

PROTOCOLLO DI RICERCA:

Efficacia della mild hyperbaric oxygen therapy su bambini affetti da autismo

Ossigeno terapia iperbarica (mHBOT) ed Autismo

Premessa

L'autismo è un disordine del neuro-sviluppo che colpisce circa 1 individuo su 150 negli Stati Uniti.[1] Inoltre, tre studi epidemiologici di assoluta attendibilità, mostrano come i casi di autismo sono aumentati negli ultimi anni [6-8].

L'autismo è caratterizzato da difficoltà nell'interazione sociale, nella comunicazione, e si manifesta con comportamenti ristretti e stereotipati [2].

Le conoscenze attuali sulla patofisiologia dell'autismo hanno indotto alcuni ricercatori a ritenere che l'HBOT possa determinare miglioramenti nei soggetti con autismo [10,11,11a]. Molti studi evidenziano che alcuni soggetti con autismo presentano ipoperfusione cerebrale[33-35], neuroinfiammazione [36-38], infiammazione intestinale[39,40].

L'HBOT può migliorare alcuni di questi problemi migliorando l'ipoperfusione cerebrale[17,21,31,41] e facendo diminuire l'infiammazione del sistema nervoso e l'infiammazione intestinale[42-47]. Per tale motivo, dati gli iniziali incoraggianti risultati non pubblicati ottenuti da numerosi medici americani, l'HBOT si sta imponendo in campo internazionale, sotto grande pressione dei genitori e delle associazioni di genitori, come trattamento empirico degli aspetti infiammatori connessi all'autismo anche in presenza ancora di poche evidenze di studi scientifici pubblicati che ne confermino l'efficacia. [10,11,11a] .

Tradizionalmente, l'HBOT prevede la somministrazione di ossigeno ad una concentrazione del 100% e ad una pressione maggiore a 1 atmosfera (ATM) in una camera pressurizzata [12]. Molte prescrizioni di HBOT arrivano a superare anche le 2 ATM. Pressioni maggiori a 2 ATM vengono utilizzate ad esempio in casi di avvelenamento da monossido di carbonio o per migliorare problemi respiratori[12,13].

Alcuni studi hanno dimostrato che l'utilizzo di ossigeno sembra migliorare le funzioni neurologiche. In uno studio in doppio cieco con placebo, la somministrazione di ossigeno a giovani adulti sani, messi a confronto con altri giovani adulti che respiravano solamente aria all'interno di una stanza, ha dimostrato che l'ossigeno migliora le performance cognitive, oltre a migliorare l'attenzione, i tempi di reazione e di risposta [14].

In pazienti più vecchi, l'HBOT a 2,5 ATM e 100% di ossigeno, a differenza del gruppo di controllo ha determinato miglioramenti nelle funzioni cognitive, compresa la memoria[15]. In seguito a questi risultati, alcuni ricercatori hanno provato ad utilizzare l'HBOT per trattare alcuni disordini neurologici quali il danno cerebrale traumatico e cronico [16-22] così come la sindrome alcolica fetale[23] e sono stati registrati miglioramenti in entrambe le tipologie di pazienti.

Inoltre, in uno studio su cavie con danno cerebrale, il trattamento con HBOT a 1,5 ATM e 100% di ossigeno, messo a confronto con l'utilizzo di camera normobarica, ha rilevato miglioramenti sia nell'apprendimento spaziale, sia nella memoria[24].

Altri studi, utilizzando HBOT alla stessa pressione, hanno dimostrato miglioramenti in alcuni pazienti con paralisi cerebrale (CP) [25-28] ed in alcuni casi con risultati davvero sorprendenti[29].

È importante notare che alcuni di questi studi[16,21-24,26] hanno utilizzato bassa pressione iperbarica (1,5 ATM o meno) rispetto alla pressione normalmente utilizzata per la maggior parte delle prescrizioni cliniche[13].

Alla luce di queste prime esperienze cliniche, alcuni medici hanno somministrato bassa pressione iperbarica (da 1,3 a 1,5 ATM) a soggetti autistici, con una concentrazione di ossigeno variabile tra il 21% e il 100% manifestando miglioramenti significativi in entrambi i gruppi nelle scale cliniche

utilizzate [10,11a, 31]. In particolare il recente studio di Rossignol et al. ha evidenziato che il trattamento con HBOT sia a 1,3 ATM al 24% di ossigeno sia a 1,3 ATM e 1,5 ATM e 100% di ossigeno nei bambini affetti da autismo sottoposti a cicli di 40 sedute da 45 minuti l'una, determina significativi miglioramenti sia degli aspetti clinici, sia dei parametri infiammatori [11a].

Heuser et al. hanno trattato un bambino di 4 anni con autismo utilizzando 1,3 ATM e 24% di concentrazione di ossigeno osservando “grossi miglioramenti nel comportamento, nella memoria e nelle funzioni cognitive” dopo solo 10 sedute. Questo bambino ha inoltre ottenuto miglioramenti nella sua condizione di ipoperfusione cerebrale secondo le misurazioni fatte con la SPECT prima e dopo i trattamenti[31]. Un'altra serie di casi ha evidenziato miglioramenti in 6 bambini con autismo utilizzando pressione a 1,3 ATM al 100% di ossigeno.[10].

L'HBOT è di solito definito sicuro per i bambini, anche a 2 ATM per 2 ore al giorno [32] anche se è stata sollevato il dubbio che l'HBOT possa aumentare lo stress ossidativo attraverso la formazione dei ROS o specie reattive dell'ossigeno[48]. Questa valutazione risulta particolarmente importante se si tiene conto del fatto che alcuni soggetti affetti da autismo già presentano un elevato stress ossidativo [49] che include bassi livelli di glutazione nel siero [50,51], diminuzione dell'attività di alcuni enzimi quali la superossido dismutasi (SOD)[52], glutazione perossidasi[52], catalasi[53] e paraoxonasi, un enzima che previene l'ossidazione lipidica e inattiva agenti tossici organofosforici nell'uomo [54].

Alcuni bambini con autismo mostrano un aumento della perossidazione lipidica [53,55,56] che si manifesta con l'aumento del malondialdeide, un indicatore di stress ossidativo e di perossidazione lipidica [57].

In letteratura medica si parla di possibile stress ossidativo in seguito a HBOT, ma sembra essere solo una preoccupazione se si utilizzano pressioni inferiori a 2,0 ATM. [58].

Di fatto, secondo alcuni studi l'utilizzo prolungato e ripetuto dell'HBOT somministrato a meno di 2,0 ATM fa diminuire lo stress ossidativo [59-61] attraverso la diminuzione della perossidazione lipidica [62] e il ribilanciamento dell'attività degli enzimi antiossidanti incluso la SOD[60,63], glutazione perossidasi[64], la catalasi[65], l'enzima paraoxonasi[62,66]. Nello studio di Rossignol et al. già citato in precedenza [11a] in cui sono stati misurati i livelli di Glutazione libero ed il rapporto tra Glutazione ossidato e ridotto nei soggetti con autismo prima e dopo l'HBOT, non è stato riscontrato alcun peggioramento del profilo ossidativo a termine del trattamento.

Recentemente Ghanizadeh ha concluso un interessante review sistematica dei trials randomizzati effettuati per provare l'efficacia di HBOT nei bambini autistici, suggerendo di effettuare studi sham-controllati con una rigorosa metodologia per accertare il possibile beneficio di tale terapia [82].

Scopo dello studio

In base ai primi risultati incoraggianti apparsi recentemente in letteratura il seguente studio si prefigge l'obiettivo di verificare l'efficacia della terapia iperbarica a 1,5 ATM alla concentrazione di ossigeno del 100% nei bambini affetti da Autismo sia sul piano clinico, che su quello neurocognitivo. *Sarà valutata la differenza tra prima e dopo i quaranta trattamenti nei singoli gruppi e se esiste una differenza tra il gruppo “Ossigeno” e quello di controllo.*

Nello specifico lo studio si propone di misurare l'efficacia dell'HBOT nei pazienti autistici valutando le modificazioni sia sul piano clinico comportamentale *come end-point principale (ABC, CGI, CARS)*, sia sul piano clinico-cognitivo *come end-point secondario* attraverso test neurocognitivi (LIPS-R) prima e dopo il trattamento. E' uno studio prospettico double-blind placebo-controlled. In tal senso si assegnerà il paziente al gruppo di trattamento in modo cieco. *La ABC viene somministrata prima di iniziare lo studio (baseline scores) e immediatamente dopo ogni batteria di trattamento. Punteggi più bassi di ABC indicano minor severità di autismo. La CGI dimostrerà tra prima e dopo il trattamento che una buona risposta al trattamento verrà adottata dal medico quando lo score corrisponderà a "very much improved" o "much improved". La scala di CARS fornirà l'indice di gravità della*

manifestazione del sintomo (da assente=1 a grave espressione=4). Le singole scale sono infine sommate per ottenere un punteggio totale. Il punteggio di 30 rappresenta il limite minimo per definire la diagnosi di Autismo.

Materiali e Metodi

Lo studio prevede il reclutamento di 43 soggetti di età compresa tra i 4 e i 12 anni, con fine del reclutamento previsto per il 7 febbraio 2016.

Tutti i partecipanti devono avere diagnosi di autismo ricevuta dal pediatra inviante e confermata da uno stesso neuropsichiatra infantile partecipante allo studio ed in accordo con i criteri diagnostici del DSM IV[2].

I bambini con Disturbo Pervasivo dello Sviluppo o Disturbo Pervasivo dello Sviluppo Non Altrimenti Specificato o Asperger saranno esclusi da questo studio.

Definizioni e Caratteristiche dell'Autismo (dal D.S.M. IV)

La diagnosi di disturbo autistico, secondo i criteri del DSM-IV, viene effettuata sulla base della presenza contemporanea di una serie di sintomi, in diverse aree comportamentali della persona.

E' importante capire che questi criteri si riferiscono a compromissioni nella qualità delle interazioni, e non alla loro assoluta assenza. Per esempio il linguaggio può variare dalla totale mancanza fino al parlare con frasi dettagliate e grammaticalmente corrette, che, malgrado tutto, rimangono ripetitive, concrete e pedanti.

Condizioni o criteri di inclusioni.

Devono essere soddisfatti quattro requisiti:

1) La presenza di almeno 6 condizioni tra quelle elencate di seguito:

A1 Marcata compromissione nell'uso di svariati comportamenti non verbali, come lo sguardo diretto, l'espressione mimica, le posture corporee e i gesti che regolano l'interazione sociale.

A2 Incapacità di sviluppare relazioni con i coetanei adeguate al livello di sviluppo.

A3 Mancanza di ricerca spontanea nella condivisione di gioie, interessi o obiettivi con altre persone

A4 Mancanza di reciprocità sociale ed emotiva.

B1 Ritardo o totale mancanza dello sviluppo del linguaggio parlato (non accompagnato da un tentativo di compenso attraverso modalità alternative di comunicazione come gesti o mimica)

B2 In soggetti con linguaggio adeguato, marcata compromissione della capacità di iniziare o sostenere una conversazione con altri

B3 Uso di linguaggio stereotipato e ripetitivo o linguaggio eccentrico

B4 Mancanza di giochi di simulazione vari e spontanei, o di giochi di imitazione sociale adeguati al livello di sviluppo;

C1 Dedizione assorbente ad uno o più tipi di interessi ristretti e stereotipati anomali o per intensità o per focalizzazione

C2 Sottomissione del tutto rigida ad inutili abitudini o rituali specifici

C3 Manierismi motori stereotipati e ripetitivi (battere o torcere le mani o il capo, o complessi movimenti di tutto il corpo)

C4 Persistente ed eccessivo interesse per parti di oggetti;

2) Le condizioni di cui sopra devono essere presenti almeno due dal gruppo A), e almeno una ciascuna dai gruppi B) e C)

3) Ritardi o funzionamento anomalo in almeno una delle seguenti aree, con esordio prima dei 3 anni di età:

- interazione sociale,
- linguaggio usato nella comunicazione sociale,
- gioco simbolico o di immaginazione.

4) L'anomalia non è meglio attribuibile al Disturbo di Rett o al Disturbo Disintegrativo della fanciullezza.

Criteri generici di esclusione dal trattamento di HBOT saranno la presenza di:

- Pregressi episodi di pneumotorace spontaneo e pneumotorace in atto non drenato,
- Enfisema bolloso,
- Stato di male epilettico,
- Claustrofobia,
- Patologie polmonari quali: Ascenso polmonare, cisti idatidea, tubercolosi cavitaria, BPCO medio-grave.
- Patologie cardiovascolari di grado medio-grave:

DIFETTO DEL SETTO INTERVENTRICOLARE

DIFETTI VALVOLARI

STENOSI AORTICA CONGENITA E VALVOLA AORTICA BICUSPIDE

STENOSI DELLA VALVOLA POLMONARE

ALTRI DIFETTI VALVOLARI

COARTAZIONE AORTICA

CARDIOPATIE CIANOGENE E ALTRE CARDIOPATIE COMPLESSE

TETRALOGIA DI FALLOT

TRASPOSIZIONE CORRETTA DELLE GRANDI ARTERIE

CUORE UNIVENTRICOLARE

I genitori dovranno sottoscrivere un consenso informato sia per sottoporre i propri figli a trattamento sperimentale con HBOT sia per accompagnarli ed assisterli nella camera iperbarica per tutto il tempo del trattamento. Inoltre sarà richiesta una relazione al pediatra di riferimento per ciascun paziente riguardante la storia clinica e lo stato di salute del singolo paziente.

Durante il periodo dello studio non sarà consentito iniziare nuove terapie, né di interrompere i trattamenti in corso, compresi supplementazioni con integratori dietetici, vitaminici e/o farmaci.

L'idoneità a sottoporsi a trattamento HBOT sarà valutata sia per i soggetti con autismo *sia per i genitori* o accompagnatori con ECG con visita cardiologica, Rx Torace, visita otorinolaringoiatrica per accertare l'integrità dei seni e delle membrane timpaniche nonché escludere infezioni in atto o escludere interventi chirurgici pregressi. Il tutto viene concluso con valutazione finale di idoneità da parte un medico di Terapia Iperbarica.

Lo studio sarà effettuato utilizzando la Camera Iperbarica della DOMUS MEDICA di RSM. La camera iperbarica composta da 8 posti consentirà il trattamento contemporaneo di 3 pazienti accompagnati da un genitore e da un assistente sanitario che attuerà un monitoraggio continuo del trattamento dall'interno della stessa. *Le valutazioni finali verranno analizzate presso il Tampa General Hospital, Centro di studio per l'Austismo e disordini correlati, con la supervisione del prof Enrico Camporesi, University of South Florida, Tampa USA.*

Diagnosi di ingresso.

Tutti i bambini devono soddisfare i criteri DSM-IV criteria for Autistic Disorder e la diagnosi viene rafforzata da psicologa e neuropsichiatra infantile usando la Autism Diagnostic Interview–Revised

(ADI-R) e la Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), tenendo in dovuta considerazione la relazione del pediatra inviante.

Protocollo di trattamento iperbarico a 1,5 ATA e 100% di concentrazione di ossigeno.

I partecipanti del gruppo di trattamento saranno sottoposti a terapia iperbarica a 1,5 ATA e 100% di concentrazione di ossigeno in camera iperbarica multiposto. Ogni soggetto entrerà in camera iperbarica con un genitore e un accompagnatore sanitario. Il tempo di compressione per raggiungere 1,5 ATA sarà di circa 10 minuti. Durante la terapia i bambini saranno aiutati a compensare la pressione nell'orecchio medio ingerendo liquidi, mangiando o sbadigliando. Ogni paziente indosserà durante il trattamento una maschera nel quale verrà erogato ossigeno o aria.

Il bambino sarà monitorato per tutto il tempo della seduta e per tutta la durata del trattamento sia dai sanitari all'esterno sia da un assistente sanitario presente all'interno della camera, *così come i rispettivi genitori*. Dopo 60 minuti di erogazione di ossigeno al 100%, l'erogazione di ossigeno verrà interrotta, e iniziata la decompressione che durerà circa 10 minuti. Questo trattamento sarà somministrato per 1 volta al giorno per 5 giorni a settimana per una durata di 60 minuti a seduta e per un totale di 40 sedute da concludersi in 8 settimane.

Protocollo di controllo di trattamento a 1,3 ATA e 21% di concentrazione di ossigeno

Si seguirà lo stesso schema temporale e qualitativo di trattamento.

Valutazione clinico-comportamentale

Baseline precedente alla prima seduta di camera iperbarica, quindi una volta finite le 40 sedute di trattamento, ed in seguito ad un mese dalla fine del trattamento i soggetti saranno sottoposti a test neuropsicologici e clinico diagnostici.

I punteggi pre-trattamento e post-trattamento saranno calcolati per ogni soggetto utilizzando le seguenti scale di valutazione clinica:

- ABC (Aberrant Behavior Checklist–Community) basata su una valutazione dei genitori;
- CGI (Clinical Global Impression–Improvement) basata su tutore e medico;
- CARS (Baseline Childhood Autism Rating Scale) basata su medico neuropsichiatra.

La ABC è un questionario con 58-item che misura comunicazione, interazione reciproca sociale, gioco e comportamenti stereotipati. E' usato per valutare l'efficacia di interventi terapeutici e la sua valutazione va da uno score di 0 ("not at all a problem") a 3 ("problem is severe in degree"). Per questo studio lo score totale viene calcolato in 5 subscales: irritabilità, letargia, stereotipia, iperattività e linguaggio inappropriato. La ABC viene somministrata prima di iniziare lo studio (baseline scores) e immediatamente dopo ogni batteria di trattamento. Punteggi più bassi di ABC indicano minor severità di autismo.

La CGI viene effettuata da un tutore e dal medico valutatore, seguendo i criteri: 1 ("very much improved"), 2 ("much improved"), 3 ("minimally improved"), 4 ("no change"), 5 ("minimally worse"), 6 ("much worse"), and 7 ("very much worse"). Buona risposta al trattamento verrà adottata dal medico quando lo score corrisponderà a "very much improved" o "much improved".

I parametri valutati: receptive language, expressive language, sleep pattern, attention span, activity level, bowel movement pattern, self-stimulatory behavior, social awareness/alertness, social interaction, play skills, self-injurious behavior, eye contact, mood, anxiety level, aggression, general health, gross motor skills, e fine motor skills.

La **CARS** è uno dei test più ampiamente standardizzato ed utilizzato per individuare sia la diagnosi di Autismo sia la gravità del disturbo [81]. E' somministrabile ai bambini a partire dai due anni di età. È costituito da 15 differenti item che descrivono dettagliatamente caratteristiche cruciali per la diagnosi. A ciascuna delle 15 scale viene assegnato un punteggio a 4 punti da 1 a 4 in base alla gravità della manifestazione del sintomo (da assente=1 a grave espressione=4). Le singole scale sono infine sommate per ottenere un punteggio totale. Il punteggio di 30 rappresenta il limite minimo per definire la diagnosi di Autismo.

Il risultato iniziale dell'ABC, del CGI e del CARS verrà confrontato col risultato alla fine delle quaranta sessioni di trattamento.

Valutazione Neuropsicologica

Per valutare le modificazioni delle funzioni cognitive in base al trattamento saranno utilizzate le seguenti scale somministrate prima e dopo il trattamento:

- Leiter International Performance Scale – Revised (LIPS-R)

La **LIPS-R** o Leiter-R è una scala completamente non verbale, che non richiede comunicazione verbale fra esaminatore e soggetto, né che quest'ultimo legga o scriva qualcosa. È quindi particolarmente adatta per bambini ed adolescenti con ritardo cognitivo e con disturbi verbali. Si somministra come un gioco, cosa che la rende divertente per i bambini, e lo scoring è effettuato in modo semplice e veloce. A differenza dei tradizionali test del QI, la Leiter-R pone l'accento sull'intelligenza fluida, che è la misura più vera dell'intelligenza innata di un individuo; essa è quindi meno soggetta ad influenze culturali, sociali od educative. La Leiter-R consiste in due batterie standardizzate: Visualizzazione e Ragionamento (VR), costituita da 10 subtest per la misura di capacità cognitive non verbali legate alla visualizzazione, alle abilità spaziali e al ragionamento; Attenzione e Memoria (AM), costituita anch'essa da 10 subtest. Sono incluse inoltre quattro scale di livello (per l'esaminatore, per il genitore, di autovalutazione e per l'insegnante), che permettono un'osservazione multidimensionale del comportamento del soggetto. Le due batterie possono essere somministrate assieme (per un totale di circa 90') o separatamente. Ambedue permettono di ottenere punteggi "di crescita", non standardizzati con l'età, che misurano piccoli, ma importanti miglioramenti in soggetti con gravi deficit cognitivi, in modo che sia possibile monitorarne nel tempo i progressi.

Randomizzazione

Di 43 bambini da arruolare nello studio, 22 sono disposti random nel gruppo di trattamento e 21 randomizzati nel gruppo di controllo. Si userà una randomizzazione a blocchi per età e genere [82] generata da un apposito software (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA). La distribuzione dei soggetti nei due diversi gruppi di trattamento rimarrà ignota a tutti: investigatori, partecipanti, genitori, assistenti e medici. Solo il tecnico iperbarico, che cambierà per ogni trattamento, conoscerà la sistemazione di quella singola seduta di trattamento. Il suddetto tecnico sarà opportunamente erudito sul non far menzione con nessuno dei dati che osserverà durante il trattamento. Dopo la conclusione della randomizzazione, i genitori dei due gruppi saranno sorvegliati e controllati per verificare la loro capacità nel riconoscere in che gruppo è stato assegnato il proprio bambino.

Analisi statistica

La valutazione di omogeneità tra il gruppo di trattamento ed il gruppo controllo sarà effettuata con il test χ^2 e t-student. Per il calcolo della numerosità abbiamo utilizzato i dati presenti in letteratura (84).

Per raggiungere un potenza dell'80% è stato calcolato (tramite G*Power 3), usando il dato più conservativo del Cohen's d tra 0.44 e 0.77, una numerosità minima di 43 bambini. Si userà un test two way ANOVA per misure ripetute (time x treatment) con un alfa a 0,05.

Valutazione della sicurezza del trattamento

In ordine decrescente, gli effetti collaterali più comunemente riscontrati durante la somministrazione di HBOT sono stati: barotrauma (2%), schiacciamento dei seni nasali, otite sierosa, claustrofobia, miopia reversibile e insorgenza di crisi epilettiche (1-3 su 10.000) [12].

Prima di iniziare lo studio, ogni bambino sarà sottoposto a visita da parte di un medico di Terapia Iperbarica per valutarne l'idoneità, da un neuropsichiatra infantile, da una psicologa. Durante il trattamento, un genitore e un assistente sanitario entreranno nella camera iperbarica insieme ad ognuno dei bambini. Durante il trattamento, i bambini saranno monitorati dall'esterno accuratamente dall'operatore di camera iperbarica e dal medico anestesista e/o iperbarico tenendo conto di qualsiasi segno di dolore all'orecchio, ed anche i genitori saranno istruiti su come riconoscere il dolore all'orecchio proprio e del loro bambino. Le norme di sicurezza per le operazioni della camera iperbarica rispondono ai requisiti imposti dalla legislazione vigente.

Team sperimentatori:

Bosco Gerardo MD PhD, medico iperbarico e ricercatore, principal investigator

Giuliano Vezzani MD, anestesista e medico iperbarico, co-investigatore

Enrico Camporesi MD, professor emeritus Anesthesia and Surgery USF Tampa, co-investigatore

Alberto Fiorito MD, medico iperbarico e nutrizionista, co-investigatore

Natalie D'Alessandro, psicologa

Patrizia Oronzo MD, medico iperbarico

Elisabetta Berenci MD, Neuropsichiatra infantile

Bibliografia.

1. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders--autism and developmental disabilities monitoring network, six cities, United States. 2000. MMWR 2007, 56:1-40.
2. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders., 4th edn. Washington, DC: American Psychiatric Press; 1994.
3. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I: The genetics of autism. Pediatrics 2004, 113(5):e472-486.
4. Charman T, Taylor E, Drew A, Cockerill H, Brown JA, Baird G: Outcome at 7 years of children diagnosed with autism at age 2: predictive validity of assessments conducted at 2 and 3 years of age and pattern of symptom change over time. J Child Psychol Psychiatry 2005, 46(5):500-513.
5. Lord C, Risi S, DiLavore PS, Shulman C, Thurm A, Pickles A: Autism from 2 to 9 years of age. Arch Gen Psychiatry 2006, 63(6):694-701.
6. Baird G, Charman T, Baron-Cohen S, Cox A, Swettenham J, Wheelwright S, Drew A: A screening instrument for autism at 18 months of age: a 6-year follow-up study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2000, 39(6):694-702.
7. Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P: Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. Pediatrics 2001, 108(5):1155-1161.
8. Chakrabarti S, Fombonne E: Pervasive developmental disorders in preschool children. JAMA 2001, 285(24):3093-3099.
9. Wong HH, Smith RG: Patterns of complementary and alternative medical therapy use in children diagnosed with autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord 2006, 36(7):901-909.
10. Rossignol DA, Rossignol LW: Hyperbaric oxygen therapy may improve symptoms in autistic children. Med Hypotheses 2006, 67(2):216-228.
11. Rossignol DA: Hyperbaric oxygen therapy might improve certain pathophysiological findings in autism. Med Hypotheses 2007, 68(6):1208-1227.
- 11a. Rossignol DA, Rossignol LW, James SJ, Melnyk S, Mumper E.: "The effects of hyperbaric oxygen therapy on oxidative stress, inflammation, and symptoms in children with autism: an open-label pilot study". BMC Pediatr. 2007 Nov 16;7:36.

12. Feldmeier JJ, Chairman and Editor: Hyperbaric oxygen 2003: indications and results: the hyperbaric oxygen therapy committee report. Kensington, MD: Undersea and Hyperbaric Medicine Society; 2003.
13. Leach RM, Rees PJ, Wilmschurst P: Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ* 1998, 317(7166):1140-1143.
14. Moss MC, Scholey AB, Wesnes K: Oxygen administration selectively enhances cognitive performance in healthy young adults: a placebo-controlled double-blind crossover study. *Psychopharmacology (Berl)* 1998, 138(1):27-33.
15. Jacobs EA, Winter PM, Alvis HJ, Small SM: Hyperoxygenation effect on cognitive functioning in the aged. *N Engl J Med* 1969, 281(14):753-757.
16. Rockswold GL, Ford SE, Anderson DC, Bergman TA, Sherman RE: Results of a prospective randomized trial for treatment of severely brain-injured patients with hyperbaric oxygen. *J Neurosurg* 1992, 76(6):929-934.
17. Golden ZL, Neubauer R, Golden CJ, Greene L, Marsh J, Mleko A: Improvement in cerebral metabolism in chronic brain injury after hyperbaric oxygen therapy. *Int J Neurosci* 2002, 112(2):119-131.
18. Shi XY, Tang ZQ, Sun D, He XJ: Evaluation of hyperbaric oxygen treatment of neuropsychiatric disorders following traumatic brain injury. *Chin Med J (Engl)* 2006, 119(23):1978-1982.
19. Golden Z, Golden CJ, Neubauer RA: Improving neuropsychological function after chronic brain injury with hyperbaric oxygen. *Disabil Rehabil* 2006, 28(22):1379-1386.
20. Hardy P, Johnston KM, De Beaumont L, Montgomery DL, Lecomte JM, Soucy JP, Bourbonnais D, Lassonde M: Pilot case study of the therapeutic potential of hyperbaric oxygen therapy on chronic brain injury. *J Neurol Sci* 2007, 253(1-2):94-105.
21. Neubauer RA, James P: Cerebral oxygenation and the recoverable brain. *Neurol Res* 1998, 20 Suppl 1:S33-36.
22. Neubauer RA, Gottlieb SF, Miale A, Jr.: Identification of hypometabolic areas in the brain using brain imaging and hyperbaric oxygen. *Clin Nucl Med* 1992, 17(6):477-481.
23. Stoller KP: Quantification of neurocognitive changes before, during, and after hyperbaric oxygen therapy in a case of fetal alcohol syndrome. *Pediatrics* 2005, 116(4):e586-591.
24. Harch PG, Kriedt C, Van Meter KW, Sutherland RJ: Hyperbaric oxygen therapy improves spatial learning and memory in a rat model of chronic traumatic brain injury. *Brain Res* 2007, 1174:120-129.
25. Montgomery D, Goldberg J, Amar M, Lacroix V, Lecomte J, Lambert J, Vanasse M, Marois P: Effects of hyperbaric oxygen therapy on children with spastic diplegic cerebral palsy: a pilot project. *Undersea Hyperb Med* 1999, 26(4):235-242.
26. Collet JP, Vanasse M, Marois P, Amar M, Goldberg J, Lambert J, Lassonde M, Hardy P, Fortin J, Tremblay SD, Montgomery D, Lacroix J, Robinson A, Majnemer A: Hyperbaric oxygen for children with cerebral palsy: a randomised multicentre trial. *HBO-CP Research Group. Lancet* 2001, 357(9256):582-586.
27. Sethi A, Mukherjee A: To see the efficacy of hyperbaric oxygen therapy in gross motor abilities of cerebral palsy children of 2-5 years, given initially as an adjunct to occupational therapy. *The Indian Journal of Occupational Therapy* 2003, 25(1):7-11.
28. Waalkes P, Fitzpatrick DT, Stankus S, Topolski R: Adjunctive HBO treatment of children with cerebral anoxic injury. *Army Medical Department Journal* 2002, April-June(13-21).
29. Marois P, Vanasse M: Hyperbaric oxygen therapy and cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2003, 45(9):646-647.
30. Bennett M, Newton H: Hyperbaric oxygen therapy and cerebral palsy--where to now? *Undersea Hyperb Med* 2007, 34(2):69-74.
31. Heuser G, Heuser SA, Rodeland D, Aguilera O, Uszler M: Treatment of neurologically impaired adults and children with "mild" hyperbaric oxygenation (1.3 ATM and 24% oxygen). In *Hyperbaric oxygenation for cerebral palsy and the brain-injured child*. Edited by Joiner JT. Flagstaff, Arizona: Best Publications, 2002.
32. Ashamalla HL, Thom SR, Goldwein JW: Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of radiation-induced sequelae in children. The University of Pennsylvania experience. *Cancer* 1996, 77(11):2407-2412.
33. Zilbovicius M, Boddaert N, Belin P, Poline JB, Remy P, Mangin JF, Thivard L, Barthelemy C, Samson Y: Temporal lobe dysfunction in childhood autism: a PET study. *Positron emission tomography. Am J Psychiatry* 2000, 157(12):1988-1993.
34. Ohnishi T, Matsuda H, Hashimoto T, Kunihiro T, Nishikawa M, Uema T, Sasaki M: Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain* 2000, 123 (Pt 9):1838-1844.
35. Boddaert N, Zilbovicius M: Functional neuroimaging and childhood autism. *Pediatr Radiol* 2002, 32(1):1-7.
36. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA: Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005, 57(1):67-81.
37. Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW: Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry* 2005, 17(6):485-495.
38. Laurence JA, Fatemi SH: Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum* 2005, 4(3):206-210.

39. Uhlmann V, Martin CM, Sheils O, Pilkington L, Silva I, Killalea A, Murch SB, Walker-Smith J, Thomson M, Wakefield AJ, O'Leary JJ: Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. *Mol Pathol* 2002, 55(2):84-90.
40. Furlano RI, Anthony A, Day R, Brown A, McGarvey L, Thomson MA, Davies SE, Berelowitz M, Forbes A, Wakefield AJ, Walker-Smith JA, Murch SH: Colonic CD8 and gamma delta T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr* 2001, 138(3):366-372.
41. Sheffield PJ, Davis JC: Application of hyperbaric oxygen therapy in a case of prolonged cerebral hypoxia following rapid decompression. *Aviat Space Environ Med* 1976, 47(7):759-762.
42. Vlodavsky E, Palzur E, Soustiel JF: Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006, 32(1):40-50.
43. Sumen G, Cimsit M, Eroglu L: Hyperbaric oxygen treatment reduces carrageenan induced acute inflammation in rats. *Eur J Pharmacol* 2001, 431(2):265-268.
44. Granowitz EV, Skulsky EJ, Benson RM, Wright J, Garb JL, Cohen ER, Smithline EC, Brown RB: Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon-gamma secretion in whole blood cultures of healthy humans. *Undersea Hyperb Med* 2002, 29(3):216-225.
45. Wilson HD, Wilson JR, Fuchs PN: Hyperbaric oxygen treatment decreases inflammation and mechanical hypersensitivity in an animal model of inflammatory pain. *Brain Res* 2006, 1098(1):126-128.
46. Takeshima F, Makiyama K, Doi T: Hyperbaric oxygen as adjunct therapy for Crohn's intractable enteric ulcer. *Am J Gastroenterol* 1999, 94(11):3374-3375.
47. Buchman AL, Fife C, Torres C, Smith L, Aristizabal J: Hyperbaric oxygen therapy for severe ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2001, 33(4):337-339.
48. Alleva R, Nasole E, Di Donato F, Borghi B, Neuzil J, Tomasetti M: alpha-Lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 333(2):404-410.
49. Chauhan A, Chauhan V: Oxidative stress in autism. *Pathophysiology* 2006, 13(3):171-181.
50. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA: etabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 2004, 80(6):1611-1617.
51. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, Cutler P, Bock K, Boris M, Bradstreet JJ, Baker SM, Gaylor DW: Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, 141(8):947-956.
52. Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik DI, Sohmen T: Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002, 67(5):341-343.
53. Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O, Meram I: Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004, 254(3):143-147.
54. D'Amelio M, Ricci I, Sacco R, Liu X, D'Agruma L, Muscarella LA, Guarnieri V, Militeri R, Bravaccio C, Elia M, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Macciardi F, Holden JJ, Persico AM: Paraoxonase gene variants are associated with autism in North America, but not in Italy: possible regional specificity in gene-environment interactions. *Mol Psychiatry* 2005, 10(11):1006-1016.
55. Ming X, Stein TP, Brimacombe M, Johnson WG, Lambert GH, Wagner GC: Increased excretion of a lipid peroxidation biomarker in autism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005, 73(5):379-384.
56. Yao Y, Walsh WJ, McGinnis WR, Pratico D: Altered vascular phenotype in autism: correlation with oxidative stress. *Arch Neurol* 2006, 63(8):1161-1164.
57. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I: Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin—the antioxidant proteins. *Life Sci* 2004, 75(21):2539-2549.
58. Wada K, Miyazawa T, Nomura N, Tsuzuki N, Nawashiro H, Shima K: Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus. *Neurosurgery* 2001, 49(1):160-166; discussion 166-167.
59. Yatsuzuka H: [Effects of hyperbaric oxygen therapy on ischemic brain injury in dogs]. *Masui* 1991, 40(2):208-223.
60. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, Durak H, Issever H, Ipek T: The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med* 2004, 203(4):253-265.
61. Yasar M, Yildiz S, Mas R, Dundar K, Yildirim A, Korkmaz A, Akay C, Kaymakcioglu N, Ozisik T, Sen D: The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003, 52(1):111-116.
62. Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L: Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20(6):1637-1643.

63. Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA: Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* 2001, 86(1):24-27.
64. Gulec B, Yasar M, Yildiz S, Oter S, Akay C, Deveci S, Sen D: Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res* 2004, 53(5):493-499.
65. Nie H, Xiong L, Lao N, Chen S, Xu N, Zhu Z: Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006, 26(5):666-674.
66. Sharifi M, Fares W, Abdel-Karim I, Koch JM, Sopko J, Adler D: Usefulness of hyperbaric oxygen therapy to inhibit restenosis after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2004, 93(12):1533-1535.
67. Magalhaes J, Ascensao A, Viscor G, Soares J, Oliveira J, Marques F, Duarte J: Oxidative stress in humans during and after 4 hours of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m. *Aviat Space Environ Med* 2004, 75(1):16-22.
68. Fatemi SH, Halt AR, Stary JM, Realmuto GM, Jalali-Mousavi M: Reduction in antiapoptotic protein Bcl-2 in autistic cerebellum. *Neuroreport* 2001, 12(5):929-933.
69. Fatemi SH, Halt AR: Altered levels of Bcl2 and p53 proteins in parietal cortex reflect deranged apoptotic regulation in autism. *Synapse* 2001, 42(4):281-284.
70. Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto GR: Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord* 2001, 31(6):529-535.
71. Araghi-Niknam M, Fatemi SH: Levels of Bcl-2 and P53 are altered in superior frontal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cell Mol Neurobiol* 2003, 23(6):945-952.
72. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ: Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994, 14(9):6264-6277.
73. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y: Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996, 56(9):2161-2166.
74. Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ: The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am J Ment Defic* 1985, 89(5):485-491.
75. Owley T, Walton L, Salt J, Guter SJ, Jr., Winnega M, Leventhal BL, Cook EH, Jr.: An open-label trial of escitalopram in pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2005, 44(4):343-348.
76. McCracken JT, McGough J, Shah B, Cronin P, Hong D, Aman MG, Arnold LE, Lindsay R, Nash P, Hollway J, McDougall CJ, Posey D, Swiezy N, Kohn A, Scahill L, Martin A, Koenig K, Volkmar F, Carroll D, Lancor A, Tierney E, Ghuman J, Gonzalez NM, Grados M, Vitiello B, Ritz L, Davies M, Robinson J, McMahon D; Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network: Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N Engl J Med* 2002, 347(5):314-321.
77. Constantino JN, Davis SA, Todd RD, Schindler MK, Gross MM, Brophy SL, Metzger LM, Shoushtari CS, Splinter R, Reich W: Validation of a brief quantitative measure of autistic traits: comparison of the social responsiveness scale with the autism diagnostic interview-revised. *J Autism Dev Disord* 2003, 33(4):427-433.
78. Edelson SM, Rimland B: Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC): Reliabilities and Score Distributions, 2000 [http://www.autism.com/ari/atec/atec_report.htm].
79. Lonsdale D, Shamberger RJ, Audhya T: Treatment of autism spectrum children with thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a pilot study. *Neuro Endocrinol Lett* 2002, 23(4):303-308.
80. Jarusiewicz B: Efficacy of neurofeedback for children in the autism spectrum: a pilot study. *J Neurotherapy* 2002, 6(4):39-49.
81. Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., & Daly, K. (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 10, 91-103
82. Suresh K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *J Hum Reprod Sci.* 2011 Jan;4(1):8-11.
83. Ghanizadeh, A. (2012). Hyperbaric oxygen therapy for treatment of children with autism: a systematic review of randomized trials. *Medical Gas research*, 2:13.
84. Rossignol DA, Rossignol LW, Smith S, Schneider C, Logerquist S, Usman A, Neubrander J, Madren EM, Hintz G, Grushkin B, Mumper EA (2009). Hyperbaric treatment for children with autism: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *BMC Pediatr.* 2009 Mar 13;9:21