

ANALISIS RESPONS STRES OKSIDATIF, ANTIOKSIDAN, DAN ADAPTASI FISILOGIS JARINGAN OTAK PASCA INDUKSI HIPOKSIA HIPOBARIK INTERMITEN PADA TIKUS *SPRAQUE DOWLEY*

Wardaya¹, Marjani², Asep Edi³

¹Akademi Keperawatan RSP TNI AU, wrdfaal@yahoo.com

²Poltekes TNI AU Ciumbuleuit Bandung, mjkhoirunnisa@gmail.com

³Poltekes TNI AU Ciumbuleuit Bandung, a.ediapt@gmail.com

ABSTRAK

Penurunan konsentrasi oksigen dapat terjadi pada kondisi fisiologis tubuh maupun patologis. Hipoksia merupakan salah satu faktor yang berkontribusi dalam patomekanisme serangan jantung, stroke, hipertensi pulmonal dan penyakit-penyakit lain yang dapat menyebabkan kematian. Dasar ilmiah dari latihan hipoksia hipobarik intermiten pada *Hypobaric chamber training* ini, terutama mengenai manfaatnya, hingga saat ini masih belum banyak dipublikasikan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis respons stres oksidatif, antioksidan, dan adaptasi fisiologis jaringan otak pasca induksi hipoksia hipobarik intermiten pada tikus *Sprague dowley*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba. Kegiatan penelitian ini dilaksanakan selama 5 (lima) bulan yaitu mulai bulan Agustus sampai dengan Desember. Tempat kegiatan penelitian di Laboratorium Aerofisiologi Lakespra Saryanto dan Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUI Salemba. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pada pemeriksaan kadar MDA pada otak tikus didapatkan hasil peningkatan kadar MDA pada kelompok hari ke-21 yaitu tikus yang mengalami tiga kali pemaparan hipoksia hipobarik walaupun tidak bermakna, sedangkan pada kelompok tikus yang mendapat paparan ulang hipoksia hipobarik (kelompok hari ke-7, 14 dan 28), didapatkan kadar MDA yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan kontrol ($p < 0,005$).

Kata Kunci: *Adaptasi fisiologis, Antioksidan, Hipoksia hipobarik intermiten, Stres oksidatif*

ABSTRACT

The decrease in oxygen concentration level could occur in both physiological and pathological conditions. Hypoxia was one of the factors that contributed to the pathomechanism of heart attacks, strokes, pulmonary hypertension and other diseases that could cause death. The scientific basis of intermittent hypobaric hypoxic training in Hypobaric chamber training, especially regarding its benefits, has not been widely publicized. The purpose of this study was to analyze the oxidative stress responses, antioxidants, and physiological adaptations of brain tissue after intermittent hypobaric hypoxic induction in Sprague Dowley rats. This research was an in-vivo experimental study using experimental animals. These research activities was carried out for 5 (five) months, from August to December. and conducted in the Lakespra Saryanto Aerophysiology Laboratory and the Biomolecular Biochemistry Laboratory Universitas Indonesia Medical Faculty Salemba. Results of this research showed an increased level of MDA levels in the 21st day group are mice that experienced three times hypobaric hypoxic exposure even though it was not significant, whereas in the group of mice that received repeated exposure to hypobaric hypoxia (day group 7th, 14th and 28th), significantly lower MDA levels were obtained compared to controls ($p < 0.005$).

Keywords: *Physiology adaptation, antioxidant, intermitten hypoxia hypobaric, oxidative stress.*

PENDAHULUAN

Hipoksia sistemik, baik kontinyu mau pun intermiten, pada tahap awal akan menimbulkan respons pada sistem kardiovaskuler dan respirasi yang kemudian jika berlangsung terus akan menimbulkan respons lanjutan pada target organ dari kedua sistem tersebut, termasuk otak.

Otak selain berisi sel neuron juga terdapat neuroglia. Neuroglia merupakan sel penyokong dan pelindung dari sel neuron. Jumlah sel glia hampir dua kali lipat sel neuron. Karena anatomi dan fungsinya, otak sangat sensitif terhadap kekurangan pasokan oksigen. Kebutuhannya terhadap oksigen juga sangat tinggi (untuk berat yang hanya 2% dari berat tubuh, otak mengkonsumsi 20% dari total oksigen tubuh). Sementara itu lebih dari 50% kebutuhan energi sel otak digunakan untuk transpor ion melewati membran sel otak dalam rangka mempertahankan homeostasis ion di tingkat sel.³⁶ Karenanya, hanya dalam beberapa menit sejak pasokan oksigen berkurang atau terputus, otak bisa mengalami iskemia. Akibat paparan hipoksia, otak mudah mengalami stres oksidatif. Hal tersebut tidak terlepas akibat tingginya jumlah kalsium yang melewati membran sel neuron, terdapatnya *excitatory amino acid*, tingginya kebutuhan oksigen per unit jaringan otak, dan adanya sejumlah neurotransmitter yang *autoxidizable molecules*. Selain itu juga karena cairan otak tidak dapat mengikat besi yang terlepas, dan mudah terjadinya peroksidasi lipid akibat membran sel neuron terdiri dari asam lemak tak jenuh, serta terbentuknya H₂O₂ pada metabolisme di otak (misalnya oksidasi dopamin) juga memudahkan otak mengalami stres oksidatif. Telah diketahui juga bahwa pertahanan antioksidan di otak cukup rendah, disisi lain ada kemampuan mikroglia untuk membentuk superoksida dan H₂O₂, dan terdapatnya sitokrom P450 yang isoformnya bisa membentuk SOR (senyawa oksigen reaktif). Semua itu membuat proses nekrosis dan apoptosis di otak mudah terjadi pada kondisi hipoksia.

Senyawa oksigen reaktif (SOR) merupakan oksidan (senyawa pengoksidasi) yang sesuai namanya berasal dari oksigen atau turunan oksigen yang mudah bereaksi. SOR dapat mengoksidasi dan merusak sel, termasuk sel otak, termasuk diantaranya yang terpenting yaitu lipid

yang merupakan bagian dari membran sel, protein dan DNA. SOR sebagian diantaranya berbentuk radikal seperti radikal hidroksil, peroksid, dan ion superoksida, dan sebagian lagi bukan radikal. Karena itulah kita sering menyebutnya sebagai radikal bebas (*free radical*). Umumnya radikal bebas lebih berbahaya (yang paling berbahaya adalah radikal hidroksil) dibanding non radikal, karena dapat menimbulkan reaksi berantai.⁸ Beberapa penelitian melaporkan bahwa paparan tekanan hipobarik dapat menyebabkan peningkatan kadar SOR. Hal ini disebabkan karena rendahnya tekanan parsial oksigen pada kondisi hipobarik yang akan mengakibatkan hipoksia. Peningkatan produksi SOR pada keadaan hipoksia terjadi di kompleks III mitokondria.³⁷ Ini yang akan memberi sinyal pada stabilisasi *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), faktor transkripsi yang berperan sebagai regulator utama untuk homeostasis oksigen²⁴. Di samping berperan dalam sinyal hipoksia, peningkatan SOR yang berlebihan juga dapat menimbulkan stres oksidatif. Sifat reaktif SOR dapat menyerang makromolekul di dalam tubuh seperti lipid, protein dan DNA yang menyebabkan kerusakan sel. Lipid akan mengalami peroksidasi oleh SOR dan menghasilkan peroksida lipid (malondialdehid). Karena itulah, peroksida lipid (MDA) banyak digunakan untuk mendeteksi kerusakan akibat peroksidasi lipid yang terjadi akibat asam lemak tidak jenuh jamak dari membran atau lipoprotein. Dampak SOR juga dialami oleh makromolekul lain seperti protein, polisakarida dan DNA.

Ikatan peptida dan rantai samping asam amino pada protein akan mengalami kerusakan akibat SOR dan menghasilkan senyawa karbonil. Serangan SOR terhadap karbohidrat juga menghasilkan kelompok senyawa yang sama. DNA juga akan mengalami serangan oleh SOR dan menghasilkan senyawa 8-OHdG.

Makhluk hidup dilengkapi dengan sistem antioksidan di seluruh tubuh, termasuk juga di otak, untuk mencegah dan meredam aktifitas SOR yang merupakan produk normal dari proses biologis. Antioksidan sendiri terdiri dari dua jenis, yaitu antioksidan yang mencegah terhipungnya SOR secara berlebihan (*preventive anti oxidant*) dan antioksidan yang berfungsi memutus reaksi

berantai SOR (*chain-breaking antioxidant*). Antioksidan yang dikenal saat ini adalah yang berupa enzim-enzim, seperti *superoksida dismutase* (SOD), *glutation peroksidase* dan *katalase*. *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan enzim yang mengurai radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) yang sangat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Hidrogen peroksida selanjutnya didetoksifikasi menjadi air oleh enzim katalase dan *glutation peroksidase*. Katalase akan mengkatalisis hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Sementara *glutation* dalam bentuk tereduksi (GSH) akan mendonasikan elektron ke SOR sehingga SOR yang menjadi penerima elektron akan menjadi senyawa yang tidak reaktif lagi.

Iskemia otak, adalah suatu keadaan dimana aliran darah ke otak tidak adekuat dengan kebutuhannya untuk mendapatkan oksigen dan nutrisi dalam rangka mempertahankan integritas metabolik neuronal (40% sampai 45% dari total *cerebral metabolic rate for oxygen consumption* [CMR02]) dan fungsi (55% to 60% CMR02). Otak akan mengalami hipoksia jika pasokan oksigen yang kurang, yang berlanjut menjadi iskemia.³⁸ Aliran darah ke otak yang tidak adekuat lebih lanjut akan menyebabkan matinya sel otak/infark serebri. Iskemia otak akan menyebabkan gangguan dalam metabolisme otak, turunnya *metabolic rate*, dan terjadinya krisis energi di otak. Krisis energi dimulai ketika usaha untuk mempertahankan konsumsi energi seperti pada keadaan normoksia tidak dapat dilakukan akibat keadaan hipoksia berat. Dengan demikian maka produsen ATP di tingkat sel tidak mencukupi, sehingga cadangan fosfat berenergi tinggi akan digunakan. Ketika ATP mencapai tingkat dibawah 50 % dari kondisi normal, maka membran sel akan mengalami depolarisasi, sehingga gradien ion akan hilang.²⁶ Dengan tidak adanya ATP, otomatis sel akan melakukan respon darurat karena bisa menyebabkan kematian sel. Kondisi ketidakseimbangan energi akan berwujud dalam bentuk perubahan jumlah metabolit energi yang dipakai. Fosfokreatin(PCr) akan berfungsi sebagai dapar ATP. Namun akhirnya cadangan PCr pun akan turun drastis hingga 10-20% dari nilai normal, dan kemudian ATP akan didegradasi menjadi ADP, dan AMP.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba. Kegiatan penelitian ini dilaksanakan selama 5 (lima) bulan yaitu mulai bulan Agustus sampai dengan Desember. Tempat kegiatan penelitian di Laboratorium Aerofisiologi Lakespra Saryanto dan Laboratorium Biokimia Biomolekuler FKUI Salemba.

Prosedur penelitian:

1. Tikus ditempatkan di animal house selama 1 minggu untuk adaptasi, makan dan minum ad libitum.
2. Induksi hipoksia hipobarik sesuai prosedur hipoksia hipobarik intermiten dari Mulyawan (2012) yang dimodifikasi: Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 kali pemaparan, 2 kali pemaparan, 3 kali pemaparan dan 4 kali pemaparan, dengan tenggang waktu tiap pemaparan adalah 7 hari. Perlakuan yang diberikan adalah tikus dimasukkan ke dalam hypobaric chamber dengan simulasi sesuai dengan latihan para penerbang, yaitu sebagai berikut:
 - a. Naik dari ketinggian 0 kaki (setinggi permukaan laut/ground level) ke ketinggian 35.000 kaki dengan rate of ascent 5.000 kaki/menit. Ketinggian 35.000 kaki ini dipertahankan selama 1 menit.
 - b. Kemudian turun dari ketinggian 35.000 kaki ke 30.000 kaki dengan rate of descent 5.000 kaki/menit, dan ketinggian ini dipertahankan selama 3 menit.
 - c. Kemudian turun lagi dari ketinggian 30.000 kaki ke 25.000 kaki dengan rate of descent 5.000 kaki/menit, dan ketinggian ini dipertahankan selama 5 menit.
 - d. Kemudian turun lagi dari ketinggian 25.000 kaki ke 18.000 kaki dengan rate of descent 5.000 kaki/menit, dan ketinggian ini dipertahankan selama 30 menit. Setelah selesai dilakukan simulasi penurunan ke ground level.
3. Setelah sampai di ground level, dilakukan pemeriksaan fungsi neuromuscular, vestibulomotorik, kompleksmotorik, deficit neurologis dan fungsi kognisi.
4. Dilakukan pematahan tulang leher tikus, dilakukan pembedahan jaringan otak tikus.

5. Jaringan otak dilakukan pemeriksaan gambaran stress oksidatif (kadar MDA, kadar karbonil).
6. Jaringan otak dilakukan pemeriksaan gambaran aktifitas antioksidan (aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik glutathion).
7. Jaringan otak dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk analisis glutamat dengan anti NMDAR1 antibody (ab17345).
8. Jaringan otak dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk analisis GABA dengan anti GABA B receptor antibody (ab55051).
9. jaringan otak dilakukan pemeriksaan protein PSD95.

HASIL

1. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pada pemeriksaan kadar MDA pada otak tikus didapatkan hasil peningkatan kadar MDA pada kelompok hari ke-21 yaitu tikus yang mengalami tiga kali pemaparan hipoksia hipobarik walaupun tidak bermakna, sedangkan pada kelompok tikus yang mendapat paparan ulang hipoksia hipobarik (kelompok hari ke-7, 14 dan 28), didapatkan kadar MDA yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan kontrol ($p < 0,005$).
2. Pada pemeriksaan karbonil otak didapatkan hasil yang lebih rendah secara tidak bermakna pada kelompok kelompok hari ke-7, 14, 21 dan 28 dibandingkan kontrol ($p = 0,095$).
3. Pada pemeriksaan kadar GSH otak didapatkan hasil yang lebih tinggi pada kelompok hari ke-7, 14, 21 dan 28 dibandingkan kelompok kontrol. Tetapi perbedaan secara bermakna peningkatan kadar GSH yaitu pada kelompok hari ke-14 dan 28 dibandingkan kontrol ($P < 0,05$), sedangkan pada kelompok hari ke-7 dan 21 terjadi peningkatan kadar GSH secara tidak bermakna ($p = 0,076$ dan $0,175$). Hasil ini menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas antioksidan dalam sel otak tikus dalam upayanya mengatasi stress oksidatif.
4. Pada pemeriksaan kadar Katalase otak didapatkan hasil lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol dan berbeda secara bermakna pada kelompok hari ke-7, 14 dan 28 ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok hari ke-21 kadar katalase tidak berbeda secara bermakna.

PEMBAHASAN

Latihan hipoksia hipobarik intermiten pada *Hypobaric chamber training* ini, terutama mengenai manfaatnya, hingga saat ini masih belum banyak dipublikasikan. Baru ada 2 penelitian (kedua-duanya dari Lakespra Saryanto) terkait hipoksia hipobarik intermiten pada *Hypobaric chamber training* ini, yaitu penelitian Hidayat dkk (2011) yang meneliti efek paparan *hipoxia preconditioning* terhadap stress oksidatif dan apoptosis pada sel jantung tikus dan penelitian Mulyawan (2012) yang meneliti respons adaptasi di tingkat biomolekuler yang terjadi pada jaringan otak tikus terhadap induksi hipoksia hipobarik intermiten. Padahal telah diketahui terbentuknya radikal bebas sebagai efek negatifnya, merupakan salahsatu kondisi yang dapat terjadi pada hipoksia di ketinggian, sehingga penelitian respons adaptasi fisiologis jaringan otak pasca induksi hipoksia hipobarik intermiten sangat diperlukan.

Hipoksia di ketinggian merupakan salahsatu bidang kajian fisiologis penting di dunia kedokteran penerbangan. Terbang memungkinkan untuk makin tinggi akibat kemajuan teknologi, namun penerbangan seperti itu memberikan resiko terjadinya hipoksia. Pesawat-pesawat, baik pesawat militer, patroli, mau pun komersial, dilengkapi dengan alat-alat canggih *pressurized cabin* untuk melindungi awak pesawat dan penumpang dari resiko dekompresi dan hipoksia. Namun kerusakan alat-alat di pesawat dapat menimbulkan hilangnya tekanan kabin yang dapat mengakibatkan bencana, dan karenanya awak kabin harus waspada mengenai resiko itu : mengenali gejalanya dan melakukan tindakan yang tepat.^{42,43} Federal Aviation Administration (FAA), regulator penerbangan sipil di Amerika Serikat mendefinisikan hipoksia (hipobarik) sebagai suatu kondisi kekurangan oksigen untuk memenuhi kebutuhan tubuh yang mengakibatkan terganggunya fungsi otak dan organ lainnya.⁶⁶ Hipoksia menimbulkan gangguan di penglihatan, pengambilan keputusan, kontrol motorik dan berakibat terjadi hendaya (inkapasitasi), bahkan kematian.⁴ Efek hipoksia terlihat pada orang sehat setelah mencapai ketinggian 10000 kaki /3048 m.⁴⁴ Pada sebagian individu bahkan sudah nampak pada ketinggian yang lebih rendah. Secara umum, gejala awal berupa pernafasan yang

cepat, sakit kepala ringan sampai berat, rasa lelah, mual, gangguan tingkah laku (eforia, iritabilitas), bicara ngaco, dan turunnya kemampuan berfikir dan analisa (FAA, 2002b).

Banyak faktor yang dapat menyebabkan Stress oksidatif pada manusia, salah satunya adalah kondisi hipoksia. Radical oxygen species (ROS) dibentuk dan dilepaskan dalam kondisi hipoksia terutama dari mitokondria. Kondisi hipoksia mengakibatkan peningkatan pembentukan ROS di dalam sel. Sumber ROS dalam kondisi hipoksia terutama berasal dari mitokondria dan aktivitas enzim NADP(H) oksidase dan xantin oksidase. Peningkatan pembentukan ROS ini tidak langsung menimbulkan kondisi stres oksidatif bagi sel. Sel akan menjaga keseimbangan dengan meningkatkan pembentukan senyawa atau reaksi yang bersifat anti oksidan.

Beberapa senyawa yang sering dijadikan petunjuk adanya kerusakan akibat radikal bebas ini adalah malondialdehid (MDA), glutathion (GSH), karbonil dan enzim katalase. MDA merupakan metabolit hasil peroksidasi lipid oleh radikal bebas. GSH memegang peranan dalam reaksi penguraian peroksida menjadi air. Enzim katalase memiliki peranan proses penguraian peroksidase menjadi air dan oksigen. MDA merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas oksidan (radikal bebas) dalam sel, sedangkan glutathion dan katalase menggambarkan aktivitas anti oksidan dalam sel. Keadaan stress oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas lebih tinggi dibandingkan jumlah antioksidan dalam tubuh.

Kadar GSH dan aktivitas enzim katalase memiliki korelasi yang bermakna dan berbanding terbalik di organ otak pada penelitian ini. Terlihat belum terjadi pembentukan yang berlebihan dari enzim katalase sebagai usaha tubuh untuk mengatasi peningkatan senyawa oksidan. Tampaknya GSH lebih berperan dalam sifatnya sebagai antioksidan dibandingkan katalase.

Hasil penelitian ini menggambarkan adanya proses adaptasi sel-sel dalam menghadapi lingkungan hipoksia. Sel-sel menurunkan proses metabolismenya sehingga energi yang ada dapat dimanfaatkan untuk proses bertahan. Penelitian ini menjelaskan bahwa selain menimbulkan

peningkatan terhadap konsentrasi ROS, kondisi hipoksia juga akan meningkatkan pembentukan antioksidan dalam sel. Pada penelitian adaptasi hipoksia, sel yang telah beradaptasi memiliki daya tahan yang lebih baik terhadap serangan iskemia ataupun hipoksia sesudahnya. Hal ini terjadi karena tubuh telah meningkatkan pembentukan senyawa anti oksidan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Paparan hipoksia hipobarik intermitten menyebabkan penurunan stres oksidatif pada otak tikus, hal ini terbukti adanya penurunan kadar MDA pada kelompok hari ke-7, 14 dan 28, sedangkan penurunan kadar karbonil terjadi pada semua kelompok tikus yang mendapatkan paparan hipoksia hipobarik intermitten.
2. Penurunan stres oksidatif pada paparan ulang hipoksia hipobarik intermitten terjadi karena adanya adaptasi terhadap kondisi hipoksia yaitu dengan cara peningkatan aktivitas enzim antioksidan seperti GSH.
3. Paparan ulang hipoksia hipobarik intermitten dapat melindungi jaringan otak terhadap stres oksidatif, hal ini disebabkan karena adanya mekanisme adaptasi jaringan terhadap kondisi hipoksia.
4. Status antioksidan pada otak berbeda, terbukti dari pola kadar GSH yang meningkat, sedangkan ekspresi enzim antioksidan katalase yang menurun. Hal ini disebabkan regulasi ekspresi antioksidan yang berbeda terhadap kondisi banyaknya paparan hipoksia yang dialami hewan coba.

REFERENSI

- Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis.2000;588-594
- Zhu et all. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Cell death and differentiation.2007; 14:775-784
- Ke Q, Costa M. hypoxia inducible factor 1 (HIF-1).molecular pharmacology.2006; vol 70:no.5
- Lau A, Tymianski. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch-Eur J Physiol. 2010; 460:525-542

- Tian X. Analysis of ischemia neuronal injury in Cav2.1 channel $\alpha 1$ subunit mutant mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013; 434: 60-64
- Wanandi SI, Dewi S, Paramita D. ekspresi relatif mRNA HIF 1 α pada jantung, otak dan darah tikus selama induksi hipoksia sistemik. *Makara sains* 2006; 13:185-188
- Wenger R. cellular adaptation to hypoxia: O₂ sensing protein hydroxylase, hypoxia inducible transcription factors and O₂ regulated gene expression. *The FASEB Journal*. 2002; 1151-1162.
- Jones NM, Lee EM, Brown TG, Jarrot B, Beart PM. Hypoxic preconditioning produces differential expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF 1 α) and its regulatory enzyme HIF prolyl hydroxylase 2 in neonatal rat brain. *Neuroscience letters*. 2006;404:72-77
- Applehoff R, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 and PHD3 in the regulation of hypoxia inducible factor. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279:38458-38465
- Chavez J, Agani F, Pichiule P, Lamanna J. expression of hypoxia inducible factor 1A in the brain of rats during chronic hypoxia. *Japp Physiology.org*. 2000
- Shao G, et al. Hypoxia preconditioning improves spatial cognitive ability in mice. *Neurosignals* 2006.07(15):314-321
- Hidayat A, Wiradisastra K, Hernowo B, Achmad TA. Paparan hipoksia hipobarik intermitten menurunkan stress oksidatif dan apoptosis sel jantung pada tikus jantan Sprague dawley. *J Indon Med Assoc*. 2011: vol 61 no 7
- Bernaudin et al. Normobaric hypoxia induced tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia inducible factor 1 and its target genes, eritropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 2002;22:393-403
- Rybnikova EA, Khoizai. Expression of early gene proteins, structure changes in brain neurons in hypobaric hypoxia and reoxygenation and correcting effects of preconditioning. *Neurosci and behave physiol*. 2005;35(4):383-388