G, Song H, Gage F. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(9):a018812.

Kempermann G. What Is Adult Hippocampal Neurogenesis Good for? *Front Neurosci*. 2022;16:852680.

Kirby J, Snyder J, Schuerer D, Peters J, Bochicchio G. Essentials of Hyperbaric Oxygen Therapy: 2019 Review. *Mo Med*. 2019;116(3):176-179.

Knierim J. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116–21.

Korzhevskii D, Karpenko M, Kirik O. Microtubule-associated proteins as markers of nerve cell differentiation and functional status. *Morfologija*. 2011;139(1):13-21.

Kot M, Neglur P, Pietraszewska A, Buzanska L. Boosting Neurogenesis in the Adult Hippocampus Using Antidepressants and Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2022;11(20):3234.

Kraitsy K, Uecal M, Grossauer S, Bruckmann L, Pflieger F, Ropele S, Fazekas F, Gruenbacher G, Patz S, Absenger M, et al. Repetitive long-term hyperbaric oxygen treatment (HBOT) administered after experimental traumatic brain injury in rats induces significant remyelination and a recovery of sensorimotor function. *PLoS One*. 2014;9(5):e97750.

Kumar A, Alvarez-Croda D, Stoica B, Faden A, Loane D. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2016;33(19):1732-1750.

Ladak A, Enam S, Ibrahim M. A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg*. 2019;131:126–32.

Lavrnja I, Ajdzanovic V, Trifunovic S, Savic D, Milosevic V, Stojiljkovic M, Pekovic S. Cortical ablation induces time-dependent changes in rat pituitary somatotrophs and upregulates growth hormone receptor expression in the injured cortex. *J Neurosci Res*. 2014;92(10):1338-49.

Lee J, Lee J, Kahng J, Kim S, Park J, Yoon S, Um J, Kim W, Lee J, Park J, et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature*. 2018;560(7717):243-247.

Lee S, Kim H, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent J, Lo E. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci*. 2006;26(13):3491-5.

Lerche C, Schwartz F, Pries-Heje M, Fosbøl E, Iversen K, Jensen P, Høiby N, Hyldegaard O, Bundgaard H, Moser C. Potential Advances of Adjunctive Hyperbaric Oxygen Therapy in Infective Endocarditis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:805964.

Li J, Wang X, Qin S. Molecular mechanisms and signaling pathways of reactive astrocytes responding to traumatic brain injury. *Histol Histopathol*. 2021;36(9):921-929.

- Liang F, Kang N, Li P, Liu X, Li G, Yang J. Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Polarization Phenotype of Rat Microglia After Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2021;12:640816.
- Liddelow S, Barres B. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-967.
- Liddelow S, Guttenplan K, Clarke L, Bennett F, Bohlen C, Schirmer L, Bennett M, Münch A, Chung W, Peterson T, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-487.
- Lim D, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5):a018820.
- Lim S, Sung K, Shiue Y, Wang C, Chio C, Kuo J. Hyperbaric Oxygen Effects on Depression-Like Behavior and Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury Rats. *World Neurosurg.* 2017;100:128-137.
- Lim S, Wang C, Wang Y, Chio C, Niu K, Kuo J. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy. *J Surg Res.* 2013;184(2):1076-84.
- Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(11):a019034.
- Lippert T, Borlongan C. Prophylactic treatment of hyperbaric oxygen treatment mitigates inflammatory response via mitochondria transfer. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(8):815-823.
- Liu S, Shen G, Deng S, Wang X, Wu Q, Guo A. Hyperbaric oxygen therapy improves cognitive functioning after brain injury. *Neural Regen Res.* 2013;8(35):3334-43.
- Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T. Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience.* 2010;166(1):241-51.
- Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Bolós M, Pallas-Bazarra N, Ávila J. Forced swimming sabotages the morphological and synaptic maturation of newborn granule neurons and triggers a unique pro-inflammatory milieu in the hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2016;53:242-254.
- Loane D, Kumar A, Stoica B, Cabatbat R, Faden A. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: Association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(1):14-29.
- Loane D, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol.* 2016;275(0 3):316-327.
- Lopez-Rojas J, Kreutz M. Mature granule cells of the dentate gyrus--Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;64:167-74.
- Lu Y, Zhou X, Cheng J, Ma Q. Early Intensified Rehabilitation Training with Hyperbaric Oxygen Therapy Improves Functional Disorders and Prognosis of Patients with Traumatic Brain Injury. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2021;10(12):663-670.

- Lv Z, Zhao R, Zhi X, Huang Y, Chen J, Song N, Su C, Ding Y. Expression of DCX and Transcription Factor Profiling in Photothrombosis-Induced Focal Ischemia in Mice. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:455.
- Ma X, Aravind A, Pfister B, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 2019;56(8):5332-5345.
- Maas A, Menon D, Adelson P, Andelic N, Bell M, Belli A, Bragge P, Brazinova A, Büki A, Chesnut R, et al. Traumatic brain injury: Integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):987–1048.
- Manivannan S, Marei O, Elalfy O, Zaben M. Neurogenesis after traumatic brain injury - The complex role of HMGB1 and neuroinflammation. *Neuropharmacology.* 2021;183:108400.
- Margulies S, Hicks R. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations. *J Neurotrauma.* 2009;26(6):925-39.
- Markgraf C, Clifton G, Aguirre M, Chaney S, Knox-Du Bois C, Kennon K, Verma N. Injury severity and sensitivity to treatment after controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma.* 2001;18(2):175-86.
- Maroon J. The effect of hyperbaric oxygen therapy on cognition, performance, proteomics, and telomere length-The difference between zero and one: A case report. *Front Neurol.* 2022;13:949536.
- Marques S, Carmo H, Carvalho F, Sá S, Silva J. A Semi-Automatic Method for the Quantification of Astrocyte Number and Branching in Bulk Immunohistochemistry Images. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4508.
- Marzano L, de Castro F, Machado C, de Barros J, Macedo E Cordeiro T, Simões E Silva A, Teixeira A, Silva de Miranda A. Potential Role of Adult Hippocampal Neurogenesis in Traumatic Brain Injury. *Curr Med Chem.* 2022;29(19):3392-3419.
- Masuda T, Isobe Y, Aihara N, Furuyama F, Misumi S, Kim T, Nishino H, Hida H. Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett.* 2007;425(2):114-9.
- Meller S, Hernandez L, Martin-Lopez E, Kloos Z, Liberia T, Greer C. Microglia Maintain Homeostatic Conditions in the Developing Rostral Migratory Stream. *eNeuro.* 2023;10(2):ENEURO.0197-22.2023.
- Meng X, Zhang Y, Li N, Fan D, Yang C, Li H, Guo D, Pan S. Hyperbaric Oxygen Alleviates Secondary Brain Injury After Trauma Through Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Med Sci Monit.* 2016;22:284-8.
- Menon D, Schwab K, Wright D, Maas A. Position statement: Definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91(11):1637–40.
- Mira R, Lira M, Cerpa W. Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Glial Response. *Front Physiol.* 2021;12:740939.
- Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* 2017;22(1):11-19.
- Moon M, Cha M, Mook-Jung I. Impaired hippocampal neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFADL. *J Alzheimer's Dis.* 2014;41(1):233–41.

- Moreno-Jiménez E, Terreros-Roncal J, Flor-García M, Rábano A, Llorens-Martín M. Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. *J Neurosci*. 2021;41(12):2541–53.
- Morganti J, Riparip L, Rosi S. Call Off the Dog(ma): M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148001.
- Morganti-Kossmann M, Semple B, Hellewell S, Bye N, Ziebell J. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol*. 2019;137(5):731-755.
- Mu J, Krafft P, Zhang J. Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand? *Med Gas Res*. 2011;1(1):14.
- Muradashvili N, Lominadze D. Role of fibrinogen in cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2013;27(13-14):1508-15.
- Najem D, Rennie K, Ribecco-Lutkiewicz M, Ly D, Haukenfrers J, Liu Q, Nzau M, Fraser D, Bani-Yaghoub M. Traumatic brain injury: classification, models, and markers. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(4):391-406.
- Nakajima M, Nito C, Sowa K, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Imagawa K, Hirato T, Ueda M, Kimura K, Okada T. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 promote neuroprotection in experimental acute ischemic stroke. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017;6:102–111.
- Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2005;22(8):1928-41.
- Nemirovich-Danchenko N, Khodanovich M. New Neurons in the Post-ischemic and Injured Brain: Migrating or Resident? *Front Neurosci*. 2019;13:588.
- Ng S, Lee A. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:528.
- Ngwenya L, Danzer S. Impact of Traumatic Brain Injury on Neurogenesis. *Front Neurosci*. 2019;12:1014.
- Niklison-Chirou M, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4869.
- Nogueira A, Hoshino H, Ortega N, Dos Santos B, Teixeira M. Adult human neurogenesis: early studies clarify recent controversies and go further. *Metab Brain Dis*. 2022;37(1):153-172.
- Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*. 2019;146(4):dev156059.
- Obernier K, Cebrian-Silla A, Thomson M, Parraguez J, Anderson R, Guinto C, Rodas Rodriguez J, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2018;22(2):221-234.e8.
- O'Donnell J, Katiyar K, Panzer K, Cullen D. A tissue-engineered rostral migratory stream for directed neuronal replacement. *Neural Regen Res*. 2018;13(8):1327-1331.

- Orihuela R, McPherson C, Harry G. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):649-65.
- Ortega M, Fraile-Martinez O, García-Montero C, Callejón-Peláez E, Sáez M, Álvarez-Mon M, García-Honduvilla N, Monserrat J, Álvarez-Mon M, Bujan J, et al. A General Overview on the Hyperbaric Oxygen Therapy: Applications, Mechanisms and Translational Opportunities. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(9):864.
- Otsuki L, Brand A. Cell cycle heterogeneity directs the timing of neural stem cell activation from quiescence. *Science*. 2018;360(6384):99–102.
- Paderno E, Zanon V, Vezzani G, Giaccon T, Bernasek T, Camporesi EM, Bosco G. Evidence-Supported HBO Therapy in Femoral Head Necrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(6):2888.
- Pantic I, Jeremic R, Dacic S, Pekovic S, Pantic S, Djelic M, Vitic Z, Brkic P, Brodski C. Gray-Level Co-Occurrence Matrix Analysis of Granule Neurons of the Hippocampal Dentate Gyrus Following Cortical Injury. *Microsc Microanal*. 2020;26(1):166-172.
- Parga Becerra A, Logsdon A, Banks W, Ransom C. Traumatic Brain Injury Broadly Affects GABAergic Signaling in Dentate Gyrus Granule Cells. *eNeuro*. 2021;8(3):ENEURO.0055-20.2021.
- Park E, Lyon J, Alvarado-Velez M, Betancur M, Mokarram N, Shin J, Bellamkonda R. Enriching neural stem cell and anti-inflammatory glial phenotypes with electrical stimulation after traumatic brain injury in male rats. *J Neurosci Res*. 2021;99(7):1864-1884.
- Parker T, Rees R, Rajagopal S, Griffin C, Goodliffe L, Dilley M, Jenkins PO. Post-traumatic amnesia. *Pract Neurol*. 2022;22(2):129-137.
- Paterno R, Folweiler K, Cohen A. Pathophysiology and Treatment of Memory Dysfunction After Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(7):52.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, USA: Academic Press; 1998.
- Pearlson G, Robinson R. Suction lesions of the frontal cerebral cortex in the rat induce asymmetrical behavioral and catecholaminergic responses. *Brain Res*. 1981;218(1-2):233-42.
- Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, Maas AI. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(10):1683-96.
- Pekovic S, Dacic S, Krstic D, Jeremic R, Djelic M, Brkic, P. Hyperbaric oxygen therapy in traumatic brain injury: Cellular and molecular mechanisms. In: Drenjačević I, editor. *Hyperbaric Oxygen Treatment in Research and Clinical Practice—Mechanisms of Action in Focus*. Rijeka, Croatia: InTechOpen; 2018. p.25–46.
- Pekovic S, Subasic S, Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Filipovic R, Milenkovic I, Lavrnja I, Stojkov D, Jovanovic S, Rakic Lj, et al. Molecularbasis of brain injury and repair. In: Ruzdijic S, Rakic LJ, editors. *Neurobiological Studies From Genes to Behaviour*. Kerala, India: Research Signpost; 2006. p.143-165.

- Peruzzaro S, Andrews M, Pupiec O, Resk M, Story D, Maiti P. Transplantation of mesenchymal stem cells genetically engineered to overexpress interleukin-10 promotes alternative inflammatory response in rat model of traumatic brain injury. 2019;2:1–15.
- Postolache T, Wadhawan A, Can A, Lowry C, Woodbury M, Makkar H, Hoisington A, Scott A, Potocki E, Benros M, et al. Inflammation in Traumatic Brain Injury. *J Alzheimers Dis.* 2020;74(1):1-28.
- Povlishock J, Erb D, Astruc J. Axonal response to traumatic brain injury: reactive axonal change, deafferentation, and neuroplasticity. *J Neurotrauma.* 1992;1:S189-200.
- Price L, Wilson C, Grant G. Blood–Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational Research in Traumatic Brain Injury.* Boca Raton (FL), USA: CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016. Chapter 4.
- Puderbaugh M, Emmady P. Neuroplasticity. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557811/>
- Pulsinelli W, Brierley J, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11(5):491-8.
- Purvis E, O'Donnell J, Cullen D. Unique Astrocyte Cytoskeletal and Nuclear Morphology in a Three-Dimensional Tissue-Engineered Rostral Migratory Stream. *Neuroglia.* 2022;3(1):41-60.
- Puškaš N, Zaletel I, Stefanović B, Ristanović D. Fractal dimension of apical dendritic arborization differs in the superficial and the deep pyramidal neurons of the rat cerebral neocortex. *Neurosci Lett.* 2015;589:88–91.
- Qin Y, Zhang W, Yang P. Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *J Neurosci Res.* 2015;93(3):391–8.
- Rakhit S, Nordness M, Lombardo S, Cook M, Smith L, Patel M. Management and Challenges of Severe Traumatic Brain Injury. *Semin Respir Crit Care Med.* 2021;42(1):127-144.
- Ramaswamy S, Goings G, Soderstrom K, Szele F, Kozlowski D. Cellular proliferation and migration following a controlled cortical impact in the mouse. *Brain Res.* 2005;1053(1-2):38-53.
- Redell J, Maynard M, Underwood E, Vita S, Dash P, Kobori N. Traumatic brain injury and hippocampal neurogenesis: Functional implications. *Exp Neurol.* 2020;331:113372.
- Ribeiro F, Xapelli S. An Overview of Adult Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1331:77-94.
- Rio D, Ares M, Hannon G, Nilsen T. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;2010(6):pdb.prot5439.
- Rodrigues M, Glover L, Weinbren N, Rizzi J, Ishikawa H, Shinozuka K, Tajiri N, Kaneko Y, Sanberg P, Allickson J, et al. Toward personalized cell therapies: autologous menstrual blood cells for stroke. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:194720.
- Rubiano A, Carney N, Chesnut R, Puyana J. Global neurotrauma research challenges and opportunities. *Nature.* 2015;527(7578):S193-7.

- Rusnak M. Traumatic brain injury: Giving voice to a silent epidemic. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):186-7.
- Russo M, McGavern D. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science.* 2016;353(6301):783-5.
- Saha B, Peron S, Murray K, Jaber M, Gaillard A. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res.* 2013;11(3):965-77.
- Sánchez-Huerta K, García-Martínez Y, Vergara P, Segovia J, Pacheco-Rosado J. Thyroid hormones are essential to preserve non-proliferative cells of adult neurogenesis of the dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci.* 2016; 76:1-10.
- Saunders D, Howe F, van den Boogaart A, McLean M, Griffiths J, Brown M. Continuing ischemic damage after acute middle cerebral artery infarction in humans demonstrated by short-echo proton spectroscopy. *Stroke.* 1995;26(6):1007-13.
- Scharfman H. The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17(9):562-75.
- Schmued L, Hopkins K. Fluoro-Jade B. A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000;874(2):123-30.
- Schweyer K, Rüschoff-Steiner C, Arias-Carrión O, Oertel W, Rösler T, Höglinger G. Neuronal precursor cells with dopaminergic commitment in the rostral migratory stream of the mouse. *Sci Rep.* 2019(1):13359.
- Sen S, Sen S. Therapeutic effects of hyperbaric oxygen: integrated review. *Med Gas Res.* 2021;11(1):30-33.
- Shah P, Stratton J, Stykel M, Abbasi S, Sharma S, Mayr K, Koblinger K, Whelan P, Biernaskie J. Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell.* 2018;173(4):1045-1057.e9.
- Shandley S, Wolf E, Schubert-Kappan C, Baugh L, Richards M, Prye J, Arizpe H, Kalns J. Increased circulating stem cells and better cognitive performance in traumatic brain injury subjects following hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med.* 2017;44(3):257-269.
- Shetty A. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection? *Epilepsy Behav.* 2014;38:117-24.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
- Simon D, McGeachy M, Bayır H, Clark R, Loane D, Kochanek P. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(3):171-191.
- Snyder J. Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. *Trends Neurosci.* 2019;42(3):164-178.
- Sofroniew M. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(5):249-63.

- Sri Dewi Untari N, Kusumastuti K, Suryokusumo G, Sudiana I. Protective Effect of Hyperbaric Oxygen Treatment on Axon Degeneration after Acute Motor Axonal Neuropathy. *Autoimmune Dis.* 2021;2021:6627779.
- Strange B, Witter M, Lein E, Moser E. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(10):655–69.
- Suk K. Lipocalin-2 as a therapeutic target for brain injury: An astrocentric perspective. *Prog Neurobiol.* 2016;144:158-72.
- Sulhan S, Lyon K, Shapiro L, Huang J. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *J Neurosci Res.* 2020;98(1):19-28.
- Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(8):721-30.
- Szele F, Alexander C, Chesselet M. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci.* 1995;15(6):4429-48.
- Terranova J, Ogawa S, Kitamura T. Adult hippocampal neurogenesis for systems consolidation of memory. *Behav Brain Res.* 2019;372:112035.
- Thapa K, Khan H, Singh T, Kaur A. Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *J Mol Neurosci.* 2021;71(9):1725-1742.
- Thomsen G, Le Belle J, Harnisch J, Mc Donald W, Hovda D, Sofroniew M, Kornblum H, Harris N. Traumatic brain injury reveals novel cell lineage relationships within the subventricular zone. *Stem Cell Res.* 2014;13(1):48-60.
- Toda T, Gage F. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* 2018;373(3):693-709.
- Ton S, Adamczyk N, Gerling J, Vaagenes I, Wu J, Hsu K, O'Brien T, Tsai S, Kartje G. Dentate Gyrus Proliferative Responses After Traumatic Brain Injury and Binge Alcohol in Adult Rats. *Neurosci Insights.* 2020;15:2633105520968904.
- Tong W, Igarashi T, Ferriero D, Noble L. Traumatic brain injury in the immature mouse brain: characterization of regional vulnerability. *Exp Neurol.* 2002;176(1):105-16.
- Toni N, Schinder A. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(1):a018903.
- Tucić M, Stamenković V, Andjus P. The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1–12.
- Tuncdemir S, Lacefield C, Hen R. Contributions of adult neurogenesis to dentate gyrus network activity and computations. *Behav Brain Res.* 2019;374:112112.
- Van Vliet E, Nnode-Ekane X, Lehto L, Gorter J, Andrade P, Aronica E, Gröhn O, Pitkänen A. Long-lasting blood-brain barrier dysfunction and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2020;145:105080.

- Velho V, Hrushikesh K, Bhople L, Palande L. Role of Hyperbaric Oxygen Therapy in Traumatic Brain Injury — Evidence-Based Consensus. *Indian Journal of Neurotrauma*. 2020;42-5.
- Villalba N, Sonkusare S, Longden T, Tran T, Sackheim A, Nelson M, Wellman G, Freeman K. Traumatic brain injury disrupts cerebrovascular tone through endothelial inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide gain of function. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(6):e001474.
- Villasana L, Kim K, Westbrook G, Schnell E. Functional Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury(1,2,3). *eNeuro*. 2015;2(5):ENEURO.0056-15.2015.
- von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2007;329(3):409-20.
- Walgrave H, Balusu S, Snoeck S, Vanden Eynden E, Craessaerts K, Thrupp N, Wolfs L, Horré K, Fourne Y, Ronisz A, et al. Restoring miR-132 expression rescues adult hippocampal neurogenesis and memory deficits in Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell*. 2021;28(10):1805-1821.e8.
- Wan F, Bai H, Liu J, Tian M, Wang Y, Niu X, Si Y. Proliferation and Glia-Directed Differentiation of Neural Stem Cells in the Subventricular Zone of the Lateral Ventricle and the Migratory Pathway to the Lesions after Cortical Devascularization of Adult Rats. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3625959.
- Wang M, Cheng L, Chen Z, Mungur R, Xu S, Wu J, Liu X, Wan S. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by regulating microglia polarization in rats. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(10):1126-1133.
- Wang R, Yang Y, Chang H. The SDF1-CXCR4 Axis Is Involved in the Hyperbaric Oxygen Therapy-Mediated Neuronal Cells Migration in Transient Brain Ischemic Rats. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1780.
- Wang X, Gao X, Michalski S, Zhao S, Chen J. Traumatic Brain Injury Severity Affects Neurogenesis in Adult Mouse Hippocampus. *J Neurotrauma*. 2016;33(8):721-33.
- Wang X, Yang Y, Xie M, Yu X, Wang Q. Hyperbaric oxygen promotes the migration and differentiation of endogenous neural stem cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2009;11(9):749-752.
- Weber J. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. *Front Pharmacol*. 2012;3:60.
- Wei L, Wang J, Cao Y, Ren Q, Zhao L, Li X, Wang J. Hyperbaric oxygenation promotes neural stem cell proliferation and protects the learning and memory ability in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1752-9.
- Willis E, MacDonald K, Nguyen Q, Garrido A, Gillespie E, Harley S, Bartlett P, Schroder W, Yates A, Anthony D, et al. Repopulating Microglia Promote Brain Repair in an IL-6-Dependent Manner. *Cell*. 2020 Mar 5;180(5):833-846.e16.
- Winston C, Chellappa D, Wilkins T, Barton D, Washington P, Loane D, Zapple D, Burns M. Controlled cortical impact results in an extensive loss of dendritic spines that is not mediated by injury-induced amyloid-beta accumulation. *J Neurotrauma*.

2013;30(23):1966-72.

Witgen B, Lifshitz J, Smith M, Schwarzbach E, Liang S, Grady M, Cohen A. Regional hippocampal alteration associated with cognitive deficit following experimental brain injury: a systems, network and cellular evaluation. *Neuroscience*. 2005;133(1):1-15.

Woo J, Min J, Lee Y, Roh H. Effects of Hyperbaric Oxygen Therapy on Inflammation, Oxidative/Antioxidant Balance, and Muscle Damage after Acute Exercise in Normobaric, Normoxic and Hypobaric, Hypoxic Environments: A Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(20):7377.

Wu N, Sun X, Zhou C, Yan J, Cheng C. Neuroblasts migration under control of reactive astrocyte-derived BDNF: a promising therapy in late neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):2.

Wu Y, Wu H, Zeng J, Pluimer B, Dong S, Xie X, Guo X, Ge T, Liang X, Feng S, et al. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):74.

Wu Z, Lo J, Wu S, Wang C, Chen R, Lee S, Chai C, Huang S. Early Hyperbaric Oxygen Treatment Attenuates Burn-Induced Neuroinflammation by Inhibiting the Galectin-3-Dependent Toll-Like Receptor-4 Pathway in a Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2195.

Xie X, Laks D, Sun D, Poran A, Laughney A, Wang Z, Sam J, Belenguer G, Fariñas I, Elemento O, et al. High-resolution mouse subventricular zone stem-cell niche transcriptome reveals features of lineage, anatomy, and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(49):31448-31458.

Xie Y, Li Z, Du J, Chen Y, Chen B, Wang T, Huang Z, Hou S, Wang Y. Visualization of Rostral Migratory Stream in the Developing Rat Brain by In Vivo Electroporation. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(5):1067-1079.

Xing P, Ma K, Li L, Wang D, Hu G, Long W. The protection effect and mechanism of hyperbaric oxygen therapy in rat brain with traumatic injury. *Acta Cir Bras*. 2018;33(4):341-353.

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128-42.

Xiu G, Li X, Li Q, Yin Y, Tang Q, Li J, Ling J, Ling B, Yang Y. Role of hyperbaric oxygen therapy in PDGF-BB-mediated astrogliosis in traumatic brain injury rats associated with ERK1/2 signaling pathway inhibition. *Eur J Med Res*. 2023;28(1):99.

Yang D, Chen Y, Wang M, Pan H, Chen S, Cheng F. Granulocyte colony-stimulating factor enhances cellular proliferation and motor function recovery on rats subjected to traumatic brain injury. *Neurol Res*. 2010;32(10):1041-9.

Yang Y, Wei H, Zhou X, Zhang F, Wang C. Hyperbaric oxygen promotes neural stem cell proliferation by activating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling after traumatic brain injury. *Neuroreport*. 2017;28(18):1232-1238.

Yang Z, Wang K. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. 2015;38(6):364-74.

- Ye Y, Feng Z, Tian S, Yang Y, Jia Y, Wang G, Wang J, Bai W, Li J, He X. HBO Alleviates Neural Stem Cell Pyroptosis via lncRNA-H19/miR-423-5p/NLRP3 Axis and Improves Neurogenesis after Oxygen Glucose Deprivation. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:9030771.
- Yoo S, Blackshaw S. Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Prog Neurobiol*. 2018;170:53-66.
- Yu T, Zhang G, Liebl D, Kernie S. Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. *J Neurosci*. 2008;28(48):12901-12.
- Zamanian J, Xu L, Foo L, Nouri N, Zhou L, Giffard R, Barres B. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012;32(18):6391-410.
- Zhang B, Bailey W, Braun K, Gensel J. Age decreases macrophage IL-10 expression: implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;273:83-91.
- Zhang P, Zhu S, Li Y, Zhao M, Liu M, Gao J, Ding S, Li J. Quantitative proteomics analysis to identify diffuse axonal injury biomarkers in rats using iTRAQ coupled LC-MS/MS. *J Proteomics*. 2016;133:93-99.
- Zhang X, Jiang Z, Wang G, Li Y, Wang Y, Li X, Shen H. Therapeutic efficacy of hyperbaric oxygen on traumatic brain injury in the rat and the underlying mechanisms. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2012;28(1):42-6.
- Zhao Q, Zhang J, Li H, Li H, Xie F. Models of traumatic brain injury-highlights and drawbacks. *Front Neurol*. 2023 ;14:1151660.
- Zhao X, van Praag H. Steps towards standardized quantification of adult neurogenesis. *Nat Commun*. 2020;11(1):4275.
- Zheng R, Lee K, Qi Z, Wang Z, Xu Z, Wu X, Mao Y. Neuroinflammation Following Traumatic Brain Injury: Take It Seriously or Not. *Front Immunol*. 2022;13:855701.
- Zheng W, ZhuGe Q, Zhong M, Chen G, Shao B, Wang H, Mao X, Xie L, Jin K. Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(22):1872-80.
- Zhou H, Liu Z, Liu X, Chen Q. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation combined with hyperbaric oxygen treatment for repair of traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2016;11(1):107-13.
- Zhou Y, Bian X, Fang L, He W, Dai C, Yang J. Aristolochic acid causes albuminuria by promoting mitochondrial DNA damage and dysfunction in podocyte. *PLoS One*. 2013;8(12):1-1.
- Zhou Y, Shao A, Yao Y, Tu S, Deng Y, Zhang J. Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):62.
- Zou L, Shi Y, He H, Jiang S, Huo F, Wang X, Wu F, Ma L. Effects of FGF2/FGFR1 Pathway on Expression of A1 Astrocytes After Infrasound Exposure. *Front Neurosci*. 2019;13:429.

Skraćenice

AB - Alchajmerova bolest	IKP - intrakranijalni pritisak
AIF - faktor koji indukuje apoptozu	IL-10 - interleukin 10
AMPA - α -amini-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat	IL-1β - interleukin 1 beta
AQP4 - akvaporin 4	IL-6 - interleukin 6
Arg - arginaza	INF-γ - interferon gama
ASK - ablacija senzomotornog korteksa	KMB - krvno-moždana barijera
ATP - adenzin trifosfat	KS - krvni sud
BDNF - neurotrofni faktor sintetisan u mozgu	MMP - matriksne metaloproteinaze
BK - bočna komora	NDS - normalni magareći serum
BMPs - engl. <i>bone morphogenic proteins</i>	NeuroD1 - engl. <i>neuronal differentiation 1</i>
CA1, CA2, CA3 - lat. <i>cornu ammonis 1,2,3</i>	NMDA - N-metil-d-aspartat
CB - cerebelum	NO - azot-monoksid
CC - lat. <i>corpus callosum</i>	NSC - neuralne stem ćelije
cDNK - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina	OB - olfaktorni bulbus
CNS - centralni nervni sistem	OE - olfaktorni epitel
CX - korteks	PBS - fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom
Cx 43 - koneksin-43	PFA - paraformaldehid
DAB - 3,3'-diaminobenzidin	Prok1 - prokineticin 1
DAMPs - molekularni obrasci oštećenja	PVDF - poliviniliden-fluoridna membrana
DAPI - 4',6-diamidin-2-fenilindol	RMP - rostralni migratorni put
DCX - dablkortin	RNK - ribonukleinska kiselina
DEPC - dietil-pirokarbonat	ROS - reaktivne kiseonične vrste
DG - dentatni girus	SDF-1 - engl. <i>stromal cell derivated factor-1</i>
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina	SDS - natrijum dodecil sulfat
E - endimalne ćelije	SOX2 - polno determinišući region 2 Y
ER - endoplazmin retikulum	SVZ - subventrikularna zona
FJB - fluoro-žad B	SGZ - subgranularna zona
Gal-3 - galektin-3 protein	TBI - traumatsko oštećenje mozga
GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein	TBST - Tris pufer sa dodatkom Tween 20
GS - granularni sloj	TLR 4 - engl. <i>Toll-like receptor 4</i>
HBO - hiperbarična oksigenacija	TNF-α - faktor nekroze tumora alfa
HIF - hipoksijom indukovani faktor	V - ventrikula
HRP - enzim peroksidaza rena	VCAM-1 - engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
IFD - gustina integrisane fluorescence	VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta
IGF-1 - insulinu sličan faktor rasta-1	V-SVZ - ventrikularna-subventrikularna zona
IgG - imunoglobulin G	VZ - ventrikularna zona

PUBLIKOVANI RADOVI IZ OVE DOKTORSKE DISERTACIJE

Jeremic R, Pekovic S, Lavrnja I, Bjelobaba I, Djelic M, Dacic S, Brkic P. Hyperbaric Oxygenation Prevents Loss of Immature Neurons in the Adult Hippocampal Dentate Gyrus Following Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4261. doi: 10.3390/ijms24054261.

Jeremić R, Peković S, Dacić S, Brkić P. What do we know about adult mammalian hippocampal neurogenesis so far? *Medicinski podmladak.* 2024; 75(2). doi: 10.5937/mp75-42260.

PRILOZI

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Rada M. Jeremić je rođena 13.09.1990. godine u Užicu. Osnovnu školu "Desanka Maksimović" i Gimnaziju Priboj završila je sa odličnim uspehom kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2009. godine, a diplomirala 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,61. Za vreme studija dr Jeremić je bila član Centra za stručni i naučno-istaživački rad studenata, u okviru koga je dala izuzetan doprinos u posredovanju između nastavnika i studenata Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i u organizovanju godišnjeg studentskog kongresa. Dr Jeremić je nosilac brojnih stipendija i nagrada, među kojima je Pohvalnica Dekana. Dobitnik je nagrade za jedan od tri najbolja rada prezentovana u vidu postera na *XIII International Congress of Medical Sciences* u Sofiji 2014. godine. Dr Rada Jeremić je dobitnik stipendije za jednomesečno usavršavanje u Univerzitetnoj klinici Ependorf u Hamburgu.

Svoj naučni put dr Jeremić je započela u Istraživačkoj stanici Petnica, kao polaznik seminara Hemija. Kasnije, od treće godine fakulteta dr Jeremić nastavlja svoj naučno-istaživački rad kao student na katedri Medicinske fiziologije. Doktorske akademske studije, modul Fiziološke nauke, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisuje 2015. godine. Zdravstvenu specijalizaciju iz interne medicine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je u aprilu 2017. godine. Master akademske studije, modul Fizička aktivnost, zdravlje i terapija vežbanjem upisala je 2020. godine.

U zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Medicinska fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu izabrana je 2017. godine. Dr Jeremić je 2019. godine izabrana u zvanje asistent na istoimenoj katedri.

Od 2018. godine dr Rada Jeremić je saradnik na projektu finansiranom od strane Ministarstva nauke, inovacija i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, br. 200110. Član je Društva za neuronauke Srbije (DNS), *Federation of European Neuroscience Societies* (FENS) i *International Society for Neurochemistry* (ISN).

Dr Rada Jeremić je mentor brojnih studentskih naučno-istaživačkih radova koji su prezentovani na kongresima u zemlji i inostranstvu. Dr Jeremić je dobitnica *Travel Award* za kongres ISN-ESN 2023 Porto u Portugaliji, Zahvalnice za posvećenost u rešavanju studentskih pitanja i izuzetnu saradnju sa studentima 2023. god, Granta za školu *Molecular targets of antiaging interventions*, Spetses, Grčka 2022. god, kao i Zahvalnice za podršku aktivnostima organizacije i izuzetan doprinos naučno-istaživačkom radu studenata 2022. i 2021. god.

Dr Jeremić je autor i koautor na 8 radova u časopisima na JCR listi. Ukupna citiranost svih radova je 38, a Hiršov, *h-index* iznosi 5 prema indeksnoj bazi SCOPUS.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora : **Rada Jeremić**

Broj indeksa: **FN-05/15**

Izjavljujem

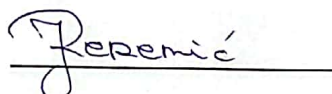
Da je doktorska disertacija pod naslovom:

Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 31.08.2023. godine



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora : **Rada Jeremić**

Broj indeksa: **FN-05/15**

Studijski program: Doktorske studije iz medicinskih nauka – smer Fiziološke nauke

Naslov rada: **Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga**

Mentori: **prof. dr Predrag Brkić, doc. dr Sanja Dacić**

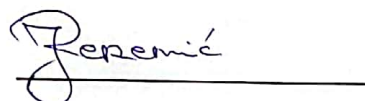
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 31.08.2023. godine

Handwritten signature of Rada Jeremić in black ink, written over a horizontal line.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dejstvo hiperbarične oksigenacije na regenerativni potencijal moždanog tkiva u eksperimentalnom modelu traumatske povrede mozga

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.


Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 31.08.2023. godine



1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.