



# Zaščitna vloga astrocitov pri zastrupitvi z ogljikovim monoksidom in optimizacija zdravljenja

Protective role of astrocytes in carbon monoxide poisoning and optimization of treatment

Ivana Krajnc,<sup>\*1</sup> Laura Kekec,<sup>\*1</sup> Miran Brvar,<sup>2,3</sup> Damijana Mojca Jurič<sup>4</sup>

## Izvleček

**Izhodišča:** Zastrupitev z ogljikovim monoksidom (CO) močno okrne funkcijo astrocitov in nevronov. Pozne nevropsihološke posledice zastrupitve lahko preprečimo z zdravljenjem s hiperbaričnim kisikom (HBO). V raziskavi smo preučevali učinek CO in HBO na zgodnje procese celične smrti v nevronske in mešane kulture ter ugotavljali, ali se raven glutaciona v astrocitih po izpostavljenosti CO in HBO spremeni in ali bi lahko le-ta bil možna nova tarča za zdravljenje zastrupitve s CO.

**Metode:** Primarne astrocitne, nevronske in mešane celične kulture možganske skorje podgane smo izpostavili 3.000 ppm CO v zraku, nato pa jih v obdobju 24-urne normoksije v različnih časovnih presledkih za 1 uro izpostavili 100-odstotnemu kisiku pri tlaku 3 barov. V celicah mešane in nevronske kulture smo merili aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) in kaspaz 3/7, v astrocitih pa raven glutaciona.

**Rezultati:** CO je povzročil zvišanje aktivnosti LDH in kaspaz 3/7 v nevronskih kulturah, v mešanih pa le zvišanje aktivnosti kaspaz 3/7. Po izpostavitvi CO in HBO se je zvišala aktivnost LDH v nevronskih kulturah in znižala aktivnost kaspaz 3/7 v mešanih kulturah. CO je v astrocitih povzročil znižanje celokupnega glutaciona (GSht), zvišanje glutacion disulfida (GSSG) in znižanje GSH/GSSG, po izpostavitvi CO in HBO pa se je zvišala GSht, znižala GSSG in zvišala GSH/GSSG.

**Zaključek:** Razlike v citotoksičnem delovanju CO in zaščitni vlogi HBO v nevronske, mešane in astrocitne kulture kažejo, da so nevroni, ki rastejo brez astrocitov, v primerjavi z mešano kulturo dozvetnejši za škodljive učinke CO ter nakazujejo, da astroцитi ob oksidativnem stresu poskušajo ščititi nevrone, ki so pri sintezi glutaciona odvisni od njih.

\* Avtorici si pripadajoče avtorsko mesto delita.

<sup>1</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Center za klinično toksikologijo in farmakologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Center za klinično fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Damijana Mojca Jurič, e: [damijana-mojca.juric@mf.uni-lj.si](mailto:damijana-mojca.juric@mf.uni-lj.si)

**Ključne besede:** glutation; hiperbarična oksigenacija; nevroni; apoptoza; nekroza

**Key words:** glutathione; hyperbaric oxygenation; neurons; apoptosis; necrosis

**Prispelo / Received:** 2. 5. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 15. 7. 2022

**Citirajte kot/Cite as:** Krajnc I, Kekec L, Brvar M, Jurič DM. Zaščitna vloga astrocitov pri zastrupitvi z ogljikovim monoksidom in optimizacija zdravljenja. Zdrav Vestn. 2022;91(11–12):462–73. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3358>



Avtorske pravice (c) 2022 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

## Abstract

**Background:** Carbon monoxide (CO) poisoning impairs astrocyte and neuron performance. Treatment with hyperbaric oxygen (HBO) can prevent late neuropsychological impairment. We investigated the effect of CO and HBO on the early processes of cell death in neuronal and mixed culture and determined whether the level of glutathione in astrocytes changes after exposure to CO and HBO and whether it could represent a potential new target for the treatment of CO poisoning.

**Methods:** Primary astrocytes, neuronal and mixed cultures of the rat cerebral cortex were exposed to CO in the air and then to 24-hour normoxia, during which the cells were exposed to 100 % oxygen at 3 bar pressure for 1 hour at various time intervals. We measured the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and caspase 3/7 in neuronal and mixed cell cultures and levels of glutathione in astrocytes.

**Results:** CO induced an increase in LDH and caspase 3/7 activity in neuronal culture, but only in caspase 3/7 activity in mixed cultures. After treatment with HBO, there was an increase in LDH activity in neuronal and in caspase 3/7 activity in mixed culture. CO caused a decrease in total glutathione (GSHT), an increase in glutathione disulfide (GSSG), and a decrease in GSH/GSSG in astrocytes, and after CO/HBO, there was an increase in GSHT, a decrease in GSSG and an increase in GSH/GSSG.

**Conclusions:** Differences in the cytotoxic effect of CO and the protective role of HBO in neuronal, mixed and astrocyte culture show that neurons growing in the absence of astrocytes are more susceptible to the harmful effects of CO compared to mixed culture and suggest that astrocytes attempt to protect neurons that depend on them for glutathione synthesis during oxidative stress.

## 1 Uvod

### 1.1 Zastrupitev z ogljikovim monoksidom

Zastrupitev z ogljikovim monoksidom (CO) je najpogostejši vzrok nenamernih zastrupitev in najpogostejša smrtna zastrupitev v razvitih državah (1). Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije pri nas letno zaradi nenamerne zastrupitve s CO, brez požarov, umre okoli 5 ljudi, še 13 ljudi pa jih umre zaradi zastrupitve s CO v požaru in kot posledica namerne zastrupitve oziroma samomora (2,3). CO je v ozračju produkt nepopolnega izgorevanja ogljikovodikov, nastaja pa tudi endogeno v normalnih biokemičnih procesih (1,2).

CO se iz pljuč z lahkoto vsrka v krvni obtok, kjer se z 240-krat večjo afiniteto veže na vezavna mesta za kisik na hemoglobinu (Hb), s čimer se tvori karboksihemoglobin (HbCO), kar dodatno poveča afiniteto za vezavo kisika na Hb in tako ovira sproščanje že vezanega kisika v tkiva (1,2,4,5). Dolgo časa so mislili, da do toksičnih učinkov pride le zaradi tkivne hipoksije, vendar delež HbCO v krvi zastrupljenecv ne korelira z njihovo klinično sliko (5). Poleg Hb ima CO interakcije z mioglobinom, s citokrom c oksidazo, z gvanilat ciklazo, mitohondriji, ionskimi kanalčki, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazo in s ksantin oksidazo, v organizmu pa povzroči nastanek reaktivnih kisikov spojin (ROS) ter vnetje. Pri zastrupitvi s CO se NO sprošča iz trombocitov in različnih hemproteinov, preko NO

sintaze pa se poveča njegova sinteza. Kombinacija CO, prostih radikalov in NO vodi v nastanek peroksinitrita (ONOO-), močnega ROS, ki skupaj s hidrogen peroksidom, superoksidom in ostalimi prostimi radikali okvari DNA/RNA, povzroča peroksidacijo lipidov, apoptozo, poškodbe žilnega endotela in aktivacijo imunskega sistema. Ti mehanizmi skupaj vodijo v demielinizacijo osrednjega živčevja (OŽ) (1,2,4-6).

Simptomi in znaki zastrupitve s CO so nespecifični. Akutne zastrupitve delimo na blage, zmerne in hude. Blage se pogosto spregledajo in se lahko kažejo z znaki blage viroze in blagim glavobolom, slabostjo, bruhanjem, utrujenostjo, omotičnostjo, oslabelostjo, poslabšanjem osnovne bolezni (npr. kroničnega bronhitisa ali angine pektoris), zmerne pa z močnim glavobolom, zaspanostjo, zmedenostjo, nevropsihološko prizadetostjo, motnjami vida, zanašanjem pri hoji, mišično nemočjo ter hitrim bitjem srca. Pri hujših zastrupitvah pride do nezavesti, epileptičnih krčev, bolečine za prsnico, čemur lahko sledijo odpoved srca in dihanja ter smrt. Dolgotrajne kronične izpostavitve CO se slabo prepoznavajo, ker se kažejo s kronično utrujenostjo, čustveno labilnostjo, težavami s spominom, z vrtoglavico, motnjami spanja, bolečinami v trebuhu in drisko. Po akutni zastrupitvi s CO imajo bolniki pogosto nevropsihološke posledice, ki se pojavijo po nekaj tednih ali mesecih (1,2,5,6).

Ob zastrupitvi s CO je prvi ukrep dajanje

normobaričnega kisika (NBO) preko maske z rezervoarjem do padca HbCO pod 5 % (2,5). Ob težjih zastrupitvah jih nato v Sloveniji zdravimo s hiperbaričnim kisikom (HBO) 90 minut s 100-odstotnim kisikom pri tlaku 3 barov (2).

Zdravljenje s HBO izboljša napoved izida pri bolnikih, saj zmanjša incidenco nevropsiholoških posledic pri zastrupljenih (7), čeprav natančni mehanizmi še niso raziskani. HBO skrajša razpolovni čas HbCO na 20 minut, izboljša oksigenacijo tkiv, poveča sintezo ATP, zniža oksidativni stres in vnetje (2,5). Kratkotrajno zdravljenje (do 120 minut) s HBO pri 3 barih je splošno sprejeto kot varno, z daljšim časom izpostavljenosti kisiku pri visokem tlaku pa bi se verjetnost toksičnih poškodb močno povečala. Toksični vpliv kisika na OŽ se kaže kot t. i. efekt Bert s hiperoksičnimi krči (6), na celični ravni pa previsoke koncentracije kisika vodijo v nastanek ROS. Hipoksiji možganov ob zastrupitvi s CO sledi reoksigenacijska poškodba možganov, pri kateri se prav tako tvorijo ROS in nato vnetje ter reperfuzijske poškodbe (2,4).

## 1.2 Astrociti in njihova zaščitna vloga

Astrociti so najštevilčnejše celice glije, ki se preko aktivnih stikov z nevroni, drugimi astrociti, mikroglijo in oligodendrociti hitro odzivajo na spremembe v okolju. Razporejeni so po celotnem OŽ in imajo med glijalnimi celicami najbolj intimen in dinamičen odnos z vsemi deli nevronov, z ustvarjanjem primerne okolja skrbijo za njihovo zorenje, diferenciacijo in preživetje ter sodelujejo pri nastajanju in vzdrževanju sinaps in sinaptični plastičnosti (8). Pri okrnjenem delovanju OŽ se mirujoči astrociti morfološko, molekularno in funkcionalno spremenijo v reaktivne celice, ki sodelujejo pri odstranjevanju strupenih snovi, ščitijo pred oksidativnim stresom in podpirajo preživetje nevronov ter njihovo rast (9).

## 1.3 Glutation

Glutation v reducirani obliki (GSH) je endogeni antioksidant, ki se nahaja v večini celic v telesu, vključno z astrociti in nevroni. Je tripeptid, ki nastane iz cisteina (Cys), glutamata in glicina s pomočjo glutamat cistein ligaze (GCL) in glutation sintetaze. Igra najpomembnejšo vlogo pri obrambi celic pred oksidativnimi poškodbami. Visoka koncentracija v astrocitih in njihova velika sposobnost razstrupljanja ščiti tako astrocite kot tudi nevrone pred škodljivimi vplivi oksidantov in toksinov. Njegova sinteza v nevronih je odvisna tudi od delovanja astrocitov, ki jim zagotavljajo zadostne količine

prekurzorjev. Glutation je odgovoren za odstranjevanje ksenobiotikov, sodeluje pri proliferaciji in diferenciaciji celic, apoptozi ter je prenašalec in vir cisteina (10,11).

GSH reagira s prostimi radikali in sodeluje v reakcijah odstranjevanja peroksidov, ki jih katalizira glutation peroksidaza (GPx). Ko GSH tem molekulam odda vodik in jih s tem reducira, se dve molekuli GSH povežeta v oksidirano obliko, tj. v GSSG. Encim glutation reduktaza (GR) v reakciji, pri kateri NADPH deluje kot donor, iz GSSG obnovi dve molekuli GSH. Tako se GSH najprej uporabi v reakcijah detoksifikacije in nato obnovi z encimom GR, pri čemer celokupna koncentracija GSH (GSht) ostaja enaka. Zadostna količina GSH je nujna za delovanje antioksidativnega sistema (10). V celici, ki je v nestresnem okolju, je razmerje GSH/GSSG okoli 9,0, ob staranju in dolgotrajnem oksidativnem stresu se pomakne na stran oksidirane oblike in se približa vrednosti 0,5 (12). Glutation in njegovi prekurzorji s pomočjo prenašalcev prehajajo krvno-možgansko pregrado (13). Koncentracija GSht se v celici zniža pri sintezi GSH-konjugatov, ki nastajajo ob detoksifikaciji ksenobiotikov in konjugaciji endogenih spojin z GSH. Do znižanja koncentracije GSht pride tudi pri prenosu GSH in njegovih derivatov iz celic v okolico (10).

## 1.4 Razlog za izvedbo raziskave

Zastrupitev s CO močno okrne funkcijo astrocitov (14,15,16) in nevronov (1,2,4,5), vendar pozne nevropsihološke posledice zastrupitve lahko preprečimo z zdravljenjem v hiperbarični komori (2,5,7). V tej raziskavi smo želeli ugotoviti dvoje; prvič, ali akutna izpostavljenost CO/hipoksiji proži zgodnje procese celične smrti v nevronske in mešani (nevronske-astrociti) celični kulturi, ter drugič, ali oksidativni stres, ki ga povzroča CO, vpliva na ravni glutationa v astrociti celični kulturi. HBO učinkovito zmanjšuje posledice delovanja CO v astrocitih (14,15,16), zato nas je zanimalo, ali zaščitno deluje tudi v mešani in nevronske celični kulturi. Preverili pa smo tudi, ali se raven glutationa v astrocitih po izpostavljenosti CO in HBO spremeni. Tako bi morda lahko postal nova tarča za zdravljenje zastrupitve s CO.

## 2 Metode

### 2.1 Poskusne živali in priprava celičnih kultur

Za pripravo primarnih nevronske in mešanih celičnih kultur možganske skorje podgane smo uporabili

18 dni stare plodove datumsko parjenih podgan Wistar, za pripravo astrocitov možganske skorje podgane pa novorojene (1–3 dni stare) podgane Wistar, vzgojene v Medicinskem eksperimentalnem centru Inštituta za patologijo Medicinske fakultete. Celične kulture smo pripravili po protokolih, opisanih v Prešernovi nalogi (17). Postopki priprave celičnih kultur so bili v skladu z dovoljenjem, ki ga je izdala Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in zdravje rastlin za delo na tkivih (št. potrdila: U34401-3/2013/3). Usmrtitev živali smo prijavili na Veterinarsko upravo Republike Slovenije (št. potrdila: 34401-87/2008/3).

## 2.2 Izpostavitve celičnih kultur ogljikovemu monoksidu

Celice smo v prirejenem inkubatorju (*New Brunswick Scientific*) izpostavili mešanici 3000 ppm CO in 5 % CO<sub>2</sub> v zraku za različno dolga obdobja (1–8 ur). Po izpostavitvi CO smo celice za 24 ur vrnili v inkubator s standardnimi razmerami (CO/normoksija). Kontrolne celice smo inkubirali v standardnih razmerah.

## 2.3 Izpostavitve celičnih kultur hiperbaričnemu kisiku

V nadaljevanju študije smo celice, ki so bile 8 ur izpostavljene CO, v različnih časovnih presledkih (0, 1, 3, 5 ali 7 ur po CO), za 1 uro prestavili v hiperbarično komoro, v kateri smo jih izpostavili 100-odstotnemu kisiku pri tlaku 3 barov (CO/HBO). Celice smo nato vrnili v inkubator s standardnimi razmerami ter jih analizirali 24 ur po 8-urnem poskusu s CO. Kontrolne celice smo za 1 uro izpostavili HBO in jih nato 24 ur inkubirali v standardnih razmerah.

## 2.4 Določanje aktivnosti kaspaze 3/7

Aktivnost poglavitne izvršilne kaspaze 3/7 smo merili s testom Caspase-Glo® 3/7 Assay (*Promega Corporation, Madison, ZDA*). Merili smo luminiscenčni signal, ki nastane ob cepitvi substrata z aktivno kaspazo. S tem smo določali stopnjo apoptoze.

## 2.5 Določanje citotoksičnosti celic – merjenje laktat dehidrogenaze

Zastrupitev s CO in kasnejše zdravljenje s HBO lahko povzročita poškodbe celične membrane, zaradi česar celice sproščajo laktat dehidrogenazo (LDH). Sproščeni LDH iz poškodovanih celic smo določali s testom

CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity (*Promega Corporation, Madison, ZDA*) ter rezultate predstavili kot delež pozitivne kontrolne vrednosti.

## 2.6 Določanje koncentracije celokupnega glutationa in glutation disulfida v astrocitih

Za merjenje koncentracije GSht in GSSG v vzorcu smo uporabili Glutathione Assay Kit (*Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, ZDA*). Meritev absorbanca nam je podala koncentracijo GSH v vzorcu. Zaradi uporabe encima GR, ki vodi v redukcijo GSSG, smo v vzorcih s to metodo lahko izmerili koncentracijo celokupnega GSH (17). Po posebnem protokolu smo določili tudi koncentracijo GSSG (17). V vzorcih, v katerih smo merili celokupni GSH in GSSG, smo koncentracijo proteinov določali z metodo po Bradfordu s kompletom BIO-RAD Protein Assay (18). GSH v reducirani obliki smo izračunali kot  $GSH = \text{celokupni GSH} - 2 \times GSSG$ . Iz koncentracij GSH in GSSG smo izračunali razmerje GSH/GSSG.

## 2.7 Statistična obdelava podatkov

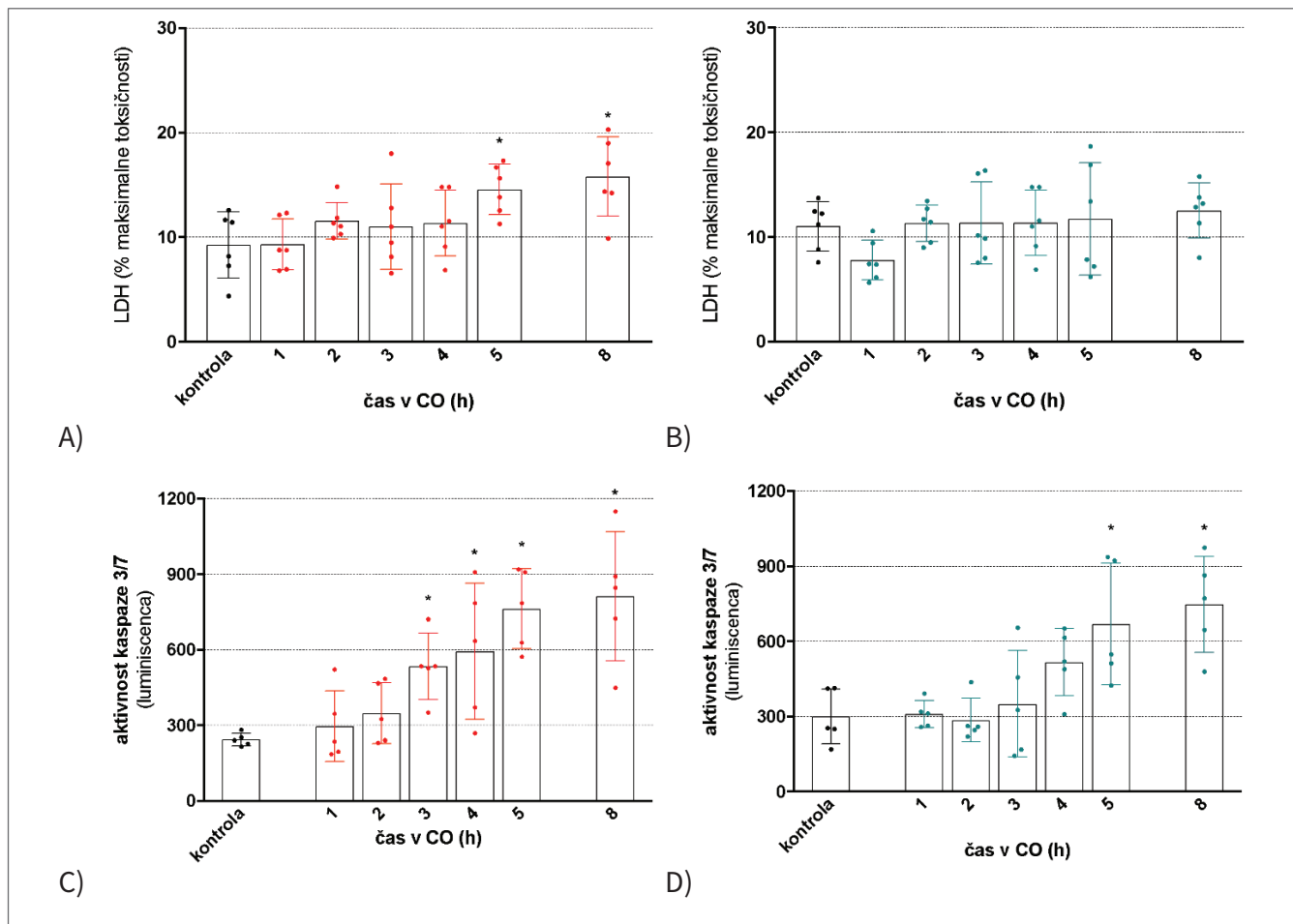
Podatke smo statistično obdelali in podali v obliki grafov z računalniškim programom GraphPad Prism, verzija 9.1.1 (*GraphPad Software Inc., San Diego, ZDA*). Predstavili smo jih s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom od aritmetične sredine ( $x \pm SD$ ) 4–6 neodvisnih poskusov ( $n = 4-6$ ), ki smo jih izvedli v treh paralelah. Točke na grafih predstavljajo povprečne vrednosti rezultata posameznega poskusa. Statistično značilnost rezultatov smo preverili z enosmerno analizo varianca (*angl.* one-way ANOVA) in t.i. post hoc testom z Dunnettovim popravkom. Za mejo statistične značilnosti smo uporabili vrednost  $p < 0,05$ .

Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka 0120-519/2019/4, 4. decembra 2019).

## 3 Rezultati

### 3.1 Vpliv CO/normoksije na zgodnje procese celične smrti v nevronske in mešani celični kulturi

Po 5-urni izpostavljenosti CO in 24-urni normoksiji se je aktivnost encima LDH, pokazatelja celične nekroze, v nevronske kulturi značilno, tj. 1,6-krat, povečala. Najvišji porast smo zabeležili po 8-urni inkubaciji v CO (Slika 1A). Izpostavljenost CO v tem obdobju ni



**Slika 1:** Vpliv CO/normoksije na aktivnost LDH v A) nevronskih in B) mešanih celičnih kulturah ter aktivnost kaspaze 3/7 v C) nevronskih in D) mešanih celičnih kulturah možganske skorje podgane. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost  $\pm$  SD 6 neodvisnih poskusov ( $n = 6$ ). Točke na grafu predstavljajo povprečne vrednosti rezultata posameznega poskusa. Statistično značilnost vpliva CO smo preverili z analizo variance med skupinami in z Dunnettovim popravkom. Označena je z zvezdico \* ( $p < 0,05$  v primerjavi s kontrolo).

značilno vplivala na delež sproščenega LDH v celicah mešane kulture (Slika 1A-B).

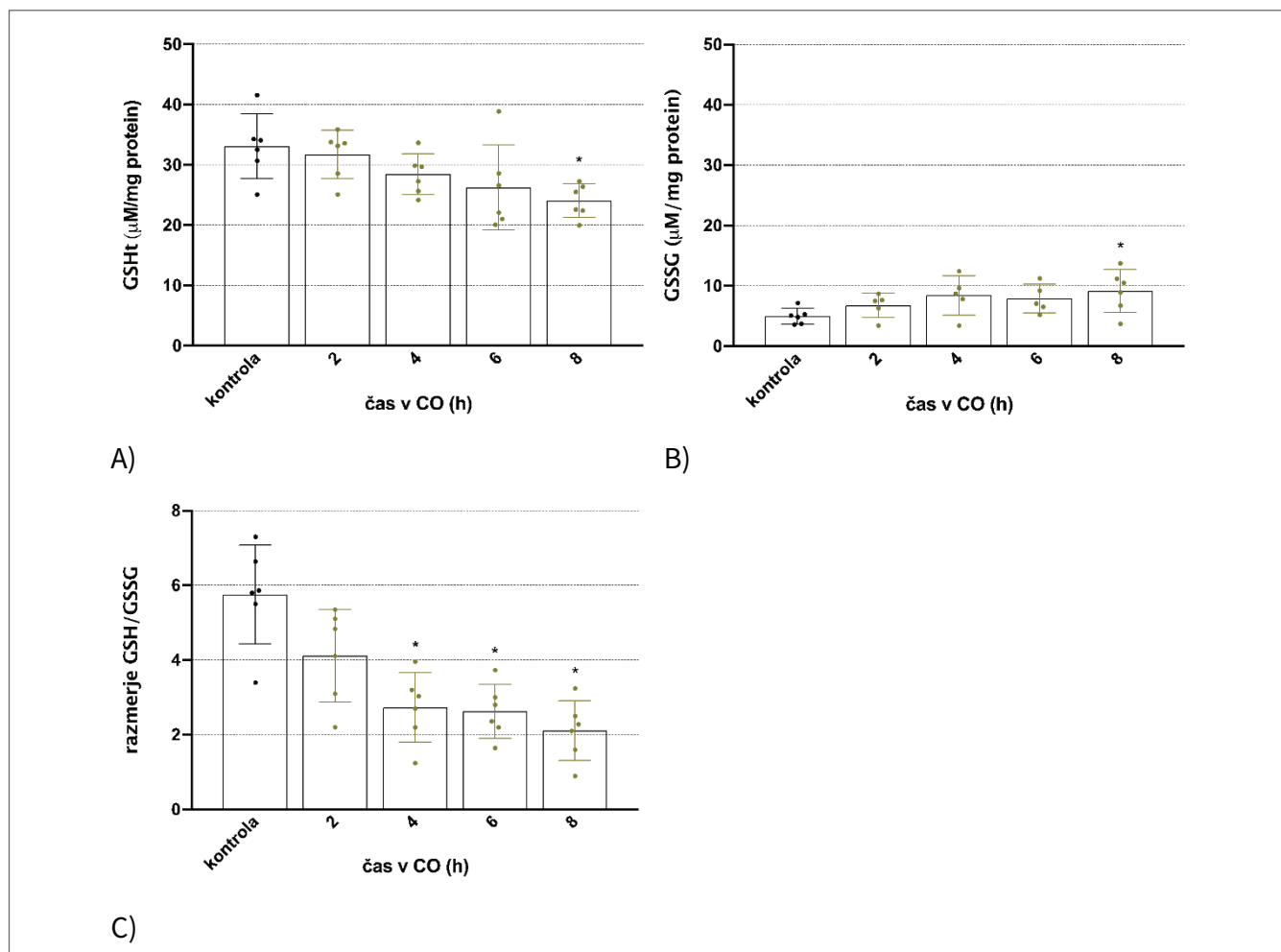
Povečanje aktivnosti sprožilca programirane celične smrti – izvršilne kaspaze 3/7 – smo zaznali v nevronski celični kulturi po 3-urni (Slika 1C), v mešani kulturi pa po 5-urni izpostavljenosti CO (Slika 1D). Največjo aktivnosti kaspaze 3/7 smo v obeh kulturah zaznali po 8-urni inkubaciji v CO, v nevronski kulturi se je povečala za 3,3-krat, v mešani kulturi pa za 2,5-krat v primerjavi s kontrolo (Slika 1C-D).

### 3.2 Vpliv CO/normoksije na raven glutationa v astrociti celični kulturi

Astrociti možganske skorje novorojene podgane so v kontrolnih pogojih vsebovali  $33,1 \pm 2,2 \mu\text{M}$  GSHT /mg proteina in  $4,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$  GSSG /mg proteina. Razmerje GSH/

GSSG v kontrolnih celicah je znašalo  $5,8 \pm 0,9$  (Slika 2).

Koncentracija GSHT se je ob izpostavljenosti CO/normoksiji znižala, pri čemer smo statistično značilni 27,2-odstotni padec glede na kontrolo zaznali po 8-urni izpostavljenosti CO (Slika 2A). Po daljši izpostavljenosti CO/normoksiji smo opazili akumuliranje oksidirane GSSG. Značilno spremembo smo izmerili po 8-urni inkubaciji s CO, ko je koncentracija GSSG znašala  $9,1 \pm 1,5 \mu\text{M}/\text{mg}$  proteina in narasla 1,9-krat glede na kontrolo (Slika 2B). Dolgotrajni oksidativni stres pomakne razmerje GSH/GSSG v smer oksidirane oblike. Statistično značilen 53,4-odstotni padec glede na kontrolo smo opazili po 4-urni izpostavljenosti CO, ko je bilo razmerje GSH/GSSG  $2,7 \pm 0,9$ . Največji padec razmerja GSH/GSSG smo ugotovili po 8-urni izpostavljenosti CO, ko je razmerje znašalo  $2,1 \pm 0,7$ , kar je pomenilo 63,8-odstotni padec glede na kontrolo (Slika 2C).



**Slika 2:** Vpliv CO/normoksije na A) koncentracijo GSht, B) koncentracijo GSSG in C) razmerje GSH/GSSG v astroцитih možganske skorje podgane. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost  $\pm$  SD 5–6 neodvisnih poskusov ( $n = 5–6$ ). Točke na grafu so povprečne vrednosti rezultata posameznega poskusa. Statistično značilnost vpliva CO smo preverili z analizo variance med skupinami in z Dunnettovim popravkom in je označena z zvezdico \* ( $p < 0,05$  v primerjavi s kontrolo).

### 3.3 Vpliv hiperbaričnega kisika na zgodnje procese celične smrti po izpostavitvi CO/normoksiji v nevronski in mešani celični kulturi

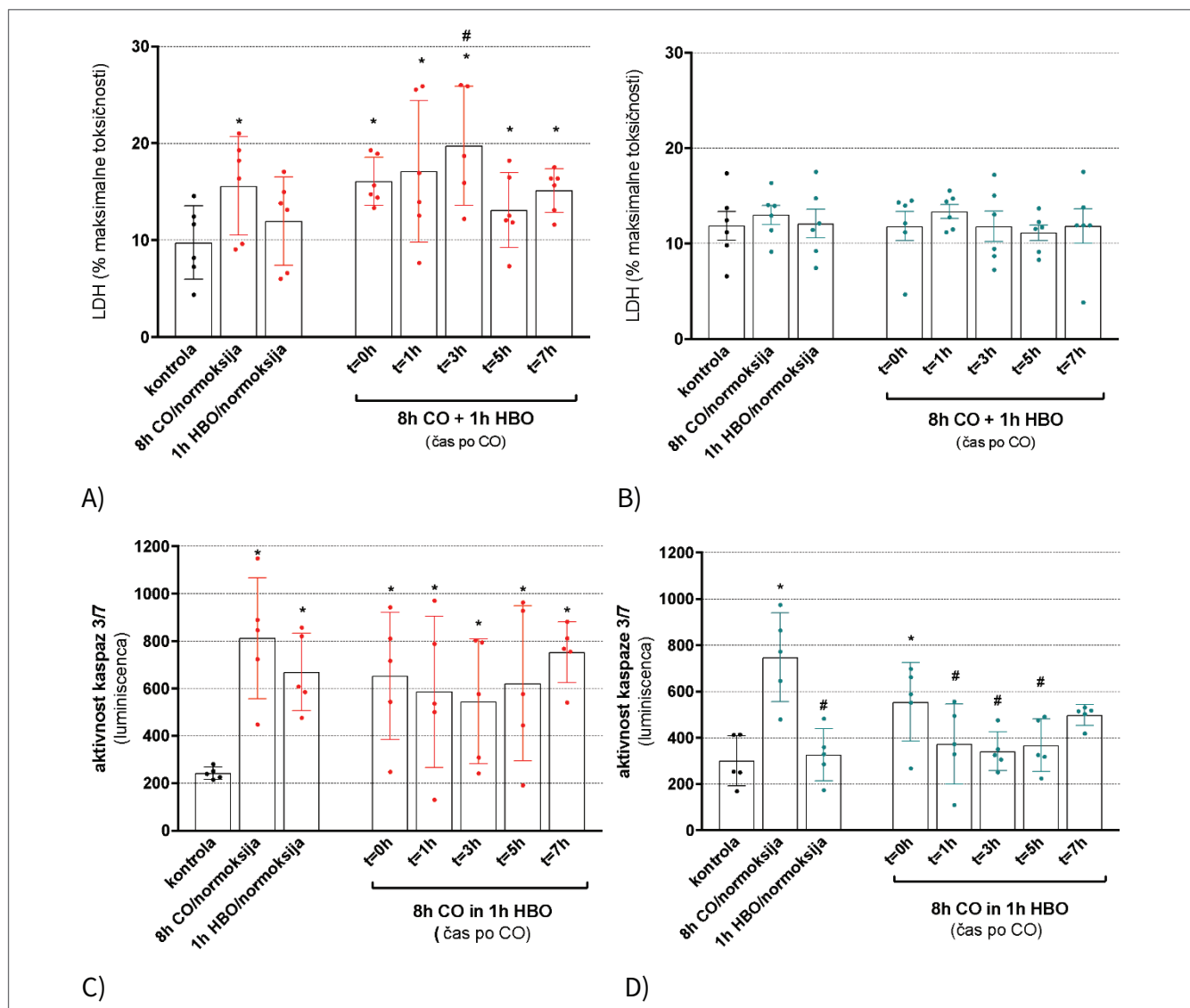
Inkubacija nevronske kulture v hiperbarični komori v danih časovnih intervalih ni zavrla citotoksičnega učinka izpostavljenosti CO/normoksiji. Delež sproščene LDH se ni zmanjšal, pač pa smo pri zdravljenju s HBO 3 ure po 8-urni izpostavljenosti CO izmerili značilen 1,3-kratni porast sproščene LDH glede na celice, izpostavljene samo CO/normoksiji (Slika 3A).

Inkubacija nevronske celične kulture v hiperbarični komori v danih časovnih presledkih prav tako ni zavrla zgodnjih apoptotičnih procesov, ki jih je sprožila izpostavljenost CO/normoksiji. Tako izpostavljenost zgolj HBO kot tudi izpostavljenost HBO po zastrupitvi s CO

privedeta do povečane aktivnosti kaspaze 3/7 (Slika 3C). Po 1-urni inkubaciji nevronov v HBO se je aktivnost kaspaze 3/7 povečala 2,7-krat v primerjavi s kontrolnimi celicami, kar kaže, da že samo 100-odstotni kisik pri 3 barih spodbuja proženje apoptoze.

Inkubacija celic mešane kulture v hiperbarični komori po 8-urni izpostavljenosti CO v danih presledkih v času 24-urne normoksije ni povzročila statistično značilnega porasta sproščanja LDH (Slika 3B).

Inkubacija celic mešane kulture v hiperbarični komori v danih časovnih presledkih je uspešno zavrla apoptozo, ki jih je sprožila izpostavljenost CO/normoksiji. Pri zdravljenju s HBO smo beležili značilen upad aktivnosti kaspaze 3/7 od 1 do 5 ur po 8-urni izpostavljenosti CO, medtem ko takojšnja in nekoliko zakasnela (7 ur po 8-urni izpostavljenosti CO) inkubacija v HBO nista značilno zavrla kaspazne aktivnosti (Slika 3D).



**Slika 3:** Vpliv HBO po izpostavljenosti CO/normoksiji na aktivnost LDH v A) nevronskih in B) mešanih celičnih kulturah ter aktivnost kaspaze 3/7 v C) nevronskih in D) mešanih celičnih kulturah možganske skorje podgane. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost ± SD 5–6 neodvisnih poskusov (n = 5–6). Točke na grafu so povprečne vrednosti rezultata posameznega poskusa. Statistično značilnost vpliva HBO smo preverili z analizo variance med skupinami in z Dunnettovim popravkom. Označena je z zvezdico \* (p < 0,05 v primerjavi s kontrolo) ali številskim znakom # (p < 0,05 v primerjavi s CO/normoksijo).

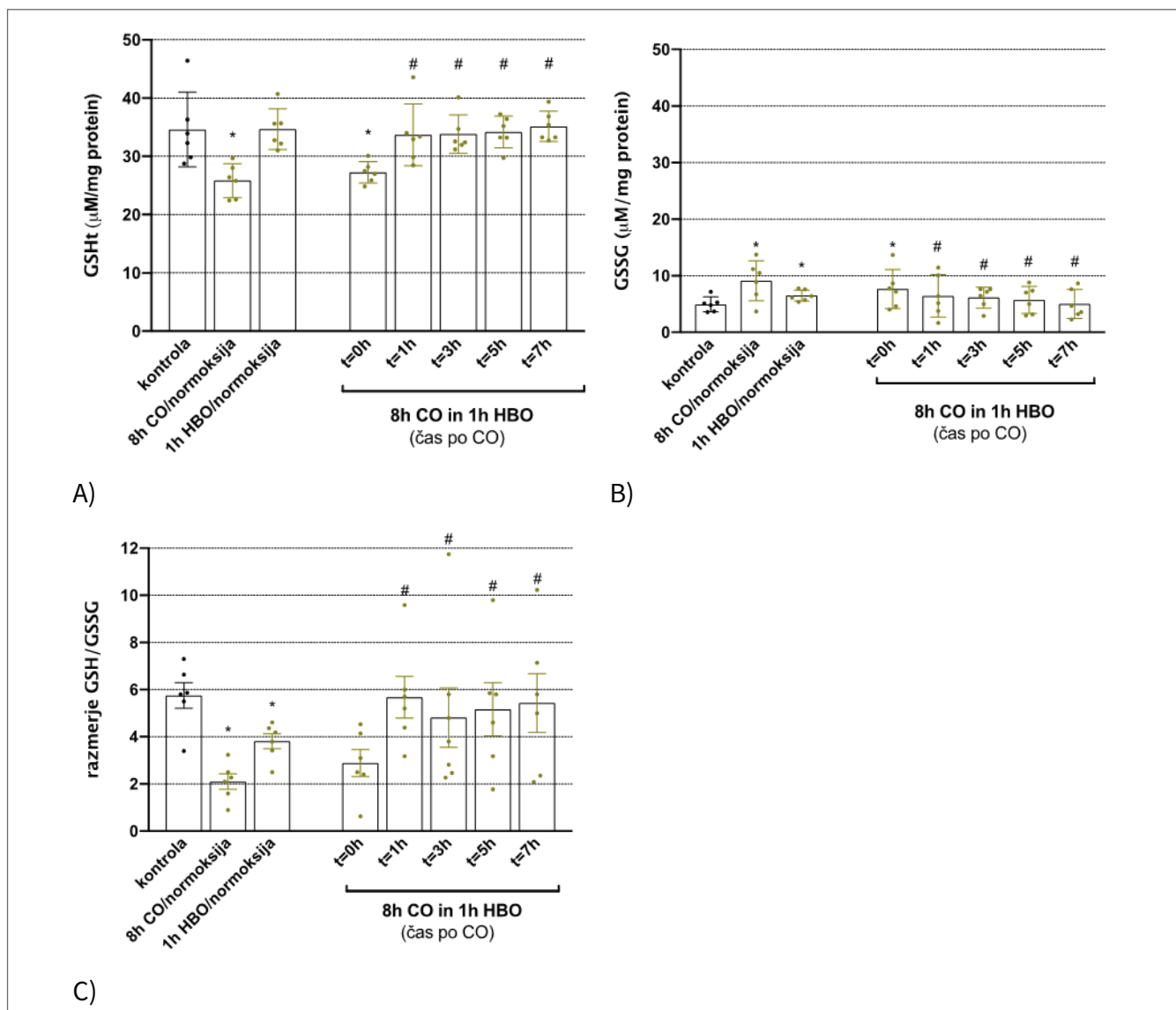
Izpostavljenost celic zgolj HBO ni povzročila statistično značilnega povečanja aktivnosti LDH v nevronski ali mešani celični kulturi (Slika 3A-B), prav tako pa tudi ni prožila kaspaze 3/7 v mešani kulturi (Slika 3D).

### 3.4 Vpliv hiperbaričnega kisika na raven glutationa po izpostavljenosti CO/normoksiji v astrocih

V celicah, ki so bile zdravljene s HBO takoj po zastrupitvi s CO, je bila koncentracija GSht značilno, tj. za 17,5 %, nižja, inkubacija s HBO v kasnejših presledkih,

od 1 do 7 ur po CO, pa je povzročila dvig GSht glede na astrocite, izpostavljene le CO/normoksiji. Največji porast GSht smo beležili pri celicah, ki so bile HBO izpostavljene 7 ur po zastrupitvi s CO. Koncentracija je znašala  $35,1 \pm 2,6 \mu\text{M}$  GSht/mg proteina. Inkubacija astrocitov zgolj v HBO ni statistično značilno vplivala na znotrajcelični GSht. V celicah smo izmerili  $34,7 \pm 3,1 \mu\text{M}$  GSht/mg proteina (Slika 4A).

Vpliv HBO se je odlikoval tudi na koncentraciji oksidirane GSSG. Ugotovili smo, da je zgolj HBO po 1-urni inkubaciji statistično značilno povečal koncentracijo GSSG ( $6,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$  GSSG/mg proteina). Na astrocih,



**Slika 4:** Vpliv HBO po izpostavljenosti CO na A) koncentracijo GSht, B) koncentracijo GSSG in C) razmerje GSH/GSSG v astrocitih možganske skorje podgane. Rezultati so predstavljeni kot srednja vrednost  $\pm$  SD 4–5 neodvisnih poskusov ( $n = 4-5$ ). Točke na grafu so povprečne vrednosti rezultata posameznega poskusa. Statistično značilnost vpliva HBO smo preverili z analizo variance med skupinami in z Dunnettovim popravkom in je označena z zvezdico \* ( $p < 0,05$  v primerjavi s kontrolo) ali številskim znakom # ( $p < 0,05$  v primerjavi s CO/normoksijo).

inkubiranih s CO, je HBO v intervalih od 1 do 7 ur po CO povzročil značilno znižanje GSSG glede na izpostavljenost CO/normoksiji. Največje znižanje koncentracije GSSG smo izmerili pri celicah, ki so bile HBO izpostavljene 7 ur po CO. Koncentracija je znašala  $5,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$  GSSG/mg proteina (Slika 4B).

Pri izpostavljenosti celic zgolj 1-urni inkubaciji s HBO je prišlo do statistično značilnih sprememb razmerja GSH/GSSG. Razmerje se je znižalo ( $3,8 \pm 0,3$ ) glede na kontrolo. Inkubacija celic s HBO po izpostavljenosti CO je v časovnih intervalih 1–7 ur po CO povzročila značilno zvišanje razmerja med GSH/GSSG

glede na celice, izpostavljene le CO/normoksiji (Slika 4C).

## 4 Razprava

Uporaba HBO za zdravljenje zastrupitev s CO je še vedno kontroverzna. Nekatere študije potrjujejo ugoden učinek HBO in mu pripisujejo znižano incidenco nevropsiholoških posledic po zastrupitvi, druge pa HBO povezujejo celo s slabšim izidom zdravljenja (2,5-7). Vloga astrocitov ostaja pri izidu zdravljenja še vedno slabo poznana. Akutna zastrupitev z visokimi



koncentracijami CO močno zavre njihovo delovanje, saj povzroča oksidativni stres in mitohondrijsko disfunkcijo ter preko aktiviranja različnih cisteinskih proteaz sproža apoptozo, medtem ko zdravljenje s HBO po zastrupitvi zavira apoptozo in izboljšuje presnovne funkcije (15,16). V raziskavi smo preverili, ali zdravljenje s HBO preko ugodnega delovanja na astrocite štiti tudi nevrone, kar bi lahko bil eden od razlogov za manjšo incidenco nevropsiholoških posledic po zdravljenju s HBO. Zastrupitev s CO vodi v nastanek prostih radikalov (2,4), zato smo se pri raziskovanju zaščitnih mehanizmov osredinili na spremembe v ravni antioksidanta glutathiona v astrocitih.

V prvem delu raziskave smo preučevali vpliv CO na zgodnje procese celične smrti, torej na pojav nekroze – citotoksičnosti in apoptoze v nevronih možganske skorje podgane, ki so rastle v celični kulturi brez prisotnosti astrocitov, ter rezultate primerjali z mešano kulturo nevronov in astrocitov. Citotoksični učinek CO, ki smo ga določili z merjenjem koncentracije LDH, se je v nevronskih kulturah povečeval s časom (Slika 1A), v celicah mešane kulture pa značilnih sprememb ravni LDH nismo zaznali (Slika 1B). Znano je, da CO ne povzroča poškodb celične membrane astrocitov in ne sproža nekrotičnih procesov v teh celicah (16). Razlike v citotoksičnem delovanju CO v nevronski (Slika 1A), mešani (Slika 1B) in astrocitni (15) kulturi tako kažejo, da so nevroni, ki rastejo v odsotnosti astrocitov, v primerjavi z mešano kulturo dovzetnejši za škodljive učinke CO. Nakazujejo, da astrociti posedujejo zaščitne mehanizme, ki jih pri nevronih ni. Astrocitno podporno vlogo pri zaščiti nevronov ob izpostavljenosti CO potrjujejo tudi meritve aktivnosti izvršilne kaspaze 3/7. V nevronski kulturi je njena vrednost 3,3-krat preseгла aktivnost kaspaze v kontrolnih celicah (Slika 1C), v mešani celični kulturi pa se aktivira kasneje in manj ter po 8-urni izpostavljenosti CO/normoksiji doseže 2,5-kratno vrednost kontrole (Slika 1D).

Toksičen učinek CO na nevrone je posledica okvar številnih procesov, kar vodi v nekrozo celic. Pomembni so predvsem mehanizmi nastanka oksidativnega stresa. Z vezavo na citokrom a in c oksidazi vpliva na delovanje mitohondrijev, zavre celično dihanje ter povzroči nastanek superoksidnega aniona, aktivacija ksantin oksidaze, pri kateri kot stranski produkt nastaja peroksid, in NADPH oksidaze, ki vodi v nastanek hidroskilnega radikala, pa skupaj s povišano koncentracijo NO povzročita nastanek posebej toksičnega ONOO<sup>-</sup>. Vse to vodi v okvaro DNA, RNA, peroksidacijo lipidov in nekrozo celic (2,4,5,19).

Astrociti so bolj odporni na stres kot nevroni, saj

endogeni mehanizmi, kot so biogeneza mitohondrijev in sinteza antioksidantov ter s tem boljša zaščita pred oksidativnim stresom, energijski metabolizem in metaboliti, kot je L-laktat, modulacija vnetnih procesov ter privzem živčnih prenašalcev in nevrotoksinov, ščitijo homeostazo astrocitov, s tem pa preko dinamičnih interakcij tudi funkcijo nevronov (20).

V nadaljevanju smo proučili vpliv izpostavljenosti CO na homeostazo endogenega antioksidanta glutathiona. V astrocitih smo izmerili koncentracijo celokupnega GSHt (Slika 2A) in oksidiranega GSSG (Slika 2B), iz tega pa izračunali koncentracijo GSH ter razmerje GSH/GSSG (Slika 2C). Razmerje GSH/GSSG in spremembe v ravni glutathiona zrcalijo oksidativni stres celic, saj GSH prehaja v oksidirano obliko (Slika 2). Nižja koncentracija GSHt in nižja vrednost razmerja GSH/GSSG je morda posledica izločanja glutathiona v okolico, s čimer astrociti ob oksidativnem stresu poskušajo ščititi nevrone, ki so pri sintezi glutathiona odvisni od njih (11). Nižje ravni sovpadajo tudi s predhodnimi opažanji, da izpostavljenost CO znižuje koncentracijo ATP v astrocitih (15), kar je lahko posledica sprememb oksidativnega metabolizma, saj CO toksično deluje na mitohondrije (3,4,15). To pa lahko vodi do zmanjšanja sinteze GSH, ki je od ATP-odvisen proces (10,11). Ob zastrupitvi s CO lahko nastajajo tudi GSH-konjugati, ki se izločijo iz celice, porabljeni GSH pa celicam ni več na voljo (10). V poskusih na podganah, zastrupljenih s CO, so ugotavljali znižano aktivnost GR v nevronih možganske skorje in hipokampusu (21). GR sodeluje pri obnovi reduciranega glutathiona iz GSSG, pri čemer v reakciji sodeluje NADPH. CO aktivira NADPH oksidazo, pri tem nastaja NADP<sup>+</sup> (19). Morda učinek CO na GR in NADPH oksidazo predstavlja četrti možni mehanizem znižanja razmerja GSH/GSSG ob zastrupitvi s CO.

Trenutne smernice zdravljenja zastrupitev s CO predvidevajo zdravljenje s 100-odstotnim kisikom za lažje in s HBO za težje zastrupljene bolnike (2). V naši raziskavi smo želeli potrditi, da HBO večinoma deluje ugodno na celice, izpostavljene CO. Glede na ugotovitve, da se škodljivi učinek CO na obeh proučevanih celičnih kulturah v polni meri izrazi po 8 urah izpostavljenosti CO (Slika 1), smo poskus zdravljenja s HBO izvedli po 8 urah inkubacije celic v CO. Celice smo med 24-urno normoksijo v različnih časovnih presledkih (0–7 ur po CO) za eno uro izpostavili HBO in merili iste parametre kot pri ugotavljanju preživetja celic po zastrupitvi s CO. Rezultati so potrdili časovno odvisen varovalni vpliv HBO na celice v mešani kulturi, saj zavira aktivnost kaspaz 3/7 (Slika 3D) in ne proži citotoksičnosti (Slika 3B). Nevroni v kulturi se na izpostavitve hiperbaričnemu kisiku odzivajo

drugače. HBO, ki sam ne spodbuja sproščanja LDH (Slika 3A), ne zavira škodljivega delovanja CO, pač pa celo poveča njegov citotoksični učinek (Slika 3A). Že v kontrolni nevronske kulturi kot tudi v celicah, ki so bile izpostavljene CO, HBO spodbuja aktivnost kaspaz 3/7 (Slika 3D), kar dokazuje toksični vpliv kisika pod tlakom na celice. Hiperoksične razmere spodbujajo tvorbo kisikovih prostih radikalov, ki so pomembne signalne molekule z zaščitnim ali škodljivim delovanjem, kar je močno odvisno od prisotnosti antioksidantov (22). Kaže, da v nevronih antioksidativni obrambni mehanizmi po kratkotrajni izpostavitvi hiperoksiji niso dovolj učinkoviti, zato se oksidativni stres, ki nastane, ne popravi; še slabše je po zastrupitvi s CO.

Zdravljenje s HBO je najbolj učinkovito v časovnem presledku 1–5 ur po izpostavljenosti CO (Slika 4D) (15,16). Ponovno pa smo dokazali boljše preživetje celic v mešani kulturi, kar kaže na zaščitno vlogo astrocitov, ki jo je HBO še izboljšal. HBO zmanjša sproženje apoptoze preko številnih mehanizmov, saj poveča izražanje antiapoptotskih proteinov Bcl-2 in Bcl-xL, zmanjša sproščanje proapoptotskega proteina Bax ter citokroma c, vpliva na aktiviranje ionskih kanalov in zviša izražanje superoksid dismutaze (SOD), kar zmanjša nastanek ROS (23,24). Uporaba HBO po zastrupitvi mešane celične kulture s CO v določenem časovnem okviru torej preprečuje njegove škodljive učinke, kar ponovno upravičuje in potrjuje uporabo HBO v terapevtske namene pri zastrupljenih s CO.

HBO vpliva na homeostazo glutaciona v astrocitih, saj enournna izpostavljenost zviša koncentracijo GSSG in s tem zniža razmerje GSH/GSSG (Slika 4). Predvidevamo, da je učinek HBO posledica oksidativnega stresa, ki povzroči oksidacijo GSH v GSSG. Pri celicah, ki so bile po izpostavitvi CO zdravljene s HBO, slednji normalizira koncentracije GSht, GSSG in razmerja GSH/GSSG na vrednosti kontrolne skupine, s čimer izniči toksični učinek CO (Slika 4). Za najboljši časovni presledki zdravljenja s HBO se je izkazal čas 1–7 ur po izpostavitvi CO, kar delno sovпада z ugotovitvami pri vplivu HBO na apoptozo po CO v mešani kulturi (Slika 3D).

Znižana koncentracija GSht v astrocitih po CO je lahko posledica povečane sekrecije, manjše sinteze in porabe GSH v procesih detoksifikacije ter vpliva na obnovo GSH. HBO zniža raven apoptoze in oksidativni stres po izpostavitvi CO (15,16). Opazili so tudi padec aktivnosti NO sintaze in nižje koncentracije NO (24), kar zmanjša nastajanje prostih radikalov. Vse skupaj pa lahko vodi v nižjo porabo GSH ter njegovo zmanjšano sekrecijo, saj imajo celice manj signalov, zaradi katerih

bi ga sicer izločile v okolico. Na zmanjšano sintezo GSH bi HBO lahko deloval preko številnih poti v metabolizmu glutaciona. Znano je, da HBO v astrocitih zviša koncentracijo ATP, saj s tem, ko izpodrine CO s citokrom c oksidazo in zmanjša peroksidacijo mitohondrijev, omogoči sintezo ATP (15). Vpliva HBO na GR v literaturi nismo zasledili. Gre za še neraziskano področje. So pa poskusi na miši pokazali, da HBO po zastrupitvi s CO zavre NADPH oksidazo, kar zmanjša oksidativni stres (25) in lahko omogoči obnovo GSH. HBO preko naštetih mehanizmov z zavoro toksičnih učinkov CO verjetno zmanjša oksidativni stres, zavre apoptozo, zviša koncentraciji ATP in NADPH. To odpravi zavoro sinteze ter obnovo GSH, kar vodi do povečanja koncentracije GSht, znižanja koncentracije GSSG ter zvišanja razmerja GSH/GSSG v primerjavi s celicami, izpostavljenimi le CO (Slika 4).

#### 4.1 Klinična uporabnost raziskave

Raziskovanje oksidativnih procesov pri zastrupitvi s CO in zdravljenju s HBO je pomembno, saj obstajajo možna zdravila, ki izboljšajo antioksidativno sposobnost celic ter bi lahko postala nova linija zdravljenja pri zastrupitvah s CO. Glutacion je pri zastrupitvi s CO verjetno udeležen v zaščitnih mehanizmih astrocitov, k čemur dodatno prispeva izpostavljenost HBO. Na to kažejo naši rezultati (Sliki 3 in 4).

Za izboljšanje antioksidativnega delovanja astrocitov bi v protokol zdravljenja zastrupitve s CO lahko dodali prekurzorje glutaciona ali njegove analoge. Koncentracija GSH v nevronih je odvisna od razpoložljivega cisteina, vendar zviševanje koncentracije GSH z dodatkom cisteina ni priporočljivo zaradi nevrotoksičnih učinkov cisteina (26). N-acetilcistein je molekula, ki prehaja krvno-možgansko pregrado in deluje kot prekurzor v sintezi GSH. Vsebuje tiolno skupino, zato lahko že sam deluje kot antioksidant in reducira ROS. Dokazano je, da dodatek N-acetilcisteina prispeva k boljšemu izidu zdravljenja nevropatij, možganskih poškodb in drugih bolezni OŽ (27). Raven glutaciona bi lahko zvišali tudi z dodajanjem čistega GSH, saj prečka krvno-možgansko pregrado (13).

Študije so pokazale, da je pri peroralnem vnosu GSH biorazpoložljivost majhna, prav tako je prehajanje v možgane vprašljivo zaradi velikega primarnega privzema jetter in črevesja. Pri intravenskem in intranazalnem vnosu čistega GSH so opažali porast njegove koncentracije v možganih (28). Za zdravljenje bi se lahko uporabljali tudi sintezni analogi glutaciona, ki so po strukturi podobni glutacionu in imajo enako antioksidativno funkcijo, ter

nekatero molekule, ki zvišujejo raven GSH (29). Vendar njihova uporabnost, prav tako kot tudi učinkovitost intravenskega in intranazalnega dodajanja GSH na področju zastrupitev s CO in zdravljenja s kisikom ni raziskana in se jih pri zdravljenju zato ne uporablja.

## 5 Zaključek

V raziskavi smo ugotovili, da akutna izpostavljenost CO/hipoksiji proži zgodnje procese celične smrti v nevronski in mešani celični kulturi. Oksidativni stres, ki ga povzroča CO, vpliva tudi na ravni glutationa v astrocitih. Zdravljenje celic s HBO učinkovito zmanjšuje posledice delovanja CO v astrocitni in mešani kulturi, ne pa v nevronski celični kulturi. Nevroni, ki rastejo v odsotnosti astrocitov, so v primerjavi z mešano kulturo dovezetnejši za škodljive učinke CO in HBO, kar nakazuje, da astrociti ob oksidativnem stresu poskušajo ščititi nevrone, ki so pri sintezi glutationa, pomembnega antioksidanta, odvisni od njih.

## Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

## Zahvala

Zahvaljujemo se Laboratoriju za molekularno in celično farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in Centru za klinično toksikologijo in farmakologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Zahvaljujemo se tudi dr. Klari Bulc Rozman, univ. dipl. biol., z Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za pripravo primarnih podganjih nevronskih in mešanih celičnih kultur. Raziskovalno delo je bilo financirano v sklopu programa (P3-0019).

## Uredniški komentar

Članek je nastal na podlagi nagrajene študentske Prešernove raziskovalne naloge v letu 2020/2021.

## Literatura

- Ernst A, Zibrak JD. Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med*. 1998;339(22):1603-8. DOI: [10.1056/NEJM199811263392206](https://doi.org/10.1056/NEJM199811263392206) PMID: [9828249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9828249/)
- Brvar M, Šarc L, Jamšek M, Grenc D, Finderle Ž. Smernice zdravljenja zastrupitev z ogljikovim monoksidom. *Zdrav Vestn*. 2014;83(1):7-17.
- Brvar M, Jamšek M, Možina M, Horvat M, Gorjup V. Epidemiološki pregled zastrupitev z ogljikovim monoksidom v Ljubljani od 1990 do 1999. *Zdrav Vestn*. 2002;71(2):87-90.
- Roderique JD, Josef CS, Feldman MJ, Spiess BD. A modern literature review of carbon monoxide poisoning theories, therapies, and potential targets for therapy advancement. *Toxicology*. 2015;334:45-58. DOI: [10.1016/j.tox.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.05.004) PMID: [25997893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25997893/)
- Weaver LK. Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med*. 2009;360(12):1217-25. DOI: [10.1056/NEJMcp0808891](https://doi.org/10.1056/NEJMcp0808891) PMID: [19297574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297574/)
- Smollin C, Olson K. Carbon monoxide poisoning (acute). *Clin Evid*. 2010;2010:2103. PMID: [21418677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21418677/)
- Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliott CG, Clemmer TP, et al. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med*. 2002;347(14):1057-67. DOI: [10.1056/NEJMoa013121](https://doi.org/10.1056/NEJMoa013121) PMID: [12362006](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12362006/)
- Verkhatsky A, Parpura V, Vardjan N, Zorec R. Physiology of Astroglia. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1175:45-91. DOI: [10.1007/978-981-13-9913-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_3) PMID: [31583584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31583584/)
- Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):312-25. DOI: [10.1038/s41593-020-00783-4](https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4) PMID: [33589835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33589835/)
- Aoyama K. Glutathione in the Brain. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):5010. DOI: [10.3390/ijms22095010](https://doi.org/10.3390/ijms22095010) PMID: [34065042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34065042/)
- Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*. 2022;27(1):324. DOI: [10.3390/molecules27010324](https://doi.org/10.3390/molecules27010324) PMID: [35011559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011559/)
- McBean GJ. Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants*. 2017;6(3):62. DOI: [10.3390/antiox6030062](https://doi.org/10.3390/antiox6030062) PMID: [28771170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771170/)
- Ni G, Hu Z, Wang Z, Zhang M, Liu X, Yang G, Yan Z, Zhang Y. Cysteine Donor-Based Brain-Targeting Prodrug: Opportunities and Challenges. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;4834117. eCollection 2022C. DOI: [10.1155/2022/4834117](https://doi.org/10.1155/2022/4834117) PMID: [35251474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35251474/)
- Loboda Č, Mlakar M. Optimizacija zdravljenja s kisikom pri zastrupitvah z ogljikovim monoksidom [Prešernova raziskovalna naloga]. Ljubljana: Loboda Č, Mlakar M. 2012. pp. 45-51.
- Jurič DM, Finderle Ž, Šuput D, Brvar M. The effectiveness of oxygen therapy in carbon monoxide poisoning is pressure- and time-dependent: a study on cultured astrocytes. *Toxicol Lett*. 2015;233(1):16-23. DOI: [10.1016/j.toxlet.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.004) PMID: [25562542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25562542/)
- Jurič DM, Šuput D, Brvar M. Hyperbaric oxygen preserves neurotrophic activity of carbon monoxide-exposed astrocytes. *Toxicol Lett*. 2016;253:1-6. DOI: [10.1016/j.toxlet.2016.04.019](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.019) PMID: [27113706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27113706/)
- Kekec L, Krajnc I. Zaščitna vloga astrocitov pri zastrupitvi z ogljikovim monoksidom in optimizacija zdravljenja [Prešernova raziskovalna naloga]. Ljubljana: Kekec L, Krajnc I. 2021;l:32-5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54. DOI: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) PMID: [942051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/)
- Hara S, Kobayashi M, Kuriwa F, Ikematsu K, Mizukami H. Hydroxyl radical production via NADPH oxidase in rat striatum due to carbon monoxide poisoning. *Toxicology*. 2018;394:63-71. DOI: [10.1016/j.tox.2017.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.12.002) PMID: [29223502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29223502/)
- Bonvento G, Bolaños JP. Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. *Cell Metab*. 2021;33(8):1546-64. DOI: [10.1016/j.cmet.2021.07.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.006) PMID: [34348099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34348099/)
- Wang P, Zeng T, Zhang CL, Gao XC, Liu X, Xie KQ, et al. Lipid peroxidation was involved in the memory impairment of carbon monoxide-induced delayed neuron damage. *Neurochem Res*. 2009;34(7):1293-8. DOI: [10.1007/s11064-008-9908-1](https://doi.org/10.1007/s11064-008-9908-1) PMID: [19199032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19199032/)

22. Poljšak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792. DOI: [10.1155/2013/956792](https://doi.org/10.1155/2013/956792) PMID: [23738047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23738047/)
23. Daly S, Thorpe M, Rockswold S, Hubbard M, Bergman T, Samadani U, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy in the Treatment of Acute Severe Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *J Neurotrauma*. 2018;35(4):623-9. DOI: [10.1089/neu.2017.5225](https://doi.org/10.1089/neu.2017.5225) PMID: [29132229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132229/)
24. Ahmadi F, Khalatbary AR. A review on the neuroprotective effects of hyperbaric oxygen therapy. *Med Gas Res*. 2021;11(2):72-82. DOI: [10.4103/2045-9912.311498](https://doi.org/10.4103/2045-9912.311498) PMID: [33818447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33818447/)
25. Qi Y, Guo Z, Meng X, Lv Y, Pan S, Guo D. Effects of hyperbaric oxygen on NLRP3 inflammasome activation in the brain after carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med*. 2020;47(4):607-19. DOI: [10.22462/10.12.2020.10](https://doi.org/10.22462/10.12.2020.10) PMID: [33227837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33227837/)
26. Kranich O, Hamprecht B, Dringen R. Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci Lett*. 1996;219(3):211-4. DOI: [10.1016/S0304-3940\(96\)13217-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13217-1) PMID: [8971817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8971817/)
27. Martinez-Banaclocha M. N-Acetyl-Cysteine: Modulating the Cysteine Redox Proteome in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants*. 2022;11(2):416. DOI: [10.3390/antiox11020416](https://doi.org/10.3390/antiox11020416) PMID: [35204298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35204298/)
28. Asanuma M, Miyazaki I. Glutathione and Related Molecules in Parkinsonism. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8689. DOI: [10.3390/ijms22168689](https://doi.org/10.3390/ijms22168689) PMID: [34445395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445395/)
29. Wu JH, Batist G. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3350-3. DOI: [10.1016/j.bbagen.2012.11.016](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.016) PMID: [23201199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201199/)