

# DJELOVANJE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MOŽDANO ISHEMIJSKO - REPERFUZIJSKO OŠTEĆENJE U DIJABETIČKIH ŠTAKORICA

---

**Mišir, Mihael**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj  
Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:147342>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Mihael Mišir

**DJELOVANJE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MOŽDANO ISHEMIJSKO –  
REPERFUZIJSKO OŠTEĆENJE U DIJABETIČKIH ŠTAKORICA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016. godina

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Mihael Mišir

**DJELOVANJE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MOŽDANO ISHEMIJSKO –  
REPERFUZIJSKO OŠTEĆENJE U DIJABETIČKIH ŠTAKORICA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016. godina

Mentor rada: prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Rad ima 94 lista.

## **PREDGOVOR RADU**

Istraživanje je provedeno u okviru projekta „Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti“ (219-2160133-2034) (glavni istraživač prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med.)

Zahvaljujem se prije svega svojoj mentorici na strpljenju i trudu koji je uložila te svima drugima koji su mi bili podrška u radu.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Moždani udar- definicija i podjele .....	1
1.1.1. Ishemijski moždani udar i njegova struktura (jezgra, penumbra i oligemija).....	1
1.1.2. O patofiziologiji moždanog udara ili faze pri razvoju moždanog udara.....	3
1.1.3. Medikamentozno liječenje moždanog udara.....	10
1.1.4. Moždani udar i dijabetes.....	10
1.1.5. Spolne razlike kod bolesnika s moždanim udarom.....	12
1.2. Hiperbarična oksigenacija (HBO <sub>2</sub> ) i njezin utjecaj na moždani udar.....	12
1.2.1 Definicija i fiziologija HBO <sub>2</sub> .....	12
1.2.2. Liječenje moždanog udara pomoću HBO <sub>2</sub> .....	15
1.2.3. Potencijalni utjecaj HBO <sub>2</sub> na ulogu 20- HETE u razvoju moždanog udara.....	15
1.2.4. Reperfuzijska ozljeda i HBO <sub>2</sub> .....	16
1.2.5. Cijeljenje tkiva i HBO <sub>2</sub> .....	16
1.2.6. HBO <sub>2</sub> i angiogeneza.....	17
1.2.7. Relativna hipoksija i HBO <sub>2</sub> .....	18
1.3. Životinjski modeli, najčešće štakorski, na kojima su istraživani načini liječenja moždanog udara.....	18
1.4. t-MCAO metoda .....	19
1.5. Streptozotocin-inducirani diabetes mellitus tip I.....	19
1.6. Uspostava modela moždanog udara kod dijabetičnih štakorica SD(Sprague Dawley) vrste.....	20
1.7. Štakori vrste Sprague-Dawley (SD) .....	21
1.8. 20-HETE.....	21
1.9. Blokatori stvaranja 20-HETE.....	21
1.10. Kombinacija HBO <sub>2</sub> i inhibitora 20-HETE.....	22
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	<b>24</b>

<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>26</b>
4.1. Pokusne životinje.....	26
4.1.1. Karakteristike životinja.....	26
4.1.2 Etika ispitivanja na životinjama.....	26
4.1.3. Podjela na skupine (dizajn studije).....	26
4.1.4. Isključujući kriteriji.....	27
4.2. Metode.....	27
4.2.1. Induciranje dijabetesa.....	27
4.2.2. Anestezija i priprema štakora za pokus.....	28
4.2.3. Monitoriranje regionalnog cerebrovaskularnog protoka krvi (rCBF) pomoću laser Doppler Flowmetrije (LDF):.....	28
4.2.4. t-MCAO (tranzitorna okluzija srednje cerebralne arterije, transitory middle cerebral artery occlusion, intra-arterial suture occlusion of the middle cerebral artery).....	29
4.2.5. Hiperbarična oksigenacija (HBO <sub>2</sub> ).....	31
4.2.6. Inhibitor 20- HETE (HET0016 (N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamide)).....	32
4.2.7. Žrtvovanje životinja, bojanje mozga i mjerenje volumena infarkta mozga.....	33
4.2.8. Molekularne analize, analiza izražaja mRNA.....	33
4.2.9. Statistička analiza.....	34
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
5.1. Novi model moždanog udara kod štakora s tip-1 dijabetesom.....	36
5.1.1. Indukcija dijabetesa.....	36
5.1.2. Oblikovanje istraživanja.....	36
5.1.3. Indukcija t-MCAO.....	36
5.1.4. Volumen moždanog infarkta pri različitim trajanjima t-MCAO protokola.....	39
5.2. Hiperbarična oksigenacija i 20-HETE inhibicija smanjuju volumen moždanog udara tranzitorne fokalne moždane ishemije, kod ženskih dijabetičkih Sprague–Dawley štakora...42	
5.2.1. Induciranje dijabetesa.....	42

5.2.2. Indukcija t-MCAO.....	42
5.2.3. Liječenje samo hiperbaričnom oksigenacijom smanjuje volume infarkta mozga nakon t-MCAO.....	45
5.2.4. Liječenje samo s HET0016 smanjuje volume infarkta mozga nakon t-MCAO.....	48
5.2.5. Liječenje ili predtretman s HET0016 kombiniran s HBO <sub>2</sub> .....	48
5.2.6. Rezultati ispitivanja izražaja mRNA enzima CYP 450.....	48
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>52</b>
6.1. Novi model za istraživanje moždanog udara kod dijabetičkih SD štakorica.....	54
6.2. Djelovanje hiperbarične oksigenacije i HEZ0016 na ishod moždanog udara.....	59
<b>7.ZAKLJUČCI.....</b>	<b>63</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>65</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>67</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>69</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>86</b>



## KRATICE

**rCBF** - regionalni moždani krvni protok, eng. regional cerebral blood flow

**HBO<sub>2</sub>**- hiperbarična oksigenacija

**HETE** -hidroksidieikosatetraenoične kiseline

**EET**- epoksieikosatrienoične kiselina

**ICA** – unutrašnja karotidna arterija, lat. arteria carotis interna, eng. internal carotid artery

**CCA** – zajednička karotidna arterija, lat. arteria carotis communis, eng. common carotid artery,

**ECA** – vanjska karotidna arterija, lat. arteria carotis externa, eng. external carotid artery

**MCA** –srednja moždana arterija, lat. arteria cerebri media, eng. middle cerebral artery

**t-MCAO**- okluzija srednje moždane arterije, eng. transient middle cerebral artery occlusion

**ACA**-prednja moždana arterija, lat. arteria cerebri anterior,eng. anterior cerebral artery

**ATA** –atmosfera, oznaka za tlak zraka na razina mora

**SD** – vrsta štakora Sprague Dawley

**STZ** – streptozotocin

**SAH** - subarahnoidalna hemoragija

**LDF** – laser Doppler-sko mjerenje protoka, eng. Laser Doppler Flowmetry

**TTC** - 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

**HET0016** - N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidin

**CYP450** – citokrom P450, eng. Cytochromes P450

**WHO** - Svjetska zdravstvena organizacija, eng. World Health Organization

**PWI** – eng. perfusion-weighted image (MRI snimke tkivne perfuzije)

**DWI** – eng. diffusion-weighted image (MRI snimke tkivne difuzije)

**HSP** - proteini toplinskog šoka, eng. heat-shock protein

**ATP**- adenzin trifosfat, eng. adenosine triphosphate

**COX-2** –ciklooksigenaza-2, eng. cyclooxygenase 2

**NO** – dušični oksid, eng. nitric oxide

**nNOS** – sintaza dušičnog oksida, eng. nitric oxide synthase

**iNOS** - inducibilna sintaza dušičnog oksida, eng. inducible nitric oxide synthase

**IL** - interleukin

**TNF** – tumorski čimbenik nekroze, eng. tumor necrosis factor

**PAF** – čimbenik aktivacije trombocita, eng. platelet-activating factor

**MAP kinaze** – mitogen aktivirane protein kinaze, eng. mitogen-activated protein kinase

**NF-κB** – nuklearni čimbenik κB, eng. nuclear factor-κB

**AP1** – eng. activator protein-1

**zif-268** – eng. zinc finger protein 268

**junB** - Jun B proto-onkogen

**cFos** – cFOS protoonkogen

**cJun** – c Jun protoonkogen

**Krox-20** – eng. zinc finger gene Krox-20

**mRNA** – eng. messenger RNA, glasnička mRNA (ribonukleinska kiselina)

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**HSC** – eng. heat-shock cognate (Hsc) proteins

**PLA2** - fosfolipaza A2, eng. phospholipase A2

**PKC** - protein kinaza C, eng. protein kinase C

**Bcl-2** – eng. B-cell lymphoma 2 protein

**Bax** – eng. Bcl-2-associated X protein

**MTP** - mitochondrial permeability transition pore

**ICE-1** – eng. interleukin-1-beta converting enzyme (poznat i kao caspase 1) – proteaza

**CA1** - sloj piramidnih stanica hipokampusa

**ER** - endoplazmatski retikulum

**cAMP** – ciklički adenzin monofosfatNMDA , eng. N-metil-D-aspartat

**PCr** – eng. Phosphocreatine, fosfokreatin

**XO** – ksantin oksidaza, eng. xantine oxydase

**XD** – ksantin dehidrogenaza, eng. xantine dehidrogenase

**MEK-MAP kinaze** - MEK gen za mitogen-activated protein kinase

**PARP** – eng. Poly ADP ribose polymerase

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

**pHi** – pH intracelularno

**BDNF** – eng. brain-derived neurotrophic factor

**ONOO<sub>2</sub>** – peroksinitrit

**OH<sub>z</sub>** – hidroksil radikal, eng. hydroxyl radical

**NADPH** - nikotinamide adenine dinukleotid fosfat

**FFA** – eng. free fatty acids, slobodne masne kiseline

**OH<sup>-</sup>** - hydroxyl radical

**AA** – arahidonska kiselina

**MAO** - monoamin oksidaza

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - hidrogen peroksid

**HO<sub>2</sub>**- hidroperoksil

**PLC** - fosfolipaza C

**PLA2** - fosfolipaza A2

**rtPA** - rekombinantni tkivni plazminogen aktivator

**AGE** – eng. advanced glycation end products

**HIF-1 $\alpha$**  - hipoksijom-inducirani čimbenik 1-  $\alpha$ , eng. hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$

**VEGF**- vaskularni endotelijalni čimbenik rasta,eng. *vascular endothelial growth factor*

**Nip3** – protein, proapoptotski

**Nogo-A** – eng. neurite outgrowth inhibitor-A

**ICAM-1** - intercelularna adhezijska molekula-1

**eNOS** - endotelne sinteze dušičnog oksida

**AHA /ASA** - American Heart Association/American Stroke Association

**TGF- $\beta$**  - transformirajući čimbenik rasta- $\beta$ ,eng. transforming growth factor- $\beta$

**PDGF** - čimbenik rasta porijeklom iz trombocita, eng. platelet-derived growth factor

**VEGF** - vaskularni endotelijalni čimbenik rasta, eng. vascular endothelial growth factor

**FGF-2** - čimbenik rasta fibroblasta, eng. fibroblast growth factor

**EGF** - epidermalni čimbenik rasta

**TNF-  $\alpha$**  – eng. tumor necrosis factor – $\alpha$ , čimbenik tumorske nekroze-  $\alpha$

**ROS** – eng. reactive oxygen species, reaktivni kisikovi radikali

**TIA** - tranzitorna ishemička ataka

**i.p.** - intraperitonealno

**NIHSS**– ocjenska ljestvica težine i proširenosti moždanog udara, eng National Institute of Health Stroke Score

## POPIS SLIKA

- Slika 4.1.** Hiperbarična komora za potrebe pokusa na malim životinjama, u kojoj su provedeni pokusi izlaganja štakorica hiperbaričnom kisiku nakon t-MCAO (tranzitorne okluzije srednje moždane arterije).....**32**
- Slika 5.2.** Moždani protok krvi (rCBF) za vrijeme različitog trajanja (20', 30', 45', 60' i 90') tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO, panel A) i reperfuzijskog razdoblja koji je slijedio nakon toga (panel B).....**38**
- Slika 5.3.** Udio subkortikalnog (panel A), kortikalnog (B) i ukupnog volumena infarkta mozga (panel C) u volumenu ipsilateralne, ishemične hemisfere nakon 20, 30, 45, 60 i 90 minutnih tranzitornih okluzija srednje moždane arterije (t-MCAO, n=5/grupi) kod dijabetičnih štakorica i zdravih, nedijabetičnih štakorica kontrolne skupine.....**40**
- Slika 5.4.** Tipični infarkt mozga u kontrolnoj skupini i pokusnim skupinama nakon 20, 30, 45, 60 i 90 minuta tranzitorne okluzije srednje cerebralne arterije u pokusnim skupinama (t-MCAO, n=5/grupi) dijabetičnih štakorica i 30 minuta t-MCAO u zdravih kontrolnih, nedijabetičnih štakorica (t-MCAO, n=5/grupi).....**41**
- Slika 5.5.** Promjene regionalnog moždanog protoka krvi (rCBF) prije, tijekom i nakon tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO) u ispitivanim skupinama: 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>.....**44**
- Slika 5.6.** Tipični presjeci mozga 24 sata nakon t-MCAO u svim ispitivanim skupinama: 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u

štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>;  
5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>. Bijelo područje odgovara području infarkta mozga.....46

**Slika 5.7.** Subkortikalni (panel A), kortikalni (panel B), kao i ukupni volumen infarkta mozga (panel C) 24 sata nakon tranzitorne okluzije srednje moždan arterije (t-MCAO) u svim ispitivanim skupinama: 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>.....47

**Slika 5.8.** Razina relativnog mRNA izražaja A) Cyp2C11, B) Cyp2J3 i C) Cyp4A1 gena u moždanom tkivu, u ispitivanim skupinama:1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>.....50

## **1. Uvod:**

### **1.1. Moždani udar- definicija i podjele**

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, World Health Organization, 2013.) definira moždani udar kao rapidno nastupajuće znakove fokalnog ili globalnog poremećaja moždanih funkcija, koji traju duže od 24 sata ili dovode do smrti, bez jasnog drugog razloga osim onog vaskularnog podrijetla. Obuhvaća ishemijski i hemoragijski moždani udar. Hemoragijski moždani udar podrazumijeva ekstraaksijalna (epiduralna, subduralna, subarahnoidalna) i intraaksijalna (intracerebralna, intraventrikularna) krvarenja.

Ishemijski moždani udar uključuje tromboze venskih sinusa, okluziju velikih moždanih arterija, okluziju malih arterija, embolizme kardijalnog ili aortalnog porijekla i arterijsko-arterijske embolizme, okluzije velikih intrakranijalnih arterija i globalnu ishemiju zbog generalizirane hipoperfuzije mozga. Smrtnost i invalidnost, kao i ekonomsko opterećenje pojedinca no i društva, koji nastaju kao posljedica moždanog udara u cijelom svijetu je izrazito velika (1).

#### **1.1.1. Ishemijski moždani udar i njegova struktura (jezgra, penumbra i oligemija)**

Najčešći tip moždanog udara (dalje u tekstu moždani udar ili infarkt mozga (u užem smislu riječi)) je ishemijski, koji obuhvaća oko 80% slučajeva (2). Ishemijski moždani udar proizvodi ishemijsku jezgru, ishemijsku penumbriu i oligemijsko područje u okolnom tkivu. Jezgra je ireverzibilno oštećena, radi poremećaja perfuzije i difuzije kisika i glukoze i posljedične nemogućnosti funkcioniranja metabolizma. Jezgra moždanog udara definira se kao tkivo perfundirano ispod praga perfuzije infarkta koji iznosi 5-8 ml/100 g/ min. i to samo u prvim satima. Kasnije raste i postaje jednak onom penumbrie oko 22 ml/ 100 mg/ min.(3-8). Prag potrebne količine moždanog metabolizma kisika, da ne bi došlo do infarkta, je 39  $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$ , no s duljim trajanjem se ne mijenja kao perfuzijski prag (9-10). Penumbria metabolizam kisika je manji, frakcija ekstrakcije kisika je povišena, a moždani krvni protok (dalje u tekstu regionalni moždani krvni protok, regional cerebral blood flow, rCBF) je uredan ili povišen. Definira se na više načina, koji s različitih tehnika gledanja govore zapravo isto; kao područje između električnog zatajenja i zatajenja ionske pumpe ili između praga infarkta i praga penumbrie (3) ili pomoću PET (pozitronska emisijska tomografija) podataka kao tkivo s normalnom difuzijom, ali smanjenom perfuzijom, oko jezgre koja ima i poremećaj difuzije (11). Penumbriu je još moguće spasiti, ali se tijekom vremena pretvara ili u jezgru

infarkta ili normalno tkivo, ovisno o revaskularizaciji kroz zahvaćenu arteriju ili kolaterale. Ima sposobnost preživljavanja od samo nekoliko sati kod nekih, do čak 18 sati, a ponekad čak i nekoliko dana kod drugih slučajeva, dopuštajući duži vremenski prozor za terapijsku intervenciju. Takva intervencija može biti npr. tromboliza ako se pomoću MRI (magnetska rezonanca, magnetic resonance imaging) vizualizira razlika između perfuzijskih i difuzijskih snimki, odnosno ako je volumen mozga kojemu nedostaje perfuzije veći od onoga kojemu nedostaje difuzijskog protoka (PWI>DWI (perfusion-weighted image/diffusion-weighted image mismatch). Takav događaj je češći nego što se misli, jer se MRI ne radi rutinski kod ranog moždanog udara, već dapače jako rijetko, a podrazumijevao bi hipoperfuziju cijelog MCA (srednja moždana arterija, middle cerebral artery) područja, ali poremećaj difuzije (DWI) ograničen na striatokapsularno/inzularno područje, što se nalazi kod čak do 70% bolesnika s akutnim infarktoma teritorija MCA(12). Oligemija se definira kao regija s rCBF iznad onog penumbre, ali ne urednim, a na PET skenovima kao područje povišene ekstrakcijske frakcije kisika. Također može biti u opasnosti ako dođe do hipotenzije, hipertenzije ili hiperglikemije (13). Oligemija kod akutnog moždanog udara mijenja indukciju i inhibiciju proteinske sinteze, HSP (heat-shock proteina), razmotanih proteina, kinaza endoplazmatskog retikuluma, kaspaza (14)... To vjerojatno predstavlja kompliciranu staničnu reakciju na stres (14), a ona pokreće apoptotski programiranu smrt stanice i može objasniti selektivni gubitak neurona u područjima čak udaljenim od penumbre i jezgre moždane ishemije (15). Liječenje ne cilja točno specifično na oligemijsko područje, ono samo sprječava sekundarna oštećenja kao hipotenziju, hiperglikemiju, porast hematokrita i vazogeni edem, koja prijete da inkorporiraju oligemiju u penumbru (5). Nedostatak energije u jezgri infarkta mozga dovodi do difunkcije stanične membrane i masivnog influksa Na<sup>+</sup>, vode, Ca<sup>++</sup>, efluksa K<sup>+</sup> i depolarizacije te stanične smrti. Visoki spori voltažni pomaci na granici jezgre šire depolarizacijske valove koji kompromitiraju preživljavanje i penumbralnog tkiva (16), čak i tjednima kasnije pokretanjem sporijih mehanizama stanične smrti. U jačoj ishemiji će smrt stanice biti brza. Stvari ipak nisu toliko jednostavne, jer noviji eksperimenti pokazuju da makroskopski intaktno penumbralno tkivo pokazuje znakove mikroskopskih oštećenja. Unutar naizgled neinfarciranog tkiva samo 27% regija iz kojih su uzeti uzorci nije pokazivao znakove neuronalnog gubitka, a 44% je pokazivao znakove oštećenja >50% od neurona u uzorku(17). Radi gore navedenih razloga penumbra i oligemija su područja od velikog interesa i ciljevi brojnih neuroprotektivnih mjera u liječenju moždanog udara (3-5). Ishemička smrt stanica koja se događa u jezgri dijeli se u tri kategorije: apoptozu, autofagocitozu i nekrozu. Nekroza je proces koji se događa nakon egzogenog oštećenja, a u njoj nema potrebe



za stvaranjem novih struktura u stanici i nije programirana, za razliku od prve dvije koje uvijek slijede iste stepenice koje vode do smrti kao dijala normalnog rasta i starenja odnosno života i smrti (18-19). Apoptoza se događa kada razina ATP-a (adenozin trifosfat) padne na oko 25%, a nekroza kada padne na 15% (20)(21). Autofagocitoza može koegzistirati s apoptozom, no može biti neovisna ili dio nekroze.

### **1.1.2. O patofiziologiji moždanog udara ili faze pri razvoju moždanog udara**

Ishemija aktivira sintezu potencijalno protektivnih, ali i destruktivnih proteina. Jedno pravilo, koje ima i svoje iznimke, je da se protektivni proteini stvaraju u relativno otpornim, a ne u osjetljivim stanicama ili previše oštećenim, koje su već na putu umiranja stanice. Postoje četiri glavna potencijalno oštećujuća proteina, COX-2 (ciklooksigenaza-2, cyclooxygenase 2), nNOS (sintaza dušičnog oksida, nitric oxide synthase), iNOS (inducibilna sintaza dušičnog oksida, inducible nitric oxide synthase) i Bax, i dva najvažnija citokina, IL-1b (interleukin-1b) i TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor, tumorski čimbenik nekroze), koja se tako sintetiziraju, a uglavnom su destruktivna, a po postojećim dokazima podupiru smrt stanice (22-25). Mehanizmi aktivacije gena su iznimno složeni, jer uključuju mnoge signalne i transkripcijske čimbenike. Ca<sup>++</sup>, neurotrofini, PAF (čimbenik aktivacije trombocita, platelet-activating factor), kao i neurotransmiteri koji djeluju kao metabotrofički receptori su svi sposobni aktivirati gene putem MAP kinaznog (mitogen-activated protein kinase, mitogen aktivirane protein kinaze) sustava ili drugim putovima. Mitogen-aktivirana protein kinaza se hiperfosforilira brzo nakon globalne ishemije u mnogim regijama (26) i tako može posredovati rane učinke; porast Ca<sup>++</sup> može činiti isto pomoću MAP kinaze, ali i alternativnim putovima (27), Kao što to mogu i slobodni radikali (28), npr. kao rezultat djelovanja NF $\kappa$ B (nuclear factor NF- $\kappa$ B) (29-30) ili AP1 (activator protein-1) aktivacije (31). Dolazi do rapidne transkripcije velikog broja gena uključujući c-Fos (c-Fos protoonkogen), c-Jun (c-Jun protoonkogen), junB (Jun B proto-onkogen), krox-20 i zif-268 (zinc finger protein) za vrijeme ili nakon ishemijskog moždanog udara (32-40) i nakon hipoksije/ishemije (41). Ulazak Ca<sup>++</sup> i slobodni radikali su sigurno sposobni aktivirati rane neposredne gene (immediate early genes), kao i PAF (42). Uzorak izražaja HSP (heat shock protein) je vrlo sličan ovome. mRNA za HSP 70, HSC70 (heat-shock cognate proteins) i HSP90 počinje rasti unutar nekoliko minuta od ishemijskog moždanog udara u svim regijama i to je učinak koji nakon toga traje dugo (35, 36,40). Proteinski izražaj pojačan je u otpornijim neuronima unutar nekoliko sati, ali HSP ne raste u osjetljivim neuronima (36,37). Ubikvitinska razina,

niskomolekularni HSP uključen u konjugaciju i razaranje oštećenih proteina, se dramatično smanjuje u nekoliko sati nakon ishemije, a potom oporavlja tijekom sljedeća 1-3 danu svim stanicama, osim onih koje su nepovratno oštećene, osuđene na smrt (43,44). Ovaj je fenomen uključen u oštećivanje moguće pomoću nagomilavanja djelomično denaturiranih proteina. HSP je neophodan za preživljavanje. Izražaj proteina inhibira aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF $\kappa$ B, koji se aktivira nakon ishemije, a čini se da je povezan s toksičnošću. 70-kDa HSP također zaštićuje od apoptoze, blokirajući aktivaciju kaspaza i njihov učinak na aktiviranje PLA2 (fosfolipaza A2, phospholipase A2), jezgri stanice i druge procese(45). Neutrofini i neurotrofični čimbenici služe kao endogeni neuroprotektivi prevencijom akumulacije slobodnih kisikovih radikala, prevencijom degradacije PKC (protein kinaza C, protein kinase C) i moguće obnavljanjem proteinske sinteze. Mogu također smanjiti odgođeno povećanje Ca<sup>++</sup>. Kao i s HSP, Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) grupa proteina se selektivno potiče u vitalno neugroženim regijama nakon globalne ishemije (46). Nasuprot protektivnim članovima obitelji Bcl, ubilački protein Bax (Bcl-2-associated X protein) bilježi poraste u vitalno ugroženim regijama nakon ishemije(22,23) kao i njemu sličan protein Bcl-short, a oba su ekprimirana tijekom razvoja ishemijskog oštećenja. Bax je također pojačano ekprimiran u penumbri fokalne ishemije (47). Postoji i dramatično smanjenje izražaja Bcl-2-like proteina i pojačanje izražaja proteina Bax-like u osjetljivim tkivima. Postoje argumenti koji govore da je povišenje Bax/Bcl-2 oštećujuće, a elevacija Bcl-2 u još vitalnim regijama protektivna. Bcl-2 jako zaštićuje od nekrotičke smrti stanica posredovane slobodnim radikalima(48). Ima i duboko protektivno djelovanje na mitohondrijsku funkciju, pomažući maksimalno preuzimanje Ca<sup>++</sup> i reducirajući sposobnost povišenog mitohondrijalnog Ca<sup>++</sup> da poremeti respiraciju moguće pomoću preveniranja otvaranja MTP (mitochondrial permeability transition pore) (49). Bcl-2 također jako štiti od apoptoze, prevencijom otpuštanja citokroma c i tako prevencijom aktivacije ICE-like (interleukin-1-beta converting enzyme ICE, poznat i kao caspase 1) proteaza (50). Genski produkti koji pojačavaju oštećenja su također ekprimirani u postishemijskom razdoblju. To su COX-2, iNOS, nNOS, a i citokini, posebno IL-1b i TNF-a. c-Jun izražaj također može pojačati oštećenje. Drugi proteini uključuju Bax, Bcl-x short, a i stanične adhezijske molekule. O ishemičkoj toleranciji treba reći da su kratka izlaganja ishemiji neuroprotektivna, a dokazano je da kad su životinje nakon tranzitornih ishemija bile podvrgavane ishemijskim moždanim udarima koji su bili inače obično letalni, kod globalnih ishemija gotovo da nije bilo oštećenja, a kod fokalnih su oštećenja bila znatno manja od očekivanih(51-57). Slična protekcija se postiže i kraćim termalnim stresovima, eksperimentalno proizvedenim kortikalno širećim depresijama i mehaničkim manipulacijama.

Dokazano je da inducirana tolerancija CA1 (sloj piramidnih stanica hipokampusu) nije inducirala inicijalni odgovor na ishemiju, s disolucijom mikrotubula, blokadom sinteze proteina, disagregacijom polisoma (58). Poboľjšala je oporavak od ovih promjena u CA1 piramidnim stanicama. Razumijevanja podloge tog mehanizma dovesti će do boljeg pregleda čimbenika koji inače uzrokuju oštećenja. Toleranciji treba nekoliko dana da postane maksimalna, a traje 7 dana(53, 59, 60). Vjerojatno je u podlozi sinteza novih proteina. Čini se da postoji jaka sveza između izražaja HSP i pojave Bcl-2 prije ishemije i pojave tolerancije(55)(61). Neki argumenti ipak govore i protiv te teze(62). Za neurotrofine, iako su logični kandidat za neuroprotekciju nema pravog dokaza(52) . Čini se da njihov učinak slabi nakon čimbenika koji uzrokuje toleranciju. Kao što je navedeno i ranije vrijeme koje je potrebno za indukciju tolerancije kod jedne vrste stanica može biti i letalno za druge vrste stanica. Razlog za to je vjerojatno razina na kojoj dolazi do globalne inhibicije proteinske sinteze. Nemogućnost sintetiziranja protektivnih proteina, a potom globalna inhibicija proteinske sinteze je dominantan čimbenik u dovođenju stanice do letalnog završetka. Postoje i dokazi da povišenje IL-1a ili IL-1b ili čak TNF- $\alpha$ , može inducirati, ali ne i stvoriti toleranciju. IL receptori, primijenjeni za vrijeme između prve kraće i druge inače letalne ishemije, potpuno su spriječili nastanak tolerancije. Primjena IL-1b ili IL-1a tijekom tri dana, bez prve ishemije, doveli su do značajnog razvoja tolerancije. IL-1a možda inducira sintezu sa stresom povezanih proteina kao što je Bcl-2 ili HSP prije ishemije, a možda dopušta i sintezu HSP tijekom ishemije. TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) također može posredovati u razvoju tolerancije, kod fokalne ali ne prejake ishemije(63). Citokini ne samo da pogoršavaju oštećenja u moždanog udara, već induciraju i toleranciju povećanjem sinteze protektivnih proteina nekoliko dana nakon neletalnog moždanog udara, i to opet kod manje vulnerabilnih stanica. Pojačano puferiranje  $Ca^{++}$  u mitohondijima i pojačana aktivnost  $Ca^{++}$  ATPaze je dokazana in vivo nakon prve ishemije i uzrok je manje akumulacije  $Ca^{++}$  u citosolu. Zato oni neuroni koji imaju razvijenu toleranciju na ishemiju bolje puferiraju  $Ca^{++}$  od običnih. Prvi od tih učinaka je sličan onom koji prouzroči jači izražaj Bcl-2 u tolerantnih stanica, no nije dokaz da  $Ca^{++}$  ili pojačana aktivnost Bcl-2 je uzrok tolerancije. Kako Bcl-2 bude pojačano aktivan tek 2-4h iza ishemije, smatra se da puferiranje  $Ca^{++}$  u citosolu ili mitohondrijsko preuzimanje istog zaštićuje neurone tek nakon 4h iza ishemije. Prvi je korak u ishemijskom procesu inhibicija elektronskog transportnog lanca i tako oksidativne fosforilacije, nakon čega dolazi do smanjene količine ATP-a i drugih fosfata, moguće fosfokreatina, a taj pad je dramatičan. Iznosi oko 90% u 1-2 minute(64, 65). Nakon toga padaju zalihe fosfokreatina, a pad ATP-a inhibira  $Na^{+}/K^{+}$  ATPazu, Porast intracelularnog  $Na^{+}$  i pad intracelularnog  $K^{+}$  dovodi do

depolarizacije stanične membrane- takozvane anoksične depolarizacije, koja je jaka u jezgri, a slabija u penumbri. Ne dovodi do oštećenja sama, ali je značajan marker istog. Pad ATP-a aktivira glikolizu, smanjuje pH, aktivira formiranje slobodnih radikala povišenjem razine ksantina, vjerojatno mijenja fosforilacijski status raznih enzima i strukturalnih proteina. Tranzitorna inhibicija  $Ca^{++}$  ATPaze u endoplazmatskom retikulumu (ER) i plazmatskoj membrani je isto prisutna, ali još neodređene važnosti.  $Na^+H^+$  i  $Na^+K^+Cl^-$  kotransporter je zahvaćen isto. Razine cAMP rastu 30 puta što je protektivno, kao i što je proces u kojem NMDA (N-methyl-D-aspartate) postaje defosforilirana i inaktivirana, L-tip  $Ca^{++}$  kanala postaje inaktivan, i dolazi do otvaranja ATP-osjetljivih  $K^+$  kanala, proizvodnje adenzina. Anoksička depolarizacija, s velikim, 10-30 mV negativnim ekstracelularnim direktnim strujama počinje 60 do 180 sekundi nakon ishemije, ovisno o razinu kisika i glukoze. Počinje prvo u jezgri ishemije, potom penumbri. Posljedica je vjerojatno inhibicije  $Na^+/K^+$  pumpe, pri niskim vrijednostima ATPa - na 13 do 40% od normale(66), porasta  $K^+$ , i pada  $Na^+$  i  $Ca^{++}$  ekstracelularno. Postoji i korelacija između PCr (phosphocreatine) i anoksične depolarizacije.  $Na^+$  teče u stanicu za vrijeme ishemije i postishemičkog perioda i najvjerojatnije je glavni uzrok oštećenja. Uzrokuje porast glutamatskog oslobađanja, povišava intracelularni  $Ca^{++}$ , smanjuje razinu ATP-a kktiviranjem  $Na^+/K^+$  pumpe, uzrokuje otok stanica s ulaskom  $Cl^-$ . Glutamatsko oslobađanje i aktivacija NOS pomoću NMDA traje satima nakon inicijalne ishemije, i porast NO i njegovih oštećenja slobodnim radikalima je krucijalni korak koji dovodi do začaranog kruga odgođenog ulaska  $Na^+$  i ponovo posljedica toga (67). Ovaj se mehanizam javlja i u penumbri radi odgođene aktivacije NMDA. Porast  $Ca^{++}$  u citoplazmi ima ključnu ulogu u normalnoj nekrotičnoj smrti stanice nakon ishemije. On ulazi u stanicu, a povišava razinu  $Ca^{++}$  za 25% pomoću NMDA receptora stimuliranih ekstracelularnim porastom glutamata u ranoj fazi ishemije (to je oko 80% količine).  $Ca^{++}$  inducirano oslobađanje  $Ca^{++}$  doprinosi ostatak. Nešto  $Ca^{++}$  preuzimaju mitohondriji ili je pohranjen u ER, no većinom je oslabljen putem influksa  $Na^+$  i aktivacije  $2Na^+/Ca^{++}$  transportera (68). Za vrijeme prvih nekoliko minuta NMDA receptori ishemijaske jezgre defosforiliraju, a kao posljedica pada ATP-a, a tako postaju inaktivni. Da nije tako oštećenje bi bilo još i veće. Kasnije održavanje razine je rezultat  $Na^+$  induciranog  $Ca^{++}$  oslobađanja iz mitohondrija, s poremećajem uklanjanja  $Ca^{++}$  preko plazmaleme zbog niske razine aktivnosti  $Ca^{++}$  ATP-aze i influksa drugim putovima kao što su N-tip i L-tip  $Ca^{++}$  kanala i  $2Na^+/Ca^{++}$  razmjena (69-71). S druge strane u penumbri je  $Ca^{++}$  influks jače ovisan o NMDA jer ATP ne pada toliko. Intracitosolni porast  $Ca^{++}$  je velik i ostaje takav u postishemičkom razdoblju, a aktivira  $Ca^{++}$  ovisne procese. Mogući mehanizam kojim povišeni  $Ca^{++}$  uzrokuje smrt je aktivacija NOS,

kalpaina, generiranje slobodnih radikala fosfolipidnim metabolizmom ili transformacijom XD (xantine dehidrogenase) u XO (xantine oxydase) (u globalnoj ishemiji), oštećenje mitohondrija (72) ili drugi putovi kao npr kalmodulinski (73). Cink se akumulira intracelularno nakon ishemije. Glutamat raste nakon što akumulacija  $\text{Na}^+$  u stanici izazove depolarizaciju i egzocitozu glutamata preko citosolnog  $\text{Ca}^{++}$  ovisnog spontanog vezikularnog oslobađanja ili preko obrnutog funkcioniranja glutamatskog preuzimanja vezanog uz visoko afinitetni  $\text{Na}^+$ -ovisni glutamatski prijenos, koji je uzrokovan slobodnim radikalima (vjerojatno glavni mehanizam). Peroksinitrit inhibira tri glavna klonska transporterske vrste (74,75). Fosforilacija sinapsina I putem MEK-MAP (MEP gen za mitogen-activated protein kinase) kinaznog sistema dovodi do ishemičkog oslobađanja glutamata. Ektracelularni glutamat raste već 2 minute nakon ishemije i ostaje povišen u jezgri, ali pada u penumbri nakon oko 1h, čak i brže kod tranzitornih ishemija. Ipak postoji i porast nakon 2h koje je, dakle, odgođen. Sam glutamat je puno opasniji uz kisik nego bez njega - u anoksiji (76). Glutamat stvara ekscitotoksično oštećenje u jezgri, ali i penumbri, ovisno o slobodnim radikalima i stvaranju NO (dušični oksid), oštećenju mitohondrija zbog ulaska  $\text{Ca}^{++}$ . Prva dva procesa trebaju kisik, a zadnji jako aktivan oksidativni metabolizam. Uzrokuje i apoptozu i nekrozu i ovisan je kao i fokalno ishemičko oštećenje o vremenu potrebom za razvoj oštećenja (12–24 h), stvaranju NO, slobodnih kisikovih radikala, aktivaciji kalpaina u većini staničnih tipova, aktivaciji kalcineurina i PARP-a (poly ADP ribose polymerase). AMPA/kainatni ili metabotropni receptori (AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina) doprinose staničnoj smrti, oslobađaju  $\text{Ca}^{++}$  iz mitohondrija i njegovom porastu u citoplazmi. AMPA receptori postaju znatno propusniji u oštećenim regijama između 1-3 dana nakon globalne ishemije. Moguće je i daje zapravo to ključni toksični događaj u globalnoj ishemiji a da su prethodni događaji oštećujući jer na kraju uzrokuju ovu promjenu AMPA receptora, koja nakon toga vodi u klasičnu ekscitotoksičnost. Oštećenje posredovano glutamatom rezultat je intrahemičkih depolarizacija koje aktiviraju štetne tijekomove iona  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Na}^+$  kroz voltažno ovisne i receptorima kontrolirane kanale. Moguće je da su oba mehanizma operativna i da depolarizacija pojačava influks iona posredovan receptorima. Važnost NMDA posredovane aktivacije TNF- $\alpha$  pokazuje kako postoje dodatni učinci u ishemiji. Glutamat senzibilizira moždano tkivo na ishemiju, što dovodi izlaganje ishemiji do letalnog učinka na neurone. Jezgra je toliko dugo metabolički kompromitirana da se oštećenja događaju i bez glutamata. Ektracelularni prostor postaje kiseo unutar 20 sekundi ishemije, puno prije anoksične depolarizacije i intercelularni pH pada za 0.5-1 jedinicu brzo, počinjući unutar 1 minute i dolazeći do minimuma nakon oko 2 minute. U jezgri gdje je protok pao na 25% u 10. minuti i

na 10% za 3-4h, pHi (intracelularno) pada na 6.6, 6.2, i 6.1 u to vrijeme. U penumbri, gdje je protok pao na oko 40%, nije bilo značajnog pada pHi nakon 3 h a manji pad je bio pri 4h (na pH 6.75). Rani pad u Phi rezultat je trenutne blokade oksidativne fosforilacije i kontinuiranog tijeka kroz glikolitički put. Nizak pHi može povisiti intracelularni Na<sup>+</sup> aktivacijom Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transportera nakon ishemije, kada je ekstracelularni H<sup>+</sup> ispran za vrijeme reperfuzije. Za razliku od glutamata, ove promjene pH same za sebe ne oštećuju neurone. Stvaranje slobodnih radikala je vjerojatno rezultat smanjenog pH preko delokalizacije željeza i Fentonove reakcije. Smanjeni pH smanjuje mogućnost stanica da smanje citoplazmatsku koncentraciju Ca<sup>++</sup> nakon ishemije, ima učinak na stvaranje BDNF (brain-derived neurotrophic factor), prolazno denaturira ključne enzime ili strukturalne proteine (endonukleaza se aktivira pri pH oko 6.6). Od svih ovih najznačajniji se čini učinak slobodnih radikala na oštećivanje. Za vrijeme okluzije arterije postoji porast kisikovih radikala, ali taj porast ostaje značajno veći tijekom reperfuzije. Njegovo trajanje ovisi o trajanju ishemije. U nekim područjima 24h nakon ishemije postoji jak porast superoksida a u isto vrijeme i COX-2 enzima. Proizvodnja kisikovih radikala se čini ograničena na penumbri. Značajan porast je vidljiv tijekom 2-3h ishemije, radi kontinuiranog generiranja, a reperfuzija nakon 1 ili 2h daje novi porast koji traje 6h. Oštećenje jezgre ishemije koje se događa unutar prva 3h nakon moždanog udara nije porijekla od kisikovih radikala, jer u jezgri tada, tijekom prva tri sata ishemije, a i tijekom još 3h reperfuzije, iako NO i peroksinitrit čini se rastu nakon toga. I iNOS (koji proizvodi NO u endotelnim stanicama i neutrofilima) o COX-2 (prostaglandin H sintaza- proizvodi superoksidne radikale u neuronima) su pojačano aktivni u penumbri tijekom 6-24h nakon ishemije. Njihovi produkti mogu reagirati i tvoriti peroksinitrit (ONOO<sup>2</sup>) jer i NO i superoksid mogu difundirati nekoliko stotina mikrometara. Može nastati nakon aktivacije NOS same za sebe, koristeći bazalne količine superoksida ili iz proizvodnje samog superoksida. Peroksinitrit, superoksid i OH<sup>•</sup> (hydroxyl radical) predstavljaju tri vrlo aktivna radikala. Postoji XO - inducirana proizvodnja slobodnih radikala, metabolitima arahidonske kiseline inducirana proizvodnja istih, kalmodulinom inducirana proizvodnja NO i neutrofilima inducirana proizvodnja superoksida iz NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). Raspadom adeninskih nukleotida za vrijeme ishemije dolazi do akumulacije hipoksantina unutar 10-ak minuta, koji ksantin oksidaza metabolizira u slobodne radikale. Dolazi do višestrukog povišenja razine slobodnih masnih kiselina (FFA), uključujući i arahidonske, za vrijeme i nakon ishemije. Metabolizmom putem ciklooksigenaze ili lipooksigenaze dolazi do superoksida ili produkcije OH<sup>-</sup> koja dalje aktivira raspad fosfolipida u arahidonsku kiselinu. COX-2 inducirana proizvodnja eikosanoida događa se tijekom 6-48 hi

tako predstavlja veliki izvod odgođene produkcije slobodnih kisikovih radikala. Neutrofili adheriraju na zid krvne žile i ulaze u parenhim za vrijeme i nakon fokalne ishemije, oksidiraju NADPH da bi nastao superoksid. Proizvode iNOS 1-2 dana nakon fokalne ishemije. Mitochondriji normalno proizvode slobodne radikale vrlo brzo. Za vrijeme i tijekom 45 minuta nakon ishemije, čak 2% elektrona teče ka formaciji superoksida, dovodeći do NO, a također i peroksinitrita. Akumulacija  $Ca^{++}$  i otvaranje MTP su među drugim činiocima koji vjerojatno uzrokuju mitohondrijsku produkciju slobodnih radikala. NO stvaraju neuroni i endotelne stanice sa svojom NOS, u reakciji ovisnoj o kisiku, a koja je aktivirana  $Ca^{++}$ /kalmodulinom u većini stanica. Može također ukloniti fosforilacijom indicirani zastoj, aktivacijom kalcineurina. I neuronalna i inducibilna NOS su pojačano aktivne nakon ishemije. Peroksinitrit se stvara reakcijom između superoksida i NO kada NO poraste na 1-2mmola, što se događa u ishemiji. Može stvoriti vrlo reaktivnu peroksinitroznu kiselinu koja se rastvara na OH- i razne dušikove i kisikove spojeve. Oboje je vrlo reaktivno, prolazi stanične membrane, tako da peroksinitrit, s dužom mogućnošću difuzije- do 100mm, kao i superoksid može djelovati u drugim stanicama osim onih u kojim je nastao. MAO (monoamin oksidaza) djeluje na oslobođene monoamine, a dolazi i do stvaranja  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide), koji se onda može metabolizirati u OH $\cdot$  u Fentonovoj reakciji. Superoksid i NO se obično prvi stvaraju, ali superoksid nije jako reaktivan. Stvaranje ONOO $_2$  je vjerojatno ono koje stvara dosta toksičnosti. Reakcijski proizvodi superoksida, OH $\cdot$  ili HO $_2\cdot$  (hydroperoxyl), su vrlo reaktivni i vjerojatnije da će stvoriti toksično stanje. Stvaranje OH $\cdot$  je jače pri niskom pH, koje postoji kod ishemije i kod delokacije slobodnog željeza s proteina kao rezultat sniženog pH ili superoksidom inducirane redukcije  $Fe^{3+}$ .  $Ca^{++}$  ovisne proteaze, kalpain, kaspaze i katepsini, 20S proteasomi također imaju svoju ulogu. Kalpain se aktivira pri malim koncentracijama ako je  $Ca^{++}$  vezan za fosfoinozotide ili druge specifične proteine. Napada citoskeletalne proteine kao što su MAP2, spektrin, ankirin, sudjeluje u razaranju mikrotubula, otvara MTP, razara eIF-4, moguće i aktivira autofagocitozu. Ima kritično mjesto u apoptozi, a pomaže u remodeliranju dendrita u kasnoj fazi nakon ozljede. Počinje djelovati, kao i slobodni radikali, oko 3-6h nakon ishemije. Ishemija uzrokuje duboke promjene fosfolipidnog metabolizma, s porastom slobodnih masnih kiselina u mitohondrijima i ostatku stanice. Osnova pojačane mobilizacije je u aktivaciji PLC (phospholipase C) i PLA $_2$  (phospholipase A $_2$ ) i smanjenoj resintezi fosfolipida zbog niskog ATP-a. Rezultati uključuju poremećaj funkcije membrane, proizvodnju slobodnih radikala, aktivaciju kalpaina ili u slučaju PAF, genetske mehanizme. Ishemička smrt stanice u jezgri može biti apoptotička, autofagocitotička ili nekrotička.

Apoptoza i autofagocitoza događaju se programirano (18,19). Apoptoza dovodi do smrti stanice aktivacijom kaspaza i kalpaina (77-80). Dolazi o masivnog napada na citoskelet, kondenziranja kromatina, skupljanja citoplazme, oslobađanja citokroma c u citoplazmu te na kraju smrti stanice. Autofagocitoza nastaje aktiviranjem fuzije lizosoma koji počinju obuhvaćati i organele, dolazi do kondenzacije citoplazme te smrti stanice (81,82). Nekroza može biti edematozna, ishemička ili homogenizirajuća. Edematozna se smatra posljedicom primarno gubitka citoskeleta i drugih proteina te otjecanja citoplazme radi poremećaja Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-aze (83). Ishemična je posljedica također masivne proteolize i aktivacije Ca<sup>++</sup> i K<sup>+</sup> kanala(84). Homogenizirajuća vjerojatno nastaje iz ishemične, a karakterizira ju postojanje fragmentirane citoplazme i zgusnute jezgre. Apoptoza se događa pri razini ATPa oko 25%, a nekroza kada je razina ko 15% (20). Završna faza apoptoze i nekroze su jako slične (21). Autofagocitotične stanice mogu postojati kod nekroze ili apoptoze, a autofagocitoza se može događati i zasebno. Vakuole se na kraju krajeva nalaze na kraju etape oba puta i dijelom mogu biti autofagocitotične. Kada se razina ATPa ili drugi parametri, kao npr. Ca<sup>++</sup> dramatično mijenjaju, mogu onesposobiti apoptotski put i usmjeriti proces ka nekrozi, što može biti posljedica poremećene sinteze potrebnih proteina ili fosforilacije. Tako nekroza ostaje kao put do smrti ako apoptoza više nije moguća.

### **1.1.3. Medikamentozno liječenje moždanog udara**

Trenutno je jedino učinkovito medikamentozno liječenje moždanog udara kod ljudi tromboliza pomoću rekombinantnog tkivnog plazminogen aktivatora (rtPA), ali dijabetes je u nekim slučajevima isključujući kriterij, kao kod liječenja recidivnog moždanog udara. Vremenski prozor za liječenje je relativno uzak i prema najnovijim smjernicama drugi lijekovi nisu pokazali učinkovitost u poboljšanju ishoda moždanog udara pa stoga nisu preporučljivi (85). Potraga za alternativnim načinima liječenja je dobrodošla.

### **1.1.4. Moždani udar i dijabetes**

Više od 347 milijuna ljudi na cijelom svijetu danas ima dijabetes i mnoge njegove komplikacije, od kojih su neke, kao mikro i makroangiopatija rizični čimbenici moždanog udara pa je dijabetes ukupno gledano jedan od najvažnijih rizičnih čimbenika za moždani udar. On pridonosi čak do 50% rizika za smrt od kardiovaskularnih bolesti, uglavnom srčane



bolesti i moždanog udara, a 2 do 4 puta veći rizik cerebrovaskularne bolesti, ali također od ponavljanja moždanih udara. Od 15 milijuna ljudi koji svake godine dobiju moždani udar, jedna trećina umire, a još jedna trećina je trajno onesposobljena radi neuroloških deficita koji su posljedica moždanih udara (87). Dijabetes je prisutan u 25% svih bolesnika s moždani udarom, a hiperglikemija u 40%, a oboje su prognostički markeri lošijeg neurološkog ishoda (87, 88). Poznato je da neka stanja stvaraju tzv. akceleraciju ishemičnog procesa kod infarkta mozga. Takvo stanja su hiperglikemija i akutna infekcija kod svježeg moždanog udara. Kod njih postoji veća vjerojatnost hemoragične transformacije infarkta mozga i pojave ranih hipodenziteta tkiva mozga (kao znakova ireverzibilne ishemije i edema) vidljivih na CT-i (computed tomography, računalna tomografija), iako su sigurno unutar vremenskog prozora koji je prihvatljiv za trombolitičko liječenje (89, 90). Sama povišena serumska koncentracija glukoze se pokazala neovisnim prediktorom hemoragijske transformacije infarkta mozga, a također i lošijeg ishoda lakunarnih moždanih udara u kohorti bolesnika u TOAST istraživanju. Ovaj lošiji ishod je bio neovisan o postojanju ranijeg dijabetesa, a tumači se pojačanim razvojem aterosklerotskih zbijanja, formiranjem ekstenzivnijih plakova u zahvaćenim arterijama, ali i onemogućavanjem reagiranja kolateralne mreže arterija na ishemiju (za koju neki autori okrivljuju i disfunkciju autonomnog živčanog sustava kao mogući patofiziološki mehanizam). Vjerojatno se radi o kombinaciji slabije perfuzije ishemičnog tkiva s metaboličkim poremećajima (91). Mogući mehanizam ovog poremećaja reperfuzije uključuje oštećenje endotela radi hiperglikemije, pojačan izražaj adhezijskih molekula ali i glikozilacija krucijalnih proteina koji stvaraju vazodilatacijske i antitrombotske spojeve kao što je dušikov oksid (92). Dodatno hiperglikemija pogoršava mogućnosti za oporavak metaboličkih funkcija stanice nakon ishemičkog oštećenja. Nekoliko potencijalnih metaboličkih čimbenika se navode kao uzrok lošijeg ishoda: acidoza koja direktno oštećuje tkiva, prolongirana postishemijska alkalozna s lošim djelovanjem na mitohondrijsku funkciju, odgođena postishemijska hipertermija koja potiče štetne enzimske reakcije poput formiranja peroksinitrata i poticanje stvaranja hidroksiliranih radikala. Zajednički rezultat tih hiperglikemijskih celularnih promjena je stvaranje slobodnih kisikovih radikala. Formiranje završnih produkata glikozilacije (advanced glycation end products (AGE)) kao rezultat pojačane neenzimske glikozilacije proteina, lipida i nukleinskih kiselina, praćen je oksidativnim reakcijama koje stvaraju slobodne radikale i njihov su najveći izvor u uvjetima kronične hiperglikemije (93). AGE su i moguća poveznica između hiperglikemije i štetnog djelovanja upale, a povezani su s sekundarnim komplikacijama dijabetesa. Mogu se pojaviti već nakon nekoliko sati hiperglikemije, a postoje dokazi da oni i slobodni radikali,

aktivacijom inflamatorne kaskade preko NF- $\kappa$ B, mogu pogoršati ishemičko oštećenje. Hiperglikemija također mijenja produkciju eikosanoida i time vaskularni tonus. Hiperglikemija stimulira lopoksigenazni i ciklooksigenazni put u glatkim mišićnim stanicama, stvarajući vazokonstriktorne prostaglandine kao što je tromboksan A<sub>2</sub>. To može biti razlog za izostanak postreperfuzijskog pojačanja protoka i razlog za efekte inhibitora ciklooksigenaze (94). Dijabetes dakle dovodi do mikroangiopatije, tkivne hipoksije, ateroskleroze i ishemijskih lezija, jačeg odgovora na vazokonstriktore i slabijeg odgovora na vazodilatatore, što ometa moždanu autoregulaciju krvotoka (95).

### **1.1.5. Spolne razlike kod bolesnika s moždanim udarom**

Žene s dijabetesom imaju 4.8 puta veći rizik za razvoj ishemijskog moždanog udara u odnosu na opću populaciju (u usporedbi s 3.7 puta većim rizikom kod muškaraca s dijabetesom) (96-98). Ti bolesnici češće zadobivaju fatalne moždane udare (standardizirani omjer smrtnosti 3.1 za muškarce i 4.4. za žene) (96-98).

## **1.2. Hiperbarična oksigenacija (HBO<sub>2</sub>) i njezin utjecaj na moždani udar**

### **1.2.1 Definicija i fiziologija HBO<sub>2</sub>.**

Liječenje hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>, HBOT- hyperbaric oxygen therapy) se definira kao intermitentna inhalacija 100% kisika unutar hiperbarične komore, pod tlakom većem od 1 atmosfere (ATA, razina mora). To je adjuvantna terapija korištena u mnogim stanjima gdje je smanjena oksigenacija tkiva i ne odgovara metaboličkim potrebama. Ona dovodi ne samo do zasićenosti hemoglobina kisikom (koji je kod atmosferskog tlaka već zasićen 97%), nego značajno povećava razinu otopljenog kisika u plazmi je važno u raznim stanjima u kojima je oksigenacija tkiva reducirana i ne zadovoljava metabolične potrebe. Tada se povišenjem tlaka po Henry-jevom zakonu situacija mijenja. Dok normobarični zrak pri normalnom tlaku od 1 ATA proizvodi arterijski tlak kisika oko 100 mmHg, a tkivni oko 55 mmHg, 100% kisik pri 3ATA povećava arterijski na oko 2000 mmHg, a tkivni na oko 500 mmHg. To omogućava transport 60 mL kisika po litri krvi (99, 100). Boerema je učinio jedan zanimljiv pokus kojim je ovo slikovito objasnio; održavao je na životu potpuno eksangvinirane svinje samo na plazmi i hiperbaričnom kisiku, bez pomoći hemoglobina iz eritrocita. Najvažniji rCBF za vrijeme moždanog udara je zapravo kapilarni tijek krvi, a sastoji se većinom od protoka plazme, koja dopire i tamo gdje eritrociti ne mogu, npr. zbog opstrukcije i zato je kisik u plazmi tako važan. Pri atmosferskom tlaku kisik se također

prenosi u plazmi, ali to je samo 3% od ukupnog potrebnog i dostavljenog kisika. Primjenom HBO<sub>2</sub> dokazano je, postiže se deseterostruko povišenje razine otopljenog kisika, još više povisuje difuzijski gradijent te postiže 20% povećanje oksigenacije ishemičke penumbre, smanjenje moždane razine piruvata i laktata, poboljšanje mitohondrijske funkcije (101-104). Primjena kisika pod povećanim tlakom povećava arterijski i tkivni PaO<sub>2</sub>, tako poboljšava tkivnu oksigenaciju i smanjuje oštećenja. HBO<sub>2</sub> smanjuje hipoksiju penumbralnog tkiva tijekom rane faze ishemije mozga značajno efektivnije nego normobarična oksigenacija (NBO<sub>2</sub>), doprinosi cijeljenju ishemičkih ulceracija kod dijabetičara i poboljšava ishod nakon moždanog udara (104), infarkta miokarda (105), akutne ishemije ekstremiteta kod ljudi (106), reducira aterosklerotske plakove u animalnim eksperimentalnim modelima (104, 105) itd.. Manje je poznato kako HBO<sub>2</sub>, utječe na strukturalne lezije nakon ishemičko-reperfuzijske ozljede (mjereno u volumenu infarkta).

Stoga su potrebna dalja istraživanja koja bi proučavala mehanizme kojima HBO<sub>2</sub> dovodi do svojih učinaka. U posljednje vrijeme se mnoga takva istraživanja i provode pojašnjavajući nam korisne učinke HBO<sub>2</sub> na ishemična tkiva (107). HBO<sub>2</sub> popravljiva dopremu kisika tkivu, obnavlja funkciju ionske pumpe, postishemijski cerebralni metabolizam pogotovo u penumbri, a svime time produžuje neuralno preživljavanje i mogućnosti do razvoja koletaralne cirkulacije (108). HBO<sub>2</sub> poboljšava i postishemijski metabolizam pomažući produkciju ATP-a i smanjenjem akumulacije laktata, smanjuje oštećenja krvno moždane barijere (109), potpomaže formiranje kolagenskog matriksa potrebnog za angiogenezu (110-112). U normalnom tkivu HBO<sub>2</sub> uzrokuje značajnu vazokonstrikciju, no taj se efekt u ishemijskom tkivu kako je već ranije u brojnim primjerima dokazano ne vidi. Čak dolazi do porasta protoka za vrijeme HBO<sub>2</sub>, a poboljšava se transport kisika s više otopljenog kisika u plazmi i poboljšanjem mikrovaskularnog protoka (113, 114) a sve to pomaže „dobivanju na vremenu“ i stvara vrijeme potrebno da se razviju kolaterale, odnosno da stanice koje su preživjele prvu, ishemičku ozljedu prežive. Do sada su se koristili modeli trajne i tranzitorne okluzije moždanih arterija, s različitim trajanjem tranzitorne okluzije te vremena od ishemije do HBO<sub>2</sub> i broja izlaganja HBO<sub>2</sub> (115,116). Njihovi podaci sugeriraju da je najveća korist postizana kod kraćeg trajanja ishemije te započinjenjem HBO<sub>2</sub> što prije nakon nastanka moždanog udara, korištenjem manjih pritisaka unutar komore (1.5-2.5 ATA), skraćenjem trajanja izlaganja HBO<sub>2</sub>, i korištenjem multiplih ekspozicija. Ipak HBO<sub>2</sub> pri 2 ili 2.5 ATA pokazala se superiornijom od 1.5 ili 1.0 ATA (117,118). Vremenski prozor za primjenu HBO<sub>2</sub> kod štakora je oko 6 h, što je dulje nego kod trombolitičke terapije (dvije studije pokazale su da je korisna, s boljim histološkim i neurološkim rezultatima, ako se primjeni 3h ili 6 h nakon

ishemije, a štetna ako se primjeni 12h ili 23 h iza nje (119,120). Moždani udar, smanjenim dovodom kisika, dovodi do hipoksije tkiva i te pokreće ireverzibilnu spiralu stanične smrti ekscitotoksičnošću, oksidativnim stresom, inflamacijom i apoptozom. Jedan od najvažnijih mehanizama neuroprotekcije s HBO<sub>2</sub> je inhibicija apoptoze ozljeđenog tkiva, posebno u penumbri, što je dokazano na neonatalnoj ishemiji štakora, kod fokalne cerebralne ishemije i globalnoj cerebralnoj ishemiji (121, 122). HBO<sub>2</sub> smanjuje aktivnost i izražaj kaspaza-3, smanjuje PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) cijepanje, i zaustavlja fragmentaciju DNA. Moguće je i da djeluje direktno na gene osjetljive na kisik. Neka recentna istraživanja pokazala su da smanjuje hipoksijom-inducirani čimbenik 1- $\alpha$  (, hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )) i brojne druge gene povezane s apoptozom (123). Ishemijom inducirano nakupljanje HIF-1 $\alpha$  aktivira svoje ciljne gene kao što su geni za angiogenezu (VEGF (vaskularni endotelijalni čimbenik rasta, vascular endothelial growth factor), eritropoezu (eritropoetin), i glikolizu (glikolitičke enzime i glukozne transportere). HIF-1 $\alpha$  također aktivira tumorski supresorski gene p53, i kaspazu-9, sve snažno povezane s apoptozom. Aktivacija p53 dovodi do oslobađanja citokroma C i aktivacije kaspaze-9 i kaspaze-3, rezultirajući staničnom smrću, pogotovo apoptozom. Jedan od najjačih inhibitora rastameđu tim mijelin-povezanim inhibitorima je Nogo-A (neurite outgrowth inhibitor), koji se veže na Nogo receptor (Ng-R) (124, 125) aktivirajući intracelularne Rho GTPazni singalne puteve. Ishemija proizvodi morfološke ozljede i odmah povisuje izražaj Nogo-A, Ng-R i njihov izvršitelj RhoA (koji je prisutan u ishemičnom moždanom korteksu). HBO<sub>2</sub> smanjuje njihov izražaj(126). Svi čimbenici Nogo-A puta odmah reagiraju, unutar 6h povišenjem razine, a vrh ima je 48h nakon globalne ishemije. Nogo-A ima važnu ulogu u preveniranju regeneracije neposredno nakon ozljede, prije formacije glijalnog ožiljka. Supresija Nogo-A puta pomoću HBO<sub>2</sub> mogla bi pomoći pri oporavku neuroloških funkcija, kao što je primijećeno u animalnom modelu globalne ishemije. HBO<sub>2</sub> u moždanom tkivu ima i antiinflamatorno djelovanje smanjivanjem izražaja ciklooksigenaze-2 (COX-2), smanjivanjem broja intercelularnih adhezijskih molekula-1 (ICAM-1), indukcijom endotelne sinteze dušičnog oksida (eNOS) te time redukcijom adhezije i infiltracije leukocita (127, 128). Događa li se isto ili drugačije u moždanim krvnim žilama, još nije dokumentirano. Krvno moždana barijera je karakteristika moždane mikrovaskulature i formirana pomoću čvrstih interendotelnih intercelularnih spona, intaktne podležeće bazalne lamine i astrocitnih nogica. Ishemija oštećuje i primarnu endotelnu barijeru i sekundarnu koja se sastoji od bazalne lamine i integrinski postredovanih interakcija stanica i ekstracelularnog matriksa. Poremećaji endotelijalnih čvrstih spojeva i integrinskog izražaja, kao i aktivacija metaloproteinaza događa se već prvih sati nakon tranzitorne

ishemije, a disolucija komponenti bazalne lamine je odgođenija (129-134). HBO<sub>2</sub> dokazano smanjuje rano i odgođeno oštećenje krvno moždane barijere tijekom tranzitorne fokalne ishemije u štakora (109). HBO<sub>2</sub> je pokazao protektivno djelovanje na krvno moždanu barijeru, a tako i smanjenje ulaska inflamatornih stanica i upalnih medijatora, smanjenje stvaranja edema mozga i hemoragizacije infarkta mozga(135-137) nakon tranzitorne fokalne ishemije u štakora (109). Nova istraživanja pokazuju uspjeh takozvanog predtretmana (prekondicioniranja, pripreme tkiva pomoću HBO<sub>2</sub>, za ishemička oštećenja), pospješujući njihov oporavak i smanjujući konačni infarkt (104).

### **1.2.2. Liječenje moždanog udara pomoću HBO<sub>2</sub>**

Ipak međunarodne smjernice, poput onih društva AHA /ASA (American Heart Association/American Stroke Association) i u svojim najnovijim smjernicama iz 2013. godine navode kako su podaci o koristi primjene HBO<sub>2</sub> nedovoljni za donošenje preporuke o liječenju te da bi navedeno liječenje potencijalno moglo biti i štetno. Stoga se još uvijek ne preporučuje za liječenje bolesnika s akutnim ishemičkim moždanim udarom (85). Jedna metaanaliza liječenja s HBO<sub>2</sub> u kliničkoj praksi nije našla da poboljšava klinički ishod nakon moždanog udara. Ipak, glavni problem otkriven pri analizi ovih istraživanja korištenih u meta-analizi je bio odgođen početak liječenja od nastupa moždanog udara do primjene HBO<sub>2</sub> i potreba njege bolesnika u specijaliziranoj komori za HBO<sub>2</sub> (138).

### **1.2.3. Potencijalni utjecaj HBO<sub>2</sub> na ulogu 20- HETE u razvoju moždanog udara**

Dijabetes, posebno neliječeni, dovodi do angiopatije, tkivne hipoksije, ateroskleroze i ishemijskih lezija, jačeg odgovora na vazokonstriktore i smanjenog odgovora na vazodilatatore, dovodi do poremećaja moždane autoregulacije (95). Citokrom P450 (P450) metabolizira arahidonsku kiselinu (AA) u hidrokdieikosatetraenoične kiseline acids (HETE-i) i epoksieikosatrienoične kiseline (EET-i). Jedan od tih, 20-HETE, ima važnu ulogu u regulaciji cerebrovaskularnog tonusa kao potentni vazokonstriktor koji proizvode glatke mišićne stanice (VSM). 20-HETE depolarizira te stanice blokadom vjerojatnosti otvorenog stanja Ca<sup>2+</sup> aktiviranih K<sup>+</sup> kanala i prihvaćen je kao protu-regulator dušičnog oksida u malim žilama mozga. Nakon moždanog udara taj povišeni cerebrovaskularni tonus može djelomično biti posljedica pojačanog otpuštanja tog vazokonstriktora, 20-HETE (139). HBO<sub>2</sub> bi mogla djelovati protiv ove vazokonstrikcije. 20-HETE inhibitori ili povećanje razine EET-a bi mogli

smanjiti moždano oštećenje nakon moždanog udara, blokadom vazospastičnog odgovora moždanih arteriola, pogotovo kod dijabetičara.

#### **1.2.4. Reperfuzijska ozljeda i HBO<sub>2</sub>**

Reperfuzijska ozljeda druga je važna noksa koja pogoršava ishemijske, „crush“ i druge traumatske ozljede, propadanje kožnih reznjeva i slično. Patofiziološka pozadina ovog fenomena koji se događa kod neuralnog oštećenja nakon ishemije su neutrofili koji prijanjaju za zid krvnih žila ishemičkog tkiva, oslobađaju proteaze i lokalno proizvode slobodne radikale, pojačavaju upalu, dovodeći do patološke vazokonstrikcije i jačeg oštećenja tkiva (140). HBO<sub>2</sub> promovira generiranje molekula („scavengers“) koje detoksiciraju tkivo od kisikovih radikala, preveniraju lipidnu peroksidaciju staničnih membrana, promoviraju sekvestraciju leukocita u plućima, tako prevenirajući njihovu akumulaciju u oštećenom tkivu. HBO<sub>2</sub> inhibira adherenciju neutrofila i postishemičku vazokonstrikciju u ishemičnom tkivu štakora. HBO<sub>2</sub> smanjuje COX-2 mRNA i proteinsku ekspresiju u ishemičnoj hemisferi nakon t-MCAO odnosno okluzije/reperfuzije u štakora (141). HBO<sub>2</sub> smanjuje i ishemijom inducirano smanjenje razine neurotrofin-3 mRNA i tako može pomoći oporavku ishemijskog oštećenja mozga (142).

#### **1.2.5. Cijeljenje tkiva i HBO<sub>2</sub>:**

HBO<sub>2</sub> poboljšava formiranje kolagenskog matriksa, koji je potreban za angiogenezu, jedan kompleksni proces koji koristi različite tipove stanica i medijatora, što je najočitiije na rubovima ishemičnog oštećenja, gdje dovodi do visokog gradijenta kisika, koji je važan stimulus angiogeneze i cijeljenja(110,111). Cijeljenje i angiogenaza je brža i bolja kod oštećenja liječenih s HBO<sub>2</sub>. Učinak jedne ili ponavljanih procedura trebao bi pomoći u održavanju na životu onih stanica koje su preživjele prvu ishemijsku ozljedu (112). Na animalnim modelima je slično tomu demonstrirano da se količina i veličina krvnih žila u kožnim reznjevima značajno povećava kada su liječeni s HBO<sub>2</sub>. Učinak je zanimljivo jače izražen u kompromitiranim tkivima poput ishemičnog, hipoksičnog ili postiradijacijskog oštećenja i kod oštećene vaskulture. To je logično ako se sjetimo originalnih Boereminih eksperimenata s eksangviniranim svinjama i da plazma prolazi oštećene kapilare i dolazi i tamo gdje eritrociti ne mogu. Tako opskrbljuje kisikom tkivo dovoljno dugo da se formira

reperfuzija i stimulira angiogenezu. HBO<sub>2</sub> je dokazano efikasna u stimulaciji angiogeneze i stvaranju nove opskrbe mreže kapilara nakon iradijacijske ozljede.

### 1.2.6. HBO<sub>2</sub> i angiogeneza

Nakon ishemije mozga angiogeneza u penumbralnoj regiji je prirodni odgovor, a tkivo oko infarciranog i osjetljivo tkivo predodređeno za apoptozu može profitirati od angiogeneze danima ili čak tjednima, mjesecima, pomažući neuralnu reorganizaciju, diferenciranje matičnih stanica i time funkcionalni oporavak. Nakon infarkta mozga dolazi do povišenja kapilarne gustoće oko tkiva infarkta što je pokazano na post-mortem analizama mozga bolesnika koji su preživjeli moždani udar nekoliko tjedana i na modelu štakora. Prvo se stvaraju vaskularni pupoljci, a kasnije i prave sveze koje komuniciraju s intaktnim kapilarama, obnavljajući perfuziju granice infarkta, već unutar tjedan dana od ishemije. Postoji više od 20 molekula, citokina, peptidnih faktora rasta, koji se oslobađaju u inflamatornoj fazi moždanog udara iz infiltrirajućih makrofaga, leukocita, oštećenih trombocita, a poznati su i da induciraju angiogenezu. Dolazi do pojačanja djelovanja mnogih angiogenetskih čimbenika uključujući TGF- $\beta$  (transformirajući čimbenik rasta- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ), PDGF (čimbenik rasta porijeklom iz trombocita, platelet-derived growth factor), VEGF (vaskularni endotelijalni čimbenik rasta, vascular endothelial growth factor) FGF-2 (čimbenik rasta fibroblasta, fibroblast growth factor) u malim krvnim žilama.

Nakon infarkta mozga dolazi do porasta PDGF-B lanaca koji induciraju neokapilarizaciju i vaskularizaciju. Ove se kapilare sastoje od pericita i endotelnih stanica (144) A PDGF- BB pomaže njihovo sazrijevanje te uključivanje glatkih mišićnih stanica u zid krvne žile i diferencijaciju endotelnih progenitornih stanica koštane srži. Obitelj VEGF-a (143-145) može biti stimulirana drugim čimbenicima kao što su TGF- $\beta$ , FGF, PDGF, EGF i možda je najpotentniji angiogeni čimbenik rasta. Raste odmah unutar sati od ishemije, stimulira angiogenezu i reducira volumen infarkta mozga. Razina VEGF-a značajno raste s primjenom HBO<sub>2</sub>, a to djelomično može objasniti proangiogeni učinak HBO<sub>2</sub>. To potvrđuje neke podatke da hipoksija nije nužna predispozicija za produkciju VEGF (145). Novija istraživanja otkrivaju stalno nove gene povezane s angiogenezom, proliferativne, adhezivne, remodelirajuće. Nakon moždanog udara apoptoza je normalna reakcija nekih endotelnih stanica i potrebna u procesu vaskularnog pupanja, ali kod teže ishemije inhibira formiranje novih žila. Ovo su samo neki neiskorišteni angiogenetski mehanizmi koji su pod utjecajem

HBO<sub>2</sub>, izravno ili neizravno, a mogli bi promijeniti načine liječenja moždanog udara, koje je ograničeno uskim vremenikom prozorom za trombolizu, nedostatkom drugih liječenja.

### **1.2.7. Relativna hipoksija i HBO<sub>2</sub>**

Jedna od naših hipoteza je i ta da se intermitentnim izlaganjem HBO<sub>2</sub> stvaraju uvjeti relativne hipoksije, koja potiče produkciju proangiogenetskih čimbenika rasta (HIF-1 $\alpha$ , VEGF itd.) i stvara pozitivne uvjete i prolongirani vremenski prozor tijekom kojeg postoji veća mogućnost, prilika, da se stvore nove kolaterale, pokrene angiogeneza i omogući preživljavanje većeg broja stanica penumbre i oligemije. Jezgra je nažalost izvan dosega, no konačni volumen infarkta mogao bi biti manji. Postoje kliničke opservacije da bolesnici koji prebole TIA-u (tranzitornu ishemičku ataku), bolje podnose kasniji moždani udar ako uslijedi, a kod 5% se on događa u prva 24, a još 5% u sljedećih 7 dana. Možda je relativna hipoksija razlog tome, omogućujući bolju kolateralnu mrežu. Intermitentna HBO<sub>2</sub> imitira prirodnu pojavu TIA-e, hipoksično stanje, nakon kojeg slijedi dovoljna doprema u plazmi otopljenog kisika i smanjen vazospazam. Na taj način bi ovim liječenjem uzrokovana neuoprotekcija imala dva načina djelovanja; jedan dopremom kisika u ishemično tkivo sa poboljšanjem preživljavanja neurona, a drugi preveniranjem apoptoze neurona do poboljšanja uvjeta, promoviranjem angiogeneze, smanjenjem vazospazma, upale, poboljšanjem cijeljenja itd.

### **1.3. Životinjski modeli, najčešće štakorski, na kojima su istraživani načini liječenja moždanog udara**

Postoje razni životinjski modeli, najčešće štakorski, na kojima su istraživani načini liječenja moždanog udara. Načini izazivanja moždanih udara također su različiti, a dijele se na kompletnu globalnu ishemiju, inkompletnu globalnu ishemiju, fokalnu cerebralnu ishemiju i multifokalnucerebralnu ishemiju (146).

Najčešće korišteni eksperimentalni model moždanog udara kod štakora je model okluzije srednje cerebralne arterije (MCAO) i tromboembolijski model. Postoje varijacije ovog modela koje koriste permanentnu ili tranzitornu MCA ishemiju. Kod nedijabetičkih štakora u ovim modelima duljina trajanja ishemije varirala je među eksperimentima od 60 do 180 minuta (147, 148). Zanimljivo je da su i kod dijabetičkih štakora eksperimentalne ishemije MCA bile istog trajanja kao i kod nedijabetičkih, iako bi bilo za očekivati, uzimajući u obzir poznate podatke o moždanim udarima kod bolesnika s dijabetesom, da je mozak



štakora s dijabetesom osjetljiviji na ishemiju. Ipak do sada nije bilo uspostavljenog i prihvaćenog modela za ispitivanje moždanog udara kod štakora s dugotrajnim dijabetesom. Kao što je navedeno do sada su postojali modeli permantne MCAO (148-150), tranzitorne (t-MCAO) od 180 minuta (151), 120 min. (152-156), 105 min. (157), 60 min (158). Pri proučavanju dosadašnjih istraživanja i izboru štakorskog modela moždanog udara primjetili smo da tromboembolijski model pokazuje nekonzistentne rezultate, a prema nekim autorima to je posljedica nepredvidive odgođene reperfuzije i posljedično tomu nemogućnosti da se sa sigurnošću predvidi vrijeme kada će se reperfuzija dogoditi i ishemija prestati (159,160). Takav model ne može npr. simulirati ishemiju kod dijabetičara za vrijeme endarterektomije unutarnje karotidne arterije, kod koje točno znamo trajanje ishemije i njezinu lokalizaciju u mozgu. MCAO modeli s druge strane intraluminalnom insercijom monofilamenta, postavljenog na točno određeno mjesto pod kontrolom LDF (Laser Doppler Flowmetry) sonde i monitorirani za vrijeme ishemije i reperfuzije, imitiraju ju potpuno, a s obzirom da je operacijski protokol na vratu sličan – i njezine komplikacije isto tako.

#### **1.4. t-MCAO metoda**

Sama t-MCAO metoda podrazumijeva transekciju vanjske karotidne arterije, privremeno podvezivanje zajedničke karotidne arterije, da bi se intraluminalno kroz unutrašnju karotidnu arteriju plasirao silikomom zaobljen najlonski monofilament do spoja prednje i srednje cerebralne arterije. Monofilament se može ostaviti na mjestu željeno vrijeme te se izvlačenjem istoga postiže reperfuzija. Na taj se način postiže uvijek infarkt mozga iste veličine i lokacije, s obzirom da se zatvara terminalna krvna žila, nakon kolaterala Williosovog kruga. Prvo do infarkta dolazi u području striatuma, a kasnije dorzolateralnog korteksa iznad njega. Strijatalni infarkti se razvijaju rapidno i uglavnom nisu izlječivi (161). Kortikalni infarkti se razvijaju kasnije uključuje prolongirano otvaranje krvno moždane barijere, apoptotsku smrt. Kod tranzitorne MCAO strijatuma je mjesto ishemičke jezgre, a ovisno o trajanju i jačini ishemije, odnosno primijenjenom liječenju korteks može prijeći u jezgru ili penumbru, oligemiju ili zdravo moždano tkivo (162).

#### **1.5. Streptozotocin-inducirani diabetes mellitus tip I**

Streptozotocin-inducirani diabetes mellitus tip I je široko korišten model neketotičke hiperglikemije, a smatra se usporediv s humanim stanjem. Postiže se jednostavno,

jednokratnim injiciranjem streptozotocina (STZ; 60 mg/kg). STZ se svaki puta mora svježe pripremiti u 0.02 M otopini citratnog pufera i injicirati intraperitonealno štakorima u dobi od 6 tjedana (163, 164). Injiciranje intraperitonealno 60mg/kg streptozotocina uzrokuje pouzdanu degeneraciju Langerhansovih otočića i u roku od 2-4 dana dijabetes. To se dokazuje ponavljanim praćenjem glukoze u krvi iz repne vene, na tašte, svaki tjedan do pokusa te neposredno prije, tijekom samog pokusa te nakon pokusa do žrtvovanja životinja. U daljnje istraživanje se uključuju samo životinje koje kao rezultat injiciranja imaju glukozu na tašte u krvi iznad 17 mmol/L (165).

### **1.6. Uspostava modela moždanog udara kod dijabetičnih štakorica SD (Sprague Dawley) vrste.**

Unatoč uložnim naporima, korištenju većeg broja životinja i nakon značajnog vremena provedenog u pokusima, nije bilo moguće uspostaviti model t-MCAO kod dijabetičkih ženki SD vrste korištenjem do sada uobičajenih vremena trajanja ishemije. Analiza korištenih životinja pokazala je da je glavni razlog za navedeno masivni ishemijski moždani udar s malignim edemom mozga, koji je dovodio do velikih neuroloških deficita, koji su se pogoršavali s vremenom i koji su se pokazali nespojivi s preživljavanjem radi nemogućnosti kretanja, uzimanja hrane i vode, cirkularnog obrasca kretanja, a ubrzo potom poremećaja svijesti i smrti životinje unutar 24 sata od nastupa ishemije. To nije omogućavalo uspostavu adekvatnog modela moždanog udara kod navedenih životinja, koji bi bilo moguće liječiti. Pretraživanjem ranijih istraživanja otkrili smo da su i kod njih dijabetički štakori razvijali velike infarkte mozga i također češće ugibali. Bolesnici s dijabetesom su također znatno osjetljiviji na moždanu ishemiju u usporedbi s nedijabetičarima, i kao što je poznato imaju teže neurološke deficite i veće infarkte mozga s lošijim čak i letalnim ishodom liječenja, bilo kojom terapijom liječeni, pogotovo s rtPA. Dijabetes je u nekim slučajevima čak isključujući kriterij za liječenje recidivirajućeg moždanog udara trombolizom (85). Uzimajući dakle paralelu iz kliničke prakse, takva se situacija događa pri liječenju jednim dokazano djelotvornim medikamentoznim liječenjem moždanog udara - trombolizom s rtPA (recombinant tissue plasminogen activator- rekombinirani tkivni plazminogen aktivator). Najveći moždani udari, koji zahvaćaju cijelo područje MCA i imaju visok NIHSS (National Institute of Health Stroke Score) su slabi kandidati za liječenje trombolizom, a uglavnom umiru radi malignog moždanog edema ili komplikacija kao što su disfagija i nepokretnost, ali također imaju veći rizik od sekundarne hemoragizacije infarkta mozga ili intrakranijalnih drugih krvarenja. Cilj ovog istraživanja je bio skratiti trajanje ishemije mozga da bi se

pronašli uvjeti u kojima je moguće takve moždane udare kod štakore s dijabetesom liječiti. Kako je naš cilj bio pratiti štakore 24h od liječenja, da bismo vidjeli učinak i multiplih HBO<sub>2</sub>, odlučili smo skratiti trajanje t-MCAO različito u različitim grupama, da bi otkrili koja dužina ishemije će uzrokovati moždani udar srednje veličine (isti kao što je opisivan u ranijim radovima kod nedijabetičkih štakora s uobičajenim, duljim trajanjem ishemije od 60 do 180 minuta, točnije veličine prosječnog volumena infarkta mozga između 40% i 50% volumena hemisfere).

### **1.7. Štakori vrste Sprague-Dawley (SD)**

Štakori vrste Sprague-Dawley (SD) su najčešće korištena vrsta štakora u MCAO eksperimentima i 41% dosadašnjih istraživača je svoje eksperimente provodila na ovoj vrsti. Od ostalih vrsta bili su zastupljeni s 34% štakori vrste Wistar, s 10% SHR (spontano hipertenzivni štakori) štakori, s 2% Long-Evans štakori i s 2% ostale vrste (166). SD štakori imaju manju učestalost komplikacija, uključujuću SAH-e (subarahnoidalna hemoragija), u usporedbi s Fisher and Wistar štakorima, što je posljedica anatomskog tijeka unutrašnje karotidne arterije u petroznom segmentu.

### **1.8. 20-HETE**

Već nekoliko godina u istraživanjima postoje indicije da se arahidonska kiselina (AA) oslobađa u likvor nakon cerebralne ishemije (167). Posredovanjem enzima citokroma P450 (CYP)P450 u cerebralnim arteriolama i moždanom tkivu (168) metabolizira se u snažan vazokonstriktor - 20-hidroksieikozatetraenoičnu kiselinu (20-HETE), opisani medijator neuronalnog oštećenja kod moždanog udara (169). On regulira vjerojatnost otvorenog stanja K<sup>+</sup> kanala te time posredno i tonus arterija (171). On također povećava proizvodnju slobodnih kisikovih radikala (170-174). Tako dakle dokazano djeluje i na konačni volumen infarkta mozga nakon moždanog udara.

### **1.9. Blokatori stvaranja 20-HETE**

Pronalaskom blokatora stvaranja 20-HETE, utvrđeno je da oni smanjuju moždanu autoregulaciju te sposobnosti vaskularnog odgovora i na vazokonstriktore i vazodilatatore (175, 176). 20-HETE djeluje na razvoj i pojačanje vazospazma nakon subarahnoidalne hemoragije (SAH), a utvrđeno je djelovanje inhibitora 20-HETE na sprječavanje pada u moždanom protoku nakon SAH-a te liječenju odgođenog vazospazma u štakora i pasa (177).

Razina 20-HETE povisuje se u mozgu unutar 7.5 h, a u plazmi tek 19.5-25.5 h nakon okluzije arterije (178). Kod infarkta mozga u animalnim modelima isti inhibitor pokazao je značajan učinak u dva istraživanja na smanjenju volumena infarkta, poboljšanju funkcionalnog ishoda(179,180), i vjeruje se da je to posljedica poboljšanja mikrocirkulacije, omogućavanja regrutiranja kolaterala u područje penumbre, neometanog vazokonstriktorom 20-HETE (181-184). Učinak je vidljiv kada se inhibitor primjeni unutar 4h od okluzije, a neuspješan kada primijenjen više od 7h nakon početka, a djelovanje jednog injiciranja traje najmanje 6h (182). Jedna doza koja efektivno suprimira razinu 20-HETE iznosi 0.3 mg/kg. Kao drugi mehanizam djelovanja 20-HETE je blokada Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazne aktivnosti i aktivacija niza intrastaničnih signalnih putova (174,185). Korištenje inhibitora 20-HETE za akutno liječenje moždanog udara ili u svrhu predtretmana je predloženo kao novi potencijalni pristup (180). Ono što nije poznato je djelovanje na moždani udar kod dijabetičkih štakora.

EET (engleski EETs- epoksieikozatrienoične kiseline), drugi metaboliti arahidonske kiseline, su endogeni moždani medijatori, koje proizvode astrociti i endotel, a uključeni su u regulaciju moždanog protoka. One su medijatori vazodilatacije, reduciraju apoptozu, agregaciju trombocita, promoviraju angiogenezu itd. (186). Dokazano je da imaju potencijalno smanjiti oštećenje tkivne perfuzije i imaju utjecaj na ishod moždanog udara (187-189). S porastom pO<sub>2</sub> (parcijalnog tlaka kisika) raste i produkcija i 20-HETE i EET, pomoću P450 enzima i ω-hidroksilacije arahidonske kiseline. U hipoksiji se stvaraju EET (koji su vazodilatatori i u zadnjih 10 godina se s velikom sigurnošću može reći da su EET zapravo EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor). Ono što je praktično vrlo malo poznato je kako izlaganje HBO<sub>2</sub>, bilo jednokratno ili intermitentno višekratno utječe na strukturno oštećenje izazvano ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom (tj. mjereno veličinom/volumenom infarcirane regije) te na koji način HBO utječe na izražaj enzima CYP450–omega hidroksiilaze i CYP450 epoksigenaze u krvnim žilama mozga. Također je još uvijek nejasna uloga 20-HETE u vaskularnom odgovoru na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu. Jedno nedavno istraživanje kod dijabetičkih štakora pokazalo je poboljšanu relaksaciju aortalnog prstena kod dijabetičkih štakora tretiranih s HBO<sub>2</sub> mogućim povišenjem razine EET (190).

### **1.10. Kombinacija HBO<sub>2</sub> i inhibitora 20-HETE**

Uzimajući u obzir potencijalne korisne učinke HBO<sub>2</sub> na modulaciju metabolizma arahidonske kiseline i značaj 20-HETE inhibicije na ishod moždanog udara, cilj ovog istraživanja je bio utvrditi učinke i mehanizme jednokratnog i višekratnog izlaganja HBO<sub>2</sub> kao

i potencijalni učinak samostalne ili simultane primjene 20-HETE inhibitora, a i uloge EET u t-MCAO modelu kod dugotrajno dijabetičkih štakorica (191)

## **2.Hipoteza**

Primjena HBO<sub>2</sub> kod moždanog udara kod dijabetičnih štakora ima pozitivan učinak izražen smanjenjem veličine infarciranog područja. Jednokratna, kao i višekratne primjene HBO<sub>2</sub> imati će značajan učinak na smanjenje tkivnog oštećenja. Dodatno, primijenjena duljina trajanja t-MCAO kod dijabetičkog štakoradovesti će do dovoljno velikih infarkta mozga, koji će nam omogućiti adekvatnu analizu veličine oštećenja i djelotvornosti terapije. Blokada proizvodnje 20-HETE imati će sinergistički učinak s HBO<sub>2</sub>, a HBO<sub>2</sub> će pojačati izražajnost i CYP450-omega hidroksilaze i CYP450 epoksigenaze.

### **3. Ciljevi istraživanja**

1. Razviti pouzdani, žarišni model t-MCAO kod dijabetičnih štakorica.
2. Utvrditi utjecaj HBO<sub>2</sub> na veličinu infarcirane regije mozga kod dijabetičnih štakorica.
3. Usporediti djelovanje jednokratne s višekratnom primjenom HBO<sub>2</sub> u istom modelu.
4. Utvrditi djelovanje inhibitora 20-HETE u kombinaciji s HBO<sub>2</sub> kod dijabetičnih štakorica.
5. Utvrditi izražajnost CYP450-omega hidroksilaze i CYP450 epoksigenaze kod dijabetičnih štakorica prije i nakon HBO<sub>2</sub>.

## **4. Materijal i metode**

### **4.1. Pokusne životinje**

#### **4.1.1. Karakteristike životinja**

U istraživanju su korištene ženke Sprague–Dawley štakora (težine 180 do 272 g), stare 12 tjedana. Veličina uzorka: ukupno je u istraživanje uključeno 72 životinje s uspješno provedenim pokusima (N=72).

U prvom dijelu pokusa, koji postavlja fokalni model t-MCAO kod dijabetičnih Sprague–Dawley štakorica, prikazani su rezultati uspješnih pokusa na 30 štakorica (25 dijabetičkih i 5 nedijabetičkih), koje su redovito testirane i bile bez patogenih organizama, starosti 12 tjedana, težine između 220 i 272 g, uzgojenih pod stručnim nadzorom u za to akreditiranoj ustanovi za animalnu njegu i uzgoj pri Katedri za Fiziologiju, Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije, na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Sveučilišta u Osijeku. Životinjama je omogućen slobodan pristup hrani i vodi (ad libitum), prije, za vrijeme i nakon pokusa, a držane su u standardnim plastičnim kavezima u okruženju kontrolirane temperature i vlažnosti s 12-satnim ciklusima svijetlo/tama.

U drugom dijelu pokusa, koji je istraživao utjecaj jednokratne i višekratne primjene hiperbarične oksigenacije, liječenja s HET0016, kombinacije HBO<sub>2</sub> i predtretmana ili liječenja s HET0016 na ishod moždanog udara, izraživanje je provedeno na 42 zdrave Sprague–Dawley štakorice s dijabetesom, starosti 12 tjedana, težine od 180 do 230 g, koje su uzgojene i držane u istim uvjetima u istoj ustanovi kao i ranije.

#### **4.1.2 Etika ispitivanja na životinjama**

Sve pokuse smo provodili u skladu sa smjernicama (European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (directive 86/609). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku i Ministarstva poljoprivrede (broj odobrenja - 525-06-1-0255/12-2).

#### **4.1.3. Podjela na skupine (dizajn studije)**

U prvom dijelu pokusa, koji postavlja žarišni model t-MCAO kod dijabetičnih Sprague–Dawley štakorica, iskorišteno je 30 životinja s uspješno izvedenim pokusima (N=30), 5 nedijabetičkih i 25 dijabetičkih. Životinje s dugotrajnim nereguliranim dijabetesom su nasumično dodjeljivane u pet skupina s različitim trajanjem t-MCAO (20, 30, 45, 60 ili 90



minuta), odnosno izlagane ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi različite jačine, a one bez dijabetesa su podvrgnute 30-minutnoj t-MCAO. Kada je postignut predviđeni broj životinja u svakoj skupini dijabetičnih životinja (u svakoj skupini N=5, s uspješnim pokusom), životinje su nasumično dodjeljivane u druge skupine, dok sve nisu bile popunjene s dovoljnim brojem životinja s uspješnim pokusom (N=25).

U drugom dijelu pokusa, koji je istraživao utjecaj jednokratne i višekratne primjene hiperbarične oksigenacije, liječenja s HET0016 te kombinacije HBO<sub>2</sub> i predtretmana ili liječenja s HET0016 na ishod moždanog udara, dijabetičke štakorice (N=42) s razinom GUK- i iznad 17 mmol/L (150) su podvrgnute t-MCAO i reperfuzijskoj ozljedi i nasumično dodjeljivane sljedećim skupinama (n=7 životinja po skupini); a) kontrolna skupina (bez farmakološkog ili HBO<sub>2</sub> liječenja nakon t-MCAO trajanja 30 minuta i reperfuzije; i eksperimentalne skupine liječene s: b) HBO<sub>2</sub> (jednokratna HBO<sub>2</sub>, 2h, 2 ATA, odmah nakon t-MCAO); c) višekratne HBO<sub>2</sub> (prva HBO<sub>2</sub> neposredno nakon, a druga 12h nakon t-MCAO); d) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> (HET0016 injiciran jednom dnevno, i.p., 1mg/kg/dan, tijekom tri dana prije t-MCAO, kombiniran s HBO<sub>2</sub> nakon t-MCAO), e) HET0016 liječenje (injiciran HET0016 i.p., 1mg/kg/h, svaki sat počevši od 1h prije t-MCAO i injiciran tijekom sljedećih 6 sati, nakon t-MCAO), i f) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> (HET0016 akutno liječenje kao što je opisano u skupini e) kombinirano s jednokratnom HBO<sub>2</sub> nakon t-MCAO).

#### **4.1.4. Isključujući kriteriji**

Isključni kriteriji su bili: smrt životinje tijekom kirurške procedure ili unutar 24 sata nakon reperfuzije, obilno krvarenje tijekom operacije, redukcija rCBF tijekom ishemije za manje od 65% od bazalnih vrijednosti, a drugom 55%, odsutnost reperfuzije nakon uklanjanja okluzivnog monofilamenta koristeći LDF (Laser Doppler Flowmetry), prisutnost intracerebralne i/ili subarahnoidalne hemoragije na postmortalnom pregledu mozga. Životinje isključene iz pokusa su zamijenjene.

Ukoliko je životinja tijekom ili nakon pokusa uginula, mozak uginule životinje nije se analizirao, isključena je iz pokusa. Također su isključene životinje kod kojih bojanje mozga TTC-om nije bilo adekvatno ili je došlo do oštećenja mozga pri ekstrakciji iz lubanje. Životinje isključene iz studije zamijenjene su novima.

## **4.2. Metode:**

### **4.2.1 Induciranje dijabetesa**

Korištene su ženke Sprague–Dawley štakora stare 12 tjedana kojima je izazvan dijabetes tip 1 jednokratnim injiciranjem streptozotocina (STZ; 60 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA). STZ je svaki puta svježe pripremljen u 0.02 M otopini citratnog pufera i dan štakorima u dobi od 6 tjedana (163, 164). Mjerenje glukoze u krvi iz repne vene na tašte je provedeno ponavljano svaki tjedan do pokusa, prije pokusa i nakon pokusa te prije žrtvovanja životinje koristeći glukometar (Accu-Check Active, Roche). Injiciranje intraperitonealno 60mg/kg streptozotocina uzrokuje pouzdanu degeneraciju Langerhansovih otočića i u roku od 2-4 dana dijabetes. To se dokazuje ponavljanim praćenjem glukoze u krvi iz repne vene, na tašte, svaki tjedan do pokusa te neposredno prije, tijekom samog pokusa te nakon pokusa do žrtvovanja životinja. U daljnje istraživanje su uključene samo životinje koje su kao rezultat injiciranja imale glukozu na tašte u krvi iznad 17 mmol/L (98).

### **4.2.2. Anestezija i priprema štakora za pokus**

Prvo je provedena premedikacija štakorica s atropinom (Atropini sulfas, Belupo d.d., Koprivnica, Croatia) u dozi 0.1 mg/kg i.p. radi suzbijanja moguće salivacije, kao učestale nuspojave anestezije, koja ponekad može biti izrazita (192).

Anesteziju smo postigli intraperitonealnim davanjem kombinacije dva lijeka u sljedećoj dozi: midazolama (Dormicum, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhel, Njemačka) 0.5 mg/kg i ketamina (Ketanest, PfizerPharma GmbH, Berlin, Njemačka) 75 mg/kg, kao što je korišteno u dosadašnjim pokusima t-MCAO, uz zadovoljavajuću analgeziju i anesteziju štakora neophodnu za miran rad.

### **4.2.3. Monitoriranje regionalnog cerebrovaskularnog protoka krvi (rCBF) pomoću laser Doppler Flowmetrije (LDF):**

Nakon anestezije, pristupalo se brijanju krzna na vratu i na lubanji i dezinfekciji alkoholom, da bi nakon završenog pokusa suture dobro zatvarale ranu i da bi rana cijelila bez komplikacija. Štakor se fiksirao za operacijski stolić, a tjelesna temperatura se kontinuirano pratila rektalnom sondom s toplomjerom i održavala na razini  $37.5 \pm 0.5$  °C, pomoću automatski grijanih termostaskih podloga povezanih s rektalnom sondom.

Postavljanje i fiksiranje sonde laser doplera na lubanju izvodi se tako da se medijalnim pristupom i širenjem kože pristupi se na periost lijeve parijetalne kosti te, nakon dobre hemostaze, zubnom bušilicom vrha širine 1 mm, stanji kost do transparentnosti u arealu promjera oko 2mm, 2 mm posteriorno i 6 mm lateralno od bregme. To je potrebno jer bi kost inače blokirala ultrazvučni signal koji emitira sonda da dođe do eritrocita u krvnim žilama i vrati se do sonde. Nakon sušenja kosti i po potrebi ponovne hemostaze kožnih i periostalnih kapilara se fiksira teflonsku cijevčicu iznad koštanog prozora stanjene kosti i intaktne dure, povrh MCA irigacijske regije. Fiksacija se postiže dentalnim cementom, koji se miješa u čaši s aktivatorom dok se ne otopi (Paladur dentalni cement i aktivator, oba od proizvođača Haeraeus Kutzer GmbH, Hanau, Njemačka). On se raspoređuje oko cijevčice i nakon sušenja, koje ne traje dugo, onemogućava kasnije pomicanje sonde. Nakon toga se instalira parafinsko ulje u cijevčicu, da bi se spriječilo interponiranje zraka između sonde i lubanje, što bi također onemogućilo širenje ultrazvučnih valova i mjerenje CBF. Potom se umetne ultrazvučna sonda koja se fiksira u teflonsku cijevčicu. Laser dopler (Laser Doppler Flowmetry, LDF, Moor Instruments Ltd, model MBF3D, Devon, Ujedinjeno Kraljevstvo) omogućuje nam tada kontinuirano praćenje regionalnog arterijskog protoka u području cerebralnog korteksa, prije, tijekom same okluzije te tijekom reperfuzije. LDF je spojen na računalo laboratorija te se na zaslonu rezultati kontinuirano prate i svakih 5 minuta, po potrebi i češće i zapisuju. Rezultati se prate tijekom disekcije vrata tj. 10 do 15 minuta prije t-MCAO (i taj se protok uzima kao osnovni - baseline, osnovica), tijekom t-MCAO (koja se manifestira kao nagli i oštri pad protoka za koji perzistira cijelo vrijeme okluzije) i potom tijekom 20 minuta reperfuzije (koja se manifestira kao također nagli skok protoka nakon ekstrakcije monofilamenta, čak iznad osnovnih vrijednosti i kasnije unutar minute njegovo lagano vraćanje na normalu ili nešto ispod nje). Sve to služi kako bi se dokazala podudarnost skupina, jednakog pada protoka, odnosno jednake jačine ishemije, također da bi se dokazala sigurna reperfuzija, odnosno tranzitornost ishemije. Kvantitativna analiza rCBF-a je učinjena od strane istraživača koji je bio neupućen u liječenje.

#### **4.2.4 t-MCAO (tranzitorna okluzijasrednjecerebralnearterije, transitory middle cerebral artery occlusion, intra-arterial suture occlusion of the middle cerebral artery)**

U pokusu se primjenjuje tranzitorna fokalna cerebralna ishemija u području lijeve MCA po metodi koju je opisao Koizumi i kasnije modificirao Zea Longa (193,194). Nakon

medijalne incizije na koži vrata, razmicanjem kože, potkožnog tkiva, fascija te mišića prikaže se i izolira lijeva CCA( zajednička karotidna arterija, common carotid artery, arteria carotis communis), uz pažljivo čuvanje nervus vagusa i simpatičkog plexusa, koji se mikrokirurškom metodom, pod kontrolom mikroskopa cijelom dužinom odvoji od CCA. Nakon toga se pristupa izoliranju i podvezivanju vanjske karotidne arterije (ECA, external carotid artery, arteria carotis externa), koncem 5-0, na dva mjesta i presijecanju iste. Time se bolje mobilizira CCA i ICA (internal carotid artery, arteria carotis interna, interna karotidna arterija). ICA se također disekcijom na lijevoj strani vrata, uz što manje traumatiziranje okolnog tkiva, izolira i prikaže njezin tijek, što je moguće, ako je potrebno učiniti do ulaska u kranij. Postavlja se privremena ligatura koncem na CCA proksimalno, gotovo kod izlazišta iz prsnog koša. Cijela se kirurška procedura od početka operacije na vratu, kako je ranije opisano, prati pomoću LDF signala na monitoru računala. Ovdje se već tijekom disekcije vrata tijekom 15 minuta registrira osnovni rCBF (baseline, osnovica). Postavi se i jedna distalna privremena ligatura na CCA u predbifurkacionom segmentu te se kroz manju inciziju na CCA između dvije ligature, uz prevenciju retrogradnog tijeka krvi, uvodi najlonski monofilament napravljen od kirurškog monofilamentskog najlonskog konca debljine 4-0. Vrh monofilamenta je zaobljen na vatri da ne bi bio oštar i ošteti arteriju i omekšan zamatanjem u silikonski omotač dužine 5 mm, i time vrh monofilamenta bude blago zadebljan do debljine 0.25 do 0.3 mm, što se provjerava pod mikroskopom. Koristi se pritom silikon Xantopren, a kao aktivator Elastomer aktivator (oba od proizvođača Haeraeus Kutzer GmbH, Hanau, Njemačka), a filament se mora prirediti ranije da bi se omogućilo sušenje na zraku, odnosno stvrdnjavanje silikona koji se čvrsto spoji do tada s monofilamentom. Monofilament se izrazito polagano, pod kontrolom mikroskopa, uvodi prvo u lijevu CCA, a potom kroz ICA, do dubine od oko 15-17mm distalno od bifurkacije CCA. Potrebno je izbjeći ulazak u pterigopalatinalnu arteriju, što se može vizualno pratiti nakon kranijalne disekcije vrata te po potrebi korekcijom položaja glave štakora. Nastavkom napredovanja monofilamenta kroz ICA, isti ulazi u intrakranijalni prostor te ako filament prođe kroz koštani prozor, ulazi neminovno u proksimalni dio prednje cerebralne arterije (ACA, anterior cerebral artery, arteria cerebri anterior) i automatski blokira ulaz u srednju moždanu arteriju lijeve strane (lijeva MCA), u segmentu prije njezine trifurkacije, što se osjeti manualno kao lagani otpor napredovanju monofilamenta, a na zaslonu računala vidi kao nagli, pad rCBF za oko od 55-70%(180). Izbjegavanje jačeg pritiska kod uvođenja monofilamenta i njegovo omotavanje mekanim silikonskim omotačem uz zaobljavanje vrha je neophodno da bi se izbjeglo oštećenje intime ICA, MCA, ACA i posljedično subarahnoidalno krvarenje. Tada se

okluzijski filament pričvršćuje u ICA pomoću također privremene ligature i ostavlja tijekom trajanja okluzije. Cijelo to vrijeme se na zaslonu računala prati i svakih 5 minuta zapisuje prosječni protok registriran pomoću LDF-a, da bi se prvo utvrdio tijekom 15 minuta osnovni protok, kasnije kao dokaz adekvatnosti okluzije. Po završetku navedenog vremena lagano se povlači filament, da bi se dopustila reperfuzija, što dovodi do još naglijeg i jačeg skoka protoka, nakon kojeg slijedi postupni pad od oko 10 - 20-ak %, što dokazuje reperfuziju i bilježi se svakih 5 minuta, tijekom cijelog trajanja reperfuzije. Nakon 20 minuta reperfuzije se monofilament potpuno izvadi iz CCA i time najvažniji dio pokusa t-MCAO završava. Po završetku pokusa se ligature uklone, rana se na vratu sašije kirurškim koncem, dezinficira, ukloni sonda LDF-a, a životinju se položi u njezin kavez i prati dok se ne razbudi iz anestezije. Tada joj se dopusti pristup hrani i vodi, ad libitum. Ovaj model, t-MCAO, pouzdano proizvodi 30 minutnu ishemijsku i reperfuzijsku ozljedu irigacionog područja MCA. Analizirane su samo životinje s redukcijom rCBF tijekom t-MCAO za više od 55% i dobrom reperfuzijom.

#### **4.2.5. Hiperbarična oksigenacija (HBO<sub>2</sub>)**

U skupinama liječenim s HBO<sub>2</sub> prva HBO<sub>2</sub> započinje nakon operacije stavljanjem životinje u adekvatnom kavezu u hermetički zatvorenu hiperbaričnu komoru, proizvedenu za potrebe pokusa na malim životinjama (proizvođač Đuro Đaković Holding d.d., Slavonski Brod, Hrvatska, Slika 4.1.). Potom se sasvim polako, tijekom 15 minuta u njoj podiže tlak 100% kisika, koji ima pripremljen dovod u komoru, do 2 ATA (2 atmosfere, 2 bara). Cijelo vrijeme boravka štakora je moguće vizualno pratiti u komori kroz prozore na njoj. Štakor se izlaže hiperbaričnom kisiku na taj način 2h te se polako, tijekom 15 minuta, vrši dekompresija komore i potom kavez sa životinjom izvadi iz hiperbarične komore. Druga HBO<sub>2</sub>, u skupini c) drugog dijela pokusa, započinje 12h nakon prve i jednak je postupak prilikom njezina provođenja (190, 195).



**Slika 4.1. Hiperbarična komora za potrebe pokusa na malim životinjama, u kojoj su provedeni pokusi izlaganja štakorica hiperbaričnom kisiku nakon t-MCAO (tranzitorne okluzije srednje moždane arterije) (U Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije, Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku).**

#### **4.2.6. Inhibitor 20- HETE (HET0016 (N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidine))**

HET0016 (N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl)-formamidin, Cayman Chemical Company, USA) je pripremljen u otopini (11% sulfobutylether-7- $\beta$ -cyclodextrin-a u izotoničnoj otopini manitola). Čuvan je zaštićen od svjetla, radi fotosenzibilnosti, i u hladnjaku. HET0016 je primijenjen intraperitonealno kao predtretman (prekondicioniranje) u HET0016 predtretman+HBO2 skupini (i.p., u dozi 1 mg/kg/dan, tijekom 3 dana prije pokusa) ili kao liječenje nakon t-MCAO u skupinama koje su izlagane HET0016 liječenju i HET0016 liječenju+HBO2 (i.p., u dozi 1 mg/kg/h, primijenjen svakih sat vremena (počevši od 1h prije t-MCAO i tijekom sljedećih 6h) (180,183).

#### **4.2.7. Žrtvovanje životinja, bojanje mozga i mjerenje volumena infarkta mozga**

24 sata nakon završetka pokusa životinje su prvo duboko anestezirane ketaminom i midazolamom, na gore navedeni način, a potom ubijene dekapitacijom po za to određenom protokolu radi uzimanja tkiva mozga. Mozak se odmah potom brzo oslobađa iz lubanje netraumatskom metodom (koja se izvodi posebnim za to prilagođenim instrumentima i tehnikom), polaže u posebni čelični matriks moduliran za mozak štakora. Stavlja se u zamrzivač, na -20°C, oko 5 do 10 minuta. To je potrebno radi stvrdnjavanja tkiva mozga, koji je inače želatinozne konzistencije i ne bi se moglo rezati. Tada se čeličnim prilagođenim rezačima za matriks pristupa rezanju tkiva na šnite debljine 2 mm, koronarnim rezovima. Presjeci se stavljaju direktno u ranije pripremljenu 2% otopinu 2,3,5-trifeniltetrazolij klorida (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Njemačka), u petrijevu zdjelicu, radi bojanja. TTC se u zdravom tkivu pretvara u tamno ciglasto crveni formazin. Poklopljeno se, na 37°C, šnite zato lagano miješa zaštićeno od svjetla, u mraku, 30 minuta, jer je TTC fotosenzibilan, dok boja ne oboja ravnomjerno cijele šnite mozga i ne dođe do kvalitetne ciglasto crvene obojenosti zdravog tkiva i jasnog kontrasta od infarciranog tkiva, koje nema mitohondrijske enzime potrebne za pretvorbu TTC-a te ostaje bijelo. Potom se šnite prebacuje u ranije pripremljene zdjelice s 10% formalinom, radi fiksacije. I tako nakon 24h fiksacije dobijemo obojene šnite mozga, koje se prebaci na predmetno stakalce, koje mora biti bez ogrebotina, kako bi se moglo slikati presjeke na skeneru, sa obje strane. Slike se potom skeniraju i pohranjuju, a zatim i analiziraju pomoću Image J imaging software (v1.37, National Institute of Health, SAD), javnog programa, a volumeni infarkta bilježe, izraženi kao postotak ishemične hemisfere (196).

#### **4.2.8. Molekularne analize, analiza izražaja mRNA:**

Uzorci tkiva ishemičnog dijela hemisfere mozga ipsilateralnog strani na kojoj je učinjena t-MCAO su prikupljeni 24 sata nakon t- MCAO, s brzim smrzavanjem u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 ° C do daljnje obrade. Ukupna RNA je izolirana korištenjem One Step RNA Reagent (BIO BASICS CANADA INC., Markham, ON, Kanada) po uputama proizvođača. RNA koncentracija i čistoća su analizirane koristeći P330 NanoPhotometer (IMPLEN GmbH, München, Njemačka). Uzorci su tretirani s DNaznim kitom 1 (Sigma) da bi se uklonila eventualna gDNA, potom 1 µg RNA je prevedena u cDNA koristeći PrimeScript™ RT Reagent kitom (TAKARA). QPCR je učinjen koristeći ABsoluteqPCR

SYBR Low ROX Mix (Thermo Scientific) naCFX96<sup>TM</sup> Real-Time System (BIO-RAD). Relativni mRNA izražaj *Cyp2J3*, *Cyp2C11*, *Cyp4A1* i *Cyp4A3* gena je izračunata u usporedbi sa standardnom krivuljom, gdje je hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase 1 (*HPRT1*) korištena kao referentni gen. Primer-i su bili sljedeći: *Cyp2J3* (početni 5'-CCTTTCTGTTCTGGCTGATTT-3' krajnji 5'-AGGCCCTGGCGGGTAGT-3'), *Cyp2C11* (početni 5'-CAATCCGCAGTCTGAGTT-3' krajnji 5'-TGCTGAGAATGGCATAAAA-3'), *Cyp4A1* (početni 5'-GTTCTACCTGCAAAGGCAATGG-3' krajnji 5'-TGCCCAAAGAACCAGTGGAA-3'), *Cyp4A3* (početni 5'-TCTCAGGGAGCAAAACACGA-3' krajnji 5'-CAACAGGAGCAAACCATAACCA-3') i *HPRT1* (početni 5'-GAAAGAACGTCTTGATTGTTGAAGATAT-3' krajnji 5'-GAGAGGTCCTTTTCACCAGCAA-3'). Primer-i za *Cyp4a3* također prepoznaju *Cyp4A2* radi visoke kompatibilnosti ovih gena.

#### 4.2.9. Statistička analiza

U prvom dijelu pokusa za statističku analizu uporabljen je SigmaPlot v.11 (Systat Software Inc., San Jose, CA USA), a grafovi su kreirani koristeći GraphPad Prism (v5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA USA). Shapiro-Wilk test se koristio za određivanje normalne raspodjele podataka. U slučaju normalne raspodjele rezultata za analizu među grupama koristio se parametrijski One-way ANOVA i post-hoc Tukey test, a u slučaju kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene primijenjen je neparametrijski Kruskal-Wallis test i potom višestruka usporedba parova (Dunn's i Student-Newman-Keuls metoda). Rezultati moždanog krvnog protoka uspoređeni su pomoću Two-Way ANOVA testa i Bonferroni višestrukom usporedbom. Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. Statistička je značajnost podešena na  $P < 0.05$ .

U drugom dijelu pokusa smanjenje volumena moždanog infarkta je izračunato dijeljenjem volumena moždanog infarkta dotične životinje s prosječnim volumenom moždanog infarkta štakora iz t-MCAO kontrolne skupine te je ta vrijednost oduzeta od broja 1.0. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. rCBF je izražen kao postotak bazalne vrijednosti izmjerene prije t-MCAO. Shapiro-Wilk test je upotrijebljen za određivanje raspodjele podataka. Značajnost razlika u rezultatima procijenjena je pomoću One-Way ANOVA testa i Holm-Sidak post hoc testom. Moždani krvni protok u različitim vremenskim točkama uspoređen je među grupama pomoću Two-Way ANOVA testa i potom Bonferroni višestrukom usporedbom. Za usporedbu razlika između dvije grupe korišten je Studentov t-



test (engl. student t-test). U slučajevima kada rezultati nisu bili normalno raspodijeljeni koristili su se neparametrijski testovi. Za statističku analizu uporabljeni su SigmaPlot v.11 (Systat Software Inc., CA, USA) i GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc., CA, USA) programi. Statistička analiza rezultata genskog izražaja (mRNA) provedena je pomoću GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc., CA, USA) programa. Kolmogorov-Smirnov test je korišten u svrhu utvrđivanja raspodjele varijabli. Razlike među grupama utvrđene su korištenjem Mann-Whitney neparametrijskog test. Statistička je značajnost podešena na  $P < 0.05$ .

## **5. Rezultati**

### **5.1. Novi model moždanog udara kod štakora s tip-1 dijabetesom**

#### **5.1.1 Indukcija dijabetesa**

U ovom pokusu tjelesna težina štakora bila je podjednaka u svim ispitivanim skupinama (220-270 g). Indukcija kronične visoke hiperglikemije nakon injiciranja STZ (60 mg/kg, i.p.) u sklopu modela loše liječenog ili neliječenog dijabetesa je potvrđena mjerenjima glukoze u krvi na tašte, iz repne vene, prije, odmah nakon i 24 sata nakon t-MCAO i bila je u rasponu od 22.6 to 31.2 mmol/L. Kod kontrolnih nedijabetičkih životinja razina glukoze u krvi mjerena u navedenim vremenskim točkama bila je 5-9 mmol/L.

#### **5.1.2. Oblikovanje istraživanja**

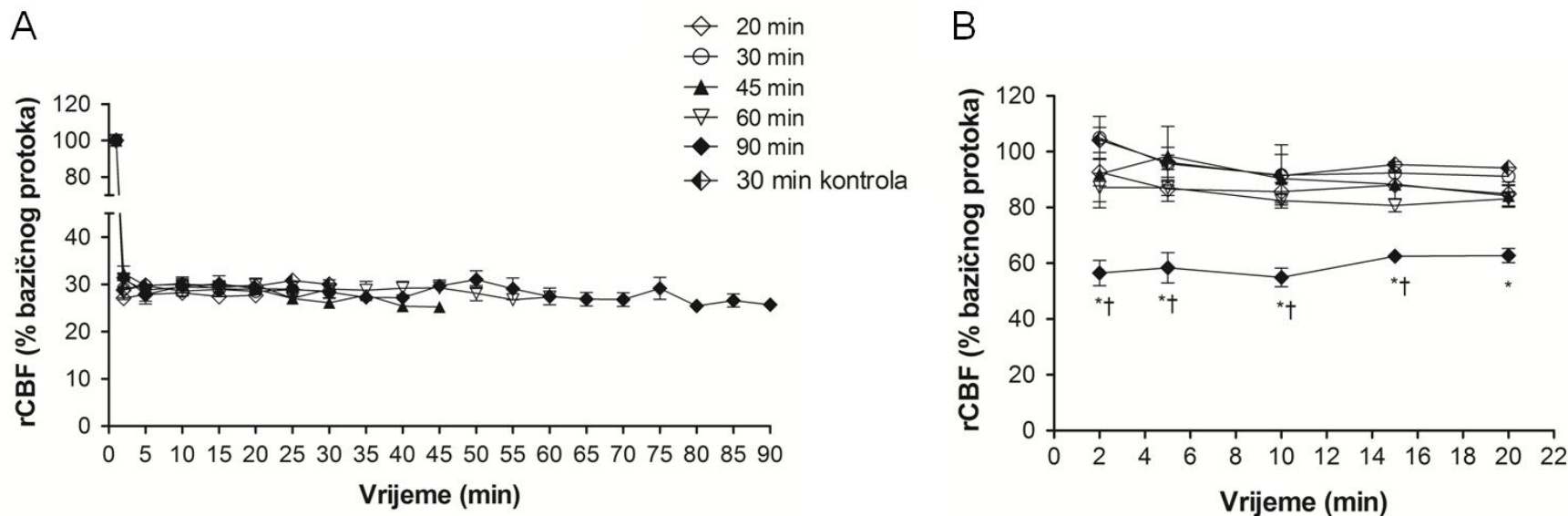
U prvom dijelu doktorata, koji postavlja žarišni model t-MCAO kod dijabetičnih Sprague–Dawley štakorica, uspješni pokusi izvedeni su kod 30 od 36 životinja korištenih u istraživanju (N=30), 5 nedijabetičkih i 25 dijabetičkih. Ostalih 6 životinja su isključene u skladu s isključnim kriterijima (vidi odjeljak metode). Dvije dijabetičke štakorice u 90' t-MCAO grupi uginule su unutar 24 sata nakon t-MCAO radi razvoja masivnog moždanog udara. Daljnje dvije štakorice u grupi 60' ishemije isključene su iz istraživanja, jedna je uginula radi masivnog moždanog udara, a druga je isključena radi subarahnoidalne hemoragije, što je potvrđeno na postmortalnom pregledu mozga. Dvije su štakorice isključene radi neuspjeha u smanjenju rCBF za više od 65% od osnovnih, početnih vrijednosti (baseline) (jedna dijabetična štakorica isključena je u 45' t-MCAO grupi, a jedna u kontrolnoj, nedijabetičkoj).

#### **5.1.3. Indukcija t-MCAO**

Koristeći LDF rCBF je kontinuirano praćen kako bi se potvrdila adekvatna intraishemička redukcija rCBF i reperfuzija nakon uklanjanja okluzijskog monofilamenta. Prosječna intra-ishemička redukcija rCBF bila je slična u svim ispitivanim skupinama, dijabetičkim i nedijabetičkim, a varirala je u rasponu za 68% do 75 % od bazalnih vrijednosti (Slika 5.2, Panel A). To je dokaz uspješne t-MCAO u svim ispitivanim grupama.

rCBF je monitoriran i tijekom prvih 20 minuta reperfuzije nije se razlikovao između 30' t-MCAO kontrolnih nedijabetičkih i 20, 30, 45 i 60' t-MCAO dijabetičkih skupina, a bio

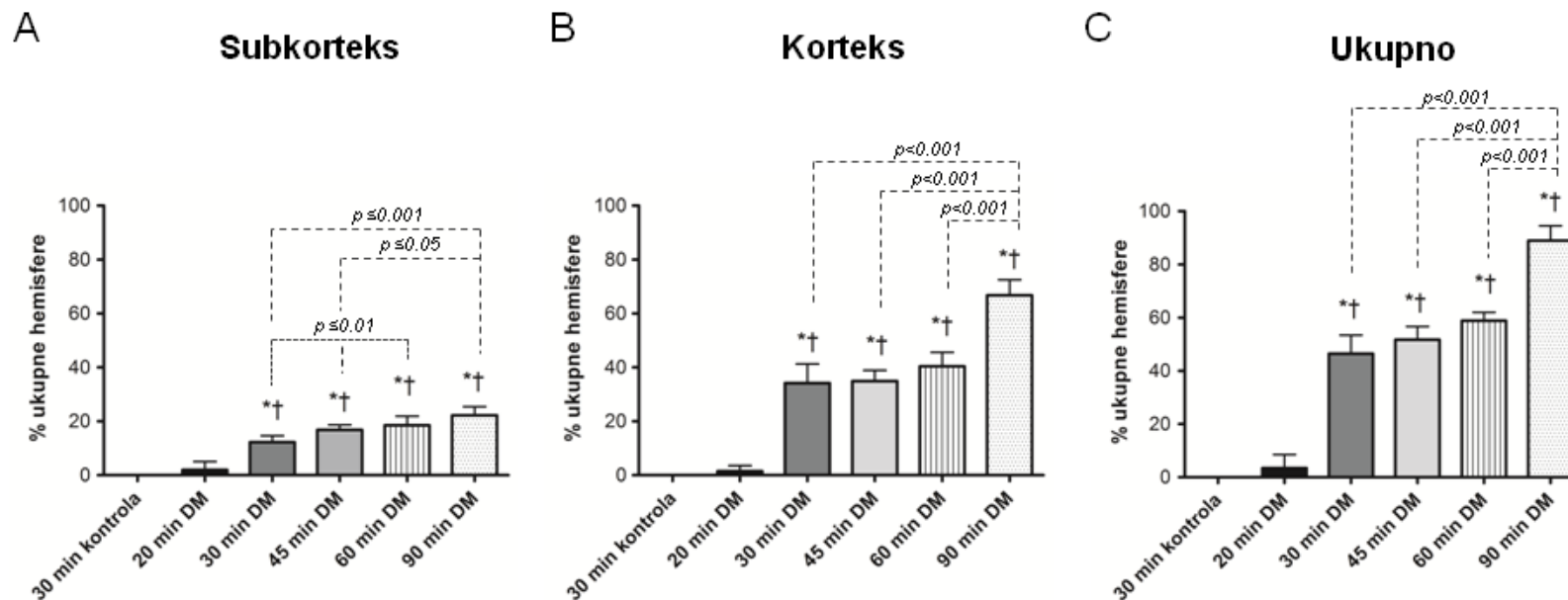
je u raponu od 80% do 125% od osnovnih vrijednosti (Slika 5.2, Panel B). Reperfuzija je bila značajno reducirana kod štakorica u 90 minutnoj grupi u usporedbi sa svim ostalim grupama, a rCBF je za vrijeme reperfuzije je bio u rasponu od 56-62% od osnovice (Slika 5.2, Panel B, \* $p < 0.05$  u usporedbi s 20, 30 i 45 minutnom t-MCAO kod dijabetičnih štakorica i 30 minutnom t-MCAO u zdravoj kontrolnoj skupini (nedijabetične štakorice), † $p < 0.05$  usporedbi s 60 minutnom t-MCAO u dijabetičnih štakorica).



Slika 5.2.prikazuje moždani protok krvi (rCBF) za vrijeme različitog trajanja (20', 30', 45', 60' i 90') tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO, panel A) i reperfuzijskog razdoblja koji je slijedio nakon toga (panel B). Panel A prikazuje podjednaku redukciju rCBF u svim ispitivanim skupinama, kao dokaz uspješne t-MCAO u svim ispitivanim skupinama. 90' t-MCAO je rezultiralo značajno slabijom reperfuzijom u odnosu na ostale skupine (panel B). \* $p < 0.05$  u usporedbi s 20', 30', 45' t-MCAO kod dijabetičkih (DM) štakora i 30' t-MCAO u zdravoj kontrolnoj skupini (non-DM) rats, † $< 0.05$  u usporedbi s 60' t-MCAO kod DM štakora; (two-way ANOVA RM i Bonferroni post-hoc test).

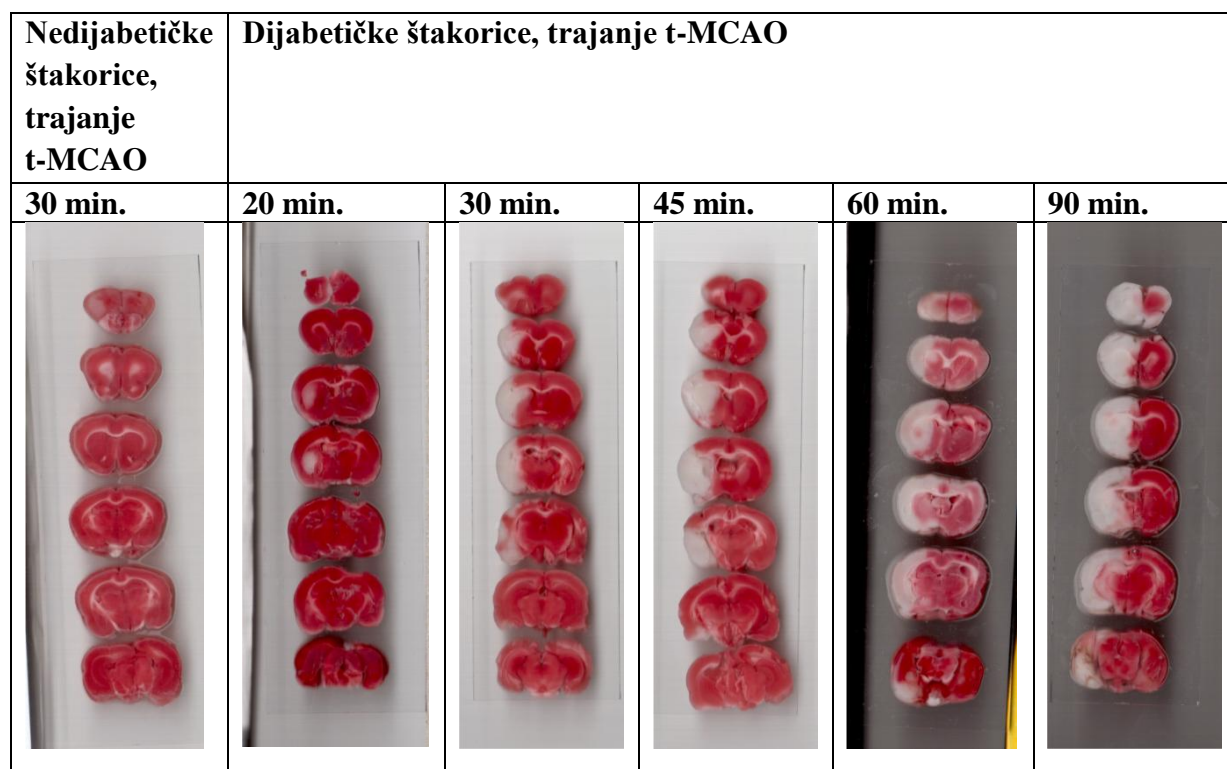
#### 5.1.4. Volumen moždanog infarkta pri različitim trajanjima t-MCAO protokola

Volumen infarkta je kvantitativno mjeren pomoću bojanja TTC-om 24 sata nakon t-MCAO. U kontrolnoj skupini, kod životinja bez dijabetesa s 30 minutnom t-MCAO, nije nađeno jasno demarkiranog ishemijskog tkiva, što upućuje da ishemija trajanja 30 minuta nije dovoljno duga da bi stvorila moždani udar u zdravih životinja (Slika 5.3. i Slika 5.4.). Kod štakorica s dijabetesom došlo je do značajnog porasta volumena infarkta mozga izraženo kao postotak ishemičnih hemisfera, kod ispitivanih skupina s dužim trajanjem ishemije. 20 minuta t-MCAO rezultiralo je s značajno manjim volumenom infarkta u usporedbi sa svim drugim trajanjima t-MCAO (Slika 5.3., panel A, B and C, i slika 5.4.) uzrokujući infarkt koji je zahvaćao samo  $3\pm 5\%$  ishemične hemisphere. Zahvaćeno područje je bilo uglavnom strijatalno, a samo mali dio je bio kortikalne lokalizacije ( $2\pm 3\%$  i  $1.5\pm 2\%$  ishemične hemisfere. Slika 5.3. i slika 5.4.). 30-minuta t-MCAO je uzrokovalo značajno veći infarkt mozga koji se širio na preko  $46\pm 7\%$  ishemične hemisphere, obuhvaćajući  $12\pm 2\%$  striatuma i  $34\pm 7\%$  korteksa, što aproksimativno obuhvaća pola striatalne regije i pola ipsilateralnog korteksa irigiranog s MCA (Slika 5.3., paneli A, B i C, Slika 5.4.). Produljenje ishemije na 45 i 60 minuta rezultiralo je značajnim širenjem infarktana gotovo cijeli striatum koji obuhvaća 22% hemisfere ( $17\pm 2\%$  ishemične hemisfere u 45' t-MCAO i  $19\pm 3\%$  u 60' t-MCAO skupini) i veliki dio korteksa ( $35\pm 10\%$  u 45' t-MCAO i  $40\pm 5\%$  u 60' t-MCAO skupinama; kortikalno područje irigirano s MCA obuhvaća oko 66% hemisfere MCAO (Slika 5.3., paneli A, B i C i Slika 5.4.). Još duža ishemija trajanja 90 minuta kod dijabetičnih štakorica dovela je do masivnog hemisferičnog moždanog udara ( $89\pm 6\%$  hemisfere; cijelog striatuma ( $22\pm 3\%$ ) i cijelog područja koje opskrbljuje MCA ( $67\pm 6\%$ )) (Slika 5.3., paneli B i C i Slika 5.4.)



**Slika 5.3.** prikazuje udio subkortikalnog (panel A), kortikalnog (B) i ukupnog volumena infarkta mozga (panel C) u volumenu ipsilateralne, ishemične hemisfere nakon 20, 30, 45, 60 i 90 minutnih tranzitornih okluzija srednje moždane arterije (t-MCAO, n=5/grupi) kod dijabetičnih štakorica i zdravih, nedijabetičnih štakorica kontrolne skupine. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD; \* $p < 0.05$  u usporedbi s 20 min. t-MCAO kod dijabetičnih štakorica; † $< 0.05$  u usporedbi s 30 min. t-MCAO kod nedijabetičnih štakorica; drugi odnosi su prikazani na panelima (one-way ANOVA and Tukey post hoc test).

U slici 5.3. je prikazano da, dok je 20-minutna t-MCAO bila neuspješna u induciranju infarkta mozga ili rezultirala infarktom minimalne veličine; 30, 45 i 60-minutne t-MCAO su rezultirale u značajno većim infarktima mozga u dijabetičnih štakorica. Nije bilo značajne razlike u veličini infarkta između t-MCAO trajanja 30-60 minuta; ipak, 90-minutna t-MCAO je dovela do zahvaćanja infarktom gotovo 90% volumena ishemične hemisfere (**panel C**). Kod nedijabetičnih štakorica nije bilo znakova infarkta mozga.



**Slika 5.4. prikazuje tipični infarkt mozga u kontrolnoj skupini i pokusnim skupinama nakon 20, 30, 45, 60 i 90 minuta tranzitorne okluzije srednje cerebralne arterije u pokusnim skupinama (t-MCAO, n=5/grupi) dijabetičnih štakorica i 30 minuta t-MCAO u zdravih kontrolnih, nedijabetičnih štakorica (t-MCAO, n=5/grupi). Dok 30 minuta t-MCAO nije dovelo do infarkta mozga u zdravih štakorica, a 20 minuta t-MCAO kod dijabetičnih nije bilo uspješno u stvaranju moždanog udara ili je rezultiralo minimalnim infarktom mozga; 30, 45 i 60 minuta t-MCAO je dovelo do značajno većih infarkta mozga u dijabetičnih štakorica.**

Većim brojem životinja, uključivanjem grupe nedijabetičnih štakora i analizama volumena infarkta mozga nakon pokusa smo dobili kvalitetne rezultate su potvrdili našu tezu. Da bi se uspostavio reproducibilan model koji bi dovodio do moždanih udara srednje veličine, bilo je potrebno u ovom istraživanju koristiti znatno kraće trajanje t-MCAO, a ovo istraživanje sugerira da je 30-minutna ishemija prikladnija nego uobičajena trajanja najčešće od 60-120 minuta. To je naš novi model za istraživanje moždanih udara u dijabetičnih štakora, koji ne nalazimo definirani argumentirano objašnjen u literaturi.

## **5.2. Hiperbarična oksigenacija i 20-HETE inhibicija smanjuju volumen moždanog udara nakon tranzitorne fokalne moždane ishemije, kod ženskih dijabetičkih Sprague–Dawley štakora**

### **5.2.1. Induciranje dijabetesa**

Tjelesna težina štakorica u svim ispitivanim skupinama u ovom dijelu rada bila je slična, između 180 i 230 g.

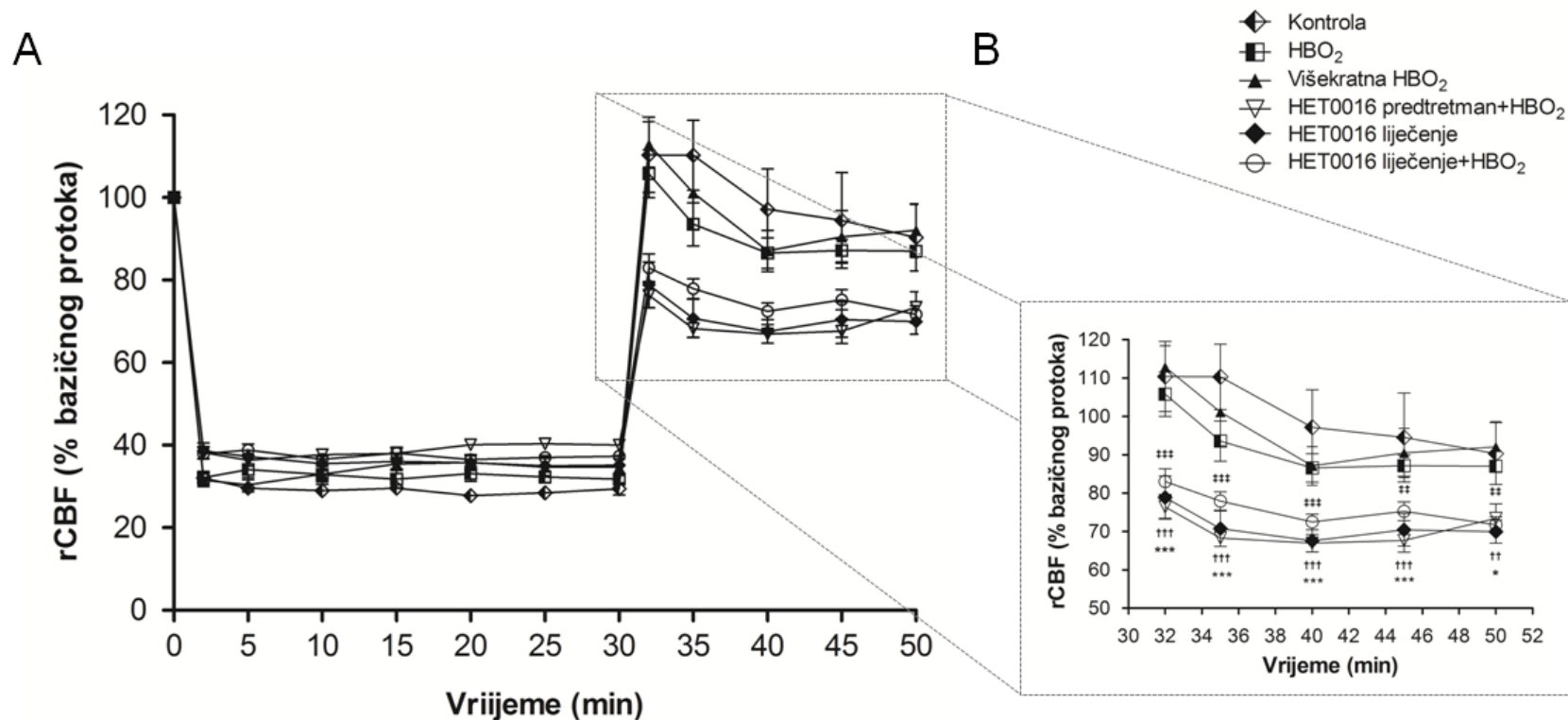
Indukcija kronične visoke hiperglikemije nakon injiciranja STZ (60 mg/kg, i.p.) u sklopu modela loše liječenog ili neliječenog dijabetesa potvrđena je mjerenjima glukoze u krvi na tašte, iz repne vene iznad 17 mmol/L. Za vrijeme t-MCAO procedure mjerenje glukoze na tašte iz repne vene učinjeno je prije i odmah nakon t-MCAO i bila je u rasponu od 21.9 i 30.4 mmol/L, dok je 24 sata nakon t-MCAO bila između 24 i 32.1 mmol/L.

### **5.2.2. Indukcija t-MCAO**

rCBF je kontinuirano monitoriran koristeći LDF da bi se potvrdila adekvatna redukcija intra-ishemičkog rCBF za vrijeme t-MCAO i reperfuzije nakon uklanjanja okludirajućeg monofilamenta obloženog silikonom. Kao što je prikazano u slici 5.5A, nije bilo statistički značajne razlike u redukciji rCBF među skupinama, što pokazuje da je t-MCAO bila jednako uspješna u svim ispitivanim skupinama (rCBF je reduciran za 59,6% do 72,2% bez razlike među skupinama u bilo kojoj vremenskoj točki). rCBF se za vrijeme prvih 20' reperfuzije nije značajno razlikovao između kontrolne i skupina liječenih samo s HBO<sub>2</sub> i bio je u rasponu od 87% do 113% od osnovice (Slika 5.5. B). Reperfuzija je bila značajno nižeg protoka kod svih skupina koje su primile HET0016 u svakoj mjerenoj vremenskoj točki u usporedbi s



kontrolnom skupinom (t-MCAO), a bila je u rasponu od 67% do 83% od osnovnih vrijednosti ( $p < 0.0001$ ; Slika 5.5. B 1). Slične razlike su utvrđene kada su HET0016 skupine uspoređene s HBO<sub>2</sub> skupinama ( $p < 0.05$ ; Slika 5.5. B)

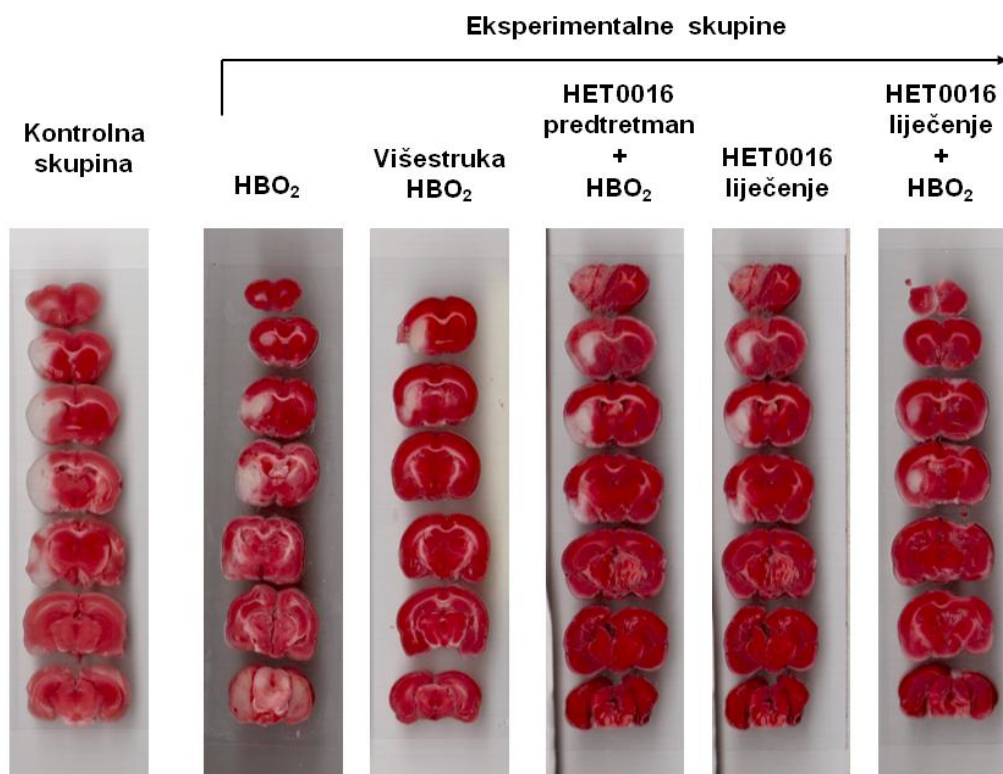


**Slika 5.5. Prikazuje promjene regionalnog moždanog protoka krvi (rCBF) prije, tijekom i nakon tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO) u ispitivanim skupinama:** 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon

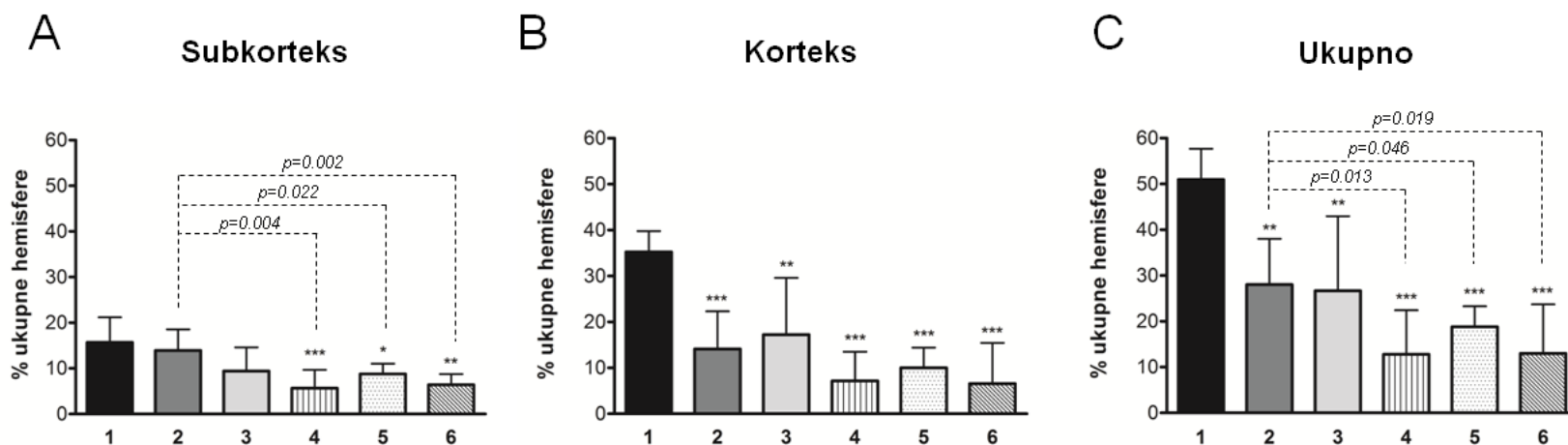
pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>. Vrijednosti rCBF u različitim vremenskim točkama izražene su kao postotak odgovarajućih bazalnih vrijednosti mjerenih u vremenu 0 (100%). rCBF svih skupina uspoređen je s t-MCAO skupinom. \*\*\*p≤0.001 i \*p≤0.05 za HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> skupinu, †††p≤0.001 I ††p≤0.01 za skupinu liječenu s HET0016, ‡‡‡p≤0.001 i ‡‡p<0.001 za HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> skupinu.

### **5.2.3. Liječenje samo hiperbaričnom oksigenacijom smanjuje volumen infarkta mozga nakon t-MCAO**

Veličina kortikalnog infarkta kao i ukupna veličina infarkta je značajno smanjena kod štakorica liječenih s HBO<sub>2</sub> u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 5.6. i Slika 5.7. B i C), ali veličina subkortikalnog infarkta nije smanjena pomoću HBO<sub>2</sub> (jednokratna HBO<sub>2</sub> p=0.966, višekratna HBO<sub>2</sub> p=0.078, Slika 5.7. A). Nije bilo značajne razlike u volumenima infarkta između skupina liječenim različitim HBO<sub>2</sub> protokolima (Slika 5.7.). HBO<sub>2</sub> je smanjila ukupni volumen infarkta mozga za 44.9±7.41 % u HBO<sub>2</sub> skupini, a za 47.6±12.07 % u skupini s višekratnom HBO<sub>2</sub> u usporedbi s kontrolnom skupinom.



**Slika 5.6. prikazuje tipične presjeka mozga 24 sata nakon t-MCAO u svim ispitivanim skupinama:** 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>. Bijelo područje odgovara području infarkta mozga.



**Slika 5.7. prikazuje subkortikalni (panel A), kortikalni (panel B), kao i ukupni volumen infarkta mozga (panel C) 24 sata nakon tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO) u svim ispitivanim skupinama: 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši**

1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primjenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>. Veličina infarkta izražena je kao % volumena cijele ipsilateralne hemisfere (volume) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 u usporedbi s kontrolnom skupinom.

#### **5.2.4. Liječenje samo s HET0016 smanjuje volume infarkta mozga nakon t-MCAO**

Liječenje s HET0016 značajno je smanjilo ukupni, subkortikalni i kortikalni volumen moždanog udara u skupini liječenoj s HET0016 u usporedbi s kontrolnom skupinom (ukupni volume infarkta smanjen je za 63.1±3.34 %, kortikalni za 71.6±4.74% i subkortikalni 44.1±5.45%, u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 5.6. i Slika 5.7., Paneli A, B i C). Dodatno, liječenje s HET0016 bilo je učinkovitije u redukciji subkortikalnog i ukupnog volumena infarkta mozga od jednokratnog liječenja s HBO<sub>2</sub> (Slika 5.7. Paneli A i C).

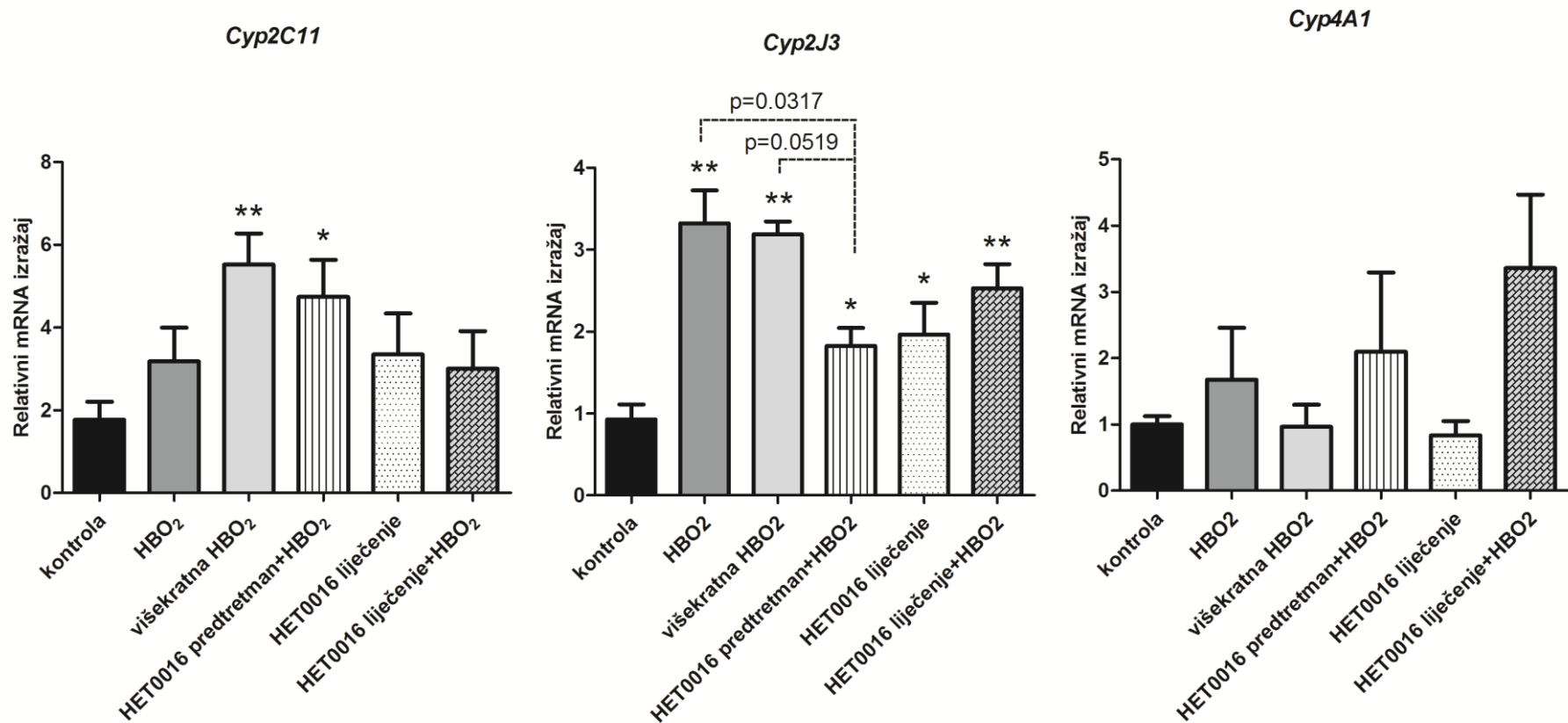
#### **5.2.5. Liječenje ili predtretman s HET0016 kombiniran s HBO<sub>2</sub>**

Liječenje ili predtretman s HET0016 kombiniran s HBO<sub>2</sub> ne donosi značajni dodatni aditivni učinak u smanjenju veličine moždanog udara, u usporedbi s samo liječenjem s HET0016. Liječenje s HBO<sub>2</sub> kombinirano s predtretmanom (HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> skupina) ili liječenjem (akutnim perioperativnim davanjem) pomoću HET0016 (HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub>) značajno je smanjilo ukupni, subkortikalni i kortikalni volumen infarkta, ali nije pokazalo superiornost u usporedbi s liječenjem samo s HET0016 (Slika 5.6. I Slika 5.7., Paneli A, B i C). Iako nije bilo razlike u kortikalnim volumenima infarkta mozga među svim ispitivanim skupinama; sve tri skupine liječene s HET0016 su imale značajno veću redukciju subkortikalnog i ukupnog volumena infarkta u usporedbi s jednokratnim liječenjem s HBO<sub>2</sub> (Slika 5.7., Paneli A i C). Višekratne HBO<sub>2</sub> bile su jednako učinkovite u smanjenju veličine infarkta mozga kao i liječenje s HET0016 (Slika 5.6. i Slika 5.7. Paneli A, B i C).

#### **5.2.6. Rezultati ispitivanja izražaja mRNA enzima CYP 450**

Iako smo učinili analize izražaja Cyp4A3 mRNA, rezultati nisu prikazani, jer je izražaj bio izrazito nizak (najviša vrijednost je bila 2.1x10<sup>-4</sup>). Cyp4a1, iako prisutan u tkivu, ne pokazuje značajne razlike između skupina. S druge strane, mRNA Cyp2J3 značajno je

povišena u svim skupinama u usporedbi s kontrolom, a mRNA Cyp2C11 značajno je povišena u skupini liječenoj s višekratnom HBO<sub>2</sub> i HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 5.8.).



**Slika 5.8.** Prikazuje razinu relativnog mRNA izražaja A) Cyp2C11, B) Cyp2J3 i C) Cyp4A1 gena u moždanom tkivu, u ispitivanim skupinama: 1) kontrolna skupina – t-MCAO trajanja 30 minuta; 2) HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena jednokratnom hiperbaričnom oksigenacijom (HBO<sub>2</sub>); 3) višestruka HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta praćena dvjema hiperbaričnim oksigenacijama (neposredno nakon t-



MCAO i nakon 12 sati); 4) HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica liječenih s HET0016 (tijekom tri dana prije pokusa) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>; 5) HET0016 liječenje – t-MCAO trajanja 30 minuta u štakorica HET0016 (primijenjen svakih 60 minuta, počevši 1h prije pokusa, do 6 sati nakon pokusa); 6) HET0016 liječenje+HBO<sub>2</sub> – t-MCAO trajanja 30 minuta kod štakorica liječenih s HET0016 (primijenjen isto kao u prethodnoj skupini) praćena s jednokratnom HBO<sub>2</sub>. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost±SEM (n=5), \*p<0.05, \*\*p<0.01, u usporedbi s t-MCAO skupinom.

## 6. Rasprava

Moždani udar jedna je od češćih neuroloških bolesti, i jedan od najčešćih uzroka smrti, no do danas ne možemo reći da je dovoljno istražen. Pogotovo je to jasno kada znamo da se liječenje moždanog udara svodi na samo jedan jedini lijek - rtPA, a i to je liječenje ograničeno brojnim kontraindikacijama te tek mali broj bolesnika ovaj lijek zapravo i dobije. Najčešće je razlog za to predugo vrijeme do dolaska u bolnicu i postavljanja dijagnoze. Alternativa praktički ne postoji. Ostali lijekovi koji se primjenjuju su tek učinkoviti u prevenciji recidiva moždanog udara. Kao nasušna potreba pokazuje se potreba za daljnjim ispitivanjem terapijskim mogućnosti u ovom liječenju, mogućnost koje ne bi bile toliko vremenski ograničene, niti s toliko kontraindikacija. Kada tako govorimo mora biti jasno da samo liječenje koje se može dati unutar prvih 3 sata spašava ishemijsku jezgru, a ono primijenjeno kasnije spašava penumbra i oligemiju. Može li se to drugo onda može nazvati liječenjem ili neuroprotekcijom, „prevencijom recidiva moždanog udara“ (što se klinički manifestira pogoršanjem deficita, patološki i radiološki većim infarkt mozga, a zapravo je možda samo inkorporiranje penumbre i oligemije koja je neko vrijeme preživljavala u ishemijsku jezgru - infarkt), ostaje za razmatranje. No potrebno je uzeti u obzir i još nešto. Klinički je jasno da su neke okluzije arterija kratkotrajne, a neke dugotrajne. Kratkotrajne mogu nastati npr. stvaranjem tromba na ulceriranom plaku velike arterije, kardijalnim embolijskim incidentom ako je tromb iz srca (najčešće atrijski u sklopu fibrilacije atrijske ili ventrikularni ako postoji diskinezija stijenke srca), arterijsko-arterijskom embolijom i slično te se tromb može, ako je svjež i nije već fibrozno organiziran, otopiti brzo spontano ili liječenjem. U uvodu je rečeno već kako HBO<sub>2</sub> stvara deseterostruko povišenje razine otopljenog kisika, još više povisuje difuzijski gradijent te postiže 20% povećanje oksigenacije ishemičke penumbre, smanjenje moždane razine piruvata i laktata, poboljšanje mitohondrijske funkcije i druge brojne pozitivne uvjete za preživljavanje ishemičnog tkiva mozga. Isto tako je rečeno kako u 27 % tkiva penumbre postoje ipak znakovi smrti neurona, iako je to makroskopski nevidljivo, a u 44% tkiva penumbre znakovi smrti više od pola neurona! Isto tako znamo da je „vrijeme mozak“ – „time is brain“ i da će dakle penumbra dijelom ili potpuno odumrijeti čekajući oporavak. Postavlja se dakle pitanje što zapravo ta „penumbra“ znači? Sigurno ne znači tkivo koje se može sigurno i potpuno oporaviti, ako se pravilno liječi, kako većina liječnika, neupoznata dovoljno s problematikom smatra. No ipak ju treba liječiti ako je ishemična, a je. Tako da neuroprotekcija ovdje sigurno nije dobar naziv jer liječimo već oštećeno tkivo, a ne štitimo zdravo. U oligemiji bi možda bila. I to ostaje za razmotriti. S tog gledišta liječenje

poboljšanjem tkivne oksigenacije (što je hitnije od dopreme glukoze) i perfuzije tkiva je najvažnije liječenje koje je potrebno. Kao paralela iz kliničke prakse, kada je u pitanje srčani infarkt postoji izrazita bol i nedostatak zraka, dispneja koju gotovo svaki bolesnik osjeti kao jaku. Srčani mišić naime boli... To daje dojam hitnosti, koji je potreban. Moždani udar većinom ne boli, niti postoji osjećaj nedostatka zraka kod bolesnika, jer mozak sam po sebi ne boli, bole tek meningealne ovojnice kada ih pritisne npr. edem. A patofiziološki mehanizam je isti. Kako ne boli i nema dispneje koju treba olakšati, bolesnici se ne žure toliko u bolnicu i zakasne primiti lijek, a kada ne postoji dispneja liječnici ne ordiniraju kisik iako postoji ishemija tkiva. Stvar je jasna, zar ne? To je razlog zašto smo odlučili proučavati nove mogućnosti liječenja kisikom, a potom to sveli na liječenje hiperbaričnim kisikom, kao još jedno moguće liječenje, koje se može primjeniti prvih sati moždanog udara.

Nadalje kada govorimo o ishemiji potrebno je spomenuti i to da kratkotrajne ishemije mozga dovode do neuroprotektivnog djelovanja, ishemičke tolerancije. Točnije ako nakon toga nastupi moždani udar, on neće biti toliko opasan niti konačni infarkt toliko masivan. Ostaje za istražiti dovodi li do tog učinka smanjeno oštećivanje, jača otpornost tkiva ili bolji popravak oštećenja. Kao medijatori se spomionju potencijalno HSP, Bcl-2, neutrofini, interleukini 1a i 1b, TNF $\alpha$ , citokini. Cijeli učinak mogao bi počivati na ishemijom induciranim protektivnim proteinima stanice, koja tako sljedeću ozljedu dočeka spremna.

Toleranciji obično treba nekoliko dana da postane najjača i učinak traje do 7 dana. HBO<sub>2</sub> stvara uvjete slične tome, uvjete relativne hipoksije, a ako se primjeni višekratno mogla bi pomoći u značajnom pojačavanju ove tolerancije na ishemiju. Npr. kao priprema za operaciju ICA, kod koje dolazi do prolaznih ishemija, a ponekad i infarkta mozga (2-5% slučajeva).

S obzirom na duljinu trajanja odumiranja penumbre i oligemije, smatramo da bi HBO<sub>2</sub> ovu toleranciju samo potpomogla. Najbolji učinak bi se postizao nakon kratke ishemije koja bi potakla produkciju proteina, a ne bi kao što duža čini, inhibirala istu i dovela do smrti neurona. Tako naizmjenično izlaganje kisiku s pauzama, stvaralo bi uvjete relativne, intermitentne hipoksije, koja dokazano proizvodi IL-1a or IL-1b, or TNF- $\alpha$ , a koji su opet dokazano protektivni, a prva dva to čime putem proteina HSP, Bcl-2, odnosno sa stresom povezanim proteinima, ali pomaže pritom, doduše manje i TNF- $\alpha$ . I citokini djeluju zaštitno nakon kraće ishemije, a štetno kod duže. Mehanizam kojim se to sve događa je, danas se smatra, ključna pojačana postishemička sposobnost puferiranja Ca<sup>++</sup> pomoću mitohondrija i pojačane Ca<sup>++</sup>-ATPazne aktivnosti, odnosno smanjenje nakupljanja Ca<sup>++</sup> u citosolu. Bcl-2 ima još nerazjašnjenu ulogu u tome, no dokazano je pojačano eksprimiran. Postoje istraživanja o

učincima normobarične oksigenacije kod moždanog udara, no dokazano je već da HBO<sub>2</sub> smanjuje hipoksiju penumbralnog tkiva tijekom rane faze ishemije mozga značajno efektivnije nego normobarična oksigenacija (NBO<sub>2</sub>), kako znamo koliko je veća količina kisika koju može donijeti ishemičnom tkivu, sigurno je bolji izbor (104-106), 197)

Većina istraživanja na štakorima uopće, ali i na dijabetičkim štakorima rađena je na muškim štakorima, uglavnom iz praktičnih razloga. Neka ranija su istraživanja sugerirala da estrogen relativno zaštićuje dijabetičke štakorice od dijabetesom uzrokovanog pojačanog oštećenja mozga nakon moždanog udara (154). S obzirom da je ta tvrdnja doista intrigantna i nedovoljno istražena, a da se pri početku ovog istraživanja primjetilo da kod SD štakorica pri uobičajenom trajanju ishemije od 90 minuta ili dulje, dolazi do čestog ugibanja životinja ili masivnih infarkta mozga odlučili smo se time detaljnije pozabaviti. Ovo istraživanje je, nasuprot navedenim ranijim radovima pokazalo, u svom prvom dijelu, da su dijabetičke SD ženke izrazito osjetljive na moždanu ishemiju. Rezultati drugog dijela ovog istraživanja sugeriraju da HBO<sub>2</sub> i inhibicija 20-HETE produkcije može smanjiti konačni volumen infarkta mozga kod dijabetičkih štakorica, svako zasebno ili zajedničkom primjenom. Ovo je vjerojatno povezano s pojačanjem izražaja CYP450- epoksigenaza u tkivu mozga tijekom HBO<sub>2</sub>.

S obzirom da se ovo istraživanje sastojalo od dva dijela, tako smo podijelili i rezultate i diskusiju.

### **6.1. Novi model za istraživanje moždanog udara kod dijabetičkih SD štakorica**

U prvom dijelu istraživanja, koji se bavi uspostavom novog modela za istraživanje moždanog udara kod dijabetičkih štakorica SD vrste najvažniji rezultati su da su: a) dijabetičke štakorice SD vrste izrazito osjetljive na ishemiju u t-MCAO modelu moždanog udara; b) 60' i 90' t-MCAO, koje se trenutno najčešće koriste u nedijabetičkih štakorica se doima preduga za dijabetičke, uzrokujući masivne moždane udare kod dijabetičkih štakorica; c) slabija reperfuzija je registrirana kod duljeg trajanja ishemije u 90' skupini (što se moguće može objasniti kao rezultat već ireverzibilnog infarkta mozga s posljedičnom vaskularnom disfunkcijom). Ovaj vaskularni znak bi mogao biti znak dolaska do točke s koje više nema povratka, oporavka u liječenju moždanog udara; d) 30' t-MCAO se doima adekvatnog trajanja ishemije za model moždanog udara kod dijabetičkih štakorica, pouzdano uzrokujući moždane udare srednje veličine koji zahvaćaju 30-50% ishemične hemisfere; e) 20' t-MCAO kod dijabetičkih štakorica uzrokuje male strijatalne moždane udare

nekonzistentne veličine; i f) upitno je komparirati rezultate istraživanja eksperimentalne ishemijske mozga štakora s dijabetesom i onih bez dijabetesa, čak i ako je trajanje t-MCAO isto.

Vrsta Sprague-Dawley štakora (SD) je najčešće korištena vrsta štakora u MCAO istraživanjima (41% istraživača je provodilo istraživanja na ovoj vrsti, nasuprot 34% na štakorima vrste Wistar, 10% na SHR (spontano hipertenzivnim štakorima), 2% na štakorima vrste Long-Evans i 2% na ostalim vrstama (166). SD štakori imaju manji postotak komplikacija uključujući SAH u usporedbi s vrstama štakora Fisher i Wistar, radi anatomskog tijeka ICA u petroznom segmentu (166).

Ranija istraživanja su sugerirala da estrogen relativno štiti ženke štakora od dijabetesom-pogoršanog oštećenja nakon moždanog udara (158). Ipak, ovo istraživanje je pokazalo da su naše dijabetičke štakorice imale izrazito visoku osjetljivost na ishemijsku ozljedu mozga i sklonost razvoju infarkta mozga. Ipak moramo priznati da postoji mogućnost da bi muški štakori s dijabetesom mogli biti još osjetljiviji, s još većim infarktima mozga, s obzirom na estrogenski zaštitni utjecaj. To ipak nije potpuno jasna mogućnost, s obzirom da je dokazano na ljudima da kada se moždani udar ipak dogodi kod žena, koje su relativno zaštićene estrogenom, on bude teži i češće fatalan nego kod muškaraca.

Pri uspostavi modela moždanog udara u dijabetičkih štakora, na osnovu publiciranih modela kod štakora bez dijabetesa, isprva smo otkrili da je uobičajeno trajanje ishemijske od 60 do 120' uzrokovalo velike moždane udare, s masivnim edemom mozga i devastirajućim neurološkim deficitima, poput nemogućnosti hranjenja, nepokretnosti i poremećaja svijesti. Ovi moždani udari su bili često letalni unutar prvih 24 sata nakon pokusa, uglavnom radi masivnog edema mozga i porasta intrakranijalnog tlaka. Slično se događa kod bolesnika s najtežim moždanim udarima cijelog MCA teritorija i s visokim NIHSS (National Institute of Health Stroke Score), koji su dokazano „loši“ kandidati za liječenje trombolizom i uglavnom umiru radi edema mozga i komplikacija disfagije i nepokretnosti, ali također imaju veći rizik sekundarnog krvarenja u zoni moždanog udara.

Imajući navedeno u vidu, u ovim pokusima smo trajanje MCA okluzije skratili različito u različitim skupinama (Slika 5.2.) da bi utvrdili optimalno trajanje t-MCAO, koje će rezultirati srednje velikim moždanim udarom ranije opisanim u nedijabetičkih bolesnika i štakora, između 30 i 50% volumena hemisfere (148,163,164)

U ovim pokusima, u dijelu o uspostavi modela za istraživanje moždanog udara, dulja ishemija je neizbježno dovodila do većih infarkta mozga (Slika 5.3, Paneli A, B i C i Slika 5.4), a uobičajeno trajanje ishemije kod štakora bez dijabetesa, koje je u ranijim istraživanjima najčešće bilo 90', (ali također 60-120', ponekad čak 180 minuta) je bilo predugo za dijabetičke štakorice i uspostavu modela moždanog udara (96, 147). Išemija od 60' i 90' je uzrokovala devastirajuće, masivne infarkta mozga s manjom vjerojatnošću preživljavanja kao i bilo koje vrste liječenja (Slika 5.3. Panel C, Slika 5.4.).

Dijabetes pogoršava ishod moždanog udara, ali je također neovisni čimbenik rizika pa bolesnici s dijabetesom imaju 2-4 puta veći rizik za moždani udar u usporedbi s nedijabetičarima (149, 153). Mogući uzroci navedenoga su kronična hiperglikemija koja dovodi do produkcije slobodnih kisikovih radikala i citokina i povećava predispoziciju ishemičnih stanica mozga apoptozi (198). Dodatno, kod dijabetičara dolazi do zadebljanja arterijske intime i arteriolarnih okluzija, dovodeći poremećenom vaskularnom funkcijom do inadekvatne perfuzije tkiva (148, 152). Kao posljedica toga i drugih patofizioloških mehanizama, isto trajanje ishemije dovodi do lošijeg ishoda liječenja moždanog udara kod dijabetičara. U ranijim istraživanjima, animalni modeli dulje ishemije i duljeg vremenskog prozora do početka liječenja moždanog udara su bili praćeni negativnim ili slabim rezultatima ishoda liječenja [(199). Na primjer, liječenje s rtPA nakon 2 sata t-MCAO nije pokazalo učinka na veličinu infarkta mozga i neurološki deficit, ali je imalo negativne učinke na rizik intracerebralne hemoragije, raspadanje krvno-moždane barijere i produkciju inflamatornih medijatora (150). Duža ishemija neizbježno pogoršava infarkt mozga, pojačava imunوسي odgovor koji je povezan s vaskularnom bolešću i dijabetesom (200). Jači upalni odgovor dovodi do moždanog edema, a posljedično (kada intrakranijalni tlak preraste prosječni venski tlak, a pogotvo arterijski krvni tlak) do smanjene perfuzije mozga inače neokludiranim arterijama(200), kompresije na do sada zdrave, čak i udaljene moždane strukture i njihova sekundarnog ishemijskog ili kompresijom uzrokovanog uništenja i neizlječivih primarnih, ali i sekundarnih oštećenja (201). Tako gledano, iz pokusa s masivnim moždanim udarima, može doći do krivog zaključka (radi neadekvatnog dizajna pokusa), da niti jedno liječenje nije korisno, čak niti moguće, a potencijalno može biti opasno, u liječenju moždanih udara kod bolesnika s dijabetesom.

Uistinu, još nedavne smjernice o liječenju moždanih udara trombolizom (rTPA, AHA/ASA smjernice 2007. (202)) bile su vrlo isključive kod dijabetičara s preboljelim moždanim udarima i oni nisu mogli dobiti jedino poznato liječenje moždanog udara niti

unutar 3 sata od početka smetnji. Od 2009. smiju, ali ne i u vremenskom prozoru od 3 do 4.5h, kada većina ostalih smiju (203).

Naše je mišljenje da je glavni problem u tome što je većina moždanih udara u kliničkoj praksi malog ili srednjeg volumena. S druge strane većina moždanih udara koji se istražuju u gore navedenim animalnim istraživanjima su veliki. Također u kliničkoj praksi, uspješno su liječivi većinom oni moždani udari koji se liječe u kraćem vremenskom prozoru od nastanka, a ako ishemija dugo traje, posljedica će biti masivan moždani udar, uglavnom rezistentan na bilo kakvo liječenje, s velikim onesposobljenjem koje ugrožava život (radi opasnosti od tromboembolije, razvoja plućnih ili urinarnih infekcija, opasnosti od aspiracije, kao posljedica disfagije, opasnosti od dehidracije, sa svim sekundarnim posljedicama tih komplikacija koje ponekad vode u začarani krug iz kojega nema izlaska). Takvi veliki moždani udari, koji su bili duže izloženi ishemiji mozga, imaju čak i sa više opasnih intrakranijalnih komplikacija samog liječenja, poput intracerebralne hemoragije, sekundarnog krvarenja u moždanog udara radi sekundarno oslabljene vaskularne stijenke. A animalni modeli su svi koristili duže trajanje ishemije. Uzimajući u obzir sve ove činjenice, dijabetički model moždanog udara bi dakle trebalo modificirati da odgovara svrsi, t.j. trajanje ishemije treba skratiti da bi se proizvelo infarkt mozga srednje veličine, koji bi imitirao moždani udar kod ljudi koji je u praksi pokazano da ga je moguće liječiti. Takav t-MCAO model moždanog udara kod dijabetičkih štakorica bi omogućio ispitivanje raznovrsnih oblika liječenja, odnosno, što smatramo i primarnom funkcijom svakog animalnog modela,

U našem istraživanju 20-minutni ishemijski model kod nekih štakorica nije uopće proizveo infarkt mozga, a u ostalih je bio izrazito malen i lociran samo u striatumu (Slika 5.3. i Slika 5.4.). Nije dovodio do konzistentnih rezultata, unatoč uredno provedenom pokusu, ali niti do dovoljno velikih infarkta mozga da bismo mogli simulirati prosječni moždani udar kod dijabetičara ili nedijabetičara. Mogao bi, kada ne bi postojao problem reproducibilnosti, konzistentnih rezultata, simulirati lakunarni moždani udar (infarkt malih krvnih žila) u bazalnim ganglijima, kao jedan od češćih tipova moždanog udara. Zato mislimo da za taj tip moždanog udara ovaj model nije najbolji (204). Kod ovog tipa moždanog udara se infarkt mozga događa na razini manjih arterija odnosno terminalnih ogranaka velikih moždanih arterija, gdje je kolateralna cirkulacija slaba, kao u slučaju striatuma. Ako se radi o kraćoj okluziji MCA, u tom se slučaju infarkt korteksa gotovo nikada ne događa, jer je kolateralna cirkulacija preko kortikalnih anastomoza ipak dovoljno jaka da pretrpi kraću ishemiju.

U ovom istraživanju samo 30-minutna ishemija je konzistentno dovela do infarkta mozga srednje veličine, koji zahvaća oko 50% MCA irigacijskog područja i oko 50% striatuma irigiranog od MCA (Slika 5.3., panel A, B i C, Slika 5.4.). To dobro odgovara trombozi, infarktu velikih krvnih žila, ali još uvijek ne toliko masivnom i uništavajućem da bude letalan i smatramo ga optimalnim za buduća istraživanja (204). Infarkti mozga iste veličine uspješno su korišteni u drugim, ranijim radovima na nedijabetičkim štakorima (148, 199).

Duža ishemija od 45, 60 ili 90 minuta uzrokuje masivnije infarkte MCA regije. U 45 i 60 minutnim ishemijama dolazilo je do relativno naglog i značajnog širenja volumena infarkta na skoro cijeli ili cijeli striatum (Slika 5.3., panel A), ali i značajno veći dio korteksa (Slika 5.3., Panel B, Slika 5.4.), no ipak ne cijeli MCA irigirani korteks, zbog funkcionalnih kortikalnih kolaterala, koje su ovdje još dovoljne za opskrbu kisikom i glukozom.

Ishemija od 90 minuta dovodi do masivnih hemisferičnih moždanih udara s infarktom gotovo cijele hemisfere mozga (cijeli striatum kao i ranije, ali ovaj put skoro cijeli MCA ili ICA irigirani korteks kao što se vidi na Slici 5.3., panel B i C, Slici 5.4. Takvi veliki moždani udari bi u kliničkoj praksi skoro uvijek bili inkompatibilni s preživljavanjem radi različitih razloga: uglavnom moždanog edema, povišenja intrakranijalnog tlaka sa radi toga niskom arterijskom perfuzijom mozga i sekundarnim širenjem infarkta mozga, hernijacije mozga (unkalne, subfalcine ili pogotovo transtentorijalne) i sekundarnog kompresijskog oštećenja neinfarciranih regija itd. Ako bi bolesnik i preživio, najteži neurološki deficiti i teška onesposobljenost bi ostala kao trajna posljedica. To se događa ako dođe do nagle i trajne MCA okluzije, bez reperfuzije ili sa prekasnom reperfuzijom ili kod kraće okluzije ako je kolateralna arterijska cirkulacija slaba.

Još jedan značajan rezultat ovog istraživanja je da je pojava slabije reperfuzije kod duže ishemije, nakon uklanjanja okluzivnog materijala. 90 minutna grupa imala je značajno lošiju reperfuziju (56-62% od osnovice, nasuprot 80 do 125 % od osnovice u drugim grupama (Slika 5.2, panel B)), koja se može objasniti kao rezultat već ireverzibilnih, definitivnih moždanih infarkta i arterijskog oštećenja intrakranijalnih arterija, kod kojih normalna postishemička hiperperfuzija, kao spasonosni mehanizam ne može nastati. Smatramo da ovaj vaskularni znak može biti marker nepovratnih oštećenja u liječenju moždanih udara (point of no return).



Za svaki eksperimentalni model koji bi trebao odražavati humano stanje je važno da simulira prosječnu situaciju. U ovom slučaju trebao bi simulirati najčešće tipove moždanih udara, a to su oni srednje veličine ili manji. Kao najbolji model u ovom pokusu pokazao se model 30 minutne ishemije, s infarktima pola striatuma i pola korteksa (Slika 5.3., Slika 5.4.) koji je opskrbljen od strane MCA. Svi duži modeli su proizveli uništenje cijelog ili skoro cijelog striatuma, a korteks je bio gotovo potpuno uništen u 90 minutnom modelu.

Za usporedbu, kod ljudi moždani su udari uglavnom mali, veličine 4.5 do 14% ipsilateralne hemisfere (205,206), a kao maligni infarkt mozga klasificira se u neurološkoj praksi onaj koji zahvaća više od 50% moždane hemisfere. Neka istraživanja objavljuju podatke da on takav postaje već tada kada je veći od 39% hemisfere (207,208).

## **.6.2. Djelovanje hiperbarične oksigenacije i HEZ0016 na ishod moždanog udara**

Najvažniji rezultati drugog dijela istraživanja, koje se bavi djelovanjem hiperbarične oksigenacije i HEZ0016 na ishod moždanog udara su: a) ako se primjeni rano nakon moždanog udara, HBO<sub>2</sub> (korištena jednokratno ili višekratnim izlaganjima HBO<sub>2</sub>) je izrazito učinkovita terapija moždanog udara kod dijabetičkih štakorica, čak i u prisutnosti dugotrajnog neliječnog dijabetesa; b) liječenje samo s HET0016 je jednako efektivno; c) HET0016 (primijenjen kao liječenje ili predtretman), kombiniran s HBO<sub>2</sub> nema značajan aditivni učinak u smanjenju volumena infarkta mozga, u usporedbi sa liječenjem samo s HET0016; d) postoji značajno povišen izražaj EET-stvarajućih enzima u tkivu mozga u skupinama podvrgnutim HBO<sub>2</sub> ili HET0016 liječenju, sugerirajući da EET doprinose smanjenju volumena infarkta mozga i e) SD dijabetičke štakorice izrazito su osjetljive na ishemiju (podatak koji potvrđuje naše rezultate iz prvog pokusa (191)).

Po našim saznanjima, ovo su prvi pokusi koji su koristili HBO<sub>2</sub> i HET0016 u in vivo pokusima na dijabetičkim štakoricama i prvi rezultati koji istražuju učinke njihove kombinirane primjene u liječenju moždanog udara (u dostupnoj literaturi).

HBO<sub>2</sub> je još uvijek rijetko korištena u modelima eksperimentalnog moždanog udara, a niti jedan od njih do sada nije proveden na dijabetičkim štakorima, što čini ovo istraživanje još značajnijim. Dodatna vrijednost ovog istraživanja je u tome što je ciljano provedeno na, težim za ispitivanje i rijetko korištenim, ženskim štakorima s dugotrajnim dijabetesom (189, 209-212). Ovaj novi model je interesantan zato što u kliničkoj praksi bolesnice s dijabetesom

imaju veći rizik za razvoj moždanog udara nego muškarci, a i češće zadobivaju veće moždane udare, koje je teže liječiti i često su fatalni (96,97,213).

Objavljeni pokusi na nedijabetičkim štakorima su utvrdili da HBO<sub>2</sub> ima učinak na smanjenje volumena moždanog udara nakon t-MCAO. Ovaj t-MCAO model ishemije, prvo stvara infarkt u području striatuma (jer je ovo područje irigacije terminalnih arterijskih ogranaka gotovo bez kolateralnog cirkulacije (161)), a kasnije u području dorzolateralnog korteksa iznad njega. Striatalni infarkti mozga se zato vrlo brzo razvijaju i gotovo su potpuno otporni na bilo koje liječenje. Kortikalni infarkti razvijaju se kasnije, jer ipak postoji iako mala kolateralna cirkulacija drugim neblokiranim arterijama, koja nije dovoljna za dugo preživljavanje. Razvoj kortikalnog infarkta mozga uključuje i druge patofiziološke procese, kao što je produženo otvaranje krvno-moždane barijere, njezinu razgradnju i apoptotsku smrt stanice. Upravo zato striatum je mjesto ishemijske jezgre, a ovisno o trajanju i razini smanjenja rCBF i/ili medicinskoj intervenciji, korteks se transformira u ishemijsku jezgru, penumbru, oligemiju ili zdravo neuralno tkivo (162).

U prvim pokusima pokazalo se da je 30 minutna t-MCAO dobra kao model u dijabetičkih SD štakorica, ako se želi stvoriti prosječan, umjereno velik moždani udar (koji zahvaća između 30% i 50% volumena ishemične hemisfere) (119), a rezultati drugog pokusa su to i potvrdili (Slika 5.6. i Slika 5.7. Paneli A, B i C). Potvrdili su i da se u ovom modelu može pratiti učinkovitost liječenja, jer ne dovodi do masivnog moždanog udara koji bi bio letalan unutar 24 sata radi komplikacija poput edema mozga, nepokretnosti, disfagije. Tako može imitirati stvarnog dijabetičkog bolesnika s moždanim udarom koji još uvijek može biti uspješno liječen.

U ovom istraživanju kod dugotrajnog dijabetesa, HBO<sub>2</sub> nije bila učinkovita u smanjenju volumena subkortikalnog infarkta mozga (Slika 5.7. Panel A). Drugim riječima, iako je trajanje ishemije skraćeno značajno, ishemijska jezgra je već prešla preko točke s koje više nema povratka. S druge strane, volumen infarkta korteksa i ukupni volumen infarkta mozga su bili značajno smanjeni (Slika 5.7. Panel B i C). Iako su učinci ponavljane HBO<sub>2</sub> na volumen infarkta mozga proučavani na različitim modelima moždanog udara (107,214), postoji praznina u istraživanjima na dijabetičkim štakorima s moždanim udarom. U ovom istraživanju nije bilo značajne razlike između skupina liječenih s HBO<sub>2</sub> u bilo kojem volumenu infarkta mozga (Slika 5.7. Paneli A, B i C). Rezultati sugeriraju da se najjači učinak HBO<sub>2</sub> postiže njezinom prvom primjenom (i to što je prije moguće nakon moždanog udara), a ponavljane aplikacije nisu superiorne u odnosu na jednokratnu (Slika 5.6.). Bi li se benefit od ponavljanih aplikacija ipak mogao ostvariti kroz svakodnevne aplikacije u dužem vremenskom

periodu, ne možemo spekulirati, ali smo mišljenja da ovaj efekt možda ne bi bio tako izražen kao efekt prve hiperbarične oksigenacije, primijenjen što prije je moguće nakon ishemije. Naime glavnina oštećenja i smrti stanica nastupa u prvim satima nakon ishemije, na mjestu ishemijske jezgre i penumbre pa bi ponavljanje hiperbarične oksigenacije moglo samo djelovati na rubna područja oligemije. Njezini mehanizmi gledani iz te perspektive definitivno jesu zaobilazanje blokirane krvne žile preko kolateralnih arterija, što nas podsjeća na prve eksperimente s HBO<sub>2</sub> u kojima su eksangvinirane životinje živjele samo na plazmi u hiperbaričnoj komori, bez eritrocita, a poznato da plazma prolazi i tamo gdje eritrociti ne mogu. Mogućnosti HBO<sub>2</sub> kod štakora su se pokazale izrazito značajne. Po našem mišljenju, raniji pokusi, koji nisu pokazali učinkovitost HBO<sub>2</sub>, su bili neuspješni radi zanemarivanja osjetljivosti neurona, prolongirane ishemije i korištenja liječenja s HBO<sub>2</sub> previše kasno nakon nastupa moždanog udara, a i očekivanja su možda bila prevelika (107). Slične poteškoće su se događale pri uvođenju trombolize u liječenje moždanih udara. Mnogo je godina prošlo dok nije postala primjenjiva, korisna, ali je morala biti ograničena na uski vremenski prozor kao i brojnim, realnim kontraindikacijama. Očekujemo da će se isto dogoditi i sa hiperbaričnom oksigenacijom. Po našem mišljenju najperspektivnije područje njezine primjene će biti kirurgija, uglavnom vaskularna kirurgija, kao u bolesnika koji su prošli endarterektomiju npr. karotidne arterije. Ova procedura ima prihvaćeni, mali postotak moždanih udara nakon operacije, ali iako je moždani udar prepoznat odmah po izlasku iz opće anestezije, koja je relativno kratka, a vrijeme od nastanka moždanog udara kratko, tromboliza nije moguća radi svježije operacije i gotovo sigurne opasnosti od krvarenja u operativno polje. Nadamo se da će HBO<sub>2</sub> popuniti ovu prazninu u liječenju. Kao napomenu je potrebno dodati da se ista operacija sve više provodi i u lokalnoj anesteziji, pri kojoj je, jer je bolesnik cijelo vrijeme u kontaktu, moguće istog trenutka kada se ishemija dogodi registrirati moždani udar, pripremiti hiperbaričnu komoru i po završetku operacije ga trenutno početi liječiti.

Inhibitori 20-HETE (TS-011, HET0016) su ranije istraživani kao liječenje ili predtretman i pokazali su se učinkoviti u smanjenju volumena infarkta mozga u nedijabetičkih štakora (sa 70% smanjenjem volumena infarkta mozga, 55% smanjenjem ukupnog volumena infarkta mozga, radi manjeg učinka na subkortikalna područja) (180,182, 183). Ovi rezultati podupiru naše rezultate na dijabetičkim štakoricama, koje ranije nisu proučavane. Naime do sada nismo pronašli takva istraživanja na dijabetičkim štakorima. Naši rezultati sugeriraju da liječenje samo s HET0016 značajno reducira volumen infarkta mozga (Slika 5.6 i Slika 5.7., Paneli A, B i C). Štakori koji su primili predtretman ili liječenje s HET0016 su imali sličnu redukciju rCBF za vrijeme ishemije, ali značajno niže vrijednosti rCBF tijekom reperfuzije, u

usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 5.5.). To je sigurno podatak koji je značajan, ali daljnja istraživanja tek trebaju otkriti je li to posljedica manjeg moždanog udara s manje toksičnih produkata i manjom potrebom za reperfuzijom, direktnog učinka 20-HETE na arterijske stijenke u ishemijskom području ili nekog drugog neuroprotektivnog mehanizma.

Ovo je istraživanje također testiralo učinak zajedničke primjene HET0016 i HBO<sub>2</sub>, ali također i razlike između kombinacija HBO<sub>2</sub> s HET0016 predtretmanom i HBO<sub>2</sub> s HET0016 liječenjem tijekom i nakon t-MCAO. Po našim saznanjima takve kombinacije nisu do sada istraživane, pogotovo u uvjetima dijabetesa. Neka istraživanja su pokazala da 20-HETE može pojačati oksidativni stres u stanicama putem aktivacije reducirane nikotinamid adenin dinukleotid fosfatne oksidaze, fosforilacije, razdvajanja NOS i putem NADP oksidazno-neovisnog puta (97). Kako HBO<sub>2</sub> reducira oksidativni stres (216), može se nagađati da bi HBO<sub>2</sub> mogla povoljno djelovati na ishod moždanog udara liječenog s HET0016 (217). Nasuprot našim očekivanjima, takve kombinacije nisu doprinjele značajan aditivni učinak u smanjenju volumena infarkta mozga, u usporedbi s liječenjem samo s HET0016 (Slika 5.6 i Slika 5.7., Paneli A, B i C). Rezultati pokazuju jednako snažnu učinkovitost HBO<sub>2</sub> i 20-HETE inhibitora na veličinu konačnog infarkta mozga. Ostaje za razjasniti je li to posljedica toga da svaki od navedenih modaliteta liječenja ima najveću moguću učinkovitost, koja se kod moždanog udara tog tipa i te dužine trajanja ishemije može očekivati, pa se dodatni diskretan učinak ne može registrirati ili postoji neki drugi do sada neotkiveni razlog za navedeno.

Doprinos CYP metabolita autoregulaciji moždanog protoka krvi još uvijek nije do kraja istražena, no već je jasno da bi oni mogli imati vrlo važnu ulogu kao novi ciljevi u razvoju lijekova za liječenje moždanog oštećenja nakon ishemije (55.). Iako smo proveli analize izražaja Cyp4A3 mRNA, rezultati nisu prikazani jer je izražaj bio iznimno nizak (najviša vrijednost je bila  $2.1 \times 10^{-4}$ ), što je u skladu s podacima o vrlo niskim ili nedetektabilnim razinama Cyp4a2 i Cyp4a3 mRNA u tkivu mozga Wistar štakora, koji su objavljeni ranije (56,57). Izražaj Cyp2J3 i Cyp2C11 u ovom istraživanju potvrđuje i prijašnje rezultate i mišljenja da oni imaju važnu neuroprotektivnu ulogu (55) (Slika 5.8., Panel A, B i C). Uzimajući u obzir analizu izražaja enzima i učinke HET0016, moguće je nagađati da bi povišenje razine EET i smanjenje razine 20-HETE, farmakološki, uz dodatak HBO<sub>2</sub>, mogao biti novi put kojim bi se moglo poći u budućim istraživanjima liječenja moždanog udara.

## 7. Zaključci

U prvom dijelu istraživanju o uspostavi novog modela za istraživanje moždanog udara kod dijabetičkih štakorica SD vrste najvažniji zaključci su:

- a) dijabetičke štakorice SD vrste izrazito su osjetljive na ishemiju u t-MCAO modelu moždanog udara;
- b) 60' i 90' t-MCAO, koje se trenutno najčešće koriste u nedijabetičkih štakorica doima se preduga za dijabetičke, uzrokujući masivne moždane udare kod dijabetičkih štakorica;
- c) slabija reperfuzija registrirana je kod duljeg trajanja ishemije u 90' skupini (što se može objasniti kao rezultat već ireverzibilnog infarkta mozga s posljedičnom vaskularnom disfunkcijom). Ovaj vaskularni znak mogao bi biti znak dolaska do točke s koje više nema povratka ni oporavka u liječenju moždanog udara;
- d) 30' t-MCAO se doima adekvatnog trajanja ishemije za model moždanog udara kod dijabetičkih štakorica, pouzdano uzrokujući moždane udare srednje veličine koji zahvaćaju 30-50% ishemične hemisfere;
- e) 20' t-MCAO kod dijabetičkih štakorica uzrokuje male strijatalne moždane udare nekonzistentne veličine; i
- f) upitno je komparirati rezultate istraživanja eksperimentalne ishemije mozga štakora s dijabetesom i onih bez dijabetesa, čak i ako je trajanje t-MCAO isto.

Najvažniji zaključci drugog dijela istraživanja su:

- a) ako se primjeni rano nakon moždanog udara, HBO<sub>2</sub> (korištena jednokratno ili višekratnim izlaganjima HBO<sub>2</sub>) je izrazito učinkovita terapija moždanog udara kod dijabetičkih štakorica, čak i u prisutnosti dugotrajnog neliječenog dijabetesa;
- b) liječenje samo s HET0016 je jednako učinkovito;
- c) HET0016 (primijenjen kao liječenje ili predtretman), kombiniran s HBO<sub>2</sub> nema značajan aditivni učinak u smanjenju volumena infarkta mozga, u usporedbi s liječenjem samo s HET0016;

d) postoji značajno povišen izražaj EET-stvarajućih enzima u tkivu mozga u skupinama podvrgnutim HBO<sub>2</sub> ili HET0016 liječenju, što upućuje na to da EET doprinose smanjenju volumena infarkta mozga i

e) SD dijabetičke štakorice izrazito su osjetljive na ishemiju (podatak koji potvrđuje naše rezultate iz prvog pokusa

## 8. Sažetak

### DJELOVANJE HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA MOŽDANO ISHEMIJSKO – REPERFUZIJSKO OŠTEĆENJE U DIJABETIČKIH ŠTAKORICA

**Cilj istraživanja:** Utvrditi optimalno trajanje tranzitorne okluzije srednje moždane arterije (t-MCAO) u modelu moždanog udara kod dijabetičkih SD (Sprague Dawley) štakorica. Utvrditi učinke jednokratne i višekratne hiperbarične oksigenacije (HBO<sub>2</sub>), 20-HETE inhibicije s N-hidroksi-N'-(4-butil-2metilfenil)-formamidinom (HET0016) na ishod eksperimentalnog moždanog udara.

**Materijali i metode:** Štakorice s streptozotocinom induciranim dijabetesom tip-1 (N=25, 12 tjedana starosti, 5 skupina; N=5/skupini), su izložene različitim trajanju t-MCAO (20 minuta ('), 30', 45', 60' i 90') i reperfuziji. Kontrolna skupina štakorica bez dijabetesa (N=5) je izložena 30' t-MCAO i reperfuziji. U drugom pokusu su dijabetičke štakorice (N=42, 12 tjedana starosti, N=7/skupini), izložene t-MCAO tijekom 30' te reperfuziji, a potom podijeljene u slijedeće skupine; a) kontrolna skupina, bez liječenja; i skupine izložene; b) HBO<sub>2</sub>; c) višekratnim HBO<sub>2</sub> (prva odmah, a druga 12h nakon t-MCAO); d) HET0016 predtretmanu (1mg/kg/3 dana prije t-MCAO) kombiniranom s HBO<sub>2</sub> nakon t-MCAO; e) HET0016 liječenju (1h prije, tijekom t-MCAO te tijekom 6 sljedećih sati 1mg/kg/h); i f) HET0016 liječenju kombiniranim s HBO<sub>2</sub> nakon t-MCAO. 24h nakon reperfuzije, volumen infarkta mozga je analiziran 2,3,5-trifeniltetrazolij kloridom (TTC).

**Rezultati:** 20' t-MCAO rezultiralo je malim infarktom (3±5% ishemične hemisfere), a 30' značajno većim infarktom (46±6%). 45' i 60' ishemija su stvorile infarkte 52±5% i 59±3% ishemične hemisfere, a 90' t-MCAO masivni infarktom mozga (89±6% ishemične hemisfere (cijelog striatuma (22±3%) i skoro cijelog korteksa opskrbljenog s MCA (67±6%)). 30' t-MCAO nije rezultiralo infarktom u kontrolnoj skupini. U drugom pokusu liječenje s HET0016 i HBO<sub>2</sub> jednako su značajno smanjili kortikalni i ukupni infarkt mozga, u usporedbi s kontrolom. Kombinirano liječenje s HET0016 i HBO<sub>2</sub> nije bilo učinkovitije u usporedbi s liječenjem samo s HET0016 bez obzira na način primjene. Cyp2J3 mRNA bila je značajno izraženija u svim ispitivanim skupinama, aCyp2C11 mRNA značajno izraženija u skupinama liječenim višekratnom HBO<sub>2</sub> i HET0016 predtretman+HBO<sub>2</sub> skupini, u usporedbi s kontrolom.

**Zaključak:** Model moždanog udara kod SD dijabetičkih štakorica treba biti drugačiji nego kod nedijabetičkih, s kraćim trajanjem ishemije, optimalno na 30', radi njihove visoke senzitivnosti na ishemiju mozga. Kod dijabetičkih SD štakorica i HBO<sub>2</sub> i HET0016 izrazito su učinkoviti načini liječenja moždanog udara, što sugerira sudjelovanje CYP450 metabolita u ovom učinku.

**Ključne riječi:** okluzija srednje moždane arterije, štakori, ženski, ishemija mozga, hiperbarična oksigenacija, diabetes mellitus, 20-HETE



## 9. Summary

### **The Effect of Hyperbaric Oxygenation on Ischemic/Reperfusion Brain Injury in Diabetic Female Rats.**

**Objectives:** To determine optimal duration of transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) for stroke model in female diabetic Sprague-Dawley (SD) rats.

To evaluate effects of acute and repetitive hyperbaric oxygenation (HBO<sub>2</sub>) as well as 20-HETE inhibition by N-hydroxy-N'-(4-butyl-2methylphenyl)-formamidine (HET0016) on experimental stroke outcomes.

**Material and Methods:** 25 streptozotocin-induced type-1 diabetic SD female rats (N=25, 12 weeks old, 5 groups; N=5 per group), were subjected to different duration of t-MCAO (20 minutes ('), 30', 45', 60' and 90') followed by reperfusion. Control group of rats without diabetes (N=5) was subjected to 30' of t-MCAO followed by reperfusion. 42 streptozotocin-induced type-1 diabetic Sprague-Dawley female rats (N=42, 12 weeks old, N=7/group), were subjected to transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) for 30' followed by reperfusion and divided in following groups; a) control group, without treatment; and groups exposed to; b) HBO<sub>2</sub>; c) multiple HBO<sub>2</sub> (first HBO<sub>2</sub> immediately and second 12h after t-MCAO); d) HET0016 pretreatment (1mg/kg/3 days prior to t-MCAO) combined with HBO<sub>2</sub> after t-MCAO; e) HET0016 treatment (1h before, during and for 6 hours after t-MCAO); and f) HET0016 treatment followed by HBO<sub>2</sub> after t-MCAO. 24h after reperfusion infarct volumes were evaluated by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. mRNA expression of CYP2J3, CYP3C11 was determined by real-time qPCR.

**Results:** Intra-ischemic reductions of regional cerebral blood flow (rCBF) were similar in all groups (68%-75% of baseline values). Reperfusion was significantly impaired in 90' ischemia group (56-62% vs. 80-125% in other groups). 20' t-MCAO induced small infarct (3±5% of ischemic hemisphere). 30' ischemia produced significantly larger infarct (46±6%). In 45' and 60' ischemia infarct was 52±5% and 59±3% of ischemic hemisphere, respectively. Ischemia of 90' led to massive stroke (89±6% of ischemic hemisphere encompassing the whole striatum (22±3%) and almost the whole MCA irrigated cortex area (67±6%)). 30' t-MCAO did not produce stroke in the control group. HBO<sub>2</sub> and HET0016 treatment equally significantly reduced size brain infarct compared to control. Combined treatment with

HET0016 and HBO<sub>2</sub> provided no significant additive effect compared to HET0016 treatment only, regardless of administration method. mRNA of Cyp2J3 was significantly increased in all study groups compared to control, and mRNA of Cyp2C11 was significantly increased in multiple HBO<sub>2</sub> and HET0016 pretreatment+HBO<sub>2</sub> groups compared to control.

**Conclusion:** Diabetic rat stroke model should be different from non-diabetic, because female type-1 diabetic SD rats are highly sensitive to brain ischemia and it is necessary to significantly shorten duration of t-MCAO, optimally to 30'.

In diabetic female SD rats HBO<sub>2</sub> and HET0016 are highly effective stroke treatments, suggesting involvement of CYP450 metabolites in this therapeutic effect.

**Key words:** middle cerebral artery occlusion, rats, female, brain ischemia, hyperbaric oxygenation; diabetes mellitus; 20-HETE

## 10. LITERATURA

1. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, I sur. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45:2160–2236.
2. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003;2:43–53.
3. Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain*. 2001;124:2–4.
4. Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis*. 1999; 9:193–201.
5. Baron JC. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis*. 2001;11 (Suppl 1):2–8.
6. Baron JC. How healthy is the acutely reperfused ischemic penumbra? *Cerebrovasc Dis*. 2005;20 (Suppl 2): 25–31.
7. Baron JC. Stroke research in the modern era: images versus dogmas. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20:154–163.
8. Baron JC, Von Kummer R, Del Zoppo GJ. Treatment of acute ischemic stroke. Challenging the concept of a rigid and universal time window. *Stroke*. 1995;26:2219–2221.
9. Marchal G, Benali K, Iglesias S, Viader F, Derlon JM, Baron JC. Voxel-based mapping of irreversible ischaemic damage with PET in acute stroke. *Brain*. 1999;122:2387–2400.
10. Marchal G, Young AR, Baron JC. Early postischemic hyperperfusion: pathophysiologic insights from positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:467–482.
11. Guadagno JV, Calautti C, Baron JC. Progress in imaging stroke: emerging clinical applications. *Br. Med. Bull*. 2003;65:145-157.
12. Neumann-Haefelin T, Wittsack HJ, Wenserski F, Siebler M, Seitz RJ, Mödder U I sur. Diffusion- and perfusion-weighted MRI. The DWI/PWI mismatch region in acute stroke. *Stroke*. 1999; 30:1591-7.
13. Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, Baron JC. Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol*. 1996;40:216–226.

14. Degracia DJ. Acute and persistent protein synthesis inhibition following cerebral reperfusion. *J Neurosci Res.* 2004;77:771–776.
15. Paschen W, Mengesdorf T. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium.* 2005;38:409–415.
16. Selman WR, Lust WD, Pundik S, Zhou Y, Ratcheson RA. Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res.* 2004;999:167–174.
17. Spratt NJ, Donnan GA, McLeod DD, Howells DW. “Salvaged” stroke ischaemic penumbra shows significant injury: studies with the hypoxia tracer FMISO. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:934–943.
18. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Hermann R. Active cell death induced by the anti-estrogenstamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogen* 1996;17:1595–1607.
19. Nixon RA, Cataldo AM. The lysosomal system in neuronal death: a review. *Ann. NY Acad. Sci.* 1993;679:87–109.
20. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* 1998;274:315–327.
21. Macmanus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997;17:815–832.
22. Chen J, Zhu RL, Nakayama M. Expression of the apoptosis-effector gene, BAX, is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J. Neurochem.* 1996;67:64–71.
23. Hara A, Iwai T, Niwa M. Immunohistochemical detection of BAX and BCL-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996;711:249–253.
24. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997;20:132–139.
25. Nogawa S, Zhang F, ROSS ME, Iadecola C. Cyclooxygenase- 2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 1997;17:2746–2755.
26. Hu BR, Wieloch T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 1994;62:1357–1367.
27. Johnson CM, Hill CS, Chawla S, Treisman R, Bading H. Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKS) signaling cascade. *J. Neurosci.* 1997;17:6189–6202.

28. Pahl HL, Baeuerle PA. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays*. 1994;16:497–502.
29. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor- $\kappa$ B in forebrain neurons of rats. *Stroke* 1997;28:1073–1080.
30. Koistinaho J, Hokfelt T. Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 1997;8:1-8.
31. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996;10:709–720.
32. An G, Lin TN, Liu JS, Xue JJ, He YY, Hsu CY.. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* 1998;33:457–464.
33. Collaço-Moraes Y, Aspey BS, de Belleruche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke* 1994;25:1855–1861.
34. Honkaniemi J, Sharp FR. Global ischemia induces immediate-early genes encoding zinc finger transcription factors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:557–565.
35. Ikeda J, Nakajima T, Osborne, Mies G, Nowack TS Jr. Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Mol. Brain Res.* 1994;26:249–258.
36. Kawagoe J, Abe K, Sato S, Nagano I, Nakamura S, Kogure K. Distributions of heat shock protein-70 mRNAs and heat shock cognate protein-70 mRNAs after transient global ischemia in gerbil brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992;12:794–801.
37. Kiessling M, Stumm G, Xie Y, Herdegen T, Aguzzi A, Bravo R, Gass P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*1993;13:914–924.
38. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T. Induction of c-fos, junB, c-jun and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14:808–817.
39. Soriano MA1, Ferrer I, Rodríguez-Farré E, Planas AM. Expression of c-fos and inducible hsp-70 mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the brain. *Brain Res.* 1995;670:317–320.
40. Woodburn VL1, Hayward NJ, Poat JA, Woodruff GN, Hughes J. The effect of dizoclipine and enandoline on immediate early gene expression in the gerbil global ischemia model. *Neuropharmacology.* 1993; 32:1047–1059.
41. Dragunow M, Beilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, I sur. Immediateearly gene protein expression in neurons undergoing delayed death but not necrosis following hypoxic-ischemic injury to the young brain. *Mol Brain Res.* 1994;25:19–33.

42. Bazan NG, Allan G. Platelet-activating factor in the modulation of excitatory neurotransmitter release and of gene expression. *J Lipid Med Cell Signal*. 1997;14:321–330.
43. Deshpande J, Bergstedt K, Lindén T, Kalimo H, Wieloch T. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res*. 1992;88:91–105.
44. Magnusson K, Wieloch T. Impairment of protein ubiquitination may cause delayed neuronal death. *Neurosci. Lett*. 1989;96:264–270.
45. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. HSP70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J*. 1998;17:6124–6134.
46. Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA, Simon RP. Apoptosis repressor genes BCL-2 and BCL-X-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:2–10.
47. Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M, Kuschinsky W. Altered expression of Bcl-2 Bcl-x, Bax, and C-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Mol Brain Res*. 1996;40:254–260.
48. Kane DJ, Ord T, Anton R, Bredesen DE. Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J Neurosci Res*. 1995;40:269–275.
49. Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9893–9898.
50. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for BCL-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132–1136.
51. Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, I sur. Ischemic preconditioning and brain tolerance. Temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke*. 1998;29:1937–1951.
52. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K1 channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:4666–4670.
53. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11:299–307.
54. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, I sur. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res*. 1990;528:21–24.

55. Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1993;56:921–927.
56. Ohta S, Furuta S, Matsubara I, Kohno K, Kumon Y, Sakaki S. Calcium movement in ischemia-tolerant hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:915–922.
57. Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb. Blood Flow Metab*. 1996;16:1137–1142.
58. Furuta S, Ohta S, Hatakeyama T, Nakamura K, Sakaki S. Recovery of protein synthesis in tolerance-induced hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*. 1993;86:329–335.
59. Kato H, Kogure K, Nakano S. Neuronal damage following repeated brief ischemia in the gerbil. *Brain Res*. 1989;479: 366–370.
60. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects. *Brain Res*. 1991;553:238–242.
61. Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. Increase in Bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res*. 1994;20: 95–99.
62. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosc. Lett*. 1992;139:118–121.
63. Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:483–490.
64. Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrová J, Bazan NG, Siesjö BK. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J Neurochem*. 1993;61:1677–1684.
65. Lipton P, Whittingham TS. Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus. *J. Physiol*. 1982;325:51–65.
66. Verhaegen M, Iaizzo PA, Todd MM. A comparison of the effects of hypothermia, pentobarbital and isoflurane on cerebral energy stores at the time of ischemic depolarization. *Anesthesiology*. 1995;82:1209–1215.

67. Strijbos PJ1, Leach MJ, Garthwaite J. Vicious cycle involving Na channels, glutamate release and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. *J Neurosci.* 1996;16:5004–5013.
68. Zhang Y, Lipton P. Cytosolic Ca<sup>++</sup> changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. *J Neurosci.* 1999;19:3307–3315.
69. Kass IS, Lipton P. Calcium and long-term transmission damage following anoxia in dentate gyrus and CA1 regions of the hippocampal slice. *J Physiol.* 1986;378:313–334.
70. Kristián T, Siesjö BK. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci.* 1996;59:357–367.
71. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 1993;13:3510–3524.
72. Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *Neurosci.* 1995;15:6377–6388.
73. Kakiuchi S, Sobue DK. Control of the cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 1983;59–62.
74. Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Racagni. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.* 1994;14:2924–2932.
75. Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem.* 1996;271:5976–5979.
76. Dubinsky JM, Kristal BS, Elizondo-Fournier M. An obligate role for oxygen in the early stages of glutamate induced delayed neuronal death. *J Neurosci.* 1995;15:7071–7078.
77. Clark WM, Zivin JA. Antileukocyte therapy: preclinical trials and combination therapy. *Neurology.* 1997;49, Suppl, 4: 32–36.
78. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–257.
79. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251–306.
80. Pike BR1, Zhao X, Newcomb JK, Wang KK, Posmantur RM, Hayes RL. Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septohippocampal cultures. *J Neurosci Res.* 1998;52:505–520.



81. Clarke PG. Developmental cell death, morphological diversity, and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 1990;181: 195–213.
82. Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L. Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int Rev Cytol.* 1981;73:149–182.
83. Inamura K, Olsson Y, Siesjö BK. Substantia nigra damage induced by ischemia in hyperglycemic rats. A light and electron microscope study. *Acta Neuropathol.* 1987;75:131–139.
84. Young RJ, Smith TC, Levinson C. Regulatory volume decrease in Ehrlich ascites tumor cells is not mediated by a rise in intracellular calcium. *Biochim Biophys. Acta.* 1993;1146: 81–86.
85. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, I sur. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44:870-947.
86. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia.* 2001; 44:14–21.
87. Williams LS, Rotich J, Qi R, Fineberg N, Espay A, Bruno A, I sur. Effects of admission hyperglycemia on mortality and costs in acute ischemic stroke. *Neurology.* 2002;59:67–71.
88. Kaarisalo MM, Raiha I, Sivenius J, Immonen-Raiha P, Lehtonen A, Sarti C, i sur. Diabetes worsens the outcome of acute ischemic stroke. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69:293–8.
89. The NINDS t-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:2109–2118.
90. Demchuk AM, Morgenstern LB, Krieger DW, Linda Chi T, Hu W, Wein TH, I sur. Serum glucose level and diabetes predict tissue plasminogen activator-related intracerebral hemorrhage in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1999;30:34 –39.
91. Kent TA, Soukup VM, Fabian RH. Heterogeneity affecting outcome from acute stroke therapy: making reperfusion worse. *Stroke* 2001;32:2318-2327.
92. Kawagishi T, Matsuyoshi M, Emoto M, Taniwaki H, Kanda H, Okuno Y, i sur. Impaired endothelium dependent vascular responses of retinal and intrarenal arteries in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2509–2516.
93. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001;44:129 –146.

94. Hara K, Kong DL, Sharp FR, Weinstein PR. Effect of selective inhibition of cyclooxygenase 2 on temporary focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 1998;256:53–56.
95. Unfirer S, Kibel A, Drenjancevic-Peric I. The effect of hyperbaric oxygen therapy on blood vessel function in diabetes mellitus. *Med Hypotheses.* 2008;71:776-80.
96. Janghorbani M, Hu FB, Willett WC, Li TY, Manson JE, Logroscino G, i sur. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. *Diabetes Care.* 2007;30:1730–5.
97. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. *Diabetes Care.* 2006;29:798–804.
98. Secrest AM, Prince CT, Costacou T, Miller RG, Orchard TJ. Predictors of and survival after incident stroke in type 1 diabetes. *DiabVasc Dis Res.* 2013;1:3–10.
99. Boerema I, Meijne NG, Brummelkamp WH, Browma S, Mensch MH, Kamermans F, i sur. Life without blood: a study of the influence of high atmospheric pressure and hypothermia on dilution of blood. *J Cardiovasc Surg* 1960;1:133-146.
100. Lambertsen CJ, Kough RH, Cooper DY, Emmel GL, Loeschcke HH, Schmidt CF. Oxygen toxicity: effects in man of oxygen inhalation at 1 and 3.5 atmospheres upon blood gas transport, cerebral circulation and cerebral metabolism. *J Appl Physiol* 1953;5: 471-486.
101. Sunami K, Takeda Y, Hashimoto M, Hirakawa M: Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery. *Crit Care Med.* 2000;28:2831–6.
102. Daugherty WP, Levasseur JE, Sun D, Rockswold GL, Bullock MR: Effects of hyperbaric oxygen therapy on cerebral oxygenation and mitochondrial function following moderate lateral fluid-percussion injury in rats. *J Neurosurg.* 2004;101:499–504
103. Liu S1, Liu W, Ding W, Miyake M, Rosenberg GA, Liu KJ. Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1274-84.
104. Lombard JH, Frisbee JC, Roman RJ, Falck JR. Evaluation of cytochrome P450-4A omega-hydroxylase and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid as an O<sub>2</sub> sensing mechanism in the microcirculation. *Methods Enzymol.* 2004;381:140-65.
105. Zhu J, Drenjancevic-Peric I, Friesema J, Roman RJ, Lombard JH. High salt (HS) diet impairs vascular calcium signaling and nitric oxide production via angiotensin II (ANG II) suppression in rat aorta. *FASEB J.* 2005,19:1308.

106. Lombard JH, Drenjancevic-Peric I, Friesema J, Zhu J. Restoration of impaired NO release and endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling by low dose angiotensin II (ANG II) infusion in aortas of normotensive Dahl salt sensitive (SS) rats on low salt (LS) diet. *FASEB J.* 2005;19: 726.
107. Xu Y, Ji R, Wei R, Yin B, He F, Luo B. The efficacy of hyperbaric oxygen therapy on middle cerebral artery occlusion in animal studies: a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2016;11:e0148324.
108. Singhal AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurol Res.* 2007;29:173-83.
109. Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, Heiland S, Bieber K, Marti HH, i sur. Hyperbaric oxygen reduces blood–brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2005;36:1679-1683.
110. Hunt TH. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med.* 1988;17:1265-73.
111. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981;90:262-70.
112. Chuba PJ, Aronin P, Bhambhani K, Eichenhorn M, Zamarano L, Cianci P, I sur. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced brain injury in children. *Cancer.*1997;80:2005–2012.
113. Zamboni WA, Roth AC, Russel RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphological analysis of the microcirculation during reperfusion of ischaemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic Reconstructr surg* 1993;91:1110-23.
114. Singhal AB, Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA: Advances in stroke neuroprotection: hyperoxia and beyond. *Neuroimaging Clin N Am.* 2005;15:697–720.
115. Zhang JH, Lo T, Mychaskiw G, Colohan A: Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology.* 2005;12:63–77.
116. Helms AK, Whelan HT, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2005 20:417–26.
117. Schäbitz WR, Schade H, Heiland S, Kollmar R, Bardutzky J, Henninger N, I sur. Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke* 2004;35:1175–9.
118. Eschenfelder CC, Krug R, Yusofi AF, Meyne JK, Herdegen T, Koch A, I sur. Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25:193-201.
119. Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH. Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280:766–70.

120. Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke*. 2004;35:578–83.
121. Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia–ischemia rat model. *J Appl Physiol*. 2003;95:2072–2080.
122. Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, Nanda A, Zhang JH. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model, *J. Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:855–864.
123. Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH. Multiple effects of HBO on HIF1 $\alpha$  expression and apoptotic genes in global ischemia rat model. *Exp Neurol*. 2005;191:198–210.
124. Taketomi M, Kinoshita N, Kimura K, Kitada M, Noda T, Asou H, Nakamura T, Ide C. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci Lett*. 2002;332:37–40.
125. Thallmair M, Metz GA, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*. 1998;1:124–131.
126. Zhou C, Li Y, Nanda A, Zhang JH. HBO suppresses Nogo- A, Ng-R, or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309:368–376.
127. Hjelde A, Hjelstuen M, Haraldseth O, Martin D, Thom R, Brubakk O. Hyperbaric oxygen and neutrophil accumulation/tissue damage during permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Eur J Appl Physiol* 2002;86:401–5.
128. Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, Rosenthal RE: Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res*. 2003;971:90–4.
129. Del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:879–894.
130. Witt KA, Mark KS, Hom S, Davis TP. Effects of hypoxia-reoxygenation
131. on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:2820–2831.
132. Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:1485–1494.
133. Tagaya M, Haring HP, Stuiver I, Wagner S, Abumiya T, Lucero J, I sur. Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:835– 846.

134. Hamann GF, Okady Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995;26:2120–2126.
135. Hamann GF, Liebetrau M, Martens H, Burggraf D, Kloss CUA, Pfefferkorn T, I sur. Microvascular basal lamina injury following experimental focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:526–533.
136. Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction: possible mechanisms. *Thromb Haemost*. 1999; 82(suppl):92–94.
137. Del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:1–9.
138. Nighoghossian N, Trouillas P. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue. *J Neurol Sci*. 1997;150:27–31.
139. Bennett MH, Wasiaik J, Schnabel A, Kranke P, French C. Hyperbaric oxygen therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(3): doi:10.1002/14651858.CD004954.pub3.
140. Alonso-Galicia M, Hudetz AG, Shen H, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*. 1999;30:2727-34.
141. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989;320:365- 376.
142. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model, *Brain Res*. 2002;926:165– 171.
143. Iadecola C, M. Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr. Opin. Neurol*. 2001;14:89–94.
144. Niimi, H. Cerebral angiogenesis induced by growth factors: intravital microscopic studies using models. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003;29,149–156.
145. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005;65,550–563.
146. Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg*. 2000;135:1293-7.
147. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005;2:396–409.
148. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1989;20:1037-1043.

149. Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med.* 2008;216:117-126.
150. Fan X, Qiu J, Yu Z, Dai H, Singhal AB, Lo EH, I sur. A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes. *Stroke.* 2012;43:567-70.
151. Ning R, Chopp M, Yan T, Zacharek A, Zhang C, Roberts C, I sur. Tissue plasminogen activator treatment of stroke in type-1 diabetes rats. *Neuroscience.* 2012;222:326-32.
152. Elgebaly MM, Oghi S, Li W, Mezzetti EM, Prakash R, Johnson MH I sur. Neurovascular injury in acute hyperglycemia and diabetes: A comparative analysis in experimental stroke. *Transl Stroke Res.* 2011;2:391-8.
153. Chen J, Ye X, Yan T, Zhang C, Yang XP, Cui X, I sur. Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats. *Stroke.* 2011;42:3551-8.
154. Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN. Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:2442-51.
155. Ye X, Yan T, Chopp M, Zacharek A, Ning R, Venkat P, I sur. BMSC and Niaspan treatment of stroke enhances white matter remodeling and synaptic protein expression in diabetic rats. *Int J Mol Sci.* 2013;14:22221-32.
156. Ye X, Chopp M, Liu X, Zacharek A, Cui X, Yan T, I sur. Niaspan reduces high-mobility group box 1/receptor for advanced glycationendproducts after stroke in type-1 diabetic rats. *Neuroscience.* 2011;190:339-45.
157. Ye X, Chopp M, Cui X, Zacharek A, Cui Y, Yan T, I sur. Niaspan enhances vascular remodeling after stroke in type 1 diabetic rats. *Exp Neurol.* 2011;232:299-308.
158. Simard JM, Yurovsky V, Tsymbalyuk N, Melnichenko L, Ivanova S, Gerzanich V. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40:604-9.
159. Toung TK, Hurn PD, Traystman RJ, Sieber FE. Estrogen decreases infarct size after temporary focal ischemia in a genetic model of type 1 diabetes mellitus. *Stroke.* 2000;31:2701-6.
160. Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke.* 2003;34:2019-2024.
161. Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 2001;109:147-151.

162. Garcia JH, Liu KF, Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*. 1995;26:636–642.
163. Takagi K, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Local hemodynamic changes during transient middle cerebral artery occlusion and recirculation in the rat: a [<sup>14</sup>C]iodoantipyrine autoradiographic study. *Brain Res*. 1995;691:160–168.
164. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Verdi AA, i sur. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22: 60–64.
165. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*. 2007;125:451–472.
166. Secrest AM, Prince CT, Costacou T, Miller RG, Orchard TJ. Predictors of and survival after incident stroke in type 1 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;1:3–10.
167. Dittmar MS, Vatankhah B, Fehm NP, Schuierer G, Bogdahn U, Horn M, I sur. Fisher-344 rats are unsuitable for MCAO filament model due to their cerebrovascular anatomy. *J Neurosci Methods*. 2006;156:50-4.
168. Pilitsis JG, Coplin WM, O'Regan MH, Wellwood JM, Diaz FG, Fairfax MR, i sur. Measurement of free fatty acids in cerebrospinal fluid from patients with hemorrhagic and ischemic stroke. *Brain Res*. 2003;985:198–201.
169. Gebremedhin D, Zhang DX, Carver KA, Rau N, Rarick KR, Roman RJ, Harder DR. Expression of CYP 4A  $\omega$ -hydroxylase and formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in cultured rat brain astrocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2016;124:16-26.
170. Dunn KM, Renic M, Flasch AK, Harder DR, Falck J, Roman RJ. Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:2455-65.
171. Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase. *C. J BiolChem*. 1997;272:27345–52.
172. Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan J, Jefcoat C, Falck JR, Campbell WB, i sur. Formation and action of a P-450 4A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol*. 1994;266:2098–107.
173. Gebremedhin D, Lange AR, Narayanan J, Aebly MR, Jacobs ER, Harder DR. Cat cerebral arterial smooth muscle cells express cytochrome P450 4A2 enzyme and produce the vasoconstrictor 20-HETE which enhances L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Physiol*. 1998; 507:771–81.

174. Medhora M, Chen Y, Gruenloh S, Harland D, Bodiga S, Zielonka J, i sur. 20-HETE increases superoxide production and activates NADPH oxidase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:902–11.
175. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002;82:131–185.
176. Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol*. 1998;275:370–378.
177. Kehl F, Cambj-Sapunar L, Maier KG, Miyata N, Kametani S, Okamoto H, i sur. 20-HETE contributes to the acute fall in cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:1556–1565.
178. Poloyac SM, Reynolds RB, Yonas H, Kerr ME. Identification and quantification of the hydroxyeicosatetraenoic acids, 20-HETE and 12-HETE, in the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*. 2005;144:257–263.
179. Tanaka Y, Omura T, Fukasawa M, Horiuchi N, Miyata N, Minagawa T, i sur. Continuous inhibition of 20-HETE synthesis by TS011 improves neurological and functional outcomes after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Research*. 2007;59:4:475-480.
180. Crago EA1, Thampatty BP, Sherwood PR, Kuo CW, Bender C, Balzer J, i sur. CSF 20-HETE is associated with delayed cerebral ischemia and poor outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2011;42:1872-1877.
181. Renic M, Klaus JA, Omura T, Kawashima N, Onishi M, Miyata N, i sur. Effect of 20-HETE inhibition on infarct volume and cerebral blood flow after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(3):629-39.
182. Miyata N, Taniguchi K, Seki T, Ishimoto T, Sato-Watanabe M, Yasuda Y, i sur. HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br J Pharmacol*. 2001;133:325–9.
183. Omura T, Tanaka Y, Miyata N, Koizumi C, Sakurai T, Fukasawa M, i sur. Effect of a new inhibitor of the synthesis of 20-HETE on cerebral ischemia reperfusion injury. *Stroke*. 2006;37:1307-1313.
184. Poloyac SM1, Zhang Y, Bies RR, Kochanek PM, Graham SH. Protective effect of the 20-HETE inhibitor HET0016 on brain damage after temporary focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006. 26(12):1551-1561.)
185. Tanaka Y, Omura T, Fukasawa M, Horiuchi N, Miyata N, Minagawa T, i sur. Continuous inhibition of 20-HETE synthesis by TS-011 improves neurological and functional outcomes after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Research*. 2007; 59;4; 475-480.



186. Miyata N, Seki T, Tanaka Y, Omura T, Taniguchi K, Doi M, i sur. Beneficial effects of a new 20-HETE synthesis inhibitor, TS-011, on hemorrhagic and ischemic stroke. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:77– 85.
187. Iliff JJ, Wang R, Zeldin DC, Alkayed NJ. Epoxyeicosanoids as mediators of neurogenic vasodilation in cerebral vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:1352-1363.
188. Qu YY, Yuan MY, Liu Y, Xiao XJ, Zhu YL. The protective effect of epoxyeicosatrienoic acids on cerebral ischemia/reperfusion injury is associated with PI3K/Akt pathway and ATP-sensitive potassium channels. *Neurochem Res.* 2015;40:1-14.
189. Zuloaga KL, Krasnow SM, Zhu X, Zhang W, Jouihan SA, Shangraw RE, Alkayed NJ, Marks DL. Mechanism of protection by soluble epoxide hydrolase inhibition in type 2 diabetic stroke. *PLoS One.* 2014;;9(5):e97529. doi:10.1371/journal.pone.0097529.
190. Zuloaga KL, Zhang W, Roese NE, Alkayed NJ. Soluble epoxide hydrolase gene deletion improves blood flow and reduces infarct size after cerebral ischemia in reproductively senescent female mice. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 290. Published online 2015 Jan 15. doi: 10.3389/fphar.2014.00290
191. Kibel A, Novak S, Ćosić A, Mihaljević Z, Falck JR, Drenjančević I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats - potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res.* 2015;12:33-45.
192. Mišir M, Renic M, Mihalj M, Novak S, Drenjančević I. Is shorter middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) duration better in stroke experiments on diabetic female Sprague Dawley rats? *Brain injury.* Accepted for publication on 07 May 2016.
193. Zhang PB, Liu Y. Effects of ketamine-midazolam anesthesia on focal cerebral ischemic injury in rats. *J First Mil Med Univ.* 2004;12:1337-41.
194. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I.: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.*1986;8:1-8.
195. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91.
196. Zhang JH. Editorial: hyperbaric oxygen in neurological diseases. *Neurological Research.* 2007;29(2):113–115.
197. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17:1304–8.

198. Drenjancevic-Peric I, Greene AS, Kunert MP, Lombard JH. Arteriolar Responses to Vasodilator Stimuli and Elevated PO<sub>2</sub> in Renin Congenic and Dahl S Hypertensive Rats. *Microcirculation*. 2004;11:669-677.
199. Tsuruta R., Fujita M., Ono T., Koda Y, Koga Y, Yamamoto T, i sur. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Research*. 2010;1309:155–163.
200. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005;3: 396–409.
201. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108:949-55.
202. Melton JE, Nattie EE. Intracranial volume adjustments and cerebrospinal fluid pressure in the osmotically swollen rat brain. *Am J Physiol*. 1984;246:533–541.
203. Adams HP, Jr, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, i sur. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups. *Stroke*. 2007;38:1655–1711
204. del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, Adams HP Jr; on behalf of the American Heart Association Stroke Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2009;40:2945–2948.
205. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke*. 1993;24:35-41.
206. Brott T, Marler JR, Olinger CP, Adams HP Jr, Tomsick T, Barsan WG, i sur. Measurements of acute cerebral infarction: lesion size by computed tomography. *Stroke*. 1989;20:871–875.
207. Nopoulos P, Flaum M, O’Leary D, Andreasen NC. Sexual dimorphism in the human brain: evaluation of tissue volume, tissue composition and surface anatomy using magnetic resonance imaging. *Psychiatry Res*. 2000;98:1–13.
208. Oppenheim C, Samson Y, Manaï R, Lalam T, Vandamme X, Crozier S, i sur. Prediction of malignant middle cerebral artery infarction by diffusion-weighted imaging. *Stroke*. 2000;31: 2175–2181.

209. Mori K, Aoki A, Yamamoto T, Horinaka N, Maeda M. Aggressive decompressive surgery in patients with massive hemispheric embolic cerebral infarction associated with severe brain swelling. *Acta Neurochir.* 2001;143:483–491.
210. Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke.* 1998;29: 159–166.
211. Toung TJK, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke.* 1998;29:1666 –1670.
212. Rusa R, Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus JA, Hurn PD. 17 $\beta$ -Estradiol reduces stroke injury in estrogen deficient female animals. *Stroke.* 1999;30:1665–1670.
213. Toung TK, Hurn PD, Traystman RJ, Sieber FE, Faraci FM. Estrogen decreases infarct size after temporary focal ischemia in a genetic model of type 1 diabetes mellitus. *Stroke.* 2000;31:2701-2706.
214. Secrli jest AM, Prince CT, Costacou T, Miller RG, Orchard TJ. Predictors of and survival after incident stroke in type 1 diabetes. *DiabVasc Dis Res.* 2013;1:3–10.
215. Yin D, Zhang JH. Delayed and multiple hyperbaric oxygen treatments expand therapeutic window in rat focal cerebral ischemic model. *Neurocrit Care.* 2005;2(2):206-11
216. Omura T, Tanaka Y, Miyata N, Koizumi C, Sakurai T, Fukasawa M, i sur. Effect of a new inhibitor of the synthesis of 20-HETE on cerebral ischemia reperfusion injury. *Stroke.* 2006;37:1307–13.
217. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E. The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study. *BMC Pediatrics.* 2007;7:36.
218. Li J, Liu W, Ding S, Xu W, Guan Y, Zhang JH, i sur. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res.* 2008;1210:223-9.

## 11. ŽIVOTOPIS

### MIHAEL MIŠIR, dr. med.

Specijalist neurologije

Klinika za neurologiju

Klinički bolnički centar Osijek

Josipa Huttlera 4

31000 Osijek, Republika Hrvatska

Tel+38531512377, mob. +38598669948

Email: mihaelmisir@net.hr

#### Osobni podaci:

---

- Datum rođenja: 20.10.1977.
- Oženjen, otac četvero djece

#### Obrazovanje:

---

- 1-7. Razred - Osnovna škola Višnjevac, Osijek. Osmi razred završio u školi Steinbrunn, Burgenland, Austria, 1991. godine
- 1992 – 1996. Prirodoslovno matematička gimnazija, Osijek, Hrvatska
- 1996 – 2002. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska (doktor medicine, 15.srpnja 2002. godine)
- 2002- 2003. Pripravnički staž pri ustanovi za Hitnu medicinsku pomoć, Osijek, Hrvatska
- 2004 -2008. Stručni poslijediplomski studij iz neurologije pri KBC Zagreb i Specijalizacija iz neurologije, pri Klinici za neurologiju, KBC Osijek, Hrvatska
- Specijalistički ispit 20.5.2008. (specijalist neurologije)

- Tečaj “Writing a Research Paper”, HIT – Conference, Šesti međunarodni simpozij, Cavtat, Hrvatska, 9. – 13. listopada 2003.
- Obojeni dopler u ispitivanju ekstrakranijske moždane cirkulacije, 2006. godine. Klinička bolnica Sestre Milosrdnice, Zagreb, Hrvatska.
- Transkranijski obojeni dopler, 2006 godine. Klinička bolnica Sestre Milosrdnice, Zagreb, Hrvatska.
- Asistent na Medicinskom fakultetu od 6.veljače 2013. godine (naslovno suradničko zvanje asistenta u Katedri za neurologiju Medicinskog fakulteta Osijek, za znanstveno područje biomedicine i zdravstva, znanstveno polje Kliničke medicinske znanosti, za znanstvenu granu Neurologija).

#### **Radno iskustvo:**

---

- Radim kao liječnik na Jedinici za intenzivno liječenje, Klinike za neurologiju, KBC Osijek
- U praksi također redovito radim u:
  - laboratoriju za ultrazvučnu dijagnostiku Klinike za neurologiju, od 2006. (Transkranijalni obojeni dopler, Obojeni dopler karotidnih i vertebralnih arterija (TCD, CDFI)
  - Redovito radim i elektromioneurografiju od 2008. godine u laboratoriju za elektrofiziologiju.

#### **Radovi citirani u CC-u:**

---

1. Bašić Kes V., Zavoreo I., Vargek-Solter V., Aleksić Shihabi A., Benčina B., Božić J., Budinčević H., Malojčić B, Mišir M. And al. Quantitative and qualitative evaluation tool in planning stroke treatment strategies: the “Safe implementation of treatments in stroke Monitoring Study (SITS MOST)” registry. Acta Neurologica Belgica. 2014;114:95-106.

2. Krpan T, Faj D, Brnić Z, Baraban V, Mišir M. Patient radiation doses during coronary interventions in four Croatian hospitals: 4-y comparison. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015;165(1-4):259-62.
3. Misir Mihael et al. Is shorter transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) duration better in stroke experiments on diabetic female Sprague Dawely rats? *Brain Injury*. Accepted for publication on 07.05.2016.

#### **Sažeci citirani u CCu:**

1. Mihael, Misir, Renic, Marija, Koller Ákos, Drenjancevic, Ines. Possible mechanisms of Neuroprotection by Hyperbaric Oxygen Treatment: Effects on Vascular and Neural Tissues. Abstracts of FAME 2011. *Acta physiologica*. 2011;202:684.
2. Janculjak D, Vladetic M, Misir M, Palic R, Stenc Bradvica I. Cognitive impairment in ischemic stroke patients after recovery of neurological deficit. *Knjiga sažetaka 14 kongresa Europske federacije neuroloških društava u Genevi 2010*, *Eur J Neurol*. 2010;17(suppl 3):173.
3. R. Palić Kramarić, T. Gilman-Kuric, B. Radanovic, M. Misir. A case report: Neurorehabilitation results in a patient suffering from a „/INS;lock-in/INS; syndrome. Abstracts of the XXI World Congress of Neurology. *Journal of neurological sciences*, 2013;333(Suppl 1):555.

#### **Stručni radovi u drugim časopisima:**

1. Tomislav Baudoin, Livije Kalogjera, Vladimir Bedeković, Petar Drviš and Mihael Mišir “Infectious Diseases as an Emergency at an Ear-Nose-Throat Pediatric Devision “, *Acta Clinica Croatica*, 2001;40:281-285.
2. Pismo uredniku: “Acta Dermatovenerologica Croatica: Priority on Reporting on New Epidemic”, Mihael Mišir, *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 2003;11(3):199-200.
3. Krpan AM, Juretić A, Boban M, Omrcen T, Paladino J, Hajnsek S, Zarković K, Rados M, Pavlovic-Ruzić I, Rakusić Z, Radić J, Erić S, Misir M, Forenpoher G, Dolić K. Clinical Guidelines for Diagnosing, Treating and Monitoring of Adulr Patients with Gliomas of Central Nervous System. *Lijec Vjesn*. 2015;137(11-12):343-7.

4. Ljiljana Perić, Danijel Šimašek, Tatjana Vilibić-Čavlek, Mihael Mišir, Nikica Perić. Clinical aspects of West Nile virus infections in humans in Croatia. Medical Sciences, 39 (2013) : 81-88.

#### **Sažeci objavljeni u drugim časopisima:**

---

1. Janculjak D, Vladetic M, Misir M, Palic R, Palic J. Cognitive dysfunctions after ischemic stroke with transient neurological deficit. Abstracts of the 40th International Danube Neurology Symposium (Sinaia, Romania, 21-24. May, 2008., Roman J Neurol 2008;7:S46-S47).
2. Pozvano predavanje: Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradžiković, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs3. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of The Physiological Societies : abstracts ; Znanstveni sažetak objavljen u; Periodicum Biologorum 115 (2013) (S2)
3. Sažetak: "AIDS in Biomedical Journals in Croatia", Mihael Mišir, Acta Dermatovenerologica Croatica, 2003;11(1):42.
4. Sažetak: Kadojić, D., Dikanović, M., Palić, R., Mišir, M., Kadojić, M., Čandrlić, M., Buljan, K. Short Term Outcome of different stroke subtypes compared. Acta Clinica Croatica (0353-9474) 43 (2004), suppl 1; 173-4
5. Sažetak: Pozvano predavanje: Mihael Mišir. "AIDS in Biomedical Journals in Croatia", ÖGDV – Jahrestagung (Österreichische Gesellschaft für Dermatologie und Venerologie), godišnja skupština Austrijskog društva za dermatologiju i venerologiju, Graz 21. – 23. studenoga 2003. Sažetak predavanja objavljen u knjizi sažetaka "ÖGDV – Jahrestagung, 21. – 23. November 2003., Grazer Congress".
6. Poster oral presentation and summery published. Štenc Bradvica I, Jančuljak D, Mišir M, Hanižjar Berlančić J, Jurić S. Color Doppler Flow Imaging in following up Takayasu arteritis; a case report. Zbornik radova 3. hrvatskog kongresa iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije sa međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 19(22.5.2010, Neurol Croat 2010;59 (Suppl 1): 114(5.9)
7. Kongresno priopćenje i sažetak: Jančuljak, Davor; Palić, Ružica; Buljan, Krunoslav; Štenc Bradvica, Ivanka; Hanižjar Berlančić, Jasna; Mišir, Mihael. Klinička i ultrasonografska obilježja u bolesnika s presavinućem(kinking) unutarnje karotidne

- arterije (Clinical and ultrasonographic features in patients with internal carotid kinking). III. kongres Hrvatskog društva za neurovaskularne poremećaje Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za prevenciju moždanog udara, Zagreb, 18-21.10.2006). Liječnički Vjesnik (1330-4917) 128 (2006), Suplement 6; 54.
8. Sažetak: I usmeno izlaganje postera: oral presentation. Mihael Misir, D. Czersky-Hafner, A. Vceva, and B. Kristek. Late recognition of Tapia's syndrome following oro-tracheal intubation leads to poor recovery. International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health. Special Issue on Controversies in Neurology. From the 10th World Congress on Controversies in Neurology (CONy), Lisbon, Portugal. 17–20 March 2016. 2016; 3(Suppl. 1):P119. International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health, open access journal. And published in congress book of abstracts.
  8. Poster publiciran u knjizi sažetaka. Janculjak Davor, Vladetić Mirjana, Palić Jozef, Misir Mihael, Palić Ruzica. Profile of cognitive functions in ischemic stroke patients with transient neurological deficit. Presented at the 3rd biannual meeting of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders, San Antonio, TX, USA.
  9. Poster i sažetak: Kadojić, Dragutin; Dikanović, Marinko; Palić, Ružica; Mišir, Mihael; Kadojić, Mira; Čandrlić, Marija; Buljan, Krunoslav. Kratkoročni ishod moždanog udara . Prvi hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem. Medicinski vjesnik 2004 ; suppl.1.
  10. Predavanje i objavljen sažetak: Kadojić, Dragutin; Dikanović, Marinko; Palić, R; M. Mišir, D; Kadojić, Mira. Outcome comparison of different stroke-subtypes. Neurologia Croatica 2004 ; 53(suppl.1). 44th International Neuropsychiatric Pula Symposium
  11. Poster i sažetak: Kadojić, Dragutin; Palić, R.; Mišir, M.; Dikanović, Marinko; Kadojić, Mira. Outcome in Different Stroke Subtypes in Eastern Croatia. Abstracts of the 36th International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education. International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education (36 ; 2004). Neurologia Croatica (0353-8842) 53 (2004) S1 127-128.
  12. Poster i sažetak: Kadojić, Dragutin; Dikanović, Marinko; Palić R; Mišir, M; Kadojić, Mira; Čandrlić, Marija; Buljan, Krunoslav. Usporedba kratkoročnog ishoda različitih podtipova moždanog udara ( Short-term outcome of different stroke subtypes compared ). Zbornik radova: Acta Clinica Croatica 2004 ; 43(suppl.1) / Demarin, Vida



- ; Trkanjec, Zlatko ; Vuković, Vlasta (ur.). Drugi kongres Hrvatskog društva za neurovaskularne poremećaje Hrvatskog liječničkog zbora s međunarodnim sudjelovanjem.
13. Poster: Hegeduš I, Buljan K, Radanović B, Mišir M, Vukašinović D, Berlančić JH, Czerny haffner D, Šarić J. Follow-up of patients with venous sinus thrombosis and inner ear infection. 4. hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem. Osijek, Hrvatska. 7-10.4.2013. Neurologia Croatica, Vol 62, Suppl.1, 2013.
  14. Poster: Palić-Kramarić R, Gilman-Kuric T, Radanović B, Mišir M. Prikaz slučaja: rezultat neurorehabilitacije u pacijentice sa „lock-in“ sindromom. 4. hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem. Osijek, Hrvatska. 7-10.4.2013. Neurologia Croatica, Vol 62, Suppl.1, 2013.
  15. Poster : Radanović B., Mišir M., Čubra M., Petek M., Jurić S., Kralik K. Tromboliza u liječenju akutnog ishemijskog moždanog udara na Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek – prikaz rezultata. Neurologia croatica. Vol 62, Supl. 1, 2013. 4. hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem. Osijek, Hrvatska. 7-10.4.2013. Neurologia Croatica, Vol 62, Suppl.1, 2013.
  16. Poster i oralna prezentacija: M. Mišir i sur.:Predviđanje hemoragičnih komplikacija trombolitičke terapije. Dileme u neurologiji. II Hrvatski kongres “Dileme u neurologiji” i II Hrvatski kongres iz intenzivne neurologije, 03-07. listopada 2010. Novigrad. Hrvatska. Sažeci, Neurologia croatica. 2010.
  17. Mirko Porobic, Radanović Branko, Mišir Mihael, Hanižjar Berlančić Jasna, Hegeduš Ivana, Butković Soldo Silva. Thrombolytic Therapy at Osijek University Hospital. Neurologia Croatica, 2010. Vol.59, Supl.3, In proceeding of: 2nd Croatian Congress on Dilemmas in Neurology with International Participation, at Novigrad, Croatia.
  18. Kongresno pozvano predavanje i sažetak u knjizi sažetaka. ISHOP3 2015. Mišir Mihael. Is stroke outcome after thrombolysis affected by blood pressure oscillations – Osijek clinical centre results. Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 2014. (invited talk, international peer-review, abstract, scientific).
  19. Pozvano predavanje održano, a sažetak objavljen u zborniku skupa: Drenjancevic, Ines; Unfirer, Sanela; Hegeduš, Ivana; Mišir, Mihael. Shift in arachidonic acid metabolites production underlies cerebrovascular reactivity to changes in pO2 and hyperoxygenation. 65th SIF National Congress Anacapri, Italija, 28.-30.9.2014.

Published in abstract book: Abstract from the "65th SIF National Congress:  
Programme & Abstracts" ISBN: 9788894010503

20. Pozvano predavanje: Mihael Mišir. Kasno prepoznavanje Tapia sindroma nakon orotrahealne intubacije dovodi do slabijeg oporavka. 5. Hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem, 11.-14. Studenoga 2015. Objavljen sažetak u Neurologia Croatica. Vol 64, Supl.2, 48, 2015.

### **Sudjelovanja na kongresima, radovi u drugim časopisima:**

Od završetka medicinskog fakulteta aktivno sam sudjelovao u brojnim tečajevima, znanstvenim i stručnim skupovima u zemlji i inozemstvu.

### **Predavanja:**

1. Pozvano predavanje na međunarodnom simpoziju: Mihael Mišir: "AIDS in Biomedical Journals in Croatia", International Symposium: "Veneral Diseases: Realities and Taboos", Zagreb, HAZU, 28. svibnja 2003.
2. Pozvano predavanje: Mihael Mišir. "AIDS in Biomedical Journals in Croatia", ÖGDV – Jahrestagung (Österreichische Gesellschaft für Dermatologie und Venerologie), godišnja skupština Austrijskog društva za dermatologiju i venerologiju, Graz 21. – 23. studenoga 2003.
3. Pozvano predavanje: FAME. Pecs. Mihael, Misir, Renic, Marija, Koller Ákos, Drenjancevic, Ines. Possible mechanisms of Neuroprotection by Hyperbaric Oxygen Treatment: Effects on Vascular and Neural Tissues. Abstracts of FAME 2011 ; u: Acta physiologica 202 2011 (S684).
4. Pozvano predavanje i sažetak objavljen u knjizi sažetaka: Misir Mihael, Renic Marija, Martina Mihalj, Novak Sanja, Drenjancevic Ines. A New Model of Stroke in Type-1 Diabetic Rats. Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference. Recoop HST association. 16-19. April 2015. Wroclaw, Poland. ISBN 978-963-12-2210-4. (invited talk, international peer-review, abstract, scientific).
5. Kongresno pozvano predavanje i sažetak u knjizi sažetaka. ISHOP3 2015. Mišir Mihael. Is stroke outcome after thrombolysis affected by blood pressure oscillations – Osijek clinical centre results. Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 2014. (invited talk, international peer-review, abstract, scientific).

6. Predavanje: Mihael Mišir. Marcus Gunn (jaw-winking) sindrom, prikaz slučaja. Program stalnog medicinskog usavršavanja I. Kategorije- Rijetke bolesti u neurologiji, Osijek, 26-27. Veljače 2016. .
7. Pozvano predavanje održano, a sažetak objavljen u zborniku skupa: Drenjancevic, Ines; Unfirer, Sanela; Hegeduš, Ivana; Mišir, Mihael. Shift in arachidonic acid metabolites production underlies cerebrovascular reactivity to changes in pO<sub>2</sub> and hyperoxygenation. 65th SIF National Congress Anacapri, Italija, 28.-30-9.2014. Published in abstract book: Abstract from the "65th SIF National Congress: Programme & Abstracts" ISBN: 9788894010503
8. Pozvano predavanje: Mihael Mišir. Kasno prepoznavanje Tapia sindroma nakon orotrahealne intubacije dovodi do slabijeg oporavka. 5. Hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem, 11.-14. Studenoga 2015. Objavljen sažetak u Neurologia Croatica. Vol 64, Supl.2, 48, 2015.
9. Predavanje: Mišir Mihael. Liječenje disfagije nakon moždanog udara – Zapostavljeno područje. Poslijediplomski tečaj trajne naobrazbe I. Kategorije. Disfagije, Osijek 10. Travnja 2015.
10. Predavanje: Mihael Mišir. OD kod traume mozga ili moždanog udara. Na međunarodnom tečaju I. kategorije trajne medicinske izobrazbe: Orofaringealna disfagija - dijagnostika i liječenje. 20. i 21. svibanj 2016, Slavonski brod.

#### **Sudjelovanje u studijama istraživanja lijekova:**

CARE-MS (monoklonska antitijela u liječenju multiple skleroze),  
CAMMS (monoklonska antitijela u liječenju multiple skleroze),  
SITS MOST (safe implementation of thrombolysis in stroke),  
Apex 11-019 (antikoagulantna terapija u prevenciji tromboembolije).

#### **Sudjelovanje u znanstvenim projektima:**

1. Bio sam suradnik na znanstvenom projektu: “Istraživanje patofiziologije i terapijskih postupaka kod kroničnog rinosinuitisa”, Klinika za ORL i cervikofacijalnu kirurgiju KB “Sestre Milosrdnice”, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

2. Bio sam suradnik na znanstvenom projektu Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, pod nazivom "Ikonografija u medicini", istraživanje o povijesti AIDS-a u Hrvatskoj, Katedra za povijest medicine.

**Članstvo u strukovnim organizacijama:**

---

Hrvatska liječnička komora, Hrvatsko katoličko liječničko društvo, Hrvatsko društvo za neurorehabilitaciju i restauracijsku neurologiju, Hrvatsko neurološko društvo