

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Predrag D. Brkić

SANIRANJE EKSPERIMENTALNE
TRAUMATSKE POVREDE MOZGA
PRIMENOM HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Predrag D. Brkić

THE REHABILITATION OF THE
EXPERIMENTAL BRAIN INJURY WITH
HYPERBARIC OXYGENATION

Doctoral Disertation

Belgrade, 2012

Mentor doktorske disertacije: Prof. dr Tomislav Jovanović, redovni profesor, Institut za Medicinsku fiziologiju "Rihard Burian", Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu.

Komentor doktorske disertacije: Prof. dr Mirjana Stojiljković, redovni profesor, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije:

Prof. dr Ljiljana Šćepanović, redovni profesor, Institut za Medicinsku fiziologiju "Rihard Burian", Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu,

Prof. dr Miodrag Rakić, vanredni profesor, Klinika za neurohirurgiju, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu

Dr Sanja Peković, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerzitet u Beogradu.

Ovaj rad posvećujem mojoj porodici.

Katarini i Marijani za sreću i ljubav koju mi daruju.

Ocu Draganu uz zahvalnost jer mi je usadio želju da tragam za novim sazanjima.

Majci Mariji na bezgraničnoj podršci i razumevanju.

Bratu Slobodanu koji mi je uvek bio najveći uzor.

„Dužnost učitelja je da nauči učenika da uči i da pritom sledi svoj put, ma kako on krivudav bio.“

Umberto Eko

Zahvaljujem se Akademiku Prof. dr Ljubisavu Rakiću čija je naučna vizija povezala mog mentora Prof. dr Tomislava Jovanovića i komentora Prof. dr Mirjanu Stojiljković, koji su me kao pravi učitelji, uz nesebičnu pomoć uveli u metodologiju primene hiperbarične oksigenacije u neuronaukama. Rad je ostvaren u okviru interdisciplinarnog integracionog projekta br. 41014, Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

Kolektivu Instituta za medicinsku fiziologiju “Rihard Burian” Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dugujem veliku zahvalnost na svesrdnoj podršci i pomoći tokom izrade teze. Nastavnicima na njihovoj spremnosti ne samo da mi prenesu svoja iskustva i znanja, već i da širom otvore vrata svojih laboratorija gde moram posebno da istaknem Van. Prof. dr Oliveru Stanojlović i Doc. dr Aleksandru Rašić-Marković. Doc. dr Milošu Petroviću želim da se zahvalim na analizi teksta i prijateljskim savetima. Kolegama asistentima na njihovoj spremnosti da mi uvek izađu u susret. Posebnu zahvalnost iskazujem višem laborantu Jovanu Despotoviću koji je uvek bio tu da mi pruži pomoć tokom ekperimentalnih procedura. Tehničkom osoblju Slavici Repac, Dragani Pavlović, Draganu Dimitrijeviću i Dragiši Nikitoviću na pomoći i razumevanju. Administrativnom osoblju na bezrezervnoj podršci. Mojim studentima Vladanu Milutinoviću i Vasiliju Korugiću zahvaljujem na njihovoj pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem članovima Laboratorije za neurohemiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Posebno Dr Sanji Peković, koja je bila od neizmerne pomoći počevši od uspostavljanja prvih kontakata, tokom svih eksperimentalnih procedura, pa sve do ispisivanja poslednjeg slova ove teze. Na spremnosti da samnom podele svoja znanja, strpljenju i prijateljskim savetima želi da se zahvalim: Dr Ireni Lavrnji, Mr Sanji Dacić, Dr Ivani Bjelobabi, dipl.bio. Ani Parabucki, Mr Danijeli Savić, Dr Danijeli Laketi i dipl. biohem. Ivi Božić.

Neizmernu zahvalnost iskazujem Doc. dr Danijeli Krstić, iz Instituta za hemiju u medicini, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Mr Mirjani Čolović, iz Instituta za Nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu, za nesebično požrtvovanje i zalaganje tokom sprovođenja biohemijskih analiza.

Velikom prijatelju Milanu Gajiću i svim članovima kolektiva Instituta za medicinsku statistiku i informatiku, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu želim da iskažem zahvalnost na savetima i pruženoj pomoći tokom izrade ovog rada.

Vanrednom Prof. dr Miroslavu Saviću sa Katedre za farmakologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu želim da se zahvalim na spremnosti da podeli samnom ne samo tehničku već i mnogo značajniju i intelektualnu svojinu.

Danici Despotović i saradnicima Centra za bibliotekarsku i izdavačku delatnost, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem za finalni dizajn ove teze.

Ovo istraživanje ne bi bilo ostvareno bez bezrezervne i sveobuhvatne podrške „Zavoda za hiperbaričnu medicinu“, njegovog vlasnika dipl. ing. Miodraga Zarića, direktora dipl. ing. Mariane Sedlar i svih zaposlenih.

Brkić Predrag

SANIRANJE EKSPERIMENTALNE TRAUMATSKE POVREDE MOZGA PRIMENOM HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

SAŽETAK

Uvod: Traumatske povrede centralnog nervnog sistema (CNS) predstavljaju širom sveta veliki zdravstveni problem, jer spadaju među vodeće uzročnike smrtnosti i različitih oblika invaliditeta u radno sposobnoj populaciji. Činjenica je da se samo u koordinisanim istraživanjima kako eksperimentalnim i tako kliničnim, mogu razviti novi kolaborativni modeli i nove strategije za sanaciju posledica moždane traume. U ovom kontekstu hiperbarična oksigenacija (HBO) se izdvaja kako procedura koja može u sinergističkom dejstvu sa drugim terapijama dovesti do ubrzanja oporavka posle moždane traume. Cilj ove studije je da utvrdi da li primena HBO može poboljšati oporavak pacova posle sukcione ablacije desnog senzomotornog korteksa.

Materijal i metode: Deset nedelja stari mužijaci pacova Wistar soja raspoređeni su u sledeće grupe (n=8, po grupi): Kontrolna (K) intakne životinje, Kontrolna + HBO (KHBO) intakne životinje koje su prošle kroz HBO protokol, Šam (Š) lažno operisane životinje, Šam + HBO (ŠHBO), Lezija (L) desni sezomotorni korteks je uklonjen sukcionom ablacijom i L + HBO (LHBO). HBO protokol: pritisak 2,5 apsolutne atmosfere, 60 minuta, jedanput dnevno, tokom 10 dana. Za evaluaciju procesa oporavka lokomotornih funkcija korišćeni su test prelaska preko grede i merenje snage stiska. Količina malondialdehida (MDA), aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPX) su mereni u uzorcima tkiva povređenog hemikorteksa. Postraumatski procesi su praćeni na uzorcima moždanog tkiva imunohistohemijskom metodom sa sledećim antitelima: GFAP, ED1, SMI31, GAP43 i SYP. U cilju evaluacije efekata HBO na proces neuronalne degeneracije sprovedeno je dovostruko imunofluorescentno bojenje: neuroni u procesu degeneracije su bojeni fluoro žadom B, dok je NeuN korišćen kao marker tela neurona.

Rezultati: LHBO grupa je postigla statistički značajno bolje rezultate na testu prelaska brvna u odnosu na L grupu. Oporavak mišićne snage onesposobljene noge je bio značajno veći posle HBO tretmana. HBO je izrazito povećao aktivnost GPX u povređenom korteksu u odnosu na sve ostale grupe. Posle povrede, nivo aktivnosti SOD je dramatično smanjen u uzorcima kortikalnog tkiva. HBO je povećao aktivnost SOD u povređenom korteksu skoro do kontrolnog nivoa. Od svih ispitivanih grupa, najviši nivo MDA je nađen u L grupi dok je kod LHBO bio smanjen. Smanjenje ekspresije GFAP-a posle HBO tretmana ukazuje da je došlo do smanjena reaktivne astroglioze i sprečavanja formiranja glijalnog ožiljka. Uočeno je i smanjenje aktivnosti mikroglije/makrofaga. HBO podstiče ekspresiju GAP43 i sinaptofizina u neuronima oko mesta povrede i u subkortikalnoj beloj masi. Slaba imunohistohemijska reakcija na SMI31 pod dejstvom HBO tretmana govori u prilog tvrdnji da HBO terapija sprečava progresiju neuronalnog oštećenja. Dvostruko imunofluorescentno bojenje je pokazalo da je broj degenerisanih neurona posle HBO tretmana manji. HBO tretman sam po sebi nije imao nikakvog efekta na intaktne životinje.

Zaključak: Smanjenjem mikroglialne i makrofagne aktivnosti HBO dovodi do remodelovanja glijalnog ožiljnog tkiva. HBO redukuje neuronalnu degeneraciju i doprinosi uspešnijem preživljavanju neurona posle moždane traume. Naši nalazi ukazuju da HBO promoviše neuralno remodelovanje, putem podsticanja izrastanja neurita, sinaptičkog remodelovanje i stvaranja novih interneuronskih veza, čime doprinosi oporavku lokomotornih funkcija. Intenziviranje aktivnost antioksidativnih enzima GPX i SOD i smanjenje stepena lipidne peroksidacije spadaju u uočene neuroprotektivne mehanizme HBO. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da treba razmotriti mogućnost integracije hiperbarične oksigenacije u terapijske strategije usmerene ka poboljšanju neurološkog oporavka pacijenata sa traumatskim povredama centralnog nervnog sistema.

Ključne reči: hiperbarična oksigenacija, povrede mozga, poremećaj lokomocije, oksidativni stres, regeneracija, GAP43, sinaptofizin, astroglioza, neuronalna degeneracija

Naučna oblast: hiperbarična medicina

Uža naučna oblast: neurofiziologija

THE REHABILITATION OF THE EXPERIMENTAL BRAIN INJURY WITH HYPERBARIC OXYGENATION

ABSTRACT

Objectives: Traumatic brain injuries (TBI) are one of the leading causes of death and chronic disability especially among the working population, and represent an important public health problem worldwide. It is proposed that coordinated research efforts of basic and clinical scientists will provide the opportunity to develop collaborative models for translational neuroscience and rehabilitation research. In this view hyperbaric oxygen therapy (HBO) appeared as an adjunctive therapy that has the synergistic effect with other treatments, strongly suggesting that combining therapies with HBO could yield better results than either alone. The aim of this study was to investigate whether HBO can improve the neurological recovery of the rat after suction ablation of the sensorimotor cortex.

Methods: The experiments were conducted on the male Wister rats, 10 weeks old. Animals were organized into following groups (n = 8, per group): Control (C) intact animals, Control+HBO (CHBO) intact animals subjected to HBO treatment, Sham control (S) animals that underwent surgical procedure without damaging the brain tissue, Sham control+HBO (SHBO), Lesion group (L)-the right sensorimotor cortex was removed by suction ablation, Lesion+HBO (LHBO). HBO protocol: pressure applied 2.5 absolute atmospheres (ATA), for 60 minutes, once daily for 10 days. Beam walking test and grip strength meter were used to evaluate the recovery of motor functions. Malondialdehyde (MDA) content, activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) sampled from injured hemicortex were measured. The posttraumatic processes were evaluated on the brain tissue preparations using the immunohistochemical method with antibodies: GFAP,

ED1, SMI31, GAP43 and SYP. To evaluate the effect of HBO on neurodegeneration we performed double immunofluorescence staining: neurons undergoing degeneration were visualized with Fluoro Jade B, while NeuN was used as a marker of neuronal cell body.

Results: LHBO group have achieved statistically superior scores in beam walking test compared to the L group. Additionally, the recovery of muscle strength of affected hindpaw was significantly enhanced after HBO treatment. HBO markedly increased GPX activity in the injured cortex compared to all other groups. After injury, the level of SOD activity was dramatically lowered in the cortical tissue sample. HBO increased SOD activity in the injured cortex to almost control levels. Compared to all investigated groups the highest level of MDA was found in the cortical tissue samples from injured cortex, while after HBO it was reduced. Reduced expression of GFAP after the HBO treatment can be interpreted as a reduction of reactive astrogliosis and the prevention of glial scar formation. Additionally, the macrophage and microglial activities were reduced as well. Hyperbaric oxygenation induced over-expression of GAP43 and SYP in the neurons surrounding the lesion site. Weak immunohistochemical reaction to SMI31 after HBO treatment, suggests that HBO was able to attenuate the effects of brain damage by reducing the progression of neural degeneration. Double immunofluorescence staining revealed that the number of degenerating neurons was decreased after HBO. HBO by itself had no significant effect on the animals with intact brain tissue.

Conclusions: Attenuation of the microglial and macrophage activity by HBO leads to the remodeling of the glial scar tissue. HBO reduces neuronal degeneration and contributes to the better neuronal survival after TBI. Data presented suggest that HBO can intensify neuroplastic responses by promoting axonal sprouting and synapse remodeling, which contributes to the recovery of locomotor performances in rats. Up-regulation of antioxidant enzymes and reduction of lipid peroxidation are among observed neuroprotective effects of

HBO. Our research points out that the integration of hyperbaric oxygen therapy in treatment strategies intentional to improve the neurological rehabilitation following brain trauma should be taken under the consideration.

Keywords: hyperbaric oxygenation, brain injury, locomotor impairments, oxidative stress, regeneration, GAP43, synaptophysin, astrogliosis, neural degeneration

Scientific field: hyperbaric medicine

Field of academic expertise: neurophysiology

SADRŽAJ

POSVETA

REZIME NA SRPSKOM JEZIKU

REZIME NA ENGLESKOM JEZIKU

1. UVOD.....	1
1.1. Moždana trauma	1
1.1.1. Glijalne ćelije	2
1.1.1.a. Oligodendrociti.....	2
1.1.1.b. Ependimske ćelije	3
1.1.1.c. Mikroglia.....	3
1.1.1.d. Astrociti	3
1.1.1.d.i. Struktura astrocita.....	4
1.1.1.d.ii. Funkcije astrocita	5
1.2. Povreda i oporavak nervnog sistema	5
1.2.1. Povreda nervnog sistema	5
1.2.2. Oporavak nervnog sistema posle povrede	6
1.2.3. Inflamacija i centralni nervni sistem	9
1.3. Reakcije ćelija centralnog nervnog sistema na povredu.....	10
1.3.1. Reakcija oligodendrocita na povredu	11
1.3.2. Odgovor oligodendrocitnih prekursorskih ćelija.....	11
1.3.3. Uloga mikroglije/makrofaga u patofiziologiji povrede CNS-a	12
1.3.4. Meningealne ćelije i povreda	13
1.3.5. Multipotentne progenitorske ćelije i povreda	13
1.3.6. Astrociti i povreda.....	14
1.4. Intermedijerni filamenti.....	16
1.4.1. Vimentin	17
1.4.2. Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)	18
1.4.3. Neurofilamenti.....	18
1.4.4. Za mikrotubule vezani protein 2 (MAP2)	19
1.4.5. Protein rasta 43 (GAP43)	20
1.4.6. Sinaprofizin (SYP)	21

1.5. Hiperbarična oksigenacija (HBO).....	21
1.5.1 Fundamentalni zakoni fizike koji se primenjuju u hiperbaričnoj medicini.....	22
1.5.2. Efekti hiperbarične oksigenacije na transport kiseonika u organizmu	23
1.5.2.a. Hiperbarična vazokonstrukcija.....	26
1.5.2.b. Efekti hiperbarične oksigenacije na eritrocite.....	27
1.5.2.c. Efekti hiperbarične oksigenacije na parcijalni pritisak kiseonika u tkvima.....	27
1.5.3. Efekti hiperbarične oksigenacije u centralnom nervnom sistemu	28
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3. MATERIJAL I METODE.....	33
3.1. Eksperimentalni model.....	33
3.2. Eksperimentalni dizajn	34
3.2.1. Eksperimentalne grupe.....	34
3.2.2. Model traumatske povrede mozga-hirurška procedura	34
3.2.3. Protokol hiperbarične oksigenacije	37
3.3. Ispitivanje motornih funkcija	38
3.3.1. Ispitivanje senzomotorne integracije-koordinacije, test prelasaka preko "grede"	38
3.3.2. Testiranje mišićne snage	39
3.4. Imunohistohemija.....	40
3.4.1. Antitela.....	40
3.4.2 Priprema mozгова za imunohistohemiju.....	41
3.4.3. Sečenje preseka mozgov u kriostatu	41
3.4.4. Priprema staklenih pločica	41
3.4.5. Imunohistohemijsko bojenje preseka.....	42
3.4.6. Postupak imunohistohemijskog bojenja.....	42
3.4.7. Histohemijsko bojenje krežil violetom.....	43
3.4.8. Imunofluorescentno bojenja fluoro-žadom.....	44
3.5. Biohemijske analize	44
3.5.1 Priprema uzoraka tkiva za analize.....	44
3.5.2. Analiza enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPX)	45
3.5.3. Analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	48
3.5.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije-koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu i serumu	49

3.6. Statistička obrada rezultata	51
4. REZULTATI	52
4.1. Telesna masa	52
4.2. Rezultati ispitivanja motornih funkcija	53
4.2.1. Rezultati ispitivanja senzomotorne integracije–koordinacije, test prelasaka preko “grede”	53
4.2.2. Rezultati testiranja mišićne snage	58
4.3. Rezultati biohemijskih analiza	69
4.3.1. Rezultati analiza enzmske aktivnosti glutacion peroksidaze (GPX)	69
4.3.2. Rezultati analiza enzmske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	71
4.3.3. Rezultati određivanja stepena lipidne peroksidacije–koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu	73
4.3.4. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu	76
4.3.5. Utvrđivanje korelacije između koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu i u serumu	78
4.4. Imunohistohemija	81
4.4.1. Uticaj hiperbarične oksigenacije na proces reaktivne astroglioze	81
4.4.1.a. Uticaj hiperbarične oksigenacije na ekspresiju GFAP-a	81
4.4.1.b. Odgovor mikroglije/makrofaga na HBO tretman	84
4.4.2. Odgovor neurona na HBO tretman	87
4.4.2.a. Uticaj hiperbarične oksigenacije na ekspresiju SMI31	87
4.4.2.b. Uticaj hiperbarične oksigenacije na rast i razvoj dendrita	89
4.4.2.c. Uticaj hiperbarične oksigenacije na rast i razvoj akosona	91
4.4.2.d. Uticaj HBO na ekspresiju sinaptofizina (SYP)	93
4.4.2.e. Histochemijsko obeležavanje preseka mozga pacova krezil violetom	95
4.4.2.f. Imunofluorescentno obeležavanje preseka mozga pacova fluoro-žadom	97
5. DISKUSIJA	100
6. ZAKLJUČAK	126
7. LITERATURA	128
BIOGRAFIJA AUTORA	151

1. UVOD

Traumatske povrede moždanog tkiva ispoljavaju širok spektar kliničkih manifestacija u zavisnosti od toga koji je moždani region zahvaćen traumom, kao i od intenziteta i trajanja inicijalnog udara. Savremeni medicinski pristup traumatskim povredama mozga je usmeren ka stabilizaciji pacijenta, putem hirurške dekompresije, održavanja hemostaze, imobilizaciji frakture i prevenciji razvoja reperfuzione povrede, a po prestanku vitalne ugroženosti, sprovođenju intenzivnog rehabilitaciono-restorativnog programa (Timmons 2010, Saiki 2009, Paci 2009, Nolan 2005, Dutton 2003). Činjenica da moždanu traumu prate dugoročne posledice, nameće stav da se prema moždanoj traumi mora pristupiti kao prema hroničnoj bolesti, što ukazuje na potrebu da se i u mesecima, čak i godinama koje slede posle prvobitne traume moraju primenjivati terapijske procedure (Masel 2010).

1.1. MOŽDANA TRAUMA

Svako narušavanje integriteta centralnog nervnog sistema (CNS) izaziva niz reakcija kojima organizam odgovara na povredu. Krajnji odgovor moždanog tkiva naziva se "reaktivna glijoza" ili stvaranje glijalnog ožiljka. Upravo zbog takvog okruženja regeneracija i remijelinizacija aksona u CNS-u su sporiji, a samim tim usporen je i funkcionalni oporavak.

1.1.1. Glijalne ćelije

Centralni nervni sistem grade dva osnovna tipa ćelija: nervne i glijalne ćelije. Nervne ćelije-neuroni su ekscitabilne ćelije koje stvaraju i provode akcione potencijale, a njihove međusobne veze oblikuju našu svest.

Dugi niz godina je uloga glije u medicinskoj praksi nepravedno zanemarivana. Glija je posmatrana isključivo kao pasivni potporni materijal koji obezbeđuje fizički integritet moždanog tkiva. Međutim, novija istraživanja su ukazala da glijalne ćelije imaju aktivnu ulogu u funkcionisanju mozga.

Glijalne ćelije su podeljene u dve velike grupe: makrogliju i mikrogliju. Makrogliji pripadaju: astrociti, oligodendrociti, ependimske ćelije i periferna glija (Švanove ćelije, satelitska glija, telioglija), dok se mikroglija ne deli u podgrupe.

1.1.1.a. Oligodendrociti

Oligodendrociti su male ćelije dijametra od 3 do 5 μm sa nekoliko razgranatih nastavaka. U beloj masi mozga nalazi se interfascikularna oligodendroglija koja učestvuje u građi mijelinskog omotača, a u sivoj masi je satelitska oligodendroglija. Osnovna funkcija oligodendrocita je formiranje mijelina u CNS-u. Jedan oligodendrocit gradi jedan segment mijelina na jednom aksonu, ali istovremeno može da mijelinizira više od 50 aksona.

Za razliku od oligodendrocita, jedna Švanova ćelija u perifernom nervnom sistemu (PNS) stvara jedan segment mijelina na samo jednom aksonu. Proliferacija oligodendrocita od prekursorskih ćelija započinje u embrionalnom razvoju, ali se nastavlja i kasnije tokom života. Jedan broj ovih progenitorskih ćelija zadržava se u nediferenciranom obliku i u adultnom dobu (Stojiljković, 1998).

1.1.1.b. Ependimske ćelije

Ependimske ćelije su cilijarne ćelije. Grade ependimsku membranu koja ograničava moždane komore i centralni kanal kičmene moždine.

Između ependimskih ćelija nema čvrstih veza što omogućava slobodnu razmenu između cerebrospinalne tečnosti i nervnog tkiva. Specijalizovani oblik ovih ćelija su taniciti koji ograničavaju komore u regionima gde krvno-moždana barijera (KMB) nije kompaktna (Stojiljković, 1998).

1.1.1.c. Mikroglija

Mikroglialne ćelije su prisutne u svim delovima nervnog sistema. Funkcionalno su slične klasičnim tkivnim makrofagima, ali učestvuju i u održavanju homeostaze unutar CNS-a. U mozgu se razlikuju dva funkcionalna tipa ovih ćelija: razgranate-mirujuća mikroglija i ameboidne-aktivne ćelije.

Mikroglija je prisutna oko mesta povrede, u toku infekcija ili drugih poremećaja CNS-a, pa se tako može smatrati za prvu liniju odbrane u svim patofiziološkim procesima koji se odvijaju u okviru CNS-a (Kreutzberg 1995).

1.1.1.d. Astrociti

U mozgu odraslog čoveka gotovo 40% od ukupnog broja svih ćelija čine astrociti (Stojiljković, 1998). Astrociti obavljaju širok spektar kompleksnih fizioloških funkcija unutar CNS-a. Astrociti obezbeđuju: strukturnu podršku nervnim ćelijama, čine okruženje neurona, oslobađaju širok spektar faktora rasta i pomažu u održavanju krvnomoždane barijere (Sofroniew 2010). Nastaju od primitivnih neuroepitelijalnih stem ćelija iz ependimalne zone.

1.1.1.d.i. Struktura astrocita

Astrociti su zvezdastog oblika, dijametra od 18 do 20 μm (Sofroniew 2010). Citoplazmatičnim nastavcima uspostavljaju kontakte sa neuronima, drugim astrocitima i endotelijalnim ćelijama. Završni delovi njihovih nastavaka, koji su u kontaktu sa membranom drugih ćelija, nazivaju se završna stopala i grade zaštitni omotač oko mozga i kičmene moždine. Većina astrocita u CNS-u je međusobno povezana pukotinastim vezama koje dozvoljavaju relativno slobodno kretanje jona i malih molekula. Veze između astrocita bogate su proteinom nazvanim koneksin 43 (Ridet 1997), koji se često koristi kao marker za identifikaciju ovih veza. Kao citoplazmatični markeri za identifikaciju astrocita koriste se intermedijerni filamenti (glijalni fibrilarni kiseli protein-GFAP i vimentin) i protein S100 β (Rajadhyaksha 2002), a kao membranski marker koristi se neuralni adhezioni molekul-NCAM.

U zavisnosti od strukture i funkcije razlikuju se dva tipa astrocita: fibrozni i protoplazmatični. Ova dva tipa astrocita eksprimiraju različite antigene i potiču od različitih prekursorskih ćelija. Fibrozni astrociti su dominantno prisutni u beloj masi, imaju malo telo sa brojnim dugim citoplazmatičnim nastavcima. U citoplazmi ovih astrocita prisutan je veliki broj fibrila i filamenata koji se prostiru i u nastavke. Glavni i specifični filament je GFAP. Protoplazmatični astrociti su zastupljeniji u sivoj masi mozga, telo im je krupnije i imaju kraće i deblje nastavke sa manjom količinom filamenata. Obuhvataju svojim nastavcima dendrite, tela neurona i sinapse. Nastavci protoplazmatičnih astrocita ostvaruju kontakt sa kapilarima gradeći krvnomoždanu barijeru, koja sprečava difuziju velikih molekula iz cirkulacije u mozak (Stojiljković 1998). Radijalna glija predstavlja poseban tip astrocita koji se pojavljuje u korteksu cerebruma u toku embriogeneze i čini predominantnu populaciju glijalnih ćelija u toku razvića. Imunohistohemijske studije su pokazale da programiranu transformaciju glije prati prelazak specifičnog markera nezrele glije (vimentina) u markere zrele glije (GFAP) (Eng 2000).

1.1.1.d.ii. Funkcije astrocita

Astroцити obezbeđuju potporu neuronima u toku neurogeneze, pružaju mehaničku potporu aksonima i učestvuju u prostornoj organizaciji neurona u zreлом mozgu (Sofroniew 2010, Hatten 1984, Rakic 1981, Hatten 1981).

Astroцити učestvuju i u uspostavljanju jonske i transmitterske homeostaze u perineuralnom tkivu (Nicholls 1990). Eksperimentalni dokazi ukazuju da neke glijalne ćelije interaguju sa neuronima i učestvuju u regulaciji sinaptičke transmisije, kao i modulaciji funkcije neurona (Araque 1999).

Astroцити učestvuju i u formiranju i održavanju krvno-moždane barijere. Nastavci astrocita ostvaruju kontakte sa kapilarima sa jedne i neuronima sa druge strane.

1.2. POVREDA I OPORAVAK NERVNOG SISTEMA

1. 2.1. Povreda nervnog sistema

Radi lakšeg razumevanja patofizioloških procesa koji se odvijaju posle povrede moždanog tkiva, izvršena je podela na primarnu i sekundarnu povredu mozga. Primarna povreda obuhvata posledice koje nastaju kao rezultat inicijalnog mehaničkog događaja. Sekundarna povreda predstavlja skup biohemijskih i metaboličkih procesa započetih mehaničkom povredom (Faden 1993, Panter 1992, Young 1987).

U primarnoj zoni povrede, odmah posle traume odumire određen broj neurona, ali 24 časa kasnije broj umrlih nervnih ćelija je daleko veći. Ovo se može objasniti sekundarnom degeneracijom na mestu povrede (Strong 1983) koja se širi (Schoenfeld 1977). Sekundarna degeneracija se manifestuje metaboličkim promenama ne samo u oštećenim neuronima, već i u intaktnom

nervnom tkivu. Sekundarno izumiranje neurona u zonama koje nisu bile neposredno izložene inicijalnom udaru, posle traumatske povrede mozga ili ishemije nastavlja se u narednih nekoliko minuta do nekoliko sati i doprinosi ireverzibilnim povredama tkiva (Cooper, 1985). Posledice povrede mogu biti ishemija, moždani edemi, acidoza i hemoragija (Zauner 1995, Miller 1993, Cervos 1991).

1.2.2. Oporavak nervnog sistema posle povrede

Potvrđeno je da mozak ima sposobnost da se adaptira posle povrede i postigne oporavak izgubljenih funkcija zahvaljujući plastičnosti nervnih ćelija (Castellanos 2010, Kolb 2010, Fawcett 2009, Nudo 2003, Kolb 1999). Procesi koji se odigravaju posle povrede mozga mogu se okarakterisati sledećim pojmovima: plastičnost, oporavak i očuvanje funkcija.

Plastičnost (reorganizacija) nervnog sistema predstavlja sve promene nervnog sistema van perioda normalnog razvića. Ove promene su prisutne u svim fazama razvoja, degeneracije i regeneracije kako u perifernom nervnom sistemu (PNS), tako i u centralnom nervnom sistemu (CNS) (Gispén 1993).

Oporavak predstavlja povratak određenog ponašanja koje je izgubljeno posle povrede, dok se pod očuvanjem funkcionalnosti smatraju oblici ponašanja koji se javljaju posle povrede, a nisu postojali ranije. Još uvek je otvoreno pitanje da li se stvaranje neurona *de novo* posle povrede može uvrstiti među moguće mehanizme plastičnosti.

Kod osoba koje su pretrpele moždani udar kao i kod osoba kod kojih je došlo do traumatske povrede moždanog tkiva, dolazi do posledične funkcionalne redukcije i gubitka sposobnosti za koje je bio zadužen oštećeni deo moždanog tkiva. U mnogim istraživanjima je uočeno da posle izvesnog vremena dolazi do oporavka tih funkcija. Zaključak koji se nameće je da su one

prenete na druge regione mozga (Frost 2003, Chu 2000, Cao 1994, Xerri 1998). Najčešće regioni neposredno oko povrede preuzimaju funkcije koje su pripadale oštećenom tkivu, ali kada je povreda velikih dimenzija, može doći do redistribucije funkcija na širem području očuvanog moždanog tkiva.

Kod pacijenata koji su pretrpeli moždanu traumu, uočeno je postojanje vremenske usklađenosti između plastičnih promena unutar centralnog nervnog sistema i njihovog funkcionalnog oporavka. Terapijski metodi koji podstiču strukturnu plastičnost moždanog tkiva, samim tim i ubrzavaju funkcionalni oporavak posle povrede CNS-a (Vavrek 2006, Dancause 2005, Papadopoulos 2006, Bareyre 2004, Bradbury 2002, Raineteau 2001, Xerri 1998).

Regeneracija u perifernom nervnom sistemu je izraženija nego u centralnom nervnom sistemu. Proksimalni deo oštećenog aksona daje nekoliko izdanaka koji se izdužuju i "traže" distalni ostatak istog aksona. Kada jedan od izdanaka dođe u kontakt sa Švanovom ćelijom distalnog ostatka, na vrhu se formira konus rasta sa filopodijama što omogućava dalje izduživanje duž lanca Švanovih ćelija. Sa druge strane, ukoliko ne dođe do kontakta, distalni deo oštećenog aksona odumire, a taj proces se naziva Valerian degeneracija (Coleman 2010).

Posle prekida aksona prvi korak u procesu regeneracije je formiranje konusa rasta. Ovaj proces se odvija u nekoliko faza. Prvo dolazi do retrakcije oštećenog proksimalnog dela aksona, koji će se posle izvesnog vremena pretvoriti u konus rasta iz koga će nići novi izrastak.

U *in vivo* uslovima ovaj proces se može desiti u toku jednoga dana (Pan 2003, Friede 1980), dok se u *in vitro* uslovima odvija u veoma kratkom vremenskom roku, čak i za svega par sati (Chierzi 2005, Verma 2005). Tokom prve dve nedelje dolazi do relativno brzog izrastanja. Kasnije se izrastanje usporava, ali se održava još nekoliko meseci.

Reaktivna glijoza sprečava širenje povrede, ali nažalost i oporavak neuronske mreže, jer se stvara neprohodna sredina za nove nervne izrastke. Međutim, pokazano je da aksoni adultnog CNS-a, ako im se obezbedi adekvatna permisivna sredina, mogu da se regenerišu i izrastaju na velike daljine (David 1981).

Mnogi faktori doprinose neuspehu regeneracije u CNS-u. Oštećeni neuroni ne eksprimiraju proteine vezane za rast, a koji se javljaju u toku razvića i uspešne regeneracije (Fu 1997). Često nedostaju i trofički faktori koji potenciraju rast aksona (Gumy 2010). Jedan od razloga zbog koga je regeneracija CNS-a kod kičmenjaka slaba je i prisustvo mnogobrojnih inhibitornih faktora koje proizvode astrociti ožiljnog tkiva i koji utiču na ćelije u okolini (Frederickson 1991). Prisutni su brojni inhibitorni faktori kao što su Nogo (Spillman 1998), mijelin-asocirani glikoprotein (MAG) (McKerracher 1994), hondroitin sulfatni proteoglikani (CSPG) (Jones 2003, Niederost 1999) i aretin (Xiao 1997).

Oporavak se može uslovno podeliti na rani i kasni. Rani period oporavka nastupa neposredno posle povrede. U ovom periodu se zapažaju promene i u neoštećenim sinapsama. Preostali, intaktni nervni završeci koji su bili u vezi sa oštećenim aksonima postaju nefunkcionalni. Javlja se hiperosetljivost. Uzrok ove pojave je povećan broj receptora na postsinaptičkoj membrani, pa denervisani deo ciljne ćelije postaje značajno osetljiviji na preostale aferentne stimuluse. U ranom periodu oporavka posle povrede neaktivne sinapse postaju aktivne, a povećana je i efikasnost neoštećenih sinapsi (što je posledica povećanog oslobađanja neurotransmitera u presinaptičkim, delimično oštećenim aksonima).

Kasni period oporavka karakteriše izrastanje novih ogranaka aksona. Neoštećeni aksoni mogu da se preusmeravaju ukoliko je postsinaptička membrana oštećena.

1.2.3. Inflamacija i centralni nervni sistem

Imuni i centralni nervni sistem su se dugo posmatrali odvojeno jedan od drugog, zbog izolovanosti CNS-a od perifernog imunog sistema krvno-moždanom barijerom, pri čemu se mislilo da u fiziološkim uslovima nema njihove međusobne interakcije. Danas se, međutim, prihvata mišljenje da je CNS pod konstantnom kontrolom imunog sistema (Becher 2000).

Prilikom povrede, glijalne ćelije sintetišu čitavu paletu malih, proinflamatornih citokina i hemokina, koji su sposobni da prođu kroz krvno-moždanu barijeru i tako stimulišu periferni imuni sistem i angažuju inflamatorne leukocite na mesto povrede (Sofroniew 2009).

Citokini, takođe, stimulišu ekspresiju intercelularnih adhezivnih molekula i na taj način stimulišu infiltraciju leukocita kroz krvno-moždanu barijeru. Nakupljanje leukocita na mestu povrede dalje produbljuje oštećenje tkiva oslobađanjem citotoksičnih supstanci kao što su reaktivne vrste kiseonika, koji se zajednički nazivaju slobodni kiseonični radikali (Stanimirović 2000).

Pored stimulacije perifernog imunog sistema, moždana trauma indukuje i aktivaciju prisutnih glijalnih ćelija koje, takođe, imaju ulogu u inflamatornom odgovoru. Posle povrede CNS-a, mikroglija i makrofagi dobijaju fagocitnu ulogu u odstranjivanju ostataka mijelina, ekstraćelijskog matriksa i mijelin-asociranih inhibitornih faktora rasta (Correale 2004). Mikroglija je posebno aktivirana preko "toll-like" receptora na površini ćelije, ali njena aktivnost je modulirana i preko purinskih i CD40 receptora koje eksprimira. Novija istraživanja su pokazala da su CD40 i njegov ligand, CD40L (CD154) koji se nalazi ekspimiran na reaktivnim astrocitima, veoma bitni molekuli u procesu inflamacije unutar CNS-a.

1.3. REAKCIJE ĆELIJA CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA NA POVREDU

Kao što je već naglašeno, povrede ili oštećenja mozga uzrokuju reakciju okolnog tkiva koja se naziva reaktivna glijoza. Proces se sastoji od formiranja barijere izgrađene od glijalnih ćelija, čime se izoluje oštećeno mesto od ostatka tkiva.

Ćelije koje u najvećoj meri učestvuju u formiranju barijere su reaktivni astrociti (Sidoryk-Wegrzynowicz 2010, Afshari 2009, Norton 1992). Proces ograničavanja i izolovanja mesta povrede pomaže u sprečavanju nastanka sekundarne povrede i smanjuje dalje oštećenje tkiva (Voskuhl 2009, Ridet 1997).

Povreda započinje seriju ćelijskih i molekularnih procesa koji se razvijaju u narednim danima. Glavni tipovi ćelija koji su uključeni u ove promene su astrociti, mikroglia, oligodendrociti i prekursori oligodendrocita (sa mogućim učešćem meningealnih i stem ćelija). Glijalni ožiljak je promenljiva struktura koja se menja i razvija u vremenu u zavisnosti od ćelija koje ga grade.

Posle povrede aktiviraju se monociti i mikroglia. Monociti iz krvi prelaze u moždano tkivo i postaju aktivni makrofagi i trenutno pristižu na mesto povrede, dok mikroglia deluje sporije (Mulligan 1991, Fulcrand 1977).

Ova vrsta glije ima dominantnu ulogu u uklanjanju degenerisanih neurona (Mulligan 1991). Odstranjivanje ćelijskih ostataka vrši se pinocitozom i fagocitozom. Morfološke promene na mikrogliji (koja dobija ameboidni oblik) i astrocitima (hiperplazija i hipertrofija) se dešavaju mnogo ranije nego na neuronima (Marty 1991, Mulligan 1991). Posle 3 do 5 dana, veliki broj oligodendrocitnih prekursora se mobiliše iz okolnog tkiva. Finalnu strukturu ožiljnog tkiva predominantno čine astrociti koji se dele i polako migriraju na mesto povrede gdje popunjavaju upražnjen prostor (Fawcett 1999).

1.3.1. Reakcija oligodendrocita na povredu

Povredu direktno oštećuje mijelinski omotač, dok degeneracija aksona takođe dovodi i do degeneracije mijelina. Ostatke ovog razorenog mijelina uklanja mikroglija. Ovaj proces može da traje i nekoliko nedelja. Neki od ovih oligodendrocita umiru, dok neki preživljavaju, pa glijalni ožiljak generalno sadrži oligodendrocite i mijelinski ostatak (Perry 1991). Sposobnost ovih preostalih oligodendrocita da regenerišu svoje nastavke i formiraju novi mijelin je diskutabilna (Keirstead 1997, Scolding 1996, Ludwin 1994).

Zreli oligodendrociti *in vitro* i mijelin *in vivo* imaju najmanje tri molekula koji inhibiraju rast aksona: NI250, MAG i tenascin R.

Regeneracija ne uspeva u mijeliniziranim putevima CNS, ali neki nemijelinizirani putevi imaju ograničenu mogućnost regeneracije. Zreli oligodendrociti *in vitro* ne dozvoljavaju izrastanje aksona i dovode do kolapsa konusa rasta aksona sa kojima dođu u kontakt (Bandtlow 1990, Fawcett 1989). Mijelin izolovan iz adultnog nervnog sistema takođe ima inhibitorno dejstvo. Antitelima NI-1 koja neutralizuju mijelinski inhibitorni molekul NI125/nogo *in vivo* potvrđuje se inhibitorno delovanje oligodendrocita na regeneraciju u CNS-u. Potvrđeno je da primena ovih antitela u različitim putevima CNS-a podstiče regeneraciju i grananje oštećenih aksona (Schnell 1990).

1.3.2. Odgovor oligodendrocitnih prekursorskih ćelija

CNS sadrži neprekidnu mrežu malih ćelija koje se boje antitelom za proteoglikan NG2, koje imaju receptore za faktor rasta trombocita (PDGF) i faktor rasta fibroblasta (FGF). Ove ćelije su identifikovane kao prekursori koji mogu da se diferenciraju u oligodendrocite (Reynolds 1997, Scolding 1995, Levine 1994, Noble 1992, Wren 1992).

Činjenica da se ove ćelije masovno mobilišu u svim tipovima povreda CNS-a, a ne samo u demijelinizacionim povredama, čini ih važnim učesnicima glijalnog odgovora (Rhodes 2006, Keirstead 1998, Levine 1994). Prvo povećavaju ekspresiju NG2 molekula na svojoj površini, a zatim se u velikom broju akumuliraju na mestu povrede verovatno kombinacijom proliferacije i migracije. Brojnost ćelija dostiže svoj maksimum 7 dana posle povrede i zatim počinje polako da opada, ali ipak broj ostaje povišen tokom nekoliko nedelja (Levine 1994). Zreli oligodendrociti inhibiraju konus rasta aksona preko NI250 i MAG, ali ovakav efekat nije zabeležen kod nezrelih oligodendrocita. Pokazano je da NG2 proteoglikan koji je nađen na oligodendrocitnim prekursorskim ćelijama, predstavlja inhibitor rasta aksona senzornih, kortikalnih i cerebelarnih neurona (Fidler 1999, Dou 1994). Ove ćelije se u velikom broju okupljaju oko mesta povrede. Sintetišu i eksprimiraju veliki broj inhibitornih proteoglikana, čime deluju kao moćni inhibitor regeneracije aksona.

1.3.3. Uloga mikroglije/makrofaga u patofiziologiji povrede CNS-a

Mikroglia je u fiziološkim uslovima u mozgu prisutna u neaktivnoj - mirujućoj formi, sa kratkim razgranatim nastavcima. Posle povrede ove ćelije se aktiviraju, dolazi do njihove deobe i migracije ka mestu povrede (Kreutzberg 1995, Kreutzberg 1996), i funkcionalne transformacije u ćelije slične makrofagima. U toku 24 sata posle povrede, u zoni oštećenja, dolazi do sakupljanja velikog broja aktiviranih ćelija mikroglije, a mogu biti prisutni i makrofagi poreklom iz krvi (ako je došlo do oštećenja krvnomoždane barijere) (Kreutzberg 1996). Povećan broj mikroglija/makrofaga, u različitim fazama aktivacije, ostaje na mestu povrede nedeljama (Fawcett 1999). Ove ćelije su sposobne da stvaraju toksične molekule. Aktivirana mikroglia ima mnoge osobine makrofaga i sposobna je da oslobađa slobodne kiseonične radikale, azot oksid, derivate arahidonske kiseline, citotoksične medijatore, citokine i druge toksične molekule (Afshari 2009, Auger 1992, Giulian 1990).

Mnogi citokini deluju direktno na neurone, pošto oni poseduju brojne receptore za citokine. Interleukin 1 (IL-1) izaziva oslobađanje drugih faktora rasta od strane astrocita (interleukin 6 - IL-6, neuronalni faktor rasta - NGF) koji utiču na aktivnost neurona (Cotman 1994). Istovremeno citokini koje stvaraju astrociti i neuroni utiču na mikrogliju (Eng 1994).

1.3.4. Meningealne ćelije i povreda

Mozak i kičmena moždina su okruženi slojem meningealnih ćelija koje su identifikovane i oko nekih većih krvnih sudova. Svaka povreda koja probija meningealnu površinu mozga ili kičmene moždine dovodi do migracije meningealnih ćelija, koje ponovo stvaraju kontinuirani sloj ćelija koji pokriva CNS. Ove ćelije u interakciji sa astrocitima dovode do ponovnog formiranja "glije limitans" (Krueger 1986).

1.3.5. Multipotentne progenitorske ćelije i povreda

Kod odraslih ljudi CNS sadrži mali broj multipotentnih progenitorskih ćelija. Većina njih se nalazi u periventrikularnom prostoru prednjeg mozga, ali su prisutne i u ostalim delovima nervnog sistema (Weiss 1996, Palmer 1995, Cameron 1993, Lois 1994). U fiziološkim uslovima, osnovna funkcija ovih ćelija je da migriraju u olfaktorne bulbuse i daju nove neurone i glijalne ćelije (Lois 1994). Ove ćelije eksprimiraju intermedijerni filament nestin i imaju polisijalizovan neuronalni ćelijski adhezioni molekul (N-CAM) na svojoj površini. U kičmenoj moždini je pokazano da periventrikularne ćelije koje eksprimiraju nestin migriraju na mesto povrede i počinju da eksprimiraju GFAP (Johansson 1999).

1.3.6. Astrociti i povreda

U finalnoj formi, glijalni ožiljak sadrži uglavnom mrežu građenu od astrocitnih nastavaka, čvrsto prepletenih i povezanih tesnim i pukotinastim vezama. Astrocitni ožiljak ima inhibitornu ulogu jer predstavlja mehaničku barijeru koja sprečava izrastanje aksona i prorastanje "pupljenja" kroz moždano tkivo (Sofroniew 2010). Tome doprinose i mnoge inhibitorne supstance koje sintetišu ove ćelije, u prvom redu hondrotin sulfatni proteoglikani - CSPG (Voskuhl 2009, Ridet 1997).

Astrociti u blizini povrede povećavaju produkciju vimentina i nestina a uočena je i njihova ćelijska deoba. Javljaju se i biohemijske promene u produkciji trofičkih faktora, citokina, proteaza, inhibitora proteaza, molekula ekstracelularnog matriksa i drugih molekula (Hamby 2010, Wu 1998, Ridet 1997, Merrill 1996, Eddleston 1993a, Norton 1992, Cervos 1991, Dusart 1991). Rani događaj koji utiče na odgovor astrocita je invazija meningealnih ćelija na mesto povrede. Interakcijom ovih ćelija i preživelih astrocita uspostavlja se nova "glija limitans" (Abnet 1991, Reier 1988, Mathewson 1985). Astrociti oko ovog područja postaju hipertrofirani, stvaraju mnogo tankih nastavaka, a neki podležu ćelijskoj deobi. Tako dolazi do formiranja tkiva predominantno građenog od gusto pakovanih, hipertrofiranih astrocita sa tesno povezanim nastavcima.

Potvrđeno je da reaktivni astrociti, koji su udaljeni od mesta povrede, na svojoj ćelijskoj membrani eksprimiraju receptore za različite faktore rasta (Nagai 2007, Pekny 2004). Astrociti luče neurotrofički faktor koji štiti neurone od degeneracije, oslobađaju nekoliko proteaza i inhibitora proteaza koji modulišu rast neurita (Gaughwin 2006). Kod reaktivnih astrocita dolazi do povećanja broja ćelijskih površinskih molekula, uključujući adhezione ćelijske molekule kao i adhezione molekule matriksa.

Pokazano je da pod određenim okolnostima to može da obezbedi povoljnu sredinu za regeneraciju aksona (Nedergaard 2003). Sa druge strane, pokazano je da reaktivna gliozna i formiranje glijalne barijere može da spreči regeneraciju aksona (Voskuhl 2009).

Jedna od osobina astrocita je njihov snažan odgovor na različita neurološka oštećenja. Odgovor astroglije je brz i može biti registrovan u toku prvog sata posle mehaničke povrede (Mucke 1991). Kakav će biti odgovor astrocita zavisi od lokalnih faktora, kao što su signali koji potiču od okolnog oštećenog tkiva. Tako astrociti igraju glavnu ulogu u odlučivanju sudbine neurona posle povrede, u odlučivanju da li će neuroni preživeti ili ne, kao i da li će doći do regeneracije aksona (Myer 2006).

Reaktivna gliozna se definiše kao povećanje veličine ćelijskog tela astrocita i njihovih nastavaka, zajedno sa povećanom ekspresijom GFAP-a, intermedijernog filameta koji se javlja samo u astrocitima (Eng 1994). Mitoza astrocita se javlja u slučaju da povreda ostavi prazan prostor koji može biti ispunjen proliferišućim astrocitima. Povećanje GFAP-a je univerzalno prihvaćeno kao marker reaktivne glioze. Reaktivna gliozna se pojavljuje kao odgovor na svako narušavanje integriteta moždanog tkiva, bez obzira da li je u pitanju hemijski ili fizički agens.

Norton i saradnici (1992) su pretpostavili da različite vrste povreda indukuju drugačiji odgovor astrocita, specifičan po vremenskom toku, uključenosti kontralateralne strane, kao i u odnosima između GFAP i RNK i/ili proteina. Reaktivni astrociti sintetišu i različite faktore rasta, citokine i neuropeptide (McMillian 1994, Eddleston 1993a, Eddleston 1993b, Schwartz 1992), koji nisu detektovani kod astrocita u mirovanju. U zavisnosti od načina na koji je došlo do inicijalnog narušavanja integriteta moždanog tkiva, može doći do razvoja inflamatornog odgovora u koji mogu biti uključene imune ćelije i/ili citokini. Astrociti i mikroglija mogu da oslobađaju citokine i odgovaraju na njih (Giulian 1994 a, b).

Mikroglia se često aktivira pre pojave reaktivnih astrocita u odgovoru na povredu u CNS-u, tako da u nekim uslovima ona oslobađa faktore koji mogu da pokrenu i indukuju reaktivnu gliozu.

U inicijalnom periodu posle moždane traume u kome dolazi do smrti i oštećenja ćelija neuroprotektivni tretmani su važna terapijska sredstva. Svi tretmani koji bi se koristili u oporavku CNS-a posle inicijalnog perioda moraju da se izbore sa sredinom u kojoj postoji glijalni ožiljak, jer on može da inhibira rast akona i mijelinizaciju. Pronaći mehanizam koji aktivira astrocite i utvrditi da li se on javlja kod svih vrsta povreda, ostaje jedan od glavnih ciljeva u istraživanjima oštećenja i oporavka CNS-a.

1.4. INTERMEDIJERNI FILAMENTI

Citoskelet omogućava eukariotskoj ćeliji da ima karakterističan oblik i mehanički integritet (Herrmann 2004). Citoskelet je sastavljen od tri proteinske mreže koje su izgrađene od tri proteinska filameta:

1. Mikrofilamenti ili aktinski filamenti (tanki) prečnika oko 6 nm.
2. Mikrotubule (debeli filamenti) prečnika oko 20 nm.
3. Intermedijerni filamenti (IF) koji variraju u prečniku od 8-12 nm.

Intermedijerni filamenti su veoma različiti i pokazuju specifičnu ćelijsku ekspresiju. Genska ekspresija intermedijernih filamenata je veoma precizno koordinisana sa razvojem organa i tkivnom diferencijacijom. Filamenti predstavljaju značajne markere ćelija u kojima se nalaze i sredstvo su pomoću koga se može proučavati ćelijska determinacija i diferencijacija. Intermedijerni filamenti su heterogena familija proteina i podeljeni su u 6 klasa (Fuchs 1994).

Prvu i drugu grupu čine kiseli i bazni keratini koji se javljaju u epidermalnim ćelijama. Treću grupu čine vimentin i filamenti srodni vimentinu, u koje spadaju: dezmin, GFAP i periferin. Četvrtu i šestu grupu čine neurofilamenti (NF). Ekspimiraju se u zrelim neuronima i čine glavnu citoskeletnu komponentu aksona. Petu grupu čine laminini.

1.4.1. Vimentin

Vimentin je kao proteinski marker veoma koristan za proučavanje mehanizma oporavka neuronske mreže i razumevanja vremenske i prostorne ekspresije mehanizama koji se dešavaju u toku razvića (Pekny 2004). On je tkivno specifičan i razvićem regulisan IF. Javlja se u nekoliko izoformi koje su rezultat različitih fosforilacija. Ekspresija vimentina je regulisana faktorima rasta. Vimentin i GFAP nisu prisutni u diferenciranim nervnim ćelijama. U ćelijskoj kulturi i vimentin i GFAP se ekspimiraju u astrocitu. Vimentin se razlikuje od ostalih IF, jer se ekspimirira u ranom stadijumu ćelijske diferencijacije. Tokom diferencijacije količina vimentina se smanjuje i prestaje njegova ekspresija, dok se indukuje ekspresija drugih IF kao što su dezmin, GFAP ili neurofilamenti (Zehner 1999, Bermano 2001). Vimentin se ekspimirira u nezrelim astrocitima (Correia 1999) i u radijalnoj gliji (Schachner 1977), gde može biti praćen i ekspresijom nestina (Frederiksen 1988). Posle kortikalne povrede na ivicama lezije pojavljuju se astrociti sa ekspimiranim vimentinom i nestinom (Pixley 1984). Unutrašnji reaktivni glijalni sloj, debljine 300–350 μm , koji ograničava povredu sastoji se od reaktivnih astrocita pozitivnih na prisustvo i vimentina i GFAP-a (oko 60 %). Izvan unutrašnjeg sloja, mogu se pronaći samo GFAP pozitivni astrociti (Calvo 1991). Smatra se da vimentin ima ulogu u komunikaciji i transportu između ćelijske površine i jedra, tako što spaja jedro sa plazma membranom. Uloga vimentina je vrlo značajna u održavanju unutrašnje organizacije ćelija, jer drži organele i jedro na određenom mestu.

1.4.2. Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)

GFAP je fibrozni, gradivni protein citoskeleta, molekulske mase 40-54 kD, debljine 10 μm (Eng 2000, 1971). Broj monomernih jedinica koje čine GFAP kreće se od 1 do 7. Tokom razvoja mozga, sadržaj GFAP-a i nivo iRNK je daleko veći u beloj nego u sivoj masi (Lewis 1985). Regionalna distribucija ovog proteina pokazuje njegovu zastupljenost u protoplazmatičnim astrocitima molekularnog sloja korteksa, paraventrikularnoj beloj masi, hipokampusu, subependimalnom sloju, talamusu, granularnom sloju i Bergmanovoj gliji malog mozga (Liu 2006, Schiffer 1986). Vimentin koegzistira sa GFAP-om u gliji, ali se javlja ranije i u toku procesa sazrevanja u potpunosti ga zamenjuje GFAP (Schnitzer 1981).

GFAP ima važnu ulogu u pokretljivosti astrocita, određuje njihov oblik i strukturnu stabilnost nastavaka. GFAP je specifični marker zrelih astrocita u normalnim i patološkim uslovima. U CNS-u viših kičmenjaka posle povrede ili kao rezultat bolesti ili genetskih poremećaja, astrociti postaju reaktivni i odgovaraju na tipičan način u procesu astroglioze. Reaktivna astroglioza se karakteriše brзом sintezom GFAP-a. Nivo ekspresije je značajno povećan od prvog dana pa sve do četvrte nedelje posle povrede (Lavrence 2000).

1.4.3. Neurofilamenti

Neurofilamenti predstavljaju glavne konstituente citoskeletnih proteina. U nervnom sistemu sisara neurofilamenti se sastoje od tri subjedinice: NF-H, od 200kD, NF-M od 150kD i od NF-L od 68kD. Ove tri subjedinice zajedno formiraju neurofilament čiji je dijametar 10 nanometara (Goldstein 1983). Sva tri neurofilamentna proteina mogu biti fosforilisana *in vivo* i *in vitro*. Putem fosforilacije se zapaža promena konformacije fosforilisanog domena i zapremine celog molekula (Julien 1983).

Antitela SMI31 prepoznaju fosforilisane oblike neurofilamenata od 200kD i 150kD i u fiziološkim uslovima ne zapaža se beleženje tela nervnih ćelija, već samo obeležavanje tankih i debelih aksona (Hugon 1990) i nekih dendrita, kao npr. kod košarastih ćelija.

Upotrebom monoklonskih antitela na fosforilisane oblike neurofilamenata, tj. SMI31, došlo se do otkrića da proces fosforilacije neurofilamenata počinje u telu nervnih ćelija, zatim se nastavlja u proksimalnom, pa u distalnom segmentu aksona (Hugon 1990). Neki neuroni pokazuju citoplazmatsku heterogenost neurofilamenata. Nefosforilisana forma se nalazi u somi neurona, dendritima i proksimalnom delu aksona, dok se fosforilisana forma nalazi u dugačkim projekcionim vlaknima i terminalnim aksonima (Sternberger 1983).

SMI32 je monoklonsko antitelo, koje prepoznaje nefosforilisane epitope na srednjoj (150kD) i teškoj subjedinici (200kD) neurofilamentnih proteina. Ovo antitelo primarno beleži tela neurona i dendrite piramidalnih neurona, kao i neke tanke aksone (Lim 2007). U patološkim stanjima dolazi do pojačanog bojenja tela nervnih ćelija. Pretpostavlja se da neurofilamenti imaju značajnu ulogu u stabilizaciji citoskeleta aksona putem interakcije sa mikrotubulima i tau-proteinom, ali da ne učestvuju direktno u procesima rasta aksona.

1.4.4. Za mikrotubule vezani protein 2 (MAP2)

MAP2 predstavlja jedan od najvažnijih proteina u moždanom tkivu. Postoje tri forme MAP2: dve forme su približne molekulske mase oko 280 kD (MAP2a i MAP2b) dok je treća nešto manje molekulske mase od oko 70 kD (MAP2c) (Scheffler 2005). MAP2 učestvuje u procesu stvaranja mikrotubula, što predstavlja jedan od najvažnijih koraka u neurogenezi. Smatra se da MAP 2 stabilizuje mikrotubule i omogućava međusobno povezivanje bočnih lanaca kao i njihovo povezivanje sa drugim intermedijernim filamentima.

U mozgu novorođenih pacova, MAP2b i MAP2c su prisutni, dok je primetno potpuno odsustvo MAP2a. Tek od 10 dana po rođenju može se uočiti prisustvo MAP2a. U tom periodu se takođe može primetiti da dolazi do značajnog pada nivoa MAP2c. Ove promene koreliraju sa periodom intenzivnog rasta dendrita, na putu ka postizanju morfološkog stepena razvoja koji odgovara zreloom moždanom tkivu. MAP2 se može koristiti kao validan marker za praćenje procesa oporavka dendritskih nastavaka posle povrede CNS-a (Furutani 2011).

1.4.5. Protein rasta 43 (GAP43)

Protein rasta 43 spada u grupu membranskih proteina. Ključna je komponenta koja učestvuje u regulaciji metaboličkih puteva koji su uključeni u procese membranskog remodelovanja i izrastanja neurita (Hulsebosch 1998). Registrovano je da u visoko plastičnim regionima adultnog mozga dolazi do fosforilacije GAP43 tokom procesa učenja (Pfenninger 1991).

GAP43 ima važnu ulogu u procesu regeneracije aksona oštećenih neurona, tako da se koristi kao validan proteinski marker rasta i neuralne plastičnosti (Dijk 2007). Do masovnog ispoljavanja GAP43 dolazi na konusima rasta kako tokom razvoja nervnog sistema, tako i tokom regeneracije (Benowitz 1997).

Potvrđeno je postojanje korelacija između ekspresije GAP43 i regenerativnih potencijala oštećenih motoneurona (Yuan 2009). U periodu od trećeg do sedmog dana posle povrede moždanog tkiva dolazi do porasta GAP43 imunoreaktivnosti, koja dostiže maksimum dve nedelje posle povrede. Pokazano je da se ovakav porast imunoreaktivnosti na GAP43 podudara sa aksonalnom regeneracijom (Hall 2010, Harris 2010, Yuan 2009, King 2001, Masliah 1993).

1.4.6. Sinaptofizin (SYP)

Glikoprotein sinaptofizin je prisutan u mnogim neuroendokrinim ćelijama i u svim neuronima unutar mozga i kičmene moždine. Unutar neurona sinaptofizin je najzastupljeniji integralni protein membrana sinaptičkih vezikula (Wiedenmann 1985).

Uzimajući u razmatranje njegovu dobro poznatu ulogu u procesu formiranja sinapsi (Tarsa 2002), SYP se koristi kao funkcionalni molekularni marker sinapsi (Hall 2010, Shojo 2006, Masliah 1993). Imunoreaktivnost na SYP se primenjuje kao pouzdan metod u istraživanjima patofizioloških procesa koji se nalaze u osnovi neuroloških poremećaja (Masliah 1993), kao i kod povreda mozga (Shojo 2006) i kičmene moždine (Li 2004).

1.5. HIPERBARIČNA OKSIGENACIJA (HBO)

Hiperbarična oksigenacija (HBO) predstavlja terapijsku i dijagnostičku metodu u kojoj pacijent u specijalizovanim uslovima pod pritiskom višim od atmosferskog udiše 100% molekulski kiseonik (Gill 2004).

U početku je hiperbarična oksigenacija razvijana kao terapija za dekompresionu bolest ronilaca (Moon 1997), dok se danas HBO primenjuje i kao terapija izbora kod trovanja ugljen monoksidom, kao i kod gasne gangrene (Schaub 2009, Korhonen 1999).

Terapijski principi hiperbarične oksigenacije se zasnivaju na istiskivanju mehurića gasa iz plazme i povećanju parcijalnog pritiska kiseonika u krvi, čime se prevazilazi hipoksija u obolelim tkivima, koja uzrokuje kolaps energetskeg metabolizma (Berger 1999), što dovodi do odumiranja ćelija (Yager 1992).

Hiperbarična oksigenacija je danas široko prihvaćena terapijska metoda, koja se primenjuje u terapiji niza kliničkih stanja kao što su: hronične nezarastajuće rane, opekotine, rezistentne bakterijske infekcije, kompartment sindrom, kompromitovani graftovi, intrakranijalni abscesi, radijacione povrede, refraktorni osteomijelitis, okluzija arterije centralis retine, kao i u terapiji komplikacija diabetesa (Murphy-Lavoie 2008, Wilkinson 2004, Abidia 2003, Kalani 2002, Feldmeier 2002, Niezgoda 1997, Faglia 1996, Doctor 1992, Lampl 1992, Bevers 1992, Knighton 1990, Skyhar 1986, Knighton 1981, Hart 1974, Ninikoski 1972, Perrins 1967).

Pored toga ova metoda se u značajnoj meri može primeniti i kod zdravih osoba u cilju očuvanja zdravlja i poboljšanju kvaliteta života, kao i kod profesionalnih sportista u cilju ubrzanja oporavka posle intenzivnih fizičkih napora.

1.5.1 Fundamentalni zakoni fizike koji se primenjuju u hiperbaričnoj medicini

Bojl-Mariotov zakon glasi da je pri konstantnoj temperaturi, proizvod pritiska gasa i zapremine suda u kome se gas nalazi konstantan.

$$P \times V = \text{const. Za } T = \text{const.}$$

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2 \text{ Za } T = \text{const.}$$

Zakon idealnih gasova se nadovezuje na Bojl-Mariotov zakon i može se iskazati sledećom jednačinom:

$$\frac{P \times V}{T} = \text{const. ili } \frac{P_1 \times V_1}{T_1} = \frac{P_2 \times V_2}{T_2}$$

Henrijev zakon glasi da je masa gasa koji će se rastvoriti u datoj zapremini tečnosti direktno proporcionalna pritisku i rastvorljivosti gasa.

$$\frac{\alpha \times V}{C} = \text{const. Za } T = \text{const.}$$

gde je P = parcijalni pritisak gasa iznad površine tečnosti

C = koncentracija gasa u tečnosti

α = koeficijent rastvorljivosti gasa

Povećanjem pritiska u hiperbaričnoj komori udeo fizički rastvorenog kiseonika u krvnoj plazmi raste.

Da bi se standardizovao iznos rastvorenog kiseonika uveden je termin apsolutna atmosfera (ATA). Izračunava se kao proizvod procenta kiseonika u smeši gasova i pritiska.

1.5.2. Efekti hiperbarične oksigenacije na transport kiseonika u organizmu

Kiseonik se kreće niz gradijent pritiska iz atmosfere, preko alveolarnog vazduha, arterijske krvi, kapilarne krvi, kroz intersticijumsku i intracelularnu tečnost do mesta u ćeliji gde se uključuje u metaboličke procese: prvenstveno u mitohondrijama, a zatim i u peroksizomima i endoplazmatskom retikulumu (Zauner 2002a). Pod normobaričnim uslovima, gradijent parcijalnog pritiska kiseonika PO_2 , koji se još naziva i kiseonična kaskada (Nun 1993), počinje sa 159 mm Hg, a završava sa 3,8–22,5 mm Hg u zavisnosti od ciljnog tkiva.

Kada se udiše vazduh pri atmosferskom pritisku od 1 atmosfere (20,9% kiseonika, pri 1 ATA), u krvi se 97% kiseonika prenosi putem eritrocita, vezano za hemoglobin. U fiziološkim uslovima 100 ml krvi sadrži 15 grama hemoglobina. Svaki gram hemoglobina može za sebe da veže oko 1,34 ml kiseonika, tako da pri saturaciji hemoglobina od 97%, svakih 100 ml krvi može da prenese 19,4 ml kiseonika, što se može i izraziti kao 19,4 vol.%.

Kada se postigne 100% saturacija hemoglobina, svakih 100 ml krvi može da prenese 20 ml kiseonika. Kako na nivou kapilara dolazi do prelaska kiseonika u intersticijumsku tečnost vol.% kiseonika u venskoj krvi opada na 14,4. U fiziološkim uslovima se oko 5 ml kiseonika transportuje od pluća do tkiva, putem 100 ml krvi vezano za hemoglobin. Svega oko 3% kiseonika prenosi se u formi fizički rastvorenog u plazmi prilikom udisanja vazduha pri 1 ATA, tako da ukupna količina kiseonika koja se prenosi u 100 ml krvi iznosi oko 19,7 vol.% (Guyton 2008).

Prema Henrijevom zakonu pocenat fizički rastvorenog kiseonika raste u hiperbaričnim uslovima.

Količina O₂ u arterijskoj krvi = O₂ vezan za Hb + O₂ rastvoren u plazmi

$$KO_2 = SaO_2 \times Hb \times 1,34 + 0,003 \times PaO_2$$

$$KO_2 = \text{ml O}_2 / 100 \text{ ml arterijske krvi}$$

SaO₂ = procenat saturacije hemoglobina kiseonikom, u formi decimalne frakcije

Hb = količina hemoglobina (g/100 ml krvi)

1,34 = Kapacitet hemoglobina za vezivanje kiseonika (Hufner-ov broj), koji ukazuje da 1 g Hb može vezati 1,34 ml O₂ kada je u potpunosti zasićen kiseonikom

0,003 = konstanta rastvorljivosti kiseonika u plazmi koja označava da će se 0,003 ml O₂/100 ml plazme/mm Hg PaO₂

PaO₂ = arterijski parcijalni pritisak kiseonika

Kada se udiše 100% kiseonik pri 1.5 ATA, dolazi do porasta arterijskog parcijalnog kiseonika (sa 90 mmHg pri udisanju 20,9 % kiseonika, pri 1ATA) na 1053 mmHg, da bi pri pritisku od 2.5 ATA dostigao 2000 mmHg. Kao posledica povećane oksigenacije procenat fizički rastvorenog kiseonika pri pritisku od 1,5

ATA bi porastao na 3,2 vol.% a pri pritisku od 2,5 ATA na 5,6 vol.%. Kako je hemoglobin u potpunosti saturisan kiseonikom pri pritisku od 2,5 ATA, ukupna količina kiseonika koja se u ovakvim uslovima prenosi putem 100 ml krvi bi iznosila 26,8 vol.%. U ovakvim uslovima 100% saturisani oksihemoglobin prelazi iz arterijske u vensku krv, jer fizički rastvoren kisonik iz plazme mnogo lakše prelazi u intersticijsku tečnost (Jain 2004). Kada se primeni pritisak od 3 ATA količina od 6,8 ml kiseonika se fizički rastvara u 100 ml plazme. Ako se minutni volumen srca održi u fiziološkim okvirima, ova količina kiseonika je dovoljna da zadovolji metaboličke potrebe organizma u mirovanju. U radu pod naslovom: Život bez krvi, I. Boerema je 1960. godine publikovao ove epohalne eksperimentalne nalaze.

Količina kiseonika koja se doprema do tkiva zavisi od minutnog volumena srca i količine kiseonika u arterijskoj krvi.

$$DO_2 = MV \times KO_2$$

DO_2 = dopremanje kiseonika ml/min

MV = minutni volumen ml/min

U skladu sa Fikovim principom, količina kiseonika koju preuzme celokupan organizam u jedinici vremena (VO_2) je jednaka količniku minutnog volumena i količine kiseonika koju tkiva preuzimaju iz krvi. To se može preračunati kao razlika između količine kiseonika u arterijskoj krvi i krvi unutar pulmonalne arterije. Osnovna hipoteza hiperbarične oksigenacije se zasniva na činjenici da će povećano snabdevanje kiseonikom u hiperbaričnim uslovima, pojačati potrošnju kiseonika i zadovoljiti metaboličke potrebe u uslovima kada VO_2 zavisi od DO_2 .

Prema tome potrošnja kiseonika se za svaki organ može preračunati kao količnik protoka krvi kroz dati organ i razlike između količine kiseonika u odgovarajućoj arteriji i količine kiseonika u odgovarajućim venama.

$$VO_2 = Q \times ([O_2]_a - [O_2]_v)$$

Q = protok krvi kroz dati organ

[O₂]_a = količina kiseonika u odgovarajućoj arteriji

[O₂]_v = količina kiseonika u odgovarajućoj veni

Ekstrakcija kiseonika EO₂ se definiše kao razlika između količine kiseonika koji su tkiva preuzela iz krvi, i količine kiseonika koja je dostavljena do datoga organa, a zavisi od stepena metaboličke aktivnosti datog organa.

$$EO_2 = \frac{[O_2]_a - [O_2]_v}{[O_2]_a}$$

1.5.2.a. Hiperbarična vazokonstrikcija

Za razliku od vazokonstrikcije koja nastaje primenom kateholamina, hiperbarična vazokonstrikcija ne dovodi do smanjenja snabdevanja tkiva kiseonikom. Hiperoksija u fiziološki očuvanom tkivu izaziva vazokonstrikciju, ali je ovaj fenomen kompenzovan povećanjem sadržaja kiseonika u plazmi u mikrovaskularnom prostoru. Značajno je da se naglasi da ovakva vazokonstrikcija nastaje samo u tkivima koja su u stanju hiperoksije, kao mehanizam prevencije razvoja kiseonične toksičnosti, dok se ne razvija u hipoksičkim tkivima. Tako, HBO omogućava da parcijalni pritisak kiseonika u oštećenom tkivu ostane na fiziološkom nivou (Mathieu 1993). Vazokonstrikcija u zdravim regionima uz očuvanje protoka kroz ishemične regione, dovodi do redistribucije minutnog volumena upravo ka pogođenim regionima. Ovaj fenomen je u medicinskoj literaturi poznat kao "Robin Hud efekat". Sa druge strane, ova vazokonstrikcija smanjuje edem tkiva u posttraumatskom periodu, usled smanjenja kapilarne transudacije. Na ovaj način se doprinosi saniranju opekotina, kompartment sindroma kao i kraš povreda i može značajno doprineti smanjenu cerebralnog i medularnog edema.

1.5.2.b. Efekti hiperbarične oksigenacije na eritrocite

Eritrociti su konkavne ćelije, koje mogu menjati svoj oblik prilikom prolaska kroz kapilare. Iako je dijametar kapilara manji od dijametra eritrocita, oni prolaze kroz njih zahvaljujući elastičnosti njihovih ćelijskih membrana. Sposobnost eritrocita da menjaju svoj oblik utiče na viskoznost krvi.

Eksperimentalno je pokazano da pri pritiscima manjim od 2 ATA sposobnost eritrocita da menjaju svoj oblik raste, dok pri višim pritiscima opada (Amin 1995). Promena viskoznosti krvi može uticati kako na sam protok krvi, tako i na stepen razmene gasova na nivou kapilara.

1.5.2.c. Efekti hiperbarične oksigenacije na parcijalni pritisak kiseonika u tkvima

Poslednji korak u kiseoničnoj kaskadi je transport kiseonika u ćelije (konvekcijom i pasivnom difuzijom). Stvarna vrednost parcijalnog pritiska kiseonika u tkivu nastaje postizanjem ravnoteže između količine kiseonika koje je tkivo preuzelo iz krvi i količine kiseonika koje su ćelije iskoristile za svoje metaboličke potrebe (Popel 1989, Ivanov 2001). Prema tome, sledeći faktori utiču na parcijalni pritisak kiseonika u tkivu:

1. Lokalne energetske potrebe tkiva u skladu sa stepenom metabolizma,
2. Sposobnost kardiovaskularnog sistema i mikrovaskularne perfuzije,
3. Kapacitet krvi za transport kiseonika,
4. Difuzija kiseonika iz kapilara do mitohondrija u datom tkivu.

1.5.3. Efekti hiperbarične oksigenacije u centralnom nervnom sistemu

U fiziološkim uslovima cerebralni protok krvi kod odrasle osobe varira između 50 i 65 ml na 100 g moždanog tkiva u minuti, dok mikro-redistribucija može biti veoma heterogena čak i u veoma bliskim moždanim regionima (Purves 1972). U proseku siva masa dobija 69 ml krvi dok istovremeno bela masa dobija svega 28 ml po 100 g tkiva. To znači da globalno centralni nervni sistem dobija između 750 i 900 ml krvi u minuti, što iznosi između 15 i 20 % minutnog volumena (Guyton 2008). Ovakva disproporcija između ukupne mase moždanog tkiva i količine krvi koja se do njega doprema svakoga minuta je posledica velikih metaboličkih potreba najkompleksnijeg organa u ljudskom organizmu (Paulson 2002, Vavilala 2002, Demchenko 2002).

Dok većina tkiva u organizmu može opstati bez kiseonika tokom više minuta, a neka čak i do 30 minuta, to nije slučaj sa moždanim tkivom. Iznenadni prekid protoka krvi u mozgu ili iznenadni potpuni nedostatak kiseonika u krvi, mogu izazvati gubitak svesti za 5-10 sekundi.

Energetski metabolizam u moždanom tkivu je jedinstven. U uslovima mirnog budnog stanja, metabolizam u mozgu čini oko 15% ukupnog metabolizma u telu, iako je njegova masa samo 2% ukupne telesne mase (Guyton 2008). Najveći deo ovog povišenog metabolizma u mozgu odvija se u neuronima, a ne u glijalnom tkivu. Energetski najzahtevniji proces u moždanom tkivu je održavanje membranskog aktivnog transporta jona.

Većina ćelija izvan moždanog tkiva je u stanju da dobija energiju iz procesa anaerobnog metabolizma. Iako ovi procesi nisu ekonomični, daju male količine energije uz utrošak velikih količina glukoze i glikogena, oni ipak omogućavaju tkivima da funkcionišu i prežive krizne situacije. Moždano tkivo nema veliku sposobnost za anaerobni metabolizam. U fiziološkim uslovima moždane ćelije dobijaju svu potrebnu energiju aerobnim metabolizmom glukoze u mitohondrijama (Calvert 2007).

Kako u moždanom tkivu postoje minimalne rezerve glukoze, konstantno dopremanje glukoze i kiseonika putem krvi do neurona je od vitalnog značaja za održavanje moždanog integriteta i funkcija. U fiziološkim uslovima, postoji linearan odnos između arterijskog parcijalnog pritiska kiseonika (P_{aO_2}) i parcijalnog pritiska kiseonika u moždanom tkivu.

Postoje i značajne varijacije u vrednosti parcijalnog pritiska kiseonika u različitim zonama mozga. Regionalne varijacije u vrednosti parcijalnog pritiska kiseonika unutar moždanog tkiva nastaju usled različitog nivoa neuronalne aktivnosti, lokalnog stepena metabolizma i protoka krvi kroz dati region.

Parcijalni pritisak kiseonika u kranijalnim arterijama iznosi između 90 i 110 mmHg, dok u kranijalnim venama parcijalni pritisak kiseonika iznosi između 35 i 40 mmHg (Erecinska 2001). Kako se kiseonik stalno preuzima od strane moždanog tkiva, očigledno je da se parcijalni pritisak kiseonika u moždanom tkivu mora opisati kao dinamička, a ne statička varijabla. Prema tome parcijalni pritisak kiseonika u moždanom tkivu se može najbolje iskazati kao spektar vrednosti koji varira od 35 do 90 mmHg, u zavisnosti da li se posmatraju zone koje su u neposrednoj blizini kapilara ili pak zone koje su na većoj distanci od kapilara (Zauner 2002a). Treba imati na umu da za svaku ponaosob moždanu zonu, vrednost parcijalnog pritiska kiseonika u fiziološkim uslovima fluktuiraju za oko 5% oko specifične ravnotežne vrednosti. Eksperimentalno je pokazano da u korteksu pacova vrednost parcijalnog pritiska kiseonika varira od 1 mmHg do 40 mmHg (Cater 1961).

Dean i saradnici (2003) su polarografskim merenjem utvrdili da pri udisanju normobaričnog vazduha, vrednost parcijalnog pritiska kiseonika u moždanom tkivu pacova varira između 10-34 mmHg. Prilikom udisanja 100% kiseonika u hiperbaričnim uslovima pod pritiskom od 3 ATA, vrednost parcijalnog pritiska kiseonika u moždanom tkivu pacova raste na 452 ± 68 mmHg, dok pri pritisku od 5 ATA iznosi 917 ± 123 mmHg. Pokazali su i da se dodavanjem ugljen dioksida u inhalacionu smešu, dodatno povećava kortikalni

parcijalni pritisak kiseonika, usled inhibicije vazokonstriktornog odgovora na hiperoksiju. Udisanjem mešavine gasova 95% O₂ i 5% CO₂ pri pritisku od 3 ATA, parcijalni pritisak kiseonika u moždanom tkivu dostiže vrednost od 791 ± 5 mmHg, dok pri pritisku od 5 ATA iznosi čak 1540 ± 94 mmHg.

Sposobnost da poboljša oksigenaciju moždanog tkiva dala je osnovu za istraživanja mogućnosti primene hiperbarične oksigenacije u saniranju patofizioloških procesa unutar centralnog nervnog sistema. Potvrđeno je da kod moždane hipoksije, usled oštećenja mitohondrijalnih membrana, neadekvatnog protoka krvi kroz moždano tkivo, dolazi do smanjenog prelaska kiseonika iz kapilarne krvi u tkivo (Menzel 1999, Zauner 2002b). Samim tim dolazi i do smanjenja transporta kiseonika u mitohondrije unutar samih neurona, čime dolazi do funkcionalnog narušavanja oksidativnog metabolizma (Menzel 1999). Ovome treba dodati i sledeće činjenice, da citotoksični edem i arterio-venski šantovi mogu povećati difuzionu distancu i preusmeriti protok krvi kroz kapilarna korita, čime dolazi do narušavanja ravnoteže između potreba tkiva za kiseonikom i njegovog dopremanja.

Primenom hiperbarične oksigenacije povećava se količina fizički rastvorenog kiseonika u plazmi, čime se poboljšava snabdevanje ugroženog moždanog tkiva kiseonikom (Gunther 2004). Podstakao bi se transport kiseonika do mitohondrija i samim tim preokrenuo disbalans između potreba za kiseonikom i njegovog neadekvatnog dopremanja. Kako je u zonama neposredno oko povrede, protok kroz kapilare uglavnom sačinjen od plazme, povećanje udela fizički rastvorenog kiseonika u plazmi u hiperbaričnim uslovima značajno doprinosi boljoj oksigenaciji ugroženog tkiva (Theilen 1994, Veltkamp 2000). Pored toga treba imati na umu i već pomenuti efekat hiperbarične oksigenacije, a to je da dovodi do povećanja fleksibilnosti eritrocita, čime se dodatno pomaže snabdevanje ugroženog moždanog tkiva kiseonikom (Van Hulst 2003).

Tokom godina, nalazi eksperimentalnih i kliničkih studija su pokazali da hiperbarična oksigenacija može poboljšati oksigenaciju oštećenog moždanog tkiva (Rockswold 2010, Niklas 2004, Daugherty 2004, Reinert 2003, Neubauer 1998). Takođe, publikovan je i niz nalaza koji ukazuju da hiperbarična oksigenacija može da doprinese stabilizaciji energetskeg metabolizma posle moždane hipoksije-ishemije, te na taj način može biti pimenjena kao korisno neuroprotektivno sredstvo (Golden 2002, Sukoff 2001). Na eksperimentalnim modelima kako *in vitro* hipoksije praćene reoksigenacijom (Gunther 2004), tako i u *in vivo* modelu ishemije (Gunther 2002), pokazano je da HBO dovodi do ponovnog uspostavljanja nukleotidnog statusa (ATP/ADP i GTP/GDP odnosa). Rezultati registrovani na akutnom modelu cerebralne ishemije ukazuju da HBO dovodi do podizanja nivoa ATP-a u moždanom tkivu (Shiokawa 1986) i da dovodi do stabilizacije nivoa glukoze, piruvata i glutamata (Badr 2001a).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Do danas nije pronađena nijedna specifična supstanca koja može uticati na sve patofiziološke procese koji prate moždanu traumu, niti koja može ukloniti sve njene posledice. Mali broj istraživanja uzima u obzir krucijalni problem, koji se ispoljava kako u mehanizmu oštećenja, tako i tokom procesa oporavka, a to je neadekvatna oksigenacija traumatizovanog moždanog tkiva.

Primena hiperbarične oksigenacije je pokazala da ona može značajno doprineti u terapiji mnogih bolesti različitih etiologija. Stoga je opravdano razmatrati mogućnost pojave pozitivnih efekata i njihove potencijacije u traumatizovanom moždanom tkivu posle izlaganja molekulskom kiseoniku pod hiperbaričnim uslovima. Stanovište da bi adekvatno snabdevanje moždanog tkiva kiseonikom u postraumatskom periodu omogućilo očuvanje neoštećenih neurona kao i brži oporavak povređenih, dovelo je do ciljeva ovog istraživanja. Da li hiperbarična oksigenacija posle jednostrane ablacije desnog senzomotornog korteksa pacova:

- ubrzava oporavak senzomotorne integracije i motornih funkcija,
- utiče na oksidativni status u traumatizovanom tkivu,
- utiče na procese reaktivne astroglioze i infiltracije monocita u traumatizovano tkivo,
- dovodi do smanjenja stepena degeneracije neurona i
- da li stvara pogodne uslove za neuronalno remodelovanje.

Krajnji cilj ovog eksperimenta bio bi da se ustanovi da li hiperbarična oksigenacija može doprineti poboljšanju neurološkog oporavka posle eksperimentalne traumatske povrede mozga, čime bi se ukazalo na mogućnost njene primene u lečenju pacijenata sa povredom centralnog nervnog sistema.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. EKSPERIMENTALNI MODEL

Poznato je da postoji analogija u funkcionalnoj organizaciji kortikalnih i subkortikalnih struktura između ljudskog mozga i mozga glodara. Zato se korteks pacova može smatrati kao dobar model za izučavanje procesa u toku oporavka posle povrede mozga.

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, uzrasta 10 nedelja, uzgajani u vivarijumu Instituta za medicinsku fiziologiju "Richard Burian", Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Protokol istraživanja je sproveden u skladu sa pravilima dobre laboratorijske prakse u radu sa eksperimentalnim životinjama, uz saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br. odluke 3027/2, doneta 19.02.2010. godine). Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa preporukama za rad sa eksperimentalnim životinjama datim u "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, D. C.,1996).

Pacovi su držani u grupama od po četiri životinje u prozirnim plastičnim kavezima (55 x 35x 30 cm) obloženim šuškom, sa hranom i vodom bez ograničenja, u konstantnim ambijentalnim uslovima: temperatura (22 ± 1 °C), vlažnost (oko 50%) i 12-to časovni ciklus svetlo-tama (svetlo od 09-21 h). Period aklimatizacije je trajao nedelju dana.

Pre uključivanja u eksperiment životinjama se merila telesna masa. Na početku istraživanja nije postojala statistički značajna razlika u telesnoj masi životinja kako u okviru jedne grupe tako i između grupa ($p > 0,05$). Prosečna telesna masa pacova je iznosila 250 ± 30 g.

3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

3.2.1. Eksperimentalne grupe

Posle perioda aklimatizacije, životinje su prošle obuku, testirane i po principu slučajnog izbora raspoređene u grupe (tabela 1).

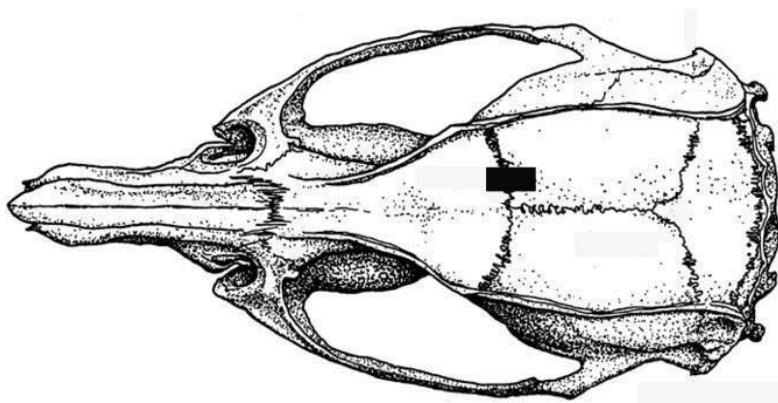
Tabela 1. Eksperimentalne grupe

Grupa	Skraćenica	Broj životinja (n)
Fiziološka kontrola	K	8
Fiziološka kontrola + HBO	KHBO	8
Šam kontrola	Š	8
Šam kontrola + HBO	ŠHBO	8
Lezija	L	8
Lezija +HBO	LHBO	8

3.2.2. Model traumatske povrede mozga-hirurška procedura

Pre započinjanja operacije pacovi su izmereni i u skladu sa njihovom telesnom masom anestetizirani Thiopental-om (Rotex Medica, Germany) u koncentraciji od 20 mg/kg telesne težine intraperitonealno. Posle započinjanja dejstva anestezije, koje je konstatovano po opuštanju tonusa mišića, životinja je fiksirana u stereotaksičnom aparatu. Kako je operacija vršena na glavi životinje, ona je posebno učvršćena pomoću poluge za koju je zakačena njuška životinje i bočnih držača. Prvo se skida dlaka sa gornje strane glave i skalpelom pravi rez, tako da se raseca koža i meko tkivo koje se nalazi ispod nje. Lobanja se u potpunosti očisti od tkiva i krvi, kako bi se tačno mogle da odrede koordinate kraniotomije.

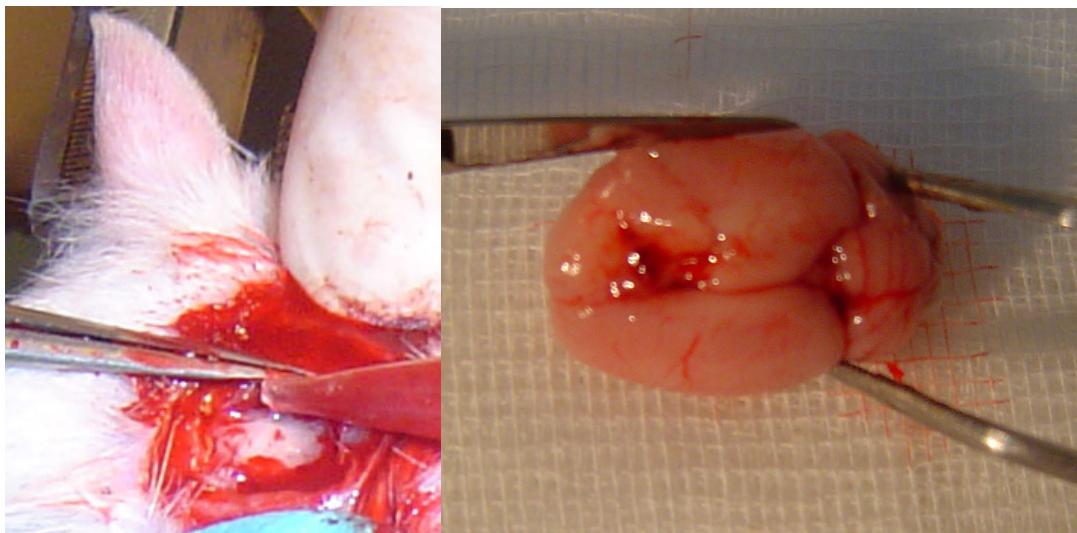
Položaj kraniotomije određen je u odnosu na bregmu i središnju liniju, a koordinate su sledeće: 2 mm ispred bregme, 4 mm iza bregme i 4 mm lateralno od središnje linije. Koordinate kraniotomije koje odgovaraju položaju desnog senzomotornog korteksa kod pacova uzete su prema anatomskom atlasu (Paxinos 1986) (Slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz koordinata kraniotomije.

Zubnom bušilicom se stvaraju otvori na odgovarajućoj površini kosti lobanje. Pincetom se odvaja koštani fragment na stranu. Dura se pažljivo iseca sa tri strane i prebacuje preko kosti lobanje. Hiruško odstranjivanje senzomotorne kore prednjeg mozga pacova vrši se metodom sukcione ablacije (usisavanja). Sam operativni postupak predstavlja blago usisavanje sive moždane mase kroz tanki polipropilenski nastavak pomoću vakuma (Slika 2.a).

Vakum sisaljkom se skida siva masa mozga sve do pojave bele mase, što je znak da je povreda napravljena. (Slika 2.b). Posle prestanka krvavljenja dura se vraća preko povređenog dela mozga, a kost se pažljivo vrati u isti položaj u kome se nalazila pre operacije. Zatim se kost fiksira pomoću lepljivog zaštitnog flastera, a koža zašije hiruškim koncem.



Slika 2.a

Slika 2.b

Slika 2. Hirurška procedura-sukciona albacija. a: Operacija na desnom senzomotornom korteksu. b: Izolovani mozak operisanog pacova.

Lažno operisane životinje (*sham kontrola*) prolaze ceo operativni postupak kao i životinje kojima je izvršena povreda, jedino što se njima ne otvara lobanja, nego se samo na odgovarajućim koordinatama napravi rez bušilicom.

Posle operacije životinje su držane na toplom. U želji da smanjimo mogućnost pojave barotraume bubne opne, odlučili smo da se pre prve HBO ekspozicije, životinjama omogući spontani izlazak iz stanja opšte anestezije. Rukovodili smo se i činjenicom da je sposobnost životinja da se adaptiraju na promenu vrednosti atmosferskog pritiska uslovljena i njihovim svesnim aktivnostima-ponašanjem. U cilju izjednačavanja vrednosti pritiska vazduha u srednjem uvu, sa povišenim pritiskom u hiperbaričnoj komori, životinje zevaju i trljaju njušku šapama. Zbog navedenih razloga, prva HBO ekspozicija životinja koje su prošle kroz anesteziju, sprovedena je 5 časova po završetku hirurške intervencije.

U toku prva dva dana posle hirurške intervencije u cilju izbegavanja telesnog kontakta i međusobnog nanošenja povreda, životinje su prebačene u individualne kaveze, uz omogućen vizuelni, olfaktorni i akustički kontakt. Posle toga pacovi su čuvani u grupama od po četiri životinje u jednom kavezu.

3.2.3. Protokol hiperbarične oksigenacije

Životinje su izlagane 100% kiseoniku u eksperimentalnoj hiperbaričnoj komori (Slika 3), po sledećem protokolu: 2,5 apsolutne atmosfere (ATA), 60 minuta sa periodom kompresije i dekompresije po 10 minuta (1 m/min), jedanput dnevno, tokom 10 sukcesivnih dana. Po postizanju željenog pritiska, dotok kiseonika je smanjen, koncentracijeakiseonika u komori je održavana na vrednosti oko 90%. U cilju smanjenja koncentracije ugljen dioksida u komori, prilikom svake sesije u komoru je stavljana posuda sa kalcijum karbonatom. Tokom trajanja tretmana temperatura u komori nije prelazila 27⁰ C.



Slika 3. Eksperimentalne hiperbarične komore. Na slici su prikazane komore u laboratoriji za eksperimentnalnu hiperbaričnu medicinu, Instituta za Medicinsku fiziologiju "Rihard Burian", Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

3.3. ISPITIVANJE MOTORNIH FUNKCIJA

3.3.1. Ispitivanje senzomotorne integracije - koordinacije, test prelaska preko "grede"

Za ovaj test aparatura se sastojala od drvene platforme (10 x 5 cm) iznad koje se na udaljenosti od 10 cm nalazila sijalica (100 W) sa usmerenim svetlom, kao i od drvene "grede" dužine 122 cm i širine od 2,5 cm i kartonske kutije (24 x 18 x 20 cm). Aparatura je bila uzdignuta od površine čeličnim nosačima na visinu od 70 cm. Pacovi su postavljeni na drvenu platformu i procenjivala se njihova uspešnost tokom prelaska "grede" do kartonske kutije. Za utvrđivanje korektnosti prelaska, na osnovu proklizavanja zadnje kontralateralne "onesposobljene" noge (Goldestein 1990), životinjama su dodeljivane sledeće kategorije:

- 1- ukoliko je pacov padao sa "grede",
- 2- ukoliko pacov nije mogao da pređe gredu, ali je postavljanjem noge održao ravnotežu,
- 3- ukoliko je prelazak izvršen a noga je "vučena" prilikom prelaska,
- 4- ukoliko je prelazak izvršen sa najmanje jednim pravilnim stupanjem onesposobljene noge na horizontalnu površinu,
- 5- ukoliko je taj procenat ispod 50%,
- 6- ukoliko se greda pređe sa učešćem onesposobljenog ekstremiteta u više od 50% koraka
- 7- ukoliko nije postojalo više od dva promašaja "grede" prilikom koračanja.

Obuka životinja se sprovodila u periodu od 5 dana pre planirane operacije, svakoga dana u isto vreme.

Prvog dana obuke, svaka životinja je prošla kroz seriju od tri probna prelaska. Prilikom prvog prelaska životinja je postavljena na udaljenost od 5 cm od ciljne kutije. Prilikom drugog prelaska životinja je postavljena na polovinu "grede", tako da je udaljenost nosa životinje od ciljne kutije iznosila 60 cm. Prilikom trećeg prelaska životinja je postavljena na početnu platformu. Narednih dana obuke životinje su jedanput dnevno postavljane na platformu, sve dok nisu bile u stanju da u dva uzastopna dana u potpunosti izvrše prelazak.

3.3.2. Testiranje mišićne snage

Po završetku obuke prelaska preko "grede" životinje su postavljane na podlogu za testiranje aparata za merenje snage stiska šape (Ugo Basile, Milan, Italy, model 47105) (Savić 2008, Gliter 2004). Povlačenjem za rep, izaziva se refleks hvatanja. Životinja šapom hvata trapezoidni nastavak, koji je povezan sa transdjuserom. Aparat meri snagu (u gramima) koju ispitivač treba da primeni prilikom povlačenja repa životinje, da bi se savladala snaga stiska ekstremiteta životinje.

U eksperimentu je registrovana snaga oba zadnja ekstremiteta životinje. Prvo bi im se postavljala kontralateralna, pa zatim ipsilateralna zadnja noga na trapezoidni nastavak. Procena sposobnosti životinja je testirana dan pre operacije. U dalju proceduru su uključene samo životinje kod kojih je utvrđen kriterijum 7 i kod kojih nije registrovana statistički značajna razlika između intenziteta snage zadnjih ekstremiteta.

Testiranja su izvođena po principu slučajnog izbora grupe životinja, u isto vreme svakoga dana, po dnevnoj svetlosti. Svaka životinja je tri puta uzastopna testirana, prilikom svake serije merenja. Testiranja su sprovedena dan pre operacije, zatim trećeg, sedmog i desetog dana po operaciji.

Po završetku HBO ekspozicije i testiranja, životinje su vraćane u providne plastične kaveze. Istraživanje je završeno desetog dana dva sata po završetku testiranja.

3.4. IMUNOHISTOHEMIJA

3.4.1. Antitela

U istraživanju su korišćena sledeća primarna antitela:

- Poliklonski imunoglobulini (Ig) kunića na glijalni fibrilarni kiseli protein-GFAP (Dako, Glostrup, Denmark).
- Monoklonski mišiji imunoglobulini (Ig) na marker aktivirane mikroglije-ED1 (Seratec, Goettingen, Germany).
- Monoklonski mišiji imunoglobulini (Ig) na fosforilisane oblike neurofilamenata-SMI31 (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy).
- Monoklonski mišiji imunoglobulini (Ig) na sinaptofizin-SYP (Seratec, Goettingen, Germany).
- Monoklonski mišiji imunoglobulini (Ig) na protein rasta 43-GAP43 (Santa cruse, Heidelberg, Germany).
- Monoklonski mišiji imunoglobulini (Ig) na za mikrotubule vezani protein-MAP2 (Seratec, Goettingen, Germany).

Sekundarna antitela koja su korišćena u ovim analizama:

- anti-zečija IgG biotiniziran (Vector Laboratories, Loerrach, Germany).
- anti-kozija IgG biotiniziran (Vector Laboratories, Loerrach, Germany).
- anti-konjska IgG biotiniziran (Vector Laboratories, Loerrach, Germany).

- anti-zečija IgG Alexa 555 konjugovana (Invitrogen, Loerrach, Germany).
- anti-kozija IgG Alexa 488 konjugovana (Invitrogen, Loerrach, Germany).

3.4.2 Priprema mozgova za imunohistohemiju

Posle dekapitacije, mozgovi su izolovani (n=4, za svaku eksperimentalnu grupu) i u toku 24 sata fiksirani u 4% paraformaldehidu u 0.1 mol fosfatnom puferu (PBS) pH=7 preko noći, a potom su, radi dehidracije tkiva, stavljeni u rastvore saharoze rastućih koncentracija (10, 20, 30%) sve dok ne potonu na dno bočice. Tkivo je zaleđeno u 2-metil-butanu (izopentan) na -70°C , zavijeno u parafilm i čuvano u zamrzivaču na -70°C do upotrebe.

3.4.3. Sečenje preseka mozgova na kriostatu

Preseci debljine 16 μm su isečeni na kriostatu na temperaturi od -23°C i pažljivo lepljeni na prethodno pripremljene želatinizirane pločice. Tkivo je pre sečenja temperirano u kriostatu oko 30 minuta na radnoj temperaturi, a pločice sa isečenim tkivom su držane na sobnoj temperaturi nekoliko sati da se osuše, a zatim su stavljanje u zamrzivač (-70°C) u kome su čuvane do upotrebe.

3.4.4. Priprema staklenih pločica

Preseci mozgova su lepljeni na želatinizirane staklene pločice. Proces želatiniziranja je sproveden na sledeći način: sat vremena su pločice ostavljane u koncentrovanom deterdžentu, zatim su isprane, prvo običnom, a posle destilovanom vodom. Mokre pločice se provlače kroz rastvor želatina (0,5% želatin, 0,05% hrom-kalijum-sulfat) i ostavljaju da se osuše u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi.

3.4.5. Imunohistohemijsko bojenje preseka

Imunohistohemijsko bojenje je kvalitativni metod za otkrivanje prisustva i distribucije određenog proteina na presecima tkiva koji se zasniva na specifičnosti reakcije antigen-antitelo. Primarna antitela se vezuju za antigene u tkivu koje treba lokalizovati. Za primarna antitela se vezuju sekundarna antitela, biotinizovana ili na drugi način obeležena, čime se postiže pojačavanje signala. Čitav kompleks se vizualizuje vezivanjem nekog vidljivog markera.

3.4.6. Postupak imunohistohemijskog bojenja

Pločice se izvade iz zamrzivača sa temperature od -70°C i 20 minuta se suše na vazduhu (temperiranje). Zatim se ispiraju dva puta po pet minuta u 0,01 mol fosfatnom puferskom rastvoru-PBS-u. PBS (0,01 mol) se pravi od 50 ml 0,2 mol Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy) pH 7,4, 8,7 g NaCl (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy) i destilovane vode do 1 l.

Endogena peroksidaza se blokira 30 minuta u 3% vodonik peroksidu (H_2O_2) (0,5 ml) koji je rastvoren u metanolu (50ml). Blokiranje se vrši kako ne bi došlo do geneze nespecifičnih signala od strane endogene peroksidaze prilikom vizualizacije antigena. Posle čega su se pločice ispirale u 0.01 mol PBS-u 2 x 5 minuta.

Blokiranje preseka u vlažnoj komori u trajanju od 30 minuta rastvorom koji se sastoji od PBS-a i konjskog seruma (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy). Višak seruma se ukloni sa pločica bez njihovog ispiranja.

Primarno antitelo razblaženo u 0,01 mol PBS-u se nanosi po kap na svaki presek na pločici i inkubira u vlažnoj komori preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$. Inkubacija se prekida ispiranjem pločica u 0,01mol PBS-u 3 x 5 minuta kako bi se uklonio višak primarnih antitela.

Zatim se, u zavisnosti od prirode primarnog antitela, nanose biotinizirana sekundarna antitela, protiv zeca ili miša, koja se specifično vezuju za već prisutna primarna antitela. Sekundarna antitela su razblažena u 0,01 mol PBS-u u odnosu 1 : 200 i inkubirana na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori u trajanju od 2 sata. Višak sekundarnih antitela se uklanja sa pločica njihovim ispiranjem u 0,01 mol PBS-u, 3 x 5 minuta.

U cilju vizualizacije imunokompleksa vrši se bojenje preparata DAB-om (diaminobenzidin tetrahidrohlorid) (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy) koji je prethodno pripremljen po uputstvu proizvođača. DAB reaguje sa preoksidazom rena i u prisustvu H₂O₂ proizvodi kompleks braon boje. Reakcija se prekida ispiranjem u tekućoj vodi. Pločice se ispiraju i u destilovanoj vodi.

Zatim se vrši dehidratacija preseka u seriji alkohola (po 5 minuta u svakoj koncentraciji): 70%, 96%, 100%. Preseci se 5 minuta prosvetljavaju u ksilolu. Posle toga preparati se montiraju nanošenjem DPX (Fluka, Buchs, Switzerland) i pokrovne pločice. Preseci su analizirani na Axio imager (Zeiss Gottingen, Germany) mikroskopu i fotografisani digitalnom kamerom.

3.4.7. Histoheмиjsko bojenje krezil violetom

Krezil violet je bazna boja kojom se obeležavaju nervne ćelije vezivanjem za Nislovu supstancu koja je prisutna u njima. Neuronі se boje svetlom nijansom ljubičaste, dok se glijalne ćelije boje tamnije.

Korišćen je 0,5% rastvor krezil violeta u 0,3% sirćetnoj kiselini. Boja je diferencirana u seriji alkohola (po 5 minuta u svakoj koncentraciji): 70%, 96%, 100%. Preparati su montirani i analizirani po opisanom principu.

3.4.8. Imunofluorescentno bojenja fluoro-žadom

Fluoro-žad B (FJ B) je fluorohromni derivat fluorescein-a, koji se koristi za obežavanje degenerisanih neurona. U našem istraživanju koristili smo modifikovanu metodu po Schmued-u (2000) bojenja sa FJ B i NeuN-om.

Pločice (super frost) sa preseckama moždanog tkiva su po 5 minuta inkubirane prvo u 1% rastvoru NaOH, pa zatim u 80% rastvoru etanola i na kraju destilovanoj vodi. Zatim su 10 minuta inkubirani, na klackalici u 0,06% rastvoru kalijumpermanganata ($KMnO_4$) u prekrivenoj posudi.

Posle toga su ispirani 2 minuta u destilovanoj vodi. Zatim su 20 minuta inkubirani u 0,0004% rastvoru fluoro-žada i NeuN. Potom su pločice ispirane 3 x 2 minuta u destilovanoj vodi i ostavljane da se osuše. Preparati su montirani i analizirani po opisanom principu.

3.5. BIOHEMIJSKE ANALIZE

3.5.1 Priprema uzoraka tkiva za analize

Posle dekapitacije, krv se sakuplja u epruvete i ostavlja da spontano koagulira na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 5 minuta na 3000 obrtaja izdvaja se serum. Mozgovi su izolovani i ispirani u ohlađenom fiziološkom rastvoru. Pažljivo se uklanja kora sa leve i desne hemisfere. Za potrebe analiza iz svake grupe životinja, u dva nezavisna eksperimenta, pulovana su po dva kompatibilna hemikorteksa. Uzorci se homogenizuju u hladnom Ringerovom rastvoru ultrazvučnim ćelijskom disrupterom (2000U Ultrasonic Power Corporation Freeport, IL USA 2008) i razblažuju Ringerovim rastvorom do postizanja koncentracije 50 mg/ml, dele u dva jednaka dela i neposredno analiziraju.

3.5.2. Analiza enzimске aktivnosti glutation peroksidaze (GPX)

Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPX) sprovedeno je kontinuiranim spektrofotokolorimetrijskim merenjem po metodi Wandel A. (1980).

Princip metode:



Korišćene skraćenice: GSH - glutation, redukovana forma, GSSG - glutation, oksidovana forma, β -NADPH - β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, redukovana forma, β -NADP - β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, oksidovana forma.

Uslovi merenja: temperatura 25°C, pH=7,0 i svetlosna distanca 1 cm.

Reagens A: natrijum fosfatna-etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA) pufer, pH=7,0 na 25°C. Priprema reagensa A u 100 ml destilovane vode sipano je 50 mmol dehidratisanog, monobaznog natrijum fosfata i 0,40 mmol soli natrijum etilendiaminotetrasirćetne kiseline. Pri temperaturi od 25°C podešena je pH vrednost na 7,0 sa 1 molarnim rastvorom NaOH.

Reagens B: 1,0 mmol natrijum azida rastvora (Pufer w/Azide). Pripreman je tako što je u 50 ml reagensa A unet 1,0 mmol natrijum azida.

Reagens C: β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, redukovana forma (β -NADPH). Pripreman je tako što je u bočicu od 1,0 mg β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, redukovana forma, unetse tetranatrijumska so).

Reagens D: Rastvor enzima glutation reduktaze (GR). Pripreman je neposredno pre upotrebe, rastvor koji sadrži 100 jedinica u 1 ml glutation reduktaze u hladnoj destilovanoj vodi.

Reagens E: 200 mmol glutation, redukovana forma (GSH). Pripreman je rastvaranjem glutationa-free acid, redukovane forme u 5 ml destilovane vode.

Reagens F: natrijum fosfatni pufer sa ditiotreitolum, pH=7,0 na 25°C (Pufer w/DTT). U 100 ml destilovane vode uneto je 10 mmol-a dehidratisanog, monobaznog, Natrijum fosfata i 10 mmol DL-ditiotreitola. Pri temperaturi od 25°C podešena je pH vrednost na 7,0 sa 1 mol rastvorom NaOH.

Reagens G: Rastvor enzima glutation peroksidaze. Neposredno pre upotrebe, pravljjen je rastvor koji sadrži 1,5-3,0 jedinice u 1 ml glutation peroksidaze u hladnom reagensu F.

Reagens H: 0,042% vodonik peroksid neposredno je pravljjen razblaživanjem 30% rastvora vodonik peroksida u 5 ml destilovane vode.

Hemikalije su nabavljene od Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy.

Procedura: Reakcioni koktel: pipetiranjem u reagens C (β -NADPH) 9,2 ml Reagens B (Pufer w/Azide), 0,1 ml reagens D (GR) i 0,05 ml Reagens E (GSH). Rastvor je promešan i po potrebi korigovan na pH 7,0 sa 1 mol HCl ili sa 1 mol NaOH.

Pipetirane su sledeće količine rastvora, izražene u ml epruvete za merenje:

	<u>Test</u>	<u>Proba</u>
Reakcioni koktel	3,00	3,00
Reagens F (Pufer w/DTT)	/	0,05
Reagens G (Glutation Peroksidaza)	0,05	/

Promešani rastvor je inkubiran na 25°C. Spektrofotokolorimetrijski je očitavana apsorbancia do uspostavljanja konstantnih uslova, na talasnoj dužini 340 nm. Posle toga dodavan je:

	<u>Test</u>	<u>Proba</u>
Reagens H (ml)	0,05	0,05

Neposredno posle mešanja, očitavano je smanjenje apsorbance tokom 5 minuta, na talasnoj dužini 340 nm. Preračunavana je razlika u apsorbanci u odnosu na vreme, uz pomoć linearne stope za testirani uzorak i probu.

Finalna koncentracija u uzorku: U 30,5ml reagensne smeše, finalna koncentracija je 48 mmol natrijum fosfata, 0,38 mmol etilendiamintetrasirćetne kiseline, 0,12 mmol redukovane forme β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, 0,95 mmol Natrijum Azida, 3,2 jedinice Glutation reduktaze, 1 mmol glutaciona, 0,02 mmol DL-ditiotreitola, 0,0007% (w/w) vodonik peroksida i 0,075-0,15 jedinica glutacion peroksidaze.

Izračunavanje:

$$\text{Jedinica/ml enzima} = \frac{(\Delta A_{340 \text{ nm/min Test}} - \Delta A_{340 \text{ nm/min Proba}})(2)(3,1)(df)}{(6,22)(0,05)}$$

2 = 2 μ mola GSH stvorena po μ molu oksidovane β -NADPH

3,1 = Ukupna zapremina u ml uzorka

df = dilucioni faktor

6,22 = Milimolarna ekstinkcija koeficijenta β -NADPH očitana na 340 nm

0,05 = Zapremina (u mililitrima) enzima koji su korišćeni u reakciji

$$\text{Jedinica / mg suvi ostatak} = \frac{\text{jedinice / ml enzima}}{\text{mg suvog ostatka / ml enzima}}$$

$$\text{Jedinica / mg proteina} = \frac{\text{jedinice / ml enzima}}{\text{mg proteina / ml enzima}}$$

Definicija jedinice: Jedna jedinica katalizuje oksidaciju 1 μmol -a redukovanog glutationa u oksidovani glutation pomoću H_2O_2 , tokom jednog minuta na pH 7,0 pri temperaturi od 25⁰ C.

3.5.3. Analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Princip metode: Aktivnost ukupne superoksid dismutaze određivana po metodi McCord i Fridovich (1969) u sistemu citohrom c (Fe^{3+})/ksantin/ksantin oksidaza. Metoda se zasniva na tome da superoksid radikal, koji se generiše u reakciji sa ksantin oksidazom, redukuje citohrom c (Fe^{3+} u Fe^{2+}) što je praćeno promenom kontinuiranim spektrofotokolorimetrijskim merenjem apsorbance na 550 nm. Superoksid dismutaza, ako je prisutna u uzorku, dismutiraće ovaj superoksid radikal tako da će se smanjiti brzina redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Kao jedinica aktivnosti superoksid dismutaze definisana je ona aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije za 50 % (pri promeni apsorbance od 0,025/min).

Reagensi: 0,5 mol KH_2PO_4 , 0,5 mol Na_2HPO_4 , 100 mmol EDTA, 100 mmol NaN_3 , 50 μmol ksantin, ksantin oksidaza (XOD, iz kravljeg mleka), 20 μmol citohrom c (Fe^{3+}) (iz konjskog srca, tip III). Hemikalije su nabavljene od Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy.

Postupak:

Rastvor A: pripreman je mešanjem 0,57 ml KH_2PO_4 , 3,14 ml Na_2HPO_4 , 0,1 ml EDTA, 1,0 ml NaN_3 , 1,0 ml ksantina, 0,4 ml citohroma c. Posuda u kojoj se nalazila smeša dopunjavana je do 100 ml sa destilovanom vodom. Rastvor je promešan i korigovan na pH 7,8 sa 1 mol HCl ili pak sa 1 mol NaOH. Kako je rastvor stabilan tri dana na +4°C pripreman je pre očitavanja i čuvan u frižideru. Tokom rada držan je na sobnoj temperaturi.

Rastvor B: pripreman je mešanjem 0,2 U XOD/ml u 0,1 mmol EDTA, rastvor je držan na ledu, i pravljen je svež svakog dana.

Reakcioni koktel: 1,3 ml rastvora A, 25-100 µl uzorka, 0,1 ml rastvora B, ako je postojala potreba dopunjavana je posuda sa destilovanom vodom do 1,5 ml. Reakcija odpočinje dodavanjem rastvora B, a apsorbance se prati u toku tri minuta. Promena apsorbance slepe probe treba da iznosi 0,025/minuti. Reakcija se odigrava na sobnoj temperaturi.

Izračunavanje: Aktivnost SOD je izražavana u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

3.5.4. Određivanje stepena lipidne peroksidacije-koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu i serumu

Princip metode: Ustanovljenoj od strane Dillard i Tappel (1984) i modifikovnoj od strane Mohanakumar i saradnika (1994). Tiobarbituratna kiselina (TBA) reaguje sa malondialdehidom (MDA), koji je jedan od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije. Na povišenoj temperaturi, u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakcijama nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje (u odnosu 1 MDA : 2 TBA), sa pikom apsorpcije na 532 nm. Nativna (inicijalna) količina lipidnih peroksida odnosno reaktanata sa TBA u homogenatu kortikalnog tkiva, određuje se sprečavanjem procesa lipidne peroksidacije u fazi zagrevanja inkubacione smeše, dodavanjem antioksidansa butiliranog hidroksi-toluena (BHT). Intenzitet indukovane lipidne peroksidacije koja se pokreće u *in vitro* uslovima određuje se dodavanjem fero jona (Fe^{3+}) i askorbinske kiseline.

Reagensi: kalijum hlorid (KCl), Morova so, askorbinska kiselina, tiobarbiturna kiselina (TBA), butilirani hidroksi-toluen (BHT). Hemikalije su nabavljane od Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy.

Postupak: po 2 ml homogenizovanih uzoraka razblaženih u KCl-u su sipani u 2 epruvete. U prvu epruvetu u kojoj se određuje sadržaj nativnih lipidnih peroksida, dodaje se 0,2 ml rastvora BHT-a. U drugu epruvetu u kojoj se određuje sadržaj lipidnih peroksida posle indukovane peroksidacije, dodaje se 0,1 ml rastvora Morove soli i 0,1 ml askorbinske kiseline.

Treća epruveta služi kao slepa proba i u nju se dodaje 2,2 ml rastvora KCl-a.

Sve tri epruvete se inkubiraju u vodenom kupatilu na 37°C u trajanju od 10 minuta. Zatim se u sve tri epruvete sipa po 1 ml trihlorsirćetne kiseline i 1 ml rastvora TBA. Sadržaj se dobro promeša i inkubira 10 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Posle 10 minuta centrifugiranja na 3000 obrtaja, epruvete se prenose do spektrofotokolorimetra i čita apsorbancu superanatanta na talasnoj dužini od 540 nm.

Izračunavanje: Koncentracija MDA se određuje pomoću nanomolarnog apsorpcionog koeficijenta i formule:

Nativni sadržaj lipidnih peroksida u tkivu u nmol/mg tkiva (N_{MDA}):

$$N_{MDA} = \frac{(A_n - A_{sp})}{\varepsilon} \times \frac{tV}{pV} \times R \times 10$$

Sadržaj lipidnih peroksida posle stimulisane peroksidacije u u nmol/mg tkiva (S_{MDA}):

$$S_{MDA} = \frac{(A_s - A_{sp})}{\varepsilon} \times \frac{tV}{pV} \times R \times 10$$

ε = Apsorpcioni koeficijent za MDA-TBA konjugat. Na 540 nm iznosi 0,156 ml/(nmol × cm)

R = razblaženje homogenata

10 = faktor za preračunavanje na mg tkiva

tV = ukupni volumen u epruveti

pV = volumen uzorka

Sadržaj indukovanih peroksida se izračunava iz razlike u sadržaju lipidnih peroksida pre i posle stimulacije.

3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Svi numerički parametri su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška i u procentima \pm standardna greška. Za testiranje značajnosti razlike korišćen je Studentov t test za nezavisne i vezane uzorke, analize varijanse (ANOVA za ponovljena merenja), generalni linearni model i korelacija. Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom ($p < 0,05$). Svi parametri dobijeni tokom istraživanja obrađivani su upotrebom kompjuterskog statističkog programa SPSS 12,0 for Windows.

4. REZULTATI

4.1. TELESNA MASA

Životinjama je merena telesna masa pre hirurške procedure, odnosno pre započinjanja prvog seta testiranja i po završetku poslednjeg seta testiranja (Tabela 2).

Tabela 2. Telesna masa životinja

Grupa	Telesna masa (g)	
	Dan 0.	Dan 10.
K	235 ± 15	265 ± 15
KHBO	245 ± 25	280 ± 20
Š	220 ± 20	255 ± 25
ŠHBO	255 ± 10	290 ± 15
L	225 ± 20	250 ± 25
LHBO	230 ± 20	255 ± 25

U tabeli su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška telesne mase životinja u gramima, na dan operacije i deset dana posle.

Desetog dana istraživanja u svim grupama registrovan je statistički značajan nivo razlike u telesnoj masi u odnosu na rezultate ostvarene prilikom prvog merenja ($p < 0,05$). Životinje iz svih grupa su tokom 10 dana istraživanja značajno povećale svoju telesnu masu. Statistički značajna razlika u telesnoj masi je uočen između grupe ŠHBO u odnosu na grupe Š, L i LHBO ($p < 0,05$).

4.2. REZULTATI ISPITIVANJA MOTORNIH FUNKCIJA

4.2.1. Rezultati ispitivanja senzomotorne integracije - koordinacije, test prelaska preko "grede"

Dan 0:

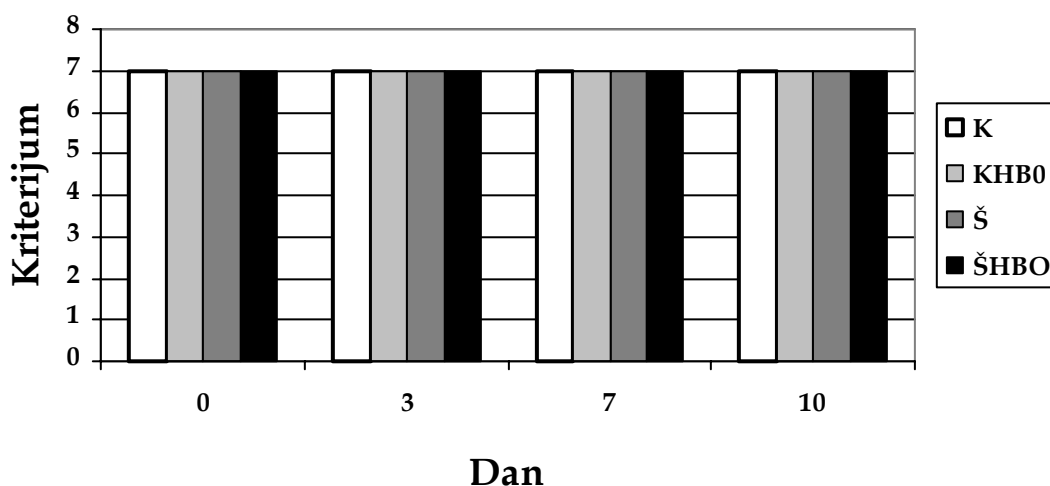
Tokom ove serije testiranja, sve životinje iz svih grupa su prilikom svakog prelaska preko "grede" ostvarile maksimalan kriterijum 7. Kako su prilikom svih narednih testiranja sve životinje iz grupa K, KHBO, Š i ŠHBO nastavile da ostvaruju maksimalan kriterijum 7 (Slika 4), u daljim poređenjima smo prikazivali samo rezultate ostvarene u grupi K.

Dan 3:

U odnosu na rezultate ostvarene prilikom prve serije testiranja, kod životinja iz grupa L trećeg dana posle operacije registrovano je statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sposobnosti motorne koordinacije (55% u odnosu na dan 0). Kod životinja iz grupe LHBO registrovana je takođe statistički značajna redukcija ($p < 0,05$) lokomotorne sposobnosti (45% u odnosu na dan 0) (Slika 5).

Kao što smo istakli životinje iz kontrolnih grupa, su tokom svih testiranja postizale maksimalan kriterijum, tako da su u odnosu na njih životinje iz grupa L i LHBO trećeg dana posle operacije prikazale statistički značajno smanjenje sposobnosti motorne koordinacije ($p < 0,05$) (Slika 5).

Test prelaska preko grede



Slika 4. Grafički prikaz rezultata testa prelaska preko "grede" pacova kojima nije narušen integritet moždanog tkiva. Na apscisi su prikazani dani testiranja eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa - intaktne životinje (n=8), KHBO kontrolna grupa - intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8), Š šam kontrola - lažno operisane životinje (n=8), ŠHBO- lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani srednje vrednosti rezultata za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna sukcesivna prelaska preko "grede" svakog pacova, u kriterijum \pm standardna greška.

Dan 7:

Sedmog dana testiranja kod životinja iz grupa L i LHBO registrovan je statistički značajno poboljšanje motorne koordinacije ($p < 0,05$), u odnosu na rezultate koje su ostvarile trećeg dana. Međutim, i dalje je u grupama L (29%) i LHBO (12%) postojalo statistički značajno smanjenje lokomotorne sposobnosti ($p < 0,05$) u odnosu na rezultate dobijene kod ostalih kontrolnih grupa životinja, kao i u odnosu na uspešnost prelaska preko "grede" dan pre operacije (Slika 5).

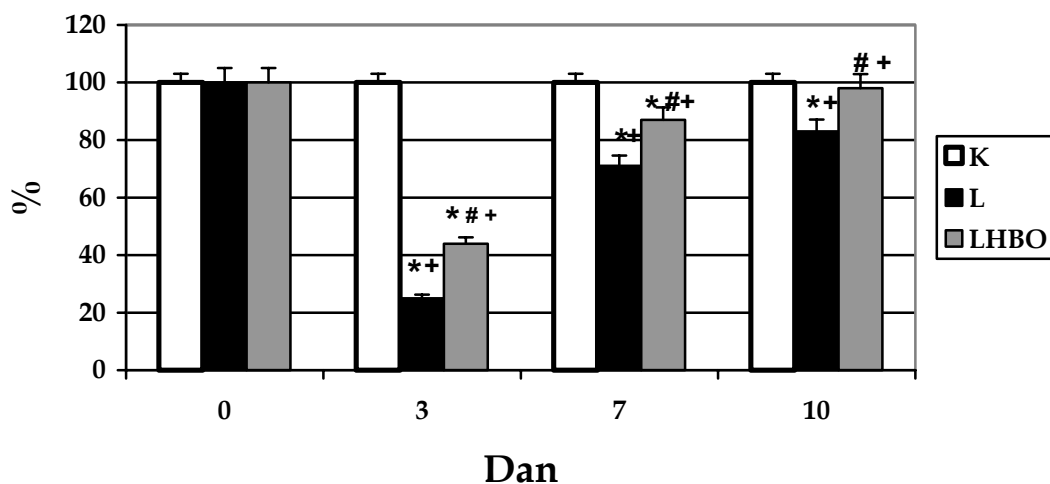
Dan 10:

Kod životinja iz grupe L desetog dana posle operacije, zapaža se statistički značajno poboljšanje motorne koordinacije ($p < 0,05$) u odnosu na rezultate ostvarene sedmog dana i trećeg dana. U proseku su životinje iz ove grupe ostvarile kriterijum od $5,8 \pm 0,4$. Međutim, uspešnost prelaska preko "grede" još uvek je statistički značajno niža ($p < 0,05$) u grupi L (18%) u odnosu na kontrolne grupe (Slika 6).

Sve životinje iz grupe LHBO su desetog dana, barem prilikom jednog prelaska preko "grede", dostigle najviši kriterijum 7 ($6,9 \pm 0,1$), što predstavlja statistički značajno ($p < 0,05$) poboljšanje motorne koordinacije u odnosu na rezultate ostvarene sedmog i trećeg dana. Desetog dana nije registrovana statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u nivou kriterijuma između grupe LHBO (3%) i kontrolnih grupa (Tabela 3).

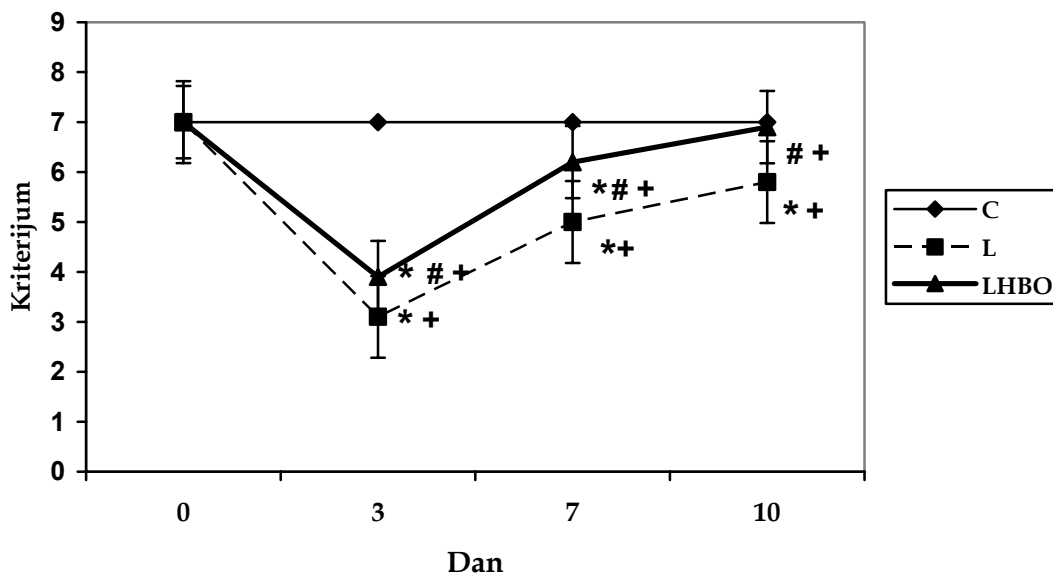
Najznačajniji nalaz je da su desetog dana u grupi L registrovane za 19% niže vrednosti lokomotorne koordinacije u odnosu na grupu LHBO, što znači da je HBO značajno podstakao motornu aktivnost nakon ablacije senzomotornog korteksa pacova.

Test prelaska preko grede



Slika 5. Grafički prikaz rezultata test prelaska preko "grede" pacova kojima je narušen integritet moždanog tkiva. Na apscisi su prikazani dani testiranja eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K-kontrolna grupa intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti rezultata za datu grupu dobijene iz tri nezavisna prelaska preko "grede" svakog pacova, u procentima \pm standardna greška. Vrednosti ostvarene prilikom prvoga testiranja su uzimane za 100%. * $p < 0,05$ vs. K za dati dan testiranja, # $p < 0,05$ vs. L za dati dan testiranja, + $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti ostvarene u prethodnom testiranju u okviru iste grupe.

Test prelaska preko grede



Slika 6. Grafički prikaz rezultata testa prelaska preko "grede" pacova kojima je narušen integritet moždanog tkiva. Na apscisi su prikazani dani testiranja eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna prelaska preko "grede" svakog pacova, u obliku kriterijumi \pm standardna greška. * $p < 0,05$ vs. K za dati dan testiranja, # $p < 0,05$ vs. L za dati dan testiranja, + $p < 0,05$ u odnosu na vrednosti ostvarene u prethodnom testiranju u okviru iste grupe.

Tabela 3. Ispitivanje senzomotorne integracije – koordinacije, test prelasaka preko “grede”

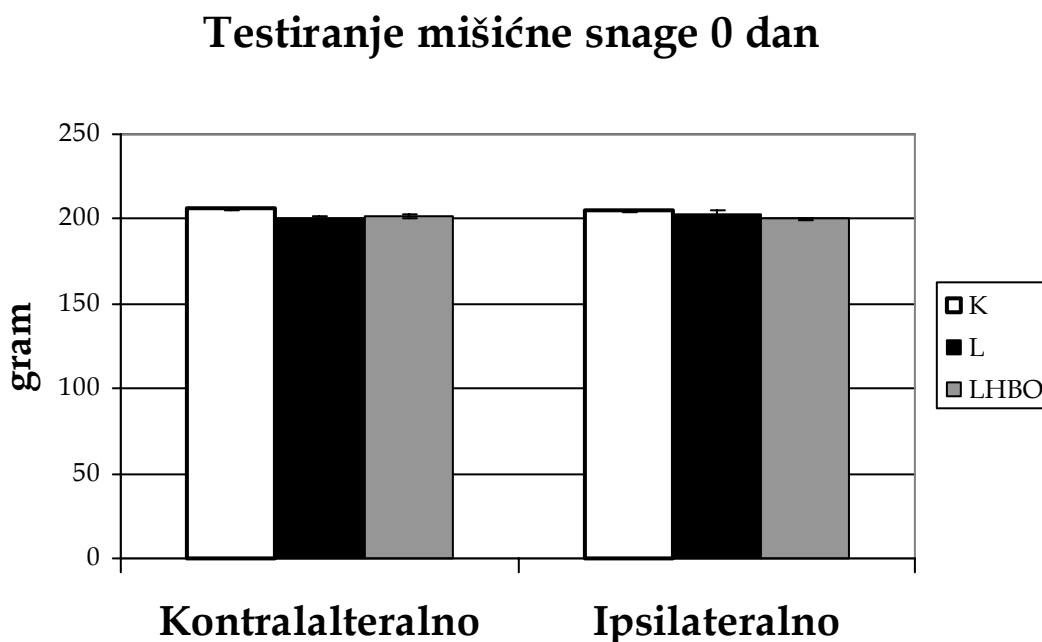
Grupa	Dan 0.	Dan 3.	Dan 7.	Dan 10.
K	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
KHBO	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
Š	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
ŠHBO	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
L	7 ± 0	3.1 ± 0.7	5 ± 1.2	5.8 ± 0.4
LHBO	7 ± 0	3.9 ± 0.9	6.2 ± 0.5	6.9 ± 0.1

U tabeli su prikazani rezultati testa prelaska preko “grede” u vidu srednje vrednosti ostvarenih kriterijuma, izračunate iz tri sukcesivna prelaska svake životnje ± standardna greška, za svaku seriju testiranja.

4.2.2. Rezultati testiranja mišićne snage

Dan 0:

Prilikom prvog seta testiranja nije registrovana statistički značajna razlika u intenzitetu snage zadnje kontralateralne-onesposobljene noge, kako kod životinja unutar svake grupe ($p > 0,05$), tako ni između grupa ($p > 0,05$) (Tabela 4). Takođe, nije registrovana statistički značajna razlika između intenziteta snage zadnje kontralateralne i zadnje ipsilateralne noge kod pojedinačne životinje, ni unutar grupe ($p > 0,05$), kao ni između grupa ($p > 0,05$) (Slika 7) (Tabela 4).



Slika 7. Grafički prikaz rezultata testa snage ipsilateralne i kontralateralne zadnje noge 0 dana testiranja. Na apscisi su prikazani kontralateralni i ipsilateralni zadnji ekstremiteti, eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani rezultati ostvareni 0 dana testiranja u vidu srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna merenja snage stiska svake životinje u gramima \pm standardna greška.

Dan 3:

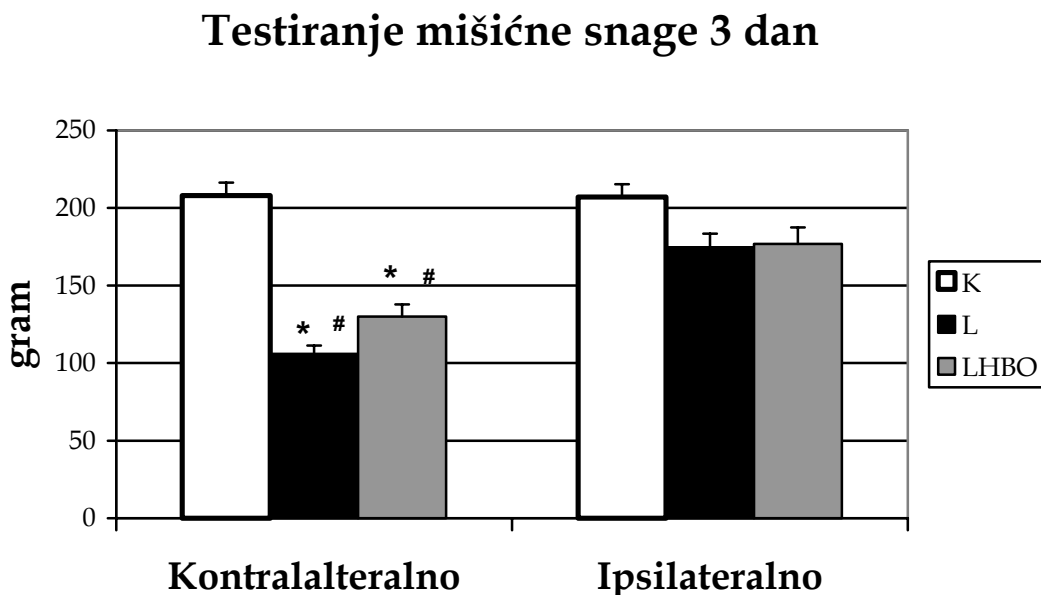
Trećeg dana testiranja unutar grupa K i KHBO nije registrovan statistički značajan nivo razlike u intenzitetu snage zadnjih ekstremiteta ($p > 0,05$). Takođe između ove dve grupe nije registrovan statistički značajan nivo razlike u intenzitetu mišićne snage kontralateralnog ($p > 0,05$), a ni ipsilateralnog zadnjeg ekstremiteta ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Iako je kod pacova iz grupa Š i ŠHBO trećeg dana testiranja registrovan pad intenziteta snage kod oba zadnja ekstremiteta, uočena razlika nije statistički značajna, kako u odnosu na vrednosti ostvarene prvog dana u okviru ovih grupa ($p > 0,05$), tako i u odnosu na rezultate ostvarene trećeg dana u grupama K i KHBO ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Takođe, unutar grupa K, KHBO, Š i ŠHBO, posmatrano pojedinačno, nije postojala statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između intenziteta snage kontralateralnog i ipsilateralnog zadnjeg ekstremiteta (Tabela 4).

U okviru grupa L i LHBO trećeg dana testiranja registrovana je statistički značajna razlika u intenzitetu snage zadnje kontralateralne noge u odnosu na vrednosti ostvarene u okviru tih grupa u 0 danu ($p < 0,05$) (Slika 8). Takođe, unutar grupa L (39%) i LHBO (27%) postojala je statistički značajna razlika u intenzitetu snage onesposobljenog-kontralateralnog i ipsilateralnog zadnjeg ekstremiteta ($p < 0,05$) (Slika 8). Međutim, između prosečnih vrednosti intenziteta snage onesposobljene-kontralateralne zadnje noge pacova iz grupa L i LHBO nije registrovana statistički značajna razlika ($p > 0,05$) (Slika 8).

U odnosu na rezultate intaktnih pacova iz grupe K, kod životinja iz grupa L smanjen je intenzitet mišićne snage za 51%, a u grupi tretiranim sa HBO (LHBO) za 38% ($p < 0,05$), što znači da se mišićna snaga pod dejstvom HBO ubrzano opopravlja (Slika 8) (Tabela 4).



Slika 8. Grafički prikaz rezultata testa snage ipsilateralne i kontralateralne zadnje noge 3 dana testiranja. Na apscisi su prikazani kontralateralni i ipsilateralni zadnji ekstremiteti, eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani rezultati ostvareni trećeg dana testiranja u vidu srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna merenja snage stiska, svake životinje, u gramima \pm standardna greška. * $p < 0,05$ ipsilateralno vs. kontralateralno za datu grupu, # $p < 0,05$ vs. K.

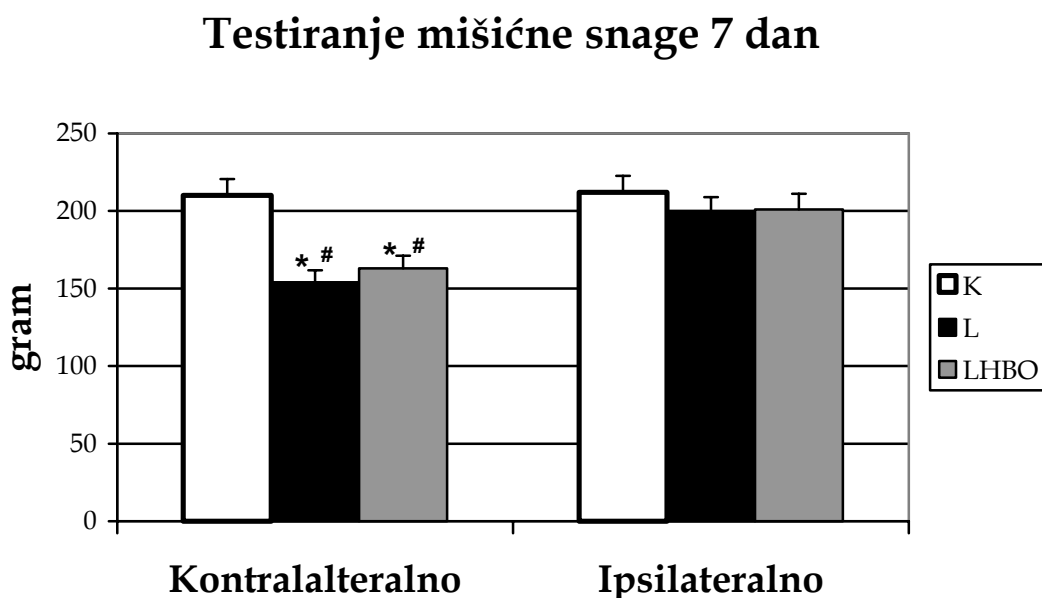
Dan 7:

Sedmog dana testiranja između grupa K, KHBO i ŠHBO nije registrovana statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između prosečnih vrednosti intenziteta snage zadnjih ekstremiteta. Takođe, u grupama K i KHBO nije registrovan statistički značajan nivo razlike u odnosu na prethodna dva merenja ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Iako je kod grupa Š i ŠHBO sedmog dana testiranja došlo do porasta intenziteta snage kod oba zadnja ekstremiteta u odnosu na rezultate ostvarene trećega dana, razlika je samo u grupi ŠHBO dostigla nivo statističke značajnosti ($p < 0,05$) (Tabela 4). Rezultati u okviru grupa Š i ŠHBO sedmoga dana nisu pokazivali statistički značajnu razliku u odnosu na vrednosti koje su registrovane u ovim grupama prvoga dana ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Sedmog dana je i dalje postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između intenziteta snage onesposobljene- zadnje kontralateralne noge, između grupa L i LHBO u odnosu na rezultate intaknih pacova (L vs. K = 26% i LHBO vs. K = 23%) (Slika 9). Sedmoga dana u okviru grupa L i LHBO registrovan je statistički značajan porast intenziteta snage zadnje kontralateralne noge u odnosu na rezultate ostvarene trećega dana ($p < 0,05$). Međutim, razlika između intenziteta snage kontralateralnog u odnosu na ipsilateralni zadnji ekstremitet u ove dve grupe je bila statistički značajna ($p < 0,05$). Kod pacova u grupi L je iznosila 23% a u grupi LHBO 20% (Slika 9) (Tabela 4).

U isto vreme, između pacova iz grupa L i LHBO nije registrovana statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između prosečnih vrednosti intenziteta snage onesposobljenog-kontralateralnog zadnjeg ekstremiteta (Slika 9) (Tabela 4).



Slika 9. Grafički prikaz rezultata testa snage ipsilateralne i kontralateralne zadnje noge 7 dana testiranja. Na apscisi su prikazani kontralateralni i ipsilateralni zadnji ekstremiteti, eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani rezultati ostvareni sedmog dana testiranja u vidu srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna merenja snage stiska, svake životinje, u gramima \pm standardna greška. * $p < 0,05$ ipsilateralno vs. kontralateralno za datu grupu, # $p < 0,05$ vs. K.

Dan 10:

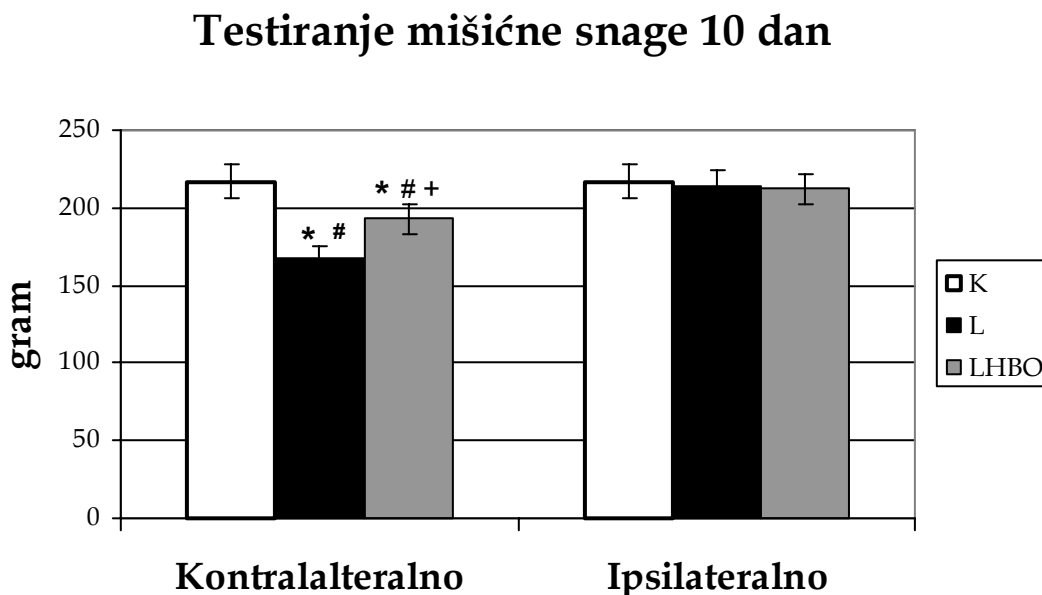
Desetog dana testiranja unutar grupa K i KHBO registrovano je podjednako povećanje intenziteta snage kod oba zadnja ekstremiteta u odnosu na vrednosti ostvarene u merenjima trećeg i sedmog dana, ali nije dostignut nivo statističke značajnosti ($p > 0,05$), dok je u odnosu na vrednosti registrovane u nultom danu postignut nivo statističke značajnosti ($p < 0,05$) (Tabela 4).

U grupama Š i ŠHBO desetoga dana je takođe registrovano podjednako povećanje intenziteta snage kod oba zadnja ekstremiteta, koje je kod životinja iz grupe ŠHBO dostiglo statistički značajan nivo razlike samo u odnosu na rezultate ostvarene trećega dana ($p < 0,05$). Kod životinja iz grupe Š uočen je statistički značajan nivo razlike u odnosu na rezultate ostvarene trećeg i prvoga dana ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Desetog dana je i u grupama L i LHBO registrovan porast intenziteta snage zadnje kontralateralne noge, koji je u odnosu na rezultate ostvarene trećeg i sedmog dana dostigao nivo statističke značajnosti ($p < 0,05$) (Slika 11). Međutim, u ove dve grupe je i dalje postojala statistički značajna razlika između intenziteta snage zadnje kontralateralne noge, koji su registrovani desetog dana u odnosu na vrednosti ostvarene 0 dana testiranja ($p < 0,05$) (Slika 11).

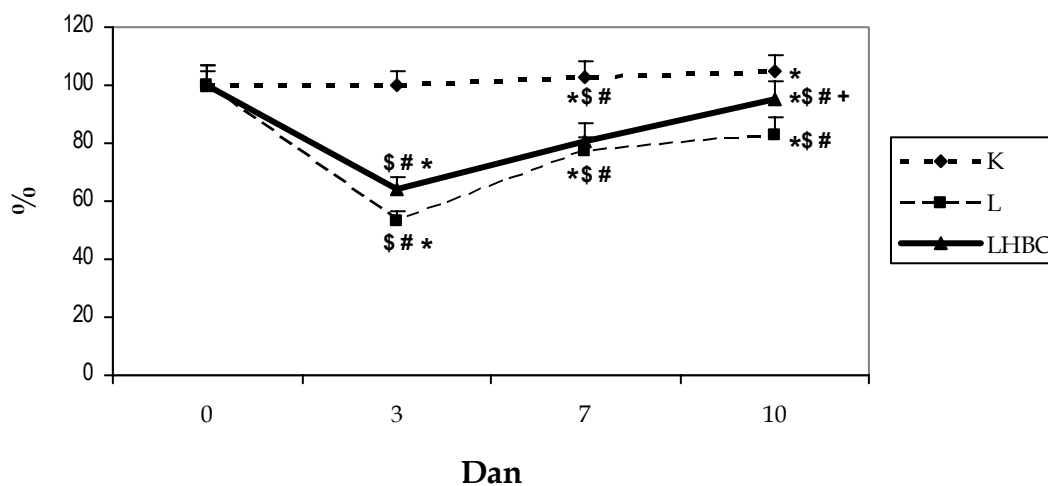
Desetoga dana postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) razlika između prosečnih vrednosti intenziteta snage onesposobljene-kontralateralne zadnje noge u grupama L i LHBO u odnosu na intaktne životinje (L vs. K manje za 23% i LHBO vs. K manje za 11%).

Registrovana razlika u intenzitetu mišićne snage zadnje kontralateralne noge kod životinja iz grupe LHBO desetoga dana, u odnosu na rezultate dobijene kod životinja iz grupe L je bila statistički značajna u smislu povećanja mišićne snage (LHBO vs. L veće za 14%) ($p < 0,05$) (Slika 10).



Slika 10. Grafički prikaz rezultata testa snage ipsilateralne i kontralateralne zadnje noge 10 dana testiranja. Na apscisi su prikazani kontralateralni i ipsilateralni zadnji ekstremiteti, eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani rezultati ostvareni desetog dana testiranja u vidu srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna merenja snage stiska, svake životinje, u gramima \pm standardna greška. * $p < 0,05$ kontralateralno vs. ipsilateralno za datu grupu, # $p < 0,05$ vs. K, + $p < 0,05$ vs. L

Snaga zadnje kontralateralne noge



Slika 11. Grafički prikaz rezultata testa snage zadnje kontralateralne noge tokom svih 10 dana testiranja. Na apscisi su prikazani dani testiranja eksperimentalnih životinja iz sledećih grupa: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=8), L-operisane životinje (n=8), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=8). Na ordinati su prikazani rezultati testiranja snage zadnje kontralateralne noge u vidu srednje vrednosti za datu grupu, dobijene iz tri nezavisna merenja snage stiska, svake životinje, u procentima u odnosu na rezultat ostvaren 0 dana testiranja koji je uziman za 100% ± standardna greška. * $p < 0,05$ vs. merenje 0 dana u okviru iste grupe, \$ $p < 0,05$ u odnosu na rezultat prethodnog meranja u okviru iste grupe, # $p < 0,05$ vs. K datoga dana merenja, + $p < 0,05$ vs. L datoga dana merenja.

Prosečno registrovani intenzitet snage zadnje kontralateralne noge kod životinja iz grupe LHBO desetoga dana je iznosio 192 ± 19 g, dok je kod životinja iz grupe L iznosio 168 ± 15 g (Tabela 4).

Desetoga dana testiranja registrovana je statistički značajna razlika između intenziteta snage zadnje kontralateralne u odnosu na zadnju ipsilateralnu nogu ($p < 0,05$) unutar grupe LHBO od 9% i unutar grupe L od 22%. Desetog dana testiranja razlika između intenziteta snage zadnje kontralateralne i ipsilateralne noge unutar grupe LHBO je iznosila 22 ± 2 g, a unutar grupe L 47 ± 2 g (Tabela 4).

Desetog dana testiranja u svim grupama je registrovana statistički značajna razlika u intenzitetu snage zadnje ipsilateralne noge u odnosu na prvi dan testiranja ($p < 0,05$), ali nije postojala statistički značajna razlika između grupa ($p > 0,05$). Tokom svih testiranja unutar grupa K, KHBO, Š i ŠHBO nije registrovana statistički značajna razlika između inteziteta snage zadnje kontralateralne i zadnje ipsilateralne noge ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Testiranje mišićne snage-Test snage stiska

Noga Grupa	Dan 0.		Dan 3.		Dan 7.		Dan 10.	
	x- lateral	y- lateral	x- lateral	y- lateral	x- lateral	y- lateral	x- lateral	y- lateral
K	206 ± 10g	205 ± 10g	208 ± 10g	207 ± 10g	212 ± 12g	209 ± 10g	217 ± 7g	217 ± 6g
KHBO	198 ± 20g	195 ± 16g	202 ± 18g	199 ± 19g	210 ± 10g	210 ± 19g	216 ± 8g	217 ± 7g
Š	185 ± 23g	186 ± 22g	169 ± 21g	167 ± 19g	183 ± 23g	186 ± 23g	198 ± 21g	201 ± 19g
ŠHBO	213 ± 9g	212 ± 10g	191 ± 6g	190 ± 6g	210 ± 5g	210 ± 6g	219 ± 8g	218 ± 5g
L	200 ± 28g	203 ± 24g	106 ± 32g	174 ± 23g	154 ± 20g	199 ± 17g	167 ± 15g	214 ± 15g
LHBO	202 ± 27g	200 ± 26g	130 ± 30g	176 ± 21g	163 ± 20g	201 ± 21g	191 ± 18g	212 ± 21g

U tabeli su prikazani rezultati testa snage stiska u gramima, svih eksperimentalnih grupa (n=8 po grupi). Prikazane su srednje vrednosti ± standardna greška, po grupama, za svaku seriju testiranja, izračunate iz ostvarenih rezultata svake životinje, prilikom tri sukcesivna merenja za svaki ekstremitet ponaosob. x-lateral označava kontralateralni-onesposobljeni zadnji ekstremitet, y-lateral označava ipsilateralni-intaktni zadnji ekstremitet.

4.3. REZULTATI BIOHEMIJSKIH ANALIZA

4.3.1. Rezultati analiza enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPX)

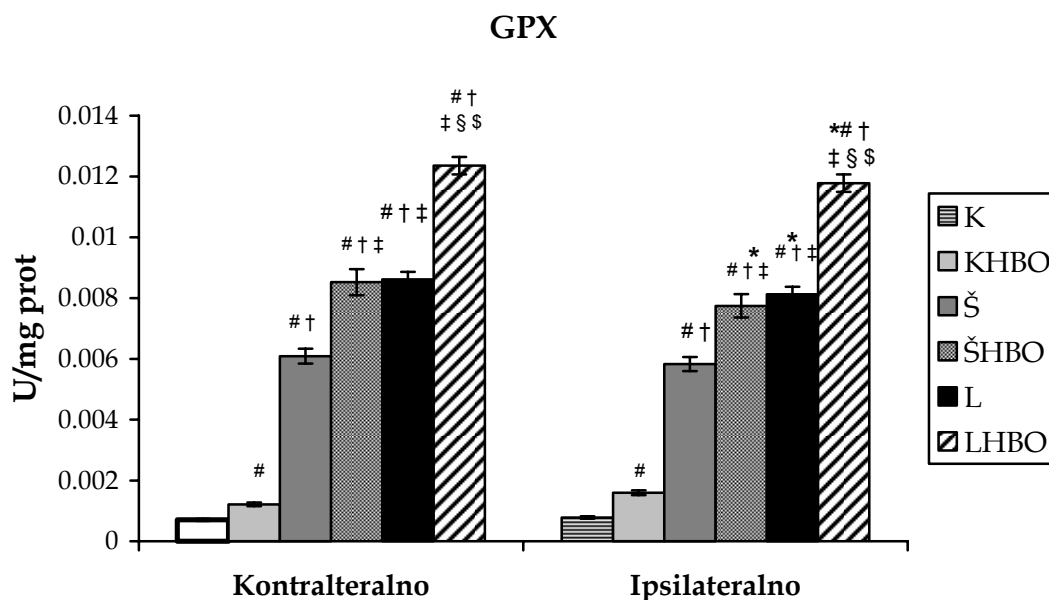
Na osnovu analize rezultata (Slika 12), primenom generalnog linearnog modela utvrdili smo da:

U uzorcima kortikalnog tkiva ipsilateralne i kontralateralne hemisfere, iz grupa K i KHBO ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GPX) ($p > 0,05$). U grupama K i KHBO su registrovani statistički značajno niži nivoi aktivnosti ovoga enzima u odnosu na sve ostale grupe Š, ŠHBO, L i LHBO ($p < 0,05$).

Nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima GPX u uzorcima kortikalnog tkiva ipsilateralne i kontralateralne hemisfere u šam kontroli ($p > 0,05$). Medjutim, nivo aktivnosti GPX u uzorcima tkiva izolovanog iz obe hemisfere, u grupi Š bio je statistički značajno niži u odnosu na odgovarajuće vrednosti u grupama ŠHBO, L i LHBO ($p < 0,05$).

Nivo aktivnosti enzima GPX u uzorcima kortikalnog tkiva kontralateralne hemisfere iz grupe ŠHBO bio je statistički značajno viši u odnosu na vrednosti u uzorcima iz ipsilateralne hemisfere ($p < 0,05$). Između grupa ŠHBO i L nije postojala statistički značajna razlika u aktivnosti GPX u uzorcima kortikalnog tkiva izolovanog iz obe hemisfere ($p > 0,05$).

U grupama L i LHBO aktivnost enzima GPX u uzorcima kortikalnog tkiva kontralateralne hemisfere je takođe bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti u uzorcima iz ipsilateralne hemisfere ($p < 0,05$).



Slika 12. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na aktivnost enzima glutation peroksidaze u uzorcima kortikalnog tkiva pacova. Na apscisi su prikazane grupe eksperimentalnih životinja: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=4), KHBO kontrolna grupa-intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), Š šam kontrola-lažno operisane životinje (n=4), ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), L-operisane životinje (n=4), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti \pm standardna greška, u internacionalnim jedinicama po mg proteina, aktivnosti enzima glutation preoksidaze. Prikazane vrednosti su izračunate na osnovu rezultata dobijenih u dva nezavisna eksperimenta. U svakom eksperimentu su paralelno analizirana dva uzorka dobijena pulovanjem po dva kompatibilna hemikorteksa iz svake grupe. * $p < 0,05$ kontralateralna vs. ipsilateralna hemisfera u okviru iste grupe, # $p < 0,05$ vs. K, † $p < 0,05$ vs. KHBO, ‡ $p < 0,05$ vs. Š, § $p < 0,05$ vs. ŠHBO, \$ $p < 0,05$ vs. L.

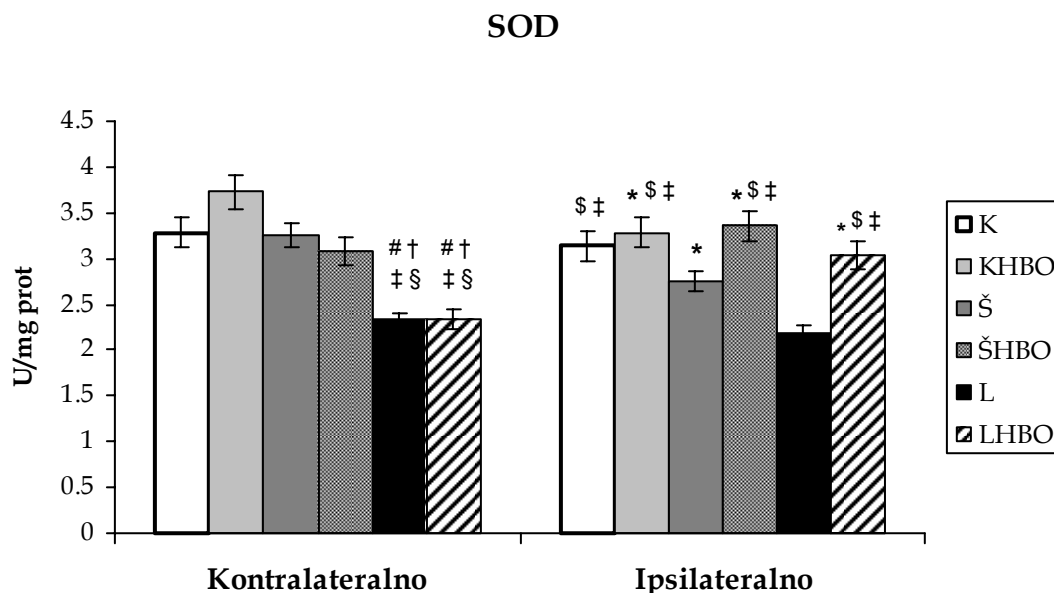
Najznačajni rezultati su registrovani u uzorcima tkiva iz ipsilateralne-povređene hemisfere. Najniže izmerene vrednosti aktivnosti GPX su nađene u grupi K. HBO tretman je gotovo dvostruko podigao nivo enzimske aktivnosti u KHBO. Šam operacija kao i povreda su dramatično ($p < 0,05$) podigli nivo aktivnosti GPX u odnosu na K grupu (u grupi Š 10 puta, u L gotovo 15 puta). Međutim, najviša aktivnosti GPX je registrovana u grupama kod operisanih životinja koje su prošle kroz HBO protokol. U grupi ŠHBO aktivnost GPX je za 33% viša u odnosu na Š grupu, a u LHBO grupi za 45% u odnosu na L grupu ($p < 0,05$) (Slika 12).

4.3.2. Rezultati analiza enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Na osnovu analize rezultata (Slika 13), primenom generalnog linearnog modela utvrdili smo da:

Između uzoraka kortikalnog tkiva iz suprotnih hemisfera (ipsilateralne i kontralateralne), unutar grupe K kao i unutar grupe L ne postoji statistički značajan nivo razlike u ukupnoj aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) ($p > 0,05$). U uzorcima tkiva ipsilateralne hemisfere u grupama KHBO i Š uočeni su statistički značajno niži stepeni aktivnosti SOD u odnosu na uzorake kontralateralne hemisfere ($p < 0,05$).

Međutim, u grupama ŠHBO i LHBO registrovano je suprotno, jer su statistički značajno niže vrednosti aktivnosti SOD nađene u uzorcima tkiva kontralateralne hemisfere u odnosu na ipsilateralnu hemisferu ($p < 0,05$) (Slika 13). U uzorcima iz intaktne kontralateralne hemisfere u grupama K, KHBO, ŠHBO i Š ne postoji statistički značajna razlika između nivoa aktivnosti SOD ($p > 0,05$).



Slika 13. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na aktivnost enzima superoksid dismutaze u uzorcima kortikalnog tkiva pacova. Na apscisi su prikazane grupe eksperimentalnih životinja: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=4), KHBO kontrolna grupa-intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), Š šam kontrola-lažno operisane životinje (n=4), ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), L-operisane životinje (n=4), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti \pm standardna greška, u internacionalnim jedinicama po mg proteina, enzima superoksid dismutaze. Prikazane vrednosti su izračunate na osnovu rezultata dobijenih u dva nezavisna eksperimenta. U svakom eksperimentu su paralelno analizirana dva uzorka dobijena pulovanjem po dva kompatibilna hemikorteksa iz svake grupe. * $p < 0,05$ kontralateralna vs. ipsilateralna hemisfera u okviru iste grupe, # $p < 0,05$ vs. K, † $p < 0,05$ vs. KHBO, ‡ $p < 0,05$ vs. Š, § $p < 0,05$ vs. ŠHBO, \$ $p < 0,05$ vs. L.

Između aktivnosti SOD registrovanih u uzorcima tkiva kontralateralne hemisfere u grupama L i LHBO ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$), ali su registrovane vrednosti značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na vrednosti očitane u svim kontrolnim grupama (K, KHBO, ŠHBO i Š) (Slika 13).

Najznačajniji rezultati su registrovani u uzorcima tkiva iz ipsilateralne-povređene hemisfere. HBO tretman nije imao statistički značajan uticaj na nivo aktivnosti SOD kod intaktnih životinja (K vs. KHBO = 4%, $p > 0,05$). Šam operacija kao i povreda su značajno ($p < 0,05$) smanjile nivo aktivnosti SOD (u grupi Š za 13% a u L za 30% u odnosu na K grupu). HBO tretman je podigao nivo aktivnosti SOD u grupama ŠHBO i LHBO do nivoa vrednosti u grupi KHBO. Zapažena je viša aktivnosti SOD u grupi ŠHBO za 22% u odnosu na Š grupu, a u LHBO grupi aktivnost je bila za 38% viša u odnosu na L ($p < 0,05$) (Slika 13).

4.3.3. Rezultati određivanja stepena lipidne peroksidacije-koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu

Na osnovu analize rezultata (Slika 14), primenom generalnog linearnog modela utvrdili smo da:

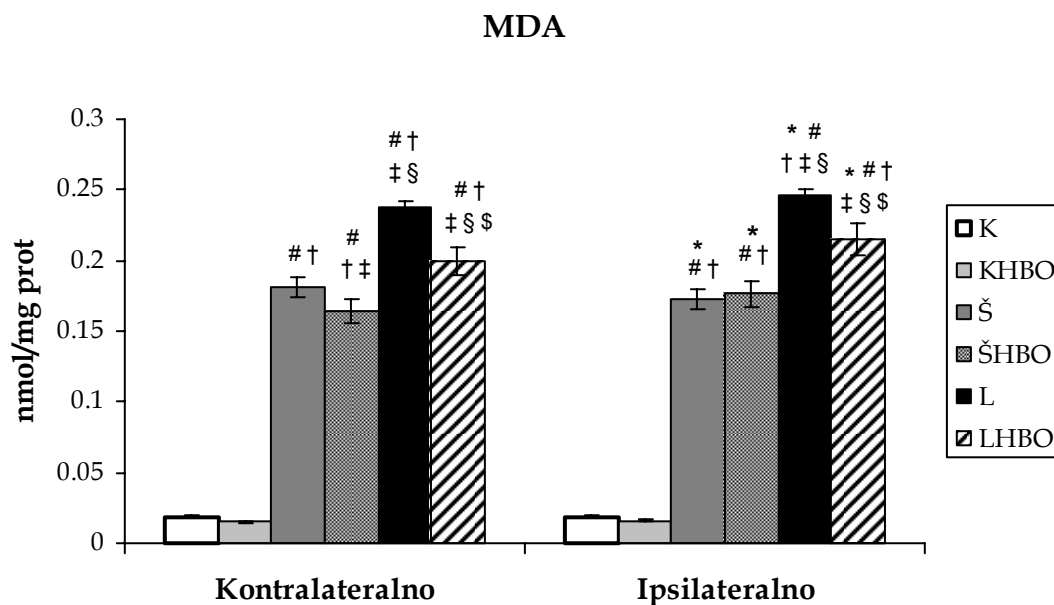
Između očitanih vrednosti iz uzoraka kortikalnog tkiva izolovanog iz ipsilateralne i kontralateralne hemisfere, u grupama K i KHBO ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji malondialdehida (MDA) ($p > 0,05$). U grupama K i KHBO su zabeležene statistički značajno niže vrednosti koncentracije MDA u odnosu na sve ostale grupe Š, ŠHBO, L i LHBO ($p < 0,05$).

U grupi Š koncentracija MDA u uzorcima tkiva kontralateralne hemisfere je statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju MDA u tkivu ipsilateralne hemisfere ($p < 0,05$).

U grupama ŠHBO, L i LHBO koncentracija MDA u tkivu ipsilateralne hemisfere je statistički značajno viša u odnosu na koncentraciju MDA u tkivu kontralateralne hemisfere ($p > 0,05$).

U tkivu iz kontralateralne hemisfere koncentracija MDA je u grupi Š statistički značajno viša u odnosu na odgovarajuće vrednosti u grupi ŠHBO ($p < 0,05$). Takođe, koncentracija MDA u uzorcima tkiva kontralateralne hemisfere u grupi L je statistički značajno viša u odnosu na grupu LHBO ($p < 0,05$), što znači da je HBO tretman smanjio koncentraciju MDA (Slika 14).

Najznačajniji rezultati su registrovani u uzorcima tkiva iz ipsilateralne-povređene hemisfere. Najniže vrednosti koncentracije MDA su registrovane u grupi K. Šam operacija kao i povreda su dramatično ($p < 0,05$) podigle nivo koncentracije MDA u odnosu na K grupu (u grupi Š 9 puta, a u LHBO gotovo 13 puta). HBO tretman nije dodatno podigao koncentraciju MDA u KHBO i ŠHBO grupama. Sa druge strane kod povređenih životinja koje su bile podvrgnute HBO tretmanu (LHBO grupa) registrovano je umereno (13%) ali statistički značajno ($p < 0,05$) sniženje koncentracije MDA u odnosu na povređene životinje (L grupa) (Slika 14).



Slika 14. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na koncentraciju malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva pacova. Na apscisi su prikazane grupe eksperimentalnih životinja: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=4), KHBO kontrolna grupa-intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), Š šam kontrola-lažno operisane životinje (n=4), ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), L-operisane životinje (n=4), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti \pm standardna greška, u nmol po mg proteina, malondialdehida. Prikazane vrednosti su izračunate na osnovu rezultata dobijenih u dva nezavisna eksperimenta. U svakom eksperimentu su paralelno analizirana dva uzorka dobijena pulovanjem po dva kompatibilna hemikorteksa iz svake grupe. * $p < 0,05$ kontralateralna vs. ipsilateralna hemisfera u okviru iste grupe, # $p < 0,05$ vs. K, † $p < 0,05$ vs. KHBO, ‡ $p < 0,05$ vs. Š, § $p < 0,05$ vs. ŠHBO, \$ $p < 0,05$ vs. L.

4.3.4. Rezultati određivanja koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu

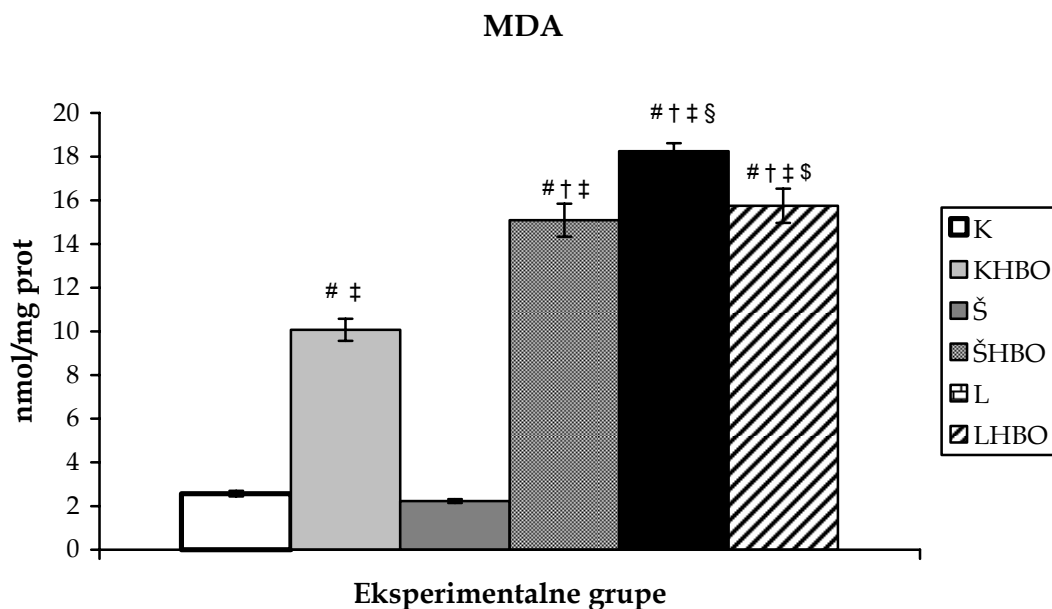
Na osnovu analize rezultata (Slika 15), primenom generalnog linearnog modela utvrdili smo da:

Koncentracija MDA je, kao i u uzorcima seruma, bila najniža u K grupi. Šam operacija nije uticala na koncentraciju MDA u serumu, tako da nije registrovana statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između grupa K i Š.

Međutim, povreda moždanog tkiva je značajno podigla koncentraciju MDA u uzorcima seruma iz grupe L (gotovo 7 puta u odnosu na grupu K ($p < 0,05$) i 8 puta u odnosu na grupu Š ($p < 0,05$). U uzorcima seruma iz grupe L očitane su najviše vrednosti koncentracije MDA (Slika 15).

HBO tretman je uticao na nivo koncentracije MDA kod intaktnih životinja, u uzorcima seruma iz grupe KHBO očitane su gotovo 4 puta više vrednosti u odnosu na grupu K ($p < 0,05$). Isti trend je uočen i kod lažno operisanih životinja u uzorcima seruma iz grupe ŠHBO očitane su gotovo 7 puta više vrednosti u odnosu na grupu Š ($p < 0,05$).

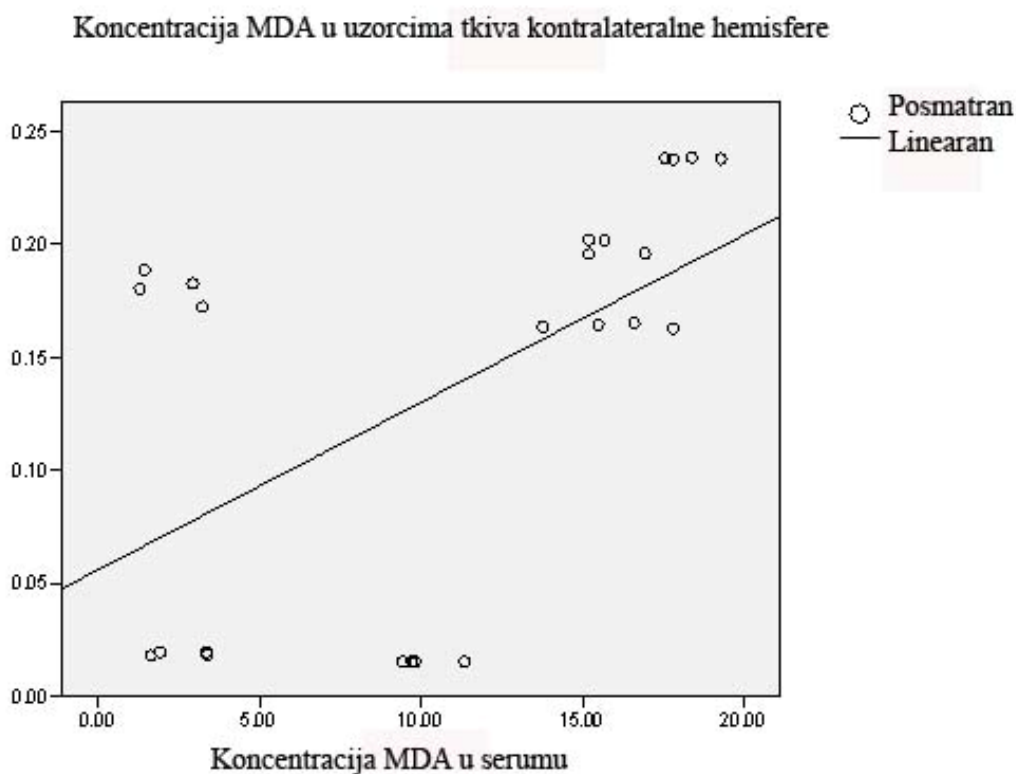
Veoma značajan nalaz je da je u LHBO grupi registrovano statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje koncentracije MDA u serumu u odnosu na L grupu za 15% (Slika 15).



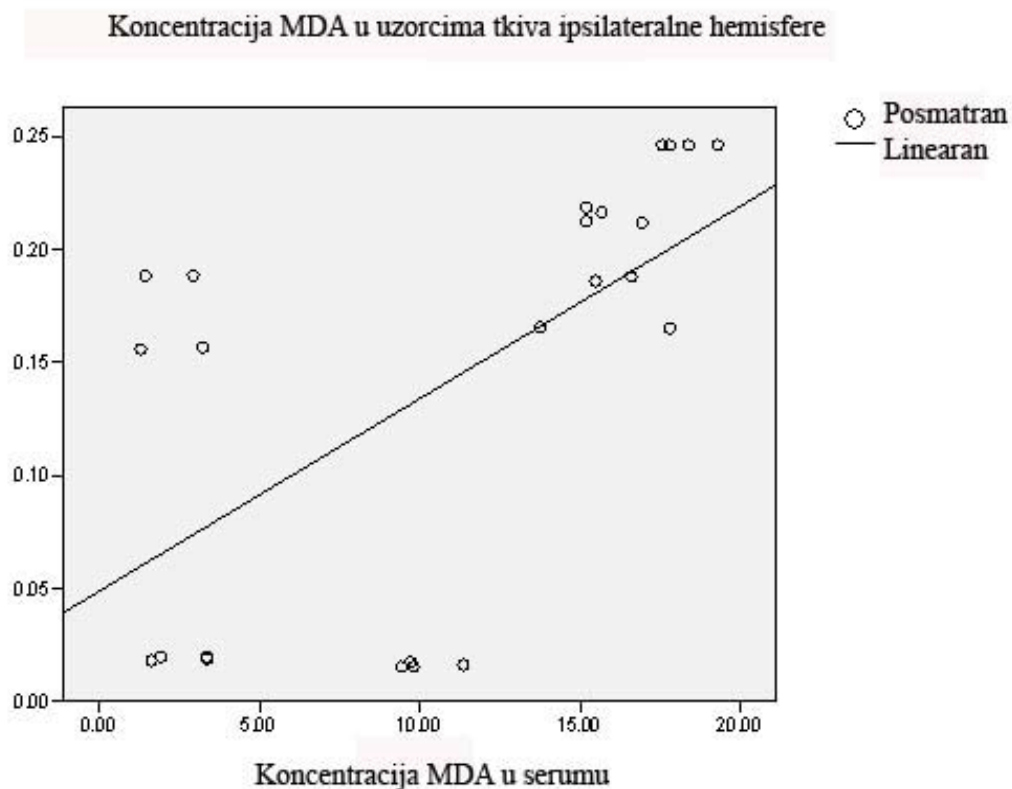
Slika 15. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na koncentraciju malondialdehida u uzorcima seruma pacova. Na apscisi su prikazane grupe eksperimentalnih životinja: K kontrolna grupa-intaktne životinje (n=4), KHBO kontrolna grupa-intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), Š šam kontrola-lažno operisane životinje (n=4), ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4), L-operisane životinje (n=4), LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol (n=4). Na ordinati su prikazane srednje vrednosti \pm standardna greška, u nmol po mg proteina, malondialdehida. # $p < 0,05$ vs. K, † $p < 0,05$ vs. KHBO, ‡ $p < 0,05$ vs. Š, § $p < 0,05$ vs. ŠHBO, \$ $p < 0,05$ vs. L.

4.3.5. Utvrđivanje korelacije između koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu i u serumu

Pirsonovom analizom podataka utvrdili smo da stepen korelacije između koncentracije MDA u uzorcima kontralateralne hemisfere i seruma iznosi 0,53 (Slika 16.a). Međutim, između koncentracija MDA u uzorcima ipsilateralne hemisfere i seruma stepen korelacije iznosi 0,6 (Slika 16.b).



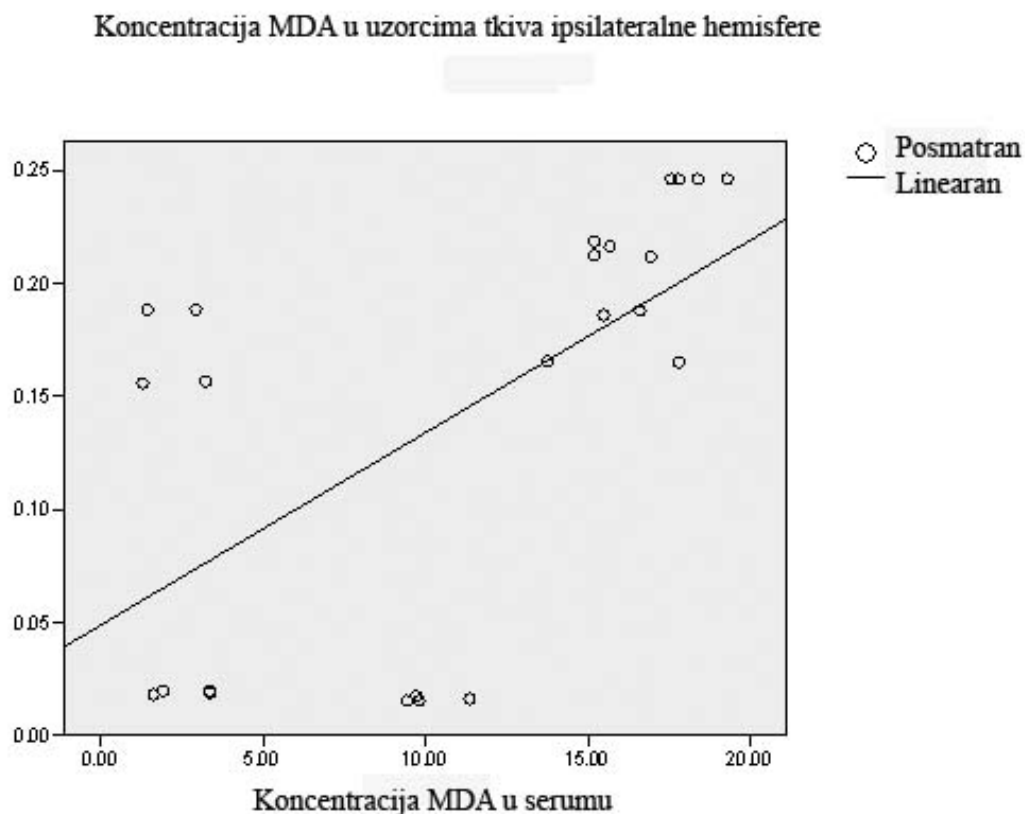
Slika 16.a



Slika 16.b

Slika 16. Prikaz korelacije između koncentracija malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva i u uzorcima seruma. Na ordinatama su prikazane koncentracije malondialdehida u uzorcima seruma. a: Na apscisi su prikazane koncentracije malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva kontralateralne hemisfere. b: Na apscisi su prikazane koncentracije malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva ipsilateralne hemisfere. Grupe eksperimentalnih životinja (n=4): K kontrolna grupa-intaktne životinje, KHBO kontrolna grupa-intaktne životinje koje su prošle kroz HBO protokol, Š šam kontrola-lažno operisane životinje, ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol, L-operisane životinje, LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol.

Kada smo analizirali samo podatke iz grupa životinja koje su prošle kroz hiruršku proceduru, Š, ŠHBO, L i LHBO stepen korelacije između koncentracije MDA u uzorcima ipsilateralne-povređene hemisfere i seruma je iznosio 0,8 (Slika 17).



Slika 17. Prikaz korelacije između koncentracija malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva i u uzorcima seruma pacova iz eksperimentalnih grupa koje su prošle kroz hiruršku proceduru. Na apscisi su prikazane koncentracije malondialdehida u uzorcima kortikalnog tkiva ipsilateralne hemisfere. Na ordinati su prikazane koncentracije malondialdehida u uzorcima seruma. Grupe eksperimentalnih životinja (n=4): Š šam kontrola-lažno operisane životinje, ŠHBO-lažno operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol, L-operisane životinje, LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol.

4.4. IMUNOHISTOHEMIJA

4.4.1. Uticaj hiperbarične oksigenacije na proces reaktivne astroglioze

Posle povrede mozga ćelije koje okružuju povredu se aktiviraju, formiraju barijeru i na taj način izoluju oštećeno mesto od ostalog tkiva. U ovom procesu najaktivniji su reaktivni astrociti, ćelije koje u najvećoj meri doprinose formiranju barijere, čime se smanjuje dalje oštećenje tkiva.

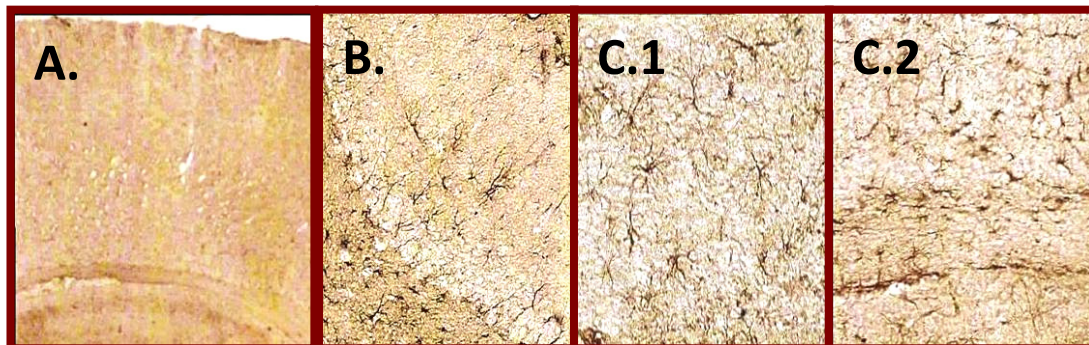
4.4.1.a. Uticaj hiperbarične oksigenacije na ekspresiju GFAP-a

GFAP je intermedijerni filament koji se javlja samo u astrocitima. Povećanje GFAP-a je univerzalno prihvaćeno kao marker reaktivne astroglioze.

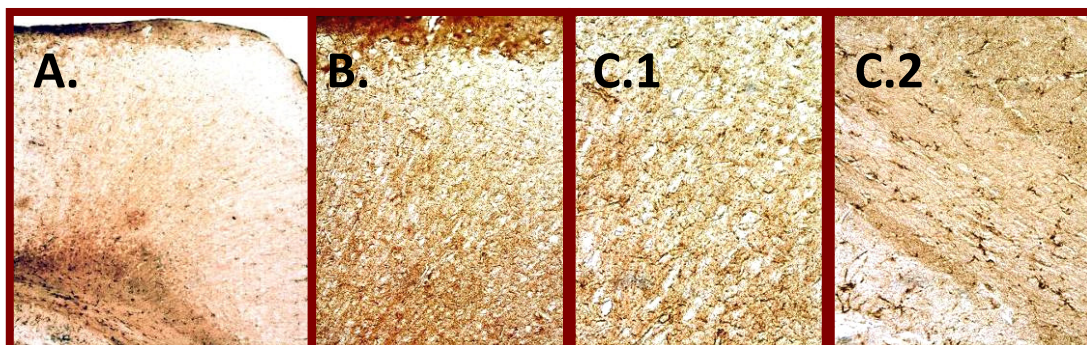
Imunohistohemija koja je urađena na presecima mozga pacova iz kontrolne grupe pacova K, koji nisu operisani niti su bili izlagani kisoniku pod hiperbaričnim uslovima, prikazuje slab nivo ekspresije GFAP-a (Slika 18).

Isti nalaz je dobijen kada je sprovedeno imunohistohemijsko bojenje preseka mozga pacova iz grupe KHBO (Slika 19), intaktnih životinja koje su prošle kroz HBO protokol, i iz grupa Š i ŠHBO pacova koji su operisani ali kojima nije narušen integritet moždanog tkiva.

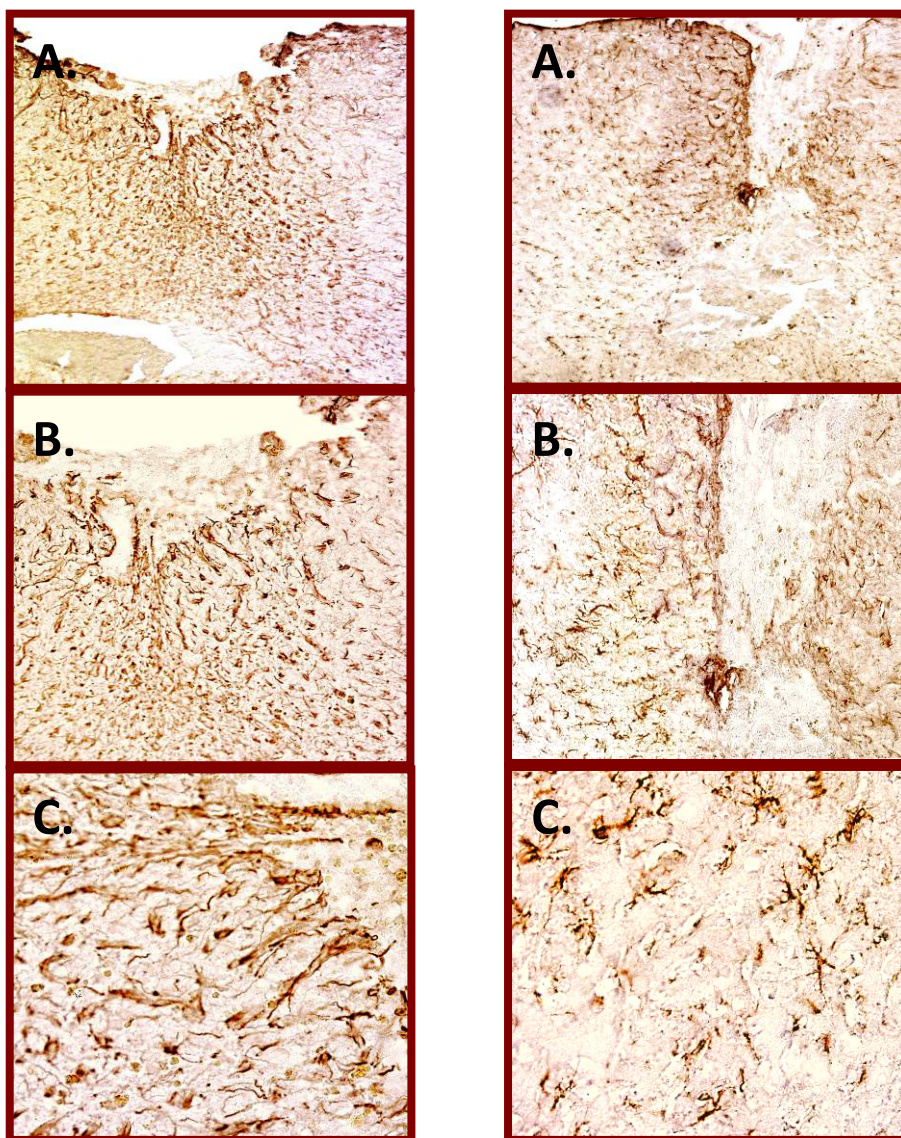
Ovde su prikazani rezultati samo za K i KHBO. Astrociti kod kontrola nemaju karakteristike reaktivnih ćelija (Slike 18 C i 19 C). Ovi astrociti imaju malo telo i duge, tanke nastavke (Slike 18 C i 19 C).



Slika 18. Astroцити u desnom intaktnom korteksu. Prikazani su preseци mozga pacova iz grupe K obeleženi anti-GFAP antitelom. Uveličanja: A:10x, B:20x, C:40x.



Slika 19. Astroцити u desnom intaktnom korteksu posle 10 HBO tretmana. Prikazani su preseци mozga pacova iz grupe KHBO obeleženi anti-GFAP antitelom. Uveličanja: A:10x, B:20x, C:40x.



Slika 20.a

Slika 20.b

Slika 20. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na aktivnost astrocita. a: Prikazani su preseki oštećenog korteksa mozga pacova koji predstavljaju grupu operisanih životinja (L) obeleženi anti-GFAP antitelom. b: Prikazani su preseki desnog korteksa mozga pacova koji su prošli operativnu proceduru i 10 HBO tretmana (LHBO) obeleženi anti-GFAP antitelom. Uveličanja: A: 10x, B: 20x, C: 40x.

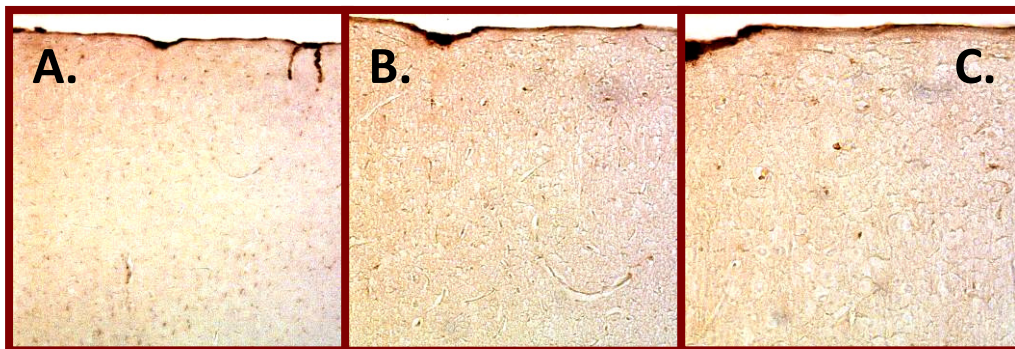
Preseci mozga pacova iz grupe L (operisanih životinja kojima je sukcionom ablacijom ukonjen desni senzomotorni korteks) (Slika 20.a) 10 dana posle operacije pokazuju intenzivnu imunoreaktivnost u odnosu na intaktne grupe (Slike 18 i 19). Najveći broj astrocita se nalazi u širokom obodu oko povrede i potpuno je ograničavaju (Slika 20.a b). Čelijska tela astrocita su uvećana i intenzivno obojena, a nastavci su kraći, deblji i jače obojeni, što je karakteristika reaktivnih astrocita (Slika 20.a C).

Na presecima mozga pacova iz grupe LHBO (operisanih životinja koje su prošle 10 HBO tretmana) (Slika 20.b) zapaža se smanjena imuno reakcija u odnosu na grupu L. Astrociti se karakterišu manjim čelijskim telom i dužim, tanjim i manje razgranatim nastavcima (Slika 20 b, C). Morfološki su sličniji astrocitima viđenim u grupi K (Slika 18 C). Nalaze se u uskom prstenu oko mesta povrede u manjem broju i bez odlika hipertrofije.

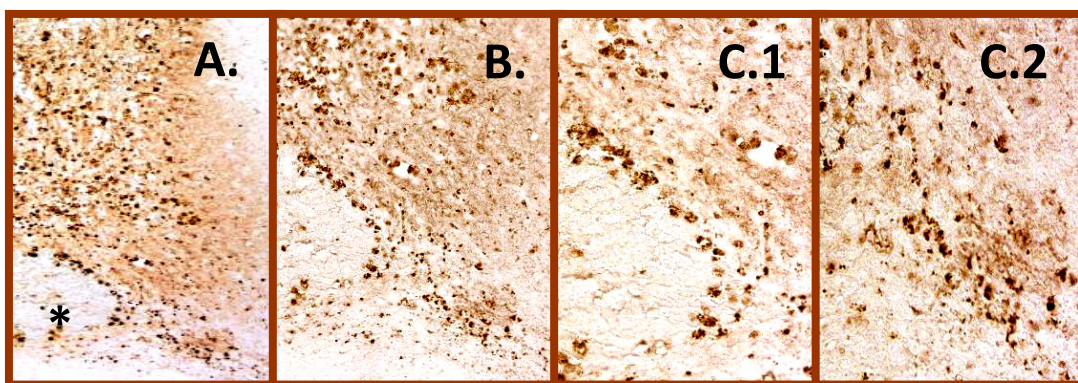
4.4.1.b. Odgovor mikroglije/makrofaga na HBO tretman

Mikroglija je u funkcionalnom smislu slična makrofagima. Ovaj tip ćelija se u većoj količini nalazi oko mesta povrede u mozgu, gde ima glavnu ulogu u fagocitozi i pinocitozi. ED-1 antitelo se koristi kao marker aktivirane mikroglije koja učestvuje u mehanizmu oporavka nervnog sistema posle povrede.

Na presecima mozga pacova iz kontrolnih grupa K, KHBO, Š i ŠHBO, kako pacova koji nisu operisani, tako i onih kojima tokom operacije nije narušen integritet moždanog tkiva, bez obzira da li su izlagani ili nisu izlagani kiseoniku pod hiperbaričnim uslovima, imunohistohemijsko bojenje ED-1 antitelom je veoma slabo, što ukazuje na to da mikroglija nije aktivirana, odnosno da se nalazi u mirujućoj formi (prikazani su samo preseci iz grupe K, Slika 21).

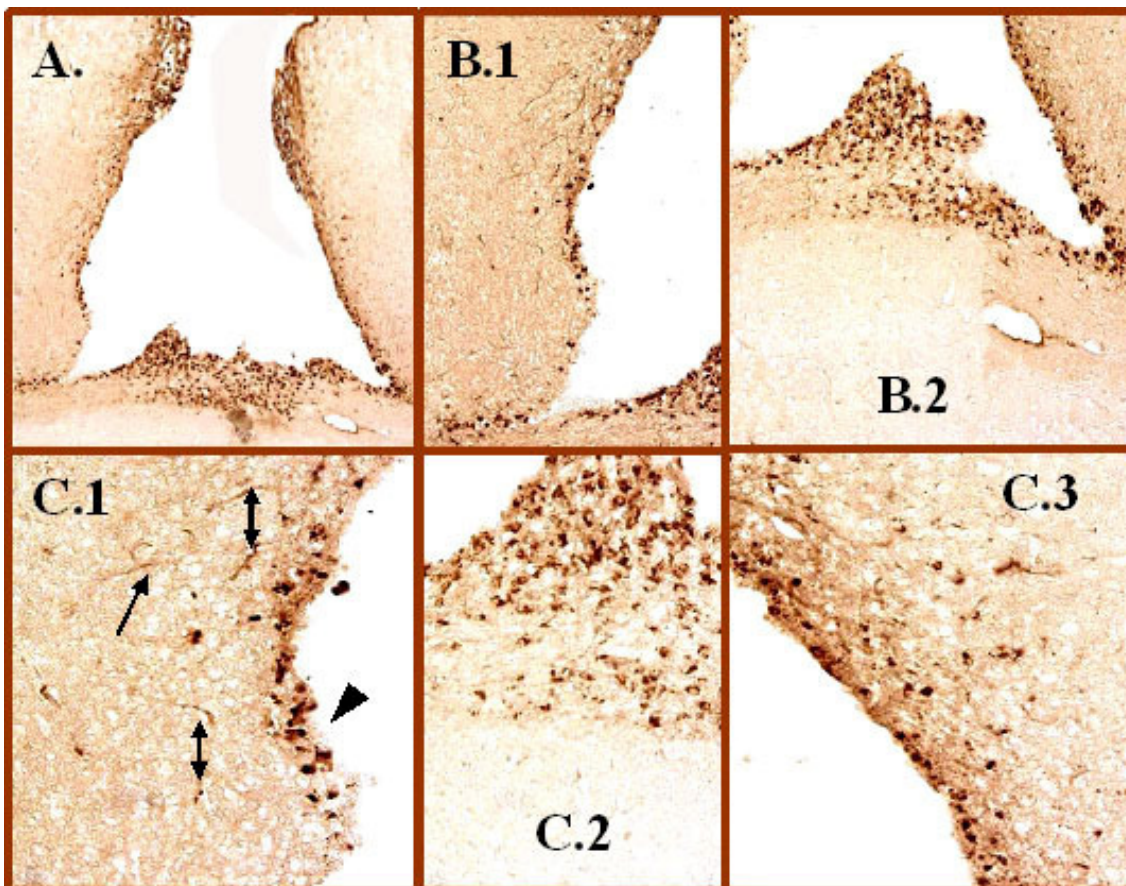


Slika 21. Izgled mikroglije/makrofaga u intaktnom korteksu. Prikazani su preseci desnog korteksa mozga pacova iz grupe K obeleženi anti-ED-1 antitelom. Uveličanja: A:10x, B:20x, C:40x.



Slika 22. Uticaj povrede na aktivnost mikroglije/makrofaga. Prikazani su preseci mozga desnog povređenog korteksa pacova iz grupe L, 10 dana posle operacije, obeleženi anti-ED-1 antitelom. Uveličanja: A:10x, B:20x, C:40x. * mesto povrede

Preseci mozga pacova iz grupe L (operisanih životinja kojima je sukcijom ablacijom ukonjen desni senzomotorni korteks) 10 dana posle operacije, pokazuju intenzivnu obojenost (Slika 22), što ukazuje na veliku aktivnost mikroglije/makrofaga. Oko mesta povrede se nalazi veliki broj aktiviranih ćelija mikroglije i makrofaga koje su krupne, okruglog oblika i intenzivno obojene (Slika 22 C).



Slika 23. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na aktivnost mikroglije/makrofaga. Prikazani su preseci desnog korteksa mozga pacova koji su prošli operativnu proceduru i 10 HBO tretmana (LHBO) obeleženi anti-ED-1 antitelom. Strelice označavaju mirujuću, a vrh strelice aktiviranu formu mikroglije. Uveličanja: A:10x , B:20x, C:40x.

Nivo ekspresije ED-1 na presecima mozga operisanih pacova koje su prošli 10 HBO tretmana (grupa LHBO) (Slika 23) je smajen, a mikroglija je nešto manje obojena nego kod grupe L (Slika 22), mada su uočljive jače obojene ćelije samo u regionu oko mesta povrede (Slika 23 B1 i B2). One koje su malo udaljene od mesta povrede imaju pretežno ramifikovanu - mirujuću formu (Slika 23 C1 strelice i C3).

4.4.2. Odgovor neurona na HBO tretman

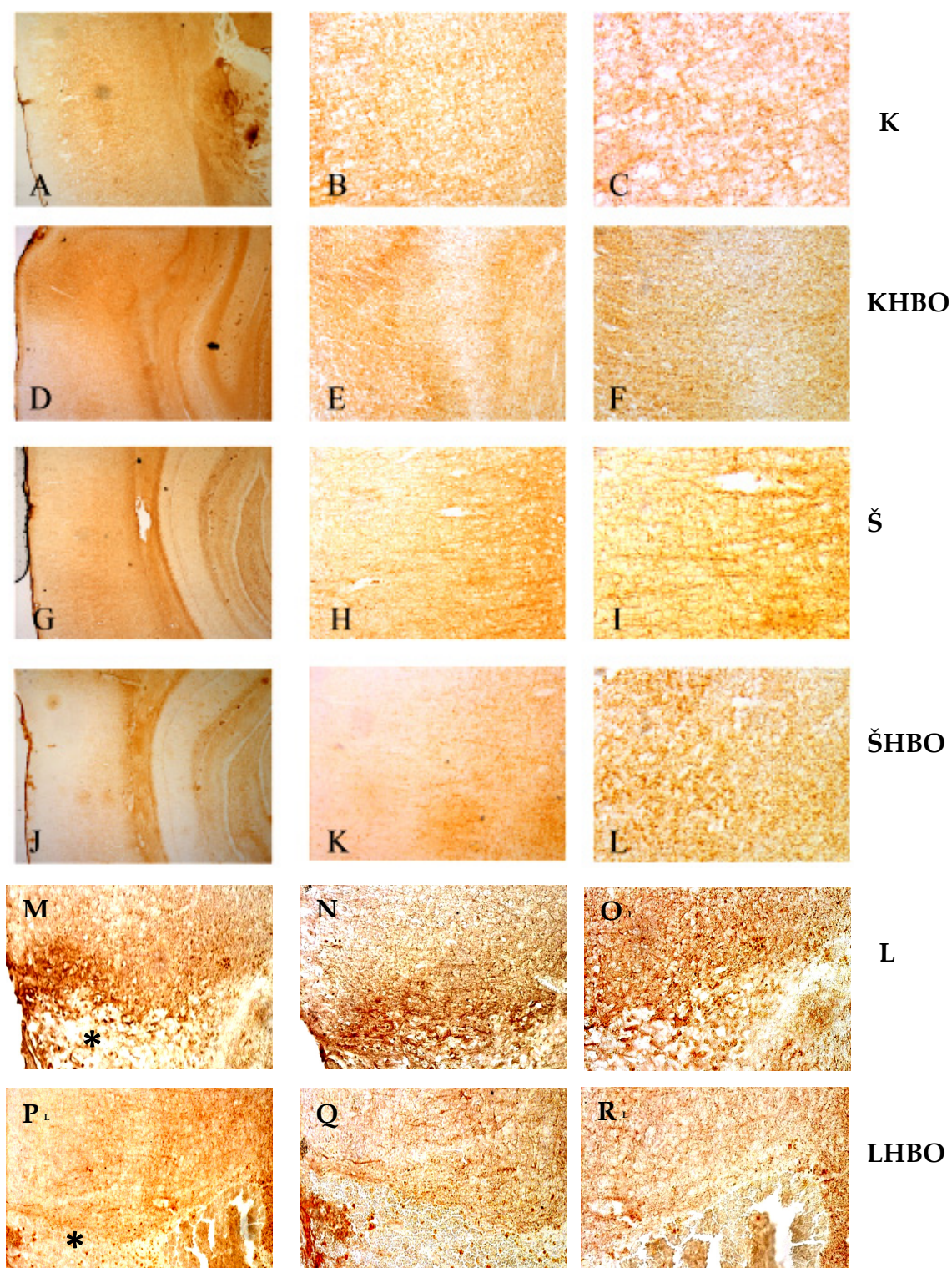
4.4.2.a. Uticaj hiperbarične oksigenacije na ekspresiju SMI31

SMI31 se koristi kao marker fosforilisanih neurofilamenata. Na slici 24 prikazani su preseci desnog korteksa mozga pacova iz svih grupa obeleženi anti-SMI31 antitelom.

Na presecima mozga životinja iz kontrolnih grupa K, KHBO, Š i ŠHBO, bez obzira da li su životinje ostale intaktne ili kojima tokom operacije nije narušen integritet moždanog tkiva, odnosno koje su bile ili nisu bile izlagane hiperbaričnom kisoniku, ne dolazi do intenzivnijeg bojenja fosforilisanih neurofilamenata (Slika 24 A-L).

Imunohistohemija urađena na presecima mozga pacova iz grupe L, pokazuje dobro obojene fosforilisane neurofilamente oko mesta povrede, koji predstavljaju degenerisane neurone (Slika 24 M, N, O). Imuno reakcija je značajno pojačana u odnosu na intaktnu grupu K (Slika 24 A-C).

Kod preseka mozga životinja iz grupe LHBO uočava se slabija SMI31 imunoreaktivnost (Slika 24 P,Q,R) u odnosu na grupu L (Slika 24 M,N,O) oko mesta povrede. Neurofilamenti su i dalje degenerisani, samo u mnogo manjoj meri (Slika 24 P,Q,R) a mogu se uočiti tanki i debeli aksoni.



Slika 24. Odgovor fosforilisanih oblika neurofilamenata na povredu i HBO tretman.
 (A, B, C): Kontrolna grupa. (D, E, F): Kontrolna HBO grupa. (G, H, I): Šam kontrolna grupa. (J, K, L): Šam kontrolna HBO grupa. (M, N, O): Operisana grupa (P, Q, R): Operisana HBO grupa. Uveličanja: (A, D, G, J, M, P): 5x, (B, E, H, K, N, Q): 20x, (C, F, I, L, O, R): 40x. * mesto povrede

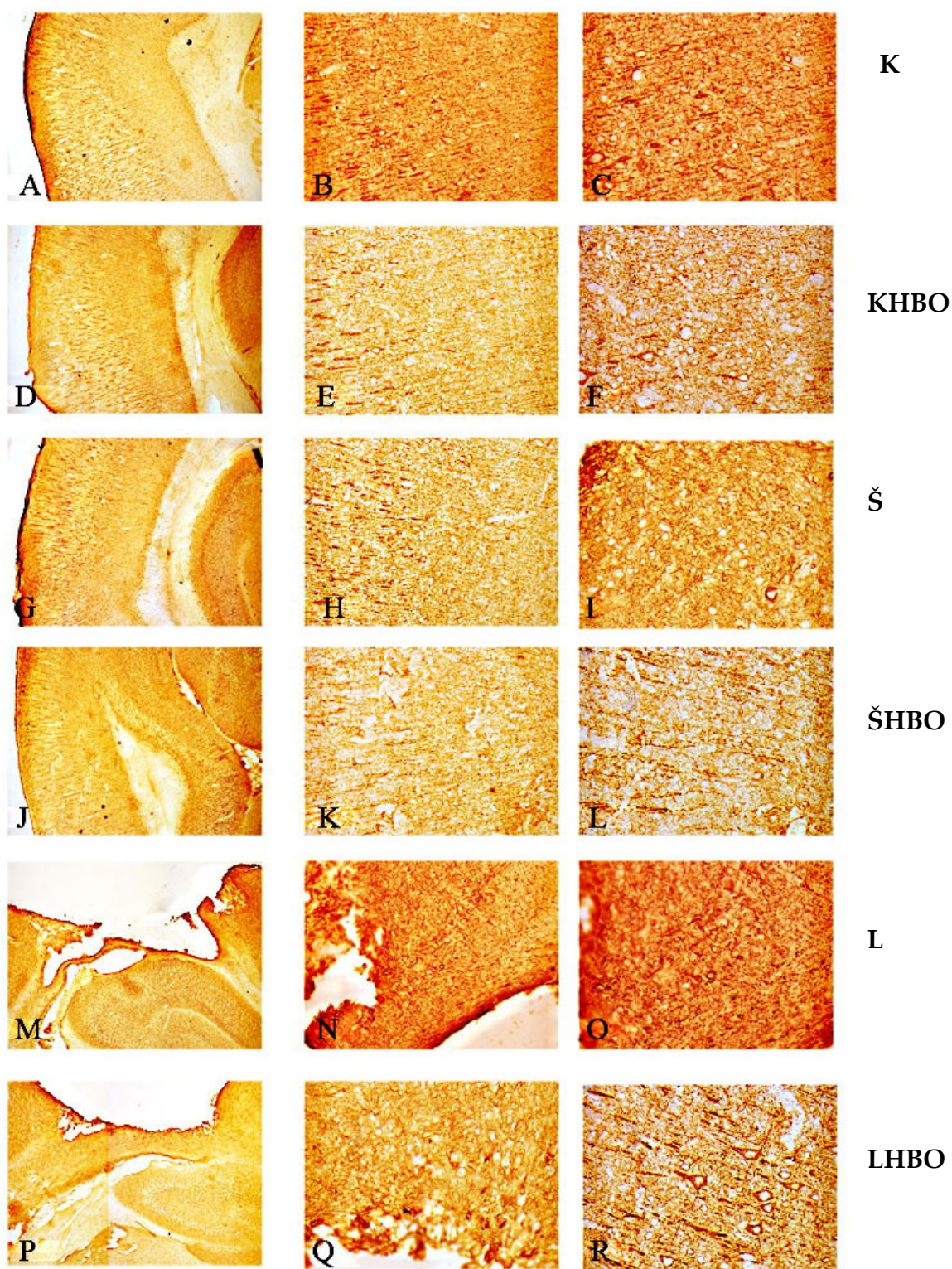
4.4.2.b. Uticaj hiperbarične oksigenacije na rast i razvoj dendrita

Protein vezan za mikrotubule (Microtubule associated protein 2-MAP2) se koristi kao marker za praćenje stepena dendritskog rasta i razvoja. Na slici 25 prikazani su preseki desnog korteksa mozga pacova iz svih grupa obeleženi anti-MAP2 antitelom.

Na presecima mozga životinja iz kontrolnih grupa K, KHBO, Š i ŠHBO ne dolazi do intenzivnog bojenja mikrotubula (Slika 25 A-L).

Imunohistohemija urađena na presecima mozga pacova iz grupe L, pokazuje prisustvo obojenih dendritskih mikrotubula oko mesta povrede (Slika 25 M-O). Imuno reakcija je značajno pojačana u odnosu na kontrolne grupe (Slika 25 A-L).

Kod preseka mozga životinja iz grupe LHBO uočava se intenzivnija imunoreaktivnost (Slika 25 P-R) u odnosu na grupu L (Slika 25 M-O) u zonama oko mesta povrede. Mogu se uočiti tanki dendritski izrastci i u širim moždanim zonama koje su dalje od mesta povrede.



Slika 25. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na ekspresiju MAP2. (A, B, C): Kontrolna grupa. (D, E, F): Kontrolna HBO grupa. (G, H, I): Šam kontrolna grupa. (J, K, L): Šam kontrolna HBO grupa. (M, N, O): Operisana grupa (P, Q, R): Operisana HBO grupa. Uveličanja: (A, D, G, J, M, P): 5x, (B, E, H, K, N, Q): 20x, (C, F, I, L, O, R): 40x.

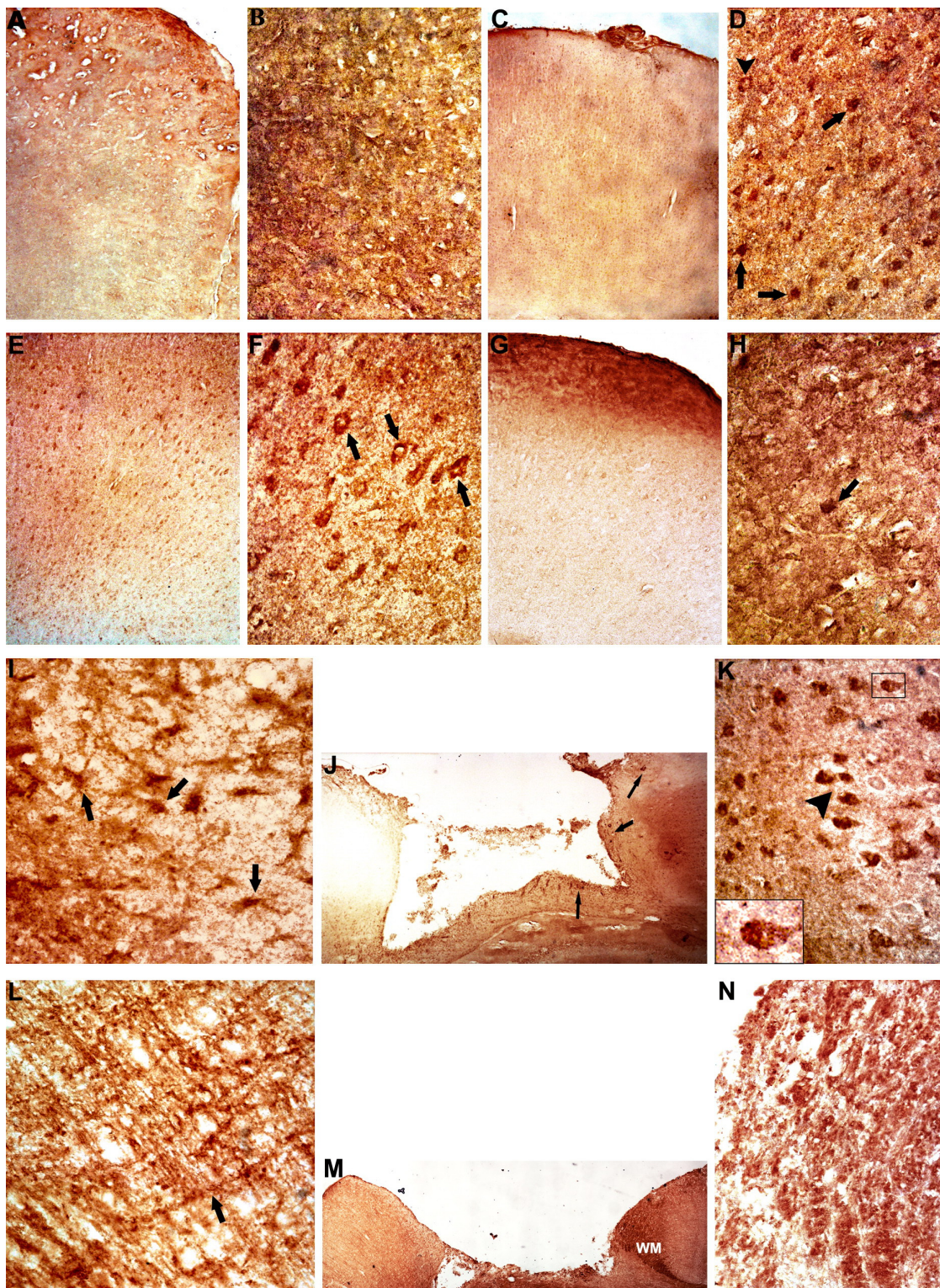
4.4.2.c. Uticaj hiperbarične oksigenacije na rast i razvoj aksona

Imunohistohemijsko bojenje sa GAP43 se koristi kao marker za obeležavanje aksona i praćenje stepena njihovog rasta, odnosno formiranje novih konusa rasta. Na slici 26 prikazani su preseci desnog korteksa mozga pacova iz svih grupa obeleženi anti-GAP43 antitelom.

Na presecima mozga životinja iz kontrolne grupe K bila je zastupljena slaba imunoreaktivnost (Slika 26 A, B) dok je u grupi KHBO primećeno intenzivno intracelularno bojenje (Slika 26 C, D). Kod lažno operisanih životinja iz grupe Š primećeno je nagomilavanje imunoreaktivnosti u okolini tela neurona (Slika 26 E, F, strelice), dok je u grupi ŠHBO primećeno intracelularno bojenje, slično kao na preparatima iz grupe KHBO (Slika 26 G, H, strelice).

Imunohistohemija urađena na presecima mozga pacova iz grupe L, utvrdila je prisustvo dva tipa ćelija koje ekspirimiraju GAP 43. Oko mesta povrede u velikom broju su bile prisutne GAP43 intenzivno obojeni reaktivni astrociti (Slika 26 I, strelice). Takođe je u okolini povrede primećeno sporadično prisustvo GAP43 "nabubrelih" neurona (Slika 26 J, strelice). Na nešto većoj udaljenosti od mesta povrede primećeno je intenzivnije intracelularno bojenje tela neurona. Interesantno je da su grupisani grozdovi GAP43 bili lokalizovani samo unutar jednog regiona (možemo pretpostaviti da je u pitanju novi konus rasta) i usmereni ka mestu povrede (Slika 27 K, vrh strelice, isečak).

Kod preseka mozga životinja iz grupe LHBO uočena je intenzivnija imunoreaktivnost u kortikalnim zonama u okolini povrede, a naročito u subkortikalnoj belojoj masi (Slika 26 M, WM). U zonama sa leve strane u odnosu na povredu je prisutno intenzivno bojenje nervnih vlakana (Slika 26 L, strelica).



Slika 26. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na ekspresiju GAP43. (A, B): Na presecima mozga pacova iz grupe K, registrovana je slaba GAP43 imunoreaktivnost. (C, D): Kod grupe KHBO prisutno je intenzivno intracelularno bojenje na GAP43 (strelice), kao i bojenje oko neurona (vrh strelice). (E, F): U grupi Š takođe je prisutno oskudno imunoreaktivno bojenje na GAP43 u okolini tela neurona (strelice). (G, H): Kod grupe ŠHBO zapaža se intenzivna intracelularna imunoreaktivnost (strelice) kao i

kod KHBO. (I, J, K): Deset dana posle ablacije (L grupa), većina GAP43⁺ ćelija oko mesta povrede po morfološkim karakteristikama podseća na reaktivne astrocite (I, strelice). Pored toga, raštrkano oko mesta povrede se mogla uočiti slaba imunoreaktivnost na GAP43 unutar nabubrelih neurona (J, strelice). Na nešto većoj udaljenosti od mesta povrede, moglo se uočiti intenzivnije nakupljanje GAP43 imunoreaktivnosti u pojedinim zonama tela neurona, usmereno ka mestu povrede (K, vrh strelice), koje podsećaju na konus rasta (K, isečak). (M): Deset dana HBO tretmana, na presecima mozga pacova iz grupe LHBO, dovelo je do intenzivne ekspresije GAP43 u kortikalnim zona oko povrede i u subkortikalnoj beloj masi (WM). (N): Intenzivno bojenje je zapaženo u subkortikalnoj beloj masi (WM) na većem uveličanju. (L): Duga, intenzivno obojena vlakna neurona (strelica) su naročito bila prisutna na levoj strani povrede. Uveličanja: (J, M): 5x, (A, C, E, G): 10x, (B, D, F, H, I, K, L, N): 40x.

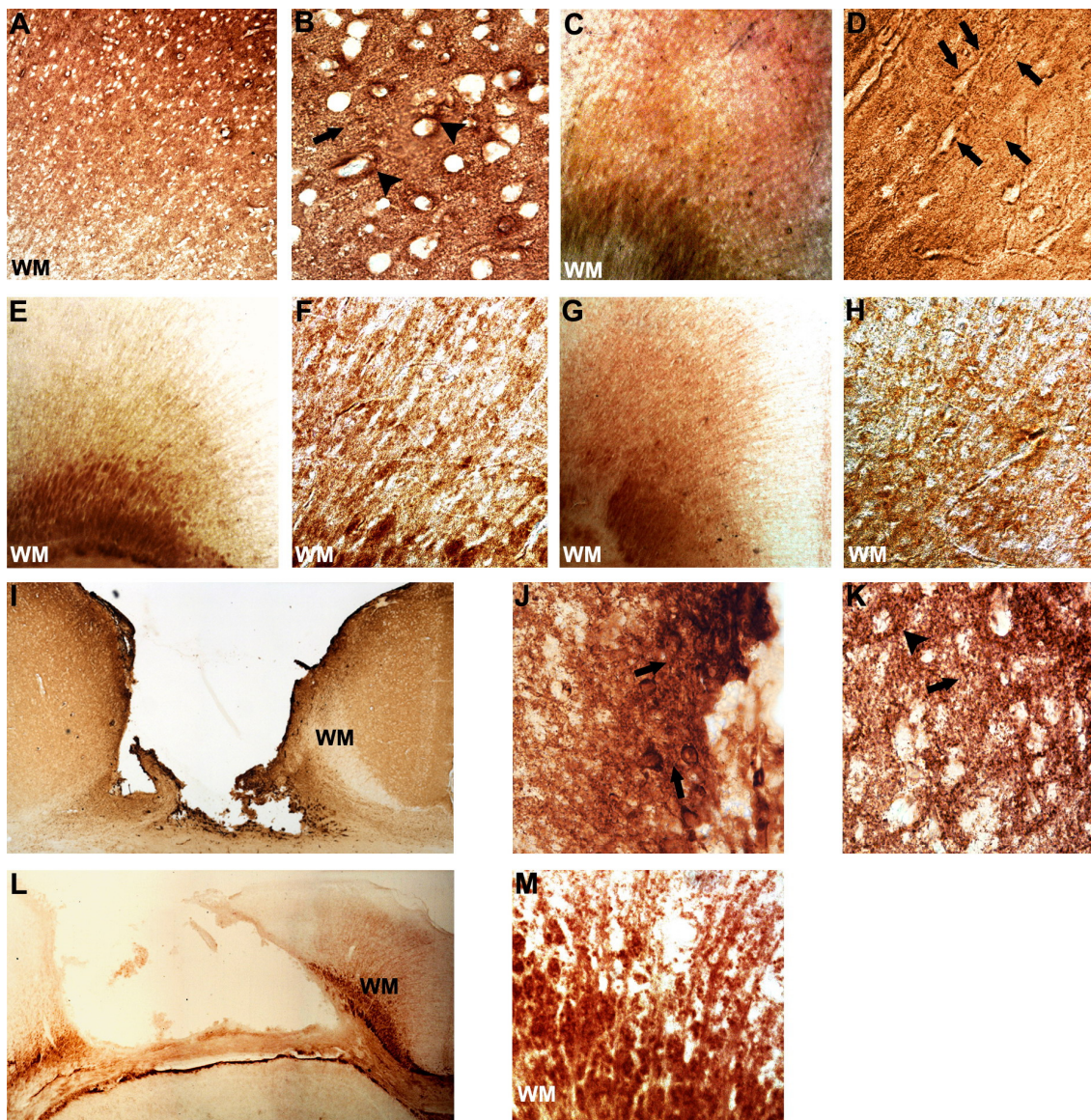
4.4.2.d. Uticaj hiperbarične oksigenacije na ekspresiju sinaptofizina (SYP)

Imunohistohemijsko bojenje na sinaptofizin se koristi kao marker za obeležavanje procesa formiranja novih sinapsi. Na slici 27 prikazani su preseci desnog korteksa mozga pacova iz svih grupa obeleženi anti-SYP antitelom.

Na presecima mozga životinja iz kontrolne grupe K (Slika 27 A, B) je bila zastupljena difuzana zrnasta imunoreaktivnost između neurona (Slika 27 B, strelice), kao i grozdasta nakupljanja u neposrednoj blizini tela neurona (Slika 27 B, vrh strelice). Međutim, u grupi KHBO (Slika 27 C, D) primećeno je intenzivnije bojenje dugih aksona kako u kortikalnim zonama tako i u beloj masi (Slika 27 D, strelice). Pri većem uveličanju grozdasta nakupljanja SYP su primećena unutar tela neurona kao i u proksimalnim dendritima. Sličan odgovor je primećen i u grupama Š (Slika 27 E, F) i ŠHBO (Slika 27 G, H).

Imunohistohemija urađena na presecima mozga pacova iz grupe L (Slika 27 I-K), ukazala je na izrazito smanjenu obojenost u subkortikalnim zonama bele mase (Slika 27 I, WM), sporadičnu zrnastu imunoreaktivnost između neurona (Slika 27 K, strelica) i znatno manje grozdastih nakupljanja u neposrednoj okolini tela neurona (Slika 27 K, vrh strelice). U neposrednoj kortikalnoj zoni oko mesta povrede primećena su nakupljanja SYP u telima degenerisanih neurona (Slika 27 J, strelice).

Kod preseka mozga životinja iz grupe LHBO uočena je intenzivna imunoreaktivnost kako u kortikalnim zonama tako i u subkortikalnoj beloj masi u zonama oko povrede (Slika 27 L, M, WM).



Slika 27. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na ekspresiju sinaptofizina (SYP). (A, B): Na presecima mozga pacova iz grupe K uočava se odsustvo imunoreaktivnosti na SYP u subkortikalnoj beloj masi (WM), kao i difuzno granularno bojenje između neurona (B, strelica), i grozdasta nakupljanja oko tela neurona (B, vrh strelice). (C): Na presecima mozga pacova iz grupe KHBO prisutna je intenzivna imunoreaktivnost dugih aksona kako u korteksu tako u subkortikalnoj beloj masi. (D): Na većem uveličanju gusta imunoreaktivnost na SYP se može primetiti na telima neurona, dendritima i duž aksona (strelice). (E, F, G, H): Sličan obrazac bojenja u

subkortikalnoj beloj masi je prisutan na presecima mozga pacova iz grupa Š (E, F) i ŠHBO (G, H). (I): Deset dana posle ablacije desnog senzomotronog korteksa, na presecima mozga pacova iz grupe L, došlo je do porasta imunoreaktivnosti u uskoj zoni oko mesta povrede, dok takav odgovor nije uočen na nivou subkortikalne bele mase. (J): Na obodima povrede može se uočiti akumulacija imunoreaktivnosti na SYP u pojedinim degenerisanim neuronima (strelice). (K): Difuzni granularni obrazac imunoreaktivnosti na SYP između neurona (strelice) kao i okolo tela neurona (vrh strelice) je bio prisutan duž povređenog korteksa. (L): Deset dana HBO tretmana, posle ablacije desnog senzomotronog korteksa, na presecima mozga pacova iz grupe LHBO, dovelo je do intenzivne imunoreaktivnosti u kortikalnim zona oko povrede i u subkortikalnoj beloj masi (WM) na SYP. (M): Na većem uveličanju intenzivno nakupljanje imunoreaktivnosti na SYP je bilo prisutno u subkortikalnoj beloj masi (WM). Uveličanja: (I, L): 5x, (A, C, E, G): 10x, (B, D, F, H, J, K, M): 40x.

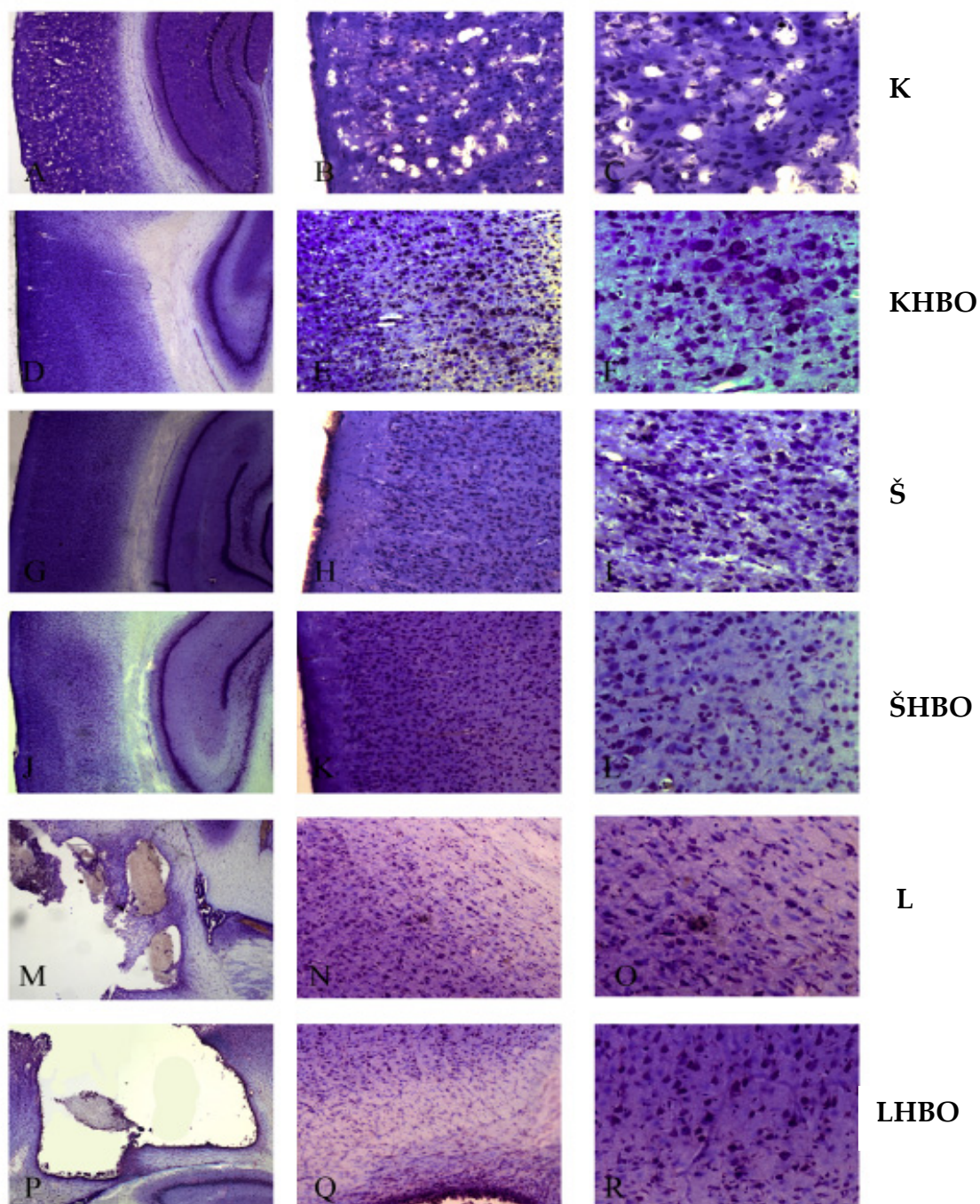
4.4.2.e. Histochemijsko obeležavanje preseka mozga pacova krezil violetom

Bojenje krezil violetom korišćeno je u cilju vizuelizacije nervnih ćelija na presecima.

Na presecima mozga pacova iz kontrolnih grupa (K i KHBO Slika 28 A-F) i lažno operisanih životinja (Š i ŠHBO Slika 28 G-L), bez obzira da li su ili nisu bili podvrgnuti HBO tretmanu, nisu uočene međusobne razlike.

U širem regionu oko povrede u grupi L (Slika 28 M) detektovan je gubitak neurona u odnosu na nalaze iz grupa životinja kojima nije narušen integritet moždanog tkiva (Slika 28 B, E, H, K), dok je gubitak neurona u regionu uz samu povredu znatno izraženiji (Slika 28 N).

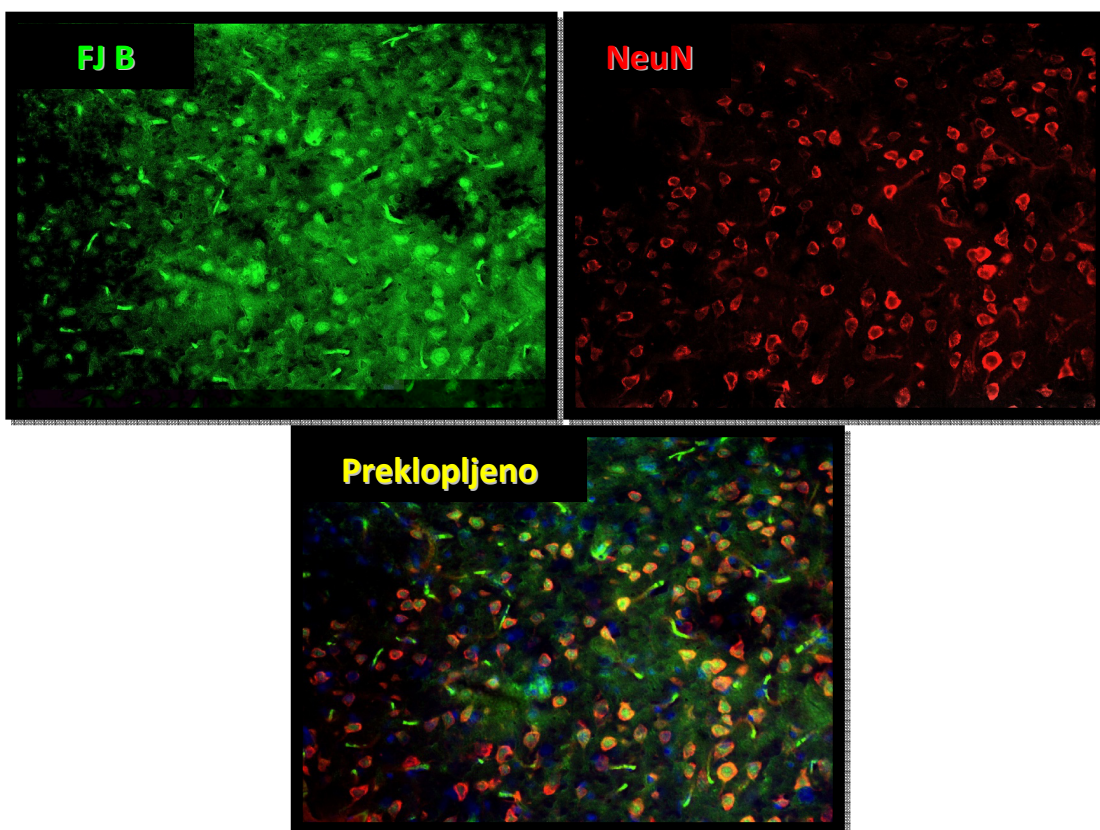
HBO tretman nije uticao na gubitak neurona niti u užem regionu oko povrede (Slika 28 Q), niti u širem regionu u grupi LHBO (Slika 28 P).



Slika 28. Svetlosna mikroskopija kretil violetom. Prikazani su preseki desnog korteksa mozga pacova iz svih grupa. (A, B, C): Kontrolna grupa. (D, E, F): Kontrolna HBO grupa. (G, H, I): Šam kontrolna grupa. (J, K, L): Šam kontrolna HBO grupa. (M, N, O): Operisana grupa (P, Q, R): Operisana HBO grupa. Uveličanja: (A, D, G, J, M, P): 5x, (B, E, H, K, N, Q): 20x, (C, F, I, L, O, R): 40x.

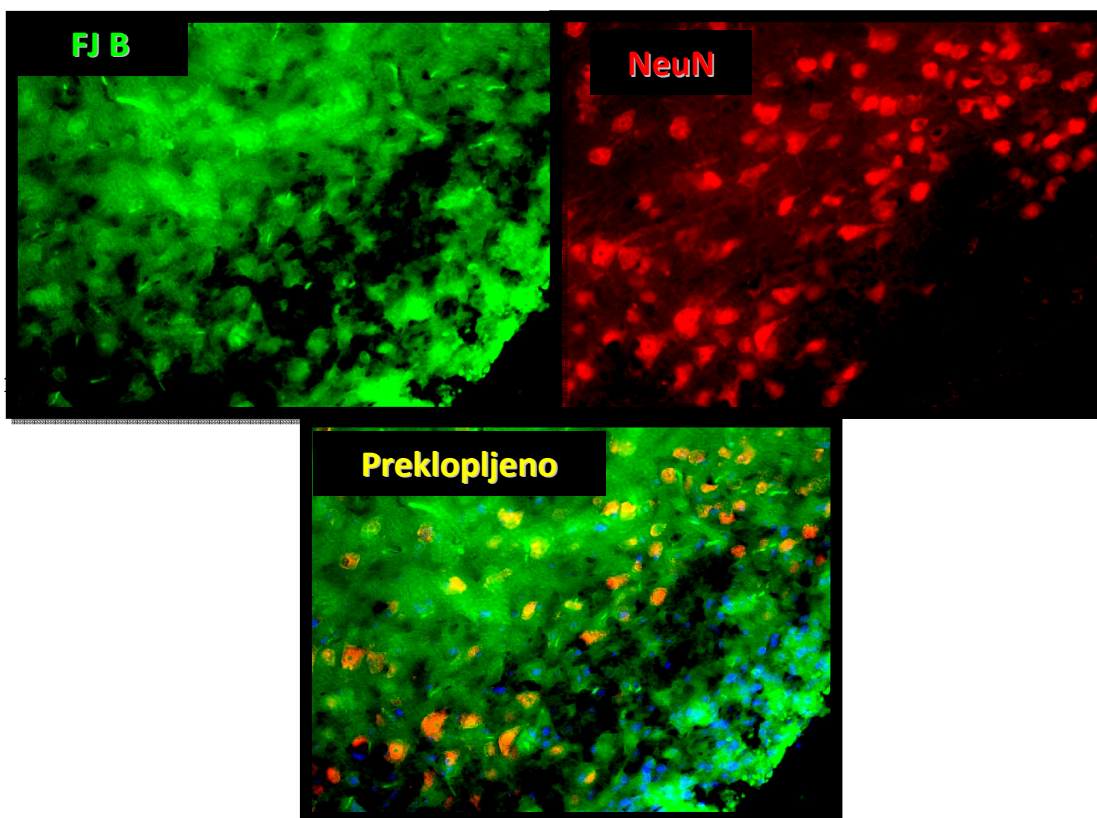
4.4.2.f. Imunofluorescentno obeležavanje preseka mozga pacova fluoro-žadom

Bojenje fluoro-žadom (FJ-B) je korišćeno za obeležavanje degenerisanih nervnih ćelija na presecima. Na slici 29 predstavljeno je bojenje sa FJ-B (zeleno) koji boji neurone koji su u procesu degeneracije, i NeuN (crveno) koji boji tela neurona.



Slika br. 29.a

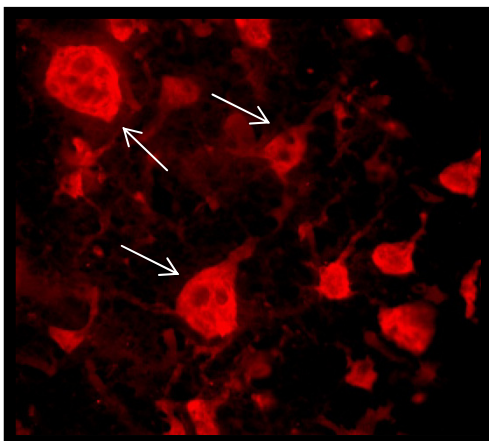
Slika 29. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na neuronalnu degeneraciju. a: Prikazani su preseki povređenog korteksa mozga pacova koji predstavljaju eksperimentalnu grupu L-operisane životinje. (FJ B): Rezultati bojenja sa FJ-B, zelena boja obeležava ćelije u procesu degeneracije. (NeuN): Rezultati bojenja sa NeuN, crvena boja obeležava tela neurona. (Preklopljeno): Žuta boja označava kolokalizaciju bojenja sa FJ B i NeuN, odnosno obeležava degenerisane neurone. Uveličanje: 20x.



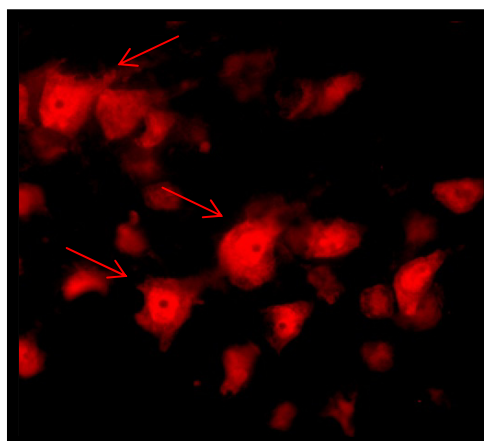
Slika 29.b

b: Prikazani su preseki povređenog korteksa mozga pacova koji predstavljaju eksperimentalnu grupu LHBO-operisane životinje koje su prošle kroz HBO protokol. (FJ B): Rezultati bojenja sa FJ-B, zelena boja obeležava ćelije u procesu degeneracije. (NeuN): Rezultati bojenja sa NeuN, crvena boja obeležava tela neurone. (Preklopljeno): Žuta boja označava kolokalizaciju bojenja sa FJ B i NeuN, odnosno obeležava degenerisane neurone. Uveličanje: 20x.

Na preklopljenoj slici jasno se vidi da je broj neurona koji su u degeneraciji (žuto) mnogo veći na preparatima mozga životinja kod kojih je posle sukcione ablacije desnog senzomotornog korteksa proces oporavka protekao bez intervencija (L) (Slika 29.a), u odnosu na preparate na kojima su preseki mozga životinja koje su prošle kroz HBO protokol (LHBO) (Slika 29.b).



Slika 30.a



Slika 30.b

Slika 30. Uticaj povrede i hiperbarične oksigenacije na neuronalnu apoptozu. a: Prikazani su preseki mozga pacova kod kojih je izvršena ablacija desnog senzomotornog korteksa i čiji je oporavak protekao bez intervencija (L) koji su obojeni sa NeuN. Bele strelice označavaju tela neurona u kojima su formirana apoptotska tela. b: Prikazani su preseki mozga operisanih pacova koji su prošli kroz HBO protokol (LHBO) i obojeni sa NeuN. Crvene strelice označavaju zdrava tela nervnih ćelija. Uveličanje: 40x.

Na većem uveličanju u grupi L, kod neurona oko mesta povrede zapaža se da u telu ćelije dolazi do formiranja apoptotskih tela (Slika 30.a bele strelice), što ukazuje na to da su neuroni ušli u proces apoptoze. Nasuprot tome, kod LHBO grupe, uočava se da najveći broj neurona ima lepa zdrava tela u čijim jedrima se jasno vidi jedarce (Slika 30.b crvene strelice). Ovi rezultati nam ukazuju da je posle HBO broj zdravih neurona mnogo veći, a procesi neurodegeneracije i apoptoze svedeni na najmanju meru. Što znači da je sekundarna degeneracija neurona smanjena primenom hiperbarične oksigenacije.

5. DISKUSIJA

U istoriji medicine zabeleženo je da se po prvi put gas pod povišenim pritiskom u terapijske svrhe primenio još daleke 1662. godine (Simpson 1857). Britanski sveštenik Henšov je tada konstruisao preteču današnje barokomore „Dominicilium“. Samo nekoliko godina pre tog događaja Robert Bojl je publikovao rad pod naslovom: „New Experiments Physio-Mechanical, Touching the Spring of Air and its Effects“ u kome je ustanovljen i njegov epohalni zakon (Boyle 1660). Čak i ova pionirska konstrukcija je bila u stanju da stvori kako hiperbarične tako i hipobarične uslove. Henšov je smatrao da njegov izum može pomoći ljudima koji imaju probleme tokom procesa digestije, da može olakšati disanje i generalno ublažiti respiratorne tegobe. Opisani događaj se odigra nešto više od 100 godina pre nego što je Antoan Lavlazije otkrio kiseonik kao prirodni element.

Prvu barokomoru koja je po svojim karakteristikama bila slična savremenima konstruisao je Pravez 1837. godine, dok je prvu mobilnu barokomoru konstruisao Fontejn 1877. godine.

Savremena primena baromedicine počinje sredinom dvadestog veka, kada je opšti tehnološki razvoj omogućio konstrukciju pouzdanih kako jednomesnih tako i višemesnih barokomora. Kao otac savremene baromedicine ističe se Dr. I. Boerema. Tokom šezdesetih godina dvadesetog veka Dr. I. Boerema je izveo hiperbaričnu oksigenaciju izvan okvira podvodne medicine i implementirao je u savremene medicinske terapijske tokove.

Kao što je već istaknuto, terapijski princip hiperbarične oksigenacije se zasniva na sposobnosti da poveća parcijalni pritisak kiseonika u krvi i da se na taj način prevaziđe hipoksija u obolelim tkivima, koja uzrokuje kolaps energetskog metabolizma (Berger 1999) i dovodi do odumiranja ćelija (Yager 1992).

Hiperbarična oksigenacija je danas široko prihvaćena terapijska i dijagnostička metoda, koja se ne primenjuje samo kao terapija izbora u dekompresionoj bolesti, trovanju ugljen monoksidom i gasnoj gangreni, već i u terapiji niza kliničkih stanja (Murphy-Lavoie 2008, Wilkinson 2004, Abidia 2003, Kalani 2002, Feldmeier 2002, Niezgoda 1997, Faglia 1996, Doctor 1992, Lampl 1992, Bevers 1992, Knighton 1990, Skyhar 1986, Knighton 1981, Hart 1974, Ninikoski 1972, Perrins 1967). Pored toga ova metoda se u značajnoj meri može primeniti i kod zdravih osoba u cilju očuvanja zdravlja, poboljšanju kvaliteta života i ubrzanja oporavka posle intenzivnih fizičkih napora.

Da li hiperbarična oksigenacija može naći svoje mesto u moždanoj traumatologiji je još uvek predmet naučne i stručne debate.

Iako je kao što smo već naveli tokom poslednjih godina publikovan značajan broj nalaza koji podržava stanovište da HBO može ostvariti doprinos u sanaciji posledica moždane traume (Zhou 2007, Niklas 2004), bilo je i kontradiktornih nalaza (Rockswold 2007), ali i onih koji opovrgavaju ovakav stav (McDonagh 2004, Opperl 2003).

Dokumentovano je da u posttraumatskom periodu dolazi do redukcije protoka krvi kroz moždano tkivo (Thomale 2002, Eriskat 1997). Na osnovu ostvarenih rezultata u našem istraživanju možemo pretpostaviti, da povećanje udela fizički rastvorenog kiseonika u plazmi dovodi do poboljšanja snabdevanja povređenog moždanog tkiva kiseonikom. Na ovaj način se stvaraju povoljni uslovi za održavanje energetskog metabolizma, prvenstveno mitohondrijalne respiracije. Očuvanje aerobnog metabolizma pomaže neuronima da održe integritet ćelijske membrane i funkcije jonskih transportera, čime se sprečava preterani upliv jona kalcijuma, koji može uzrokovati neuralnu smrt (Faden 1989). Primenom hiperbarične oksigenacije stvaraju se povoljni uslovi za preživljavanje neurona koji nisu bili direktno oštećeni traumom, ali čije su veze sa drugim neuronima prekinute.

Publikovani su nalazi koji potvrđuju da HBO putem podsticanja energetskog metabolizma i sinteze ATP-a, omogućava neuroprotekciju, dok ujedno smanjuje inflamatornu reakciju i edeme nastale posle povrede (Helms 2005, Miljkovic-Lolic 2005, Veltkamp 2005, Yager 1992).

Potvrđeno je da HBO poboljšava ekspresiju protektivnih ćelijskih enzima i regulatora apoptoze i da stvara povoljne uslove za neuroregeneraciju (Rosenthal 2003, Yin 2003, Yang 2002, Weinstein 1986).

Naše mišljenje je da razvoj adekvatnih eksperimentalnih animalnih modela može ukazati na potencijalne dobrobiti u poboljšanju oporavka pacijenata sa povredama mozga, koje se mogu postići primenom HBO u humanoj medicini. Činjenica da se kod traumatskih stanja prvenstveno zbog vitalne ugroženosti pacijenta, adekvatna dvostruko slepa klinička istraživanja ne mogu tako lako organizovati, dodatno opravdava naš stav (Rockswold 2010, Lin 2008, Adamides 2006). Stoga se i uprkos razlici kako u metabolizmu, tako i u regenerativnim sposobnostima koje postoje između čoveka i pacova, rezultati dobijeni na ovom eksperimentalnom modelu mogu posmatrati kao validni pokazatelji potencijala koji HBO može ponuditi u humanoj medicini.

Povrede CNS-a spadaju među vodeće uzročnika smrtnosti kod ljudi, a ujedno prouzrokuju veliki broj različitih oblika invaliditeta (McMillan TM 2007, MCArtur 2004). Najčešći uzroci ovih povreda su saobraćajne nesreće, nezgode na poslu i sportske povrede. Bez obzira na veličinu, svaka povreda CNS-a se mora smatrati urgentnim medicinskim stanjem (Flanagan 2008).

Medicinske posledice koje mogu nastati posle povrede mozga veoma se razlikuju, u zavisnosti od mesta povrede, kao i od veličine oštećenog regiona mozga. Može se reći da ne postoje dva čoveka sa pretrpljenom povredom moždanog tkiva kod kojih su se ispoljile identične posledice. Mogu da se razviju senzorni ili motorni problemi za koje nije neophodna medicinska intervencija. Ali traumatska povreda mozga može da izazove ozbiljne probleme

kao što su: spazam mišića, dupli vid ili smanjenje vida, pa čak i slepilo, gubitak osećaja za miris, smanjenje govornih sposobnosti kao što je usporen govor, glavobolje ili migrene, kao i poremećaje sna. Česti problemi su smanjenje pažnje i memorije, smanjenje brzine obrade informacija, kao i problemi percepcije.

Kognitivni problemi uključuju promene u koncentraciji ili pažnji, probleme u komunikaciji, kao što su teškoće u pronalaženju reči, zatim teškoće u prostornoj orijentaciji, organizacione probleme, kao i probleme rasuđivanja i nemogućnost obavljanja više radnji u isto vreme. Promene raspoloženja i promene ličnosti, kao što su agresija, depresija i anksioznost su moguće posledice traumatske povrede mozga, kao i česti emocionalni problemi (Lippert-Gruner 2006, Perbal 2003, Perino 2001, Hanks 1999).

Kognitivne i neurološke komplikacije mogu da nastanu odmah posle povrede mozga, ali se mogu razviti i menjati tokom vremena (Masel 2010, Chambers 1996, Rimel 1981). Pokazano je da kao jedna od naknadnih posledica traumatske povrede mozga može da se javi i abnormalna električna aktivnost, usled koje se javljaju epileptični napadi. Interesantno je da prvi napad epilepsije kod pacijenta koji je pretrpeo povredu mozga može da se javi čak i dve godine posle povrede (Peković 2006).

Neposredna medicinska interventna procedura kod traumatskih povreda glave je usmerena na hiruršku dekompresiju, hemostazu, stabilizaciju koštanih fragmenata i prevenciju reperfuzivnih povreda (Nortje 2004). Ali i pored velikog napretka koji je postignut u standardnom neurohirurškom, farmakološkom i fizikalno-rehabilitacionom saniranju posledica moždane traume, smanjenje motornih sposobnosti u vidu paraliza ili pak pareze, su još uvek vrlo učestale prepreke u potpunom izlečenju pacijenata sa moždnom traumom (Timmons 2010, Saiki 2009, Paci 2009, Nolan 2005, Dutton 2003). Zato proučavanje molekularnih patofizioloških procesa kod disfunkcije mozga omogućava razvoj novih terapijskih pristupa kojima bi se omogućilo smanjenje oštećenja i redukcija neuronalnog propadanja (Fawcett 2006).

Sukciona ablacija eksperimentalni model traumatske povrede moždanog tkiva pacova koji smo mi koristili, omogućava izazivanje uniformnog senzomotornog deficita na kontralateralnoj strani (Szele 1995).

Intenzitet bihevijornog deficita je maksimalan neposredno posle povrede. Budući da se ovom procedurom trajno uklanja moždano tkivo, sekundarne komplikacije koje prate traumatsku povredu poput zapaljenskog odgovora, ishemije, konvulzija, elektrolitnog disbalansa su kod ovog modela minimalne (Saunders 1995, Povlishock 1992, Pulsinelli 1982, Pearlson 1981). Po svojim karakteristikama, preciznoj lokalizaciji, jasno definisanoj površini i dubini povrede, ovaj model je jednostavan za ponovnu reprodukciju. Karakteristike sukzione ablacije kao eksperimentalnog modela koreliraju sa karakteristikama povrede koje na moždanom tkivu nanosi projektil iz vatrenog oružja.

Tokom prehodnih nekoliko godina publikovano je nekoliko ohrabrujućih prikaza kliničkih slučajeva upotrebe hiperbarične oksigenacije u saniranju trauma nastalih tokom oružanih sukoba.

Jansen i saradnici (2010) su opisali klinički slučaj vojnika koji je bio pogođen u glavu projektilom maloga kalibra. Fragmenti projektila su se zaustavili u srednjem mozgu i njihovo uklanjanje hirurškim putem nije bilo moguće. Posle hirurške intervencije i izlaska iz intenzivne nege, sproveden je kompletan konvencionalni rehabilitacioni postupak. Međutim, značajni neurološki deficiti su ostali. Čak 4 godine posle povrede, pacijent je bio uključen u HBO tretman. Protokol se sastojao od 40 ekspozicija 100% molekulskom kiseoniku, pod pritiskom od 1,25 do 1,50 ATA. Registrovano je blago poboljšanje motorne kordinacije. Nekoliko meseci kasnije, pacijent je po drugi put uključen u HBO tretman. Tom prilikom sprovedeno je 30 ekspozicija pod pritiskom od 2 ATA. Pored dodatnog poboljšanja motorne koordinacije, regostrovali su i blagi porast motorne snage. PET skenom je praćeno funkcionalno stanje moždanog tkiva pre i posle HBO tretmana. Nalazi skeniranja posle druge serije HBO

tretmana, su pokazivali da je došlo do smanjenja zona funkcionalno neaktivnog moždanog tkiva, u okolini mesta na kojima su se zadržali fragmenti projektila.

Wright i saradnici (2009) su opisali klinički slučaj dva vazduhoplovca koji su pretrpeli povrede mozga, kao posledice eksplozije nagazne mine. Kod obojice su se razvili kognitivni poremećaji, poremećaji sna, otežano pamćenje i psihička razdražljivost. Šest meseci posle povrede neuropsihološki testovi su jasno ukazivali na značajno pogoršanje svih parametara (reakciono vreme, proceduralno reakciono vreme, obrada matematičkih zadataka i test uparivanja) u odnosu na rezultate njihovih testiranja pre povrede. Vazduhoplovci su uključeni u seriju HBO ekspozicija u trajanju od 1 sata pri pritisku 100% kiseonika od 1,5 ATA. Rezultati ponovnih neuropsiholoških testova, devet meseci posle povrede, su pokazivali ne samo znakove poboljšanja u odnosu na rezultate prethodnog testiranja, već su u nekim aspektima bili i bolji od rezultata testiranja pre povređivanja. Kako osim medicinskog praćenja vazduhoplovci nisu primali nikakvu drugu terapiju, autori su zaključili da primena hiperbarične oksigenacije može doprineti saniranju simptoma povrede mozga.

Imajući u vidu ubrzan razvoj prenosivih modela hiperbaričnih komora i mogućnosti da se primene čak i u neposrednoj blizini konfliktnih zona, eksperimentalna potvrda da hiperbarična oksigenacija može imati pozitivne efekte u sanaciji posledica traumatskih povreda nervnog tkiva ima strateški značaj.

Wang i saradnici (2010) su u svom istraživanju koristili Fenijev model traumatske povrede moždanog tkiva pacova (Feeney 1981). Oni su registrovali snažne neuroprotektivne efekte pod dejstvom HBO. Jedan od protokola koji su primenjivali i kojim su postigli najbolje rezultate se sastojao u izlaganju životinja HBO tretmanu od 3 ATA. Iako su autori istakli da je njihov protokol u saglasnosti sa preporukama za humanu populaciju, naše je stanovište da bi takav protokol nosio velike potencijalne opasnosti.

Izlaganje 100% kiseoniku u hiperbaričnim uslovima pri pritisku višem od 3 ATA može da izazove epileptične napade, čak i kod zdravih ljudi (Bitterman 2004, Balentine 1973).

Napad epilepsije predstavlja jednu od najozbiljnih komplikacija koja se može razviti posle povrede moždanog tkiva. Kod pacova kod kojih se pojavio epileptični napad indukovano HBO terapijom uočeno je povećanje koncentracije glutamata i γ -aminobuterne kiseline (GABA) (Wood 1969). U eksperimentima na ćelijskim kulturama kortikalnog tkiva pacova ukazano je da izloženost hiperbaričnom kiseoniku pri pritisku od čak 6 ATA, za samo 30 minuta može da izazove veliku štetu, dok je tretman koji je trajao 90 minuta pri istom pritisku doveo do ćelijske smrti (Huang 2000).

Upravo zato smo se prilikom dizajniranja našeg istraživanja, na osnovu naših iskustava kako u eksperimentalnoj, tako i kliničkoj aplikaciji HBO (Brkić 2007, 2008) u cilju izbegavanja toksičnih efekata kiseonika, odlučili da sprovedemo eksperimentalni protokol od 2,5 ATA u trajanju od 60 minuta, koji se smatra idealnim i sigurnim terapijskim modelom (Rockswold 2007).

Mnogi publikovani rezultati ukazuju na činjenicu da je pored pritiska u komori i dužine ekspozicije, veoma važan i vremenski interval između nastanka povrede mozga i primene HBO tretmana. Voigt i saradnici (2008) su na modelu kontuzione povrede moždanog tkiva pacova, praćenjem veličine oštećenja pomoću magnetne rezonance, prikazali da čak i jedna HBO ekspozicija primenjena 60 minuta posle traume, može ispoljiti dugotrajne neuroprotektivne efekte. Stav koji važi za svaku terapijsku proceduru je da bi se postigli maksimalni efekti, neophodno je što pre započeti sa njenom primenom. Mnoge supstance mogu imati značajan doprinos u saniranju posledica moždane traume ako se primene neposredno posle njenog nastanka. Međutim, nerelano je očekivati da će pacijenti sa traumatskim povredama glave, prvenstveno zbog vitalne ugroženosti, biti u kratkom vremenskom periodu posle traume transportovani do odgovarajućeg centra za hiperbaričnu medicinu.

U literaturi se mogu naći nalazi poređenja efekata HBO terapije kada je ona primenjivana neposredno posle ishemije ili posle dužeg vremenskog perioda (Lou 2004, Weinstein 1987). Pokazano je da HBO terapija koja je primenjivana u kratkom vremenskom periodu posle ishemije, dovela do smanjenja obima infarkta i boljeg neurološkog stanja, odnosno očuvanja neuroloških funkcija (Lou 2004, Yin 2003, Calvert 2002, Badr 2001b, Mink 1995, Weinstein 1986). Lou i saradnici (2004) su u svom eksperimentu tretirali životinje hiperbaričnim kiseonikom tri sata, šest i dvanaest sati posle ishemijske povrede. Pokazali su da do poboljšanja neuroloških funkcija kod životinja dolazi kada se podvrgnu HBO terapiji u periodu od tri do šest sati posle ishemije.

Vođeni ovakvim nalazima, odlučili smo se da u našem istraživanju ispitamo da li će čak i relativno kasna primena hiperbarične oksigenacije imati pozitivne efekte. U skladu sa tim, odredili smo da pacovi budu izloženi hiperbaričnom kisoniku pet sati pošto je izvršena hirurška intervencija.

Jedan od najvažnijih ciljeva ovog istraživanja je bio da utvrdimo da li HBO može doprineti oporavku motornih funkcija posle traumatske povrede moždanog tkiva. Motorni deficiti koji prate moždanu traumu u humanoj populaciji predstavljaju jedan od najvećih problema, kako lični tako i socio ekonomski.

Pregledom literature našli smo da su Jadhav i saradnici (2008) na modelu hirurške povrede moždanog tkiva miša, pomoću testa prelaska preko "grede", pratili uticaj HBO predtretmana na oporavak motornih funkcija. Njihov zaključak je da HBO predtretman umnogome smanjuje neurološki deficit i doprinosi oporavku motornih funkcija.

Kako su prilikom testiranja senzomotorne integracije, sve životinje iz kontrolnih grupa K, KHBO, Š i ŠHBO stalno ostvarivale maksimalnu vrednost

kriterijuma, možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija ne utiče na lokomotornu sposobnost intaktnih pacova.

Prilikom analize rezultata testiranja snage stiska šape registrovanim u grupama Š i ŠHBO, samo u rezultatima ostvarenim trećeg dana israživanja smo uočili odstupanja u intenzitetu snage. Pošto je redukcija mišićne snage bila podjednaka kod oba ekstremiteta, u odnosu na ostale dane, smatramo da se to može protumačiti kao efekat rezidua anestetika u organizmu životinje. Uzevši u razmatranje i ostvarene rezultate u grupama intaktnih životinja (K i KHBO), možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija ne utiče na mišićnu snagu zdravih pacova.

Ono što predstavlja jedan od najvažijih nalaza našeg istraživanja je činjenica da HBO može doprineti oporavku motornih funkcija kod životinja koje su bile podvrgnute unilateralnoj ablaciji senzomotornog korteksa.

Iako su i životinje u grupi L postigle zavidan stepen oporavka senzomotorne integracije, njihovi rezultati su bili značajno lošiji u odnosu na rezultate ostvarene u grupi LHBO.

Kod životinja iz grupe L desetog dana posle operacije, registrovano je da su prilikom prelaska preko "grede" ostvarili značajan napredak, ali su rezultati životinje iz grupe LHBO bili bolji. Takođe, desetog dana testiranja prosečno registrovani intenzitet snage zadnje kontralateralne noge kod životinja iz grupe LHBO desetoga dana je bio viši u odnosu na životinja iz grupe L, a azlika između intenziteta snage zadnje kontralateralne i ipsilaterallne noge unutar grupe LHBO je bila manja nego unutar grupe L.

Stoga nalazi registrovani u grupi LHBO jasno ukazuju da HBO snažno podstiče oporavak senzomotorne integracije i motorne snage posle povrede moždanog tkiva. Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazima fundamentalnih i kliničkih istraživanja koje su sproveli Rockswold (2010), Wang (2010), Ma (2008), Zhang (2005), Rosenthal (2003), Veltkamp (2000) i njihovi saradnici.

U našem istraživanju nastojali smo da uvidimo i koji su mehanizmi uključeni u ostvarivanje neuroprotektivnih efekata hiperbarične oksigenacije.

Niz publikovanih nalaza, kako kliničkih tako i fundamentalnih istraživanja, ukazuju na činjenicu da se kao posledica moždane traume razvija i poremećaj mitohondrijalne aktivnosti u neuronima (Robertson 2010, Mazzeo 2009, Sullivan 2005, Xiong 2001). Mitohondrijalna insuficijencija dovodi do kolapsa aerobnog metabolizma i uvodi moždano tkivo u stanje oksidativnog stresa (Mustafa 2010). Dokazano je da oksidativni stres u moždanom tkivu, u postraumatskom periodu može značajno uticati na neuronalno preživljavanje (Niisuma 2009, Robertson 2004).

Oksidativni stres predstavlja disbalans između proizvodnje reaktivnih kiseoničnih radikala i sposobnosti bioloških mehanizama da ih detoksifikuju i da poprave oštećenja koja su nastala njihovom aktivnošću. Slobodni radikali su atomi ili molekuli koji imaju jedan nesporeni elektron, usled čega su vrlo nestabilni i reaktivni. U slobodne kiseonične radikale spadaju: superoksid (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HClO$), hidroksil ($HO\cdot$) i peroksinitrit ($ONOO^-$).

Slobodni kiseonični radikali u tkivima mogu reagovati sa mnogim makromolekulima, proteinima, lipidima, DNK-a i izazivati toksične efekte, narušiti integritet ćelijskih membrana, neadekvatno aktivirati ili pak inaktivirati enzimske sisteme (Karageuzyan 2005).

S druge strane, slobodni kiseonični radikali imaju i pozitivne uloge u organizmu. Pomažu imunskom sistemu u odbrani organizma od patogenih mikroorganizama (Prior 2009, Blumi 2008). U mnogim signalnim kaskadama, slobodni kiseonični radikali mogu biti molekularni glasnici (Calabrese 2007, Ushio-Fukai 2004, Fattman 2003).

Pokazano je da oksidativni stres ima ulogu u mnogim patofiziološkim procesima unutar ljudskog organizma poput: ateroskleroze, infarkta miokarda, Parkinsonove bolesti, Alzheimer-ove bolesti, epilepsije, kao i u mnogim psihijatrijskim stanjima poput bipolarnog poremećaja i shizofrenije (Gigante 2010, Harrison 2010, Jomova 2010, Waldbaum 2010, Barone 2010, De Rosa 2010, Tsang 2009, Fendri 2006, Madamanchi 2005, Berges 2003).

Mendez i saradnici (2004) su potvrdili da posle eksperimentalne traumatske povrede moždanog tkiva pacova dolazi do oksidativnog oštećenja DNK-a. Jorgensen i saradnici (1997) su ukazali da slobodni kiseonični radikali mogu usporiti sinaptičko remodelovanje kod eksperimentalne traumatske povrede mozga pacova. Pun i saradnici (2009) su potvrdili da posle traume CNS-a slobodni kiseonični radikali utiču na propustljivost krvno-moždane barijere. Azbill i saradnici (1997) su utvrdili da kod traumatskih povreda kičmene moždine dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija, koja je praćena oksidativnim stresom.

Posledice oksidativnog stresa su dozno zavisne i u stalnom konfliktu sa sposobnostima ćelija da prevaziđu nastali disbalans u redoks potencijalu i da ga vrate na početni fiziološki nivo. U fiziološkim uslovima male količine slobodnih kiseoničnih radikala nastaju kao sporedni produkti aerobnog metabolizma, ali šteta koju oni stvaraju na ćelijskom nivou se konstantno popravljaju. Međutim, kada dođe do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala u velikim količinama, prevazilaze se odbrambene sposobnosti organizma i dolazi do ubrzane razgradnje ATP-a, nemogućnosti kontrole apoptotičkih procesa i opšteg kolapsa ćelije (Karageuzyan 2005, Lelli 1998). Oštećenje genetskog materijala je jedna od najtežih posledica oksidativnog stresa po organizam (Tsutsiu 2008, Evans 2004). Izrazito visok nivo oksidativnog stresa izaziva ćelijsku smrt, ali čak i manji intenzitet može započeti apoptozu (Valko 2005).

Mnogi mehanizmi unutar organizma učestvuju u odbrani i sanaciji posledica oksidativnog stresa.

Merenje stepena aktivnosti enzimskih familija koje učestvuju u procesu odbrane organizma od oksidativnog stresa je jedan od najboljih načina da se uvidi stepen vitalnosti ugroženog tkiva, odnosno celokupnog organizma.

Familija enzima superoksid dismutaza (SOD) predstavlja jednu od najvažnijih karika u lancu odbrane od oksidativnog stresa (McCord 1988). SOD katalizuje reakciju dismutacije superoksida ($O_2^{\cdot-}$) u kiseonik i vodonik peroksid. Superoksid spada među najagresivnije slobodne kiseonične radikale, koji dovodi do stvaranja drugih, podjednako štetnih slobodnih radikala poput peroksinitrita (Rush 2005). Samim tim značaj SOD-u u odbrani od oksidativnog stresa je veći. Pored navedenih aktivnosti, potvrđeno je da ekstracelularna SOD ima uticaja na regulaciju protoka krvi kroz moždano tkivo (Demchenko 2008).

Druga enzimska familija, koja ima važnu ulogu u odbrani organizma od oksidativnog stresa ja familija glutacion peroksidaza (GPX) (Epp 1983). GPX redukuje lipidne hidroperoksidge u odgovarajuće alkohole i redukuje slobodni vodonik peroksid u vodu.

Jedan od načina da se proceni koliki je stepena oštećenja koje je nastupio u organizmu kao posledica dejstva slobodnih kiseoničnih radikala je merenje koncentracije malondialdehida (MDA) (Yin 2005). Malondialdehid je reaktivni produkt tiobarbituratne kiseline, koji nastaje tokom peroksidacije polisaturisanih masnih kiselina. Superoksid i hidroksilni radikal iniciraju peroksidaciju lipida koji ulaze u sastav plazma membrana, mitohondrija, jedra i endoplazmatskog retikuluma. Posledice peroksidacije lipida su gubitak višestruko nezasićenih masnih kiselina u membranama uz promenu njihove propustljivosti, promenjen jonski transport, oslobađanje sadržaja ćelijskih organela i stvaranje citotoksičnih metabolita lipidnih peroksidge (alkanala, alkenala i alkana). Ova jedinjenja stvaraju Šifove baze sa amino grupama, reaguju sa tiol grupama, inaktiviraju enzime i imaju mutagena svojstva (Marnett 1999).

Poznato je da primena 100% molekuskog kiseonika u hiperbaričnim uslovima može da uzrokuje pojavu slobodnih kiseoničnih radikala (Thom 2009). Međutim, upravo na taj način HBO pomaže organizmu u odbrani od patogenih mikroorganizma, podstiče neovaskularizaciju i zarastanje rana (Hopf 2004, Wilkinson 2004, Lahat 1995). Opravdana je bojazan da slobodni kiseonički radikali mogu prouzrokovati i štetne efekte tokom HBO terapije. Potvrđeno je da od trajanja pojedinačne ekspozicije i ukupnog broja tretmana zavisi kako će HBO uticati na oksidativni status organizma (Benedetti 2004).

Ozden i saradnici (2004) su ukazali da HBO može povoljno uticati na oksidativni status u patofiziološkim stanjima. Kod pacova kojima je izvršena parcijalna hepatektomija, utvrdili su da intenzivan HBO protokol može da smanji koncentraciju MDA a ujedno poveća aktivnosti SOD i GPX u preostalom tkivu jetre.

Mora se imati na umu da je zbog visokog stepena potrošnje kiseonika i velikog protoka krvi, kao i činjenice da je moždano tkivo mahom sačinjeno od lipida, prilikom primene 100% kiseonika u hiperbaričnim uslovima, mozak pogodno tlo na kome može doći do razvoja negativnih posledica oksidativnog stresa. U svojim istraživanjima Korkomaz (2007) i Other (2005) sa saradnicima su potvrdili da u kortikalnom tkivu pacova stepen aktivnosti enzimskih mehanizama uključenih u odbranu organizma od dejstva slobodnih kiseoničnih radikala, kao i stepena oksidativnog oštećenja zavise od trajanja ekspozicije i primenjenog pritiska prilikom HBO ekspozicije. Njihova preporuka je da pri izlaganju organizma dejstvu 100% kiseonika, u cilju izbegavanja razvoja oksidativnog oštećenja CNS-a, treba primeniti HBO protokol sa vrednostima pritiska nižim od 3 ATA.

Ay i saradnici (2007) su utvrdili da dvočasovno izlaganje pacova 100% kiseoniku pod pritiskom od 3 ATA, utiče na koncentraciju MDA i aktivnost SOD i GPX u kortikalnom tkivu pacova. Našli su da su vrednosti svih parametara 30 minuta posle HBO ekspozicije povišene, a 60 minuta posle HBO

ekspozicije uočili su da su povišene samo vrednosti SOD i GPX. U grupi životinja kod kojih su parametri mereni 120 minuta posle HBO ekspozicije, vrednosti su bile u okviru onih koje su izmerene kod kontrolnih životinja, pacova koji nisu izlagani HBO uslovima. Njihov zaključak je da jedna ekspozicija 100% kiseoniku u HBO uslovima ima kratkotrajan efekat na oksidativan status u kortikalnom tkivu velikog mozga pacova.

Wada i saradnici (2000, 2001) su pokazali da pretretman hiperbaričnom oksigenacijom povećava toleranciju na ishemiju u moždanom tkivu pacova, putem podsticanja aktivnosti enzimskih mehanizma uključenih u antioksidativne procese. Mrsić-Pelčić i saradnici (2004) su kod eksperimentalne ishemije mozga pacova ukazali da primena hiperbarične oksigenacije, u postishemijskom periodu doprinosi očuvanju funkcije $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATP-aza}$ i intenzivira aktivnost SOD. Li i saradnici (2008) su ukazali da kod pacova primena HBO pre eksperimentalne moždane ishemije može smanjiti stopu smrtnosti, doprineti neurološkom oporavku, smanjiti koncentraciju MDA i intenzivirati aktivnost SOD.

Nalazi mnogih istraživanja ukazuju da HBO može imati pozitivan uticaj na očuvanje oksidativnog statusa posle traumatske povrede CNS-a. Palzur i saradnici (2008) su utvrdili da primena hiperbarične oksigenacije posle traumatske povrede moždanog tkiva pacova, doprinosi očuvanju mitohondrijalnih membrana a samim tim i oksidativnih procesa u ovim organelama. Takođe su potvrdili da HBO inhibitorno deluje na mitohondrijalne apoptotičke puteve.

Daugherty i saradnici (2004) su potvrdili da hiperbarična oksigenacija kod pacova posle perkusione povrede CNS-a, osim što poboljšava oksigenaciju moždanog tkiva, podstiče i funkcionalni oporavak mitohondrija u CNS-u. Zhou i saradnici (2007) su u svom istraživanju takođe utvrdili da primena HBO kod pacova posle perkusione povrede CNS-a, podstiče funkcionalni oporavak mitohondrija u CNS-u. Međutim, oni nisu uočili značajne promene u

porocesima stvaranja peroksida. Najvažniji nalaz njihovog istraživanja je da primena HBO smanjuje gubitak neurona u hipokampusu i poboljšava oporavak kognitivnih funkcija pacova posle moždane traume.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da HBO utiče na aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPX) kako u intaktnom tako i u traumatizovanom moždanom tkivu.

Registrovali smo postojanje različitog stepena aktivnosti GPX u uzorcima tkiva iz grupa K, KHBO, Š i ŠHBO. U grupama Š i ŠHBO stepen aktivnosti GPX je bio veći u odnosu na grupe K i KHBO. Ovaj nalaz nam ukazuje da je hirurška procedura kojoj su životinje iz ovih grupa bile podvrgnute, iako nije narušila integritet moždanog tkiva, imala uticaj na oksidativni status CNS-a. Ovaj nalaz možemo protumačiti i kao posledice neželjenih dejstava anestetika na nivou nervnoga tkiva.

Registrovan je viši stepen aktivnosti GPX u grupama koje su prošle kroz HBO protokol, KHBO i ŠHBO u odnosu na odgovarajuće vrednosti u grupama koje nisu bile izložene hiperbaričnom kiseoniku K i Š. Ovi rezultati nam ukazuju da HBO podstiče aktivnost GPX u intaktnom moždanom tkivu pacova.

Sukciona ablacija senzomotornog korteksa koja je izvršena na životinjama iz grupa L i LHBO povećala je stepen aktivnosti GPX. Interesantno je da nismo našli statistički značajnu razliku između nivoa aktivnosti GPX u grupama L i ŠHBO.

Nivo aktivnosti GPX u grupi LHBO je bio najviši u odnosu na sve ostale grupe. U grupi LHBO smo registrovali da je stepen aktivnosti GPX u uzorcima moždanog tkiva iz kontralateralne hemisfere viši u odnosu na uzorke iz ipsilateralnu hemisfere.

Razultati našeg istraživanja ukazuju da HBO utiče i na ukupnu aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u moždanom tkivu.

Registrovano je da je u uzorcima tkiva ipsilateralne hemisfere ukupna aktivnost SOD veća u grupama koje su prošle kroz HBO protokol (KHBO i ŠHBO) u odnosu na komplementarne grupe koje nisu bile izložene hiperbaričnom kiseoniku (K i Š), mada te razlike nisu bile statistički značajne.

Međutim u grupi L registrovan je značajno niži stepen aktivnosti ovog enzima. Najvažniji nalaz je da HBO tretman povećao ukupnu aktivnost SOD u uzorcima moždanog tkiva iz ipsilateralne-povređene hemisfere (LHBO) u odnosu vrednosti registrovane u grupi L.

Na osnovu ovih nalaza možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija pomaže u odbrani moždanog tkiva od dejstva slobodnih kiseoničkih radikala, podsticanjem aktivnosti enzimskih mehanizama GPX i SOD. Rezultati nešeg istraživanja su u saglasnosti sa nalazima drugih autora (Palzur 2008, Li 2008, Ay 2007, Mrsić-Pelčić 2004, Wada 2001).

Analizom registrovanih nivoa koncentracije malondialdehida (MDA), uočili smo da HBO utiče na stepen lipidne peroksidacije moždanog tkiva.

U grupama životinja koje nisu bile podvrgnute hirurškoj proceduri (K i KHBO), registrovali smo izuzetno niske vrednosti koncentracije MDA u moždanom tkivu. Interesantno je da su niže vrednosti registrovane u grupi intaktnih životinja (KHBO) koje su prošle kroz HBO protokol, ali da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuće vrednosti iz kontrolne grupe (K).

Na osnovu rezultata registrovanih u grupama Š i ŠHBO, možemo zaključiti da sama hirurška procedura iako nije dovela do narušavanja integriteta moždanog tkiva, prevashodno anestezija, ima uticaj na oksidativni status i produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u moždanom tkivu. Registrovane vrednosti koncentracije MDA u grupama lažno operisanih životinja (Š i ŠHBO) su bile značajno više u odnosu na vrednosti izmerene kod intaktnih životinja (K i KHBO).

Bilo je sasvim izvesno da će ablacija senzomotornog korteksa intenzivirati lipidnu peroksidaciju u moždanom tkivu. Tako da nas nije iznenadilo to što su najviše koncentracije MDA u uzorcima moždanog tkiva registrovane u grupama L i LHBO. Međutim, značajan nalaz predstavlja postojanje statistički značajne razlike u nivou koncentracije MDA u uzorcima moždanog tkiva iz grupa L i LHBO. Koncentracija MDA je kod životinja koje su bile izložene hiperbaričnom kiseoniku (LHBO) bila značajno niža u odnosu na životinje čiji je oporavak posle hirurške operacije protekao bez intervencija (L).

Činjenica da nismo našli statistički značajan nivo razlike u koncentraciji MDA u uzorcima seruma iz grupa K i Š, ukazuje da hirurška procedura, bez narušavanja integriteta moždanog tkiva, ipak ima samo lokalni efekat i da utiče na stepen lipidne peroksidacije samo na nivou moždanog tkiva.

Značajno viši nivo koncentracije MDA u uzorcima seruma iz grupe KHBO u odnosu na grupe K i Š, ukazuje da hiperbarična oksigenacija na nivou celoga organizma uzrokuje stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala i da njihova aktivnost dovodi do lipidne peroksidacije na nivou celoga organizma. Međutim, nivo koncentracije MDA u uzorcima seruma iz grupe KHBO je bio značajno niži u odnosu na vrednosti registrovane u grupama ŠHBO, L i LHBO. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nalazima drugih autora koji ukazuju da u patofiziološkim stanjima hiperbarična oksigenacija može smanjiti stepen lipidne peroksidacije (Li 2008, Kudchodkar 2007, Ozden 2004)

Najznačajniji nalaz je da smo u LHBO grupi registrovali statistički značajano smanjenje koncentracije MDA u odnosu na L grupu.

Postojanje korelacija između koncentracije MDA u uzorcima moždanog tkiva hemisfere koja je bila podvrgnuta hirurškoj proceduri i koncentracije MDA u uzorcima seruma je izuzetno značajan nalaz. Dalja istraživanja će utvrditi da li se nivo MDA u serumu može koristiti kao validan pokazatelj za praćenje stepena lipidne peroksidacije u traumatizovanom moždanom tkivu.

Na osnovu prethodnih saznanja, prilikom dizajniranja našeg istraživanja pretpostavili smo da HBO na nivou CNS-a ne utiče samo na funkcije neurona, već i na potporne i imune ćelije moždanog tkiva. Pretpostavili smo da će hiperbarična oksigenacija ne samo dovesti do stvaranja povoljnijih uslova za oporavak i preživljavanje neurona, već i da će uticati na funkciju glijalnih ćelija u centralnom nervnom sistemu.

Kod čoveka kao i kod drugih kičmenjaka, centralni nervni sistem ima ograničene mogućnosti samoreparacije. Treba imati u vidu da regenerativna sposobnost aksona CNS-a sa starenjem slabi, pa je i mali stepen inhibicije dovoljan da spreči regeneraciju (Fawcett 2009). Mehanička trauma dovodi do destrukcije nervnih i glijalnih ćelija i njihovih veza, narušavanja krvno-moždane barijere i prolaska komponenti krvi na mesto povrede. Mikrosredina oko povrede sadrži proteine plazme, krvne pločice, eikozanoide, biološki aktivne peptide, produkte razgradnje mijelina, slobodne kiseonične radikale, purinske nuleozide i nukleotide i druge molekule koji mogu aktivirati astrocite i/ili funkcionisati kao trofički faktori za makrofage i mikrogliju (Sofroniew 2010, Sofroniew 2009, Ridet 1997, McMillian 1994).

Posle povrede dolazi do procesa degradacije tkiva, ali i procesa reaktivne astroglioze, kolateralnog izrastanja neurita, kao i sinaptičkog remodelovanja.

Svi ovi procesi se odigravaju kako na samom mestu povrede, tako i u strukturama koje su funkcionalno i stuktorno povezane. Većina glijalnih ožiljaka su sagrađeni od tesno isprepletanih astrocitnih nastavaka povezanih pukotinastim vezama i okruženih ekstraćelijskim matriksom (Hamby 2010, Fawcett 2006, Reier 1988, Eng 1987), tako da se svaka regeneracija odvija u sredini ispunjenoj astrocitima.

Procesi koji utiču na hipertrofiju i hiperplaziju astrocita u glijalnom ožiljku su pogodna mesta za terapijske intervencije, koje bi poboljšale preživljavanje neurona i potpomogle ponovno izrastanje neurita.

Među važne ciljeve rada mnogih laboratorija spada i pronalaženje novih terapijskih pristupa u cilju sprečavanja nastanka glijalnog ožiljka i omogućavanja oporavka funkcija posle povrede CNS-a. Reaktivni astrociti grade glijalni ožiljak koji je glavna prepreka za regeneraciju aksona u CNS-u. Brojni *in vivo* i *in vitro* eksperimenti su pokazali da ovo ožiljno tkivo deluje ekstremno inhibitorno na regeneraciju aksona (Hamby 2010, Sofroniew 2009, Fawcett 2006, Ridet 1997). S druge strane u nekim *in vivo* eksperimentima aksoni su bili sposobni da se regenerišu na astrocitnim nastavcima (Kawaja 1991).

Jedan od aspekata ovog istraživanja je bio da se putem imunohistohemijskih analiza ispita uticaj hiperbarične oksigenacije posle ablacije desne senzomotorne kore pacova Wistar soja, na promene u ekspresiji glijalnih i neuronalnih markera u povređenom tkivu.

Reaktivna astroglioza je praćena pomoću antitela na GFAP, za koje se zna da se pojačano eksprimira posle povrede. Imunohistohemijsko bojenje je pokazalo prisustvo intermedijernih filamenata GFAP-a u reaktivnim astrocitima posle povrede. Svi astrociti koji se nalaze oko mesta povrede su GFAP pozitivni. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima drugih autora (Schiffer 1993, Calvo 1991, Schiffer 1986, Takamiya 1988).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je reaktivna astroglioza smanjena posle primene HBO terapije kod operisanih pacova. Astrociti u grupi LHBO se odlikuju manjim ćelijskim telom i dužim, tanjim nastavcima koji su mnogo manje razgranati nego u grupi L. Po svom morfološkom izgledu ovi asrociti su sličniji astrocitima iz kontrolnih grupa K, KH, Š i ŠHBO i nalaze se u mnogo manjem broju i to samo u uskom pojasu oko mesta povrede. Može se reći da je HBO terapija posle ablacije senzomotorne kore dovela do značajnog smanjenja procesa reaktivne astroglioze i sprečila formiranje glijalnog ožiljka.

Kod povrede mozga adulta mikroglia ima predominantnu ulogu u odgovoru na ćelijsku smrt indukovanu povredom. Smatra se da aktivirani astrociti produkuju veliki broj neurotrofičkih faktora, koji mogu da pomognu preživljavanju neurona, dok mikroglia aktivirana posle povrede izlučuje mnoge neurotoksične faktore, uključujući i slobodne kiseonične radikale (Jorgensen 1997).

U ovom istraživanju pokazano je da je nivo ED-1, specifičnog markera aktivirane mikroglie/makrofaga, smanjen kod životinja koje su posle operativne procedure prošle kroz HBO protokol (LHBO) u odnosu na životinje koje su samo operisane (L). U grupi LHBO uočavaju se kratki i razgranati nastavci mikroglialnih ćelija oko mesta povrede, za razliku od aktivirane i veoma krupne mikroglie koja je prisutna na presecima mozga pacova iz grupe L. Novija istraživanja takođe ukazuju na supresiju mikroglie pod dejstvom HBO terapije u animalnom modelu cerebralne ishemije (Gunter 2005). Po ovim autorima, upravo ovo smanjenje mikroglialnih ćelija u infarktnom regionu posle ranog tretmana hiperbaričnim kiseonikom, predstavlja osnovu zapaženog poboljšanja.

Imunohistohemijska analiza sa antitelima koja beleže fosforilisane neurofilamente je pokazala da posle HBO terapije dolazi do slabijeg obeležavanja neurita, kao i tela neurona oko mesta povrede (LHBO), nego što je to uočeno kod životinja koje su samo operisane (L).

U mozgu pacova koji predstavljaju fiziološku kontrolu nefosforilisani neurofilamenti se nalaze u telima neurona i dendritima, dok aksoni uglavnom sadrže fosforilisane neurofilamente. Primenom primarnog antitela na SMI31 je pokazano da neurofilamenti u toku razvića, osim u izgradnji citoskeleta mogu imati ulogu u procesima maturacije aksona i dendrita (Hynes 2005, Ang 1995).

U pafiziološkim uslovima, imunološka reakcija je najintenzivnija u telu nervnih ćelija (Hugon 1990), što je potvrđeno i našim rezultatima. Ovi nalazi ukazuju na činjenicu da se na mestu povrede i degenerativni i regenerativni procesi odigravaju u isto vreme.

Kod pacova kojima je sukcionom ablacijom uklonjen desni senzomotroni korteks i koji su prošli kroz desetodnevni HBO protokol, uočena je smanjena imunoreakcija na SMI31, odnosno slabije bojenje fosforilisanih oblika neurofilamenata.

Imunocitohemijska reakcija na SMI31 je pojačana na presecima mozga pacova koji su se posle operacije oporavljali bez ikakvih intervencija (L), naročito oko mesta povrede. Na presecima mozga pacova kod kojih je posle povrede primenjena HBO terapija (LHBO) imunocitohemijsko bojenje fosforilisanih oblika neurofilamenata je bilo slabije. Takođe se uočava i smanjenje broja neurona koji ulaze u proces Valerian degeneracije, koji će dovesti do njihovog propadanja i smrti, što sve zajedno ukazuje na neuroprotektivni efekat HBO terapije.

Ovi nalazi ukazuju da putem neuroprotekcije HBO terapija potpomaže neurobihejvioralni funkcionalni oporavak posle povrede.

MAP2 predstavlja najvažniji asociirani protein u moždanom tkivu. Ma i saradnici (2008) su na modelu ishemijske povrede moždanog tkiva pacova uočili da HBO pojačava imunoreaktivnost na MAP2. Njihov zaključak je da to predstavlja pokazatelj da HBO podstiče neuralnu plastičnost i omogućava brži oporavak motornih puteva kod eksperimentalnih životinja.

GAP43 spada u grupu membranskih proteina, koji učestvuju u regulaciji metaboličkih puteva koji su uključeni u procese mebranskog remodelovanja i izrastanja neurita (Hulsebosch 1998) i ima važnu ulogu u procesu regeneracije aksona oštećenih neurona, te se smatra za proteinski marker rasta i neuralne plastičnosti (Dijk 2007).

U saglasnosti sa tim činjenicama, mi smo primetili intenzivno bojenje neurona na GAP43 u kortikalnim zonama oko povrede. Posebno je interesanto što je u većini neurona došlo do nakupljanja imunoreaktivnosti na GAP43 u samo određenom delu tela neurona, što odgovara formiranju struktura konusa rasta usmerenih ka mestu povrede. Međutim, u neposrednoj zoni oko mesta povrede uočeno je samo slabo prisustvo imunoreaktivnosti na GAP43 i to u oštećenim-otečenim neuronima. Imunoreaktivnost na GAP43 kod oštećenih-otečenih neurona čije su veze prekinute je uočio i Christman (1997) u svom istraživanju.

U okolini povrede primetno je pojačano bojenje na GAP43 u ćelijama koje izgledaju kao reaktivni astrociti, što ukazuje na činjenicu da se posle povrede moždanog tkiva ekspresija ovog proteina ne odvija isključivo na neuronima. Yamada i saradnici (1994) su uočili slično ispoljavanje imunoreaktivnosti na GAP43 u astrocitima koji okružuju infarktenu zonu, kod njihovog modela ishemijske povrede CNS-a adultnih pacova.

Nalazi drugih autora takođe sugerišu da je ekspresija GAP43 prisutna i u kortikalnim astrocitima, makrofagima i oligodendrocitima (Vitkovic 1988, Cunha 1990, Moretto 1995). Prisustvo GAP43 je bilo izraženo kod ćelija na kojima su se odvijali procesi grananja, koji su karakteristični za reaktivne astrocite i aktivnu mikrogliju/makrofage (Cunha 1990).

Bliska prostorna povezanost između GAP43 i strukturnih molekula citoskeleta ukazuje na njegovu ulogu u kontroli ćelijskog oblika, pokretljivosti i adhezionih procesa (Moretto 1995). Primetno je odsutvo publikovanih rezultata koji bi ukazali na efekte hiperbarične oksigenacije na ekspresiju GAP 43. Samim tim naši nalazi da HBO intenzivira GAP43 imunoreaktivnosti u kortikalnim zonama u okolini povrede, a naročito u subkortikalnoj beloј masi, dobijaju na značaju. Smatramo da je važno istaći da smo duž oboda povrede uočili intenzivno bojenje nervnih vlakana na GAP 43.

Na osnovu nalaza da HBO, intenzivira ekspresiju GAP43 i MAP2, možemo pretpostaviti da u suštini HBO promoviše rast aksona i grananje dendrita u cilju stvaranja novih neuronskih veza i ponovnog uspostavljanja prekinutih neuronskih krugova, čime dolazi do smanjenja motornog deficta koji je nastupio posle povrede. Naši nalazi su u saglasnosti sa nalazima Hulsebosch i njegovih saradnika (1998) koji su našli da je porast intenziteta bojenja preparata na GAP43 u kortikalnim zonama odgovornim za kontrolu motornih aktivnosti prednjih i zadnjih šapa u korelaciji sa stepenom oporavka motornih funkcija prednjih i zadnjih šapa, posle perkusione povrede moždanog tkiva adultnih pacova.

Protein sinaptofizin (SYP) je prisutan u mnogim zonama unutar neurona a najzastupljeniji je integralni protein membrana sinaptičkih vezikula (Wiedenmann 1985) i koristi se kao funkcionalni molekularni marker sinapsi (Hall 2010, Shojo 2006, Masliah 1991). U skladu sa navedenim činjenicama mi smo ispitivali efekte hiperbarične oksigenacije na procese sinaptogeneze posle sukcionne ablacije desnog senzomotornog korteksa.

Naši nalazi ukazuju da HBO značajno intenzivira imunohistohemijsko bojenje na SYP aksona u kortikalnim zonama i u beloju moždanoj masi, kako kod intaktnih životinja iz grupe KHBO, tako i kod životinja koje su prošle operacionu proceduru, ali bez narušavanja integriteta moždanog tkiva grupa ŠHBO. Imunoreaktivnost na SYP je bila koncentrisana u grozdovima unutar neuronskih tela, apikalnim zonama dendrita, kao i duž aksona.

Elektronskom mikroskopijom Bergman i njegovi saradnici (1997), su identifikovali da do intenzivnog sakupljanja imunoreaktivnosti na SYP dolazi u zonama nervnih završetaka dendrta.

Na osnovu iznetih nalaza, možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija podstiče formiranje novh sinapsi, posle traumatske povrede kortikalnog tkiva.

Kod životinja koje su se posle sukciono ablacije oporavljale bez intervencija (L) uočena je pojačana imunoreaktivnost na SYP u uskom krugu oko mesta povrede, dok je u širim zonama povređenog korteksa bila difuzno zrnasto zastupljena, mahom ograničavajući tela neurona. Ovakvi nalazi su u korelaciji da obrascima imunoreaktivnosti koje su uočili drugi autori kod različitih modela traumatske povrede moždanog tkiva (Hall 2010, Shojo 2006, Bergmann 1997). Takođe smo uočili da na obodima mesta povrede, dolazi do akumulacije bojenja na SYP u oštećenim - otečenim neuronima, kao i u neuronima u podmaklim stadijumima degeneracije.

Shojo i njegovi saradnici (2006) su uočili da, nakupljanja imunoreaktivnosti na SYP nije praćeno povećanjem količine SYP na mestu povrede. Njihovo objašnjenje ovog fenomena je da usled disfunkcije sinapsi i prekinutih inter neuralnih veza na mestu povrede dolazi do sakupljanja SYP iz degenerisanih neuronskih tela. Za razliku od njihovih nalaza, mi smo u okviru subkortikalne bele mase uočili redukciju imunoreaktivnosti na SYP. Ovakvo nepodudaranje možemo objasniti različitim eksperimentalnim modelima traumatske povrede, kao i činjenicom da od intenziteta traume zavisi i stepen indukovano neurorestorativnog odgovora (Thompson 2006).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da posle povrede HBO povećava imunoreaktivnost na SYP, kako u aksonima unutar bele subkortikalne mase, tako i duž celog povređenog korteksa. Chen i saradnici (2010) su na modelu hipoksijske - ishemijske povrede takođe uočili hiperbaričnom oksigenacijom indukovano pojačanje ekspresije SYP. Njihovi zaključci su da među neuroprotektivne efekte HBO spadaju podsticanje sinaptičke plastičnosti i smanjenje stepena ultrastrukturnih oštećenja neurona.

Mnogi autori dovode u pitanje da li porast neuroplastične adaptabilnosti doprinosi i funkcionalnom oporavku. Oni navode da formiranje novih sinapsi i pratećih novih neuronskih krugova može biti odgovorno za funkcionalne deficite koji prate mnoge neurološke poremećaje i da mogu doprineti razvoju

post-traumatskih epilepsija (Hall 2010, Chuckowee 2004). Tokom našeg istraživanja u svim fazama postoperacionih ispitivanja, ni kod jedne životinje nisu uočena epileptička paroksizmalna pražnjenja, iako je dokumentovano da primena molekuskog kiseonika pod hiperbaričnim uslovima može indukovati pojavu istih. Rezultati našeg istraživanja jasno ukazuju da formiranje novih sinapsi dovodi do poboljšanja lokomotornih sposobnosti.

Najznačajniji nalaz našeg istraživanja je da hiperbarična oksigenacija stvara pogodno tlo za oporavak i preživljavanje neurona posle povrede moždanog tkiva.

Mali broj istraživanja se bavio praćenjima efekta primene hiperbarične oksigenacije na procese apoptoze u patofiziološkim stanjima na nivou centralnog nervnog sistema. Calvert i saradnici (2003) su zaključili da kod neonatalnih pacova, posle ishemijsko reperfuzivne povrede CNS-a, primena HBO ostvaruje neuroprotektivni efekat putem redukcije apoptoze. Li i saradnici (2009) su takođe na modelu ishemijsko reperfuzivne povrede CNS-a, prikazali da HBO inhibira mitohondrijalne apoptotičke puteve kod pacova. Lou i saradnici (2006) su na modelu fokalne cerebralne ishemije, pokazali da rana primena HBO dovodi do inhibicije apoptoze u zonama u okolini povrede. Ostrowski i saradnici (2008) su ukazali da i predtretman sa HBO može imati neuroprotektivni efekat kod pacova i smanjiti neuronalnu apoptozu izazvanu globalnom cerebralnom ishemijom. Peng i saradnici (2009) su opisali da rana primena HBO posle ishemije, može poboljšati oporavak kognitivnih funkcija pacova, putem smanjenja stepena neuronalne apoptoze.

Voldavski i saradnici (2005) su prikazali da primena hiperbarične oksigenacije, posle kontuzione povrede CNS-a, kod pacova pojačava ekspresiju anti-apoptotskih proteina. Wang i saradnici (2010) su ukazali da je za inhibiciju procesa apoptoze u moždanom tkivu, posle mehaničke traume, presudan vremenski okvir u kome će se primeniti HBO.

Rezultati bojenja krezil violetom nam ukazuje da HBO tretman nije smanjio gubitak neurona u užem regionu oko povrede, niti u širem regionu oko povrede u grupi LHBO.

Na osnovu nalaza, bojenja preparata sa fluoro žadom B, markerom degenerisanih neurona i NeuN markerom neuronalnih tela, možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija usporava procese neurodegeneracije. Broj zdravih neurona na presecima mozga životinja iz grupe LHBO je mnogo veći u odnosu na grupu L. Kod neurona oko mesta povrede u grupi L, zapaža se da u jedru dolazi do formiranja apoptotskih tela. Međutim, najveći broj neurona kod LHBO grupe ima lepa zdrava jedra u kojima se jasno vidi jedarce. Ovi rezultati nam ukazuju da je posle HBO proces apoptoze sveden na najmanju meru. Što znači da je hiperbarična oksigenacija sprečila pojavu sekundarne degeneracije neurona. Dobijeni rezultati su i pored činjenice da su u primenjivani različiti eksperimentalni modeli i terapijski protokoli, u saglasnosti sa nalazima drugih autora (Wang 2010, Peng 2009, Ostrowski 2008, Lou 2006, Voldavski 2005, Calvert 2003, Yin 2003).

6. ZAKLJUČAK

Posle analize svih dobijenih rezultata našeg istraživanja i njihovog poređenje sa dosada publikovanim rezultatima iz ove oblasti od strane drugih istraživača, možemo zaključiti da hiperbarična oksigenacija posle jednostrane ablacije desnog senzomotornog korteksa mozga pacova Wistar soja:

- Ubrzava oporavak senzomotorne integracije i lokomotornih funkcija, kao i oporavak mišićne snage, što se može zaključiti na osnovu uspešnijih rezultata bihevioralnih testiranja u grupi LHBO.
- Stabilizuje oksidativni status u postraumatskom periodu. Smanjuje nivo koncentracije malondialdehida (MDA) u moždanom tkivu. Intenzivira enzimsku aktivnost glutation peroksidaze (GPX) i superoksid dismutaze (SOD).
- Smanjuje proces reaktivne astroglioze i sprečava formiranje glijalnog ožiljka, što se manifestuje smanjenom ekspresijom GFAP-a koji predstavlja osnovni marker aktiviranih astrocita. Posle HBO terapije astrociti se karakterišu mnogo manjim ćelijskim telom sa tanjim, dužim i manje razgranatim nastavcima, slične morfologije kao kod fiziološke kontrole, odnosno kao kod intaktnih pacova podvrgnutih HBO terapiji.
- Smanjuje ekspresiju ED-1, markera reaktivne mikroglije/makrofaga, što ukazuje na smanjeni broj aktivirane mikroglije/makrofaga oko mesta povrede, dovodi do pojave mirujuće forme mikroglije koja je karakteristika fiziološkog stanja mozga.
- Potpomaže neuronalnu plastičnost, u postraumatskom periodu, putem podsticanja izrastanja neurita, formiranja novih funkcionalnih sinapsi i uspostavljanja novih veza između očuvanih neurona, što potkrepljuje pojačana ekspresija GAP 43, MAP2 i SYP.

- Sprečava dalju progresiju neuronalnog oštećenja, što je pokazano veoma slabom imunohistohemijskom reakcijom na SMI31, osnovnog markera fosforilisanih neurofilamenata, kao i značajno manjim brojem neurona koji podležu Valerijan degeneraciji.
- Rezultati bojenja sa krezil violetom, fluoro žadom i NeuN ukazuju da je posle HBO broj zdravih neurona mnogo veći, a procesi neurodegeneracije i apoptoze svedeni na najmanju meru.

Na osnovu dobijenih rezultata opšti zaključak je da hiperbarična oksigenacija dovodi do smanjenja oštećenja mozga tako što sprečava pojavu reaktivne astroglioze, formiranje glijalnog ožiljka, smanjuje inflamatorni odgovor i stepen neuronalne degeneracije, stabilizuje oksidativni status u moždanom tkivu, podstiče neuralnu plastičnost i stvaranje novih interneuralnih veza, čime potpomaže funkcionalni oporavak.

Rezultati ovog eksperimentalnog istraživanja na životinjama ukazuju na mogućnost primene hiperbarične oksigenacije, kao terapijskog metoda u ranim fazama sanacije, kod pacijenata sa traumatskim povredama centralnog nervnog sistema.

Naše mišljenje je da će terapija hiperbaričnim kiseonikom u sinergističkom dejstvu sa standardnim terapijama doprineti razvoju novih strategija lečenja pacijenata ne samo sa traumatskim povredama mozga, već i pacijenata sa cerebrovaskularnim insultom i pacijenata kod kojih su izvršeni operativni zahvati u nivou centralnog nervnog sistema.

7. LITERATURA:

Abnet K, Fawcett JW, Dunnett SB. Interactions between meningeal cells and astrocytes in vivo and in vitro. *Dev. Brain Res.* 199;53:187-96.

Abidia A, Laden G, Kuhan G, et al. The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomised-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25(6):513-8.

Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp Med.* 2004;207:3171-88.

Adamides AA, Winter CD, Lewis PM, et al. Current controversies in the management of patients with severe traumatic brain injury. *ANZ J Surg.* 2006;76(3):163-74.

Afshari FT, Kappagantula S, Fawcett JW. Extrinsic and intrinsic factors controlling axonal regeneration after spinal cord injury. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:37.

Amin HM, Kaniewski WS, Cohen D, et al. Effects of acute exposure to hyperbaric oxygen on the rheology and morphology of the red blood cells in the rat. *Microvasc Res.* 1995;50(3):417-28.

Ang LC, Munoz DG, Shul D, George DH. SMI-32 immunoreactivity in human striate cortex during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991;61(1):103-9.

Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999;77(9):699-706.

Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JO, eds. *The macrophage.* Oxford: Oxford University Press. 1992;1-57.

Ay H, Topal T, Ozler M, et al. Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue. *Life Sci.* 2007;80(22):2025-9.

Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, et al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 1997;765(2):283-90.

Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, et al. Effect of hyperbaric oxygen on striatal metabolites: A microdialysis study in awake freely moving rats after MCA occlusion. *Brain Res.* 2001a; 916:85-90.

Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH. Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001b;280(3):R766-70.

Bandtlow C, Zachleder T, Schwab ME. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci.* 1990;10:3837-48.

- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci.* 2004;7:269-77.
- Balentine JD. Selective vulnerability of the central nervous system to hyperbaric oxygen. *Adv Exp Med Biol.* 1973;37A:293-8.
- Barone E, Cenini G, Di Domenico F, et al. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: A novel mechanism of action. *Pharmacol Res.* 2011;63:172-50.
- Bevers RF, Bakker DJ, Kurth KH. Hyperbaric oxygen treatment for haemorrhagic radiation cystitis. *Lancet.* 23 1995;346(8978):803-5.
- Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;30(2):107-34.
- Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia.* 2000;29(4):293-304.
- Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem.* 2004;37(4):312-7.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 1997;20(2):84-91.
- Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, et al. Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. *Acta Cardiol.* 2003;58(2):119-32.
- Bermano G, Shepherd R, Zehner ZE, Hesketh JE. Perinuclear mRNA localisation by vimentin 3'-untranslated region requires a 100 nucleotide sequence and intermediate filaments. *FEBS Lett.* 2001;497(2-3):77-81.
- Bergmann M, Post A, Rittel I, Bechmann I, Nitsch R. Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat. *Exp Brain Res.* 1997;117:80-6.
- Bitterman N. CNS oxygen toxicity. *Undersea Hyperb Med.* 2004;31(1):63-72.
- Bluml S, Rosc B, Lorincz A, et al. The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes. *J Immunol.* 2008;181(6):4347-53.
- Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WH, et al. Life without blood. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1960;104:949-54.
- Boyle R. *New Experiments: Physico-Mechanical, Touching the Spring of the Air, and its Effects: Made, for the most part, in a New Pneumatical Engine.* Publisher. 1660.
- Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes axon regeneration and functional recovery following spinal cord injury. *Nature.* 2002; 416:636-40.

Brkić P, Mitrović A, Rakić M, Grajić M, Jovanović T. Hyperbaric oxygen therapy of angiopathic changes in patients with inherited gene imbalance. *Srp Arh Celok Lek.* 2007;135:669-71.

Brkić P, Jovanović T, Mitrović A. Effects of hyperbaric oxygen treatment on experimentally induced hypercholesterolemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15:65-6.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 1993;56:337-44.

Cater DB, Garatini S, Marina F, et al. Changes of oxygen tension in brain and somatic tissues induced by vasodilator and vasoconstrictor substances. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci.* 1961; 155:136-57.

Castellanos NP, Paúl N, Ordóñez VE, et al. Reorganization of functional connectivity as a correlate of cognitive recovery in acquired brain injury. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2365-81.

Calvo JL, Carbonell AL, Boya J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 1991;566(1-2):333-6.

Cao Y, Vikingstad EM, Huttenlocher PR, et al. Functional magnetic resonance studies of the reorganization of the human hand sensorimotor area after unilateral brain injury in the perinatal period. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:9612-6.

Calvert JW, Cahill J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology. *Neurol Res.* 2007;29(2):132-41.

Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Appl Physiol.* 2003;95(5):2072-80.

Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res.* 2002;951(1):1-8.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):766-75.

Cervos NJ, Lafuente JV. Traumatic brain injuries: Structural changes. *J Neurol Sci.* 1991;103:3-14.

Chambers J, Cohen SS, Hemminger L, Prall JA, Nichols JS. Mild traumatic brain injuries in low-risk trauma patients. *J Trauma.* 1996;41(6):976-80.

Christman CW, Salvant JB, Jr, Walker SA, Povlishock JT. Characterization of a prolonged regenerative attempt by diffusely injured axons following traumatic brain injury in adult cat: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997;94:329-37.

Chuckowree JA, Dickson TC, Vickers JC. Intrinsic regenerative ability of mature CNS neurons. *Neuroscientist.* 2004;10:280-5.

Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW. The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J Neurosci.* 2005;21:2051-62.

Chu D, Huttenlocher PR, Levin DN, Towle VL. Reorganization of the hand somatosensory cortex following perinatal unilateral brain injury. *Neuropediatrics.* 2000;31:63-9.

Cooper PR. Delayed brain injury: secondary insults, Central Nervous System Trauma Status Report, (Eds. Becker D.P. & Pavlishock J.T.) NINDCS; Bethesda, Maryland. 1985;217-22.

Cotman CV, Gomez-Pinilla F, Kahle JS. Neural plasticity and regeneration. *Basic Neuroch.*, Raven Press, New York. 1994;607-26.

Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system inflammation. *J Neurol.* 2004, 251(11):1304-16.

Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol.*1999;146(4):831-42.

Coleman MP, Freeman MR. Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annu Rev Neurosci.* 2010;33:245-67.

David S, Aguayo AJ.: Axonal elongation in peripheral nervous system bridges after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 1981;214:391-3.

D'Agostino D P, Colomb D G, Dean J B. Effects of hyperbaric gases on membrane nanostructure and function in neurons. *J Appl Physiol.* 2009;106:996-1003.

Da Cunha A, Vitković L. Regulation of immunoreactive GAP-43 expression in rat cortical macroglia is cell type specific. *J Cell Biol.* 1990;111(1):209-15.

Daugherty WP, Levasseur JE, Sun D, Rockswold GL, Bullock MR. Effects of hyperbaric oxygen therapy on cerebral oxygenation and mitochondrial function following moderate lateral fluid-percussion injury in rats. *J Neurosurg.* 2004;101(3):499-504.

Dancause N, Barbay S, Frost SB, et al. Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci.* 2005; 25: 4410167-79.

Dutton RP, McCunn M. Traumatic brain injury. *Curr Opin Crit Care.* 2003;9(6):503-9.

Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ 3rd, Putnam RW, Henderson RA 3rd. Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J Appl Physiol.* 2003;95(3):883-909.

De Rosa S, Cirillo P, Paglia A, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? *Curr Vasc Pharmacol.*2010;8(2):259-75.

Dou CL, Levine JM. Inhibition of neurite growth by the ng2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Neurosci.* 1994;14:7616 -28.

Doctor N, Pandya S, Supe A. Hyperbaric oxygen therapy in diabetic foot. *J Postgrad Med.* 1992;38(3):112-4.

Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res.* 2002;91(11):1031-7.

Demchenko IT, Gutsaeva DR, Moskvina AN, Zhiliaev S. Involvement of extracellular superoxide dismutase in cerebral blood flow regulation. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2008;94:1365-73.

Dusart I, Marty S, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS-II. Astrocytes. *Neuroscience* 1991;45:541-9.

Dillard CJ, Tappel AL. Fluorescent damage products of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1984;105:337-41.

Dijk F, Bergen AA, Kamphuis W. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):858-67.

Eschenfelder CC, Krug R, Yusofi AF, et al. Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25:193-201.

Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993a;54(1):15-36.

Eddleston M, De la Torre JC, Oldstone MB, et al. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest.* 1993b; 92(1):349-58.

Erecinska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 2001;128:263-76.

Eriskat J, Plesnila N, Stoffel M, Baethmann A. Assessment of regional cortical blood flow following traumatic lesion of the brain. *Acta Neurochir Suppl.* 1997;70:94-5.

Emery DL, Raghupathi R, Saatman KE, et al. Bilateral growth-related protein expression suggests a transient increase in regenerative potential following brain trauma. *J Comp Neurol.* 2000;424(3):521-31.

Eng LE, Vanderhaeghen JJ, Bignami A. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971;28:351-4.

Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994;4(3):229-37.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000;25:1439-51.

Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem.* 1983;133(1):51-69.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res.* 2004;567(1):1-61.

Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 1989;244(4906):798-800.

Faden AI. Experimental neurobiology of central nervous system injury. In: *Critical Reviews in Neurobiology* (Ed. C.B. Nemeroff), CRC Press: Boca Raton, FL, 1993:175-86.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(3):236-56.

Fawcett JW, Rokos J, Bakst I. Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J. Cell Sci*.1989;92:93-100.

Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*.1999; 49(6):377-91.

Fawcett JW. Novel strategies for protection and repair of the central nervous system. *Clin Med*. 2006;6(6):598-603.

Fawcett JW, Curt A. Damage control in the nervous system: rehabilitation in a plastic environment. *Nat Med*. 2009;15(7):735-6.

Faglia E, Favales F, Aldeghi A, et al. Adjunctive systemic hyperbaric oxygen therapy in treatment of severe prevalently ischemic diabetic foot ulcer. A randomized study. *Diabetes Care*.1996; 19(12):1338-43.

Feldmeier JJ, Hampson NB. A systematic review of the literature reporting the application of hyperbaric oxygen prevention and treatment of delayed radiation injuries: an evidence based approach. *Undersea Hyperb Med*. 2002;29(1):4-30.

Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*. 1981;211(1):67-77.

Fendri C, Mechri A, Khiari G, et al. Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review. *Encephale*. 2006;32(2 Pt 1):244-52.

Fischer BR, Speckmann EJ, Greiner C, et al. Hyperbaric oxygen in neurosurgery. *Acta Neurochir*. 2009;151:415-8.

Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*. 2008;209:294-301.

Fidler PS, Schuette K, Asher RA, et al. Comparing astrocytic cells lines that are inhibitory or permissive for axon growth: The major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci*. 1999;19(20):8778-88.

Frontczak-Baniewicz M, Walski M. Glial scar instability after brain injury. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57:97-102.

Friede RL, Bischhausen R. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. *J Neurol Sci*. 1980;44:181-203.

Frost SB, Barbay S, Friel KM, et al. Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol.* 2003;89:3205-14.

Flanagan SR, Cantor JB, Ashman TA. Traumatic brain injury: future assessment tools and treatment prospects. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(5):877-92.

Frederickson RC, Silver J. Glial cells: The Unsung heroes of the brain. One company's view, *Bio/Technology.* 1991;9:11.

Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* 1988;8(4):1144-51.

Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14:67-116.

Fulcrand J, Prival A. Neuroglial reaction secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: Ultrastructural and quantitative study. *J Comp Neurol.* 1977;176, 189-224.

Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:345-82.

Furutani R, Kibayashi K. Morphological Alteration and Reduction of MAP2-immunoreactivity in Pyramidal Neurons of Cerebral Cortex in a Rat Model of Focal Cortical Compression. *J Neurotrauma.* 2011. PMID: 21401443

Gaughwin PM, Caldwell MA, Anderson JM, et al. Astrocytes promote neurogenesis from oligodendrocyte precursor cells. *Eur J Neurosci.* 2006;23(4):945-56.

Goldstein G. Immunoregulatory mechanisms: dissection and diagnosis with monoclonal antibodies. *Diagn Immunol.* 1983;1(3):98-9.

Goldstein LB, Davis JN. Influence of lesion size and location on amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in rats. *Behav Neurosci.* 1990;104(2):320-7.

Goldstein LB. Right vs. left sensorimotor cortex suction ablation in the rat: no difference in beam walking recovery. *Brain Research.* 1995;674:167-70.

Gossett WA, Rockswold GL, Rockswold SB, et al. The safe treatment, monitoring and management of severe traumatic brain injury patients in a monoplace chamber. *Undersea Hyperb Med.* 2010;37(1):35-48.

Goslin K, Schreyer DJ, Skene JHP, Banker G. Development of neuronal polarity. GAP43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature.* 1988; 336:672-4.

Gunther A, Manaenko A, Franke H, et al. Early biochemical and histological changes during hyperbaric or normobaric reoxygenation after in vitro ischaemia in primary corticoencephalic cell cultures of rats. *Brain Res.* 2002; 946:130-38.

Gunther A, Manaenko A, Franke H, et al. Hyperbaric and normobaric reoxygenation of hypoxic rat brain slices - impact on purine nucleotides and cell viability. *Neurochem Int* 2004; 45:1125-32.

Gunther A, Koppers-Tiedt L, Schneider PM, et al. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*. 2005;21(11):3189-94.

Giulian D, Robertson C. Inhibition of molecular phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol*. 1990;27:33-42.

Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem Int*. 1994a;25(3):227-33.

Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci*. 1994b;16(3-4):128-36.

Gitler D, Takagishi Y, Feng J, et al. Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci*. 2004;24(50):11368-80.

Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*. 2004;97(7):385-95.

Gispén WH. Neuronal plasticity and function. *Clin Neuroph*. 1993;16:S5-S11.

Gigante AD, Young LT, Yatham LN, et al. Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010:1-15.

Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija: Savremena administracija*, Beograd 2008.

Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol*. 2010;223(1):28-37.

Hall KD, Lifshitz J. Diffuse traumatic brain injury initially attenuates and later expands activation of the rat somatosensory whisker circuit concomitant with neuroplastic responses. *Brain Res*. 2010;1323:161-73.

Hart GB, O'Reilly RR, Broussard ND, et al. Treatment of burns with hyperbaric oxygen. *Surg Gynecol Obstet*. 1974;139(5):693-6.

Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):494-506.

Hatten ME, Liem RKH. Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J Cell Biol*. 1981;90:662-30.

Hatten ME, Liem RKH, Mason CA. Two forms of cerebellar glial cells interact differently with neurons in vitro. *J Cell Biol*. 1984;98:193-204.

Hanks RA, Temkin N, Machamer J, Dikmen SS. Emotional and behavioral adjustment after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 1999;80(9):991-7.

Harris NG, Mironova YA, Hovda DA, Sutton RL. Pericontusion axon sprouting is spatially and temporally consistent with a growth-permissive environment after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(2):139-54.

Harrison CM, Pompilius M, Pinkerton KE, Ballinger SW. Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine induced oxidant production. *Environ Health Perspect.* 2011;119(5):676-81.

Haynes RL, Borenstein NS, Desilva TM, et al. Axonal development in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J Comp Neurol.* 2005;484(2):156-67.

Hopf HW, Gibson JJ, Angeles AP, Constant JS, Feng JJ, et al. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2005;13(6):558-64.

Henninger N, Küppers-Tiedt L, Sicard KM, et al. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy monitored by MR-imaging after embolic stroke in rats. *Exp Neurol.* 2006;201:316-23.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:749-89.

Henshaw IN, Simpson A. *Compressed Air as a Therapeutic Agent in the Treatment of Consumption, Asthma, Chronic Bronchitis and Other Diseases.* Edinburgh: Sutherland and Knox; 1857.

Helms AK, Whelan HT, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20(6):417-26.

Hulsebosch CE, DeWitt DS, Jenkins LW, Prough DS. Traumatic brain injury in rats results in increased expression of GAP43 that correlates with behavioral recovery. *Neurosci Lett.* 1998; 255:83 -6.

Hugon J, Vallat JM. Abnormal distribution of phosphorylated neurofilaments in neuronal degeneration induced by kainic acid. *Neurosci Lett.* 1990;119(1):45-8.

Huang KL, Wu JN, Lin HC, et al. Prolonged exposure to hyperbaric oxygen induces neuronal damage in primary rat cortical cultures. *Neurosci Lett.* 2000;293(3):159-62.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res.* 2007;29:734-42.

Ivanov KP. Current views on oxygen transport from blood to tissues. *Usp Fiziol Nauk.* 2001;32(4):3-22.

Jain KK. *Textbook of Hyperbaric Medicine,* Cambridge, MA: Hogrefe & Huber, 2004.

Jansen EC, Law I, Lokkegaard A, Warburg F, Byrdof J. Traumatic brain injury treated by HBO. *Abst Confe B 36th Ann Sci Meet EUBS, Istanbul, Turkey, 2010:*59.

Jadhav V, Ostrowski RP, Tong W, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces postoperative brain edema and improves neurological outcomes after surgical brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 2010;106:217-20.

Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci.* 2003;23(28):9276-88.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999;96:25-34.

Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010;345(1-2):91-104.

Jorgensen OS, Hansen LI, Hoffman SW, Fulop Z, Stein DG. Synaptic remodeling and free radical formation after brain contusion injury in the rat. *Exp Neurol*. 1997;144(2):326-38.

Julien JP, Mushznski WE. The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *J Biol Chem*. 1983;258(6):4019-25.

Kalani M, Jorneskog G, Naderi N, et al. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy in treatment of diabetic foot ulcers. Long-term follow-up. *J Diabetes Complications*. 2002;16(2):153-8.

Karageuzyan KG. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(1):85-98.

Kawaja MD, Gage FH. Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron*. 1991;7(6):1019-30.

Kindwall EP. Uses of hyperbaric oxygen therapy in the 1990s. *Cleve Clin J Med*. 1992;59:517-28.

King CE, Canty AJ, Vickers JC. Alterations in neurofilaments associated with reactive brain changes and axonal sprouting following acute physical injury to the rat neocortex. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27:115-26.

Korhonen K, Klossner J, Hirn M, Niinikoski J. Management of clostridial gas gangrene and the role of hyperbaric oxygen. *Ann Chir Gynaecol*. 1999;88(2):139-42.

Kolb B. Synaptic plasticity and the organization of behaviour after early and late brain injury. *Can J Exp Psychol*. 1999;53(1):62-76.

Kolb B, Teskey GC, Gibb R. Factors influencing cerebral plasticity in the normal and injured brain. *Front Hum Neurosci*. 2010;4:204.

Korkmaz A, Oter S, Sadir S, et al. Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res*. 2008;33(1):160-6.

Keirstead HS, Blakemore WF. Identification of post-mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:1191-201.

Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. *Glia*. 1998; 22:161-70.

Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung*. 1995;45(3A):357-60.

Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19:312-18.

Krueger S, Sievers J, Hansen C, Sadler M, Berry M. Three morphologically distinct types of interface develop between adult host and fetal brain transplants: Implications for scar formation in the adult central nervous system. *J Comp Neurol*. 1986;249:103-16.

Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. 1981;90(2):262-70

Knighton DR, Fiegel VD, Halverson T, et al. Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on bacterial clearance. *Arch Surg*. 1990;125(1):97-100.

Kudchodkar BJ, Pierce A, Dory L. Chronic hyperbaric oxygen treatment elicits an antioxidant response and attenuates atherosclerosis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis*. 2007;193(1):28-35.

Laskawi R, Wolff JR. Changes in the phosphorylation of neurofilament proteins in facial motoneurons following various types of nerve lesion. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1996;58:13-22.

Lampl L, Frey G, Bock KH. Hyperbaric oxygen in intracranial abscesses - update of a series of 13 patients. *Undersea Biomed Res (Suppl)*. 1992;19:83.

Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinary A, Bitterman N. Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(3):655-9.

Lavrence FE. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years. *Neuroch Res*. 2000;25:1439-51.

Li J, Liu W, Ding S, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res*. 2008;1210:223-9.

Lim EJ, Kim IB, Oh SJ, Chun MH. Identification and characterization of SMI32-immunoreactive amacrine cells in the mouse retina. *Neurosci Lett*. 2007;424(3):199-202.

Lin JW, Tsai JT, Lee LM, et al. Effect of hyperbaric oxygen on patients with traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;101:145-9.

Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia*. 2006; 54:394-410.

Ludwin SK. Central nervous system remyelination: Studies in chronically damaged tissue. *Ann Neurol*. 1994;36:143-5.

Levine JM. Increased expression of the ng2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci*. 1994;14:4716-30.

Lelli JL Jr, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(6):694-702.

Lewis SA, Cowan NJ. Temporal expression of mouse glial fibrillary acidic protein mRNA studied by a rapid in situ hybridization procedure. *J Neurochem*. 1985;45:913-19.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264:1145-48.

Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke*. 2004;35(2):578-83.

Lou M, Ding MP, Wen SQ. Effect of hyperbaric oxygenation treatment on the apoptotic cell death pathway after transient focal cerebral ischemia. *Zhongguo Zing Zong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2006;22(1):1-5.

Li JS, Zhang W, Kang ZM, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain. *Neuroscience*. 2009; 159(4):1309-15.

Lippert-Grüner M, Kuchta J, Hellmich M, Klug N. Neurobehavioural deficits after severe traumatic brain injury (TBI). *Brain Inj*. 2006;20(6):569-74.

Ma MM, Zhang L, Liu BQ. Influence of hyperbaric oxygen treatment on neural plasticity in experimental rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008;33(12):1113-8.

Mathewson AJ, Berry M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res*. 1985;327:61- 9.

Mathieu D, Neviere R, Millien JP, Coget JM, Wattel F. Non invasive assessment of vasoconstrictive effects of hyperoxygenation in focal ischemia, in: *Basic and Applied High Pressure Biology*, edited by Bennett PB and Marquis RE. University of Rochester Press, Rochester, 1993:375-81.

Masana Y, Yoshimine T, Fujita T, et al. Reaction of microglial cells and macrophages after cortical incision in rats: effect of a synthesized free radical scavenger, (+/-)-N,N'-propylenedinitinamide (AVS). *Neurosci Res*. 1995;23:217-21.

Masliah E, Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol*. 1993;3, 77-85.

Masel BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury a disease process not an event. *J Neurotrauma*. 2010;27(8):1529-40.

Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. Microglia/macrophages. *Neurosci*. 1991;45:529-39.

Mazzeo AT, Beat A. Singh A, Bullock MR. The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Exp Neurol.* 2009;218(2):363-70.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):29-38.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.*1999;424(1-2):83-95.

Mohanakumar KP, de Bartolomeis A, Wu RM, et al. Ferrous-citrate complex and nigral degeneration: evidence for free-radical formation and lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:392-9.

Moretto G, Xu RY, Monaco S, Rizzuto N, Kim SU. Expression and distribution of GAP-43 in human astrocytes in culture. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995;21(4):362-7.

McArthur DL, Chute DJ, Villablanca JP. Moderate and severe traumatic brain injury: epidemiologic, imaging and neuropathologic perspectives. *Brain Pathol.* 2004;14:185-94.

McDonagh M, Helfand M, Carson S, Russman BS. Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury: a systematic review of the evidence. *Arch Pys Med Rehabil.* 2004;85(7):1198-204.

McMillian MK, Thai L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. *Trends Neurosci.* 1994;(4):138-42.

McMillan TM, Teasdale GM. Death rate is increased for at least 7 years after head injury: a prospective study. *Brain.* 2007;130(Pt 10):2520-7.

McKerracher L, David S, Jackson JL, et al. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite outgrowth. *Neuron.*1994;13:805-11.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 1969;244(22):6056-63.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med.* 1988;5(5-6):363-9.

Moon RE, Sheffield PJ. Guidelines for treatment of decompression illness. *Aviat Space Environ Med.* 1997;68(3):234-43.

Menzel M, Doppenberg EM, Zauner A, et al. Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury. *J Neurosurg* 1999; 91:1-10.

Mendez DR, Cherian L, Moore N, Arora T, Liu PK, Robertson CS. Oxidative DNA lesions in a rodent model of traumatic brain injury. *J Trauma.* 2004;56(6):1235-40.

Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: Helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 1996;19:331-8.

Miller DJ. Head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993; 56: 440-7.

Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, Rosenthal RE. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res.* 2003;971(1):90-4.

Mrsić-Pelčić J, Pelčić G, Vitezić D, et al Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats. *Neurochem Int.* 2004;44(8):585-94.

Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow. *Stroke.* 1995;26(12):2307-12.

Mulligan CE, Levitt P, Cunningham TJ. Brain macrophages and microglia respond differentially to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol* 1991;314:136-46.

Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol.* 1991;3(5):465-74.

Murphy-Lavoie H, Butler FK, Hagan CE. Hyperbaric oxygen therapy in the management of central retinal artery occlusion. 12. Durham: Undersea and Hyperbaric Medicine Society; 2008.57-66.

Mustafa AG, Singh IN, Wang J, Carrico KM, Hall ED. Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals. *J Neurochem.* 2010;114(1):271-80.

Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain.* 2006;129:2761-72.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26:523-30.

Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2007;10:615-22.

Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:462-67.

Niklas A, Brock D, Schober R, Schulz A, Schneider D. Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation-HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J Neurol Sci.* 2004;219(1-2):77-82.

Niederost BP, Zimmerman DR, Schwab ME, Bandtlow CE. Bovine CNS myelin contains neurotrophic growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* 1999;19: 8979-89.

- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res.* 1992;17:877-85.
- Noble M, Wolswijk G. Development and regeneration in the O-2A lineage: Studies in vitro and in vivo. *J Neuroimmunol.* 1992;40:287-94.
- Nortje J, Menon DK. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Curr Opin Neurol.* 2004; 17: 711-8.
- Nolan S. Traumatic brain injury: a review. *Crit Care Nurs Q.* 2005;28(2):188-94.
- Niinikoski J, Hunt TK. Oxygen tensions in healing bone. *Surg Gynecol Obstet.* 1972;134(5):746-50.
- Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem.* 2009;109(1):133-8.
- Niezgoda JA, Cianci P, Folden BW, et al. The effect of hyperbaric oxygen therapy on a burn wound model in human volunteers. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(6):1620-5.
- Neubauer RA, James P. Cerebral oxygenation and the recoverable brain. *Neurol Res.* 1998;20(1):S33-6.
- Nudo RJ. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. *J Rehabil Med.* 2003;(41):7-10.
- Nun JF. The Oxygen cascade, in: *Nunn's Applied Respiratory Physiology*, edited by Nunn JF, Butterworth-Heinemann Ltd.: New York, 1993:255-68.
- Oppel L. A review of the scientific evidence on the treatment of traumatic brain injuries and strokes with hyperbaric oxygen. *Brain Injury* 2003;17:225-36.
- Oriani G, Michael M, Marroni A, Longoni C. Physiology and pathophysiology of hyperbaric oxygen. In: Oriani G, Marroni A, Wattel F, editors. *Handbook on hyperbaric medicine.* Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 1 - 34.
- Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, et al. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2008;29(1):1-13.
- Oter S, Korkmaz A, Topal T, et al. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem.* 2005;38(8):706-11.
- Panter SS, Faden, AI. Biochemical changes and secondary injury from stroke and trauma, in: *Principles and Practice of Restorative Neurology*, edited by Young R and Delwade P, Butterworths -Heinemann Ltd.: New York, 1992:32-52.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 1995;6:474-86.

Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press Inc.: San Diego, 1986.

Palzur E, Vlodayvsky E, Mulla H, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy for Reduction of Secondary Brain Damage in Head Injury: An Animal Model of Brain Contusion. *J Neurotrauma*, 2004; 21:41-8.

Palzur E, Zaaroor M, Vlodayvsky E, Milman F, Soustiel JF. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy in brain injury is mediated by preservation of mitochondrial membrane properties. *Brain Res*. 2008;1221:126-33.

Paulson OB. Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002;12(6):495-501.

Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci*. 2003;23:11479-88.

Papadopoulos CM, Tsai SY, Cheatwood JL, et al. Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex*. 2006; 16:4529-36.

Paci GM, Sise MJ, Sise CB, et al. Preemptive craniectomy with craniotomy: what role in the management of severe traumatic brain injury? *J Trauma*. 2009;67(3):531-6.

Pfenninger KH, de la Houssaye BA, Helmke SM, Quiroga S. Growth-regulated proteins and neuronal plasticity. A commentary. *Mol Neurobiol*. 1991;5(2-4):143-51.

Purves MJ. The physiology of the cerebral circulation. *Monogr Physiol Soc* 1972;(28):1-414.

Pekovic S, Subasic S, Nedeljkovic N, et al. *Molecular Basis of Brain Injury and Repair*. In : *Neurobiological Studies – From Genes to Behaviour*, (2006): ISBN: 81-308-0107-8 (Eds: S. Ruzdijic and Lj. Rakic) Research Signpost, Kerala, India, 143-65.

Perry VH, Gordon S. Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol*. 1991;125:203-44.

Peng Z, Xiao P, Guo H, Liu Q. Effect of early hyperbaric oxygen on neuronal apoptosis and learning and memory of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009;34(6):468-75.

Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*. 2004; 204:428-37.

Pixley SK, De Vellis J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res*. 1984;317(2):201-9.

Perrins DJ. Influence of hyperbaric oxygen on the survival of split skin grafts. *Lancet*. 1967;1(7495):868-71.

Perino C, Rago R, Cicolini A, Torta R, Monaco F. Mood and behavioural disorders following traumatic brain injury: clinical evaluation and pharmacological management. *Brain Inj.* 2001; 15(2):139-48.

Perbal S, Couillet J, Azouvi P, Pouthas V. Relationships between time estimation, memory, attention, and processing speed in patients with severe traumatic brain injury. *Neuropsychologia.* 2003;41(12):1599-610.

Pearlson GD, Robinson RG. Suction lesions of the frontal cerebral cortex in the rat induce asymmetrical behavioral and catecholaminergic responses. *Brain Res.* 1981;218:233-42.

Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11:491-8.

Povlishock JT, Erb DE, Arstruc J. Axonal response to traumatic brain injury: Reactive axonal change, deafferentation, and neuroplasticity. *J Neurotrauma.* 1992;9:189-200.

Prior K, Hautefort I, Hinton JC, et al. All stressed out. Salmonella pathogenesis and reactive nitrogen species. *Adv Microb Physiol.* 2009;56:1-28.

Pun PB, Lu J, Moomhala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res.* 2009;43:348-64.

Popel AS. Theoriz of oxygen transport to tissue. *Crit Rev Biomed Eng.* 1989;17(3):257-321.

Rakic P. Neuronal-glia interaction during brain development. *Trends Neurosci.* 1981;4: 184-7.

Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 6929-34.

Rajadhyaksha MS, Manghani D. Part 2. Astrocytes – Star Performers in the Neronal Tissue. *Resonance.* 2002;7(1):25-6.

Rhodes KE, Raivich G, Fawcett JW. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience.* 2006;140(1):87-100.

Rockswold SB, Rockswold GL, Defillo A. Hyperbaric oxygen in traumatic brain injury. *Neurol Res.* 2007;29(2):162-72.

Rockswold SB, Rockswold GL, Zaun DA, et al. A prospective, randomized clinical trial to compare the effect of hyperbaric to normobaric hyperoxia on cerebral metabolism, intracranial pressure, and oxygen toxicity in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2010;112(5):1080-94.

Rosenthal RE, Silbergleit R, Hof PR, Haywood Y, Fiskum G. Hyperbaric oxygen reduces neuronal death and improves neurological outcome after canine cardiac arrest. *Stroke.* 2003;34(5):1311-6.

Robertson CL. Mitochondrial dysfunction contributes to cell death following traumatic brain injury in adult and immature animals. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36(4):363-8.

Robertson CL, Scafidi S, McKenna MC, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2009;218(2):371-80.

Reinert M, Barth A, Rothen HU, et al. Effects of cerebral perfusion pressure and increased fraction of inspired oxygen on brain tissue oxygen, lactate and glucose in patients with severe head injury. *Acta Neurochir* 2003;145:341-9.

Reynolds R, Hardy R. Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J Neurosci Res.* 1997;47:455-70.

Reier PJ, Houle JD. The glial scar: Its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol.* 1988;47:87-138.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20:570-7.

Rimel RW, Jane JA, Tyson GW. Emergency management of head injuries. *Resuscitation.* 1981;9(1):75-97.

Rush JW, Green HJ, Maclean DA, Code LM. Oxidative stress and nitric oxide synthase in skeletal muscles of rats with post-infarction, compensated chronic heart failure. *Acta Physiol Scand.* 2005;185(3):211-8.

Saunders DE, Howe FA, Van den Boogaart A, et al. Continuing ischemic damage after acute middle cerebral artery infarction in humans demonstrated by short-echo proton spectroscopy. *Stroke.* 1995;26:1007-13.

Stanimirović D, Satoh K: Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Bra Pathol.* 2000;10:113-26.

Saiki RL. Current and evolving management of traumatic brain injury. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2009;21(4):549-59.

Schwartz JP. Neurotransmitters as neurotrophic factors: A new set of functions. *Int Rev Neurobiol.* 1992;34:1-23.

Sukoff MH. Effects of hyperbaric oxygenation. *J Neurosurg* 2001;95: 544-6.

Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000;874(2):123-30.

Schiffer D, Giordana MT, Migheli A. GFAP and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986;374:110-8.

Schiffer D, Giordana MT, Cavalla P, Vigliani MC, Attanasio A. Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: double stainings and markers of cell proliferation. *Int J Dev Neurosci.* 1993;11(2):269-80.

Schoenfeld TA, Hamilton, L. Secondary brain changes following lesions: a new paradigm for lesion experimentation. *Physiol Behav.* 1977;18:951-67.

Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, et al. Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9353-8.

Schaub E, Pellegrini M, Pugin D. Carbon monoxide poisoning: an update for 2009. *Rev Med Suisse.* 2009;5:1606-9.

Schachner M, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, Schoonmaker G, Bignami A. Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J Cell Biol.* 1977; 75(1):67-73.

Scolding, NJ, Rayner PJ, Sussman J, Shaw C, Compston DA. A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *Neuroreport.* 1995;6:441- 5.

Scolding NJ, Lassmann H. Demyelination and remyelination. *Trends Neurosci.*1996;19:1-2.

Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature.* 1990;343:269-72.

Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol.*1981;90:435-47.

Shiokawa O, Fujishima M, Yanai T, et al. Hyperbaric oxygen therapy in experimentally induced acute cerebral ischemia. *Undersea Biomed Res* 1986;13: 337-44.

Shojo H, Kibayashi K. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res.* 2006;1078:198-211.

Szele FG, Alexander C, Chesselet MF. 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.

Stojiljkovic M. Osnovni principi molekularne neurobiologije. Nova prosveta. 1998.

Strong AJ, Venables GS, Gibson G. The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983; 3(1):86-96.

Sternberger LA, Sternberger NH. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1983;80(19):6126-30.

Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman A, Aschner M. Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. *Toxicol Pathol.* 2011;39:115-23.

Spillman AA, Bandtlow, CE, Lottspeich F, Keller F, Schwab ME. Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *J Biol Chem.*1998;73:19283-93.

- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009;32:638-47.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:7-35.
- Skyhar MJ, Hargens AR, Strauss MB, et al. Hyperbaric oxygen reduces edema and necrosis of skeletal muscle in compartment syndromes associated with hemorrhagic hypotension. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(8):1218-24.
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res.* 2005;79(1-2):231-9.
- Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res.* 1988;466(2):201-10.
- Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1012-6.
- Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009;106(3):988-95.
- Thomale UW, Schaser K, Kroppenstedt SN, Unterberg AW, Stover JF. Cortical hypoperfusion precedes hyperperfusion following controlled cortical impact injury. *Acta Neurochir Suppl.* 2002;81:229-31.
- Thompson SN, Gibson TR, Thompson BM, Deng Y, Hall ED. Relationship of calpain-mediated proteolysis to the expression of axonal and synaptic plasticity markers following traumatic brain injury in mice. *Exp Neurol.* 2006;201:253-65.
- Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(7):643-50.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J.* 2008;72:31-7.
- Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric oxygen therapy. *N Engl J Med.* 1996;334:1642-8.
- Timmons SD. Current trends in neurotrauma care. *Crit Care Med.* 2010;38(9):S431-44.
- Theilen H, Schrock H, Kuschinsky W. Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:1055-61.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* 2004;264(1-2):85-97.
- Van Hulst RA, Haitsma JJ, Klein J, et al. Oxygen tension under hyperbaric conditions in healthy pig brain. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003;23:143-8.

- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.
- Vavilala MS, Lee LA, Lam AM. Cerebral blood flow and vascular physiology. *Anesthesiol Clin North Am* 2002;20:247-64.
- Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, Hiebert GW, Fouad K. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain*. 2006;129:1534-45.
- Veltkamp R, Warner DS, Domoki F, et al. Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2000;853(1):68-73.
- Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2005;36(8):1679-83.
- Verardo MR, Lewis GP, Takeda M, et al. Abnormal reactivity of muller cells after retinal detachment in mice deficient in GFAP and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3659-65.
- Verma P, Chierzi S, Codd AM, et al. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci*. 2005;25:331-42.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, et al. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 2009;29:11511-22.
- Voigt C, Förchler A, Jaeger M, et al. Protective effect of hyperbaric oxygen therapy on experimental brain contusions. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;102:441-5.
- Vitković L, Steisslinger HW, Aloyo VJ, Mersel M. The 43-kDa neuronal growth-associated protein (GAP-43) is present in plasma membranes of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(21):8296-300.
- Wada K, Miyazawa T, Nomura N, et al. Mn-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl*. 2000;76:285-90.
- Wada K, Miyazawa T, Nomura N, et al. Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery*. 2001;49(1):160-6.
- Wang GH, Zhang XG, Jiang ZL, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment on traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2010;27(9):1733-43.
- Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma*. 2009;26(1):55-66.
- Waldbaum S, Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *J Bioenerg Biomembr*. 2010;42(6):449-55.
- Wendel A. *Enzymatic Basis of Detoxication*. Academic Press, NY, 1980; Volume 1:333.

Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, et al. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain. *Trends Neurosci.* 1996;19:387-93.

Weinstein PR, Hameroff SR, Johnson PC, Anderson GG. Effect of hyperbaric oxygen therapy or dimethyl sulfoxide on cerebral ischemia in unanesthetized gerbils. *Neurosurgery.* 1986;18(5):528-32.

Weinstein PR, Anderson GG, Telles DA. Results of hyperbaric oxygen therapy during temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. *Neurosurgery.* 1987;20(4):518-24.

Wilkinson D, Doolette D. Hyperbaric oxygen treatment and survival from necrotizing soft tissue infection. *Arch Surg.* 2004;139:1339-45.

Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 1985;41:1017-28.

Wren D, Wolswijk G, Noble M. In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Aadult progenitor cells. *J Cell Biol.* 1992;116:167- 76.

Wright JK, Zant E, Groom K, Schlegel RE, Gilliland K. Case report: Treatment of mild traumatic brain injury with hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med.* 2009;36(6):391-9.

Wood JD, Watson WJ, Murray GW. Correlation between decreases in brain gamma-aminobutyric acid levels and susceptibility to convulsions induced by hyperbaric oxygen. *J Neurochem.* 1969;16(3):281-7.

Wu VW, Schwartz JP. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res.* 1998;51(6):675-81.

Xiao ZC, David S, Braun PE, McKerracher L. Characterization of a new myelin-derived growth inhibitory activity. *Soc Neurosci Abstr.* 1997;23:1994.

Xerri C, Merzenich MM, Peterson BE, Jenkins W. Plasticity of primary somatosensory cortex paralleling sensorimotor skill recovery from stroke in adult monkeys. *J Neurophysiol.* 1998;79:2119-48.

Xiong Y, Peterson PL, Lee CP. Alterations in cerebral energy metabolism induced by traumatic brain injury. *Neurol Res.* 2001;23(2-3):129-38.

Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. *Am J Physiol.* 1992;262(3 Pt 2):672-7.

Yamada K, Goto S, Oyama T, Inoue N, Nagahiro S, Ushio Y. In vivo induction of the growth associated protein GAP43/B-50 in rat astrocytes following transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 1994;88(6):553-7.

Yang ZJ, Camporesi C, Yang X, et al. Hyperbaric oxygenation mitigates focal cerebral injury and reduces striatal dopamine release in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion. *Eur J Appl Physiol.* 2002;87:101-7.

Young W. The post-injury responses in trauma and ischemia: Secondary injury or protective mechanisms? *Cent Nerv Syst Trauma*. 1987;4:27-51.

Yuan Q, Hu B, Su H, So KF, Lin Z, Wu W. GAP-43 expression correlates with spinal motoneuron regeneration following root avulsion. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2009;4:18.

Yin H, Porter NA. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(1-2):170-84.

Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(7):855-64.

Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, Warner DS. Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery*. 2002a;51(2):289-302.

Zauner A, Clausen T, Alves OL, et al. Cerebral metabolism after fluid-percussion injury and hypoxia in a feline model. *J Neurosurg*. 2002b;97(3):643-9.

Zauner A, Bullock R. The role of excitatory amino acids in severe brain trauma: Opportunities for therapy: A review. *J Neurotrauma*. 1995;12: 547-54.

Zehner ZE, Izmailova ES, Perkins EB. A GC-box is required for expression of the human vimentin gene. *Gene*. 1999;235:69-97.

Zhang JH, Lo T, Mychaskiw G, Colohan A. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology*. 2005;12:63-77.

Zhou Z, Daugherty WP, Sun D, et al. Protection of mitochondrial function and improvement in cognitive recovery in rats treated with hyperbaric oxygen following lateral fluid-percussion injury. *J Neurosurg*. 2007;106:687-94.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Predrag (Dragan) Brkić je rođen 23.01.1974. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1992/93 godine. Diplomirao je 2000. godine, sa prosečnom ocenom 9,26. Tokom 2000/01 godine obavio je obavezni lekarski staž u okviru Kliničkog centra Srbije, kao stažer Medicinskog fakulteta i položio državni ispit za doktora medicine. Magistarske sudije je upisao školske 2000/01 godine u okviru poslediplomske katedre za Eksperimentalnu fiziologiju i patološku fiziologiju, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu. Magistarski rad pod naslovom "Odnos između aktivnosti $\beta 1$ adrenergičkih receptora, azot monoksida i cirkulišućeg cGMP-a u mehanizmu regulisanja tonusa glatke muskulature a. carotis communis ", je odbranio 2006. godine. Mentor rada je bio Prof. dr Tomislav Jovanović. Komisija za ocenu magistarske teze je određena u sastavu: Prof. dr Vujadin Mujović, predsednik komisije, Prof. dr Dragan Micić, član komisije i Prof. dr Velibor Stojić, član komisije. U zvanje asistenta pripravnika na predmetu Medicinska fiziologija na Institutu za fiziologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu izabran je 2002. godine. U zvanje asistenta na istom predmetu izabran je 2006. godine i reizabran 2009. godine. Član je domaćih i međunarodnih strukovnih udruženja: Srpsko lekarsko društvo, Lekarska komora Srbije, Društvo fiziologa Republike Srbije, Društvo za neuronauke Srbije, European Underwater and Baromedical Society i Association of Clinical Researcher Professionals. Kao saradnik učestvuje na dva interdisciplinarna integraciona projekta, pod pokroviteljstvom Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije. Bio je član organizacionih odbora i generalni sekretar više naučnih skupova. Autor i koautor preko 40 naučnih radova od kojih su 4 rada štampana u celini u časopisima kategorije CC i 3 u časopisima koji se nalaze u bazi Medline. Učestvovao je u izradi udžbenika i praktikuma za redovnu i poslediplomsku nastavu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Brkić Predrag

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

SANIRANJE EKSPERIMENTALNE TRAUMATSKE POVREDE MOZGA
PRIMENOM HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Brkić Predrag

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Brkić Predrag

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада SANIRANJE EKSPERIMENTALNE TRAUMATSKE POVREDE MOZGA PRIMENOM HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

Ментор prof. dr Tomislav Jovanović Komentor prof. dr Mirjana Stojiljković

Потписани Brkić Predrag

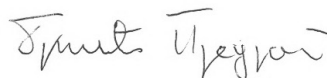
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

SANIRANJE EKSPERIMENTALNE TRAUMATSKE POVREDE MOZGA
PRIMENOM HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, _____

Потпис докторанда

