

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Robert Paweł Ostrowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

I. Dyplom lekarza medycyny, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie, 1994r.

II. Stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, 2001r; tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ koenzymu Q₁₀ na obraz niedokrwienia w mózgowiu szczura spowodowanego podaniem endotelin.”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

I. 1995-2000 Zakład Neuropatologii Instytutu-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Stanowisko: asystent.

II. 2000-2003 Pracownia Doświadczalnej Medycyny Nuklearnej ICMDiK PAN. Stanowisko: st. asystent; 2004-2006: urlop bezpłatny.

III. 2003-2004 Zakład Neurochirurgii Ośrodka Nauk Medycznych Uniwersytetu Stanowego Luizjany, USA. Stanowisko: *postdoctoral fellow*.

IV. 2004-2011 Zakład Fizjologii i Farmakologii Uniwersytetu Loma Linda w Kalifornii, USA Stanowiska: od 2004r. do 2008r. *postdoctoral fellow* a następnie od 2009r. do 2011r *assistant research professor*.

V. 2012 - obecnie, Zakład Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN. Stanowisko: adiunkt.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Monotematyczny cykl publikacji zatytułowany:

„Mechanizmy neuroprotekcynowego działania tlenu hiperbarycznego w doświadczalnych modelach krwotoku podpajęczynówkowego, udaru niedokrwiennego oraz urazu chirurgicznego mózgu”.

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem **7 prac naukowych**, w tym **6 prac oryginalnych**, opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* o sumarycznym współczynniku oddziaływania

IF_{HSum}=28.149, punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego=153 i liczbie cytowań=223 oraz 1 pracy przeglądowej w czasopiśmie nieindeksowanym.

b) monotematyczny cykl publikacji zawiera następujące publikacje naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, współczynnik wpływu „impact factor” IF oraz punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - MNiSW):

- H1. **Ostrowski R.P.**, Colohan A.R.T., Zhang J.H., 2005, “Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25, 554-571. (*praca oryginalna*)
IF 2005: 4.786; punkty MNiSW: 24.
- H2. **Ostrowski R.P.**, Tang J., Zhang J.H., 2006, „Hyperbaric oxygen suppresses NADPH oxidase in a rat subarachnoid hemorrhage model.” *Stroke* 37, 1314-1318. (*praca oryginalna*)
IF 2006: 5.391; punkty MNiSW: 24.
- H3. Jadhav V., **Ostrowski R.P.**, Tong W., Matus B., Jesunathadas R., Zhang J.H., 2009, “Cyclo-Oxygenase-2 Mediates Hyperbaric Oxygen Preconditioning-Induced Neuroprotection in the Mouse Model of Surgical Brain Injury.” *Stroke* 40, 3139-3142. (*praca oryginalna*)
IF 2009: 7.041; punkty MNiSW: 32.
- H4. **Ostrowski R.P.**, Jadhav V., Chen W., Zhang J.H., 2010, “Reduced matrix metalloproteinase-9 activity and cell death after global ischemia in the brain preconditioned with hyperbaric oxygen.” *Acta Neurochirurgica Suppl.*, 106, 47-49. (*praca oryginalna*)
Punkty MNiSW: 8.
- H5. Cheng O., **Ostrowski R.P.**, Wu B., Liu C., Chen W., Zhang J. H., 2011, “The Cyclooxygenase-2 Mediates the Mechanism of Hyperbaric Oxygen Preconditioning in the Rat Model of Transient Global Cerebral Ischemia.” *Stroke*, 42, 484-490. (*praca oryginalna*)
IF 2011: 5.729; punkty MNiSW: 32.
- H6. Mu J., **Ostrowski R.P.**, Soejima Y., Rolland W.B., Krafft P.R., Tang J., Zhang J.H., 2013, “Delayed hyperbaric oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the rat model of MCAo-induced ischemic brain injury.” *Neurobiology of Disease* 51, 133-143. (*praca oryginalna*)
IF 2013: 5.202; punkty MNiSW: 35.
- H7. **Ostrowski R.P.**, Pucko E.B., 2013, “Research of medical gases in Poland.” *Medical Gas Research*, 2, 17. doi: 10.1186/2045-9912-3-17. (*praca przeglądowa*)

IF 2013: brak (*Unofficial Impact Factor: 1.59*) MNiSW: nie.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

i. Omówienie celu naukowego ww. prac.

Pośród incydentów mózgowo-naczyniowych, udar mózgu obarczony jest wysoką śmiertelnością, a stosowane metody terapeutyczne nie są wystarczająco skuteczne. W odróżnieniu od incydentów sercowo-naczyniowych, udar mózgu często pozostawia chorego z trwałym inwalidztwem i utratą samodzielności. Istnieją dwa rodzaje udaru mózgu: niedokrwienny (72-86% udarów) i krwotoczny (9-18% udarów) (Kobayashi et al, 2003). Pierwszy spowodowany jest najczęściej zamknięciem naczynia krwionośnego, doprowadzającego krew do określonego obszaru mózgu, przez narastającą blaszkę miażdżycową lub zakrzep, uformowany na zmianach miażdżycowych (15 - 30% udarów ischemicznych), lub poprzez materiał zatorowy, głównie z jam i zastawek serca (20-25% wszystkich udarów niedokrwiennych). Takie zwężenie lub zamknięcie światła naczynia powoduje ogniskowe niedokrwienie i w następstwie zawał mózgu. Natomiast całkowite niedokrwienie mózgu, głównie wybiórczo uszkadzające wrażliwe obszary anatomiczne mózgowia, jest najczęściej spowodowane zatrzymaniem czynności serca (Wiebers et al, 2006). Wśród udarów krwotocznych można wyodrębnić formę szczególną - krwotok podpajęczynówkowy (ang. *subarachnoid hemorrhage*; SAH), w wyniku którego krew, najczęściej z pękniętego tętniaka tętnic wewnątrzczaszkowych, przedostaje się pomiędzy oponę pajęczą i przylegającą do powierzchni mózgu oponę mięką (MacDonald, 1989).

Jednostką kliniczną, która posiada pewne wspólne z udarem komponenty uszkadzające, takie jak odpowiedź zapalna i hipoksja tkankowa, jest urazowe uszkodzenie mózgu. Wciąż poszukiwane są metody zwiększenia skuteczności leczenia urazów mózgu, których jako powstałych wypadkowo lub będących efektami ubocznymi interwencji neurochirurgicznych, nigdy nie będzie można całkowicie wyeliminować.

Metodą, która może budzić nadzieje na poprawienie wyników leczenia udarów i urazowego uszkodzenia mózgu jest natlenienie hiperbaryczne. O leczeniu tym mówimy wtedy, gdy pacjent oddycha czystym tlenem przy ciśnieniu wyższym od ciśnienia atmosferycznego. Metoda ta ma zdolność zmaksymalizowania podaży tlenu w sytuacji, gdy jego niedobór jest jedną z zasadniczych konsekwencji uszkodzenia ciągłości lub drożności naczyń mózgu i leży u podstaw rozwoju uszkodzeń tkankowych w następstwie udaru. W urazach mózgu, podanie tlenu hiperbarycznego może zwiększać mózgowy metabolizm tlenu oraz pO_2 w obrębie mózgu.

W tej sytuacji, jako temat wiodący badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, przyjęto neuroprotektoryjne działanie tlenu hiperbarycznego (ang. *hyperbaric oxygen*; HBO) na poziomie mechanizmów patofizjologicznych i molekularnych.

Jednym z głównych czynników, ograniczających postęp w badaniach nad skutecznym leczeniem tlenem hiperbarycznym w przypadkach udarów i urazów mózgu, jest niedostateczne poznanie patomechanizmów chorobowych oraz mechanizmów

terapeutycznych. Badanie mechanizmu oddziaływania leczniczego HBO na poziomie subkomórkowym może pozwolić na lepsze monitorowanie leczenia oraz pomóc w wyselekcjonowaniu pacjentów, którzy najbardziej mogliby skorzystać z terapii tlenem hiperbarycznym. Dzięki temu można by efektywniej projektować badania kliniczne nad zastosowaniem HBO i w ten sposób zwiększyć prawdopodobieństwo jego sukcesu w próbach klinicznych.

Badania patomechanizmów uszkodzenia mózgu na poziomie neurochemicznym i molekularnym wymagają zastosowania modeli zwierzęcych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Przeprowadzone badania na gryzoniach obejmowały ogniskowe i całkowite niedokrwienie mózgu, krwotok podpajęczynówkowy a także chirurgiczne uszkodzenie mózgu. Badania wykonane na tak zróżnicowanych modelach pozwalają na wykazanie, że terapia tlenem może być skuteczna w chorobach naczyniowych i urazowych mózgu.

Wcześniejsi autorzy wykazali, że w warunkach ischemicznych, tlen normobaryczny (ang. *normobaric oxygen*; NBO) może nie zapewniać wystarczającego natlenienia tkanki nerwowej, w przeciwieństwie do tlenu hiperbarycznego (Sun et al, 2008). Podanie HBO okazało się korzystniejsze niż NBO w dotychczasowych badaniach nad eksperymentalnym uszkodzeniem mózgu (Beynon et al, 2007; Huang & Obenaus, 2011).

Celem podjętego obecnie cyklu badań było określenie korzystnego efektu HBO, jako procedury leczniczej i hartującej w walce z uszkodzeniem mózgu po eksperymentalnym udarze i urazie chirurgicznym mózgu. W szczególności, podjęte badania eksperymentalne na modelach zwierzęcych mogą utorować drogę badaniom klinicznym z hartowaniem tlenem hiperbarycznym.

Dlatego w ramach celów szczegółowych postawiono zbadać mechanizm wpływu HBO na wczesne uszkodzenie mózgu po eksperymentalnym SAH, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na odpowiedź hipoksyjną i stres oksydacyjny (2 prace), oraz na rozległość uszkodzenia i proces proliferacji komórek w mózgu, mogący prowadzić do jego regeneracji po niedokrwieniu ogniskowym przy opóźnionym podaniu HBO (1 praca). Postanowiono także zbadać skuteczność oraz mechanizm hartowania tlenem hiperbarycznym w całkowitym niedokrwieniu mózgu (2 prace), oraz chirurgicznym uszkodzeniu mózgu (1 praca). Opracowano również pracę poglądową, dotyczącą całokształtu badań z wykorzystaniem gazów medycznych w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem tlenu hiperbarycznego (1 praca).

ii. Omówienie osiągniętych wyników.

Krwotok podpajęczynówkowy, który stanowi od 5 do 10% wszystkich udarów (Wiebers et al, 2006) jest obiektem szczególnie intensywnych badań, gdyż dotyka ludzi relatywnie młodych i niesie ze sobą wysoką śmiertelność lub trwale inwalidztwo (van Gijn & Rinkel, 2001). Dlatego w pierwszym etapie badań zainteresowano się mechanizmem działania HBO na niedokrwienie mózgu w przebiegu krwawienia podpajęczynówkowego (**Publikacja H1**). W początkowej fazie krwawienia spada mózgowy przepływ krwi (ang. *cerebral blood flow*; CBF), co można uważać za mechanizm powstrzymujący krwawienie, jednak przy przedłużającej się hipoperfuzji dochodzi do niedokrwienia mózgu i niedotlenienia komórek

(Grote & Hassler, 1988; Jarus-Dziedzic et al, 2003). Może to tłumaczyć obecność uszkodzonych komórek w rejonach mózgu, odległych od ogniska wynaczynionej krwi. HBO może być potencjalnie korzystną opcją terapeutyczną wobec odległych uszkodzeń niedokrwiennych.

Natlenienie hiperbaryczne nie było stosowane we wczesnym okresie po SAH. Dotychczasowe kliniczne użycie HBO w SAH ograniczało się głównie do pacjentów z rozwiniętym skurczem mózgowych naczyń krwionośnych po krwotoku (Kawamura, 1988; Kohshi et al, 1993). Istotną przesłanką użycia HBO w krwotoku podpajęczynówkowym było to, że krwotok podpajęczynówkowy wywiera na mózg wpływ ischemiczny o charakterze globalnym, a skuteczność HBO udowodniono w modelach całkowitego niedokrwienia mózgu (Li et al, 2005). Warto przy tym podkreślić, że niedokrwienie mózgu powstające w mechanizmie natychmiastowego wzrostu ciśnienia śródczaszkowego (ang. *intracranial pressure*; ICP) na skutek krwotoku podpajęczynówkowego, prowadzi do łagodniejszego i bardziej krótkotrwałego spadku mózgowego ciśnienia perfuzyjnego (ang. *cerebral perfusion pressure*; CPP), niż wskutek zamknięcia światła naczyń, czy też czasowego zatrzymania czynności serca. Tym bardziej więc przewidywano sukces terapeutyczny.

Postawiono hipotezę, że natlenienie hiperbaryczne obniży stopień uszkodzenia komórek mózgu po SAH w następstwie oddziaływania na główny mechanizm detekcji stężenia tlenu w komórce, związany z czynnikiem indukowanym hipoksją 1 (ang. *hypoxia inducible factor 1*; HIF-1), który może mieć również działanie proapoptotyczne (**Publikacja H1**). Czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1 składa się z indukowalnej podjednostki α oraz podjednostki β , znanej również jako translokator receptora wodorowęglanu arylu (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*; ARNT) (Semenza, 2007). W odpowiedzi na hipoksję, HIF-1 jest aktywowany głównie dzięki zahamowaniu degradacji proteosomalnej HIF-1 α . Badania przeprowadzone na modelu SAH wykazały wzrost poziomu HIF-1 α w hipokampie, mózdzku i pniu mózgu po 24 godz. od krwawienia, jak również nasilenie immunoreaktywności w hipokampie i korze mózgu. Komórki TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*) pozytywne występowały w korze mózgu i prezentowały kolokalizację z czynnikiem HIF-1 α . Towarzyszyła temu wzmożona ekspresja zależnego od HIF-1 proapoptotycznego białka wiążącego Bcl-2 i adenowirusowe białko E1B-19kDa 3 (ang. *Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3*; BNIP3) w homogenatach hipokampa. Natomiast obecność wzmożonej ekspresji śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), jak również wynaczynienia immunoglobulin IgG, stwierdzone w korze mózgu, świadczyły o nieszczelności bariery krew-mózg. Zastosowanie tlenu hiperbarycznego przy 2,8 atmosfer absolutnych (ang. *atmospheres absolute*; ATA) przez 2 godz., począwszy od 60 minut po krwotoku, przyniosło redukcję poziomów HIF-1 α , BNIP3 oraz VEGF we wszystkich badanych strukturach mózgu. Ponadto HBO znormalizował szereg zmian patofizjologicznych wyindukowanych krwotokiem, takich jak wzrost ICP, obniżenie CPP i CBF, zwiększona objętość krwi w mózgu i obrzęk mózgu. Zastosowanie tlenu hiperbarycznego przyniosło także statystycznie istotną poprawę stanu neurologicznego.

Od dawna postulowano, że uszkodzenia wolnorodnikowe leżą u podłoża zmian wywołanych krwawieniem, natomiast zastosowanie HBO niesie potencjał nasilenia produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) w tkance. Wzrost produkcji ROS w SAH ma związek nie

tylko z hipoksją, indukowaną krwawieniem, ale również z działaniem produktów degradacji krwi. Wiadomo było również, dzięki pracom grupy badawczej Schumackera (Chandel et al, 2000), że wolne rodniki tlenowe są czynnikiem stabilizującym HIF-1 α . Z uwagi na powyższe, postanowiono zbadać wpływ HBO na mediatory i wykładniki stresu oksydacyjnego po SAH (**Publikacja H2**). W tej pracy wykazano hamujące działanie HBO na jedno z głównych źródeł produkcji wolnych rodników ponadtlennokowych, jakim jest oksydaza NADPH. W ten sposób redukcja stresu oksydacyjnego pod wpływem HBO zachodziłaby głównie na drodze zahamowania aktywności i ekspresji czynników produkujących wolne rodniki, a nie wskutek podniesienia poziomu wmiataczy wolnych rodników. SAH wywołał wzrost ekspresji podjednostki gp91^{phox} oksydazy NADPH na poziomie przekąźnikowego RNA (mRNA) oraz wzrost immunoreaktywności białka tej podjednostki w neuronach kory mózgowej po pierwszej dobie od krwotoku. Działanie HBO (2,8 ATA przez 2 godz. od 60 min. po SAH) po 24 godz. od krwotoku manifestowało się zmniejszeniem poziomu mRNA gp91^{phox}, określonym metodą PCR, redukcją aktywności oksydazy NADPH w teście z lucygeniną oraz zmniejszeniem stężenia aldehydu dimalonowego (ang. *malondialdehyde*; MDA) w korze mózgu. Wyniki potwierdziły, że HBO ma zdolność redukcji stresu oksydacyjnego, związanego z oksydazą NADPH po SAH.

W dalszym etapie postanowiono zbadać zagadnienie hartowania tlenem hiperbarycznym, jako procedury podnoszącej odporność komórek na uszkodzenie (**Publikacja H3**). Powzięto bowiem przypuszczenie, że obserwowana w niektórych badaniach klinicznych, niecałkowita efektywność HBO może wiązać się z ograniczoną podatnością dokonanego uszkodzenia na działanie terapeutyczne. Postanowiono zaproponować eksperyment, który miałby na celu wykazanie, że hartowanie wymaga udziału mediatora szkodliwego lecz podprogowego dla uszkodzenia, ewentualnie odbywa się na drodze wyczerpania czynnika uszkadzającego, który wskutek tego nie może uczestniczyć w mechanizmie uszkodzenia mózgu.

Postawiono hipotezę, że mediatory zapalne uczestniczą w mechanizmie hartowania tlenem hiperbarycznym. Skłoniły do tego wstępne wyniki badań z zahamowaniem cyklooksygenazy-2 (ang. *cyclooxygenase-2*; COX-2, oficjalna nazwa *Human Genome Organization: prostaglandin-endoperoxide synthase 2*; PTGS2) po hipoksji neonatalnej, które przyniosło znaczną protekcję komórek nerwowych. Wyniki pracy opublikowano w 2010 r. (**Publikacja IIA33**).

Hartowanie, które wyzwala COX-2, mogłoby zawczasu uruchomić mechanizmy obronne. W **Publikacji H3** postulowano, że hartowanie tlenem hiperbarycznym (ang. *hyperbaric oxygen preconditioning*; HBO-PC) w 5 sesjach przy 2,5 ATA, będzie działało ochronnie przeciwko traumatycznemu uszkodzeniu mózgu, w którym rozpadające się komórki wyzwalają mediatory zapalne, aktywując COX-2. Zastosowano model uszkodzenia chirurgicznego mózgu (ang. *surgical brain injury*; SBI), który stanowi odpowiednik uszkodzenia powstającego w czasie operacji neurochirurgicznych, ale może być też uważany za modelowanie niektórych urazów współczesnego pola walki (uszkodzenie płata czołowego). Jak oczekiwano, SBI zwiększył poziom COX-2 w mózgu. Podczas gdy sam HBO-PC również zwiększył poziom COX-2, po urazie chirurgicznym wywołał redukcję COX-2 w porównaniu do grupy bez hartowania. Podobny wzorzec zmian ekspresji wykazywał HIF-1 α (z wyjątkiem braku wyraźnego wzbudzenia samym hartowaniem – być

może niewykrytego z uwagi na szybki katabolizm HIF-1 α), który uznawany jest za nadrzędny regulator COX-2.

HBO-PC zredukował deficyt neurologiczny po 72 godz. od SBI. Pod wpływem hartowania wystąpiło też zmniejszenie obrzęku mózgu w płacie czołowym. Związek COX-2 z obrzękiem jest dobrze znany. W celu potwierdzenia udziału COX-2 w mechanizmie hartowania zastosowano inhibitor COX-2: NS398, w ¼ dawki leczniczej, podawany na godzinę przed każdą sesją hartowania. NS398 zniósł efekt HBO-PC, polegający na zmniejszeniu obrzęku mózgu. W ten sposób potwierdzono wymóg uczestnictwa COX-2 w mechanizmie hartowania tlenem hiperbarycznym przed chirurgicznym urazem mózgu.

Jednocześnie zainteresowano się rolą metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie hartowania HBO (**Publikacja H4**). Szczególny rodzaj śmierci apoptotycznej komórek, zwany *anoikis*, może zachodzić wskutek utraty kontaktu komórek z macierzą pozakomórkową w wyniku jej degradacji m.in. przez metaloproteinazy macierzy (ang. *matrix metalloproteinases*; MMP), włączając MMP-9. Stosując model zwierzęcy 10-minutowego całkowitego niedokrwienia mózgu, postanowiono zbadać efekt HBO-PC na MMP, które mogą pośredniczyć w tym rodzaju śmierci apoptotycznej. W przeprowadzonym doświadczeniu HBO-PC zredukował zymograficzną aktywację MMP-9 w 72 godz. po ischemii i poprawił stan neurologiczny. Co ciekawe, wzrost immunoreaktywności MMP-9 był wykryty po samym HBO-PC, co może sugerować, że zasób MMP-9 wyczerpuje się w trakcie hartowania, przez co niedokrwienie mózgu nie jest w stanie wywołać nadmiernej aktywacji MMP. W ten sposób zredukowana może być degradacja białek macierzy i obniżona liczebność komórek TUNEL pozytywnych po niedokrwieniu. Zaproponowano zatem interesujący mechanizm hartowania HBO, wskazując na uczestnictwo proteaz macierzy pozakomórkowej w tym procesie.

Wynik doświadczeń z SBI pozwolił domniemywać, że nawet skutki bardzo silnych bodźców uszkodzających mózg mogą być osłabione poprzez modulację COX-2 za pomocą HBO-PC. Dlatego też w kolejnej publikacji (**Publikacja H5**) wysunięto postulat, że w ciężkich przypadkach całkowitego niedokrwienia mózgu wpływ HBO-PC na COX-2 odgrywa ważną rolę w mechanizmie ochrony komórek przed uszkodzeniem. W kolejnym doświadczeniu postanowiono zastosować 15 minutowy czas całkowitego niedokrwienia mózgu. Należy podkreślić, że w całkowitym niedokrwieniu mózgu u ludzi odnotowuje się nadal dużą śmiertelność. Znajduje to również odzwierciedlenie w badaniach doświadczalnych nad metodami leczenia skutków 5-10 min zatrzymania krążenia, zwykle wiążącego się z 13-35% natychmiastową śmiertelnością, a także śmiercią do 100% komórek piramidowych sektora CA1 hipokampa po 7 dniach u przeżywających osobników (Lipton, 1999; Majkowska-Wierzbicka, 1989; Ostrowski et al, 2005). Tymczasem pośród naszych wyników zwraca uwagę zdolność HBO-PC (5 dni przy 2,5 ATA przez 1 godzinną sesję każdego dnia) do zmniejszenia rozległości śmierci komórek rejonu CA1 po relatywnie długim, 15 minutowym niedokrwieniu całkowitym mózgu. 7 dni po ischemii przeżywało zaledwie 14% neuronów CA1 w porównaniu z grupą kontrolną. Liczba przeżywających neuronów była ponad 2 i pół razy wyższa w grupie hartowanej tlenem niż w grupie bez hartowania. Liczba TUNEL pozytywnych komórek w analogicznym czasie była zmniejszona o 37,1% w porównaniu do zwierząt niehartowanych. Poprzedzenie sesji hartujących inhibitorem COX-2,

NS398 skutkowało ponownym wystąpieniem bardzo znacznego obniżenia liczby przeżywających neuronów CA1 oraz wzrostu neuronalnej apoptozy.

Znamienną rzeczą było stwierdzenie obniżenia ekspresji białka COX-2 w Western Blot w hipokampie osobników hartowanych tlenem w stosunku do niehartowanych, wykazujących poischemiczny wysoki wzrost COX-2. Podobnie, nasilony wzrost COX-2 stwierdzano, gdy hartowanie było połączone z uprzednim podawaniem inhibitora COX-2. HBO-PC obniżył immunoreaktywność (IR) COX-2 kolokalizowanej z IR aktywnej kaspazy-3 w hipokampie po 3 dniach od ischemii, jednak efekt obniżonej immunoreaktywności nie występował przy zastosowaniu HBO-PC razem z inhibitorem COX-2. Podobnie deficyt poznawczy w teście z labiryntem T był zredukowany w grupie hartowanej, natomiast inhibitor temu przeciwdziałał. Samo hartowanie, bez ischemii, nie spowodowało statystycznie istotnego wzrostu poziomów COX-2 w mózgu. Jednakże wywołało ono wzrost poziomu HIF-1 α (po 24 godz. od ostatniej sesji hartowania) w hipokampie mózgu. Przy interpretacji tego wyniku należy pamiętać, że potrzebny jest czas na dokonanie wzrostu ekspresji genów, podległych danemu czynnikowi transkrypcyjnemu (w tym przypadku HIF-1). Podobnie jak COX-2, oksygenaza hemowa-1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1) nie była w tym czasie, co HIF-1 α , podwyższona. Może to również wskazywać, że odpowiedź COX-2 na hartowanie tlenem wykazuje subtelne różnice międzygatunkowe, gdyż wzrost poziomu COX-2 samym HBO-PC uzyskano na mysim modelu SBI. Skuteczność inhibitora COX-2 w odwróceniu efektu hartowania, również w modelu niedokrwiennym, wyraźnie jednak podkreśla, że hartowanie zależne jest od funkcjonalnej COX-2 w mózgu.

Obecnie prowadzone prace są kontynuacją prac, dotyczących mechanizmów hartowania tlenem hiperbarycznym, przedstawianych jako osiągnięcie habilitacyjne. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że HBO-PC prowadzi do rearanżacji proteomu. Do zaistnienia takiej przemiany może być konieczne aktywowanie systemu proteosomalnego, którego działanie zredukuje białka - mediatory śmierci komórki jeszcze przed wystąpieniem uszkodzenia mózgu.

Wobec ograniczonego zastosowania hartowania HBO i trudności wprowadzenia terapii hiperbarycznej we wczesnym okresie udaru mózgu, postanowiono przeprowadzić badania doświadczalne, w których leczenie rozpoczęto w okresie późniejszym. Do tej pory nie badano opóźnionego stosowania HBO, do 48 godz. po eksperymentalnym nieodwracalnym niedokrwieniu mózgu u dorosłych osobników. Uważano bowiem, że tylko zastosowanie HBO we wczesnym okresie udaru może przynieść dobroczynne efekty. W warunkach klinicznych obawiano się interakcji HBO z lekami i logistycznego konfliktu stosowania HBO z innymi komponentami terapii ostrego udaru (także z uwagi na pierwszeństwo dla podania tPA). Zaniepokojenie budziła też możliwość utrudniającego wpływu hiperbarii na intensywne monitorowanie pacjenta oraz ograniczona dostępność komór hiperbarycznych.

Dotychczasowe próby kliniczne, obejmujące pacjentów z natlenieniem hiperbarycznym zastosowanym we wczesnym okresie po udarze, nie przyniosły jednoznacznie pozytywnych wyników. W tej sytuacji, zastosowanie opóźnionego początku podjęcia terapii tlenem hiperbarycznym oraz zbadanie jego efektów wydawało się być uzasadnione. Przy zastosowaniu HBO po upływie wczesnego okresu uszkodzenia mózgu w następstwie udaru, na czoło wysuwa się możliwość stymulowania reakcji naprawczych. Założeniem następnej pracy (**Publikacja H6**) był fakt, że wykładnikiem reakcji naprawczych, w szczególności

neurogenezy, jest proliferacja komórek, która może być stymulowana przez tlen hiperbaryczny. U podłoża rozplemu komórek o charakterze naprawczym leżą mechanizmy molekularne, włączając działanie czynników transkrypcyjnych.

Wykazano, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego, regulującego ekspresję genów zależnych od cAMP (ang. *cAMP-responsive element-binding protein*; CREB), jest warunkiem koniecznym i wystarczającym dla aktywacji neurogenezy poischemicznej w zakręcie zębatym po ogniskowym niedokrwieniu mózgu (Zhu et al, 2004). CREB działa poprzez nasilenie ekspresji podległych mu genów, indukując neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*; BDNF), białko Bcl-2 (ang. B-cell lymphoma 2) oraz c-Fos. Wiadomo również, że fosfataza białkowa 1 γ (ang. *protein phosphatase 1 γ* ; PP1 γ) defosforyluje CREB na Ser-133, przeciwdziałając jego nadmiernej fosforylacji, która prowadzi do degradacji CREB na szlaku proteosomalnym (Taylor et al, 2000). Założono, że HBO, zapoczątkowany po 48 godz. od trwałego niedokrwienia, zablokuje degradację CREB i zaktywuje procesy naprawcze w ischemicznym mózgu. Przeprowadzono badania immunohistochemiczne z bromodeoksyurydyną (BrdU), która była podawana inaczej dla badania proliferacji komórek (2 iniekcje i badanie 24 godz. po ostatniej), a inaczej dla przeżywalności i migracji komórek (badanie mózgu 14 dni po ostatniej z sześciu iniekcji BrdU; przez 3 dni 2 iniekcje dziennie).

Natomiast w eksperymencie z podaniem tlenu hiperbarycznego 3 godz. po ischemii, postanowiono zbadać ekspresję PP1 γ oraz CREB po 24 godz. od indukcji niedokrwienia. HBO podany po 48 godz. od niedokrwienia przez 1 godz. dziennie przy 2,5 ATA przez 10 dni zredukował rozległość udaru, poprawił deficyt neurologiczny i poznawczy (uczenie się i pamięć przestrzenna) oraz zwiększył ekspresję białka CREB, przynosząc zwiększenie proliferacji komórek w hipokampie i okolicy około-zawałowej 14 i 28 dnia po indukcji ischemii. W eksperymencie ostrym wykazano spadek ekspresji PP1 γ oraz wzrost ubikwitynowanego CREB po 24 godz. od indukcji niedokrwienia. Tymczasem podanie HBO w 3 godz. po niedokrwieniu odwróciło te zmiany i zredukowało wielkość zawału mózgu oraz dało poprawę w badaniach neurobehawioralnych. Wyciszenie CREB albo PP1 γ , przez użycie interferującego RNA, zredukowało dobroczynne działanie HBO, prowadząc do zwiększenia obszaru zawału i pogorszenia deficytu neurologicznego. Użycie PP1 γ siRNA osłabiło też obniżający wpływ HBO na ubikwitynację CREB. Wyniki te mogą wskazywać na udział CREB w korzystnym działaniu tlenu hiperbarycznego zarówno w terapii ostrej, jak i opóźnionej. W podsumowaniu należy stwierdzić, że HBO zwiększa proliferację komórek w okolicach uszkodzenia mózgu przez ogniskowe niedokrwienie. Wyniki tych badań mogą wskazywać na zasadność opóźnionego zastosowania tlenu hiperbarycznego w celu aktywacji mechanizmów naprawczych mózgu i usprawnienia funkcji neurologicznych po udarze.

Postanowiono też dokonać analizy badań naukowych gazów medycznych w Polsce i ich zastosowań, ze szczególnym uwzględnieniem tlenu hiperbarycznego (**Publikacja H7**). W tej pracy przeglądowej zaoferowano krótki rys historyczny, począwszy od nakreślenia sylwetki Michała Sędziwoja – Sendivogiusa, który dokonał odkrycia tlenu pod nazwą „pokarmu życia” na 170 lat przed odkryciem Priestleya. Scharakteryzowano też pionierskie prace profesorów Wróblewskiego i Olszewskiego w skraplaniu gazów. W ostatnich latach odnotowano szereg badań klinicznych z tlenem hiperbarycznym, przeprowadzonych na niewielkiej liczbie pacjentów, podczas gdy dopiero pojawiają się prace, próbujące określić mechanizm działania

HBO na poziomie molekularnym. W badaniach, przeprowadzonych w IMDiK im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie, stwierdzono, że zarówno tlen hiperbaryczny (HBO), jak i powietrze hiperbaryczne były skuteczne w powodowaniu wzrostu przeżywalności neuronów CA1 hipokampa i poprawy deficytu neurobehawioralnego po 5 min. całkowitym niedokrwieniu mózgu. Te korzystne zmiany przypisano efektowi temperaturowemu hiperbarii, zapobiegającej wzrostowi temperatury mózgu, wywołanym przez ischemię (Malek et al, 2013). Natomiast HBO podany w modelu niedotlenienia noworodków promował wzrost poziomu endogennego zredukowanego glutationu (GSH), czym wzmacniał komórkowe mechanizmy antyoksydacyjne. Jednocześnie poziom aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*; SOD), jako wykładnika stresu oksydacyjnego, ulegał w tych warunkach obniżeniu, co wskazuje na możliwość zmniejszenia produkcji wolnych rodników tlenowych w wyniku działania HBO. Na podstawie analizy ogólnokrajowych kierunków badań nad tlenem hiperbarycznym wnioskowaliśmy, że potrzebne są dalsze badania, zwłaszcza w aspekcie wpływu HBO na komórki macierzyste oraz badania potencjału HBO w terapii nowotworów. W badaniach klinicznych autorzy podali kilka istotnych przykładów skuteczności HBO, która nie jest jednoznacznie rozstrzygnięta w piśmiennictwie naukowym. I tak, HBO ograniczył uszkodzenie tkankowe i rozległość amputacji u pacjentów ze stopą cukrzycową, a także poprawił stan kliniczny pacjentów z oparzeniami termicznymi i elektrycznymi. Ponadto, pod wpływem HBO dokonała się poprawa słuchu u znacznej większości pacjentów z nagłym niedosłuchem czuciowo-nerwowym. HBO był także skuteczny w leczeniu martwicy popromiennej kości, powstałej wskutek radioterapii nowotworów.

Napotkano także szeroki nurt badań ozonowych, który na podstawie wyników uzyskanych przez polskich uczonych, może przynieść poszerzenie wskazań do zastosowania leczenia ozonem na polu stomatologii i ortopedii. Polscy badacze zidentyfikowali liczne szczepy bakterii i wirusów jamy ustnej podatnych na leczenie ozonem. W opracowaniu wskazano na znaczenie testów proteomicznych krwi dla prac ozonowych, jako mogących ustalić nowe markery skuteczności terapii ozonowej oraz pozwolić na monitorowanie bezpieczeństwa leczenia.

Interesującym nurtem polskich prac badawczych są badania mediatorów gazowych tj. tlenku węgla (CO), tlenku azotu (NO) oraz siarczku wodoru (H₂S). Autorzy dostrzegli potencjał terapeutyczny CO oraz H₂S, podczas gdy efekt inhalacji gazowym NO był już badany w polskich próbach klinicznych. NO dał poprawę wartości parametrów hemodynamicznych i gazometrycznych u chorych kardiochirurgicznych, w postaci redukcji ciśnienia w tętnicy płucnej oraz wzrostu PaO₂. Wskazano na prace badające potencjał CO w mechanizmie hartowania przed transplantacją organów, jego rolę w hamowaniu zakrzepicy i efekt przeciwzapalny.

Z literatury wynika, że polscy badacze włączyli się w ogólnoswiatowy dyskurs, dotyczący zalet i ograniczeń anestetyków wziewnych wobec dożylnych. Badano również mechanizmy hartowania gazowymi anestetykami wskazując na redukcję wolnych rodników i mediatorów zapalnych. Badania polskich badaczy wskazały na redukcję biochemicznych markerów uszkodzenia (MMP-9 oraz S-100β), jako wykładnik protekcji mózgu i serca, poddanych ekspozycji na anestetyki wziewne. W badaniach doświadczalnych wykazano również ich

wpływ na redukcję uwalniania/syntezy aminokwasów pobudzających oraz zahamowanie aktywacji mikro- i astro gleju po udarze mózgu.

Polscy naukowcy podjęli również badania nad użyciem gazów szlachetnych w warunkach klinicznych. Badali oni mieszaninę helu i tlenu (heliox) pod kątem przydatności w leczeniu zaburzeń oddechowych u noworodków w przebiegu zespołu aspiracji smółki; badania te były zarejestrowane na stronie clinicaltrials.gov. Uzyskano istotny statystycznie wzrost wskaźnika PaO_2/FiO_2 w czasie wentylacji helioxem.

Biorąc pod uwagę całokształt wyników badań nad gazami medycznymi w Polsce, należałoby postulować ulepszenie narzędzi finansowania tego obszaru badawczego i wzrostu ich integracji z badaniami z dziedziny biologii molekularnej i medycyny naprawczej.

iii. Omówienie ewentualnego wykorzystania osiągniętych wyników.

Niewątpliwym osiągnięciem naukowym przedstawionego cyklu prac było wykazanie, że tlen hiperbaryczny wywiera działanie neuroprotekcyjne w warunkach eksperymentalnego udaru i urazu mózgu z uwzględnieniem zarówno hartowania jak i terapii wczesnej i opóźnionej. Przedstawiono niebadane do tej pory mechanizmy działania HBO w różnych typach uszkodzenia mózgu, włączając po raz pierwszy wczesny okres doświadczalnego SAH. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do ulepszonego projektowania prób klinicznych. Ewentualny sukces badań klinicznych mógłby pozwolić na zastosowanie tlenu hiperbarycznego, jako szeroko dostępnego ekwiwalentu farmakoterapii lub środka wspomagającego leczenie udaru i urazu mózgu.

Przedstawione badania mogą przyczynić się do wypracowania optymalnego reżymu HBO, określenia, które markery uszkodzenia mózgu ulegają korzystnym zmianom oraz określenia mechanizmów terapeutycznych. Potwierdzi to nie tylko działanie ochronne na mózg, ale także pozwoli przewidzieć możliwe interakcje lekowe, co jest ważne przy opracowaniu wytycznych dla terapii równoległych. Wyniki tych badań mogą w szczególności wskazywać na zasadność opóźnionego zastosowania tlenu hiperbarycznego w celu aktywacji mechanizmów naprawczych mózgu i usprawnienia funkcji neurologicznych po udarze.

W ostatnich latach wzrosła wiedza o mechanizmach udaru mózgu, co umożliwiło (razem z rosnącą dostępnością zaawansowanego sprzętu intensywnej opieki neurologicznej) ulepszone prowadzenie chorych na oddziałach udarowych. Poszerzeniu uległa również wiedza na temat patomechanizmów traumatycznego uszkodzenia mózgu w tym roli komponenty hipoksyjnej i zapalnej. Jednak istnieje niewiele leków zwalczających skutki udaru bądź urazu mózgu, których skuteczność zostałaby wykazana w wieloośrodkowych badaniach klinicznych. Na podstawie obecnego stanu wiedzy wyłania się potrzeba zastosowania procedur medycznych, które połączyłyby cechy wieloczynnikowej neuroprotekcji oraz medycyny naprawczej. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że natlenienie hiperbaryczne może wykazywać i łączyć takie właściwości. Może służyć jako procedura o wielokierunkowym działaniu, wspomagająca inne strategie terapeutyczne i przyczynić się do ograniczenia wielolekowości.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Poza pracami, stanowiącymi podstawę habilitacyjnego osiągnięcia naukowego, mój dorobek naukowy zawiera prace różnorodne tematycznie, które można zaklasyfikować do 4 głównych nurtów badań: neurotoksykologii, neuroprotekcji, badania endotelin w udarze mózgu i zawale serca, oraz transplantologii.

Neurotoksykologia

Staż lekarski odbyłem w Wojskowym Instytucie Medycyny Lotniczej, gdzie interesowałem się znaczeniem zaburzeń metabolicznych, kardiologicznych i neurologicznych w ocenie zdrowia pilotów wojskowych oraz personelu naziemnego. Po ukończeniu stażu w 1995r. zacząłem pracować w Instytucie-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, w kierowanej przez Docenta Mieczysława Śmiałka, Pracowni Neurochemii Klinicznej w Zakładzie Neuropatologii. Włączyłem się tam aktywnie w badania neurotoksykologiczne, które zaowocowały kilkoma pracami mojego współautorstwa. W owym czasie prowadzone były prace nad doświadczalną encefaloneuropatią tellurową. Warto zaznaczyć, że u ludzi mogą występować skutki zawodowego narażenia na tellur, który w przemyśle używany jest do produkcji stopów, półprzewodników oraz paneli słonecznych. Większość doświadczeń z narażeniem na tellur przeprowadzono na szczurach dorosłych, u których badano mózg, nerw kulszowy, wątrobę i nerki po 7 i 30 dniach eksperymentu **(Publikacja IIA2)** *“Experimental Tellurium Encephaloneuropathy in the Rat. I. Effect of Intoxication with Sodium Tellurite.” Pol J Environ Stud Suppl, 1997, 6, 186-188.* Badania ultrastrukturalne po 7 dniach po podaniu tellurynu sodu wykazały obecność pojedynczych, zmielinizowanych aksonów w istocie białej i ciele modzelowatym mózgu u 25-dniowych oraz dorosłych szczurów. Występował obrzęk astrocytów, obrzmienie synaps w korze mózgu oraz uszkodzenie oligodendrocytów w hipokampie. Ujawniono zaburzenia procesu mielinizacji w istocie białej mózgu oraz zmiany ultrastrukturalne w nerwie kulszowym. **(Publikacja IIA2).**

W publikacji *“Experimental Tellurium Encephaloneuropathy in the Rat. II. Does Squalene Play an Important Role in pathogenesis of Tellurium Encephaloneuropathy? (Electron Microscopic Studies).” Pol J Environ Stud Supl, 1997, 6, 189-191* **(Publikacja IIA3)** postulowano, że nagromadzenie skwalenu odgrywa ważną rolę w powstawaniu zmian patologicznych w układzie nerwowym po zatruciu tellurem. Skwalen, ważny związek na szlaku syntezy cholesterolu, ulega konwersji do 2-3 epoksuskwalenu w reakcji katalizowanej przez epoksydazę skwalenową (EC 1.14.99.7; obecna nazwa: monooksygenaza skwalenu, EC 1.14.13.132), która ulega inhibicji przez tellur. Można zatem przypuszczać, że przy ekspozycji na tellur dochodzi do gromadzenia skwalenu w układzie nerwowym. Po 30 dniach od podania skwalenu u dorosłych osobników obserwowano rozwinięty obraz encefaloneuropatii skwalenowej, objawiającej się pierwotnym uszkodzeniem komórek glejowych, dezintegracją mieliny i degeneracją aksonalną. W cytoplazmie neuronów kory mózgowej i hipokampa stwierdzano obecność tłuszczo-podobnych kropelek oraz wykryto przerost i apoptozę komórek śródbłonna mózgowych naczyń krwionośnych. Kropelki tłuszczo-podobne występowały również w osłonkach mielinowych nerwu kulszowego **(Publikacja IIA1)** *„The experimental squalene encephaloneuropathy in the rat.” Folia Neuropathol, 1997, 35, 262-264.*

Powyższe prace ustaliły różnice pomiędzy efektami wywołanym przez podanie telluru i skwalenu. Tellur wywołuje uszkodzenia komórek Schwanna w PNS (ang. *peripheral nervous system*), a uszkodzenie mieliny (wglóbiecie mieliny w aksony, hipomielinizacja) jest wtórne. Po tellurze nie obserwuje się przerostu endotelium, czy depozytów tłuszczo-podobnych w nerwie kulszowym (**Publikacja IIA7**) „*The experimental squalene encephaloneuropathy.*” *Exp Toxicol Pathol*, 1999, 51, 75-80. Do charakterystycznych cech encefaloneuropatii skwalenowej należy akumulacja kropelek tłuszczo-podobnych w komórkach mózgu i nerwach obwodowych oraz apoptoza śródbłonek naczyń mózgowych. Po podaniu skwalenu zachodzi penetracja tłuszczo-podobnych substancji do komórki Schwanna, a nie pierwotne jej uszkodzenie. Skwalen jawi się więc jako czynnik neurotoksyczny, wywołujący specyficzną encefaloneuropatię. Do prac tych odwoływali się później badacze amerykańscy przy dyskusji na temat obecności skwalenu w szczepionce przeciw węglikowi (Asa et al, 2002).

Ogniskowe niedokrwienie mózgu w zatorze gazowym i neuroprotekcja hipotermiczna. Endotelinowe niedokrwienie mózgu i neuroprotekcja CoQ₁₀

Drugim nurtem badań była neuroprotekcja przy zastosowaniu hipotermii oraz ubichinonu w dwóch modelach doświadczalnych. Pierwszy model bazował na wstrzyknięciu powietrza i podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej, natomiast drugi polegał na domózgowej iniekcji endotelin powodujących wieloogniskowe niedokrwienie mózgu z martwicą selektywną. Zatory gazowe są przedmiotem badań m.in. w związku z ich występowaniem w chorobie dekompresyjnej, wskutek obniżenia ciśnienia w kabinie samolotu podczas utraty szczelności lub zwiększenia wysokości. Po zastosowaniu 4 godzinnej umiarkowanej hipotermii u szczura z zatorami gazowymi i zamknięciem tętnicy szyjnej wspólnej wystąpił spadek poziomu mleczanu w mózgu w porównaniu z grupą normo-termiczną, jednak efekt ten zmniejszył się po 24 godzinach od zatoru. Badania wskazały na kluczową istotność czasu rozpoczęcia oraz podtrzymywania hipotermii dla utrzymania efektu leczniczego. (**Publikacja IIA5**) “*Effect of hypothermia on lactate acidosis in experimental ischemia in the rat brain.*” *Neurol Neurochir Pol*, 1998, 32(6), 1385-1395. Drugi model uszkodzenia mózgu był zbliżony do zespołu klinicznego niedokrwienia mózgu. W dokomorowej iniekcji stereotaktycznej podawano do mózgu szczura endotelinę-1 (ET-1) - związek silnie obkurczający naczynia. Zbadano wpływ koenzymu Q₁₀ (CoQ₁₀) na kwas mleczanowy po podaniu ET-1. Okazało się, że endotelina po podaniu do mózgu, wywołuje istotny wzrost poziomu mleczanów w półkulach mózgu po 1, 4 i 24 godz. od podania. Koenzym Q₁₀ obniżał poziom mleczanów po 24 godz. od podania endoteliny, co może stanowić przyczynek do rozważań nad jego zastosowaniem w niedokrwieniu mózgu w klinice. Wyniki tej pracy zasugerowały dalsze badania nad CoQ₁₀ w celu oceny jego wpływu na zmiany morfologiczne oraz endogenne układy antyoksydacyjne mózgowia po podaniu endoteliny. (**Publikacja IIA6**) “*Effect of coenzyme Q₁₀ on lactate acidosis in endothelin-1 model of experimental cerebral ischemia.*” *Neurol Neurochir Pol*, 32(6), 1397-1404.

Bliższej ocenie poddano efekt koenzymu Q₁₀ na charakter zmian morfologicznych, spowodowanych podaniem endoteliny-1. Wykazano obecność ognisk martwicy selektywnej oraz ciemnych neuronów w hipokampie i korze mózgu, z depozytami glikogenu na ich obwodzie 24 godz. po podaniu endoteliny. Obserwowano zmniejszenie nasilenia zmian pod

wpływem leczenia koenzymem Q₁₀. **(Publikacja IIA4)** *“Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) in experimental ischemia in the rat.” Folia Neuropathol, 1998, 36,185-188.*

W dalszych etapach badań skupiono się na oddziaływaniu koenzymu Q₁₀ na endogenne układy antyoksydacyjne. Przeprowadzono badania porównawcze wpływu CoQ₁₀ po podaniu ET-1 oraz ET-3 na aktywność SOD, która jest enzymatycznym wymiataczem wolnych rodników ponadtlenkowych. Podanie endotelin spowodowało obniżenie aktywności SOD w korze mózgu, mózdzku i pniu mózgu oraz hipokampie. Dowiedziono, że ET-1 powoduje głębszy niż ET-3 spadek aktywności enzymatycznej w pierwszej godzinie doświadczenia. Normalizacja aktywności SOD po podaniu CoQ₁₀ była obserwowana już po 4 godz. w grupie z ET-3 i po 24 godz. z ET-1. Jedynie w pniu mózgu normalizacja nie wystąpiła, jednakże CoQ₁₀ istotnie zwiększył tam aktywność SOD w porównaniu do przypadków nieleczonych po 24 godz. **(Publikacja IIA8)** *“Effect of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) on superoxide dismutase activity in ET-1 and ET-3 experimental models of cerebral ischemia in the rat.” Folia Neuropathol, 1999, 37, 247-251.*

Neuroprotekcja koenzymem Q₁₀ po domózgowym podaniu endotelin była wiodącym nurtem moich badań i stała się tematem pracy doktorskiej. Wykazano w niej, że ET-1 podana do mózgu powodowała wyższe stężenia mleczanów, głębszy spadek GSH i aktywności SOD, oraz wyższy iloraz utlenionego i zredukowanego glutationu (GSSG/GSH) niż ET-3. Ponadto w odróżnieniu od ET-3, ET-1 powodowała liczne ubytki neuronalne w korze mózgu i hipokampie. Jednocześnie CoQ₁₀ normalizował metabolizm energetyczny mózgu po podaniu endotelin poprzez wzrost ATP i redukcję mleczanów. CoQ₁₀ zredukował też stres oksydacyjny, co wyraziło się normalizacją aktywności SOD, a także redukcją spadku GSH i przeciwdziałaniem wzrostowi GSSG w korze mózgu, hipokampie, mózdzku i pniu mózgu. W grupie z podaniem CoQ₁₀ obserwowano redukcję stopnia uszkodzeń neuronalnych. Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w *Brain Research Bulletin* w 2000r. **(Publikacja IIA9)** *„Effect of coenzyme Q₁₀ on biochemical and morphological changes in experimental ischemia in the rat brain.” Brain Res Bull, 2000;53:399-407.*

Endoteliny

W dziedzinie kardiologii eksperymentalnej postanowiono zbadać wpływ ET-1 na regulację leptyny, która, jako hormon tkanki tłuszczowej regulujący metabolizm energetyczny organizmu, może odgrywać rolę w patogenezie zawału serca. Hiperleptynemia jest czynnikiem predykcyjnym zawału serca i udaru krwotocznego mózgu (Koh et al, 2008). Wiadomo też, że endotelina-1 stymuluje produkcję leptyny w komórkach adipocytów (Xiong et al, 2001). Postanowiono zatem zweryfikować, czy mieszany antagonist receptorów endotelinowych - bosentan wywiera wpływ na pozawałowe uszkodzenie serca i poziom leptyny osoczowej. Ustalono, że w doświadczalnym zawale serca rozległość zawału była podobna w grupie z lekiem lub bez leku. Jednakże bosentan wpływał obniżająco na osoczowy poziom leptyny. Wzrost poziomu leptyny w grupie z bosentanem pojawił się tylko w 24 godzinie od zawału serca. Co nie mniej ważne, podanie bosentanu przyniosło istotne obniżenie śmiertelności pozawałowej, wskazując na potencjalną korzyść jego zastosowania klinicznego w ostrym zawale serca. **(Publikacja IIDb1)** *“Effect of endothelin receptor*

antagonist bosentan on plasma leptin concentration in acute myocardial infarction (MI) in rats.” *Pathophysiology*, 2003, 9, 249-256.

W dalszym etapie badań zastosowano bosentan w modelu zatrzymania krążenia z resuscytacją, powodującym całkowite niedokrwienie mózgu, obarczone znaczną śmiertelnością. Bosentan znacznie obniżył poziom endoteliny-1 w hipokampie po niedokrwieniu. Uzyskano przy tym zwiększenie poziomu endoteliny osoczowej, co może świadczyć o nasilonym wypieraniu jej z połączeń receptorowych. Jednocześnie samo zatrzymanie krążenia zwiększało stężenie leptyny po 24 godz., podczas gdy zastosowanie antagonisty endotelinowego hamowało ten efekt. Nie stwierdzono jednak wpływu blokady endotelinowej na śmiertelność po zatrzymaniu krążenia. Badania ultrastrukturalne udokumentowały neuroprotektoryjny efekt bosentanu wobec neuronów CA1 hipokampa. Można wnioskować, że endoteliny uczestniczą w wywieraniu stresu na organelle komórek w trakcie niedokrwienia mózgu. Co więcej, obniżenie poziomu leptyny przez bosentan nie wskazuje na jej udział w korzystnym wpływie bosentanu na poniedokrwienne uszkodzenie mózgu (**Publikacja IIA11**) “*Effect of Bosentan on Leptin and Endothelin-1 Concentration in Plasma and Brain after Cardiac Arrest in Rats.*” *Drug Dev Res*, 2005, 64,137–144.

Domniemana rola leptyny w zakresie neuroprotekcji nie została potwierdzona w dalszych badaniach z użyciem modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu i zastosowania tlenu hiperbarycznego (HBO). Mimo redukcji uszkodzenia mózgu przez zastosowanie HBO, poziom leptyny osoczowej nie uległ modyfikacji przez terapię hiperbaryczną. (**Publikacja IIDb4**) “*Serum leptin levels decrease after permanent MCAo in the rat and remain unaffected by delayed hyperbaric oxygen therapy.*” *Med Gas Res* 2013, 3, 8. doi: 10.1186/2045-9912-3-8.

Badania izotopowe

W Pracowni Doświadczalnej Medycyny Nuklearnej IMDiK podjęto badania z zastosowaniem izotopów promieniotwórczych. Jednym z głównych tematów badań była zdolność przechodzenia związków znakowanych przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*; BBB). Warto zwrócić uwagę na badania w kooperacji z Zakładem Fizjologii Oddychania IMDiK i Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego nad N-oleinoilo-dopaminą (OL-DA), pochodną dopaminy i kwasu oleinowego. Jej przechodzenie do mózgu po podaniu do tętnicy szyjnej wewnętrznej było obiektem badań, które wykazały 3-4 krotne wzmożenie pasażu trytowanej N-oleinoilo-dopaminy przez BBB w porównaniu z dopaminą niezmodyfikowaną, znakowaną trytem. Wyniki te wskazują na możliwość farmakologicznego zastosowania egzogennej OL-DA w celu lepszego zaspokojenia zapotrzebowania mózgu na dopaminę. (**Publikacja IIA10**) “*Brain uptake of radiolabeled N-oleoyl-dopamine in the rat.*” *Drug Dev Res*, 2003, 60, 217-224.

Neuroprotekcja w krwotoku podpajęczynówkowym

Wiodącym tematem moich badań w Laboratoriach Badawczych Neurobiologii, kierowanych przez profesora Johna Zhanga w Zakładzie Neurochirurgii Uniwersytetu

Stanowego Luizjany w Shreveport oraz w Zakładzie Fizjologii i Farmakologii na Uniwersytecie Loma Linda w Kalifornii były mechanizmy neuroprotekcji w terapiach eksperymentalnych na modelach krwotoku podpajęczynówkowego.

W doświadczalnym krwotoku podpajęczynówkowym obserwowano supresję zjawisk zależnych od hipoksyjnych szlaków sygnałowych i redukcję stresu oksydacyjnego po zastosowaniu HBO, w szczególności zahamowanie ekspresji i aktywności NADPH oksydazy. **(Publikacja IIA13;14)** *“Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen in a rat model of subarachnoid hemorrhage.” Acta Neurochir Suppl, 2006, 96, 188-193.*

Jednakże roli NADPH w stresie oksydacyjnym po krwotoku podpajęczynówkowym nie udało się potwierdzić na myszach ze znokautowanym genem gp91^{phox}, chociaż w przypadku ischemii inni autorzy stwierdzili redukcję uszkodzenia mózgu u myszy z brakiem funkcjonalnej NADPH oksydazy (Walder et al, 1997). Po SAH myszy znokautowane wykazywały podobne poziomy peroksydacji lipidów oraz produkcji rodnika ponadtlenkowego w mózgu jak myszy nieznokautowane. Może to wskazywać na redundancję funkcji w obrębie systemu NADPH oksydaz, zapewnioną przez różne izoformy podjednostek enzymu lub niekompatybilność modelu mysiego SAH ze szczurzym, przy czym ten ostatni lepiej odzwierciedla ludzki SAH (Milner et al, 2014). **(Publikacja IIA16)** *“Oxidative Stress after Subarachnoid Hemorrhage in gp91^{phox} Knockout Mice”. Can J Neurol Sci, 2007, 34, 356-361.*

Do prac przeprowadzonych na modelu SAH, aby badać neuroprotektanty, należy zaliczyć te z zastosowaniem inhibitorów kinaz. Wykazano, że SP600125, inhibitor kinazy białkowej fosforylującej N-koniec białka Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase*; JNK), zapobiegał fosforylacji c-Jun oraz hamował ekspresję akwaporyny 1 (ang. *aquaporin 1*; AQP1), MMP-9, VEGF oraz redukował aktywację kaspazy-3. Towarzyszyło temu zmniejszenie uszkodzeń neuronalnych mózgu, ochrona bariery krew-mózg, redukcja obrzęku mózgu oraz poprawa deficytu neurologicznego. Wyniki tych badań mogą wskazywać na wiodącą rolę JNK we wczesnym okresie uszkodzenia neuronalno-naczyniowego mózgu po SAH. **(Publikacja IIA18)** *“Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage.” J Neurosci Res, 2007, 85, 1436-1438.*

Jednakże inhibitory farmakologiczne stwarzają szereg niedogodności w interpretacji wyników, szczególnie co do specyficzności ich działania. Dlatego też postanowiono użyć wyciszenia określonych genów za pomocą krótkiego interferującego RNA (ang. *small interfering RNA*; siRNA). Postulowano, że białko homologiczne C/EBP (ang. *C/EBP homologous protein*; CHOP) może brać udział w mechanizmie wczesnego uszkodzenia mózgu po SAH. W osobnych badaniach poddano też weryfikacji jego rolę w uszkodzeniu dużych naczyń mózgowych po SAH. CHOP jest czynnikiem transkrypcyjnym, uruchamianym w odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej poprzez działanie m.in. kinazy białkowej PERK (ang. *PKR-like ER kinase*), zlokalizowanej w retikulum endoplazmatycznym, eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2 eIF-2 (ang. *eukaryotic initiation factor 2*) i czynniki transkrypcyjne ATF4 i ATF6 (ang. *activating transcription factors*). Również enzym zależny od inozytolu 1 (ang. *inositol-requiring enzyme-1*; IRE1), poprzez kinazę białka p38 aktywowaną przez mitogen (ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*; p38 MAPK), może aktywować CHOP (Oyadomari & Mori, 2004). Ten ostatni aktywuje apoptozę poprzez aktywatorowe białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only,

Bim (ang. *B cell lymphoma-2 interacting mediator of cell death*) i proteazy cysteinowe specyficzne dla asparagianu, kaspazy (Puthalakath et al, 2007). Zastosowano wyciszenie poprzez podanie dokomorowe jednej z dwóch siRNA dla CHOP. Po ich podaniu uzyskano tendencję do zmniejszenia śmiertelności z 18 do 7,5%, (siRNA1). Po 24 godz. uzyskano redukcję poziomu wynaczynionego do mózgu barwnika Evans Blue oraz normalizację zawartości wody w mózgu, świadczące o zmniejszeniu przepuszczalności bariery krew-mózg. Wyciszenie przyniosło obniżenie poziomu białka CHOP, Bim oraz kaspazy 3, oraz zmniejszyło spadek Bcl-2. Zredukowane ilości komórek TUNEL-pozytywnych, kolokalizujących z CHOP, obserwowano po wyciszeniu w warstwach podkorowych i hipokampie. W tętnicy podstawnej mózgu, podaniem siRNA osiągnięto zmniejszenie poziomu CHOP, Bim i kaspazy 3 w tkance naczyniowej oraz zredukowanie nasilenia zmian apoptotycznych w śródbłonkach, a także redukcję średnicy i grubości ściany tętnicy po 72 godz. od doświadczalnego SAH. Wydaje się, że CHOP może odgrywać istotną rolę nie tylko we wczesnym uszkodzeniu mózgu po SAH, ale i w mechanizmie apoptotycznego uszkodzenia śródbłonnków naczyniowych, będącym podstawą rozwoju skurczu naczyń mózgowych po krwotoku podpajęczynówkowym. CHOP może stanowić cel interwencji terapeutycznej opartej na wyciszeniu ekspresji genu. **(Publikacja IIA52)** "*CHOP Silencing Reduces Acute Brain Injury in the Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage.*" *Stroke*, 2012, 43, 484-490. **(Publikacja IIA53)** "*Targeting C/EBP homologous protein with siRNA attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage.*" *Exp Neurol*, 2012, 238, 218-224.

Z badań przeprowadzonych w ostatnich latach wynika, że również immunomodulacja może być podstawą opracowania nowych terapii w SAH. Postanowiono zastosować immunomodulację za pomocą statyn, które mają właściwości zmieniania kompozycji podtypów limfocytów T pomocniczych z Th1, które mogą promować nasiloną odpowiedź immunologiczno-zapalną w kierunku mniej agresywnych, immunomodulacyjnych Th2. W procesie tym uczestniczy transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor β 1*; TGF- β 1), wydzielany przez limfocyty Treg (regulujące negatywnie wydzielanie cytokin Th2). Th2 wydaje się korzystniej wpływać na przeżycie neuronów i regenerację OUN niż Th1 (Hendrix & Nitsch, 2007). Simvastatyna zmniejszała upośledzenie neurologiczne zwierząt laboratoryjnych po SAH. Towarzyszyła temu zwyżka poziomów TGF-1 β w korze mózgu i pniu mózgu, przy obniżeniu interleukiny 1 β (IL-1 β), związanej z odpowiedzią Th1. W barwieniach podwójnych immunofluorescencyjnych wzmożenie sygnału TGF-1 β kolokalizowało z markerem limfocytów T. Tym samym wykazano, że statyny niosą potencjał immunomodulacyjny dla poprawy stanu neurologicznego po krwotoku podpajęczynówkowym. **(Publikacja IIA54)** "*Statin-induced T-lymphocyte modulation and neuroprotection following experimental subarachnoid hemorrhage.*" *Acta Neurochir Suppl.*, 2013, 115, 259-266.

Stosowano również myszy model SAH do badań neuroprotekcji, uzyskiwanej poprzez gazy anestetyczne. Zbadano efekt izofluranu na wykładniki reakcji zapalnej mózgu po SAH. Izofluran, podany przez godzinę począwszy od 1 godziny od krwotoku, działał obniżająco na poziomy markerów komórek zapalnych- mieloperoksydazy (MPO), cząsteczki adaptorowej wiążącej zjonizowany wapń 1 (ang. *ionized calcium binding adaptor molecule-1*; Iba-1), oraz cytokin - czynnika nekrozy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* ; TNF- α),

interleukiny 1 β (IL-1 β), a także cząsteczek adhezji komórkowej, włączając cząsteczkę adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*; ICAM-1) i selektynę P, oraz induktorów zapalnych - COX-2 i ufosforylowanej kinazy białkowej fosforylującej N-koniec białka Jun (JNK; *phosphorylated c-Jun N-terminal kinase*) w 24 godz. po krwotoku. Równoległe obniżył on ciężkość stanu neurologicznego i obrzęku mózgu. Kliniczne efekty izofluranu były zablokowane przez dokomorowe podanie inhibitora kinazy sfingozynowej DMS, a także antagonistę sfingozyno-1/3-fosforanu VPC23019, które także wzmogły ekspresję ICAM-1 oraz IL-1 β . Uzyskane rezultaty świadczą o tym, że izofluran może hamować reakcje zapalną mózgu na SAH poprzez aktywację szlaku kinazy sfingozynowej. **(Publikacja IIA58)** *"Isoflurane on brain inflammation."* *Neurobiol Dis*, 2014, 62, 365-371.

Badania poświęcone SAH stały się przedmiotem kilku prac poglądowych. W artykule, skupiającym się na wczesnych stadiach po SAH, opisano wieloczynnikowość patogenezy krwotocznego uszkodzenia mózgu. W pracy tej podkreślono znaczenie ostrej ischemii po SAH dla obrazu uszkodzenia mózgu, w odróżnieniu do dotąd wiodącej roli, przypisywanej późnemu skurczowi naczyń mózgowych. **(Publikacja IIA15)** *"Molecular Mechanisms for Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage."* *Neurol Res*, 2006, 28, 399-414.

Wobec złożoności mechanizmów patogenetycznych uszkodzenia mózgu po SAH dokonano przeglądu modeli SAH pod kątem ich przydatności do modelowania różnych stadiów krwotoku **(Publikacja IIA28)** *"Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm."* *Neurol Res*, 2009, 31, 568-581. W oparciu o dane z krwotoku doświadczalnego dokonano również analizy możliwości zastosowań oraz skuteczności tlenu hiperbarycznego w zapobieganiu i leczeniu ostrych uszkodzeń krwotocznych, a także skurczu naczyniowego oraz wywołanego nim niedokrwienia mózgu po krwotoku. W pracy tej zasugerowano aspekt kondycjonujący użycia HBO po SAH, jako przeciwdziałający rozwinięciu się i konsekwencjom skurczu naczyń mózgowych w następstwie krwawienia do przestrzeni podpajęczynówkowej. **(Publikacja IIA46)** *"Hyperbaric Oxygen for Cerebral Vasospasm and Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage."* *Transl Stroke Res*, 2011, 3, 316-327.

Neuroprotekcja w krwotoku śródmózgowym

Podjęto badania potencjalnych terapii uszkodzenia mózgu również po krwotoku śródmózgowym (ang. *intracerebral hemorrhage*; ICH), który jest częstszy u ludzi niż podpajęczynówkowy i obarczony wysoką śmiertelnością. Postanowiono zastosować apocyninę, będącą inhibitorem oksydazy NADPH, w celu zmniejszenia stresu oksydacyjnego w doświadczalnym krwotoku śródmózgowym.

Wykazano brak istotnego wpływu apocyniny na oksydazę NADPH, jednakże etanol, początkowo użyty jako nośnik apocyniny, wykazał działanie neuroprotekcyjne, skutkujące redukcją deficytu neurologicznego i obrzęku mózgu. Działanie etanolu nie wiązało się z redukcją peroksydacji lipidowej, ani wpływem na oksydazę NADPH. Wyniki te mogły przyczynić się do dalszego rozwoju badań nad neuroprotekcyjnym działaniem etanolu, których przykłady można znaleźć w bardzo niedawnych publikacjach innych autorów (Qi et al, 2010; Wang et al, 2012). **(Publikacja IIA17)** *"Effects of Apocynin and ethanol on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats."* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34, 356-361.

Oprócz badań czynników odpowiedzialnych za wytwarzanie wolnych rodników w patogenezie uszkodzeń mózgu po krwotoku śródmózgowym, postanowiono zbadać wpływ egzogennych antyoksydantów enzymatycznych: miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej, połączonej kowalentnie z lecytyną (PC-SOD) oraz katalazy, połączonej z łańcuchem glikolu polietylenowego (PEG-CAT), na poziom produktów rozpadu związków lipidowych, obrzęk mózgu i deficyt neurologiczny. Wyniki badań wykazały, że PC-SOD i PEG-CAT podane bezpośrednio po krwotoku, wywołanym przez kolagenazę bakteryjną, nie miały istotnego wpływu na uszkodzenie mózgu. Negatywne wyniki podawania czynników hamujących wytwarzanie wolnych rodników, jak i podania egzogennych antyoksydantów, zasugerowały śledzenie innych podejść terapeutycznych niż walka ze stresem oksydacyjnym po ICH. **(Publikacja IIA24)** *“The Effects of Superoxide Dismutase and Catalase Derivates on Intracerebral Hemorrhage-Induced Brain Injury in Rats.” Acta Neurochir Suppl., 2008, 105, 33-35.*

Badania na modelu kolagenazowym krwotoku wykazały również brak skuteczności amantadyny, która poprzez modulację receptorów NMDA mogłaby wpływać na rozległość uszkodzeń po krwotoku śródmózgowym. Jednak ani spadek obrzęku mózgu, ani poprawa funkcji neurologicznej nie były odnotowane w grupie leczonej **(Publikacja IIA25)** *“Effects of Amantadine Sulphate on Intracerebral Hemorrhage-induced Brain Injury in Rats.” Acta Neurochir Suppl., 2008, 105, 119-124.*

Postulowano zatem, że po krwotoku śródmiąższowym mózgu dominuje nasilona reakcja zapalna związana z krwiakiem, w której wiodącą jest komponenta komórkowa. Postawiono też hipotezę, że infiltracja zapalna oraz produkcja i uwalnianie cytokin zapalnych odbywa się poprzez działanie granulocytów obojętnochłonnych. Założono, że znokautowanie ich zasadniczej molekuly adhezji CD18 pozbawi lub znacznie ograniczy możliwość ich interakcji z komórkami śródbłonna mikronaczyń, a co za tym idzie, zmniejszy naciekanie uszkodzonej tkanki przez te komórki. Wyniki potwierdziły istotną skuteczność nokautu CD18 w ograniczaniu obrzęku mózgu oraz redukowaniu śmiertelności i wykazały tendencję do poprawy neurologicznej oraz zmniejszenia aktywności MPO, jak też immunoreaktywności MPO oraz nitrotyrozyny. Na tle tych wyników, białko CD18 jawi się jako istotny komponent cząsteczek adhezyjnych, biorących udział w odpowiedzi mózgu na krwotok śródmiąższowy. **(Publikacja IIA22)** *“Deficiency of CD18 Gene Reduces Brain Edema in Experimental Intracerebral Hemorrhage in Mice.” Acta Neurochir Suppl., 2008, 105, 85-88.* **(Publikacja IIA23)** *“Reduced brain injury in CD18 deficient mice after intracerebral hemorrhage.” J Neurosci Res, 2008, 86, 3240-3245.*

W leczeniu eksperymentalnego ICH zastosowano też izofluran, który spowodował zmniejszenie liczby komórek TUNEL pozytywnych oraz podwójnie znakowanych TUNEL/MAP2 (ang. *microtubule-associated protein 2*) w mózgu, oraz redukcję obrzęku mózgu, jak i deficytu neurologicznego. Przy czym bardziej korzystną okazała się ekspozycja 1 godzinna od 2 godzinnej. Izofluran, po ustaleniu optymalnego protokołu leczenia, mógłby stać się środkiem neuroprotekcji pokrwotocznej poprzez działanie antyapoptotyczne i dużej dostępności klinicznej. **(Publikacja IIA42)** *“Isoflurane as a post-treatment therapeutic modality reduces brain injury after intracerebral hemorrhagic stroke in mice.” Anesth Analg, 2011, 113, 343-348.*

Jednym z interesujących aspektów ICH jest jego szczególna epidemiologia. W jednej z naszych prac wykazano, że płeć żeńska i stan po porodzie kreuje czynniki podwyższające ciężkość uszkodzenia mózgu w wyniku krwotoku do mózdzku. Poprzez porównanie samic w połogu i samców o równoważnej masie ciała, stwierdzono większą śmiertelność, gorszą punktację neurologiczną i większą objętość krwiaka po takiej samej dawce kolagenazy. Ponadto u samic popołogowych bez krwotoku poziom AQP4 w mózdzku był istotnie wyższy, a białka obwódki zamykającej (ang. *zonula occludens protein 1*; ZO-1) niższy niż u kontrolnych samców (**Publikacja IIA44**) "*The Postpartum Period of Pregnancy Worsens Brain Injury and Functional Outcome After Cerebellar Hemorrhage in Rats.*" *Acta Neurochir Suppl.*, 2011, 111, 37-41.

Prace nad czynnikami neuroprotekcijnymi w ICH kontynuowano przy zastosowaniu inhalacji 2% wodorem. Wodór obniżył procentową zawartość wody w korze mózgowej i jądrach podstawy i wywołał poprawę stanu funkcjonalnego myszy z ICH po 24 godz. lecz nie po 72 godz. od krwawienia. Ponadto, tylko 1 godz. (lecz nie 2 godz.) inhalacja wodorowa dała istotne zmiany. Sama terapia wodorowa nie okazała się wystarczająca, aby efekt leczniczy był równie silny w 3 dobie po krwotoku. Biorąc jednak pod uwagę silny efekt neuroprotekcyny wodoru inhalacyjnego w okresie ostrym, może on stanowić cenne leczenie wspomagające obok ewakuacji krwiaka w niektórych przypadkach krwotoku do mózgu. (**Publikacja IIA45**) "*Hydrogen Inhalation is Neuroprotective and Improves Functional Outcomes in Mice After Intracerebral Hemorrhage.*" *Acta Neurochir Suppl.*, 2011, 111:179-183.

Doświadczalny ICH stał się również obiektem badań z użyciem immunomodulacji. Postanowiono zastosować FTY720, znany również jako fingolimod, analog fosforanu sfingozyny, (ang. *sphingosine 1-phosphate*; S1P) który poprzez interakcję z receptorami S1P hamuje wyjście limfocytów z centralnych i obwodowych narządów limfoidalnych. W badaniach ICH po podaniu fingolimodu stwierdzono zmniejszenie nacieku limfocytów z markerem CD3 w mózgu oraz zredukowaną limfocytozę w 72 godz. po krwotoku. Co więcej, fingolimod redukował obrzęk mózgu i dawał poprawę funkcji OUN zarówno we wczesnym okresie 24-72 godz., jak i po 8 tygodniach po krwotoku. Przy pomocy Western blot stwierdzono, wywołaną przez fingolimod, redukcję poziomu cząsteczek adhezji międzykomórkowej-1, interferonu γ i interleukiny-17 w jednoimiennej półkuli mózgu 72 godz. po krwotoku. Wyniki badań wskazują, że modulacja limfocytarna przez fingolimod może stanowić efektywną strategię redukcji uszkodzenia mózgu i stymulacji regeneracji funkcji OUN po krwawieniu śródmózgowym. (**Publikacja IIA47**) "FTY720 is Neuroprotective and Improves Functional Outcomes after Intracerebral Hemorrhage in Mice." *Acta Neurochir Suppl.*, 2011, 111, 213-217. (**Publikacja IIA57**) "*Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage.*" *Exp Neurol*, 2013, 241, 45-55.

Postanowiono także powrócić do idei leczenia HBO w krwawieniu śródmózgowym, tym bardziej, że grupa prof. Xi z Uniwersytetu Michigan uzyskała różne efekty HBO, który osłabiał lub nasilał obrzęk mózgu w zależności od rodzaju podawanych komponentów krwi (Qin et al, 2008). Wykazano, że HBO powodował poprawę funkcji poznawczych badanych 3 tyg. po krwotoku w noworodkowym modelu krwotoku do podwyściółkowej strefy germinacyjnej (badania w labiryncie T i basenie Morrissa), a poprawę funkcji czuciowo-

ruchowych w 4 tyg. po krwotoku. Miał też działanie redukujące zarówno atrofię mózgu, jak i splenomegalię, oraz przerost serca w tym samym czasie. **(Publikacja IIA43)** “*Beneficial Effect of Hyperbaric Oxygenation After Neonatal Germinal Matrix Hemorrhage.*” *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 111, 253-257.

Tlen hiperbaryczny w procedurach transplantacji wysepek trzustkowych

Wciąż poszukiwane są metody, które mogłyby polepszyć wyniki przeszczepiania wysepek trzustkowych, których komórki β przechodzą po przeszczepie masową apoptozę i nekrozę na tle potransplantacyjnej hipoksji (Biarnes et al, 2002; Zheng et al, 2012). Przeszczepy syngenicznych wysepek trzustkowych (w liczbie 400) wykonano pod torebkę nerkową w modelu mysim (myszy balb/c) cukrzycy streptozotocynowej. W obrębie przeszczepionych wysepek, poziom HIF-1 α wzrósł 3 dnia po transplantacji, razem z intensywnością TUNEL i proapoptotycznym białkiem BNIP3, regulowanym przez HIF-1. Obniżyła się również tkankowa ekspresja insuliny, a wzmogła apoptoza komórek β . Siódmego dnia obserwowano wzrost poziomów czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*; NGF) oraz czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla trzustki i komórek β -1 (ang. *pancreatic and duodenal homeobox factor-1*; PDX-1) wraz z rozpoczęciem przebudowy unaczynienia przeszczepionych wysepek. Obserwowano również przyrost poziomu VEGF z intensywnym rozwojem nowych naczyń przy zmniejszeniu poziomu HIF-1 α . Tlen hiperbaryczny przy 2,5 ATA, stosowany 2 razy dziennie po godzinie zredukował poziom HIF-1 α i liczbę komórek apoptotycznych oraz wzmógł sekrecję insuliny. W 14 dniu tlen hiperbaryczny poprawił kontrolę glikemii nawet u osobników z marginalną liczbą przeszczepionych wysepek. Wnioskowano, że wczesna terapia tlenem hiperbarycznym może zsupresjonować HIF-1 α w przeszczepie wysepek trzustkowych, redukując hipoksyjne uszkodzenie komórek β . **(Publikacja IIA13)** “*Dynamic Production of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Early Transplanted Islets.*” *Am J Transplant*, 2006, 6, 2636-2643.

Jednakże wobec ograniczonej wartości translacyjnej przeszczepów pod torebkę nerkową, postanowiono zbadać podanie wysepek trzustkowych do żyły wrotnej (transplantacja 500 wysepek). Do oceny rezultatów przeszczepu użyto między innymi badanie dynamiczne rezonansu magnetycznego po podaniu środka kontrastującego (ang. *dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging*; DCE MRI). Poprzez zastosowanie HBO o podobnych jw. parametrach przez 6 dni po transplantacji uzyskano istotne obniżenie liczby komórek HIF-1 α pozytywnych oraz intensywności znakowania TUNEL w przeszczepionych wysepkach i otaczającej tkance wątrobowej. Ponadto, w tym czasie poziom insuliny w surowicy był podwyższony, a test tolerancji glukozy wykazywał istotną poprawę glikemii. Chociaż 7 dnia sygnał DCE MRI wskazujący na niedojrzałe naczynia był większy bez leczenia tlenem, to całkowita liczba naczyń okołowysepkowych była taka sama w obu grupach. Przemawia to za wpływem natlenienia hiperbarycznego na poprawę dojrzewania naczyń i zmniejszenie hipoksji w przeszczepionych wysepkach w krytycznych dniach po przeszczepie. **(Publikacja IIA35)** “*Hyperbaric Oxygen Treatment Improves Islet Function after Intra-Portal Transplantation.*” *Pediatr Diabetes*, 2010, 11, 471–478.

Neuroprotekcja w ogniskowym niedokrwieniu mózgu

Po kilkuletniej przerwie wznowiłem badania nad doświadczalnym ogniskowym niedokrwieniem mózgu. Początkowo współpracowałem z gronem badaczy, którzy podjęli próbę określenia substancji pośredniczącej w powstawaniu efektu hartowania tlenem hiperbarycznym (HBO-PC). W owym czasie dopiero zaczęto poznawać podwaliny tego wieloczynnikowego mechanizmu. Wyniki wskazały, że u podłoża tego procesu może leżeć aktywacja HIF-1 α . W pracy wykazano aktywację HIF-1 α samym hartowaniem hiperbaryczno tlenowym (wzrost poziomu białka i aktywności transkrypcyjnej), połączoną ze wzrostem ekspresji HIF-1 zależnego genu, erytropoetyny – (EPO; poziomu białka i mRNA) w korze i hipokampie mózgu. EPO, która reguluje proliferację, różnicowanie i dojrzewanie erytrocytów ma również właściwości neuroprotektoryjne poprzez szlak EPOR-PI3K-Akt/PKB (Juul & Felderhoff-Mueser, 2007). Natomiast po ogniskowej ischemii nastąpiło zmniejszenie obszaru zawału mózgu i deficytu neurologicznego pod wpływem hartowania. Sam mechanizm aktywacji HIF-1 α nie został dostatecznie poznany, ale przypuszcza się, że ma miejsce stabilizacja HIF-1 α przez wolne rodniki, powstające czasie natlenienia lub przestawienie progu detekcji hipoksji na wyższy poziom. **(Publikacja IIA19)** *“Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves up-regulation of hypoxia-inducible factor -1 α and erythropoietin in rats.” J Appl Physiol, 2008, 104, 1185-1191.*

Obiecujące wyniki opublikowanych prac laboratoryjnych i małych badań klinicznych, posiadające wartość translacyjną dla poszerzenia zastosowania tlenu hiperbarycznego w różnych jednostkach klinicznych, dały podstawę do zaproponowania wieloośrodkowych prób klinicznych z użyciem HBO w odrębnej publikacji. Dokonano w niej przede wszystkim nakreślenia warunków podjęcia badań, zasad rekrutacji pacjentów i organizacji badań oraz zawarto podłoże teoretyczne i dyskusję. **(Publikacja IIA41)** *“Neurologic Aspects of Hyperbaric Medicine – Proceedings. Hyperbaric oxygen for neurologic indications: Action Plan for Multicenter Trials in: Stroke, Traumatic Brain Injury, Radiation Encephalopathy and Status Migrainosus.” Undersea Hyperb Med, 2011, 5, 309-319.*

Wracając do badań nad HIF-1 w mózgu; wykazano, że w warunkach normoksyjnych istotnym elementem modulującym HIF-1 α może być również kwasica wywoływana acetazolamidem. Acetazolamid, używany do leczenia ostrej choroby wysokogórskiej, wywołał wzrost poziomu HIF-1 α oraz jego aktywności transkrypcyjnej w korze mózgu. Poziomy informacyjny RNA dla EPO, VEGF i transportera glukozy 1 (GLUT1) także wzrosły. W zakwaszonych hodowlach normoksyjnych wykazano, że wyindukowany HIF-1 α aktywuje ekspresję acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT) z plazmidu CAT, zawierającego wbudowaną sekwencję elementu odpowiedzi na hipoksję promotora VEGF. Badania innych autorów wykazały, że kwasica neutralizuje funkcję ligazy E3 ubikwitynowej von Hippel Lindau, która odgrywa ważną rolę w degradacji proteosomalnej HIF-1 α (Mekhail et al, 2004). Zasugerowano, że aktywacja HIF-1 α i genów mu podległych może leżeć u podłoża mechanizmu leczenia choroby wysokogórskiej przez acetazolamid, jako wspomagającego reakcję adaptacyjną do warunków hipoksji wysokościowej. **(Publikacja IIA29)** *„Normoxic induction of cerebral HIF-1 α by acetazolamide in rats: Evidence for acidosis.” Neurosci Lett, 2009, 451, 274-278.*

Rola HIF-1 α w stanach niedotlenienia wydaje się dwukierunkowa: zarówno adaptacyjna, jak i proapoptotyczna. Jego wybitnie nasiloną ekspresją w komórkach, przekraczająca ramy

adaptacyjne, może przyczyniać się do ich uszkodzenia. W naszych badaniach okazało się, że supresja HIF-1 α i jego genów podległych może prowadzić do zahamowania transformacji krwotocznej zawału mózgu, wywołanego zamknięciem tętnicy środkowej mózgu (ang. *middle cerebral artery occlusion*; MCAO), skojarzonym z hiperglikemią w warunkach doświadczalnych. Zastosowane inhibitory HIF-1 α , 2ME2 oraz YC-1, podane na początku reperfuzji, zredukowały poziomy białka HIF-1 α , VEGF oraz deficyt neurologiczny i obszar martwicy po 24 i 72 godzinach od udaru. 2ME2 spowodował zmniejszenie transformacji krwotocznej. Pod wpływem 2ME2 redukcji również uległy poziomy MMP-2 oraz MMP-9 w półkuli jednoimiennej. Wyniki pracy stwarzają sugestię, że inhibitory HIF-1 α powinny być przebadane pod kątem ewentualnego wykorzystania w zapobieganiu konwersji krwotocznej udaru niedokrwiennego w warunkach klinicznych. **(Publikacja IIA31)** *“Suppression of HIF-1 α and its Downstream Genes Reduces Acute Hyperglycemia-Enhanced Hemorrhagic Transformation in a Rat Model of Cerebral Ischemia.” J Neurosci Res., 2010, 88, 2046-2055.*

Podobny efekt ograniczenia ukrwotocznienia ogniska niedokrwiennego udaru uzyskano, gdy podano mieszaninę gazów inhalacyjnych, zawierających 2,9% wodoru. Jedno- lub dwugodzinna inhalacja w komorze wodorowej zredukowała zawartość wynaczonej krwi w ognisku niedokrwiennym. Jednak tylko inhalacja 2 godzinna znamienne zredukowała obszar zawału oraz deficyt neurologiczny w 24 godz. po reperfuzji. W mózgu zmniejszona przy tym była immunoreaktywność 8-oksoguaniny oraz poziomy 4-hydroksynonenalu oraz 3-nitrotyrozyny, wykładników uszkodzeń wolnorodnikowych kwasów nukleinowych, lipidów oraz białek. Można zatem sądzić, że poprawa w udarze niedokrwiennym za sprawą leczenia wodorem dokonała się przez neutralizację rodnika hydroksylowego i nadtlenoazotynu, a w konsekwencji obniżenia uszkodzenia bariery krew-mózg. Wymaga to jednak dalszych badań jako że niektóre istotne badane wykładniki wzrostu przepuszczalności BBB nie uległy modyfikacji pod wpływem leczenia wodorem. **(Publikacja IIA30)** *„Hydrogen Gas Reduced Acute Hyperglycemia-Enhanced Hemorrhagic Transformation in a Focal Ischemia Rat Model.” Neuroscience, 2010, 169, 402-414.*

Również za pomocą modelu wtórnie ukrwotoczonego ogniska niedokrwiennego wykazano, że HBO-PC zmniejsza rozległość zawału mózgu, deficyt neurologiczny oraz, w mniejszym stopniu, redukuje ukrwotocznienie zawału po 24 godzinach od indukcji niedokrwienia. Jednakże nie wykazano udziału postulowanego mechanizmu ochronnego, opartego na transkrypcyjnym czynnikiem jądrowym 2 związanym z NF-E2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; Nrf2) i podległej mu HO-1, mimo, że wcześniej inni autorzy wykazali, że czynniki te mogą być indukowane w warunkach natlenienia hiperbarycznego (Godman et al, 2010). **(Publikacja IIDb3)** *“Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hyperglycemia enhanced hemorrhagic transformation after transient MCAO in rats.” Med Gas Res, 2012, 2, 9. doi:10.1186/2045-9912-2-9.*

Co ciekawe, ekspozycja na promieniowanie jonizujące także może mieć efekt hartujący przeciw niedokrwieniu mózgu. Dawką 8Gy z akceleratora protonowego, podaną 10 dni przed doświadczalnym udarem, uzyskano zmniejszenie lezji niedokrwiennej w badaniu T2 rezonansu magnetycznego, znamienne w 2 dniu po udarze wskutek MCAO i z tendencją do redukcji w 14 i 28 dniu. Inwolucja zmian poniedokrwiennych wykazała silniejszą akcelerację u napromieniowanych. W tej grupie rzeczywisty współczynnik dyfuzji wzrósł wokół lezji w dniu 2, a w ognisku niedokrwienia w dniu 14 i 28, co może odzwierciedlać zredukowaną

reakcję glejową. Obserwowano też histologicznie zmniejszenie rozległości martwicy i spadek liczby komórek z popękany DNA w badaniu TUNEL w 28 dniu po ischemii. Uzyskano także zmniejszenie blizny glejowej około lezji, co może być zjawiskiem przyczyniającym się do neuroprotekcji radiacyjnej po udarze. Hartowanie napromienieniem, jako metoda neuroprotekcyjna, wydaje się zasługiwać na dalsze badania. **(Publikacja IIA36)** “*Radiation Exposure Prior to Ischemia decreases lesion volume, cytotoxic Edema and Cell Death.*” *Acta NeurochirSuppl.*,2010,106,51-53.**(Publikacja IIA49)** “*Brain irradiation improves focal cerebral ischemia recovery in aged rats.*” *J Neurol Sci*, 2011, 306:143-153.

Napromienianie postanowiono wykorzystać w innym paradygmacie podejścia do leczenia udarów, mianowicie jako środek do zmniejszenia liczebności komórek immunologicznych w śledzionie. Badania innych autorów wykazały, że w odpowiedzi na udar mózgu, śledziona uwalnia komórki immunologiczne, które z krwiobiegiem przemieszczają się do mózgu naciekając jego tkanki i powodując zapalenie. Wcześniej autorzy sugerowali, że usunięcie śledziony może poprawić stan neurologiczny po udarze (Ajmo et al, 2008). Jednakże zaproponowana metoda chirurgiczna splenektomii jest zbyt obciążająca dla pacjenta, a doświadczalnie była przeprowadzona przed udarem, co ogranicza znaczenie translacyjne dla kliniki neurologicznej.

Napromienienie śledziony stało się podstawą projektu autorskiego, dotyczącego nowej techniki leczenia udaru. Użyto napromienienie okolicy śledzionowej Co-60 przez kolimator, w dawce 8Gy, po określeniu lokalizacji śledziony obrazowaniem CT. Grupa zwierząt z nieleczoną ischemią otrzymała napromienienie rzekome. Przez zastosowanie napromienienia kobaltem Co-60 po 3 lub 4 godz. od niedokrwienia ogniskowego wywołanego przez 120 min MCAO, po 2 dniach uzyskano zmniejszenie objętości lezji w barwieniu chlorkiem tetrazoliowym, oraz redukcję liczby komórek TUNEL pozytywnych. Odnotowano zmniejszenie wielkości śledziony i spadek liczebności komórek immunologicznych w jej obrębie, a w mózgu zredukowanie liczby limfocytów T oraz komórek zapalnych i neuronów z cechami apoptozy. Obniżenie poziomu limfocytów we krwi korelowało ze zmniejszeniem masy śledziony po napromienieniu. Zwracała uwagę mnogość komórek apoptotycznych w śledzionach napromienionych w 4 godz. po ischemii, wobec niewielkiej liczby przy napromienieniu w późniejszym czasie. Jako przyszły kierunek badań zaproponowano zastosowanie napromienienia protonowego śledziony, jako pozwalającego uzyskać dokładniejsze kształtowanie wiązki promieniowania i redukcję dawki otrzymywanej przez tkanki sąsiadujące. **(Publikacja IIA56)** “*Acute splenic irradiation reduces brain injury in the rat focal ischemic stroke model.*” *Transl Stroke Res*, 2013, 3(4), 473-481.

Neuroprotekcja w niedotlenieniu noworodkowym

Pracę nad doświadczalnym niedotlenieniem noworodkowym zaczęto od analizy udziału HIF-1 w mechanizmach okołoporodowego uszkodzenia mózgu. Przegląd literatury pozwolił na dogłębne zapoznanie się ze specyfiką szlaków sygnałowych w tym rodzaju uszkodzenia i przez to kompetentny udział w dalszych projektach. **(Publikacja IIA26)** „*Prodeath or prosurvival: two facets of hypoxia inducible factor-1 in perinatal brain injury.*” *Exp Neurol*, 2009, 216, 7-15.

Pierwszym projektem badawczym neonatologii eksperymentalnej było zbadanie odpowiedzi niedojrzałego mózgu w 10 dniu po urodzeniu (P10) u szczura na leczenie 2,9% wodorem w uszkodzeniu, spowodowanym umiarkowaną i ciężką hipoksją-ischemią (umieszczenie w atmosferze 8% tlenu przez 120 lub 150 minut w połączeniu z permanentnym zamknięciem tętnicy szyjnej wspólnej). W badaniach nie stwierdzono jednak pozytywnego efektu inhalacji wodorowej na obszar martwicy w mózgu, czy poziom MDA w półkulach mózgu, jako korelatu peroksydacji lipidów po 24 godz. od niedotlenienia, a nawet nastąpiło powiększenie rozległości udaru w przypadku zastosowania wodoru przed niedotlenieniem. Natomiast u szczurów dorosłych z okluzją tętnicy środkowej mózgu wystąpiła jedynie tendencja w kierunku zmniejszenia rozległości udaru, chociaż znamieny efekt raportowano we wcześniejszych pracach innych autorów (Ohsawa et al, 2007). W oparciu o wyniki naszej pracy wnioskowano, że wodór może nie stanowić łagodnej formy terapii noworodków. U podstaw braku efektu leczniczego może leżeć przekroczenie potencjału terapeutycznego wodoru wobec średniego i ciężkiego stopnia niedotlenienia u niedojrzałych osobników. **(Publikacja IIA27)** *“Hydrogen Gas Is Ineffective in Moderate and Severe Neonatal Hypoxia-Ischemia Rat Models.” Brain Res, 2009, 1259, 90-97.*

Postanowiono wobec tego podjąć próby zmniejszenia komponenty zapalnej, silnie wyrażonej w noworodkowym uszkodzeniu niedotlenieniowym mózgu w warunkach doświadczalnych. Postawiono hipotezę, że centralną rolę mediatora zapalnego w niedotlenieniu okołoporodowym pełni COX-2. Jest ona formą indukowalną enzymu, która to indukcja zachodzi intensywnie po niedotlenieniu, a jej produkty enzymatyczne w podwyższonym stężeniu wykryto w płynie mózgowo-rdzeniowym u noworodków z hipoksją. Efekt inhibicji COX-2 był wcześniej badany przez innych autorów i okazał się korzystny w uszkodzeniu OUN u osobników dorosłych (Sugimoto & Iadecola, 2003). W przeprowadzonych przez nas badaniach, selektywny inhibitor COX-2, NS398 zredukował ilość makrofagów, mikrogleju i naciekających granulocytów obojętnochłonnych z towarzyszącym zmniejszeniem poziomu IL-6 w mózgu 3 dni po 120 minutowym niedotlenieniu z zamknięciem prawej tętnicy szyjnej wspólnej szczura P10. W grupie leczonej stwierdzono mniejszą redukcję wagi mózgu i zmniejszenie objętości zawału po 2 tyg. Podanie NS398 przyniosło też poprawę rozwoju somatycznego oraz istotne polepszenie funkcji neurologicznej po 6 tyg. od niedotlenienia. Można sądzić, że wyniki tych badań mogą stworzyć podwaliny dla badań inhibitorów COX-2 w hipoksyjnej encefalopatii noworodkowej w warunkach klinicznych. **(Publikacja IIA33)** *“Cyclooxygenase-2 inhibition provides lasting protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury.” Crit Care Med, 2010, 38, 572-578.*

Dokonano przy tym przeglądu prac naukowo-badawczych, dotyczących roli procesów zapalnych w uszkodzeniu OUN po niedotlenieniu noworodkowym, **(Publikacja IIA40)** *“The Evolving Landscape of Neuroinflammation after Neonatal Hypoxia-Ischemia.” Acta Neurochirur Suppl, 2011, 111, 93-100.*

W dalszym etapie badań poszukiwano substratu komórkowego nasilonych zmian zapalnych w mózgu po niedotlenieniu noworodkowym. Postawiono hipotezę, że rezerwuarem immunologicznych komórek prozapalnych jest śledziona. Jej chirurgiczna eliminacja, przeprowadzona trzy dni przed indukcją niedotlenienia, spowodowała znaczne zmniejszenie objętości lezji mózgu w 72 godz. po niedotlenieniu. Splenektomia spowodowała również

spadek liczebności limfocytów T i komórek NK wraz z supresją poziomów COX-2, mediatora zapalnego IL-15, i markerów apoptozy w mózgu (aktywna kaspaza-3, TUNEL w neuronach), przy tym wzrosła ekspresja pro-życiowych kinaz PI3K/Akt (3-kinazy fosfatydyloinozytolu/kinazy Akt) w półkulach mózgu po stronie uszkodzenia po 3 dniach po hipoksji.

Warto przy tym podkreślić, że redukcję ekspresji COX-2 wykazywały komórki nacieku immunologicznego, natomiast ekspresja IL-15 spadła w astrocytach. Ponadto, inne komórki prozapalne, włączając granulocyty obojętnochłonne, makrofagi i mikroglej również były znajdowane w mniejszej liczbie w tkankach mózgu po niedotlenieniu ze splenektomią. Podobny efekt w zakresie normalizacji COX-2 uzyskano poprzez wyciszenie genowe CD161 (potwierdzone w RT-PCR), który odpowiada za aktywację komórek NK i uwalnianie cytokin (Montaldo et al, 2012). Splenektomia przyniosła poprawę rozwoju somatycznego i funkcjonalnego badanych zwierząt w 3 tyg. po niedotlenieniu. Można sądzić, że splenektomia, poprzez redukcję nacieku komórek immunologicznych, może zmniejszać rozmiar zapalenia mózgu i apoptotycznej śmierci komórek przez hamowanie interakcji COX-2-interleukina-15 po niedotlenieniu noworodkowym. Dalszych badań wymaga szczegółowe określenie, które funkcje i podtypy komórek immunologicznych śledziona pełnią rolę niszczącą po niedotlenieniu noworodkowym. **(Publikacja IIA55)** "Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia." *Transl Stroke Res*, 2013, 4, 208-219.

Na podstawie badań własnych oraz innych autorów można wysnuć tezę, że czynniki modulujące komórki zapalne mogą wywierać efekt neuroprotekcyny w niedotlenieniu noworodkowym. Obiecującym lekiem eksperymentalnym w leczeniu niedokrwienia mózgu jest czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang: *granulocyte colony-stimulating factor*; G-CSF). Jest to aktywator komórek progenitorowych dla granulocytów, prowadzący do wytwarzania i uwalniania do krwi dojrzałych granulocytów obojętnochłonnych (Panopoulos & Watovich, 2008). Postawiono hipotezę, że może on mieć również działanie neuroprotekcyny w eksperymentalnym niedotlenieniu noworodkowym poprzez wpływ regulujący na hormony osi podwzgórze-przysadka-nadnercze. G-CSF oraz metyrapone, który hamuje syntezę i uwalnianie kortykosteronu na poziomie nadnerczowym, obniżyły rozległość udaru. G-CSF obniżył przy tym hipoksyjny wzrost kortykosteronu we krwi po 4 i 24 godz. od niedotlenienia, nie mając wpływu na poziom ACTH. Jednak kiedy G-CSF podany był z deksametazonem, rozległość udaru nie była zredukowana. Podanie G-CSF przyniosło również redukcję ilorazu Bax (ang. *Bcl-2 associated X protein*)/Bcl-2 i spadek ekspresji kaspazy-3 w półkulach mózgu objętych uszkodzeniem, a także poprawę stanu neurologicznego. Również i te efekty były zantagonizowane przez deksametazon. Nasze badania świadczą o tym, że osłabienie aktywności osi podwzgórze-przysadka-nadnercza przez podanie G-CSF skutkuje neuroprotekcją po niedotlenieniu noworodkowym. **(Publikacja IIA51)** "Role of the pituitary-adrenal axis in granulocyte-colony stimulating factor-induced neuroprotection against hypoxia-ischemia in neonatal rats." *Neurobiol Dis*, 2012, 47, 29-37.

Równolegle kontynuowano eksperymentalne leczenie gazami anestetycznymi. Hipoteza badawcza zakładała rolę szlaku, utworzonego przez S1P oraz PI3K i kinazę Akt w neuroprotekcji izofluranowej u szczura P10 po 2 godzinnej hipoksji. Fosforan sfingozyny, wiążąc się z receptorami S1P, reguluje wiele procesów - proliferacji, przeżycia, migracji i

apoptozy komórek poprzez kinazy PI3K/Akt (Kluk & Hla, 2002). Sfingozyna powstaje poprzez rozpad sfingomieliny za pośrednictwem sfingomielinazy. Izofluran nasila produkcję S1P poprzez aktywację kinazy sfingozyny (Lochhead & Zager, 1998). Jednogodzinna inhalacja izofluranem natychmiast po dokonany niedotlenieniu mózgu prowadziła do aktywacji szlaku bioaktywnego lipidu S1P i kinazy Akt oraz zmniejszenia rozmiarów lezji po 48 godz. od niedotlenienia. Izofluran poprawił też funkcje neurologiczne 4 tygodnie po niedotlenieniu. Izofluran w neuronach utrzymywał poziom ufosforylowanej Akt pomimo hipoksji i obniżył poziom kaspazy-3 w półkuli mózgu po stronie uszkodzenia. Osłabienie tych efektów uzyskano poprzez zastosowanie antagonisty S1P, VPC23019 oraz inhibitora PI3K, wortmaniny. Oba inhibitory zniosły redukujący efekt izofluranu na rozmiar martwicy mózgu oraz poprawę stanu neurologicznego po niedotlenieniu. Antagonista opioidowy nalokson nie zdołał odwrócić efektu neuroprotekcynowego izofluranu. Wyniki pracy sugerują, że podanie izofluranu zapewnia długotrwały efekt neuroprotekcynowy przeciw niedotlenieniu noworodkowemu z kluczową rolą dla aktywacji szlaku wyzwalanego przez sfingozyno-1-fosforan. **(Publikacja II A38)** “*Isoflurane post-treatment protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: Role of S1P/PI3K/Akt pathway.*” *Stroke*, 2010, 41, 1521-1527.

W leczeniu niedotlenienia noworodkowego postanowiono też zastosować metody niefarmakologiczne. Wybrano oddalone kończynowe postkondycjonowanie niedokrwienne. Jest to procedura zastosowana po wystąpieniu ciężkiego niedokrwienia witalnego narządu, kiedy krótki bodziec niedokrwienno innego narządu wytwarza ochronę owego witalnego narządu uprzednio zaatakowanego ciężkim niedokrwieniem. Zarówno fakt, że postkondycjonowanie niedokrwienne stosuje się po wystąpieniu bodźca uszkodzającego, jak i że wywoływania go przez niedokrwienie narządu innego niż uszkodzany, przemawiają na rzecz translacyjności tej metody. Nadal jednak niepoznane są mechanizmy, leżące u podłoża skuteczności tej metody w ograniczaniu rozmiarów uszkodzenia nerek, serca i mózgu przez niedokrwienie w warunkach eksperymentalnych i klinicznych.

Zastosowanie postkondycjonującej ischemii kończyny pozwoliło uzyskać obniżenie objętości zawału mózgu po 48 godz. od niedotlenienia oraz poprawić sprawność neurologiczną, badaną po 4 tyg. Postkondycjonowanie przywróciło poziom ufosforylowanej kinazy Akt po 24 i 48 godz. oraz obniżyło ekspresję Bax, nie mając jednak wpływu na ufosforylowane formy kinaz regulowanych zewnątrzkomórkowo 1/2 (ang. *extracellular signal regulated kinases 1/2*; ERK1/2) po 24 godz. od niedotlenienia. Obniżenie poziomu Bax może wynikać z działania pAkt, która fosforyluje Bax, zmniejszając jego okres półtrwania.

Założyliśmy, że w mechanizmie postkondycjonowania uczestniczą receptory opioidowe, które są sprzężone z białkami G i mogą aktywować PI3K/kinazę Akt przez uwolniony kompleks $\beta\gamma$. Istotnie, podanie antagonisty opioidowego naloksonu lub wortmaniny (inhibitora transdukcji sygnału PI3K) zniosło efekt neuroprotekcynowy, wskazując na udział receptorów opioidowych i PI3K w tym badanym szlaku neuroprotekcji. Ponadto morfina, podana podskórnie, również zredukowała objętość udaru, a wortmanina odwróciła ten efekt. Wyniki mogą wskazywać na to, że opioidy uwalniane z niedokrwionych kończyn służą do transferu cytoprotekcji między organami. **(Publikacja II A50)** “*Remote Limb Ischemic Postconditioning Improves Neurological Outcomes after Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury in Rat Pups by Opioid receptor/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt Signaling Pathway.*” *Stroke*, 2011, 42, 439-444.

Od początku mojego udziału w badaniach nad niedotlenieniem neonatalnym uczestniczyłem również w badaniu udziału metaloproteinaz macierzy (MMP) w mechanizmie uszkodzenia, spowodowanego niedotlenieniem niedojrzałego mózgu. Podwyższona ekspresja MMP-2 oraz MMP-9 może być szkodliwa dla mózgu po niedotlenieniu noworodkowym. Nie wiadomo jednak było w owym czasie, czy chroniczne niedotlenienie płodu zmienia ekspresję MMP i TIMP (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) w mózgu noworodka. W powziętym doświadczeniu niedotlenienie w ciąży spowodowało spadki całkowitej masy ciała i mózgu noworodków. Aktywność żelatynolityczna MMP-9 była podwyższona w dniach 0 i 4 po urodzeniu, a aktywność MMP-2 przy urodzeniu, podczas gdy ekspresja TIMP-1 oraz TIMP-2 była zredukowana w 0, 4 i 7 dniu życia. Co do ekspresji tkankowej MMP, dominowała lokalizacja okołohipokampalna w astrocytach. W tych samych dniach odnotowano wzrost liczby martwych komórek w hipokampie. U podłoża tego zjawiska może leżeć obniżenie poziomu TIMP-1, który ma właściwości antyapoptotyczne. Wykryto również pogorszenie siły chwytnej za pomocą testów neurobehawioralnych. Ta pierwsza praca, demonstrująca zachwianie balansu między MMP a TIMP, spowodowane chronicznym niedotlenieniem u matki, podpowiada kierunek eksperymentalnych wewnątrzmacicznych interwencji terapeutycznych, nakierowanych na ograniczenie zewnątrzkomórkowej proteolizy poprzez wzbudzenie aktywności jej endogennych inhibitorów. **(Publikacja IIA37)** *“Maternal hypoxia increases the activity of MMPs and decreases the expression of TIMPs in the brain of neonatal rats.” Dev Neurobiol, 2010, 70, 182-194.*

Wyniki tych badań przyniosły potrzebę znalezienia leczenia, które jest nakierowane na zwalczanie niedoboru tlenu oraz mediatorów uszkodzenia mózgu, związanych z macierzą zewnątrzkomórkową. Dlatego też wybrano leczenie egzogenną EPO. Zamierzono zbadać odpowiedź osi MMP-TIMP, jako biorącej udział w mechanizmie leczenia erytropoetyną 2,5 godz. niedotlenienia noworodkowego modelowanego u szczura P10 i w hodowli komórkowej poddanej 2 godz. deprywacji tlenu i glukozy (ang. *oxygen and glucose deprivation*; OGD). Fizjologicznie EPO jest genem odpowiedzi adaptacyjnej, regulowanym przez HIF-1 (Juul & Felderhoff-Mueser, 2007).

Nasze badania ujawniły, że w neuroprotekcji przeciw niedotlenieniu noworodkowemu, wywołanej podaniem EPO, krytycznymi komponentami są kinaza Janusa 2 (JAK-2) i regulowany przez nią TIMP-1. Podanie EPO *in vivo* spowodowało wzrost ekspresji i aktywności TIMP-1 oraz obniżenie aktywności MMP-9 w jednoimiennej korze mózgu, skojarzone z obniżeniem rozległości martwicy mózgu 48 godz. po niedotlenieniu. Podanie EPO wywołało też wzrost poziomu pJAK-2 w mózgu. *In vitro*, w komórkach PC12, 18 godz. po OGD z podaniem EPO obserwowano fosforylację JAK-2 i STAT-3, wzrost aktywności TIMP-1 oraz obniżenie aktywności MMP-9 razem ze wzrostem przeżywalności niedotlenionych komórek. Potwierdzono udział proponowanych mediatorów cytoprotekcji poprzez zastosowanie inhibitora JAK-2, AG490 lub przeciwciał neutralizujących TIMP-1, podanych razem z EPO w hipoksyjnej hodowli komórkowej, lub domózgowo, co zniosło neuroprotekcję erytropoetynową, odpowiednio *in vitro* oraz *in vivo*. Na podstawie wyników tych badań wnioskowano, że mediatorami neuroprotekcji uzyskanej podaniem EPO w niedotlenieniu noworodkowym są TIMP-1 oraz JAK-2 i STAT-3. **(Publikacja IIA48)** *“Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Mediates Erythropoietin-induced Neuroprotection in Hypoxia Ischemia.” Neurobiol Dis, 2011, 44, 28-37.*

Następnie podniesiono kwestię, czy EPO posiada wpływ na HIF-1 α . Wiadomo, że nadmierna aktywacja HIF-1 może wyzwolić kaskadę apoptotyczną, sformowaną przez BNIP3 oraz inne białka apoptotyczne (Schmidt-Kastner et al, 2004). W badaniach wstępnych stwierdzono, że chociaż EPO jest genem podległym HIF-1, to powoduje zahamowanie ekspresji HIF-1 α w 18 godz. po hipoksji i deprywacji glukozy *in vitro*, trwającej 2 godz. na zróżnicowanych komórkach PC-12. Postanowiono ustalić czynnik pośredniczący w tym zahamowaniu poprzez sprawdzenie hipotetycznego udziału hydroksylazy prolinowej 2 (PHD2). Stwierdzono, że EPO powoduje wzrost transkrypcji i translacji PHD2 oraz zahamowanie ekspresji białka (lecz nie mRNA) dla HIF-1 α , supresję formowania wolnych rodników i spadek aktywności MMP-9 w połączeniu ze wzrostem przeżycia komórek po OGD. Poziom HIF-2 α pozostał niezmieniony w czasie całego eksperymentu. Skuteczne wyciszenie genu PHD2 równoległe do podania EPO, spowodowało odwrócenie neuroprotekcji erytropoetynowej, skojarzone ze wzrostem poziomu mRNA i białka HIF-1 α oraz aktywności MMP-9 w warunkach hipoksyjnych. Również chimera EPOR, podana z EPO, podwyższyła poziom białka HIF-1 α oraz zredukowała poziom białka i mRNA dla PHD2. Pod wpływem jej działania podwyższeniu uległy też aktywności MMP-9 oraz wzrósł odsetek martwych komórek. Co więcej, samo EPO podwyższało poziom mRNA dla białka VHL (ang. *von Hippel Lindau tumor suppressor*), będącego częścią ligazy E3 ubikwitynowej, która jest efektem degradacji HIF-1 α . Jednakże nie powiodła się próba detekcji białka VHL w hodowanych komórkach, pozostawiając PHD2 z lepiej potwierdzonym udziałem w inhibicji HIF-1 α . W podsumowaniu eksperymentów wskazano na PHD2, jako wiodącą komponentę szlaku działania neuroprotekcijnego EPO. **(Publikacja IIA59)** *“Erythropoietin inhibits HIF-1 α expression via upregulation of PHD-2 transcription and translation in an in-vitro model of Hypoxia-Ischemia.”* *Transl Stroke Res*, 2014, 5, 118-127.

Neuroprotekcja w całkowitym niedokrwieniu mózgu

Ważnym zagadnieniem badawczym są markery i związki neuroprotekcyjne w całkowitym niedokrwieniu mózgu. W IMDiK PAN było ono uzyskiwane m.in. w modelu całkowitego zatrzymania krążenia krwi („cardiac arrest”). Począwszy od 2006 roku, na kalifornijskim Uniwersytecie Loma Linda zaadoptowano w badaniach model całkowitego niedokrwienia mózgu poprzez jednoczesne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych i kręgowych wg. Yamaguchi i wsp. (Yamaguchi et al, 2005).

Ten model został użyty do porównania dwóch odmiennych reżimów hartowania tlenem hiperbarycznym (oba dla 2,5 ATA): 5 sesji HBO, jedna dziennie, przy czym ostatnia sesja na 24 godziny przed niedokrwieniem (5HBO) lub 3 sesje w przeciągu 24 godzin: na 24 godz., 12 godz. i 4 godz. (3HBO) przed niedokrwieniem. Przez porównanie protokołu 3HBO z 5HBO stwierdzono wyższą skuteczność 5HBO na podstawie statystycznie znamiennej poprawy funkcji neurologicznej przy 24, 48 i 72 godzinach po ischemii, w odniesieniu do grup niehartowanych, podczas gdy 3HBO dało statystycznie istotną poprawę funkcji neurologicznej tylko po 24 godz. W barwieniach fluorescencyjnych obserwowano, że 5HBO wywołało większą niż 3HBO redukcję wczesnej apoptozy neuronów kory mózgu przed upływem 3 godz. od ischemii. **(Publikacja IIA20)** *“The hyperbaric oxygen preconditioning-*

induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia. “*Neurobiol Dis*, 2008, 29, 1-13.

Z użyciem tego modelu poddano także ocenie związku farmakologiczne, mające potencjał w leczeniu skutków globalnej ischemii mózgu. Związkiem mogącym budzić nadzieje na poprawę stanu neurologicznego po całkowitym niedokrwieniu mózgu jest agonista, występujących w OUN receptorów wątrobowych X, o nazwie GW3965. W naszych badaniach GW3965 został podany w dawce 20mg/kg i.p. począwszy od 10 min po reperfuzji. W analizie Western blot stwierdzono redukcję jądrowej translokacji podjednostki p65 transkrypcyjnego czynnika jądrowego κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; NF- κ B), jak i obniżenie ekspresji białka jego genu podległego COX-2 przy braku wpływu GW3965 na ufosforylowany inhibitor NF- κ B (pI κ B) w hipokampie 12 godz. po niedokrwieniu. Po podaniu GW3965 stwierdzono tendencję do poprawy funkcji czuciowo-ruchowych 24 godz. po ischemii. Wyniki badań spontanicznej alternacji w labiryncie T wykazały pozytywny wpływ GW3965 na poprawę eksploracji środowiska, a badania histologiczne ujawniły istotnie lepsze przeżycie neuronów w sektorze CA1 na 3 i 7 dzień po ischemii wraz ze spadkiem liczby komórek TUNEL pozytywnych hipokampa 7 dnia po ischemii. Podsumowując, w pracy wykazano blokadę aktywacji NF- κ B oraz COX-2, jako mogącą brać/biorących udział w neuroprotekcji, stwierdzanej po podaniu agonisty LXR po całkowitym niedokrwieniu mózgu. (**Publikacja IIA32**) “*Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB.*” *Neuroscience*, 2010, 166, 1101-1109.

Obecnie jednak prace nad neuroprotekcją w całkowitym niedokrwieniu mózgu prowadzone są z użyciem modelu doświadczalnego, wykorzystującego obniżenie ciśnienia krwi oraz podwiązanie obu tętnic szyjnych wspólnych. Oferuje on znaczne zredukowanie interwencji chirurgicznej w okolicy szyjnej oraz może, poprzez kontrolowaną hipotensję hipowolemiczną, modelować niektóre stany zagrożenia życia, powstające na współczesnym polu walki.

W ostatnich latach prowadzono dwa kierunki prac nad gazami medycznymi: działanie wodoru na uszkodzenie wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgu oraz badania nad hartowaniem tlenem hiperbarycznym w patologii niedokrwiennej mózgu w celu dalszego poznania jego mechanizmów i zwiększenia jego efektywności, możliwie poprzez kombinację ze środkami farmakologicznymi (nie wyłączając innych opcji terapeutycznych). Wyniki wstępne tych prac wskazują na bardzo silne działanie neuroprotektoryjne inhalacji wodorowej na rozmiar uszkodzeń mózgu po całkowitej ischemii. W przypadku hartowania tlenem hiperbarycznym wykazano jego proteosomo-zależność i czynione są plany wzmocnienia efektu hartowania m.in. poprzez modulację proteosomalną.

Obok publikowania prac badawczych i przeglądowych zajmowałem się pisaniem rozdziałów w monografiach takich jak **Publikacja IIDa1** (“*Molecular Signaling Pathways After Subarachnoid Hemorrhage.*” w: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 3e. Springer New York, NY 2007), w której współtworzyłem tekst rozdziału oraz sporządziłem część ilustracji. Napisałem tekst i wykonałem ilustracje również dla **Publikacji IIDa2** (“*Mechanisms of HBO for neurological disorders.*” w: J.H. Zhang, ed. *Hyperbaric Oxygen for Neurological Disorders*. Best Publishing Company. Flagstaff, AZ

2008) oraz **Publikacji IIDa3** (“Preconditioning for SAH.” w: *Innate Tolerance in the CNS*. Springer, J.M. Gidday, M.A. Perez-Pinzon, J.H. Zhang, eds., New York 2012).

Napisałem także artykuły redakcyjne, takie jak **Publikacja IIA21** („Risk Factors for Short-Term Mortality from Carbon Monoxide Poisoning Treated with Hyperbaric Oxygen: Editorial.” *Crit Care Med*, 2008, 36, 2684-2685), **IIDb2** (“The Pacific Chapter Annual Meeting of the Undersea & Hyperbaric Medical Society. A summary report.” *Med Gas Res*, 2011, 1, 19. doi:10.1186/2045-9912-1-19), **IIA39** („Response to letter by Tsuda.” *Stroke*, 2010, 41: e579E), a także recenzję książki (**Publikacja IIA12**; *Book Review*: Z. Israel, K.J. Burchiel. “Microelectrode Recording in Movement Disorder Surgery”, 2004, New York, Thieme. *J Neurosurg*, 2005, 102, 755-756), oraz niepublikowane recenzje manuskryptów w liczbie 62 recenzji dla ogółem 31 tytułów czasopism i cztery recenzje wniosków badawczych (stan na 09.2015).

W podsumowaniu, 53 prace badawcze niewchodzące w skład cyklu habilitacyjnego łączą zastosowanie modeli zwierzęcych i hodowli komórkowych w celu zbadania mechanizmów śmierci komórek oraz oceny nowych strategii ochrony komórek przed uszkodzeniem i poprawy ich funkcji, z perspektywą zastosowania klinicznego. Co do potencjalnych czynników neuroprotekcyjnych, wiele prób klinicznych zawiodło, jednak wciąż funkcjonuje przekonanie, że zostanie wynaleziona metoda neuroprotekcji, która uruchomi optymalny zestaw endogennych mechanizmów obronnych komórek OUN przed uszkodzeniem, prowadząc do poprawy stanu neurologicznego chorych po udarze. W tym celu należy określić zmiany molekularne biorące udział w odpowiedzi na terapię doświadczalne.

Całkowita liczba publikacji = 71

Liczba doniesień = 59

Sumaryczny współczynnik wpływu dla wszystkich współtworzonych prac **IF_{Sum}=181.223**

Liczba cytowań bez autocytowań = 945

Index Hirscha =18

Literatura

Ajmo CT, Jr., Vernon DO, Collier L, Hall AA, Garbuzova-Davis S, Willing A, Pennypacker KR. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 2008, 86, 2227-2234.

Asa PB, Wilson RB, Garry RF. Antibodies to squalene in recipients of anthrax vaccine. *Exp Mol Pathol* 2002, 73, 19-27.

Beynon C, Sun L, Marti HH, Heiland S, Veltkamp R. Delayed hyperbaric oxygenation is more effective than early prolonged normobaric hyperoxia in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2007, 425, 141-145.

Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002, 51, 66-72.

- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000, 275, 25130-25138.
- Godman CA, Chheda KP, Hightower LE, Perdrizet G, Shin DG, Giardina C. Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells. *Cell Stress Chaperones* 2010, 15, 431-442.
- Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1988, 22, 654-661.
- Hendrix S, Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *J Neuroimmunol* 2007, 184, 100-112.
- Huang L, Obenaus A. Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury. *Med Gas Res* 2011, 1, 21.
- Jarus-Dziedzic K, Czernicki Z, Kozniewska E. Acute decrease of cerebrocortical microflow and lack of carbon dioxide reactivity following subarachnoid haemorrhage in the rat. *Acta Neurochir Suppl* 2003, 86, 473-476.
- Juul S, Felderhoff-Mueser U. Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007, 12, 250-258.
- Kawamura SO, H; Yasui, N; Nemoto, M; Hinuma, Y; Suzuki, E. Effects of Hyperbaric Oxygenation in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *J Hyperbaric Med* 1988, 3, 243-256.
- Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1582, 72-80.
- Kobayashi A, Niewada M, Członkowska A. Udar mózgu - wybrane aspekty epidemiologiczne. *Medical Web Designs*, (2003).
- Koh KK, Park SM, Quon MJ. Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *Circulation* 2008, 117, 3238-3249.
- Kohshi K, Yokota A, Konda N, Munaka M, Yasukouchi H. Hyperbaric oxygen therapy adjunctive to mild hypertensive hypervolemia for symptomatic vasospasm. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1993, 33, 92-99.
- Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 α and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol* 2005, 191, 198-210.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999, 79, 1431-1568.
- Lochhead KM, Zager RA. Fluorinated anesthetic exposure "activates" the renal cortical sphingomyelinase cascade. *Kidney Int* 1998, 54, 373-381.
- MacDonald E. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Nurs* 1989, 21, 313-321.
- Majkowska-Wierzbička J. Pathophysiological characteristics of clinical death in rats. *Neuropat Pol* 1989, 27, 85-96.

Malek M, Duszczyk M, Zyszkowski M, Ziembowicz A, Salinska E. Hyperbaric oxygen and hyperbaric air treatment result in comparable neuronal death reduction and improved behavioral outcome after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Exp Brain Res* 2013, 224, 1-14.

Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi ME, Lee S. HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol* 2004, 6, 642-647.

Milner E, Holtzman JC, Friess S, Hartman RE, Brody DL, Han BH, Zipfel GJ. Endovascular perforation subarachnoid hemorrhage fails to cause Morris water maze deficits in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014, 34, 1571-1572

Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, Conte R, Glatzer T, Ambrosini P, Moretta L, Mingari MC. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* 2012, 119, 3987-3996.

Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007, 13, 688-694.

Ostrowski RP, Kowalska Z, Jauszewski S, Kapuscinski A. Effect of bosentan on leptin and endothelin-1 concentration in plasma and brain after cardiac arrest in rats. *Drug Dev Res* 2005, 64, 137-144.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004, 11, 381-389.

Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* 2008, 42, 277-288.

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007, 129, 1337-1349.

Qi SH, Liu Y, Hao LY, Guan QH, Gu YH, Zhang J, Yan H, Wang M, Zhang GY. Neuroprotection of ethanol against ischemia/reperfusion-induced brain injury through decreasing c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) activation by enhancing GABA release. *Neuroscience* 2010, 167, 1125-1137.

Qin Z, Xi G, Keep RF, Silbergleit R, He Y, Hua Y. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2008, 105, 113-117.

Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Kietzmann T, Saul I, Busto R, Ginsberg MD. Nuclear localization of the hypoxia-regulated pro-apoptotic protein BNIP3 after global brain ischemia in the rat hippocampus. *Brain Res* 2004, 1001, 133-142.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007, 2007, cm8.

Sugimoto K, Iadecola C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res* 2003, 960, 273-276.

Sun L, Marti HH, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia. *Stroke* 2008, 39, 1000-1006.

Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt K, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, 12091-12096.

van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* 2001, 124, 249-278.

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke* 1997, 28, 2252-2258.

Wang F, Wang Y, Geng X, Asmaro K, Peng C, Sullivan JM, Ding JY, Ji X, Ding Y. Neuroprotective effect of acute ethanol administration in a rat with transient cerebral ischemia. *Stroke* 2012, 43, 205-210.

Wiebers DO, Feigin VL, Brown J, R.D. Handbook of Stroke. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, PA 2006.

Xiong Y, Tanaka H, Richardson JA, Williams SC, Slaughter CA, Nakamura M, Chen JL, Yanagisawa M. Endothelin-1 stimulates leptin production in adipocytes. *J Biol Chem* 2001, 276, 28471-28477.

Yamaguchi M, Calvert JW, Kusaka G, Zhang JH. One-stage anterior approach for four-vessel occlusion in rat. *Stroke* 2005, 36, 2212-2214.

Zheng X, Zheng X, Wang X, Ma Z, Gupta Sunkari V, Botusan I, Takeda T, Bjorklund A, Inoue M, Catrina SB, Brismar K, Poellinger L, Pereira TS. Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic beta-cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP. *Cell Death Dis* 2012, 3, e322.

Zhu DY, Lau L, Liu SH, Wei JS, Lu YM. Activation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101, 9453-9457.

Warszawa, 16.09.2015r.

Robert Ostrowski