

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE LEVSTIK

VPLIV KISIKA NA NEVROTROFIČNO AKTIVNOST ASTROCITOV PO
ZASTRUPITVI Z OGLJIKOVIM MONOKSIDOM

THE INFLUENCE OF OXYGEN ON NEUROTROPHIC ACTIVITY OF ASTROCYTES
AFTER CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan, dr.med. in somentorstvom znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ.dipl.kem.

Zahvala

Rad bi se zahvalil mentorici prof. dr. Mojci Kržan za ponujeno priložnost in podporo pri magistrski nalogi ter znan. sod. dr. Damijani Mojci Jurič za vso podporo, vodenje in pomoč ob izvajanju te magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Mojce Kržan dr.med. in somentorstvom znan. sod. dr. Damijane Mojce Jurič, univ.dipl.kem.

KAZALO

KAZALO.....	<i>i</i>
KAZALO SLIK.....	<i>iii</i>
KAZALO TABEL.....	<i>iv</i>
POVZETEK.....	<i>v</i>
ABSTRACT.....	<i>vi</i>
SEZNAM OKRAJŠAV.....	<i>vii</i>
1. UVOD.....	<i>1</i>
1.1 Ogljikov monoksid.....	<i>1</i>
1.1.1. Fiziološka vloga ogljikovega monoksida.....	<i>1</i>
1.1.2. Zastrupitev z ogljikovim monoksidom	<i>3</i>
1.1.3. Pozne posledice zastrupitve z ogljikovim monoksidom.....	<i>4</i>
1.1.4. Zdravljenje zastrupitev z ogljikovim monoksidom.....	<i>5</i>
1.2 Astrociti.....	<i>8</i>
1.3. Nevrotrofini.....	<i>10</i>
1.4. Ogljikov monoksid in astrociti.....	<i>12</i>
2. NAMEN DELA	<i>14</i>
3. MATERIALI IN METODE.....	<i>15</i>
3.1 Materiali.....	<i>15</i>
3.2 Metode.....	<i>17</i>
3.2.1. Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov novorojenih podgan.....	<i>17</i>
3.2.2. Izpostavitve celičnih kultur ogljikovemu monoksidu.....	<i>18</i>
3.2.3. Izpostavitve celičnih kultur normobaričnem in hiperbaričnemu kisiku.....	<i>19</i>
3.2.4 Priprava vzorcev za encimsko-immunske poskuse	<i>19</i>
3.2.5 Določitev celokupnih proteinov v vzorcih.....	<i>20</i>
3.2.6. Encimsko-immunske metode za kvantitativno določevanje nevrotrofinov	<i>20</i>
3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR)	<i>23</i>

3.2.8	Statistična obdelava podatkov	26
4.	<i>REZULTATI</i>	27
4.1	Vpliv CO/normoksije na nevrotrofično aktivnost astrocitov	27
4.1.1	NGF	27
4.1.2	BDNF	29
4.1.3	NT-3	32
4.2	Vpliv normobaričnega in hiperbaričnega kisika na nevrotrofično aktivnost astrocitov po izpostavitvi CO/normoksiji	34
4.2.1	NGF	34
4.2.2	BDNF	37
4.2.3	NT-3	39
5.	<i>RAZPRAVA</i>	42
5.1	Nevrotrofična aktivnost astrocitov po zastrupitvi s CO	42
5.2	Hiperbarični kisik spodbuja nevrotrofično aktivnost astrocitov po zastrupitvi s CO	45
6.	<i>SKLEP</i>	49
7.	<i>LITERATURA</i>	50

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Razgradnja hema v biliverdin in sinteza CO.....</i>	<i>2</i>
<i>Slika 2: Hiperbarična komora na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.....</i>	<i>6</i>
<i>Slika 3: Astrociti so del nevrovaskularne enote.....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 4: Astrociti v primarni kulturi.....</i>	<i>9</i>
<i>Slika 5: Možni izvor trofične podpore.....</i>	<i>11</i>
<i>Slika 6: Receptorji za nevrotrofine.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 7: Primarna celična kultura astrocitov možganske skorje podgane.....</i>	<i>18</i>
<i>Slika 8: Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 9: Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan.....</i>	<i>31</i>
<i>Slika 10: Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan.....</i>	<i>33</i>
<i>Slika 11: Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>35</i>
<i>Slika 12: Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost in sproščanje NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>36</i>
<i>Slika 13: Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>37</i>
<i>Slika 14: Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost in sproščanje BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>38</i>
<i>Slika 15: Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>40</i>
<i>Slika 16: Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost in sproščanje NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji.....</i>	<i>41</i>

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Pozne nevropsihološke posledice zastupitve s CO.</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 2: Zaščitna vloga HBK pri zastupitvi s CO.....</i>	<i>7</i>

POVZETEK

Zastrupitev z ogljikovim monoksidom (CO) povzroča apoptozo in nekrozo živčnih in glijalnih celic, kar lahko vodi do poznih nevropsiholoških posledic. Poškodbe možganskih celic zaradi zastrupitve s CO lahko preprečimo z zdravljenjem s kisikom. Izpostavljenost CO in nato normoksiji močno zavre delovanje astrocitov, saj znižuje njihovo viabilnost in mitohondrijsko funkcijo ter proži apoptozo. Škodljive vplive CO preprečuje hiperbarični, ne pa normobarični, kisik. Zaradi pomembne vloge astrocitov pri ohranjanju preživetja živčnih celic z nudenjem nevrotrofične podpore smo raziskali učinke CO/normoksije na nevrotrofično aktivnost ter možni učinek kisika na astrocite po zastrupitvi s CO.

Astroците možganske skorje novorojenih podgan smo od 30 min do 24 ur inkubirali v prisotnosti 3000 ppm CO v zraku, nato pa jih za 24 ur vrnil v inkubator s standardnimi razmerami (normoksija). Astrocite, ki so bili CO izpostavljeni 8 ur, smo v obdobju 24-urne normoksije v različnih časovnih intervalih (0, 1, 3, 5 ali 7 ur po CO) za 1 uro izpostavili 100 % kisiku pri 1 baru (normobarični, NBK) ali 3 barih (hiperbarični, HBK). Gensko izražanje živčnega rastnega dejavnika (NGF), nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (BDNF) in nevrotrofina-3 (NT-3) smo določili z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR), znotrajcelično vsebnost in sproščanje nevrotrofinov pa s specifičnimi encimsko-immunskimi metodami.

Izpostavljenost astrocitov CO/normoksiji postopno zavre sposobnost genskega izražanja in sinteze nevrotrofinov, na sproščanje pa vpliva le deloma. Največji učinek je opazen po 8-urni izpostavljenosti CO, ki povzroči 50% padec nivojev NGF mRNA in NT-3 mRNA ter 29 % padec BDNF mRNA glede na kontrolne celice, podoben je tudi vpliv na znotrajcelično vsebnost nevrotrofinov. HBK spodbudno vpliva na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje vseh treh nevrotrofinov, njegovo delovanje je največje v času od 1 ure do 5 ur po 8 h CO/normoksiji. Inkubacija celic v NBK ne prepreči zavrtja nevrotrofične podpore astrocitov.

Učinek kisika na nevrotrofično delovanje astrocitov po zastrupitvi s CO je odvisen od tlaka in časa, ki preteče med izpostavljenostjo CO in tretiranjem s kisikom. Pokazalo se je, da zgolj HBK varuje celice in spodbuja sintezo in sproščanje nevrotrofinov. Ohranjanje nevrotrofične podpore živčnim celicam kot posledica zdravljenja s HBK predstavlja možni mehanizem za preprečevanje poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO.

Ključne besede: ogljikov monoksid, kisik, nevrotrofin, astrociti, podgana

ABSTRACT

Carbon monoxide (CO) poisoning causes apoptosis and necrosis of neuronal and glial cells that can lead to delayed neurological sequelae. Brain cell lesions caused by CO can be prevented by oxygen therapy. Exposure to CO and then normoxia strongly suppresses normal astrocytic function due to decreasing their viability and mitochondrial function and triggers apoptosis. Harmful effects of CO can be prevented by hyperbaric but not normobaric oxygen. Because of the important role that astrocytes play in survival of neuronal cells by providing neurotrophic support we have explored the effects of CO/normoxia on neurotrophic activity and the possible protective influence of oxygen on astrocytes after intoxication with CO.

Astrocytes from cerebral cortex of neonatal rat were incubated from 30 minutes to 24 hours in 3000 ppm CO in air and were then put into an incubator with standard conditions (normoxia) for 24 hours. Astrocytes that were exposed to CO for 8 hours were during 24h normoxia exposed for 1 hour to 100% oxygen either at 1 bar (normobaric, NBO) or 3 bar (hyperbaric, HBO) at different time periods (0, 1, 3, 5 or 7 hours after CO). Gene expression of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) was determined with real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), intracellular concentration and secretion was determined by specific enzyme-immune assays.

The exposure of astrocytes to CO/normoxia gradually suppresses the ability of gene expression and neurotrophin synthesis, but only partially suppresses the secretion. The maximum effect was seen after 8 hour exposure to CO, which causes 50% decrease in NGF mRNA and NT-3 mRNA and 29% decrease in BDNF mRNA levels compared to control cells. The effect on intracellular concentrations was similar. HBO enhances gene expression, intracellular concentration and secretion of all three neurotrophins, with its protective effect being the most evident 1 to 5 hours after 8 h CO/normoxia exposure. Incubation of cells in the NBO does not prevent the suppression of astrocytic neurotrophic support.

The effect of oxygen on neurotrophic activity of astrocytes after CO intoxication is dependent on pressure and time that passes between CO exposure and treatment with oxygen. It has been shown that only HBO protects the cells and enhances synthesis and secretion of neurotrophins. The maintenance of neurotrophic support to neuronal cells as the effect of HBO treatment represents a possible mechanism to prevent delayed neurological sequelae after CO intoxication.

Key words: carbon monoxide, oxygen, neurotrophin, astrocytes, rat

SEZNAM OKRAJŠAV

Bcl-2: regulatorni protein imenovan po b celičnem limfomu 2

BDNF: nevrotrofični dejavnik možganskega izvora

cAMP: 3',5'- ciklični adenzin monofosfat

cGMP: 3',5'- ciklični gvanozin monofosfat

CO: ogljikov monoksid

COHb: karboksihemoglobin

CREB: vezavni protein odzivnega elementa za cAMP

GFAP: glialna fibrilarna kislina beljakovina

HBK: hiperbarični kisik

HIF: inducibilni dejavnik hipoksije

HO: hem oksigenaza

HT22: celične linije hipokampalnih živčnih celic miši

LTP: dolgoročno sinaptično ojačevanje

MAP(K): z mitogenom aktivirane proteinske kinaze

NBK: normobarični kisik

NF- κ B: jedrni dejavnik κ B

NGF: živčni rastni dejavnik

N-CAM: živčno-celične adhezijske molekule

NOS: sintaza dušikovega oksida

NT-3: nevrotrofin 3

p75^{NTR}: nevrotrofinski receptor p75

RNS: reaktivne dušikove zvrsti

ROS: reaktivne kisikove zvrsti

sGC: topna gvaničil ciklaza

TrkA: tropomiozinu sorodna kinaza A

TrkB: tropomiozinu sorodna kinaza B

TrkC: tropomiozinu sorodna kinaza C

1. UVOD

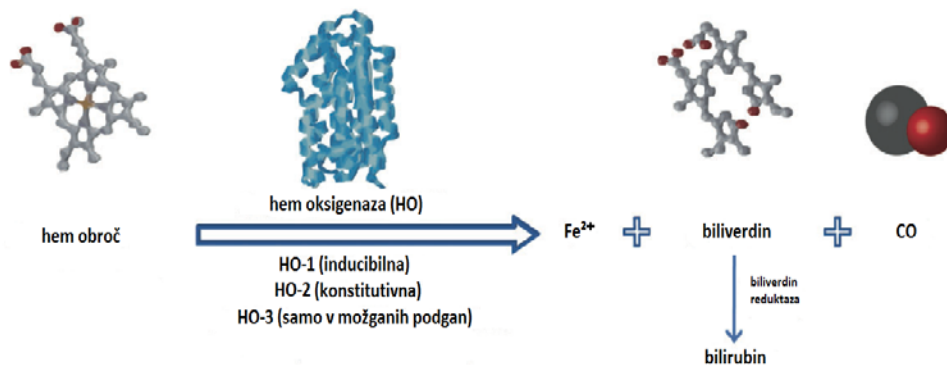
1.1 Ogljikov monoksid

Ogljikov monoksid (CO) je diatomski oksid ogljika, ki je pri temperaturi nad $-191,5^{\circ}\text{C}$ plin brez barve, vonja in okusa. Njegova specifična gostota znaša pri temperaturi 25°C in tlaku 1 atm $1,145\text{ g/L}$ in je le malo nižja od zraka ($1,184\text{ g/L}$), zato se CO enakomerno porazdeli po prostoru. CO je zaradi trojne vezi kemijsko stabilna molekula, ki se zelo slabo topi v vodi ter z njo tudi ne reagira brez dodatne energije. Tudi s kisikom je reakcija počasna in ima visoko aktivacijsko energijo (213 kJ/mol). Prost CO ne reagira z reducenti niti z vodikom, večjo reaktivnost pa ima v prisotnosti prehodnih kovin. Vez med prehodnimi kovinami in CO je stabilna in se lahko prekine šele, ko jo izpodrine druga molekula kot, na primer, kisik (1).

V naravi je CO produkt nepopolnega zgorevanja trdnih, tekočih in plinastih snovi, ki vsebujejo ogljik (butan, propan, nafta, bencin, kurilno olje, drva, premog), nastaja pa tudi kot produkt metabolizma rastlin, vulkanske aktivnosti, gozdnih požarov ipd. (1). Vdihavanje visokih koncentracij CO in/ali dolgotrajna izpostavljenost eksogenemu CO lahko vodi do hude nenamerne zastrupitve, ki je v razvitih industrijskih državah najpogostejša smrtna zastrupitev. CO nastaja tudi endogeno in je kot prenašalna in signalna molekula udeležen v mnogih fizioloških in patofizioloških procesih (1, 2).

1.1.1. Fiziološka vloga ogljikovega monoksida

CO je naravni metabolit endogenih procesov v telesu, kar je v zgodnjih 50 letih prejšnjega stoletja prvi ugotovil Sjöstrand (3). V prokariontskih in evkariontskih celicah je CO večinoma produkt razgradnje hema v biliverdin, kar katalitsko uravnava hem oksigenaza (HO) (Slika 1) (4). Znane so tri izooblike HO. HO-1 (ali stresni protein 32) je v vseh tipih celic prisotna inducibilna oblika encima, katerega izražanje sprožijo različni stresni dejavniki, kot so oksidativni stres, ishemija, sevanje, hipoksija, mediatorji vnetja in nekatera zdravila. HO-2 je konstitutivna oblika encima, ki je primarno prisotna v možganih in testisih, v nižjih koncentracijah pa v večini drugih tkiv. Konstitutivno obliko encima predstavlja tudi podganji HO-3 (1). V manjših količinah CO nastaja pri drugih metabolnih procesih kot je peroksidacija membranskih lipidov ali metabolizem ksenobiotikov (4).



Slika 1. Razgradnja hema v biliverdin in sinteza CO. Hem oksigenaza (HO) razgradi hem v CO, železo (Fe^{2+}) in biliverdin, ki se pod vplivom biliverdin reduktaze hitro pretvori v bilirubin (prirejeno po (5)).

CO je kemijsko inertna plinska molekula, ki prosto prehaja celične membrane in hitro doseže svoje tarče. Primarno se veže na tiste, ki so blizu celične površine, kot je topna gvanilil ciklaza (sGC), K^+ kanali, sintaza dušikovega oksida (NOS) ter tudi na druge hemoproteine, kot so hemoglobin, mioglobin, prostaglandin endoperoksid sintetaza, citokrom c oksidaza, citokrom P450 ali triptofan dioksidaza (1). Vezava CO aktivira tarčne molekule, kar v primeru sGC in NOS spodbudi sintezo gvanozin-3,5-cikličnega monofosfata (cGMP) in dušikov oksid (NO), ki sta pomembna mediatorja žilne funkcije in nevrottransmisije, pri ishemičnih in ekscitotoksičnih procesih v možganih pa tudi mediatorja nevroprotektivnega delovanja CO (5). Endogeni CO lahko tudi zavre aktivnost hemoproteinov. Znano je, da CO preko delne in/ali reverzibilne inhibicije mitohondrijske citokrom c oksidaze uravnava elektronski transport dihalne verige in oksidativno fosforilacijo, kar vodi do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS, angl. reactive oxygen species), ki imajo v nizkih koncentracijah zaščitno vlogo v telesu (preko inhibicije Ca^{2+} kanalov tipa L in proženja biogeneze mitohondrijev ščitijo kardiomiocite, zavirajo apoptozo astrocitov in živčnih celic, itd.) (5).

CO sodeljuje pri uravnavanju cirkadianega ritma, spomina in hemodinamske stabilnosti. Je vazodilatator in povečuje dovod krvi v srce, ščiti endotelijske celice, zavira agregacijo trombocitov in vnetne procese v žilni steni ter prispeva k angiogenezi in vaskulogenezi. Preko proženja MAP kinaznih poti zavira sintezo vnetnih mediatorjev, apoptozo in

proliferacijo in spodbuja biogenezo mitohondrijev (2, 6, 7). V osrednjem živčevju je CO kot živčni prenašalec udeležen pri olfaktorni signalni transdukciji, dolgoročnem sinaptičnem ojačevanju (LTP, angl. long term potentiation), holinergični regulaciji cirkadianega ritma, pri avtonomni regulaciji srčno-žilne funkcije in spodbujanju antinociceptivnega delovanja opioidov (7).

Okrnjeno delovanje endogenega HO/CO sistema povezujejo z etiologijo različnih obolenj, zato farmakološka modulacija endogene sinteze CO in/ali nizki odmerki apliciranega eksogenega CO predstavljajo zanimivo potencialno terapevtsko sredstvo. Zadnje raziskave potrjujejo možno terapevtsko uporabnost CO za zdravljenje akutnega in kroničnega vnetja in sepse, srčno-žilnih obolenj, raka, različnih možganskih patologij ter zapletov pri transplantaciji organov (2, 5, 7, 8).

1.1.2. Zastrupitev z ogljikovim monoksidom

Zastrupitev s CO je glavni vzrok nenamernih zastrupitev in najpogostejša smrtna zastrupitev v razvitih industrijskih državah. V ZDA potrebuje nujno zdravniško pomoč zaradi zastrupitve s CO približno 50.000 ljudi na leto (9, 10). Pravo incidenco je težko določiti, saj zastrupitve pogosto ostanejo neodkrite, ker so znaki blažjih zastrupitev nespecifični. Prav tako oseba, ki je bila izpostavljena CO, tega ne more vedeti, saj je plin brezbarven, brez okusa, brez vonja in ne draži sluznice (11, 12). Simptomi postanejo očitnejši in resnejši z naraščajočo koncentracijo in časom izpostavljenosti CO. Zmerno zastrupitev spremlja močan glavobol, hitro utripanje srca, mišična nemoč, težave oblikovanja misli in zmedenost, hudo zastrupitev pa prepoznamo po nezavesti, epileptičnih krčih, zastoju srca in dihanja ter smrti (12).

Vdihan CO se hitro vsrka in porazdeli po telesu, kjer se z visoko afiniteto veže na zgoraj omenjene proteine, ki vsebujejo železo ali baker. Na hemoglobin se CO veže z 240-krat večjo afiniteto kot kisik, kar ne zmanjša samo sposobnosti vezave kisika na hemoglobin, pač pa ovira tudi sproščanje že vezanega kisika s hemoglobina, s čimer se tkivna hipoksija še poslabša. Nastanek karboksihemoglobina (COHb) je veljal za glavni mehanizem delovanja CO, zdaj pa je znano, da sta pri zastrupitvi s CO tkivna hipoksija in neposredno delovanje CO na celice preko imunskih in vnetnih mehanizmov enakovredna procesa (11). CO se veže na mioglobin in s tem zavre prenos kisika na skeletna mišična vlakna. CO ovira celično dihanje, ker z vezavo na citokrom c oksidazo onemogoča prenos elektronov preko hem centra in

povzroči nastanek ROS, ki okvarijo mitohondrije. CO deluje tudi posredno, saj močno poveča znotraj in zunajcelično koncentracijo NO, ki se ob prisotnosti ROS pretvori v peroksinitrit, močan oksidant, ki lahko poškoduje RNA in DNA. Peroksinitrit dodatno zavira citokrom c oksidazo in poškoduje žilni endotel, na katerega se prilepijo nevtrofilci. Ti se aktivirajo in sprostijo proteaze in ROS, kar povzroči vnetje in lipidno peroksidacijo in s tem demielinizacijo osrednjega živčevja. Hipoksiji možganov po zastrupitvi s CO sledi reoksigenacijska poškodba možganov, saj hiperoksigenacija pospeši tvorbo ROS, ki pospešijo oksidacijo proteinov in nukleinskih kislin. S tem se sproži vnetje in reperfuzijska poškodba. CO se z veliko afiniteto veže tudi na ionske kanale. Z inhibicijo Ca^{2+} kanalov tipa L v miokardu se zmanjša dotok Ca^{2+} v miocite, kar povzroča srčne disfunkcije. Zastrupitev s CO proži tudi apoptotične procese (9, 11, 12) .

1.1.3. Pozne posledice zastrupitve z ogljikovim monoksidom

Nekaj dni do nekaj tednov po odpravi simptomov akutne zastrupitve s CO se pri posameznih zastrupljenih lahko pojavijo pozne nevropsihološke posledice zastrupitve, ki se najpogosteje kažejo s ponavljajočimi glavoboli, motnjami spomina in osredotočenja misli, kognitivnim upadom in osebnostnimi spremembami (13, 14), občasno tudi s horeo (15) (Tabela 1).

Tabela 1: Pozne nevropsihološke posledice zastrupitve s CO (12)

nevrološke posledice	kognitivne in psihološke posledice
glavobol	motnje osredotočanja misli
epilepsija	težave s spominom
parkinsonizem	nihanje razpoloženja
dispraksija	nespečnost
disfazija	depresija
ataksija	anksioznost
vertigo	psihoza
periferna nevropatija	
inkontinenca za vodo in/ali blato	

Pogostost teh posledic je zaradi odsotnosti natančnih diagnostičnih kriterijev in specifičnih plazemskih označevalcev, ki bi jih lahko uporabili kot napovedne dejavnike izida zastrupitve s CO (16), težko določiti. Indikatorje zapletov in slabšega izida zastrupitve predstavljajo povišana raven COHb, znižan pH, povišana raven plazemske laktat-dehidrogenaze, troponina, kreatin kinaze, kreatin kinaze-MB ter računalniško tomografsko slikanje možganov (CT), ki nakazuje hipoksično encefalopatijo (12,17,18). Ocenjuje se, da se pozne posledice zastrupitve s CO pojavijo pri 3 - 40 % zastrupljenec, pogosteje pri starejših in tistih, ki so bili CO izpostavljeni daljši čas, so bili ob tem nezavestni ali so imeli epileptične krče (12). Posledice zastrupitve s CO pri večini bolnikov sčasoma izzvenijo, pri okoli četrtini pa ostanejo v obliki demence in parkinsonizma trajne (17,18). Mehanizmi teh posledic niso jasni, vendar raziskave kažejo, da CO povzroča apoptozo in nekrozo živčnih celic različnih možganskih regij, predvsem globus palidusa, hipokampus, malih možganov in substance nigre, kar je najverjetnje vzrok poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve (18,19).

1.1.4. Zdravljenje zastrupitev z ogljikovim monoksidom

Zastrupitve s CO zdravimo s 100 % kisikom pri tlaku 1 bar (normobarično, NBK), ki ga zastrupljeni vdihavajo preko kisikove maske. Kisiku so izpostavljeni, dokler COHb ne pade pod 3% in ne izzvenijo vsi znaki akutne zastrupitve, kar običajno traja 5-6 ur. 100% kisik skrajša razpolovni čas COHb s 320 minut na 74 minut (20). Kljub ugodnemu vplivu normobaričnega zdravljenja s 100 % kisikom na izid zastrupitve prednost takega zdravljenja pred zdravljenjem z vdihavanjem zraka ni bila nedvoumno potrjena (12, 20).

Zastrupljence s težjo klinično sliko zastrupitve s CO zdravimo s 100 % kisikom pri tlaku 3 barov v hiperbarični komori (hiperbarično zdravljenje, HBK) (Slika 2). Izpostavljenost HBK zviša parcialni tlak kisika v krvi in tkivih, poveča nastajanje ATP, zmanjša oksidativni stres in vnetje ter pospeši izločanje CO, saj se razpolovni čas COHb skrajša na le 20 minut (12, 21). Raziskave na živalskih modelih zastrupitve s CO so potrdile spodbudni vpliv hiperbaričnega kisika, ne pa kisika pri normalnem tlaku, pri zaščiti in izboljšanju delovanja osrednjega živčevja, hitrejšem izboljšanju srčno-žilnega statusa in manjšo incidenco poznih nevropsiholoških posledic (Tabela 2) (21).



Slika 2. Hiperbarična komora na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Namen zdravljenja s hiperbaričnim kisikom je preprečevanje poznih in trajnih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO, zato je indikacija za zdravljenje v hiperbarični komori odvisna od okoliščin in stanja bolnika (12). Uporablja se pri zastrupljencih s težjo klinično sliko, saj so simptomi, ki se pojavljajo ob težjih zastrupitvah, indikator poznih nevropsiholoških posledic in se HBK indicira za preprečevanje le-teh. Uporaba je priporočljiva pri pacientih, ki so utrpeli tudi druge poškodbe (opekline) in predstavljajo večjo tveganje za preživetje, pri nosečnicah pa je zastrupitev nevarna za plod, zato jih vedno zdravimo s hiperbaričnim kisikom (12).

Kljub koristnim učinkom hiperbaričnega zdravljenja s 100 % kisikom na izid akutne zastrupitve nobena raziskava še ni uspela nedvoumno prikazati koristnega vpliva takega zdravljenja v primerjavi z normobaričnim kisikom (20, 21). Podatki iz literature kažejo, da so nekatere klinične študije uspeli potrditi učinkovitost HBK pri zmanjševanju pojavnosti poznih nevropsiholoških posledic, nekatere pa so to ovrgle ali dokazale celo škodljiv vpliv takega zdravljenja. Raziskave na živalskih modelih so potrdile razliko v učinkovitosti med HBK in NBK ter pokazale pomembnost časovne odvisnosti delovanja HBK. Zdravljenje z HBK in NBK takoj po zastrupitvi je bilo enako učinkovito, pri zdravljenju v različnih časovnih intervalih po zastrupitvi s CO pa je HBK učinkoviteje preprečeval apoptozo in demielinizacijo živčnih celic (22 - 25).

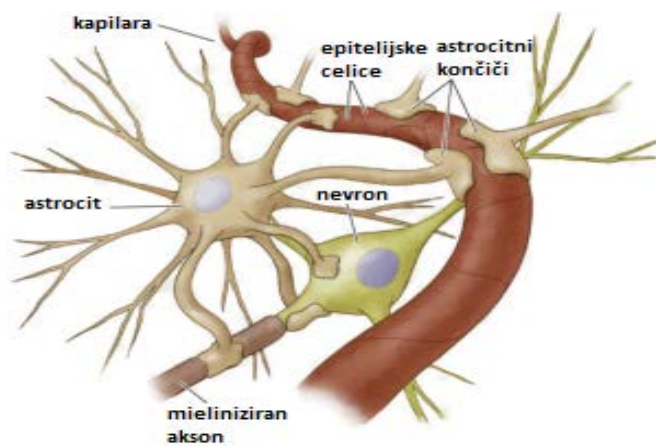
Tabela 2: Zaščitna vloga HBK pri zastrupitvi s CO (21).

zastrupitev s CO	zaščitno delovanje HBK
nastanek COHb	hitra odstranitev CO iz krvi in tkiv
tkivna hipoksija	normalizirana tkivna oksigenacija
vezava CO na celične proteine (citokromi, mioglobin) in povečana ravnotežna koncentracija NO	sproščena citokromska vezavna mesta
inhibicija celičnega metabolizma	ohranjena sinteza ATP
oksidativni stres zaradi sinteze ROS v mitohondrijih in prostih radikalov pri razgradnji hema	zaščitni oksidativni stres zaradi povečanega izražanja HO-1, antioksidantov in stresnih proteinov, ki ščitijo pred oksidativnim stresom
agregacija trombocitov in nevtrofilcev, degranulacija nevtrofilcev, sproščanje mieloperoksidaze, oksidativni stres endotelijjskih celic	zmanjšana aktivnost mieloperoksidaze
adhezija nevtrofilcev na žilni endotel, imunski odziv levkocitov, pretvorba ksantin dehidrogenaze (XD) v ksantin oksidazo (XO)	zmanjšana adhezija levkocitov, imunskega odziva in pretvorbe XD v XO
lipidna peroksidacija	zaščita pred peroksidacijo možganskih lipidov
nekroza in apoptoza živčnih celic	zmanjšana nekroza in zaščita pred pospešeno apoptozo

1.2 Astrociti

Astrociti so najštevilčnejše glijalne celice v osrednjem živčevju. Čeprav je v preteklosti veljalo, da astrociti zagotavljajo zgolj strukturno in metabolno podporo živčnim celicam, je danes jasno, da imajo pomembno vlogo pri procesih, ki ključno vplivajo na razvoj, normalno delovanje in adaptacijo živčevja ter tako aktivno posegajo v delovanje možganov (26).

Morfološko so zvezdastih oblik, razdeljeni v tri morfološke tipe; podolgovati protoplazemski astrociti v sivi substanci z izraženim S100 beta proteinom, vlaknasti astrociti v možganski belini s kratkimi in močno razvejanimi izrastki in specializirani astrociti (npr. Bergmanova glija v malih možganih ali Mullerjeve celice v mrežnici). Vlaknasti astrociti izražajo citoskeltno glijalno fibrilarno kislno beljakovino (GFAP, angl. glial fibrillary acidic protein), ki je njihov označevalec. Protoplazemski astrociti so povezani s sinapsami, endotelijskimi celicami in telesi živčnih celic in so tako pomemben sestavni del nevrovaskularne enote (Slika 3). Prisotni so v vseh možganskih regijah, vendar se ne prepletajo (26). Astrociti med seboj komunicirajo preko presledkovnih stikov, kjer lahko en astrocit zaradi svoje razvejanosti komunicira z 300 - 600 nevronskimi dendriti (27).

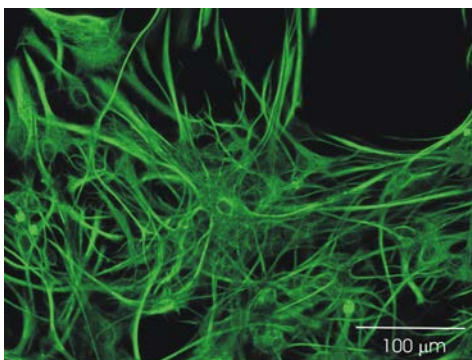


Slika 3. Astrociti so del nevrovaskularne enote.

Astrociti so, tako kot nevroni, ektodermalnega izvora, vendar niso vzdražni. V različnih življenjskih obdobjih spreminjajo svojo obliko in funkcijo ter predstavljajo enakovreden člen v tridelni sinapsi.

V obdobju razvoja živčevja je ključnega pomena vzpostavitev nevronske poti ter stabilizacija njihove tridimenzionalne strukture. Skelet, ki daje živčnim celicam anatomsko podporo, se imenuje ekstracelularni matriks. Za razvoj matriksa so odgovorni astrociti, saj so glavni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul (živčno-celične adhezijske molekule (N-CAM, angl. neural cell adhesion molecule), laminin, fibronektin, citotacin J 1) (28, 29). S sproščanjem nevrotrofičnih dejavnikov spodbujajo preživetje, diferenciacijo in zorenje živčnih celic ter usmerjajo rast aksonov, s sproščanjem signalnih molekul, kot so trombospondini, pa omogočajo razvoj tripartitnih sinaps (30, 31).

V odraslem obdobju so astrociti pomembni za vzdrževanje homeostaze osrednjega živčevja. Z izražanjem proteinov zunajceličnega matriksa in celičnih adhezijskih molekul skrbijo za strukturo odraslih možganov, vzdržujejo in uravnavajo permeabilnost krvno-možganske pregrade ter sodelujejo pri ohranjanju sinaptičnega delovanja (32). Preko K^+ , Na^+/H^+ , AQP4 in drugih kanalov skrbijo za ionsko in pH ravnovesje ter za nivoje ekstracelularne tekočine. Izražajo transporterje za živčne prenašalce, kot sta glutamat in GABA, in jih privzemajo iz sinaptičnih špranj (32). Z izražanjem vazoaktivnih snovi, kot so prostaglandini in NO, uravnavajo dotok krvi v možgane ter shranjujejo glikogen, ki ohranja delovanje živčnih celic ob hipoglikemiji. So enakovredni partner v tridelni sinapsi: izražajo številne receptorje za živčne prenašalce, preko katerih lahko odgovarjajo na nevronske aktivnosti in modulirajo sinaptično aktivnost s sproščanjem glijalnih prenašalcev (glutamat, ATP, aspartat) (32).



Slika 4. Astrociti v primarni kulturi. Celična kultura astrocitov je označena s protitelesi proti GFAP (izvedla dr. Klara Bulc Rozman z Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani).

Pri okrnjenem delovanju osrednjega živčevja (infekcije, poškodbe, ishemije, zastrupitve z nevrotoksini, neurodegenerativne bolezni, itd.) se mirujoči astrociti spremenijo v reaktivne celice. Reaktivna astrocitoza je kompleksen, heterogen proces, ki je odvisen od narave noксе

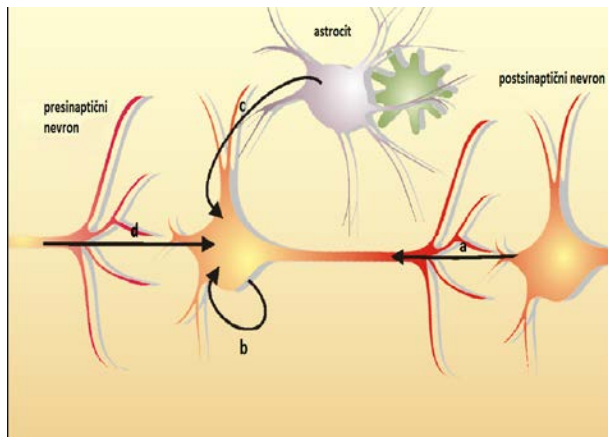
in mikrookolja, v katerem je prišlo do poškodbe. Opazna je hipertrofija celic in povečano izražanje strukturnih molekul (GFAP, vimentin), regulatorjev transkripcije, adhezijskih molekul, rastnih dejavnikov, mediatorjev vnetja in receptorjev. Reaktivni astrociti sodelujejo pri odstranjevanju strupenih snovi (glutamat, amoniak), ščitijo pred oksidativnim stresom, razgrajujejo amiloidni- β peptid in podpirajo preživetje živčnih celic ter njihovo rast s povečano sintezo in sproščanjem nevrotrofičnih dejavnikov. Pri hujših poškodbah prihaja do proliferacije astrocitov in nastanka brazgotin, ki lahko ščitijo nepoškodovano tkivo, hkrati pa zavirajo regenerativne procese v poškodovanih živčnih celicah (33, 34).

1.3. Nevrotrofini

Nevrotrofini so družina proteinov iz skupine nevrotrofičnih dejavnikov, ki uravnavajo preživetje, razvoj in delovanje živčnih celic v osrednjem in perifernem živčevju. V času razvoja omogočajo preživetje, rast in diferenciacijo nevronov ter sodelujejo pri sinaptogenezi. Njihova prisotnost je potrebna tudi v odraslem živčevju, kjer ohranjajo preživetje in fenotip različnih populacij zrelih živčnih celic ter uravnavajo delovanje sinaps in njihovo plastičnost. S preprečevanjem apoptoze in z vlogo pri regeneraciji živčnih celic so vpleteni tudi v patološka stanja, kot so poškodbe živčevja in neurodegenerativne bolezni (35,36).

Pri sesalcih se izražajo štirje nevrotrofini: živčni rastni dejavnik (NGF, angl. nerve growth factor) (37), nevrotrofični dejavnik možganskega izvora (BDNF, angl. brain-derived neurotrophic factor) (38), nevrotrofin-3 (NT-3) (39, 40) in nevrotrofin-4 (NT-4 oz. NT-4/5) (44, 42). Med njimi obstaja visoka stopnja homologije, delijo si podobno molekulsko maso (13,2-15,9 kDa), izoelektrično točko in 50% ujemanje v aminokislinskem zaporedju, skupna jim je tudi strukturna značilnost, t.i. cisteinski vozeli (43).

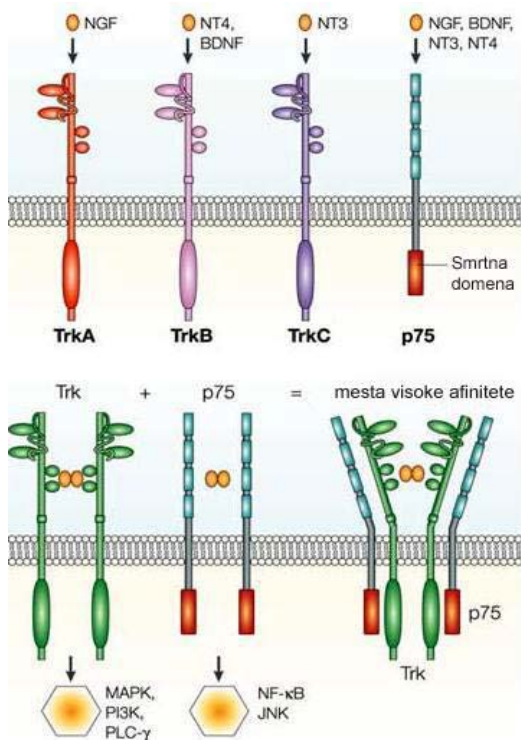
Vir nevrotrofinov so tarčni organi simpatičnega in senzoričnega živčevja ter številni nevroni in glijalne celice osrednjega živčevja. Sproščeni nevrotrofini se vežejo na receptorje na živčnih končičih in lokalno regulirajo oživčenost tarče ter delovanje živčnih končičev. Po privzemu v nevrone potujejo do telesa živčne celice, kjer pospešujejo njeno preživetje in diferenciacijo. Poleg retrogradnega transporta v telesa živčnih celic lahko delujejo tudi anterogradno, avtokrino in parakrino (Slika 5) (35, 44).



Slika 5. Možni izvor trofične podpore. a - retrogradni transport iz tarčnega nevrona, b - avtokrina zanka, c - parakrina podpora iz gljalnih celic, d - anterogradni transport iz aferentnega nevrona. (Prirejeno po (44)).

Izražanje nevrotrofinov je kompleksen proces, saj obstaja več transkripcijskih dejavnikov in promotorskih regij, ki selektivno, glede na mesto izražanja in v odvisnosti od stimulusa, uravnavajo raven transkripcije genov. Čeprav so nekatere translacijske in transkripcijske poti poznane, njihovi medsebojni vplivi še niso popolnoma pojasnjeni. Ali se nevrotrofini izločajo pretežno konstitutivno ali po regulirani poti, se razlikuje glede na vrsto celic (35, 36). Sinteza v živčnih celicah je odvisna od nevrnske aktivnosti, saj izražanje posameznih nevrotrofinov uravnavajo številni živčni prenašalci. Ti so udeleženi tudi pri sintezi nevrotrofinov v neživčnih celicah, npr. astrocitih, kjer je njihova sinteza tudi pod vplivom hormonov, citokinov, drugih mediatorjev vnetja, številnih zdravil ter telesne aktivnosti in prehrane (45, 46, 47). Vpliv posameznih regulatorjev sinteze je specifičen in se razlikuje med posameznimi nevrotrofini.

Ne glede na način transkripcije in translacije so končni rezultat vedno 30-35 kDa veliki prepronevrotrofini, po odcepitvi preprodomene in prodomene pa nastanejo zrele oblike s približno 120 aminokislinami. Znotrajcelična pretvorba pronevrotrofinov ni vedno popolna, zato celice poleg nekovalentno povezanih homodimerov zrelih nevrotrofinov izločajo tudi pronevrotrofine. Včasih je bilo predpostavljeno, da so pronevrotrofini zgolj strukturni predhodniki zrelih proteinom, novejša raziskava pa so pokazale, da imajo tudi pronevrotrofini specifično biološko vlogo, ki je pogosto nasprotna vlogi zrelih nevrotrofinov (35,43).



Slika 6. Receptorji za nevrotrofine. Nevrotrofini izkazujejo svoje učinke preko dveh vrst receptorjev. Receptorji Trk spadajo v družino receptorjev z intrinzično tirozinsko kinazno aktivnostjo, receptor $p75^{NTR}$ pa v družino receptorjev za dejavnik tumorske nekroze. NGF se specifično veže na TrkA, BDNF in NT-4/5 na TrkB in NT-3 na TrkC, vsi pa se s približno enako afiniteto ($K_d \approx 10^{-9} M$) vežejo še na $p75^{NTR}$ (35, 44). Vsak receptor aktivira več znotrajceličnih signalnih poti. Interakcije med $p75^{NTR}$ in Trk receptorji povečajo afiniteto in specifičnost vezave nevrotrofinov na Trk. Pronevrotrofini se vežejo na receptor $p75^{NTR}$, ne pa na Trk receptorje (prirejeno po 48).

1.4. Ogljikov monoksid in astrociti

Akutna zastrupitev s CO vodi do apoptoze in nekroze živčnih in glialnih celic, kar je najverjetnje vzrok poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve. Možganska hipoksija zaradi vezave CO na hemoglobin je znan vzrok nevrotoksičnosti CO, neposredni učinek CO na znotrajcelične tarče možganskih celic pa ostaja slabo poznan. Raziskava na celičnih linijah hipokampalnih živčnih celic miši (HT22) in glialnih celic človeka (D384) je pokazala, da dolgotrajna izpostavljenost CO proži celično smrt z lastnostmi apoptoze (49). 48-urna izpostavljenost 1000 ppm CO v zraku je aktivirala intrinzično mitohondrijsko apoptozno pot z izgubo membranskega potenciala mitohondrijev, sproščanjem citokroma c, aktivacijo kaspaze-3 ter prisotnostjo oksidativnega stresa v obeh tipih proučevanih celic (49). Omenjene mehanizme zastrupitve možganskih celic je potrdila tudi raziskava na astrocitih podgane v celični kulturi (24). Astrociti so bili izpostavljeni 3000 ppm CO v zraku in nato še 24 urni normoksiji, kar je povzročilo oksidativni stres in mitohondrijsko disfunkcijo (24). CO je preko vezave na citokrom c-oksidozno okrnil celično dihanje, kar je poleg povečane sinteze

ROS vodilo v postopno zmanjšanje viabilnosti celic, izgubo membranskega potenciala mitohondrijev in znižanje nivojev ATP. Izgubo mitohondrijske funkcije je spremljala aktivacija kalpainov in kaspaz-8, -9 in -3/7 in s tem proženje ekstrinzičnih in intrinzičnih poti apoptoze (24).

Okrnjeno delovanje astrocitov vpliva na interakcije med astrociti in živčnimi celicami, kar lahko usodno vpliva na njihovo preživetje in regeneracijo. Poškodbe možganskih celic zaradi zastrupitve s CO lahko preprečimo z zdravljenjem s kisikom (12). Raziskava na astrocitih je pokazala, da HBK preko zavrtja pro-apoptotskih dejavnikov ščiti astrocite in ohranja delovanje mitohondrijev. V nasprotju s prejšnjimi raziskavami na podganah (19) se je pokazalo, da NBK nima nobenega učinka pri zastrupitvah s CO. Zanimivo je tudi časovno okno delovanja HBK, saj izpostavitve celic hiperbarični komori takoj po zastrupitvi s CO lahko povzroči povečano tvorjenje ROS, dodaten oksidativni stres in apoptozo preko aktiviranja kaspaze-8 in kaspaze-9. Izpostavljenost HBK več kot 5 ur po zastrupitvi je prav tako škodljivo, saj v tem času apoptotskih procesov ni mogoče več ustaviti. Delovanje hiperbaričnega kisika je najučinkovitejše v času od 1 ure do 5 ur po zastrupitvi s CO (24).

2. NAMEN DELA

Astroцити so celice glije, ki metabolno in trofično podpirajo živčne celice, modulirajo sinaptično aktivnost ter aktivno posegajo v dogodke ob možganskih poškodbah in nevrodegenerativnih obolenjih. Njihovo delovanje močno zavre zastrupitev s CO, ki znižuje viabilnost in mitohondrijsko funkcijo ter proži apoptozo. Škodljive vplive CO preprečuje kisik, pri čemer je njegov učinek odvisen od tlaka in časa, ki je pretekel od zastrupitve s CO (24).

V magistrskem delu bomo preverili naslednji delovni hipotezi:

1. CO/normoksija zavira nevrotrofično aktivnost astrocitov

Astroцити sintetizirajo in sproščajo nevrotrofične dejavnike. Nevrotrofična aktivnost spodbuja preživetje in rast živčnih celic ter ohranja njihov fenotip, zato lahko okrnjeno delovanje astrocitov pospeši nevrodegenerativne procese v osrednjem živčevju. Proučili bomo vpliv izpostavljenosti 3000 ppm CO v zraku in 24-urne normoksije na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje nevrotrofinov NGF, BDNF in NT-3 v astrocitih podgane.

2. Vpliv kisika na nevrotrofično aktivnost astrocitov po izpostavitvi CO/normoksiji je odvisen od tlaka in časa, ki je pretekel od zastrupitve s CO

Poškodbe možganskih celic, ki nastanejo zaradi zastrupitve s CO, lahko preprečimo z zdravljenjem s kisikom. Hiperbarični kisik učinkovito zmanjšuje škodljivi vpliv CO/normoksije na astroците, saj zavre pro-apoptotske procese in oksidativni stres ter spodbudi delovanje mitohondrijev (24). Proučili bomo vlogo kisika pri različnih tlakih (1 bar, 3 bari) in v različnih časovnih obdobjih (0 do 7 ur) po izpostavitvi 3000 ppm CO v zraku pri ohranjanju genskega izražanja, sinteze in sproščanja nevrotrofinov NGF, BDNF in NT-3 v astrocitih novorojene podgane.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

za pripravo celičnih kultur:

- Leibowitzev medij L-15
- Dulbeccov modificiran Eeaglov medij s Hamovo hranilno mešanico F-12 (1:1) (DMEM/F12)
- fetalni goveji serum (FBS)
- penicilin-streptomycin (10.000 IU/ml – 10.000 UG/ml) (P/S)
- fosfatni pufer z NaCl, pH 7,4 (10x) (PBS)
- Dulbeccov fosfatni pufer z NaCl (10x) (DPBS)
- 2,5 % tripsin (10x)
(vse Gibco, Life Technologies, Carlsbad, ZDA)
- natrijev hidrogenkarbonat za celične kulture (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA)
- steklenice in petrijevke za gojenje celičnih kultur (NUNC, Roskilde, Danska)

za encimsko-immunske metode:

- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu NT-3
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu NT-3
- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu NGF
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu NGF
- monoklonsko mišje protitelo proti človeškemu BDNF
- z biotinom označeno kozje protitelo proti človeškemu BDNF
- rekombinantni človeški NT-3 (rh NT-3)
- rekombinantni človeški BDNF (rh BDNF)
- rekombinantni podganji beta-NGF (rr NGF)
- streptavidin, konjugiran s hrenovo peroksidazo
- stabiliziran vodikov peroksid (barvni reagent A)
- stabiliziran tetra-metilbenzidin (barvni reagent B)
(vse R&D Systems, Minneapolis, ZDA)

- H₂SO₄ 96% (*Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija*)
- goveji serumski albumin (BSA), saharoza, natrijev azid (NaN₃), Triton X-100, Trizma baza, natrijev klorid (NaCl), fenilmetil-sulfonil florid (PMSF), *N*-etilmaleimid (NEM), kalcijev klorid (CaCl₂), EDTA (vse *Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA*)
- Tween 20 (*Promega Corporation, ZDA*)
- plošče za encimsko-immunske poskuse (*NUNC, Roskilde, Danska*)
- BIO-RAD komplet za določevanje proteinov (*Bio-Rad Laboratories, München, Nemčija*)

za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR):

- raztopina za stabilizacijo RNA (RNAlater)
- voda brez nukleaz
- komercialni komplet za izolacijo mRNA (RNAqueous-Micro kit)
(vse *Ambion, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)
- reagent za reverzno transkripcijo (High Capacity Reverse Transcription Reagent)
- TaqMan sonde (Rn01533871_ml, Rn01484924_ml, Rn00579280_ml, Rn00667869_ml)
- univerzalna mešanica za ekspresijo genov (Gene Expression Master Mix)
- optične plošče za qRT-PCR (96 luknjic)
(vse *Applied BioSystems, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*)

Poskusne živali:

Za pripravo celičnih kultur smo uporabili novorojene (1-3 dni stare) Wistar podgane, vzgojene v Medicinskem eksperimentalnem centru Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Usmrtitev živali smo priglasili na Veterinarsko upravo Republike Slovenije (potrdilo št. 34401-87/2008/3).

3.2 Metode

3.2.1. Priprava primarnih celičnih kultur astrocitov novorojenih podgan

Reagenti:

500 mL DMEM medija	
6 g	DMEM/F-12
1,219 g	NaHCO ₃
500 mL	ddH ₂ O

100 mL 10x EDTA (10mM)	
0,372 g	EDTA
100 mL	DPBS

40 mL 0,25 % raztopine tripsina	
4 mL	2,5% tripsina
36 mL	DPBS/EDTA

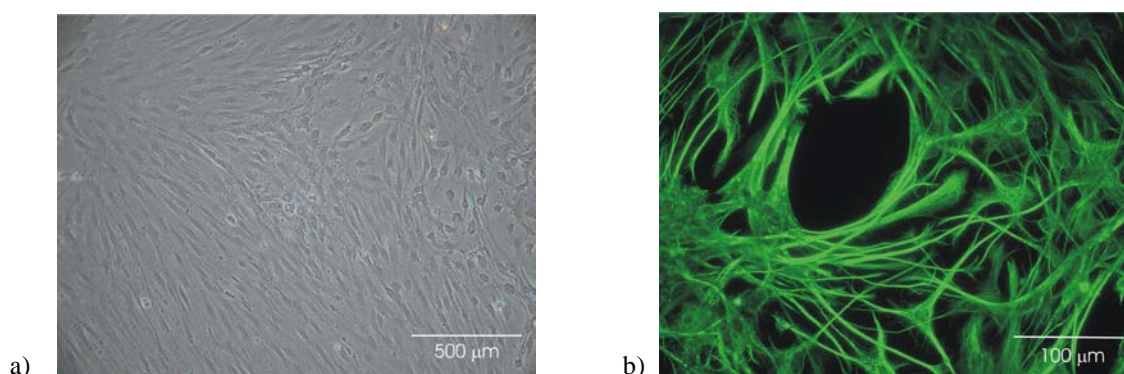
100 mL inkubacijskega medija:	
89 mL	DMEM medija
10 mL	FBS
1 mL	P/S

100 mL DPBS/EDTA	
10 mL	10x EDTA
90 mL	DPBS

Postopek:

Primarne kulture astrocitov možganske skorje novorojene podgane smo pripravili po metodi, opisani v Mele in Jurič, 2013 (50). Novorojene (1-3 dni stare) podgane smo žrtvovali z dekapitacijo in jim aseptično odvzeli možgane. Po odstranitvi možganskih ovojnic smo možgansko skorjo ločili od preostalih možganov in skozi sterilno najlonsko mrežico (premer

por 75 μm) tkivo mehansko razdružili v inkubacijski medij. Celice smo v 75 cm^2 steklenicah za celične kulture gojili do stanja 70-80 % konfluentnosti v vlažni atmosferi s 5% CO_2 in 95% zraka pri konstantni temperaturi 37°C. Po treh ciklih stresanja čez noč na 200 obratih/min smo celice s pomočjo 0,25 % raztopine tripsina presadili v nove steklenice za gojenje celičnih kultur ter jih v enakih razmerah gojili do konfluentnosti (10 - 14 dni) (Slika 7).



Slika 7: Primarna celična kultura astrocitov možganske skorje podgane. Fotografija nativnega preparata (a) in fotografija preparata, označenega s protitelesi proti GFAP (b) (imunocitokemija je delo dr. Klare Bulc Rozman z Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani).

Celice smo nato presadili na petrijevke ($\text{Ø} = 35$ ali 100 mm), jim četrty dan v kulturi zamenjali medij s svežim medijem brez dodatka seruma ter jih 24 ur kasneje izpostavili CO_2 , 100 % kisiku ali standardnim razmeram.

3.2.2. Izpostavitvev celičnih kultur ogljikovemu monoksidu

Astrocite možganske skorje podgane smo izpostavili mešanici 3000 ppm CO in 5 % CO_2 v zraku za različno dolga časovna obdobja, od 30 minut do 24 ur, v inkubatorju, ki smo ga v našem laboratoriju priredili za izpostavljanje celic različnim plinskim mešanicam (modificiran inkubator New Brunswick Scientific). Uporabili smo plinsko mešanico 3000 ppm CO (0,3 %) in zraka, ki jo pripravlja Messer in smo jo uspešno uporabili v prejšnjih *in vitro* in *in vivo* poskusih (23, 24, 25, 51). Razmerje plinov v inkubatorju je bilo ves čas poskusov enako. Po izpostavitvi CO smo celice za 24 ur vrnili v inkubator s standardnimi razmerami. Kontrolne celice smo inkubirali v standardnih razmerah.

3.2.3. Izpostavitev celičnih kultur normobaričnem in hiperbaričnemu kisiku

V nadaljevanju študije smo celice, ki so bile 8 ur izpostavljene CO, v času 24-urne normoksije v različnih časovnih intervalih (0-7 ur po CO) za 1 uro prestavili v hiperbarično komoro, prirejeno za celične kulture, kjer smo jih izpostavili 100 % kisiku pri tlaku 1 bar (normobarični kisik - NBK) ali tlaku 3 barov (hiperbarični kisik - HBK). Po izpostavljanju kisiku smo celice vrnili v inkubator s standardnimi razmerami ter poskus zaključili 24 ur po zastrupitvi s CO.

Po končani inkubaciji smo odpipetirali medij, celice sprali z ledeno mrzlim PBS, jih postrgali ter celično suspenzijo centrifugirali 7 min pri 12.000 obr./min pri temperaturi 4°C. Supernatant smo odlili, usedlino celic in celični medij pa smo do nadaljnjih poskusov shranili pri -70°C.

3.2.4 Priprava vzorcev za encimsko-immunske poskuse

Reagenti:

puferna raztopina X:
50 mM Tris-HCl (pH 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1%, Triton X-100
0,5% NaN ₃ v dd H ₂ O

puferna raztopina Y:
50 mM Tris-HCl (pH 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1 % Triton X-100
0,5 % NaN ₃
10 % BSA v dd H ₂ O
inhibitorji proteaz, dodani tik pred uporabo: 1 mM EDTA, 1 mM NEM in 1 mM PMSF

Postopek:

Celice v celični usedlini smo odtalili in jim dodali 1 mL puferne raztopine X. Z ultrazvočnim razbijalcem smo celice 10 s razbijali z močjo približno 1,5 W. Za določitev celokupnih celičnih proteinov smo alikvote vzorcev (5 µL) odpipetirali na mikrotitersko ploščo.

Vzorcem razbitih celic smo dodali 10 % puferne raztopine Y ter jih centrifugirali

30 min pri 23.000 obr./min pri 4°C in supernatant do izvedbe encimsko-immunskih testov hranili pri -70°C.

3.2.5 Določitev celokupnih proteinov v vzorcih

Za vsak vzorec za analizo nevrotrofinov smo v alikvotu (5 µl) homogenatov ultrazvočno razbitih celic določili količino celokupnih proteinov, saj smo vsebnost celičnih nevrotrofinov izrazili v pg/mg proteina. Celokupne celične proteine smo določili spektrofotometrično na mikrotiterski plošči z metodo po Bradfordu (52) s kompletom BIO-RAD. Za umeritveno krivuljo smo uporabili goveji serumski albumin v koncentraciji od 0 – 50 µg/mL. Absorbanco vzorcev in standardov smo merili pri valovni dolžini 585 nm s čitalcem za mikrotiterske plošče (*SynergyHT*, *Bio Tek*, *Winooski*, *ZDA*). Koncentracijo proteinov smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo napravili na vsaki mikrotiterski plošči posebej.

3.2.6. Encimsko-immunske metode za kvantitativno določevanje nevrotrofinov

Za določitev celične vsebnosti nevrotrofinov v astrocitih podgane in nivojev njihovega sproščanja smo uporabili encimsko-immunske metode (ELISA), ki smo jih razvili in optimizirali v našem laboratoriju (46, 47). Uporabili smo parne sisteme protiteles in standarde proizvajalca R&D Systems, *ZDA*, ki so omogočili specifično in kvantitativno določitev NGF, BDNF in NT-3 proteinov v vzorcih.

Reagenti:

puferna raztopina A:
50 mM Tris HCl (pH 7,0)
200 mM NaCl
10 mM CaCl ₂
0,1 % Triton X-100
0,5 % NaN ₃
1% BSA v ddH ₂ O

puferna raztopina D:
0,1 % BSA
0,02 % NaN ₃
0,05 % Tween 20 v PBS

puferna raztopina B:
0,05% Tween 20 v PBS

puferna raztopina E:
1 % BSA v PBS

puferna raztopina C:
1 % BSA
5 % saharoze
0,05 % NaN ₃ v PBS

Priprava standardov za umeritvene krivulje:

Za vsak ELISA test smo na vsaki posamezni mikrotiterski plošči izdelali umeritveno krivuljo za določitev nivojev nevrotrofinov. Za standard smo uporabili rrNGF, rhBDNF ali rhNT-3, ki smo jih ustrezno razredčili (0 – 375 pg/mL) v puferni raztopini A. Ustrezne razredčitve standardov smo hkrati v vzorci nanesti na mikrotiterske plošče.

Protokol NGF, BDNF in NT-3 ELISA:

1. na ploščo za encimsko-immunski test (96 luknjic) smo nanegli 100 μL /luknjico primarnega monoklonskega protitelesa proti nevrotrofinom v PBS in inkubirali čez noč pri 4°C;
2. ploščo smo trikrat sprali s puferno raztopino B;
3. za preprečitev nespecifične vezave smo nanegli 300 μL /luknjico puferne raztopine C in čez 1 uro ploščo sprali s puferno raztopino B;
4. v luknjice smo v dveh paralelkah nanegli po 100 μL standardnih raztopin oziroma vzorcev in inkubirali 1,5 ure pri 37°C;
5. po spiranju s puferno raztopino B smo na ploščo nanegli 100 μL /luknjico z biotinom označenih sekundarnih protiteles proti nevrotrofinom v puferni raztopini D in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi;
6. ploščo smo sprali s puferno raztopino B in za 20 min dodali 100 μL /luknjico streptavidina, konjugiranega s hrenovo peroksidazo (1,25 mg/mL v puferni raztopini E);
7. po ponovnem spiranju z raztopino B smo dodali substrat (1:1 mešanica stabiliziranega peroksida in kromogena) in po 20-30 min ustavili encimsko reakcijo z dodatkom 50 μL H_2SO_4 ;
8. absorbanco obarvanega produkta smo merili spektrofotometrično v roku 15 min pri 450 nm s korekcijo pri 540 nm s čitalcem za mikrotiterske plošče (*SynergyHT*, *BioTek*, *Winooski ZDA*);
9. koncentracijo nevrotrofinov smo izračunali iz umeritvene krivulje.

Med seboj smo primerjali koncentracijo specifičnega nevrotrofina/mg celokupnih celičnih proteinov v kontrolnih in tretiranih celicah.

3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qRT-PCR)

Izolacija skupne RNA

Za izolacijo skupne RNA smo uporabili komercialni komplet RNAqueous-Micro kit (*Ambion, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*), ki vsebuje:

lizni pufer
reagent za spiranje A
reagent za spiranje B
raztopina za izpiranje RNA
mikropruvete
kolone za lovljenje RNA
DNaza pufer 1 (10x)
DNaza 1
DNaza inaktivacijski reagent

Postopek:

1. vzorce, shranjene v RNAlater, smo centrifugirali 5 min pri 7000 obr./min ter odlili supernatant;
2. celicam smo dodali 100 μ L liznega pufra in jih temeljito premešali;
3. dodali smo 50 μ L absolutnega etanola, temeljito premešali in nanесли mešanico na kolone za lovljenje RNA;
4. vzorce smo centrifugirali 10 s pri 13.000 obr./min in nato sprali s 180 μ L reagenta za spiranje A;
5. vzorce smo centrifugirali 10 s pri 13.000 obr./min in jih sprali s 180 μ L reagenta za spiranje B ter postopek ponovili;

6. vzorcem smo dodali 10 μL raztopine za izpiranje (segrete na 75°C), jih za 1 minuto pustili na sobni temperaturi in nato centrifugirali 30 s pri 12.000 obr./min ter postopek ponovili;
7. vzorcem smo nato dodali 2 μL 10x DNaza pufra in 1 μL encima DNaza ter inkubirali 20 min pri 37°C ;
8. po inkubaciji smo dodali 2 μL DNaza inaktivacijskega reagenta, pustili 2 min na sobni temperaturi in centrifugirali 1,5 min pri 13.000 obr./min;
9. vzorce smo prenesli v sveže mikroeprovete in jih do nadaljnjih poskusov shranili pri -70°C .

Obratna transkripcija

Za obratno transkripcijo smo uporabili High Capacity Reverse Transcription reagent (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*), ki vsebuje:

pufer za obratno transkripcijo (10x)
deoksiribonukleozid-5'trifosfat (dNTP) (25x)
naključne začetne oligonukleotide (10x)
encim MultiScribe
RNazni inhibitor
sterilna voda brez nukleaz

Postopek:

1. 10 μL vzorca (izolirana RNA) smo dodali:

2 μL	pufra za obratno transkripcijo (10x)
0,8 μL	dNTP(25x)
2 μL	naključnih začetnih oligonukleotidov (10x)
1 μL	encima MultiScribe
1 μL	inhibitorja RNaze
3,2 μL	voda brez nukleaz

2. vzorce smo inkubirali v pomnoževalniku DNA (*GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, ZDA*) po programu:

temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
čas	10 min	120 min	5 min	∞

3. do nadaljnjih poskusov smo vzorce shranili pri - 70°C.

qRT-PCR reakcija

qRT-PCR reakcijo smo izvedli za NGF, BDNF, NT-3 in beta-aktin (hišni gen) z uporabo TaqMan sond (Rn01533871_ml, Rn01484924_m1, Rn00579280_m1 in Rn00667869_m1) (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*). Za vsak vzorec smo pripravili dve različni razredčitvi cDNA.

Za vsak analiziran gen smo zmešali (za 1 vzorec):

0,5 µL	TaqMan sonde
5 µL	TaqMan univerzalne mešanice za ekspresijo genov
2,5 µL	vode brez nukelaz

Na optično ploščo (96 luknjic) smo odpipetirali po 2 µL vzorca cDNA in 8 µL mešanice. Plošče smo pokrili s samolepljivo folijo in jih 2 min centrifugirali pri 1000 g. Pomnoževanje, detekcijo in kvantifikacijo cDNA smo izvedli na ABI PRISM 7500 Fast (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, ZDA*) z univerzalnim protokolom pomnoževanja (2 min pri 50 °C, 10 min pri 96 °C in 40 ciklov pomnoževanja, ki so sestavljeni iz 15 sekund pri 95 °C in 1 minute pri 60 °C).

Za analizo podatkov smo uporabili primerjalno Ct metodo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, kjer je $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,\text{tretiranih}} - \Delta C_{t,\text{kontrolnih}}$). Za vsak vzorec smo fluorescenčni prag (cycle threshold - Ct) za tarčni gen normalizirali na endogeno kontrolo (beta-aktin) (=ΔCt). Povišanje mRNA nevrotrofinov smo izrazili s faktorjem vzorec/kontrola.

3.2.8 Statistična obdelava podatkov

Vse poskuse smo ponovili vsaj trikrat v 3-5-tih paralelkah. Rezultate smo obdelali s pomočjo računalniškega programa GraphPad Prism za okolje Windows (*GraphPad Software, San Diego, ZDA*), predstavili pa smo jih s srednjo vrednostjo in standardno napako ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Statistično značilnost smo preverili z neparnim t-testom (Studentovim t-testom) ali z analizo variance (ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom. Za mejo statistične značilnosti smo uporabili vrednost $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1 Vpliv CO/normoksije na nevrotrofično aktivnost astrocitov

Astrocite možganske skorje novorojenih podgan smo od 30 min do 24 ur inkubirali v prirejenem inkubatorju v prisotnosti 3000 ppm CO v zraku, nato pa jih za 24 ur vrnili v inkubator s standardnimi razmerami (normoksija). Ugotovili smo, da CO/normoksija poleg postopnega zmanjševanja viabilnosti in mitohondrijske funkcije celic ter proženja apoptotskih procesov (24) v astrocitih povzroča tudi postopno zaviranje sinteze nevrotrofinov. Vpliv je odvisen od časa izpostavljenosti CO in se razlikuje med proučevanimi nevrotrofini.

4.1.1 NGF

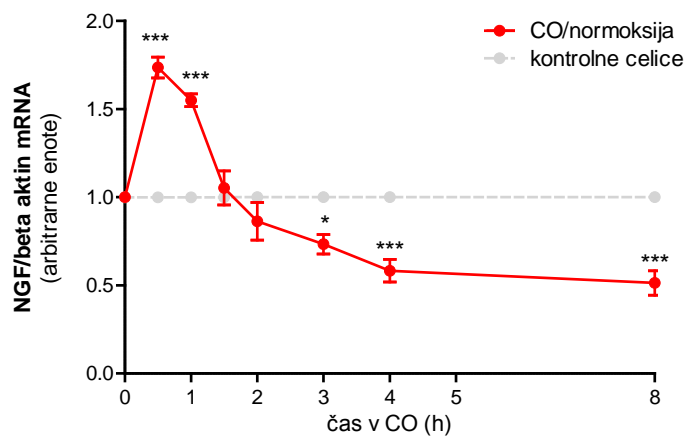
Izpostavljenost astrocitov 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji je povzročila hitro in prehodno povečanje izražanja NGF. Značilno, 1,7-kratno povišanje nivojev NGF mRNA smo opazili že po 30 min inkubacije v CO, koncentracija NGF mRNA je bila tudi v naslednjih 30 min še vedno 1,5-krat višja kot v kontrolnih celicah (Slika 8a). Spodbudni vpliv CO/normoksije je nato izzvenel, po 3 urah inkubacije smo zaznali značilen, 26,7 % padec izražanja NGF. Največji učinek CO/normoksije smo opazili po 8-urni inkubaciji, ko je bila koncentracija NGF mRNA za 48,7 % nižja kot v celicah, ki niso bile izpostavljene CO (Slika 8a).

Manjši sposobnosti izražanja NGF je časovno sledila nižja koncentracija NGF proteina v astrocitih, ki so bili izpostavljeni CO/normoksiji. V prvih 4 urah nismo zaznali padca znotrajcelične vsebnosti, 6-urna inkubacija v CO/normoksiji pa je povzročila značilen padec znotrajceličnega proteina. Največji učinek CO/normoksije smo opazili po 8-urni inkubaciji,

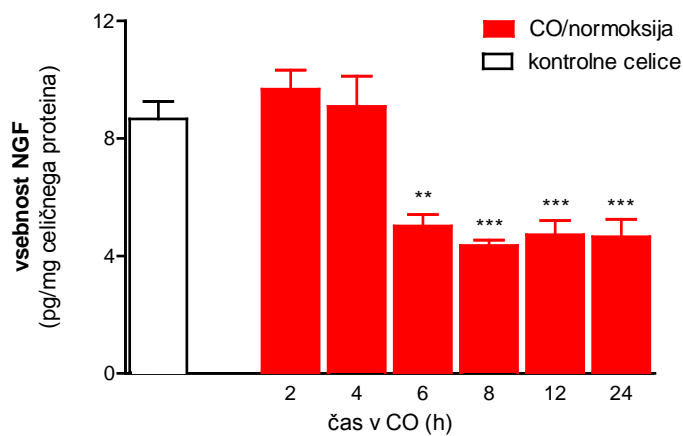
ko so celice vsebovale $4,4 \pm 0,2$ pg NGF/mg proteinov, kar predstavlja 49,5 % padec glede na kontrolne celice ($8,7 \pm 0,6$ pg NGF/mg proteinov) (Slika 8b).

Izpostavljenost astrocitov 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji je povzročila prehodno obsežno sproščanje NGF. Največjo količino sproščenega NGF smo izmerili po 2-urni inkubaciji v CO/normoksiji, ko je bila koncentracija NGF v celičnem mediju 3,3-krat višja od

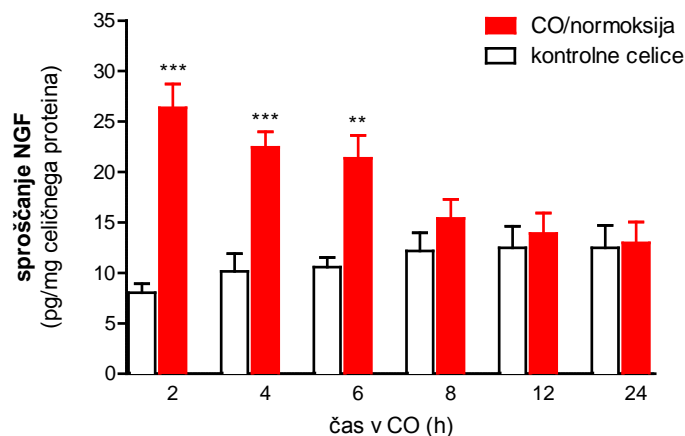
a)



b)



c)



Slika 8. Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje (a), znotrajcelično vsebnost (b) in sproščanje (c) NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan. NGF mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje NGF smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Vsebnost in sproščanje NGF smo določili z NGF ELISO, bazalna vrednost NGF proteina v celicah je bila $8,7 \pm 0,6$ pg NGF/mg proteinov. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom (izražanje NGF) oz. z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$.

koncentracije v kontrolnih celicah (Slika 8c). Po 4-urni izpostavljenosti CO je bila koncentracija NGF 2,2-krat večja, 2 uri kasneje pa še vedno 2-krat večja od koncentracije v netretiranih celicah. Spodbudni vpliv CO/normoksije je nato izzvenel, nivoji sproščenega NGF se v celicah, ki so bile 8 ali več ur izpostavljene eksperimentalnim razmeram, niso razlikovali od kontrolnih celic, prav tako nismo zaznali padca sproščanja NGF, ki bi bilo nižje od sproščanja v kontrolnih celicah (Slika 8c).

4.1.2 BDNF

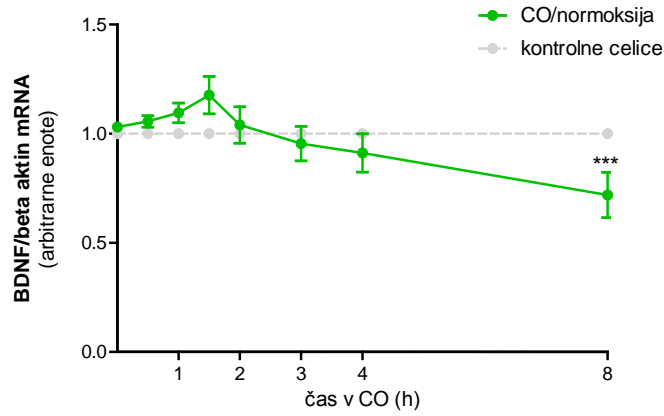
Inkubacija astrocitov novorojenih podgan v 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji je vplivala na izražanje BDNF, vendar je bil učinek v primerjavi z NGF manjši. Značilen padec nivojev BDNF mRNA smo tako zaznali šele po 8-urni izpostavljenosti celic CO/normoksiji, ko so vsebovale 29,0 % manj izraženega BDNF kot celice, ki niso bile izpostavljene CO (Slika 9a).

Nekoliko manjša sposobnost izražanja BDNF se je odražala v nižji koncentraciji BDNF proteina v astrocitih, ki so bili izpostavljeni CO/normoksiji. V prvih 4 urah inkubacije padca znotrajcelične vsebnosti BDNF nismo zaznali, 2 uri kasneje pa smo izmerili značilno, 28,0 % nižjo koncentracijo tega nevrotrufina. Največji učinek CO/normoksije smo, tako kot pri NGF,

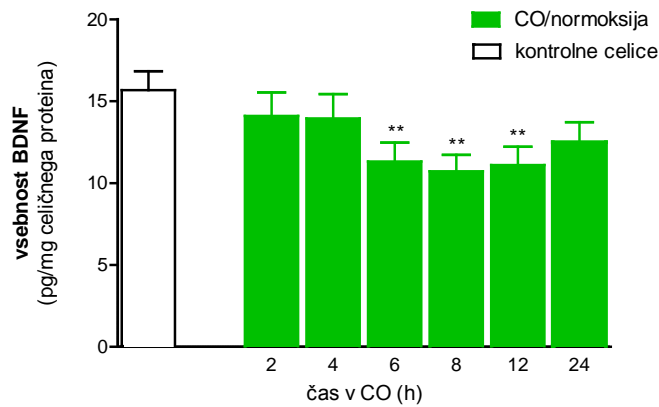
opazili po 8-urni inkubaciji, ko so celice vsebovale $10,7 \pm 1,0$ pg BDNF/mg proteinov, kar predstavlja 31,8 % nižjo koncentracijo BDNF kot v kontrolnih celicah ($15,7 \pm 1,1$ pg BDNF/mg proteinov) (Slika 9b). Zaviralni učinek CO/normoksije je sčasoma izzvenel, saj smo v celicah, ko so bile 24 ur izpostavljene eksperimentalnim razmeram, izmerili koncentracijo BDNF, ki se statistično ni razlikovala od koncentracije BDNF v kontrolnih celicah.

Izpostavljenost astrocitov 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji ni vplivala na sproščanje BDNF. Pri merjenju zunajceličnih koncentracij namreč nismo zaznali nobene statistično značilne razlike med celicami, ki so bile izpostavljene CO/normoksiji in tistimi, ki smo jih inkubirali v standardnih razmerah (Slika 9c).

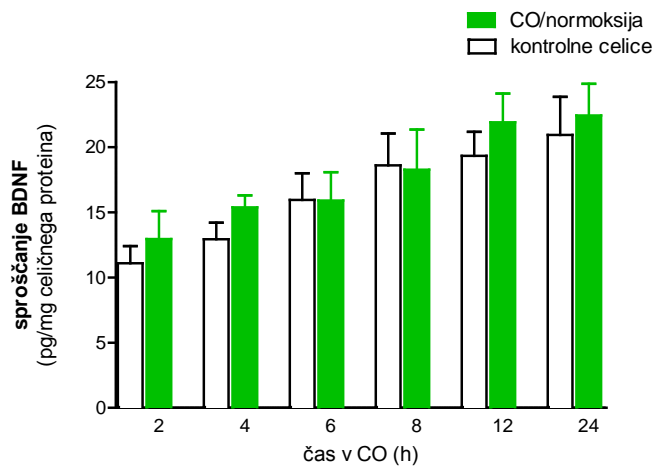
a)



b)



c)



Slika 9. Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje (a), znotrajcelično vsebnost (b) in sproščanje (c) BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan. BDNF mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje BDNF smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Vsebnost in sproščanje BDNF smo določili z BDNF ELISO, bazalna vrednost BDNF proteina v celicah je bila $15,7 \pm 1,1$ pg BDNF/mg proteina. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom (izražanje BDNF) oz. z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ in ** $p < 0,01$.

4.1.3 NT-3

Inkubacija astrocitov novorojenih podgan v 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji je vplivala tudi na sintezo NT-3. Opazili smo postopno zaviranje izražanja NT-3, pri čemer smo značilni padec NT-3 mRNA zaznali po 3-urni izpostavljenosti celic CO/normoksiji, največji učinek pa po 8 urah, ko so celice vsebovale 46,2 % manj izraženega NT-3 kot celice, ki niso bile izpostavljene CO (Slika 10a).

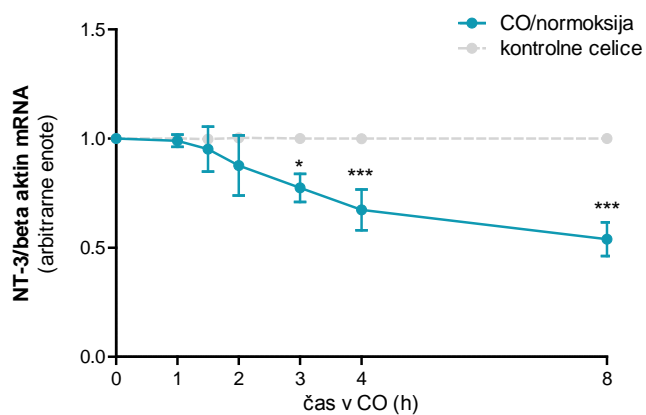
Zmanjšana sposobnost izražanja NT-3 v astrocitih se je odrazila v časovno odvisnem zniževanju znotrajcelične koncentracije NT-3 proteina. Značilen padec nivojev NT-3 po 4 urah inkubacije se je postopno povečeval tako, da so po 8-urni izpostavljenosti CO/normoksiji celice vsebovale $9,9 \pm 0,7$ pg NT-3/mg proteinov, kar predstavlja 48,5 % nižjo koncentracijo NT-3 kot v kontrolnih celicah ($19,2 \pm 1,1$ pg NT-3/mg proteinov) (Slika 10b).

Zaviralni učinek CO/normoksije s časom ni izzvenel, saj smo v celicah, ko so bile 24 ur izpostavljene eksperimentalnim razmeram, izmerili $7,5 \pm 1,6$ pg NT-3/mg proteinov, kar predstavlja 62,0 % nižjo koncentracijo NT-3 kot v kontrolnih celicah (Slika 10b).

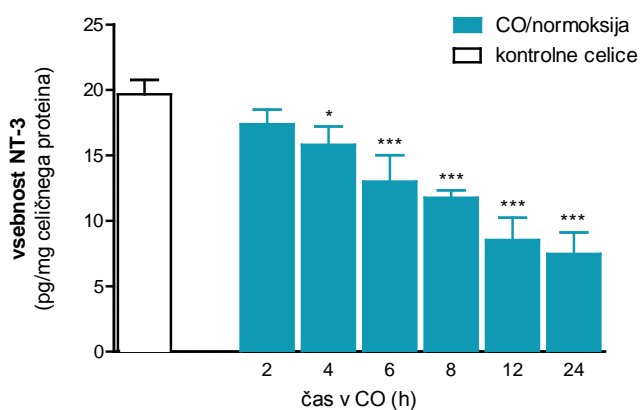
Izpostavljenost astrocitov 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji pa ni vplivala na sproščanje NT-3. Pri merjenju zunajceličnih koncentracij tudi pri NT-3 nismo opazili nobene statistično značilne razlike med celicami, ki so bile izpostavljene CO/normoksiji in tistimi, ki smo jih inkubirali v standardnih razmerah (Slika 10c).

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da daljša izpostavljenost astrocitov novorojenih podgan visokim koncentracijam CO in 24-urni normoksiji postopno zavre sposobnost genskega izražanja in sinteze nevrotrofinov, na njihovo sproščanje pa v danih časovnih okvirih vpliva le deloma. Največji učinek škodljivega delovanja CO/normoksije smo zaznali po 8-urni izpostavljenosti CO, zato smo v nadaljevanju raziskave astrocite izpostavili 3000 ppm CO za 8 ur.

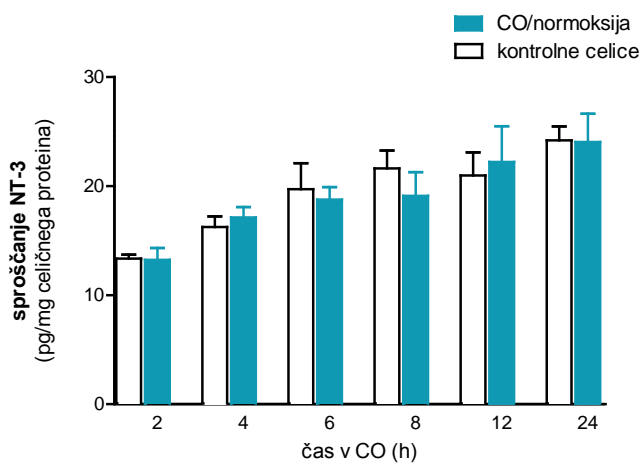
a)



b)



c)



Slika 10. Vpliv CO/normoksije na gensko izražanje (a), znotrajcelično vsebnost (b) in sproščanje (c) NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan. NT-3 mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje NT-3 smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Vsebnost in sproščanje NT-3 smo določili z NT-3 ELISO, bazalna vrednost NT-3 proteina v celicah je bila $19,7 \pm 1,1$ pg NT-3/mg proteina. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom (izražanje NT-3) oz. z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom in je označena kot *** $p < 0,001$ in * $p < 0,05$.

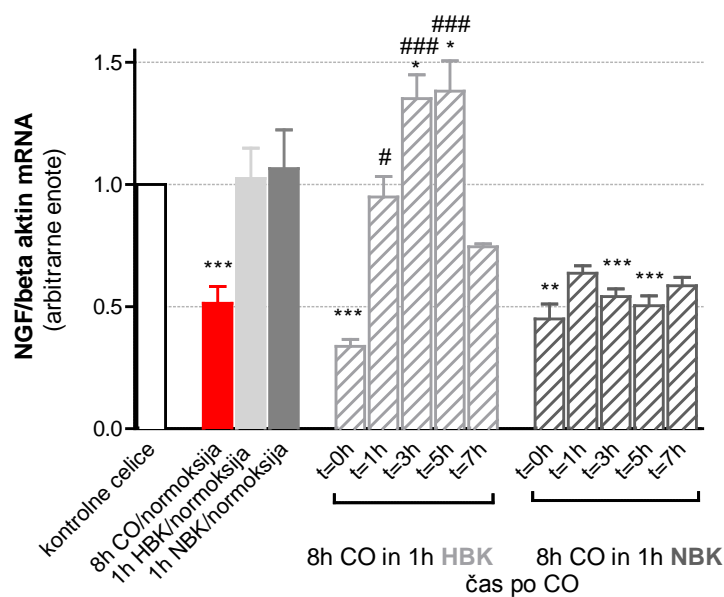
4.2 Vpliv normobaričnega in hiperbaričnega kisika na nevrotrofično aktivnost astrocitov po izpostavitvi CO/normoksiji

Akutne zastrupitve s CO zdravimo s 100% kisikom pri tlaku 1 bar (normobarično, NBK) ali pri tlaku 3 barov v hiperbarični komori (hiperbarično, HBK). V nadaljevanju raziskave smo želeli preveriti učinkovitost kisika pri zmanjšanju škodljivih vplivov CO/normoksije na nevrotrofično aktivnost astrocitov. Astroците možganske skorje novorojene podgane smo 8 ur inkubirali v prirejenem inkubatorju v prisotnosti 3000 ppm CO, nato pa jih v obdobju 24-urne normoksije v različnih časovnih intervalih (0, 1, 3, 5 ali 7 ur po CO) za 1 uro prestavili v posebno hiperbarično komoro, prirejeno za celične kulture, kjer smo jih izpostavili NBK in HBK.

4.2.1 NGF

8-urna izpostavljenost astrocitov CO in nato 24-urni normoksiji je zavrla gensko izražanje in sintezo NGF (Slika 8). Inkubacija celic v hiperbarični komori je pokazala spodbudni vpliv HBK na znižane nivoje NGF mRNA, ki pa je bil odvisen od časa, ki je pretekel med izpostavljenostjo CO in tretiranjem s kisikom. Takojšnja inkubacija celic v HBK (t=0 h) je povzročila neznačilen padec NGF mRNA, izpostavljenost HBK v času od 1 ure do 5 ur po CO pa je spodbudila gensko izražanje NGF, ki je v primeru 3 in 5 ur po CO značilno, 1,3-krat in 1,5-krat, preseglo nivoje izražanja v kontrolnih celicah (Slika 11). Kasnejše tretiranje celic s HBK (7 h po CO) ni imelo več spodbudnega vpliva na izražanje NGF. V nasprotju s HBK pri inkubaciji celic v NBK nismo zaznali statistično pomembnih razlik v izražanju NGF v primerjavi s celicam, izpostavljenimi samo 8 h CO/normoksiji (Slika 11).

Hkrati z vplivom na gensko izražanje HBK spodbuja tudi sintezo NGF (Slika 12a). Po tretiranju s HBK so imele celice v vseh časovnih intervalih po izpostavitvi CO značilno višjo vsebnost NGF kot po 8-urni CO/normoksiji. Največji učinek smo zaznali po inkubaciji celic v HBK 3 ure po zastrupitvi s CO, kjer je koncentracija NGF znašala $11,1 \pm 1,1$ pg NGF/mg proteinov, kar je 2,5-krat preseglo znotrajcelični nivo NGF po 8-urni CO/normoksiji ($4,4 \pm 0,2$ pg NGF/mg proteinov) ter za 1,3-krat tudi nivoje NGF proteina v kontrolnih celicah (Slika 12a).

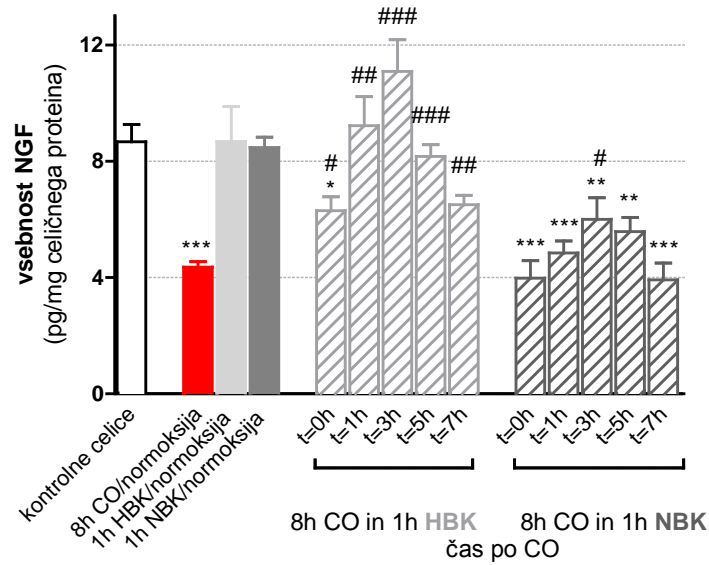


Slika 11. Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. NGF mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje NGF smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$.

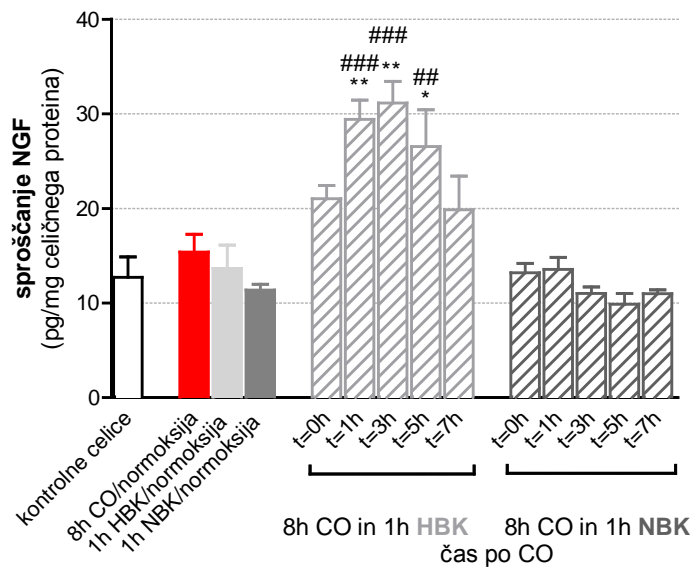
Sintezo NGF v astrocitih je nekoliko spodbudila tudi inkubacija celic v NBO. Značilno višji znotrajcelični nivo NGF po 8-urni CO/normoksiji je povzročil normobarični kisik 3 ure po CO, ko so celice vsebovale $6,0 \pm 0,7$ pg NGF/mg proteinov, vendar pa je bila ta koncentracija še vedno značilno nižja od koncentracije NGF v kontrolnih celicah (Slika 12a).

Izpostavljenost astrocitov 3000 ppm CO v zraku in 24-urni normoksiji je povzročila prehodno obsežno sproščanje NGF, ki pa je s časom izzvenelo in se v celicah, ki so bile 8 ali več ur izpostavljene eksperimentalnim razmeram, ni več razlikovalo od sproščanja v kontrolnih celicah (Slika 8c). Inkubacija celic v hiperbarični komori je pokazala časovno odvisen spodbudni vpliv HBK na sproščanje NGF, ki je v primeru 1 in 3 ur po CO značilno, 1,9-krat in 2,1-krat preseglo koncentracijo sproščenega NGF v kontrolnih celicah (Slika 12b). Kasnejše tretiranje celic s HBK (7 ur po CO) ni imelo več spodbudnega vpliva na sproščanje NGF. Pri inkubaciji celic v NBK nismo zaznali vpliva na sproščanje NGF iz astrocitov v primerjavi s celicam, izpostavljenimi samo 8-urni CO/normoksiji (Slika 12b).

a)



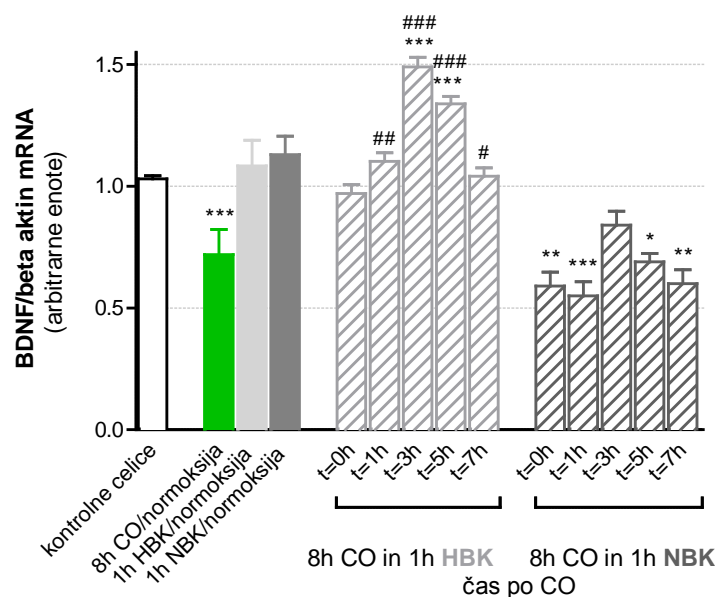
b)



Slika 12. Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost (a) in sproščanje (b) NGF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. Vsebnost in sproščanje NGF smo določili z NGF ELISO. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ in * $p<0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p<0,001$, ## $p<0,01$ in # $p<0,05$.

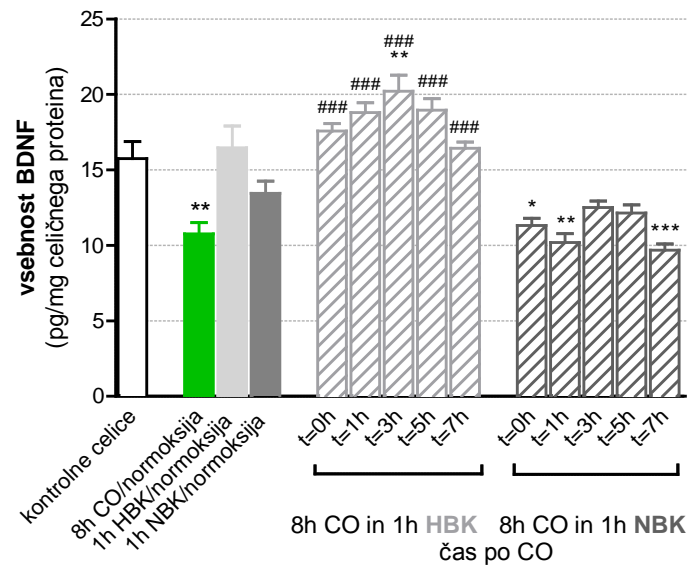
4.2.2 BDNF

8-urna izpostavljenost astrocitov CO in nato 24-urni normoksiji je zavrla izražanje BDNF, saj so celice vsebovale 29,0 % manj BDNF mRNA kot celice, ki niso bile izpostavljene CO/normoksiji (Slika 9a). Učinek hiperbarične komore je bil, tako kot pri NGF, odvisen od časa, ki je pretekel med inkubacijo v CO in tretiranjem s kisikom. Izpostavljenost HBK v času od 1 do 7 ur po CO je spodbudila gensko izražanje BDNF, ki je v primeru 3 in 5 ur po CO značilno, 1,5-krat in 1,3-krat, preseгло nivoje izražanja v kontrolnih celicah (Slika 13). V nasprotju s HBK inkubacija celic v NBK ni pokazala statistično pomembnih razlik v izražanju BDNF v primerjavi s celicami, izpostavljenimi samo 8-urni CO/normoksiji (Slika 13).

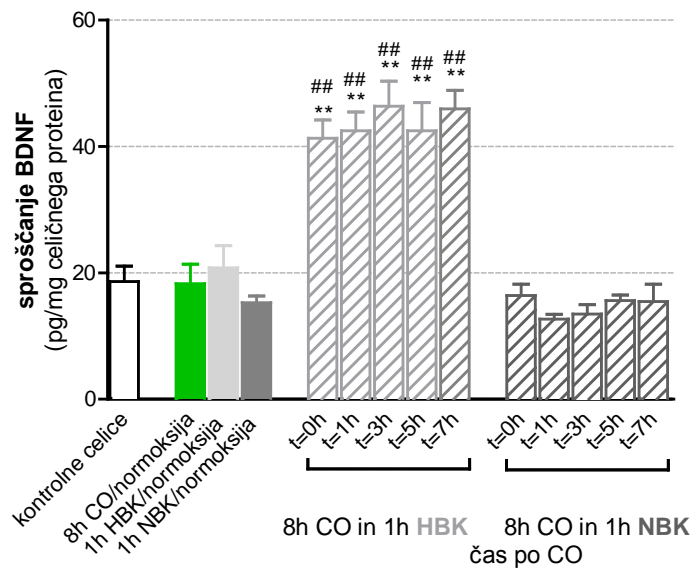


Slika 13. Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. BDNF mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje BDNF smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$.

a)



b)



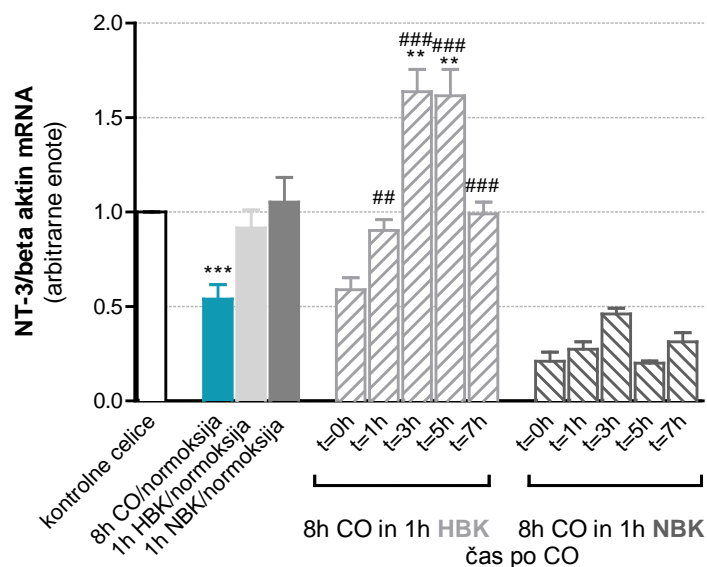
Slika 14. Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost (a) in sproščanje (b) BDNF v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. Vsebnost in sproščanje BDNF smo določili z BDNF ELISO. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$.

Učinek hiperbarične komore smo opazili tudi pri spodbujanju sinteze BDNF (Slika 14). Po tretiranju s HBK so imele celice v vseh časovnih intervalih po izpostavitvi CO značilno višjo vsebnost BDNF kot po 8-urni CO/normoksiji. Največji učinek smo zaznali po inkubaciji celic v HBK 3 ure po zastrupitvi s CO, kjer je koncentracija BDNF znašala $20,2 \pm 1,1$ pg BDNF/mg proteinov, kar je 1,9-krat preseglo znotrajcelični nivo BDNF po 8h CO/normoksiji ($10,7 \pm 1,0$ pg BDNF/mg proteinov) ter za 1,3-krat tudi nivoje BDNF proteina v kontrolnih celicah (Slika 14a). Inkubacija astrocitov v NBK ni imela pomembnega vpliva na sintezo BDNF v primerjavi s celicam, izpostavljenimi samo 8h CO/normoksiji (Slika 14a).

Inkubacija celic v hiperbarični komori je pokazala močan spodbudni vpliv HBK na sproščanje BDNF, ki je v vseh časovnih intervalih po izpostavitvi CO več kot 2-krat preseglo koncentracijo sproščenega BDNF v kontrolnih celicah (Slika 14b). Pri inkubaciji celic v NBK vpliva na sproščanje BDNF iz astrocitov v primerjavi s celicam, izpostavljenimi samo 8-urni CO/normoksiji, nismo zaznali (Slika 14b).

4.2.3 NT-3

8-urna izpostavljenost astrocitov CO in 24-urni normoksiji je okrnila tudi izražanja in sintezo NT-3 (Slika 10). Naši poskusi so pokazali, da je inkubacija celic v hiperbarični komori spodbudila nastajanje NT-3 mRNA, pri čemer je bil vpliv HBK ponovno odvisen od časa, ki je pretekel med izpostavljenostjo CO in tretiranjem s kisikom. Izpostavljenost HBK v času od 1 do 7 ur po CO je sprožila gensko izražanje NT-3, ki je v primeru 3 in 5 ur po CO značilno, 1,6-krat preseglo nivoje izražanja v kontrolnih celicah (Slika 15). V nasprotju s HBK inkubacija celic v NBK ni pokazala statistično pomembnih razlik v izražanju NT-3 v primerjavi s celicam, izpostavljenimi samo 8-urni CO/normoksiji (Slika 15).

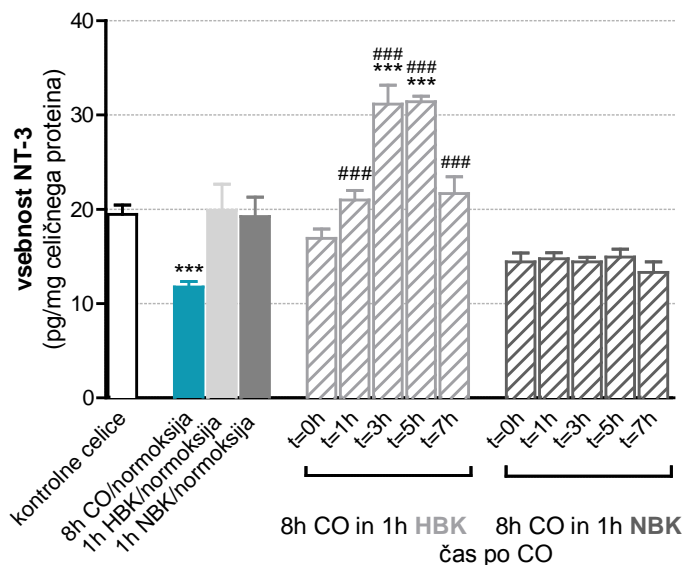


Slika 15. Vpliv HBK in NBK na gensko izražanje NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. NT-3 mRNA smo določili s qRT-PCR, izražanje NT-3 smo normalizirali na izražanje beta-aktina. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili s t-testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$.

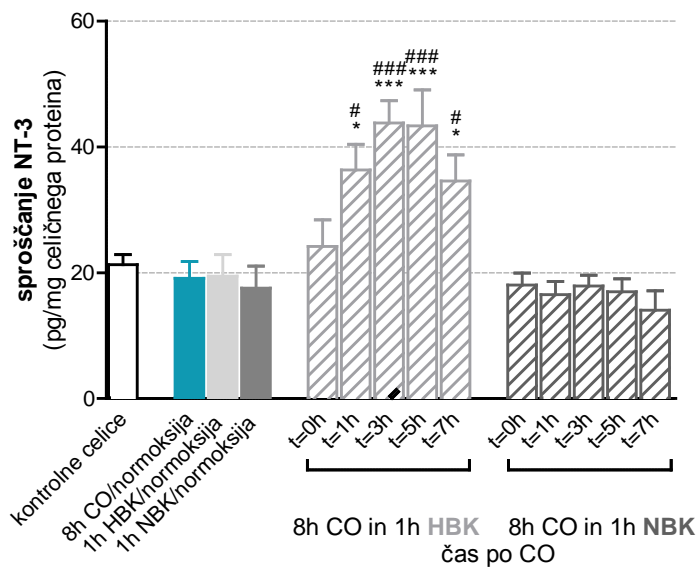
Spodbudni vpliv HBK smo opazili tudi pri uravnavanju sinteze NT-3. Izpostavljenost HBK v času od 1 do 7 ur po CO je spodbudila znotrajcelično koncentracijo NT-3, največji učinek HBO smo zaznali 3 do 5 ur po zastrupitvi s CO, ko je koncentracija NT-3 znašala $31,6 \pm 2,1$ pg NT-3/mg proteinov, kar je 2,6-krat preseglo znotrajcelični nivo NT-3 po 8-runi CO/normoksiji ($12,1 \pm 0,9$ pg NT-3/mg proteinov) ter za 1,7-krat tudi nivoje NT-3 proteina v kontrolnih celicah (Slika 16a). Inkubacija celic v normobarični komori ni imela pomembnega vpliva na sintezo NT-3 v primerjavi s celicami, izpostavljenimi samo 8h CO/normoksiji (Slika 16a).

Hiperbarični kisik je, tako kot pri NGF in BDNF, močno spodbudil sproščanje NT-3, na katerega CO/normoksija ni imela vpliva (Slika 16b). Inkubacija celic v hiperbarični komori v času od 1 do 7 ur po CO je povzročila povečanje zunajcelične koncentracije NT-3, ki je v primeru 3 in 5 ur po CO značilno, 2-krat presegla sproščanje v kontrolnih celicah (Slika 16b). NBK na sproščanje NT-3 iz astrocitov v primerjavi s celicami, izpostavljenimi samo 8h CO/normoksiji, ni imel značilnega vpliva (Slika 16b).

a)



b)



Slika 16. Vpliv HBK in NBK na znotrajcelično vsebnost (a) in sproščanje (b) NT-3 v primarnih kulturah astrocitov novorojenih podgan, izpostavljenih 8h CO/normoksiji. Vsebnost in sproščanje NT-3 smo določili z NT-3 ELISO. Točke predstavljajo srednjo vrednost \pm SEM treh do petih neodvisnih poskusov. Statistično značilnost smo preverili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) z Bonferronijevim post hoc testom; statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolnimi celicami je označena kot *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ in * $p < 0,05$, v primerjavi s celicami, izpostavljenimi 8h CO/normoksiji pa ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ in # $p < 0,05$.

5. RAZPRAVA

Astroцитi so enakovreden partner živčnih celic pri prenosu informacij in uravnavanju sinaptične aktivnosti, imajo pa tudi pomembno vlogo pri sintezi in sproščanju nevrotrofičnih dejavnikov. Nevrotrofična aktivnost spodbuja preživetje in rast živčnih celic ter ohranja njihov fenotip, zato lahko okrnjeno delovanje astrocitov pospeši nevrodegenerativne procese v osrednjem živčevju. Zastrupitev s CO povzroča apoptozo in nekrozo živčnih in glijalnih celic, kar lahko vodi do poznih nevropsiholoških posledic. Pričujoča raziskava na astrocitih podgane je pokazala, da CO postopno zavira gensko izražanje in sintezo nevrotrofinov (Slike 8-10). Upad nevrotrofične aktivnosti astrocitov sovpada z upadom viabilnosti in mitohondrijske funkcije celic ter s proženjem apoptotskih procesov (24). Poškodbe možganskih celic lahko preprečimo z zdravljenjem s kisikom. Hiperbarični kisik je zaradi svoje zaščitne vloge predmet mnogih raziskav, naša nedavna študija je potrdila njegov ugoden vpliv na procese, ki potekajo v astrocitih po zastrupitvi s CO (24). Ohranjanje nevrotrofične podpore živčnim celicam kot posledica zdravljenja s hiperbaričnim, ne pa tudi z normobaričnim kisikom (Slike 11-16), predstavlja možni mehanizem preprečevanja poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO.

5.1 Nevrotrofična aktivnost astrocitov po zastrupitvi s CO

Astroцитi so na poškodbe osrednjega živčevja manj dovzetni kot živčne celice, vendar daljša izpostavljenost visokim koncentracijam CO močno okrne njihovo delovanje. Naša nedavna raziskava na astrocitih podgane, ki so bili izpostavljeni 3000 ppm CO v zraku in nato 24-urni normoksiji, je pokazala postopen padec viabilnosti, membranskega potenciala mitohondrijev in sinteze ATP ter hkrati povišane koncentracije ROS. Izgubo mitohondrijske funkcije je spremljala aktivacija kalpainov in kaspaz-8, -9 in -3/7 ter s tem apoptoza celic (24). CO/normoksija močno vpliva tudi na sposobnost nujenja nevrotrofične podpore. Rezultati pričujoče naloge kažejo, da daljša izpostavljenost astrocitov novorojenih podgan visokim koncentracijam CO in 24-urni normoksiji postopno zavrača sposobnost genskega izražanja in sinteze nevrotrofinov NGF, BDNF in NT-3, na njihovo sproščanje pa v danih časovnih okvirih vpliva le deloma. Ugotovili smo, da je škodljivi vpliv odvisen od časa inkubacije v CO in se razlikuje med proučevanimi nevrotrofini.

CO je v prvih dveh urah povzročil prehodno značilno povečanje genskega izražanja NGF (Slika 8), neznačilno povišanje nivojev BDNF mRNA (Slika 9), vpliva na koncentracijo NT-3 mRNA pa v tem časovnem obdobju nismo zaznali (Slika 10). S podaljševanjem inkubacije astrocitov v CO se je izražanje vseh treh genov zniževalo in po 8-urni izpostavljenosti CO doseglo najnižjo vrednost glede na kontrolne celice. Nivoji NGF mRNA in NT-3 mRNA so bili za okoli 50 % nižji, nivo BDNF mRNA pa za 29 % nižji kot v netretiranih celicah. Zmanjšana sposobnost genskega izražanja se je odrazila v časovno odvisnem zniževanje znotrajcelične koncentracije nevrotrofinov. Okoli 50 % nižjo raven NGF proteina glede na kontrolo smo izmerili v astrocitih po 8-urni izpostavljenosti CO/normoksiji, ki pa se pri daljši, 12- do 24-urni inkubaciji v CO ni več spreminjala (Slika 8). Tudi koncentracija BDNF proteina je bila najnižja po 8 urah v CO, vendar pa je zaviralni učinek CO/normoksije na sintezo BDNF sčasoma izzvenel in po 24-urni inkubaciji v CO ni bil več značilen (Slika 9). Največji učinek smo zaznali pri znotrajcelični vsebnosti NT-3, ki je dosegla najnižjo vrednost po 24-urni inkubaciji astrocitov v CO, ko so vsebovali le še 38% NT-3 proteina v primerjavi z netretiranimi celicami (Slika 10).

Padec genskega izražanja in sinteze proučevanih nevrotrofinov je ob daljši izpostavljenosti CO pričakovan, saj je celična funkcija astrocitov okrnjena. CO se po prehodu v celice veže na citokrom c-oksidozo, s tem ovira celično dihanje in spodbudi nastanek ROS, lahko pa tudi poveča znotraj in zunajcelično koncentracijo NO, ki se ob prisotnosti ROS pretvori v peroksinitrit. Prekomerna tvorba reaktivnih kisikovih/dušikovih spojin lahko vodi v oksidativni stres, ki povzroči neželene poškodbe vseh glavnih bioloških makromolekul: nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Te poškodbe so lahko reverzibilne in odvisne od antioksidantnega sistema in stresnih proteinov. Če pa so poškodbe ireverzibilne, vodijo celico v celično smrt, kar je že pokazala naša prejšnja raziskava (24). Oksidacija nukleinskih kislin povzroči lom DNA verige, spremembe purinskih ali pirimidinskih baz ali sladkornega dela, izgubo baz ter njihove navzkrižne povezave (53). Take poškodbe vodijo do spremembe genskega izražanja in signalnih poti nevrotrofinov (54). Oksidacija proteinov lahko preko nastanka oksidiranih aminokislin ali sprememb aminokislin v reaktivne karbonile povzroči spremembo strukture in izgubo funkcije, poveča se tudi občutljivost takih proteinov na proteolizo in denaturacijo (54,55). Poleg zmanjšane viabilnosti in energetske podpore predstavljajo oksidativne poškodbe tako DNA kot tudi proteinov enega od verjetnih razlogov za postopno zavrtje nevrotrofične podpore astrocitov, ki smo jo opazili po inkubaciji celic v CO in normoksiji. Naši rezultati kažejo, da so vplivi omenjenih procesov na posamezen

neurotrofin različni. Predvidevamo, da je to posledica različnih transkripcijskih dejavnikov in postrnlacijskih modifikacij, ki uravnavajo gensko izražanje in sintezo NGF, BDNF in NT-3. Zanimivo je prehodno hitro povišanje genskega izražanja, ki smo ga opazili pri NGF in deloma tudi pri BDNF. Podatki iz literature kažejo, da bi hitre spremembe v izražanju neurotrofinov, ki jih sprožajo različni dejavniki, kot so stres (56), ishemično prekondicioniranje (57) ali neuroprotektivne učinkovine (58), lahko predstavljale varovalni mehanizem za ohranjanje možganskih funkcij po poškodbi, morda pa tudi obliko nevronske plastičnosti, ki omogoča odzivanje na nove dražljaje.

Izpostavljenost astrocitov visokim koncentracijam CO in 24-urni normoksiji v danih časovnih okvirih (2 - 24 ur) le deloma vpliva na sproščanje NGF, BDNF in NT-3. V prvih 6 urah izpostavljenosti CO smo zaznali le prehodno obsežno sproščanje NGF (Slika 8), ki je najverjetneje odraz prehodnega povišanja genskega izražanja. Zaenkrat ni znano, zakaj smo tak porast, ki bi lahko bil ključen za ohranjanje neurotrofične podpore živčnim celicam in s tem njihovega preživetja v prvih urah zastrupitve s CO, opazili le pri NGF. Zanimivo je tudi, da se je pri vseh treh neurotrofinih kljub dolgotrajni izpostavljenosti CO/normoksiji in deloma zavrti sintezi v prvih 24 urah ohranila sposobnost bazalnega sproščanja iz astrocitov. Predvidevamo, da eden od razlogov tiči v časovnem protokolu naših poskusov, ki zaradi poznavanja odziva celic v naših eksperimentalnih razmerah temelji na prejšnji študiji. Za boljše razumevanje vpliva CO na sproščanje neurotrofinov bi bilo potrebno podaljšati čas opazovanja celic po zastrupitvi s CO, torej čas normoksije. Znano je namreč, da zastrupitev s CO šele čez nekaj dni ali celo tednov povzroči obsežnejše okvare celic in vnetne procese, ki so pri možganski poškodbi še pomembnejši kot akutna hipoksija (59).

Sproščanje neurotrofinov iz astrocitov je zapleten proces, ki lahko poteka konstitutivno, t.j. spontano, ali pa regulirano in ga uravnava nevronska aktivnost, neurotrofini preko pozitivnih povratnih zank, različne farmakološko aktivne snovi in drugi dražljaji (60). Kakšna je vloga CO pri uravnavanju procesov sproščanja iz živčnih ali glijalnih celic, ni jasno. Vsaj deloma bi CO lahko deloval posredno, preko NO, saj je znano, da CO aktivira NOS in s tem sintezo NO. Študije na hipokampalnih živčnih celicah in glutamatnih sinapsah so pokazale, da NO, ko je prisoten v visokih koncentracijah, preko aktivacije cGMP in protein kinaze G učinkovito zavira sproščanje BDNF in NT-3 iz teh celic (61, 62). Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da astrociti kljub okrnjeni celični funkciji in z omejeno sposobnostjo sinteze v prvih 24 urah po zastrupitvi s CO preko nejasnega varovalnega mehanizma ohranjajo

bazalno raven sproščanja nevrotrofinov, s čemer verjetno lahko vsaj deloma podpirajo preživetje in regeneracijo poškodovanih živčnih celic.

5.2 Hiperbarični kisik spodbuja nevrotrofično aktivnost astrocitov po zastrupitvi s CO

Poškodbe možganskih celic zaradi zastrupitve s CO lahko preprečimo z zdravljenjem s kisikom (12). Hiperbarični kisik učinkovito zmanjšuje škodljivi vpliv CO/normoksije na astrocite, saj zavre pro-apoptotske procese in oksidativni stres ter spodbudi delovanje mitohondrijev (24), kot kažejo rezultati pričujoče naloge, pa vpliva tudi na sposobnost nujenja nevrotrofične podpore. Inkubacija astrocitov v hiperbarični komori po 8-urni izpostavljenosti CO, ko je bil učinek škodljivega delovanja CO/normoksije na nevrotrofično aktivnost največji, je spodbudno vplivala na gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje vseh treh nevrotrofinov (Slike 11-16). Delovanje HBK je bilo časovno odvisno, t.j. odvisno od časa, ki je pretekel med izpostavljenostjo CO in 1-urnim tretiranjem s kisikom. Takojšnja inkubacija celic v hiperbarični komori ni imela pomembnega vpliva na nevrotrofine, medtem ko je HBK 1 uro do 5 ur po izpostavljenosti CO spodbudil sintezo proučevanih proteinov. Največji vpliv smo zaznali 3 - 5 ur po izpostavljenosti CO, ko so nivoji mRNA in proteinov značilno presegli nivoje v netretiranih celicah. Faktor povišanja je bil med posameznimi nevrotrofini različen. Inkubacija celic v normobaričnem kisiku ni preprečila zavrtja nevrotrofične podpore astrocitov (Slika 11-16) kot tudi ne oksidativnega stresa in apoptoze (24), kar kaže, kako pomemben je vpliv tlaka kisika na izid zdravljenja zastrupitev s CO.

Zdravljenje s 100 % kisikom pri 3 barih zviša parcialni tlak kisika v krvi in tkivih, kar se je izkazalo za koristen terapevtski pristop ne samo pri dekompresijski bolezni pač pa tudi pri pospeševanju celjenja ran in opeklin, pri diabetičnih poškodbah, določenih nevroloških boleznih ter pri zastrupitvi s CO (63). Hiperoksični pogoji spodbujajo nastanek ROS, ki lahko z oksidacijo NO tvorijo različne RNS (63). Reaktivne kisikove/dušikove spojine so pomembne celične signalne molekule v številnih procesih, glede na koncentracijo in znotrajcelično mesto delovanja pa je njihov vpliv lahko ugoden ali škodljiv in zato močno odvisen od prisotnosti antioksidantov (63, 64). Ker so bile v naših poskusih celice izpostavljene hiperbaričnemu kisiku in s tem reaktivnim spojinam le kratek čas (1 uro), predvidevamo, da je bila antioksidativna zaščita dovoljšna, da je bil škodljivi učinek ROS reverzibilen. Kot kažejo rezultati prejšnje raziskave, so se nivoji ROS v obdobju 24-urne

normoksije, ko smo celice izpostavili 100 % hiperbaričnemu kisiku, ne pa, ko smo jih izpostavili 100 % kisiku pri 1 baru, vrnili na bazalno raven. Ta učinek je bil odvisen od časa, ki je pretekel med zastrupitvijo s CO in tretiranjem s HBK (24), verjetno pa tudi od sposobnosti HBK, da spodbudi sintezo antioksidantov. Takojšnje zdravljenje s HBK ni pokazalo Vpliva na funkcijo celic, saj poleg dodatnega povišanja ROS in možne oksidativne denaturacije proteinov HBK ne prepreči izgube membranskega potenciala mitohondrijev in proženja kaspaze 9, ki vodi v apoptozo.. Zdravljenje s HBK postane manj učinkovita tudi pri intervalih, daljših od 5 ur, kar je posledica apoptotičnih procesov, ki jih po določenem času ni več mogoče ustaviti (23, 24).

Hiperbarični kisik spodbuja nevrotrofično aktivnost astrocitov, ki so bili izpostavljeni CO, saj vpliva na gensko izražanje proučevanih nevrotrofinov. Uravnavanje transkripcije genov za nevrotrofine je zapleten proces, v katerem nastopa več promotorskih regij ter tudi več specifičnih transkripcijskih dejavnikov za posamezen nevrotrofin (65). Vse regulatorne poti izražanja niso dokončno razjasnjene, saj so specifične za posamezne tipe celic (66 - 70). Znano je, da HBK lahko aktivira več transkripcijskih dejavnikov, med drugim inducibilni dejavnik hipoksije-1 α (HIF-1 α , angl. hypoxia inducible factor-1 α), Wnt, vezavni protein odzivnega elementa za cAMP (CREB, angl. cAMP response element binding protein) ali jedrni faktor κ B (NF- κ B, angl. nuclear factor κ B) (71,72), ki so vpleteni v transkripcijo genov za NGF, BDNF in NT-3. Nekateri bi lahko bili udeleženi tudi pri spodbujanju nevrotrofične aktivnosti astrocitov po zastrupitvi s CO. NF- κ B je transkripcijski dejavnik, ki je v normoksičnih pogojih neaktiven. ROS omogočijo odcep inhibitorne enote proteina (I κ B) in tako aktivirajo NF- κ B, ki lahko spodbudi izražanje NGF (67) in BDNF (73). Njuna sinteza ter sinteza NT-3 poteka tudi preko aktivacije CREB (66, 68), ki jo prav tako lahko sproži ROS (74). Transkripcijo gena za NT-3 spodbujajo tudi dejavniki Wnt signalne poti (69). Izražanje genov pod vpliv ROS morda poteka tudi preko aktivacije Ca²⁺-kanalov, ki so tarča ROS, in povišane znotrajcelične koncentracije Ca²⁺ (75). Kalcij namreč aktivira nekatere transkripcijske dejavnike, ki sodelujejo pri regulaciji izražanja BDNF (66). Za jasen odgovor je seveda potrebno preučiti, kateri dejavniki se aktivirajo po terapiji s HBK in ali so produkt neposrednega delovanja ROS ali pa gre za drug mehanizem. Neposredni vpliv ROS je morda tudi razlog za opazno razliko med učinkom HBK in pomanjkanjem le-tega pri NBK, saj pod vplivom NBK nastaja manj ROS (63).

Hiperbarični kisik spodbuja tudi znotrajcelično vsebnost nevrotrofinov ter močno poveča njihovo sproščanje, kar je posledica ugodnega vpliva na funkcijo astrocitov. Znano je, da HBK ustavi apoptotične poti, ki se prožijo pri možganskih poškodbah. Bcl-2 so družina membranskih proteinov mitohondrijev, ki nadzorujejo apoptotične procese. Pokazalo se je, da HBK spodbuja izražanje teh regulatornih proteinov in s tem ustavi apoptotične procese, ohranja membranski potencial mitohondrijev in mitohondrijsko funkcijo (57,76, 24). K učinku morda pripomore tudi večja dostopnost kisika v mitohondrijih in s tem hitrejša vzpostavitev fizioloških funkcij celic (76). Podatki o nivojih ATP na astrocitnem modelu to potrjujejo, saj se je v celicah, ki so bile 8 ur izpostavljene CO in 1-5 ur kasneje tretirane s HBK, koncentracija ATP vrnila na fiziološko raven (24). Opisanih odzivov astrocitov po zastrupitvi s CO pri tretiranju z NBK nismo opazili. Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da je povišana nevrotrofična aktivnost posledica zaščitnega mehanizma astrocitov, ki je možen zaradi vrnitve viabilnosti celic in vpliva kisika na gensko izražanje in sproščanje nevrotrofinov

Rezultati, ki pričajo o razliki v delovanju HBK in NBK, niso novi. Študije na živalskih modelih zastrupitve s CO so pokazale, da HBK znižuje serumsko koncentracijo proteina S100B, ki se uporablja kot označevalec možganskih poškodb (51). HBK, ne pa normoksija ali NBK, preprečuje strukturne spremembe mielinskega bazičnega proteina (MBP, angl. myelin basic protein), ki sproži imunski odziv po zastrupitvi s CO (22). HBK preprečuje tudi lipidno peroksidacijo v podganah, tretiranih s HBO po zastrupitvi s CO (77). Nevroprotektivne lastnosti HBK so potrdile tudi nekatere klinične študije. Tako so Thom in sodelavci na dvojno slepi randomizirani študiji uspeli dokazati razliko v pojavnosti in pogostnosti poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO pri bolnikih, ki so jih zdravili s HBK in tistimi, ki so jih zdravili z NBK (78). Nekatere študije teh razlik niso potrdile, kot npr. Annane in sodelavci na dveh randomiziranih študijah niso ugotovili razlike med vplivom HBK in NBK na možno pojavljanje nevropsiholoških posledic (79). Nekateri pregledni članki so analizirali te klinični študije ter izpostavili možnosti napak v njihovih zaključkih, saj so ugotovili, da ni mogoče z gotovostjo trditi, da HBK prepreči nevropsihološke posledice (11, 80). Protokoli zdravljenja so namreč med različnimi kliničnimi ustanovami različni in se med seboj razlikujejo po uporabljenem tlaku kisika, trajanju terapije, številu terapij in časovnem razmaku med njimi, kar otežuje ovrednotenje rezultatov (80). Čeprav je splošno sprejeto, da se bolnike z akutno zastrupitvijo zdravi čimprej po privzemu v urgentni center, obstaja možnost, da to ni optimalno (21). Na živalskem modelu zastrupitve s CO ter *in vitro*

raziskavi se je pokazalo, da ima HBK najvišji učinek pri preprečevanju celične apoptoze 3-5 ur po akutni izpostavitvi CO (23, 24). To odpira možnost, da je potrebno raziskati, kdaj je optimalno pričeti z zdravljenjem s kisikom glede na čas, preživet v normoksičnem okolju. V naši študiji se večina parametrov v primeru takojšnjega tretiranja celic s HBK po izpostavitvi CO ni izboljšala. Optimalno delovanje HBK smo opazili šele po 3 ali celo 5 urah po zastrupitvi s CO, pozneje (7 ur po CO) pa je HBK manj učinkovit pri preprečevanju škodljivih učinkov CO. Annane in sodelavci so v svoji študiji uporabili bolnike, ki so preživeli od zastrupitve do prevzema v bolnišnico manj kot 12 ur. Glede na naše rezultate je to preširoko okno in bi bilo potrebno natančneje določiti časovni okvir, ki bi zagotavljal optimalno zdravljenje zastrupljenec. Študijo Annane in sodelavcev omenjamo zato, ker je bila randomizirana in imela najvišje število vzorcev (79).

Pojavnosti poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO še ne znamo predvideti. V nekaterih primerih pride do teh posledic tudi ob blažjih zastrupitvah in nizkih koncentracijah COHb (20). Znani so nekateri specifični označevalci, ki bi jih zaradi njihove povezave z različnimi stopnjami možganskih poškodb lahko uporabili kot napovedne dejavnike izida zastrupitve s CO (16, 20, 22, 81), nobena raziskava pa ni proučila pomembnosti ohranjanja nevrotrofične podpore kot dejavnika preživetja živčnih celic in posledično preprečevanja možganskih lezij. Nevrotrofini NGF, BDNF in NT-3 so nevrotrofični dejavniki s širokim spektrom delovanja v osrednjem živčevju. Poleg klasične nevrotrofične podpore različnim, in za posamezne nevrotrofine tudi specifičnim, populacijam živčnih celic, preko vpliva na funkcionalno in strukturno plastičnost modulirajo sinaptični prenos. Spremenjeni nivoji nevrotrofinov lahko vodijo do različnih neurodegenerativnih stanj, zato ohranjanje njihove sinteze v astrocitih lahko zavira ali celo preprečuje pojavnost teh bolezni. To je pomembno, saj novejša raziskava kažejo na korelacijo med neurodegenerativnimi boleznimi, kot so Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen ter nivoji nevrotrofinov in delovanjem njihovih signalnih poti (82, 83, 84). Simptomi nekaterih neurodegenerativnih bolezni, kot so parkinsonizem, depresija, anksioznost in podobno so del poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO (81). Kako je aktivnost nevrotrofinov povezana z apoptotičnimi lezijami v določenih možganskih predelih po zastrupitvi s CO, zaenkrat ostaja neznanka. Astroцитi so v patoloških pogojih bolj odporni na toksične dejavnike in so zato primerni kandidati za ohranjanje preživetja in funkcije živčnih celic (85). S poznavanjem mehanizmov hiperbaričnega kisika v astrocitih se odpirajo možnosti manipulacije astrocitne sinteze nevrotrofinov po zastrupitvi s CO, ko je sproščanje iz živčnih celic nezadostno, kar bi lahko

pomembno pripomoglo k regeneraciji živčnih celic in vzpostavljanju njihovih povezav ter s tem k preprečevanju poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve.

6. SKLEP

Rezultate magistrske naloge lahko povzamemo z naslednjimi ugotovitvami:

1. CO/normoksija zavira nevrotrofično aktivnost astrocitov. Izpostavljenost astrocitov možganske skorje novorojenih podgan visokim koncentracijam CO in 24-urni normoksiji postopno zavre sposobnost genskega izražanja in sinteze nevrotrofinov, na njihovo sproščanje pa v danih časovnih okvirih vpliva le deloma. Največji učinek je opazen po 8-urni inkubaciji v CO, ko so nivoji NGF mRNA in NT-3 mRNA 50 % nižji, nivo BDNF mRNA pa 29 % nižji kot v netretiranih celicah. Podoben je tudi vpliv na znotrajcelično vsebnost NGF in BDNF, vsebnost NT-3 pa doseže najnižjo vrednost po 24-urni inkubaciji astrocitov v CO, ko celice vsebujejo le 38 % NT-3 proteina v primerjavi s kontrolo. Astrociti kljub okrnjeni celični funkciji in z omejeno sposobnostjo sinteze v prvih 24 urah po zastrupitvi s CO ohranjajo bazalno raven sproščanja nevrotrofinov.

2. Vpliv kisika na nevrotrofično aktivnost astrocitov po izpostavitvi CO/normoksiji je odvisen od tlaka in časa, ki preteče od zastrupitve s CO. Hiperbarični kisik učinkovito zmanjšuje škodljivi vpliv CO/normoksije na astrocite in spodbuja gensko izražanje, znotrajcelično vsebnost in sproščanje nevrotrofinov. Učinek HBK je opazen od 1 do 5 ur ter v nekaterih primerih tudi 7 ur po zastrupitvi s CO, največji pa 3 do 5 ur po izpostavljenosti CO, ko nivoji mRNA in proteinov značilno presežejo nivoje v kontrolnih celicah. Inkubacija celic v normobaričnem kisiku ne prepreči zavrtja nevrotrofične podpore astrocitov.

Rezultati pričujoče naloge kažejo, da je časovna odvisnost zdravljenja s hiperbaričnim kisikom lahko ključna pri preprečevanju apoptotskih procesov v osrednjem živčevju. Ali HBK prepreči apoptozo živčnih celic zaradi ohranjanja nevrotrofične podpore, ki jo nudijo astrociti, še ni znano. Prav tako ni jasno, preko katerih receptorskih in znotrajceličnih signalnih poti bi iz astrocitov sproščeni nevrotrofini lahko ohranjali preživetje in funkcijo s

CO poškodovanih živčnih celic. Ohranjanje nevrotrofične podpore živčnim celicam kot posledica zdravljenja s HBK predstavlja enega od možnih mehanizmov za preprečevanje poznih nevropsiholoških posledic zastrupitve s CO.

7. LITERATURA

1. Wu L, Wang R: Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 585-630.
2. Motterlini R, Otterbein LE: The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 728-743.
3. Sjöstrand T: The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. *Physiol Scand* 1952; 26:338-344.
4. Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2: 2557-2568.
5. Queiroga CS, Vercelli A, Vieira HL: Carbon monoxide and central nervous system: challenges and achievements. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 1533-1545
6. Gullotta F, di Masi A, Coletta M, Ascenzi P: CO metabolism, sensing, and signaling. *Biofactors* 2012; 38: 1-13.
7. Ryter SW, Alam J, Choi AKM: Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications *Physiol Rev* 2006; 86: 583–650
8. Gullotta F, di Masi A, Ascenzi P: Carbon monoxide: an unusual drug. *IUBMB Life* 2012; 64: 378-386.
9. Roderique JD, Josef CS, Feldman MJ, Spiess BD: A modern literature review of carbon monoxide poisoning theories, therapies, and potential targets for therapy advancement. *Toxicology* 2015; 334: 45-58.
10. Hampson NB, Weaver LK: Carbon monoxide poisoning: a new incidence for an old disease. *Undersea Hyperb Med* 2007; 34:163-168.
11. Hampson NB, Piantadosi CA, Thom SR, Weaver LK: Practice recommendations in the diagnosis, management, and prevention of carbon monoxide poisoning. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 1095-1101.
12. Brvar M, Šarc L, Jamšek M, Grenc D, Finderle Ž: Smernice zdravljenja zastrupitev z ogljikovim monoksidom. *Zdrav Vestn* 2014; 83: 7-17.

13. Choi IS: Carbon monoxide poisoning: systemic manifestations and complications. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 253-261.
14. Pepe G, Castelli M, Nazerian P, Vanni S, Del Panta M, Gambassi F, Botti P, Missanelli A, Grifoni S: Delayed neuropsychological sequelae after carbon monoxide poisoning: predictive risk factors in the Emergency Department. A retrospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2011; 19:16-23.
15. Sung YF, Chen MH, Peng GS, Lee JT: Generalized chorea due to delayed encephalopathy after acute carbon monoxide intoxication. *Ann Indian Acad Neurol* 2015; 18: 108-110.
16. Thom SR, Bhopale VM, Milovanova TM, Hardy KR, Logue CJ, Lambert DS, Troxel AB, Ballard K, Eisinger D: Plasma biomarkers in carbon monoxide poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 2010; 48: 47-56.
17. Bhatia R, Chacko F, Lal V, Mittal BR: Reversible delayed neuropsychiatric syndrome following acute carbon monoxide exposure. *Indian J Occup Environ Med* 2007; 11:80-82
18. Kudo K, Otsuka K, Yagi J, s sod.: Predictors for delayed encephalopathy following acute carbon monoxide poisoning. *BMC Emerg Med* 2014; 14: 3-9
19. Bunc M, Luzar B, FINDERLE Ž, ŠUPUT D, BRVAR M: Immediate oxygen therapy prevents brain cell injury in carbon monoxide poisoned rats without loss of consciousness. *Toxicology* 2006; 225:138-141
20. Hampson NB, Piantadosi CA, Thom SR, Weaver LK: Practice recommendations in the diagnosis, management, and prevention of carbon monoxide poisoning. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 1095-1101.
21. Weaver LK: Hyperbaric oxygen therapy for carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med* 2014; 41: 339-354.
22. Thom SR, Bhopale VM, Fisher D: Hiperbaric oxygen reduces delayed immune mediated neuropathology in experimental carbon monoxide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213: 152-159.
23. Brvar M, Luzar B, FINDERLE Ž, ŠUPUT D, BUNC M: The time-dependent protective effect of hyperbaric oxygen on neuronal cell apoptosis in carbon monoxide poisoning *Inhal Toxicol*. 2010; 22: 1026-1031.
24. Jurič DM, FINDERLE Ž, ŠUPUT D, BRVAR M.: The effectiveness of oxygen therapy in carbon monoxide poisoning is pressure- and time-dependent: a study on cultured astrocytes. *Toxicol Lett* 2015; 233: 16-23.

25. Bunc M, Luzar B, Finderle Ž, Šuput D, Brvar M: Immediate oxygen therapy prevents brain cell injury in carbon monoxide poisoned rats without loss of consciousness. *Toxicology* 2006; 225: 138-141.
26. Sofroniew MV, Vinters HV: Astrocytes: Biology and Pathophysiology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 7-35.
27. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG: Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 2007; 27: 6473-6477.
28. Jones EV, Bouvier DS: Astrocyte-secreted matricellular proteins in CNS remodelling during development and disease. *Neural Plast* 2014: ID članka 321209, 12 strani.
29. Wiese S, Karus M, Faissner A: Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Front Pharmacol* 2012; 3: 120.
30. Schwartz JP, Mishler K: Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 1990; 10: 447-457.
31. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P, Barres BA. Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* 2005 ;120: 421-33.
32. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliek SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A: Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; 121: 4-27.
33. Sofroniew MV: Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32: 638-647.
34. Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV: Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 2014; 565: 23-29.
35. Reichardt LF: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-1564.
36. Skaper SD: The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 2012; 846: 1-12

37. Levi-Montalcini R., Hamburger V: Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo 1. *J Exp Zool* 1951; 116: 321-361
38. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1: 549-553.
39. Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde Y.A.: Identification and characterisation of a novel member of the nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor family. *Nature* 1990; 344: 339-341.
40. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.m., Yancopoulos G.D.: Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990; 247: 1446-51
41. Hallböök F., Ibanez C.F., Persson H.: Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991; 6: 845-858
42. Berkemeier L.R., Winslow J.W., Kaplan D.R., Nikolics K., Goeddel D.R., Rosenthal A.: Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 1991; 7: 857-866
43. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA: Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 12660-6.
44. Korsching S: The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993; 13: 2739-48.
45. Jurič DM, Miklič Š, Čarman-Kržan M: Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res* 2006; 1108: 54-62.
46. Miklič Š, Jurič DM, Čarman-Kržan M: Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Devl Neurosci* 2004; 22: 119-130.
47. Mele T, Čarman-Kržan M, Jurič DM: Regulatory role of monoamine neurotransmitters in astrocytic NT-3 synthesis. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28: 13-19.
48. Moses V. Chao: Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev Neurosci* 2003; 4: 299-309.
49. Tofighi R, Tillmark N, Daré E, Aberg AM, Larsson JE, Ceccatelli S: Hypoxia-independent apoptosis in neural cells exposed to carbon monoxide in vitro. *Brain Res.* 2006; 1098: 1-8.

50. Mele. T in Jurič DM: Identification and pharmacological characterization of the histamine H3 receptor in cultured rat astrocytes. *Eur J Pharmacol* 2013; 720: 198-204.
51. Brvar M, Finderle Ž, Šuput D, in Bunc M.: S100B protein in conscious carbon monoxide-poisoned rats treated with normobaric or hyperbaric oxygen. *Crit. Care. Med* 2006; 34: 2228-2230
52. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976; 72: 248-254.
53. Cadet J, Loft S, Olinski R, Evans MD, Bialkowski K, Richard Wagner J, Dedon PC, Møller P, Greenberg MM, Cooke MS. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radic Res* 2012; 46: 367-81.
54. Espinet C, Gonzalo H, Fleitas C, Menal MJ, Egea J, Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Neurotrophic Approach. *Curr Drug Targets* 2015; 16: 20-30.
55. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.
56. Marmigere F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, and Arancibia LT: Rapid induction of BDNF Expression in the Hippocampus During Immobilization Stress Challenge in Adult Rats 2003; 13: 646-55.
57. Neumann JT, Thompson JW, Raval AP, Cohan CH, Koronowski KB, Perez-Pinzon MA: Increased BDNF protein expression after ischemic or PKC epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015; 35: 121-30.
58. Zhan H, Li S, Sun J, Liu R, Yan F, Niu B, Zhang H, and Wang X: Lettuce Glycoside B ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury by increasing nerve growth factor and neurotrophin-3 expression of cerebral cortex in rats. *Indian J Pharmacol* 2014; 46: 63–68.
59. Weaver, L.K: Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N. Engl. J. Med* 2009; 360: 1217-1225.
60. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M, Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003; 69: 341-74.
61. Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal

- neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3282-3287.
62. Kolarow R, Kuhlmann CR, Munsch T, Zehendner C, Brigadski T, Luhmann HJ, Lessmann V. BDNF-induced nitric oxide signals in cultured rat hippocampal neurons: time course, mechanism of generation, and effect on neurotrophin secretion. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 323.
 63. Thom SR: Hyperbaric oxygen – its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127: 131S–141S.
 64. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S and Kalayci O: Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5: 9–19.
 65. Lyons MR and West AE. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription *Prog Neurobiol* 2011; 94: 259–295.
 66. West A: *Transcriptional Regulation by Neuronal Activity.* Springer US, New York, 2008; 155-173.
 67. Friedman W, Thakuri S, Seidman L and Rabson A: Regulation of Nerve Growth Factor mRNA by Interleukin-1 in Rat Hippocampal Astrocytes Is Mediated by NFκB. *The journal of biological chemistry* 1996; 271: 31115-31120.
 68. Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD: Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 1999; 286: 2358-2361.
 69. Patapoutian A, Backus C, Kispert A and Reichardt L: Regulation of Neurotrophin-3 Expression by Epithelial-Mesenchymal Interactions: The Role of Wnt Factors. *Science* 1999; 283: 1180–1183.
 70. Reichardt L: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545–1564.
 71. D'Angio C, Finkelstein J: Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71: 371-380.
 72. Turpaev KT: Reactive Oxygen Species and Regulation of Gene Expression. *Biochemistry (Moscow)* 2002; 67: 281-292.
 73. Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang C: Regulation of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2012; 4: 188-200.
 74. Gravis D and Stick A: Novel Regulation of CREB Activation by Reactive Oxygen Species in B Lymphocytes. *The FASEB Journal* 2011; 25: 129.

75. Mungai P, Waypa G, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball M and Schumacker: Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channel. *Mol. Cell Biol.* September 2011; 31: 3531-3545.
76. Soustiel JF, Palzur E, Vlodaysky E, Veenman L, Gavish M: The effect of oxygenation level on cerebral post-traumatic apoptosis is modulated by the 18-kDa translocator protein (also known as peripheral-type benzodiazepine receptor) in a rat model of cortical contusion. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008; 34: 412-23.
77. Thom SR: Functional inhibition of leukocyte B2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide-mediated brain injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 123: 248-56.
78. Weaver LK, Hopkins R, Chan K, Churchill S, Elliott G, Clemmer T, Orme J, Thomas F and Morris A: Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *The new England Journal Of Medicine* 2002; 347: 1057-1067.
79. Annane D, Chadda K, Gajdos P, Jars-Guincestre MC, Chevret S, Raphael JC: Hyperbaric oxygen therapy for acute domestic carbon monoxide poisoning: two randomized controlled trials. *Intensive Care Med* 2011; 37: 486-92.
80. Buckley N, Juurlink D, Isbister G, Bennett M, Lavonas E: Hyperbaric oxygen for carbon monoxide poisoning. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; 13: 1-39.
81. R. Bhatia, F. Chacko, V. Lal, and B. R. Mittal: Reversible delayed neuropsychiatric syndrome following acute carbon monoxide exposure. *Indian J Occup Environ Med.* 2007; 11: 80-82.
82. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A: Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000; 60:277-90.
83. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110:167-73.
84. Espinet C, Gonzalo H, Fleitas C, Menal MJ, Egea J. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a neurotrophic approach. *Curr Drug Targets.* 2015; 16: 20-30.
85. Hagg T: From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist.* 2009; 15: 20-27.

