

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Viktor Kuchtiak

Neurobiologie hypoxicko-ischemického poškození mozku v raném postnatálním období

Neurobiology of hypoxic-ischemic insult in immature brain

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a uvedl veškeré použité informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Viktor Kuchtiak

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D za vstřícnost, rady a pomoc, kterou mi během psaní této práce poskytl. Dále Mgr. Lence Kletečkové, bez jejíž rad bych tuto práci nenapsal a nakonec Všem, kdo mě při psaní podporovali.

Abstrakt

Patologie hypoxicko-ischemického poškození mozku je velmi dobře popsána u dospělých jedinců, zatímco v perinatálním období není zdaleka vše zcela známo. Tento závažný inzult v raném postnatálním období vede často k trvalým neurologickým následkům či smrti. Ischemický inzult způsobuje v mozkové tkáni nadměrné uvolňování glutamátu, které je následováno excitotoxicitickým poškozením tkáně. Zásadní úlohu v excitotoxicitě mají glutamátové NMDA receptory. Aktivované NMDA receptory způsobují vtok vápníku do buňky, což vyúsťuje v aktivaci velkého množství signálních drah spojených s buněčnou smrtí. Aktivované NMDA receptory jsou tak jedním z možných cílů budoucích terapeutických přístupů proti ischemickému poškození mozku. V současných projektech, které se zaměřují na perinatální ischemická poškození, je nezbytné zohlednit vývojové rozdíly v mozkové tkáni a požadavky na minimální toxicitu případných léčiv. Farmakoterapie pro hypoxicko-ischemická poškození zavedené v současné perinatologii, jsou nedostatečné.

Klíčová slova: glutamát, NMDA receptory, excitotoxicita, hypoxicko-ischemické poškození, perinatální období

Abstract

Pathology of the hypoxic-ischemic insult is very well described in the adult age, whereas the state of knowledge is largely neglected during the perinatal age. Serious insult in the early postnatal age leads often to the permanent neurological consequences or death. Ischemic insult causes over release of the glutamate in a brain tissue. This process is followed by excitotoxic damage of the tissue. Glutamatergic NMDA receptors play a key role in the excitotoxicity. Over-activated NMDA receptors are one of the possible therapeutic approaches against ischemic damage of the brain. Speaking of contemporary projects focusing on perinatal stroke, it is necessary to take into account developmental differences in the brain tissue and the requirements to minimal toxicity of possible drugs. Pharmacotherapies for hypoxic-ischemic damage implemented in the current perinatology are insufficient.

Key words: glutamate, NMDA receptors, excitotoxicity, hypoxic-ischemic insult, perinatal age

Seznam použitých zkratek

Akt	protein kináza B
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-soxazolpropionát
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CNS	centrální nervový systém
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPK1	death-associated protein kinase 1
EEG	elektroencefalogram
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GABA	γ -amino máselná kyselina
HI	hypoxicko-ischemické
INPP4A	inositol polyphosphate phosphatase 4A
KA	kainátová kyselina
KCC2	potassium-chloride transporter
MCA	střední mozková tepna
MAP	mitogen-activated protein
MK-801	dizocilpin
NKCC1	Na-K-Cl cotransporter
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NOS	syntáza oxidu dusnatého
P3 β 5 α	3 β 5 α pregnanolon (isopregnanolon)
P3 α 5 α	3 α 5 α pregnanolon (allopregnanolon)
P3 α 5 β	3 α 5 β pregnanolon (pregnanolon)
PCP	fencyklidin
PG	3 β -pregnanolon glutamát

PIKE-L	long form of phosphoinositide 3 kinase enhancer
PIP2	fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfát / fosfatidylinositol(3,4)-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát
PND	postnatální den
PNS	periferní nervový systém
PSD95	postsynaptic density protein 95
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
STEP	striatal-enriched protein tyrosine phosphatase

Obsah

1. Úvod	1
2. Biologické charakterizace nervové tkáně v raných vývojových fázích	2
2.1. Neurogeneze, gliogeneze, synaptogeneze, myelinogeneze a tvorba hematoencefalické bariéry	2
2.2. Neurotransmitterové receptory během vývoje.....	5
2.3. Neurosteroidy.....	6
3. Hypoxicko-ischemické experimentální modely.....	7
3.1. Modely fokální mozkové ischemie	7
3.2. Modely globální mozkové ischemie	8
3.3. Hypoxicko-ischemické modely raných vývojových stádií.....	8
4. Hypoxicko-ischemická poškození u raných vývojových stádií.....	8
4.1. Neuropatologie hypoxicko-ischemického poškození	9
4.1.1. Excitotoxicita	11
4.1.2. Oxidační stres	12
4.1.3. Laktátová acidóza	13
4.1.4. Protizánětlivé reakce spojené s hypoxicko-ischemickým poškozením	13
4.1.5. Dysfunkce hematoencefalické bariéry	14
4.1.6. Infiltrace leukocytů.....	14
5. NMDA receptory.....	14
5.1. Aktivace NMDA receptoru.....	14
5.2. Struktura NMDA receptoru	15
5.3. NMDA receptory během vývoje	15
5.4. Klíčová úloha NMDA receptoru v excitotoxicitě.....	15
5.5. Duální role NMDA receptoru.....	16
5.6. NMDA antagonismus.....	17
5.6.1. Kompetitivní antagonisté	18
5.6.2. Nekompetitivní antagonisté.....	19
5.6.3. Unkompetitivní antagonisté.....	20
5.6.4. Antagonisté glycinového vazebného místa.....	22
5.6.5. Modulátory polyaminového vazebného místa	22
6. Následné signální dráhy spojené s hypoxicko-ischemickým inzultem	23
6.1. Akt a PTEN	24
6.2. CREB a BDNF.....	25
6.3. DAPK1	25

6.4.	PSD95 a nNOS.....	25
6.5.	Calpain.....	26
7.	Způsoby neuroprotektce v perinatologii	26
7.1.	Strategie pro snížení dlouhodobého dopadu perinatálního poranění mozku	27
7.1.1.	Síran hořečnatý.....	27
7.1.2.	Terapeutická hypotermie	27
7.2.	Strategie k zabránění perinatálního poranění mozku	27
7.3.	Nové strategie	28
7.3.1.	Nspotřebovaná pupečnicková krev.....	28
7.3.2.	Využití erythropoetinu.....	29
7.3.3.	Experimentální farmaka	29
8.	Závěr	30
9.	Seznam literatury	32

1. Úvod

Mozek je ve srovnání s jinými tkáněmi a orgány zvláště náchylný k hypoxicko-ischemickému poškození. Na rozdíl od bezprostředního ischemického poškození, které je pozorováno v jiných tkáních, přechodná doba mozkové ischemie (přibližně 10 minut) může způsobit rozsáhlé poškození neuronů, které se projeví nejen krátce po iktu, ale pokračuje postupně po celé měsíce. Jedno z vysvětlení pro zvláštní citlivost mozku na ischemické poškození je vysoká koncentrace neurotransmiteru glutamátu v mozkové tkáni. Tento důležitý neuropřenašeč je za fyziologického stavu esenciální pro život. Nicméně při hypoxicko-ischemickém infarktu díky jeho excitotoxickému potenciálu způsobuje patologické změny v ischemií zasažené oblasti nervové tkáně [1]. Samozřejmě nelze opomenout ani vysoké energetické potřeby, jež tato tkáň potřebuje.

Hypoxicko-ischemické poškození mozku je také častý následek těžkých porodů a patří mezi nejkritičtější možné události v raném postnatálním období. Toto poškození může vyvolávat dlouhodobé neurologické komplikace od mírných behaviorálních deficitů k těžkým epileptickým záchvatům, mentálním retardacím či mozkové obrně [2]. V perinatologii je navíc situace značně komplikovaná. Perinatologové mají omezené možnosti farmakoterapie a ve většině případech mohou pouze doufat, že se novorozenec uzdraví bez větších následků sám. Tento rozdíl oproti možnostem léčby dospělých pacientů je způsoben především etickými problémy. Mozková tkáň novorozence je v mnoha ohledech rozdílná než tkáň v plně vyvinutém mozku, a tak vzniká nutnost klinických testů, které jsou nepřípustné.

Cílem této práce bylo vytvořit rešerši o mechanismech hypoxicko—ischemického poškození v raném postnatálním období, přičemž důraz je kladen na glutamátergní transmissi, receptory NMDA a na signální dráhy, které s těmito receptory souvisí. Cílem bylo také popsat některé potenciální možnosti léčby ve stádiu aplikovaného výzkumu, které by mohly vést k inhibici tohoto poškození.

2. Biologické charakterizace nervové tkáně v raných vývojových fázích

Během ontogeneze probíhají důležité vývojové změny ve všech částech těla. Výjimkou není ani nervová tkáň. Základ nervové tkáně se tvoří během embryogeneze a její vývoj pokračuje postnatálně, a to především během dětství a dospívání. Mezi důležité body ve vývoji nervové tkáně v raných vývojových fázích patří neurogenze, gliogenze, synaptogenze, myelinogenze, tvorba hematoencefalické bariéry, změny na poli neurotransmiterových receptorů či změny v koncentracích neurosteroidů.

2.1. Neurogenze, gliogenze, synaptogenze, myelinogenze a tvorba hematoencefalické bariéry

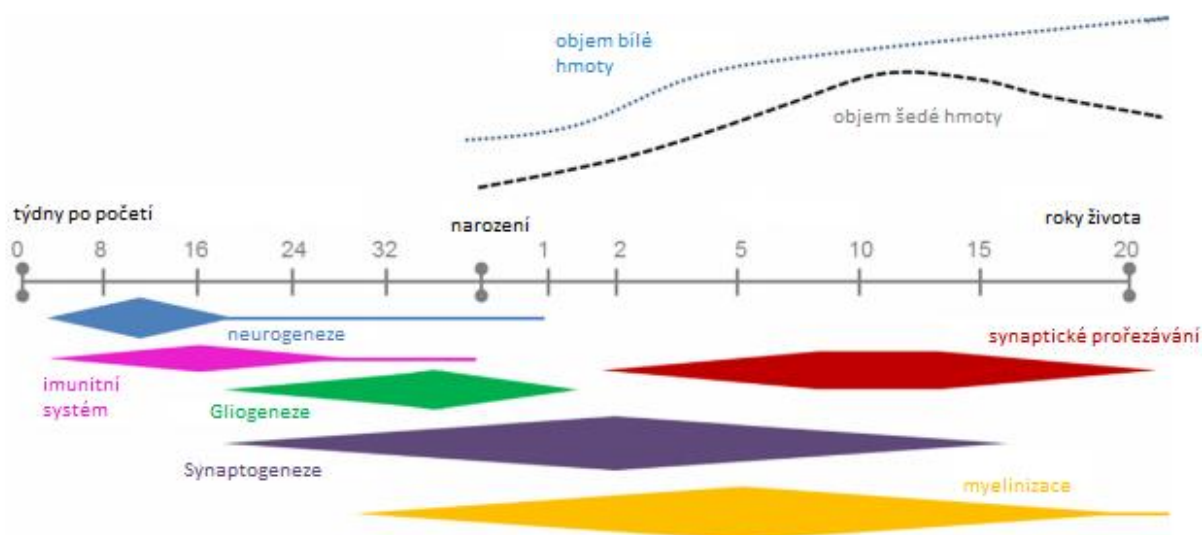
Neurogenze je proces, při kterém se tvoří neurony z neuronálních kmenových buněk a progenitorových buněk. Neurogenze je nejaktivnější při prenatálním vývoji. Kortikální neurogenze pak ale může pokračovat až do 2,5 let [3]. Nicméně neurogenze probíhá také v dospělém mozku, jako například v gyrus dentatus hipokampu, subventrikulární zóně a v nucleus accumbens [4].

Gliogenze je proces, při kterém se tvoří gliové buňky z multipotentních nervových kmenových buněk. Během procesu se vytvoří astrocyty, oligodendrocyty, ependymální buňky, mikroglie, Schwannovy buňky, satelitní buňky a další specializované buňky. Gliové buňky jsou důležité pro správnou funkci CNS a PNS, protože neurony vyživují, myelinizují, nebo je ochraňují [5]. Gliogenze probíhá po celou dobu postnatálního vývoje [6]. Vrchol gliogenze je v době, kdy vrcholí růst cév, růst dendritů a tvorba synapsí. To naznačuje, že mezi gliemi a cévním a synaptickým růstem vzniká spolupráce, která zajišťuje vhodné gliovo-cévní a gliovo-neuronální interakce. [7].

Synaptogenze je tvorba synapsí mezi neurony v nervové soustavě. Tento děj probíhá po celou dobu života, avšak vrchol synaptogenese probíhá v raném vývoji, a to především během takzvané nevázané synaptogenese mezi 3. až 15. měsícem [8]. Důležitá je také redukce synapsí, jež přispívá k plasticitě a umožňuje účinnější zpracování informací. Je to základní vývojová strategie společná pro většinu oblastí CNS savců včetně lidí [9]. Tyto synaptické změny se vyskytují bez jakékoli významné ztráty neuronů, a pravděpodobně odráží zjemnění a zrání nervových obvodů během dětství a časného dospívání [10].

Myelinogeneze, neboli tvorba myelinových pochev, probíhá v celém nervovém systému. Tyto pochvy se tvoří kolem většiny axonů v lidském těle. Tvorba myelinových pochev je nezbytná k rozmnožování a rychlosti nervového přenosu v savčím mozku [11]. Myelin má funkci dielektrického materiálu. Za produkci myelinové pochvy jsou zodpovědné oligodendrocyty a Schwannovy buňky. Oligodendrocyty jsou makroglie, jež se nachází v šedé i bílé hmotě CNS a většinou myelinizují více vláken najednou. Naproti tomu Schwannovy buňky se nacházejí v PNS a myelinizují jen jedno vlákno. Myelinizované axony jsou bílé a tvoří tzv. bílou hmotu. Myelin obsahuje ze 40 % vodu, sušinu tvoří ze 70 % tuky a zbylých 30 % jsou proteiny. Tukovou složku myelinu tvoří cholesterol, galactocerebrosid a sfingomyelin. Mezi proteiny tvořící myelin patří myelinový bazický protein, proteolipidový protein a myelinový oligodendrocytový glykoprotein. Místa, kde je myelinová pochva přerušena, se nazývají Ranvierovy zářezy, v tomto úseku je axon obvykle zbytnělý a nachází se zde velké množství iontových kanálů. Právě tato oblast má rozhodující vliv na rychlost vedení akčního potenciálu [12]. Myelinogeneze začíná v embryu, ale vrcholu dosahuje v dětství a nadále pokračuje do druhé a třetí dekády života [11][13].

Hematoencefalická bariéra odděluje cirkulující krev od mozkové extracelulární tekutiny v CNS a mozkové tkáni. Je tvořena mozkovými endoteliálními buňkami, které jsou spojeny pomocí těsných spojů (tight junctions). Pro její správnou funkci jsou nezbytné také neuroglie – astrocyty, které se napojují na vnější stěnu krevních vlásečnic. Tato bariéra umožňuje průchod vody a některých plynů. Pasivní difuzí prochází molekuly rozpustné v tucích a přes bariéru také prochází selektivním transportem glukóza a aminokyseliny [14]. Svoji selektivitou chrání mozkovou tkáň před potenciálními toxickými látkami a cizorodými organismy. Hematoencefalická bariéra se vytváří během embryogeneze. Spolu s choroidálním plexem vyvíjejícího se mozku, který vytváří mozkomíšní mok, obsahují prvky, které nejsou v dospělosti přítomné. Patří mezi ně specializovaný systém tubulárních endoplazmatických retikulí, které přepravují proteiny přímo přes epiteliální buňky a pravděpodobně přispívají k vyšší koncentraci proteinů pocházejících z plazmy, jež se nacházejí v mozkomíšním moku novorozenců [15].



Obr. 1: Časový průběh některých klíčových neurovývojových procesů a s tím spojených změn v objemu bílé a šedé hmoty, u lidí od početí do 20. roku života. Upraveno podle [10].

Lidé	Hlodavci (postnatální dny)	Vývojové milníky
23 – 32 týden těhotenství / předčasně narozené děti	PND 1 – 3	<ul style="list-style-type: none"> • Vývoj imunitního systému • Vznik hematoencefalické bariéry • Maturace oligodendrocytů - převaha mitoticky aktivních pre-oligodendrocytů
36 – 40 týden těhotenství / období porodu	PND 7 – 10	<ul style="list-style-type: none"> • Období nejrychlejšího buněčného růstu • Zvýšení hustoty axonů a dendritů • Vrchol gliogeneze • Maturace oligodendrocytů – převaha nezralých oligodendrocytů • Konsolidace imunitního systému
2. – 3. rok	PND 20 – 21	<ul style="list-style-type: none"> • Mozek dosahuje 90 – 95 % dospělé hmotnosti • Vrchol synaptogeneze • Vrchol myelinizace • Vývojové změny ve funkci neuroreceptorů
4. – 11. rok	PND 25 – 35	<ul style="list-style-type: none"> • Strukturální zrání prefrontální kůry • Maximální objem šedé kůry a kortikální tloušťky
12. – 18. rok	PND 35 – 49	<ul style="list-style-type: none"> • Hustota synapsí se snižuje na hodnotu dospělých • Pokračující myelinizace a zvyšující se objem bílé hmoty • Zdokonalení obvodů ovlivňujících kognitivní funkce
20 a více let	PND 60 a více	<ul style="list-style-type: none"> • Hustota synapsí srovnatelná s hodnotou dospělých • Běžná hladina neurotransmiterů pro dospělé • Pokračující myelinizace a klesající objem šedé hmoty

Tab. 1: Shrnutí klíčových neurovývojových procesů u srovnatelných věkových kategorií lidí a hlodavců (PND – postnatální dny). Upraveno podle [10].

2.2. Neurotransmitterové receptory během vývoje

Neurotransmitterové receptory jsou proteiny, které se nacházejí v plasmatické membráně neuronů a gliových buněk, především v synapsích. Jsou aktivované chemickými látkami, neurotransmitery, jež se váží na vnější část receptoru. Tyto receptory umožňují vzájemnou komunikaci mezi nervovými buňkami. Receptory přijímají signály, podle kterých regulují aktivity iontových kanálů, což může mít za následek změnu membránového potenciálu. [16] Neurotransmitterové receptory dělíme na ionotropní a metabotropní. Ionotropní receptory mohou být aktivované či inhibované ligandem – neurotransmitterem. Podjednotkové složení neurotransmitterových receptorů ve vyvíjejícím se mozku podporuje excitaci, která převládá nad inhibicí, což usnadňuje rozvoj mozkových obvodů. [17]

V AMPA receptorech se díky snížené expresi GluA2 podjednotky, zvyšuje propustnost pro Ca^{2+} [18]. Když je zvýšený poměr non-GluA2 / GluA2, zvyšuje se i propustnost pro Ca^{2+} , a ten podporuje hyperexcitabilitu [19]. AMPA receptory bez GluA2 podjednotky jsou obvykle exprimovány v nezralém mozku a jejich přítomnost odpovídá zvýšenému riziku excitotoxického buněčného poškození v důsledku hypoxicko-ischemického poranění [20].

Moje práce se z velké části zabývá NMDA receptory a jejich vlivem na postnatální ischemii, z důvodu přehlednosti práce popíši vývoj NMDA receptorů v samostatné kapitole o nich.

Vývojové změny se také týkají GABA receptorů a transportérů chloridů. Na rozdíl od plně vyvinutých neuronů, ve vyvíjejících se neuronech je koncentrace chloridu vyšší v intracelulárním než v extracelulárním prostoru. Tento fakt je dán rozdílnou funkcí GABA receptorů spojených s Cl^- kanálem během vývoje. V nezralém neuronu probíhá odliv Cl^- a depolarizace (excitace), naopak v plně vyvinutém neuronu probíhá příliv Cl^- a hyperpolarizace (inhibice). Koncentrace Cl^- je regulována především působením Cl^- transportérů NKCC1 a KCC2. NKCC1 hromadí Cl^- v buňce a KCC2 transportují Cl^- ven z buňky. NKCC1 je hlavní Cl^- transportér v nezralém neuronu a jeho exprese se snižuje v průběhu času, zatímco KCC2 je v nezralém neuronu méně početný, ale časem je stále více a více exprimován [21]. Roli mohou také hrát změny v subjednotkovém složení receptorů GABA, konkrétně $\alpha 1$ podjednotka receptoru GABA je vývojově regulovaná a exprimována v nízkých hladinách v nezralém mozku [22].

Stručně řečeno, nezralý mozek má zvýšené následující poměry receptorových podjednotek: GluA1 / GluA2 (AMPA receptory), GluN2B / GluN2A (receptory NMDA), NKCC1 / KCC2 (GABA neurotransmise), a non- α 1 / α 1 (GABA receptory), které podporují hyperexcitabilitu, synaptogenezi, a vývoj neuronových sítí ve vyvíjejícím se mozku [17].

2.3. Neurosteroidy

Jednou z možností, jak je činnost NMDA receptorů, ale také GABA_A receptorů v mozku přirozeně modulována je aktivita neurosteroidů. Neurosteroidy jsou endogenní steroidy syntetizované v mozku, které rychle mění dráždivost neuronů především díky interakci s ionotropními receptory. U těchto neurotransmiterních receptorů ovlivňují propustnost iontových kanálů. Některé z těchto steroidů mohou mít také vliv na genovou expresi prostřednictvím jaderných receptorů [23]. Neurosteroidy jsou syntetizovány z cholesterolu a dalších steroidních molekul transportovaných krví do mozku. Primárně celá kaskáda začíná syntézou pregnenlonu, ze kterého jsou odvozeny ostatní neurosteroidy. Mezi známé biologické funkce neurosteroidů patří modulace procesu učení a paměti, modulace chování, či formování reakce na stres, úzkost a deprese [24]. Významnou úlohu hrají také během těhotenství a při nástupu porodu [26].

Dalším klíčovým endogenním neurosteroidem je pregnanolon (3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-on) je endogenní neurosteroid, který je syntetizovaný z progesteronu. Je to pozitivní alosterický modulátor GABA receptorů [27]. Známé jsou pak především 4 pregnanolonové izomery: allopregnanolon (P3 α 5 α); isopregnanolon (P3 β 5 α); pregnanolon (P3 α 5 β); epipregnanolon (P3 β 5 β). Steroidní hladiny izomerů pregnanolonu jsou podobné mezi muži a ženami ve folikulární fázi, zvýšené třikrát u žen v luteální fázi a eskalují během těhotenství (38- 410 krát ve srovnání s ženami ve folikulární fázi). 3 β izomery pregnanolonu soutěží s 3 α izomery pregnanolonu o vazebná místa na GABA receptorech. Přičemž inhibiční účinnost P3 β 5 α pro GABA receptor je srovnatelná s GABA receptorovou aktivační účinností P3 α 5 α . Tyto neurosteroidy významně ovlivňují těhotenství. Například klesající tvorba P3 α 5 β se může podílet na zahájení porodu, díky jeho schopnosti potlačit aktivity buněk produkujících oxytocin. P3 α 5 α pak působí aktivačně na NMDA receptor v hypotalamu a vyvolává produkci oxytocinu [28].

Přirozeně se vyskytující pregnanolon sulfát je alosterický modulátor NMDA receptorů. Preferenčně inhibuje use-dependentním mechanismem aktivované NMDA receptory. Výsledky studií zabývající se pregananolon sulfátem poskytují jedinečnou příležitost pro vývoj nových terapeutických neurosteroidů k léčbě nemocí spojených s dysfunkcí glutamátového systému [25].

Neurosteroidy jsou z pohledu hypoxicko-ischemického poškození v postnatálním období zajímavé z důvodu jejich fyziologického přírodního výskytu. Předpokládá se, že počet a závažnost vedlejších účinků případných léčiv na bázi struktury neurosteroidů bude výrazně nižší, než u léčiv, které jsou tělu cizí. Nicméně toto téma je velmi obsáhlé, a tak chci v mé práci pouze nastínit tuto možnost, která se do budoucna jeví velice slibně [29].

3. Hypoxicko-ischemické experimentální modely

Animální modely poskytují základní nástroj pro pochopení buněčné a molekulární patofyziologie ischemického poškození mozku. Mezi nejčastější modelová zvířata patří hlodavci, a to především potkani a myši [30]. Tato zvířata jsou vhodná pro studium ischemické cévní mozkové příhody. Jejich fyziologické veličiny jsou snadno monitorované, jsou ekonomicky nenáročná a díky většímu počtu potomstva a kratšímu životnímu cyklu se dají zkoumat ve velkých, pro statistickou analýzu vhodných, počtech [31]. Modely pro studium patofyziologických důsledků ischemické cévní mozkové příhody lze rozdělit na modely fokální a globální [30].

3.1. Modely fokální mozkové ischemie

Fokální ischemie je charakterizována redukcí krevního toku pouze v určité oblasti mozku. U experimentálně navozené fokální ischemie je mechanicky nebo farmakologicky navozenou tromboembolií uzavřena céva ve zvoleném místě. Mezi tyto techniky patří okluze proximální střední mozkové tepny (pMCAO – velká cévní okluze), okluze distální střední mozkové tepny (dMCAO – malá cévní okluze), trombotická okluze prostřednictvím injekce krevních sraženin či trombinu do MCA či fototrombóza po intravenózní injekci bengálské červeně [30].

3.2. Modely globální mozkové ischemie

Globální ischemie je charakterizována snížením průtoku krve v celém mozku. Modely globální mozkové ischemie se obvykle používají ke studiu poškození mozku, které se vyskytuje v souvislosti s poruchou oběhové soustavy. Mezi tyto techniky patří metoda okluze čtyř cév (4VO), zahrnující okluze společných karotid a vertebrálních tepen, nebo okluze obou společných karotid (2VO) spolu s indukcí hypotenze po omezenou dobu [30].

3.3. Hypoxicko-ischemické modely raných vývojových stádií

Mezi nejvhodnější modelová zvířata pro hypoxicko-ischemická poškození mozku v raných vývojových stádiích patří mláďata potkanů, kterým je podvázána karotida, a následně jsou podrobeny systémové hypoxii. Insult způsobuje trvalé hypoxicko-ischemické poškození jedné z hemisfér v závislosti na okluzi pravé nebo levé karotidy. K systémové hypoxii dochází díky inhalaci dusíku s 8% přídávkem kyslíku. Mláďata potkanů jsou takto schopné přežít 3 nebo více hodin. Poškození tkáně je způsobeno odumřením jednotlivých neuronů anebo cévní mozkovou příhodou. Pro tyto studie se často používá potkan ve stáří 7. postnatálního dne (PND 7), jehož mozek je srovnatelný s mozkem lidského plodu ve 32. až 34. týdnu těhotenství. Jedná se o období, kdy dochází nejčastěji k předčasným porodům. Dále se používá potkan v PND 12 – 13, jehož mozek odpovídá mozku novorozence narozeného v řádném termínu [32].

Mezi další modely pro raná vývojová stádia patří model fokální cerebrální ischemie u potkanů v PND 12. V tomto případě je fokální ischemie vyvolaná infuzí vazokonstrikčního peptidu endothelinu-1 (ET-1) do dorzálního hipokampu. Infuze endothelinu-1 vede ke glutamátové excitotoxicitě, následované rozvojem ischemických lézí a ischemii vyvolaných záchvatů [29].

4. Hypoxicko-ischemická poškození u raných vývojových stádií

Hypoxicko-ischemická (HI) poškození mozku v raných vývojových stádiích mohou vyvolávat dlouhodobé neurologické komplikace od mírných behaviorálních deficitů k těžkým epileptickým záchvatům, mentálním retardacím či mozkové obrně [2]. Neuropatologické rysy těchto poškození se značně liší s věkem dítěte, povahou insultu a typem intervence. Studie vlivu hypoxie na energetický metabolismus mozku ukázala u modelu potkaního mláďete na speciální časovou závislost pro poškození tkáně. Toto poškození se vyznačuje větší

zranitelností v druhém postnatálním týdnu (srovnatelný s lidským mozkem při porodu) než v prvním postnatálním týdnu (srovnatelný s lidským mozkem u předčasného porodu) [33]. Jiné studie HI poškození v myším mozku zase poukazují na paradox, kdy při neexistenci poškození je hipokampální neurogeneze několikrát vyšší v mladším mozku (PND 9), ve srovnání s mozky při PND 21. Avšak regenerační reakce na HI je paradoxní, neurogeneze je snížena v PND 9 a zvýšena v PND 21 [34]. Kromě toho, na základě důkazů o větší odolnosti energetického metabolismu nezralého mozku oproti plně vyvinutému platí, že perinatální mozek je více tolerantní k asfyxii než mozek plně vyvinutý [33].

To, že je nezralá mozková tkáň podstatně odolnější vůči hypoxii a nedostatku adenosin-5'-trifosfátu je pravděpodobně proto, že má nižší hustotu axonů a dendritů. Získání podobné velikosti poškození si mezi věkovými skupinami vyžaduje různou dobu trvání hypoxicko-ischemického infarktu. Kromě toho, mechanismy poškození se mezi nezralým a dospělým mozkem výrazně liší [35]. Nezralý mozek je náchylný k HI poškození zejména v souvislosti se zvýšenou hustotou a funkcí excitačních receptorů a zvýšenou zranitelností vůči reaktivním formám kyslíku (ROS) a reaktivním formám dusíku (RNS) [33].

4.1. Neuropatologie hypoxicko-ischemického poškození

Princip patogenního mechanismu neurologického HI poškození vyplývá z omezené dostupnosti glukózy a kyslíku. Omezená dostupnost glukózy a kyslíku způsobuje primární selhání energetického metabolismu a iniciuje kaskádu biochemických událostí vedoucích k buněčné dysfunkci a nakonec k buněčné smrti [36]. Následné reperfuze poškození často ještě zhorší metabolismus postižené tkáně tím, že způsobí zvýšení koncentrace ROS v oblasti reperfuze a jejich rozšíření. Základní princip tohoto poškození tkví ve zvýšení extracelulárního glutamátu, nadměrné aktivaci glutamátových receptorů (excitotoxicita) a zvýšení cytosolického vápníku (Ca^{2+}), což vede k buněčné smrti [37].

Časové aspekty změn v množství glukózy energetického metabolismu po HI insultu zahrnují primární a sekundární selhání energie [38]. Ihned po HI insultu nastává primární selhání energie. Vyčerpání kyslíku brání oxidativní fosforylaci, což má za následek snížené množství makroergních fosfátových sloučenin, zejména ATP a vede k přechodu na anaerobní metabolismus. Tato transformace buněčného metabolismu způsobí akumulaci laktátu a asociovaného H^+ . Akumulace laktátu a asociovaného H^+ je zpočátku výhodná pro adaptaci

na kyslíkovou deprivaci. Avšak později, s progresí laktátového cyklu, má škodlivé účinky na cévní autoregulaci, způsobuje pokročilé ischemické poškození a inhibuje fosfofruktokinázovou aktivitu prostřednictvím nízkého pH. Dále také podporuje biochemické kaskády vedoucí k buněčnému poškození [2]. Výskyt sekundárního selhání energie se mění v závislosti k druhu a povaze insultu s nástupem mezi 8 až 16 hodinami po insultu a dosahuje nejnižší hodnoty za 24 až 48 hodin. Hladina makroergních fosfátových sloučenin se vrací zpět k fyziologickým hodnotám 2 až 3 hodiny po reperfuzi a reoxygenaci [39].

Počáteční pokles makroergních fosfátových sloučenin spouští řadu dalších mechanismů, počínaje selháním ATP-dependentních Na^+/K^+ pump. Transcelulární iontové pumpy vedou k selhání ve vnitrobuněčné akumulaci Na^+ , Ca^{2+} a vodě (cytotoxický otok). Toto selhání je následované membránovou depolarizací, nadměrným uvolňováním excitačních neurotransmiterů, zejména glutamátu, zvýšením cytosolového Ca^{2+} , aktivací fosfolipázy a vytvářením volných radikálů. Rozhodující úlohu při HI insultu hraje excitotoxický glutamát [40]. Glutamát je převládající excitační neurotransmitter v mozku a má 3 hlavní typy ionotropních receptorů; NMDA, AMPA, a KA, jež můžeme najít ve většině neuronech a gliích [37].

Za normálních okolností glutamátové ionotropní receptory fungují kooperativně při stabilizaci synapsí, plasticitě neuronů a neuronální excitaci pro běžné úkoly, jako je učení a paměť. Nicméně jejich zásadní a rozšířené funkce v perinatálním období činí také neurony zranitelnější k excitotoxicitě. [41]. Bylo zjištěno, že právě specifické blokátory glutamátových receptorů zmírňují poškození mozku v důsledku HI [42]. Zvýšení extracelulární glutamátové koncentrace a aktivace glutamátových receptorů spouští po hypoxicko-ischemickém insultu excitotoxickou kaskádu. Excitotoxicita vede ke zvýšení cytosolického Ca^{2+} prostřednictvím otevřených NMDA a AMPA receptorů a dalších napětově závislých Ca^{2+} kanálů. Svou roli hraje také uvolňování vápníku z nitrobuněčných zásob. Mezi škodlivé účinky zvýšené koncentrace cytosolového vápníku patří aktivace proteinů, které signalizují smrt. Tyto proteiny vedou k aktivaci syntázy oxidu dusnatého (NOS; tvorba oxidu dusnatého), generování volných radikálů, degradaci buněčných lipidů (aktivace fosfolipáz), degradaci buněčných proteinů (aktivace proteáz) a degradaci buněčné DNA (aktivací nukleáz) [43]. Vnější mitochondriální membrána dále vyvolává mitochondriální uvolňování cytochromu C, štěpení kaspáz 9 / 3 a apoptózu-indukujícího faktor (AIF), což vede k apoptóze [44].

Mechanismus neuronální buněčné smrti po hypoxii-ischemii zahrnuje neuronální nekrózu a apoptózu v závislosti hlavně na závažnosti insultu a stáří buňky [45]. Počáteční pokles makroergních fosfátových sloučenin v závažném insultu způsobuje akutní příliv Na^+ , Cl^- a vody s následným buněčným otokem a lýzí buňky vedoucí k nekrotické buněčné smrti. Zatímco v méně závažném insultu po membránové depolarizaci následuje kaskáda excitotoxicity a oxidačního stresu, což vede ke zpožděné buněčné smrti, a to především apoptóze. Apoptóza převládá v perinatálním mozku, ať už kaspázy-závislými, tak kaspázy-nezávislými mechanismy apoptotické buněčné smrti [37].

4.1.1. Excitotoxicita

Excitotoxicita je primární mechanismus ischemického poškození. Protože glutamát je excitační a další související excitační aminokyseliny jsou také excitotoxické, tyto aminokyseliny se souhrně nazývají excitotoxiny a jejich poškození neuronů se nazývá excitotoxicita. Výzkum excitotoxicity byl původně založen na studiu bezpečnostních rizik potravin, které obsahují glutamát sodný. Rychle se však ukázalo, že excitotoxicita je hlavní mechanismus neurodegenerace, která následuje po cerebrální ischemii a může způsobovat i další neurodegenerativní onemocnění, včetně Huntingtonovy choroby, Alzheimerovy choroby či amyotrofni laterální sklerózy. Pokud zabráníme excitotoxicitě, můžeme také zabránit poškození, které vzniká jako následek cerebrální ischemie [1].

Prvním krokem k excitotoxicitě je rychlé zvýšení hladin glutamátu v ischemické oblasti mozku [46]. Centrální neurotransmitter glutamát je obvykle v mozku fyziologicky potřebný, avšak při cerebrální ischemii, kdy je pozorován až 8 násobný nárůst jeho koncentrace, indukuje excitotoxicitu [47]. Mechanismus, kterým je glutamát uvolňován, je multifaktoriální a závisí na závažnosti ischemie [46]. Mezi několika glutamátovými analogy je N-methyl-D-aspartát (NMDA) nejúčinnější při zvyšování přílivu vápníku a je také nejúčinnější v indukci neurotoxicity. Zvýšená koncentrace vápníku pak aktivuje signální dráhy, které vedou k buněčné smrti. Toto zjištění vedlo k teorii, podle které je podtyp glutamátového receptoru, jenž je aktivován pomocí NMDA (nyní známý jako NMDA receptor), základem pro excitotoxicitu zprostředkovanou glutamátem [48]. Koncepce excitotoxicity také udává, že neurotoxické glutamátové analogy jsou strukturálně podobné a tyto molekuly mohou vyvolat neurotoxicitu podle společného mechanismu [49].

Případná inhibice uvolňování glutamátu by tedy mohla přinést neuroprotekcí pomocí ovlivnění signálních drah spojených s buněčnou smrtí na jejich počátečním bodu. [46] Dále neuronální smrt, která je pozorována 24 hodin po nadměrné aplikaci glutamátu (či jeho analogu), je zastavena odstraněním vápníku a naopak zesílena zvýšením hladiny vápníku. [50] Dysfunkce sodno-vápenatého přenašeče, která je zprostředkována NMDA receptorem, pak vysvětluje následný vtok vápníku, jenž nastane po excitotoxickém stimulu. Nahrzení tohoto dysfunkčního sodno-vápenatého přenašeče (NCX) za funkční izoformou zabraňuje excitotoxickému poškození buněk [51]. A konečně, intracerebrální injekce 2-amino-7-fosfoheptanové kyseliny, jež je antagonist NMDA receptoru, zabraňuje buněčné smrti v mozku potkana, která následuje po cerebrální ischemii. Toto zjištění poskytlo první jasný důkaz, že glutamát a zejména jeho účinek na NMDA receptor je zásadní pro ischemické poškození mozku [52].

4.1.2. Oxidační stres

Oxidační stres a apoptóza jsou v patofyziologii hypoxicko-ischemického poškození úzce spjaty. V průběhu HI insultu se zvyšuje tvorba ROS a RNS. Jedná se o vysoce reaktivní molekuly, obsahující jeden či více nepárových elektronů. Volné radikály mohou reagovat s DNA, proteiny či lipidy, což může způsobovat poškození buňky. Volné radikály, které jsou zapojené do ischemického poškození mozku, zahrnují superoxidový anion O_2^- a oxid dusnatý (NO^*). Jejich škodlivé účinky lze omezit nebo jim zabránit pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů [53].

Primárním zdrojem ROS je během ischemie mitochondriální transportní řetězec. Mitochondrie produkují O_2^- během oxidativní fosforylace za patofyziologických podmínek. Dalším důležitým zdrojem ROS je metabolismus kyseliny arachidonové. Volné kyslíkové radikály jsou tvořeny a rozšířeny během reperfuze ischemické tkáně, aktivovanými mikroglie a periferními leukocyty díky NADPH oxidázovému systému.

NO^* (reaktivní forma dusíku) vzniká z L-argininu pomocí enzymu NO syntázy (NOS). Neuronální izforma (nNOS) vyžaduje pro svou aktivaci vápník. Další izoformy jsou indukovatelná NO syntáza (iNOS), kterou exprimují zánětlivé buňky (monocyty, mikroglie) a endoteliální NO syntáza (eNOS), která je vazodilatační a zlepšuje průtok krve cévou. Mozek během ischemie poškozuje především nNOS a iNOS. Aktivace NMDA receptoru stimuluje

produkcí oxidu dusnatého přes nNOS, který poté hraje důležitou roli v excitotoxickém poškození. NO* se volně šíří přes membrány a může reagovat se superoxidovým aniontem (O₂⁻) za vzniku peroxynitritu (ONOO⁻). ROS a RNS se podílejí na aktivaci několika drah, které vedou k buněčné smrti. K největšímu poškození dochází při reperfuzi, kdy se nahromaděné ROS a RNS najednou vyplaví a negativně působí na okolní tkáň [54].

4.1.3. Laktátová acidóza

Jeden z nejdůležitějších zdrojů energie lidského těla je sacharid glukóza. Glukóza se přeměňuje na dvě molekuly pyruvátu, který je poté v mitochondrii přeměněn na vodu a oxid uhličitý za spotřeby kyslíku. ATP, které vzniká při těchto reakcích, se při buněčné práci hydrolyzuje, čímž se uvolní energie, vzniká ADP, Pi a také proton (H⁺). Mitochondrie tyto protony při dostatku kyslíku začleňuje zpět do ATP, čímž zabraňuje hromadění H⁺ a udržuje neutrální pH [55].

Při nedostatku kyslíku nemohou mitochondrie produkovat dostatečné množství ATP, jenž buňka potřebuje. V této situaci se zvyšuje glykolýza, při které vzniká přebytek pyruvátu, ale také potřebné ATP. Přebytek pyruvátu se poté převádí na laktát (kyselina mléčná), který je uvolňován z buněk do krevního řečiště. I když zvýšená glykolýza pomáhá kompenzovat menší výtěžek ATP z oxidativní fosforylace, nemůže vázat H⁺, které vznikají při hydrolyze ATP. Koncentrace H⁺ proto stoupá a způsobuje acidózu [55]. Laktátová acidóza má škodlivé účinky na cévní autoregulaci, způsobuje pokročilé ischemické poškození, inhibuje fosfofruktokinázovou aktivitu prostřednictvím nízkého pH a podporuje biochemické kaskády vedoucí k buněčnému poškození [2].

4.1.4. Protizánětlivé reakce spojené s hypoxicko-ischemickým poškozením

V mozkové tkáni existuje několik populací buněk, které jsou schopné po ischemickém poškození vylučovat protizánětlivé mediátory. Patří mezi ně endotelové buňky, astrocyty, mikroglie a neurony. Tyto buňky aktivují neuroprotektivní transkripční faktory, čímž zvyšují expresi zánětlivých cytokinů, chemokinů a endotelových buněčných adhezních molekul (CAM). Rozhodující úlohu v zánětu mozkové tkáně mají mikroglie. Aktivované mikroglie produkují četné prozánětlivé cytokiny, stejně jako toxické metabolity a enzymy. Vzhledem k ničivému i ochrannému charakteru mikroglíí (a astrocytů) se celková úloha glíí může po ischemii lišit v různých časových bodech [54].

4.1.5. Dysfunkce hematoencefalické bariéry

Hematoencefalická bariéra reaguje na ischemii zvýšenou propustností a degradací bazální laminy. Dále se také zvyšuje interakce endotelu s extravaskulárními buňkami CNS (astrocyty, mikroglie, neurony) a interakce endotelu s intravaskulárními buňkami (leukocyty, krevní destičky). Výsledkem těchto reakcí je špatné kapilární prokrvení mozkové tkáně, adheze cirkulujících buněk, záněty, trombózy či snížená bariérová funkce endotelu [54].

4.1.6. Infiltrace leukocytů

Také leukocyty hrají roli v patogenezi hypoxicko-ischemického poškození. Zprostředkovávají totiž poškození vyvolané reperfuzí. Především neutrofilů se silně podílí na poškození tím, že pronikají skrz endotel do mozkového parenchymu. Jak ale konkrétně přispívají k patofyziologii HI poškození, není zatím známo [54].

5. NMDA receptory

N-methyl-D-aspartátový receptor (také známý jako receptor NMDA) je specifický druh ionotropního glutamátového receptoru nacházející se v nervových buňkách [57]. NMDA receptor je pojmenován po jeho agonistovi, molekule NMDA, která se k němu selektivně váže [58]. NMDA receptor je velmi důležitý pro řízení synaptické plasticity a má významnou paměťovou funkci [59].

5.1. Aktivace NMDA receptoru

Aktivace NMDA receptorů vede k otevření iontového kanálu. Je aktivován, pokud se na něj naváží 2 koagonisté, tzn. dvě molekuly glutamátu na GluN2 či GluN3 a dvě molekuly glycinu (nebo D-serinu) na GluN1 podjednotku. Aktivace NMDA receptoru je současně napěťově závislá. Iontový kanál totiž za klidového membránového potenciálu blokují ionty Mg^{2+} a kanál je odblokován až depolarizací membrány. Navázání glutamátu a glycinu na vazebná místa NMDA receptoru a depolarizace membrány pak umožní průtok iontů Na^+ a Ca^{2+} do buňky a K^+ ven z buňky [58]. Mimo vazebných míst pro koagonisty se na povrchu receptoru nachází i další vazebná místa pro jiné ligandy např. pro Mg^{2+} , Zn^{2+} , H^+ , polyaminy, blokátory kanálu či neurosteroidy. Existence mnoha vazebných míst je předpokladem pro farmakologické zásahy [60].

5.2. Struktura NMDA receptoru

NMDA receptory jsou heterotetramery, které se skládají ze 3 typů podjednotek zahrnujících GluN1, GluN2 a GluN3. Podjednotka GluN1 existuje celkem v 8 izoformách, GluN2 může být syntetizována podle 4 různých genů, (GluN2A až GluN2D), méně častá GluN3 podjednotka se nachází ve variantách GluN3A či GluN3B. Homotetramer NMDA receptoru většinou obsahuje dvě GluN1 a dvě GluN2. GluN3 může nahrazovat jednu z GluN2 podjednotek. Z terapeutického hlediska je složení receptoru velmi důležité, jelikož se od něj odvíjí biofyzikální a farmakologické vlastnosti komplexu. Topologie všech podjednotek je shodná. N-konec proteinu je na extracelulární straně, zatímco C-konec je orientován intracelulárně. Do membrány jsou integrované 3 domény TM1, TM3 a TM4. Doména TM2 je intracelulární pohyblivá část vytvářející iontově selektivní pór kanálu receptoru [60].

5.3. NMDA receptory během vývoje

Podjednotkové složení NMDA receptoru je specifické pro různé oblasti mozku a také se dynamicky mění v průběhu vývoje mozku a při odpovědi na fyziologické podněty. Zatímco GluN1 podjednotka NMDA receptoru je hojně rozšířená v dospělém mozku, GluN2A a GluN2B podjednotky jsou součástí především předního mozku a GluN2A a GluN2C podjednotky jsou přítomné v mozečku [61]. Co se týče vývojových změn, tak zejména kortikální a hippocampální neurony v novorozeneckém předním mozku obsahují receptory NMDA s GluN2B podjednotkou jak v synapsích, tak v extrasynaptických místech, zatímco kortikální neurony v dospělém mozku obsahují zvýšené synaptické populace receptorů NMDA s GluN2A podjednotkou [62]. U potkaního modelu nezralého mozku jsou GluN2B, GluN2C, GluN2D, a GluN3A podjednotky nadměrně exprimovány a tato nadměrná exprese, která zvyšuje poměr non-GluN2A / GluN2A, podporuje hyperexcitabilitu [63].

5.4. Klíčová úloha NMDA receptoru v excitotoxicitě

NMDA receptor je v mozkové tkáni důležitý pro neuronální rozvoj a udržování buněk při životě. Je významný v běžném vývoji, ale i v ischemické nebo traumatizované tkáni. Určitá subpopulace NMDA receptorů je neuroprotektivní a hraje podstatnou roli při obnově neurologických funkcí, které byly narušené například iktem [1]. NMDA receptory jsou významné také v excitotoxicitě zprostředkované vápníkovými ionty, které přes tyto

receptory velice snadno prochází do buňky. Nadměrný vtok vápníku způsobený aktivací NMDA receptoru je vysoce neurotoxický oproti ekvivalentnímu vtoku vápníku, který vede přes napětově řízené vápenaté kanály [56]. Vtok vápníků do buňky přes NMDA receptory může mít odlišný účinek na genovou expresi [64]. Jedna z klíčových rolí NMDA receptoru je ta, že se jedná o zdroj vápníku, který signalizuje buněčnou smrt. Tato skutečnost vede k teorii, podle které proteiny signalizující smrt, jež jsou zároveň na vápníku závislé, musí být úzce spojené s NMDA receptorem [56]. Dnes již máme důkazy o tom, že C-koncová doména určité subpopulace NMDA receptorů přímo váže mnoho proteinů participujících na apoptotických procesech, což je významné zejména při cerebrální ischemii [1].

5.5. Duální role NMDA receptoru

V závislosti na úrovni aktivity receptorů NMDA, mohou některé subpopulace těchto receptorů podporovat neuronální smrt nebo přežití. Například stimulace NMDA receptoru nízkou dávkou NMDA podporuje přežívání neuronů v kulturách granulových buněk. Za stejných kultivačních podmínek stimulace vysokou dávkou NMDA vyvolává neuronální smrt. Tyto účinky jsou zprostředkované odlišnými mechanismy následných signálních drah jednotlivých subpopulací NMDA receptorů [65].

Taktéž synaptické a extrasynaptické NMDA receptory mohou být spojené s rozdílnými proteiny následných signálních drah. Tyto proteiny mají na neurony rozdílné účinky. Synaptické NMDA receptory mohou podporovat neuronální přežití. Naproti tomu extrasynaptické NMDA receptory, které se aktivují, když je příliš mnoho glutamátu v ischemické oblasti mozkové tkáně, mohou indukovat neuronální smrt [66]. Synaptické NMDA receptory aktivují proteiny signalizující přežití. Aktivují kinázu ERK a zvýší koncentraci jaderného vápníku, což vede k aktivaci transkripčního faktoru CREB a produkci proteinu podporujícího přežití BDNF. Naproti tomu extrasynaptické NMDA receptory snižují aktivaci ERK, CREB a snižují produkci BDNF [67].

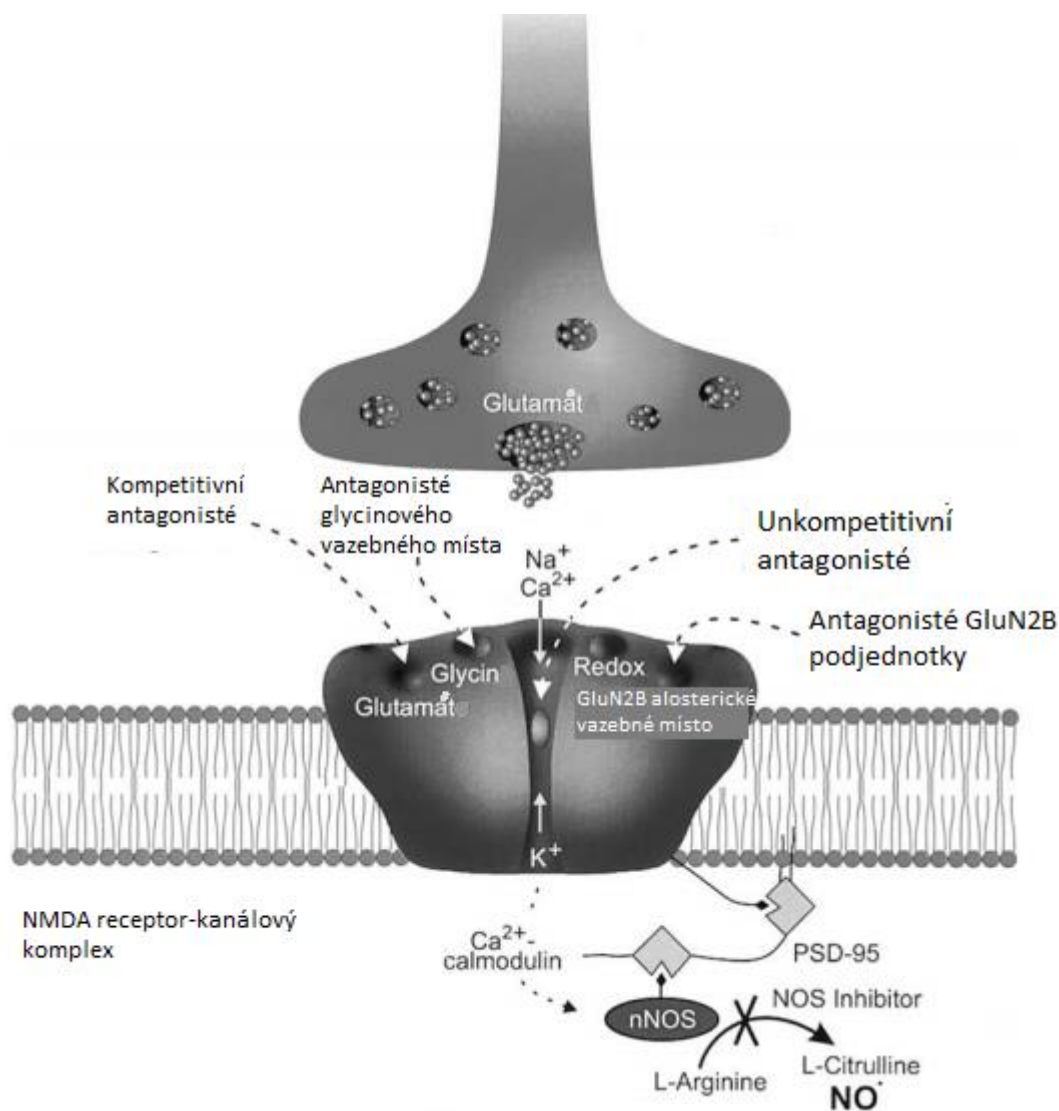
Rozdílná funkce synaptických a extrasynaptických NMDA receptorů může být také částečně vysvětlena přítomností odlišných podjednotek. NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotky se vyskytují hlavně na synapsích a podporují přežívání neuronů díky aktivaci proteinů kontrolujících přežití – AKT, ERK a CREB. Naproti tomu NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotky se vyskytují hlavně extrasynapticky a váží na svou c-terminální doménu

proteiny, jež po průniku vápníku participují na proapoptotických procesech. Selektivní antagonisté NMDA receptorů obsahujících GluN2B podjednotku jsou pak vysoce neuroprotektivní v modelech mozkové ischemie a dalších neurodegenerativních onemocněních, zatímco selektivní antagonisté NMDA receptorů obsahujících GluN2A podjednotku jsou slabě neuroprotektivní a v několika studiích zhoršují neuronální poškození [62].

5.6. NMDA antagonismus

Antagonisté NMDA receptorů jsou skupinou látek, které antagonizují nebo inhibují účinek NMDA receptorů. Používají se jako veterinární a lékařská anestetika. Někteří antagonisté NMDA receptoru, jako je ketamin či fencyklidin (PCP), jsou pro své disociativní, halucinogenní a euforizační vlastnosti rozšířené rekreační drogy [68]. Rozhodující úloha NMDA receptoru v patogenezi cerebrální ischemie naznačuje, že antagonisté NMDA receptorů a postsynaptické blokátory vápníkového kanálu mohou být neuroprotektivní [69]. Přímý antagonismus NMDA receptoru se dokonce zdá být dostatečně neuroprotektivní proti ischemickému poškození ve srovnání s ko-antagonismem různých excitotoxických receptorů a zdrojů vápníku. Mezi látky, které se v tomto ohledu nejvíce studují, patří MK-801 (dizocilpin). Tato látka je selektivní nekompetitivní antagonist NMDA receptoru, který prochází lehce hematoencefalickou bariérou, což umožňuje systémové podání [70].

Z hlediska schopnosti a místa navázání lze antagonisty dělit na kompetitivní antagonisty, antagonisty glycinového vazebného místa, nekompetitivní antagonisty a unkompetitivní antagonisty. Jednotlivé skupiny se liší také svými vlivy na chování jedince a nežádoucími vedlejšími účinky [71]. Antagonisté NMDA receptorů byly primárně zkoumány na plně vyvinuté nervové tkáni.



Obr. 2: Schématické znázornění některých vazebných a regulačních domén NMDA receptoru. Upraveno podle [72].

5.6.1. Kompetitivní antagonisté

Kompetitivní antagonisté se váží na glutamátové vazebné místo NMDA receptoru. První kompetitivní antagonisté NMDA receptoru neprocházely hematoencefalickou bariérou a to je činilo nevhodnými pro klinické využití. Proto se začaly vyrábět antagonisté, které byly více lipofilní a mohly touto bariérou procházet. Během ischemického poškození se přechodně zvýší extracelulární hladiny glutamátu, což vede k excitotoxicitě. Z toho důvodu jsou kompetitivní antagonisté, které soutěží o vazebné místo s glutamátem, méně účinnými. Mezi sloučeniny, které prochází hematoencefalickou bariérou, patří 3- (2- karboxypiperazin-4-yl)

propyl-1-fosfonová kyselina (CPP) a jeho derivát d-CPPene. Tyto sloučeniny však měly závažné vedlejší účinky [73].

CGS19755 (Selfotel) byl intenzivně zkoumán u lidí. Při všech studiích se ale signifikantně projevil jeho nežádoucí vedlejší účinky, jako jsou halucinace, paranoie, poruchy vědomí, pocit omámení či zvracení. Zjistilo se také, že jedna dávka této látky může mít biologický účinek na NMDA receptor po dobu 24 hodin a déle, což je dlouho poté, co se extracelulární koncentrace glutamátu vrátí do normálu. Bylo také zaznamenáno nesignifikantní zvýšení úmrtí u pacientů léčených CGS19755 [73].

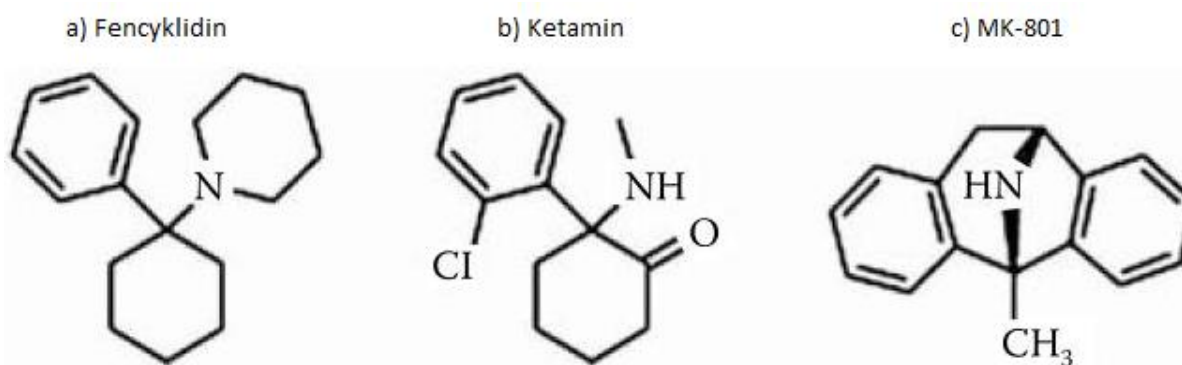
5.6.2. Nekompetitivní antagonisté

Nekompetitivní antagonisté se přednostně vážou do otevřeného póru kanálu NMDA receptoru. Jestli má vazba proběhnout, musí být také depolarizována membrána, aby pór kanálu opustil Mg^{2+} , který kanál za klidového membránového potenciálu blokuje [74]. Nekompetitivní antagonisté procházejí účinně přes hematoencefalickou bariéru. První generace antagonisté se vážaly do póru s vysokou afinitou, proto jejich disociace trvala dlouho a bránily tak běžným funkcím NMDA receptorů [73]. Proto se dnešní studie často zaměřují na nízkoafinitní antagonisty, které disociují rychleji, a tudíž by neměly mít tak závažné vedlejší účinky [74].

Fencyklidin (PCP) je nekompetitivní vysokoafinitní antagonist NMDA receptoru. Byl to vůbec první syntetizovaný antagonist NMDA receptoru vytvořený v roce 1950 jako anestetikum [73]. Následně bylo PCP použito zejména v psychiatrickém výzkumu jako farmakologický model schizofrenie. PCP je také zneužíván jako droga ("andělský prach"). Užívání PCP navozuje stav silné analgezie a katalepsie, ve kterém je subjekt při vědomí (oči zůstávají otevřené), ale reakce na podněty je slabá. 10 mg PCP vyvolává stav euforie a analgezie, která byla vhodná pro premedikaci, 20 mg byla adekvátní dávka jako anestetikum pro chirurgické zákroky. Po anestézii se ale pacienti cítili výrazně neklidní a občas měli násilnické chování doprovázené halucinacemi a paranoidními reakcemi. Změny v EEG pacientů, kteří užívali PCP, ukazují disociaci mezi thalamokortikálními a limbickými křivkami, což vedlo k vytvoření termínu "disociativní anestetika" pro PCP a jiné nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů [74].

Ketamin je nekompetitivní a nízkoafinitní antagonist NMDA receptoru. Je to analog PCP s totožnými klinickými účinky, které jsou pouze kratší. Je široce používán jako anestetikum a v některých případech jako analgetikum. V případě jeho využití jako anestetika se podává souběžně s benzodiazepiny, které snižují psychomimetické a kardiovaskulární vedlejší účinky [74].

MK-801 (dizocilpin) je další vysokoafinitní nekompetitivní antagonist NMDA receptoru. Na potkaním modelu cerebrální ischemie bylo dokázáno, že je silně neuroprotektivní. Následně bylo také prokázáno, že je trvale neuroprotektivní v několika modelech excitotoxicity. Jeho klinický vývoj byl ale přerušeno, protože měl nepříznivé vedlejší účinky [73].



Obr. 3: Chemické struktury a) fencyklidin (PCP), b) ketamin, c) MK-801. Upraveno podle [75].

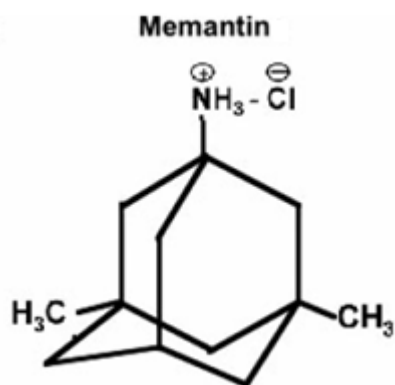
5.6.3. Unkompetitivní antagonisté

Unkompetitivní antagonisté se stejně jako nekompetitivní antagonisté vážou do otevřeného póru kanálu [76]. Kanál NMDA receptoru ukrývá alosterické místo, které je antagonistům vystavené pouze při patologické aktivaci, jako například při nadměrné koncentraci agonistů. Unkompetitivní antagonisté se na tyto alosterická místa dokáží vázat a tím inhibovat NMDA receptor. Když je patologický stav odstraněn, zmizí i toto alosterická místa [77]. Tito antagonisté mají proto tendenci se hromadit v oblastech, ve kterých je koncentrace glutamátu nejvyšší (tzn, receptor má největší pravděpodobnost, že bude aktivován). Naproti tomu, nekompetitivní antagonisté se vážou na svá vazebná místa bez potřeby patologické aktivace a antagonizují NMDA receptory s konstantní účinností [74]. Ačkoli jsou unkompetitivní antagonisté strukturálně různorodé látky, všechny jsou nabitě kladně z důvodu vazebných míst v póru kanálu [76].

CNS-1102 (Cerestat) je vysokoafinitní unkompetitivní antagonist NMDA receptoru. Jeho výhodou je, že má oproti MK-801 o polovinu menší afinitu k vazebnému místu, a tak předpokládané vedlejší účinky by měly být menší. Stejně ale jako u ostatních vysokoafinitních nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů se při nižších dávkách projevily jeho sedativní účinky a ataxie, zatímco vyšší dávky byly spojeny s halucinacemi a paranoií [73].

Dextromethorphan je nízkoafinitní unkompetitivní antagonist NMDA receptoru. Roky se používal jako přípravek proti kašli [73]. Dávka 60 mg denně byla podávána pacientům, kteří byli ohrožováni mozkovou ischemií. Tato studie proběhla bez jakýchkoli nežádoucích, ale i žádoucích účinků. Předávkování vedlo k psychomimetickým účinkům a dysforii. Při dávkách až 120 mg / h vznikaly u zdravých dobrovolníků některé vedlejší účinky jako závratě, ataxie, nevolnost, zvracení či změny nálad. Negativní vedlejší účinky se projevily i v dalších studiích [74].

Memantin je také nízkoafinitní unkompetitivní antagonist NMDA receptoru [73]. Je to dimethyl derivát amantidinu. Používá se jako antiparkinsonikum a antispastikum v různých chronických neurologických onemocněních, včetně roztroušené sklerózy. Díky tomuto užívání máme značné zkušenosti s dlouhodobým perorálním podáváním, avšak je zde nedostatek placebem kontrolovaných studií a neexistují žádné zprávy o jeho účincích při krátkodobém podávání. Vedlejší účinky dlouhodobého orální podávání zahrnují závrať, neklid, a únavu. Dvojitě zaslepená studie u 88 pacientů s demencí po dobu 42 dnů našla funkční zlepšení při užívání 20 mg memantinu, kdy byl tento lék navíc dobře tolerován. Jednou-zaslepená studie 10 pacientů trpících demencí při denní dávce 20-30 mg memantinu nezjistila žádné významné zlepšení, u 2 z 10 pacientů vyvolal dokonce přechodné zhoršení [74].



Obr. 4: Chemická struktura memantinu. Upraveno podle [78].

Remacemid hydrochlorid se dlouhodobě perorálně používá jako antikonvulzivum. Remacemid hydrochlorid má sám o sobě malou afinitu k NMDA receptoru, ale jeho hlavní metabolit Remacemid desglycin (FPL 12495) je nízkoafinitní (unkompetitivní) antagonist NMDA receptoru. Remacemid hydrochlorid byl podáván zdravým dobrovolníkům v dávkách 150 mg v opakovaném perorálním podání každých 6 hodin po dobu 28 dnů. Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky byli závratě a gastrointestinální obtíže. Druhá fáze klinické studie s použitím orální dávky až do 400 mg každých 12 hodin probíhají u pacientů mrtvice a nemají dosud žádné konkrétní vedlejší účinky [74].

Extracelulární hořčík se chová jako unkompetitivní antagonist receptoru NMDA. Ve studiích se používal chlorid hořečnatý nebo síran hořečnatý a tyto látky se prokázaly jako neuroprotektivní a navíc levné a široce dostupné. Při podávání síranu hořečnatého infuzí v průběhu 24 hodin se neprojevily žádné negativní vedlejší účinky [74].

5.6.4. Antagonisté glycinového vazebného místa

Antagonisté glycinového vazebného místa se oproti antagonistům kompetitivním ukazují jako bezpečnější [73]. Avšak endogenní koncentrace glycinu je vysoká a vazebná místa jsou za normálních podmínek zcela nasycená. To představuje potencionální problém, protože pro funkční antagonismus je nutná extrémně vysoká synaptická koncentrace těchto látek [74]. Značná pozornost při klinických testech byla zaměřena na ACEA 1021 (5-nitro-6,7-dichlor-2,3-chinoxalin-dion, známý jako licostinel). ACEA 1021 se projevil jako neuroprotektivní na zvířecím modelu jak fokální, tak globální ischemie. Vykazoval minimální nepříznivé vedlejší účinky, avšak v moči pacientů v první fázi klinické studie byli objeveny krystaly této látky, jež by mohly být potenciálně škodlivé. Při kombinaci s probenecidem by však tento problém měl být odstraněn a studie ACEA-1021 tak bude pokračovat [73].

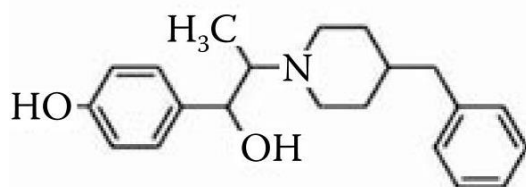
Další zkoumanou látkou byl GV150526, který se na zvířecích modelech mozkové ischemie projevil neuroprotektivně. Bohužel se neprojevilo žádné zlepšení při jeho podání lidským pacientům [73].

5.6.5. Modulátory polyaminového vazebného místa

Tyto modulátory se neváží v póru kanálu, ani ve vazebném místě pro agonisty, ale vážou N-terminální doménu specifické podjednotky NMDA receptoru. Mezi látky, které se váží

na polyaminové vazebné místo patří Ifenprodil a jeho deriváty. Tyto látky jsou tedy vysoce selektivní a váží se preferenčně na NMDA receptor obsahující GluN2B podjednotku, která je spojená se signalizací buněčné smrti. Modulátory této skupiny nemají 100 % účinnost inhibice. Tento farmakologický nedostatek by ale pro Ifenprodil mohl být velmi výhodný, kvůli požadované minimální aktivaci NMDA receptorů pro správnou funkci mozku. Navíc díky své vysoké specifitě neovlivní funkci NMDA receptorů obsahujících jiné, než GluN2B podjednotky (např. většinu NMDA receptorů mozečku) a jsou také maximálně efektivní při trvale aktivovaných NMDA receptorech v průběhu excitotoxicity. Ifenprodil a jeho deriváty se zatím ukázaly jako neuroprotektivní na hlodavčích a primátích modelech Parkinsonovy choroby a neprojeví se u nich závažné vedlejší účinky, jako je to u neselektivních antagonistů NMDA receptorů. Problém ale spočívá v ústním podávání. Nedávné studie však přichází s novými antagonisty NMDA receptorů obsahujícími GluN2B podjednotku, které strukturálně nesouvisí s Ifenprodilem, ale mohly by omezení překonat [76].

Mezi další podjednotkově specifické antagonisty patří Zn^{2+} , který se váže na NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotku [76].



Ifenprodil

Obr. 5: Chemická struktura Ifenprodilu. Upraveno podle [75].

6. Následné signální dráhy spojené s hypoxicko-ischemickým inzultem

NMDA receptory hrají primární roli v excitotoxicitě, která následuje po ischemické cévní mozkové příhodě. Některá farmakologická léčiva se proto zaměřila na zabránění excitotoxického uvolňování glutamátu v průběhu mozkové ischemie. Další antagonistizují kompetitivně či unkompetitivně NMDA receptory a některé inhibují NMDA receptory, které obsahují GluN2B podjednotku. Tyto sloučeniny se zaměřují na NMDA receptory na jejich receptorové úrovni, což vede ke krátkým časovým oknům pro účinné podávání léčiva. Léky,

kteře se tedy zaměřuji na excitotoxické uvolňování glutamátu nejsou účinné, jakmile se glutamát uvolní do ischemického mozku. A také léky, které antagonizují NMDA receptory nebo jiné excitotoxické receptory, jsou neúčinné, jakmile jsou tyto receptory a jejich signální proteiny spojené s buněčnou smrtí aktivovány. Navíc kromě proteinů signalizujících buněčnou smrt existuje celá řada jiných signálních proteinů, které jsou zodpovědné za normální neuronální funkce. Patří mezi ně signalizační proteiny s významnými úlohami v procesech učení a paměti, kognitivního zpracování, motivace a odměn, či přežití neuronů. Antagonisté NMDA receptorů proto obvykle vyvolávají nežádoucí účinky, jako jsou psychomimetické efekty, paměťové deficity, sedativní účinky nebo zhoršení iktu. V posledních deseti letech se řada studií pokusila odhalit proapoptické mechanismy a určit proteiny nitrobuněčné signální dráhy, které přispívají k excitotoxické neuronální smrti. Vývojem nových farmakoterapeutických přístupů, které budou inhibovat tyto následné signální dráhy, bude pravděpodobně možné překonat mnoho klinických omezení, které jsou pozorovány u běžných procedur, které se zaměřují na inhibici NMDA receptorů. Léky, které se zaměří na proteiny a signalizační dráhy spojené s buněčnou smrtí, jež jsou aktivovány několik hodin nebo dní po cévní mozkové příhodě, mohou zůstat pro iktus účinné, i když je léčba zpožděná. Přesný mechanismus následných signálních drah spojených s hypoxicko-ischemickým inzultem se prozatím zkoumá na plně vyvinuté nervové tkáni [1].

6.1. Akt a PTEN

Synaptické receptory NMDA, jež obsahují GluN2A podjednotky, podporují přežívání neuronů aktivováním proteinkinázy Akt [79]. Tato proteinkináza je aktivována fosforylací. Fosforylace může proběhnout odlišnými dráhami. Nejznámější cesta vede přes vazbu Akt na fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát (PIP3). PIP3 vzniká na plasmatické membráně z fosfatidylinositolu(4,5)-bisfosfátu (PIP2) za pomoci fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K) [80][81]. Akt se po aktivování přemístí do jádra, kde podporuje přežívání buněk [82]. Při mozkové ischemii fosfatáza PTEN defosforyluje PIP3 na PIP2 a přerušuje aktivitu Akt[83]. PTEN se také přímo naváže na C-terminální doménu podjednotky GluN1 NMDA receptoru, která zároveň obsahuje GluN2B podjednotku. Kromě toho se PTEN přemísťuje do jádra. Všechny tyto aktivity PTEN vedou k rozšíření excitotoxicity a k ukončení buněčného života [84][85]. Dále se také zjistilo, že jiná forma PIP2, fosfatidylinositol(3,4)-bisfosfát, je excitotoxická tím, že převádí

GluN2B podjednotku NMDA receptoru do synapsí. Defosforylace excitotoxického PIP2 do fosfatidylinositol monofosfátu (PIP) inositolovou fosfatázou INPP4A je neuroprotektivní [86].

6.2. CREB a BDNF

Synaptická činnost zprostředkovává neuronální přežívání prostřednictvím pozitivní zpětné vazby mezi CREB a BDNF. Synaptické receptory NMDA, které obsahují GluN2A podjednotku, podporují neuronální přežívání díky aktivování CRE vazebného proteinu (CREB). Fosforylovaný CREB se váže na CREB vazebný protein (CBP) a reguluje transkripci genů citlivých na CRE, mezi které patří neurotrofní faktor BDNF [87][88]. BDNF může po uvolnění z jádra aktivovat receptor Trk, který opět podporuje aktivaci CREB [89]. Během cerebrální ischemie stimulace extrasynaptických NMDA receptorů indukuje uzavření dráhy CREB, což vede k neuronální smrti [88].

6.3. DAPK1

Přiliv vápenatých iontů přes receptor NMDA v průběhu cerebrální ischemie indukuje aktivaci proteinkinázy DAPK1. DAPK1 je defosforylovaná kalcineurinem na serinu-308, což ji aktivuje. Aktivovaná DAPK1 se poté váže na c-terminální doménu GluN2B podjednotky NMDA receptoru, zvyšuje jeho aktivitu a tím podporuje excitotoxicitu. Kromě toho může být DAPK1 fosforylována kinázou ERK na serinu-735, čímž se zvedne její aktivita. Zvýšená aktivita DAPK1 pak vede k neuronální smrti [90].

6.4. PSD95 a nNOS

Při fyziologických podmínkách synaptické činnosti receptor NMDA aktivuje protein PSD95 a tím podporuje přežívání neuronů. Kromě toho je PSD95 chráněn před S-nitrosylací formováním disulfidických můstků. V průběhu mozkové ischemie tvoří NMDA receptor obsahující GluN2B podjednotku komplex s PSD95 a nNOS. Tento komplex signalizuje smrt a vede k produkci superoxidových aniontů (O_2^-) a oxidu dusnatého (NO^*). Tato produkce je závislá na vápenatých iontech, které získává díky NMDA receptorům [91][92]. Následná tvorba peroxynitritu ($ONOO^-$) z O_2^- a NO^* může vyvolat neuronální poškození prostřednictvím řady mechanismů [93]. Vlivem nedostatku kyslíku jsou také často rozbité disulfidické můstky. To využívá NO^* kongener, kation oxidu dusnatého (NO^+), který indukuje s-nitrosylaci proteinů na

volných cysteinových zbytcích. S-nitrosylace pak vede k aktivaci proteinů signalizujících smrt a inhibici proteinů, které podporují buněčné přežití [94][95].

6.5. Calpain

NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotku mohou vyvolat neuronální poškození aktivací proteázy calpain. Tato aktivace je opět závislá na přílivu vápníku z NMDA receptorů. Calpain poté zkracuje c-terminální doménu metabotropního glutamátového receptoru mGluR1. Tento receptor za běžných okolností aktivuje enhancer PIKE-L a tím podporuje přežívání neuronů. Avšak zkrácením C-terminální domény mGluR1 začne tento receptor signalizovat smrt [96][97]. Kromě toho calpain štěpí protein p35 na protein p25. p35 běžně podporuje přežívání neuronů pomocí kinázy cdk5, avšak poté, co je zkrácen na p25, indukuje přeměrování cdk5, což podporuje neuronální poškození [98]. A konečně, calpain také štěpí fosfatázu STEP61, která inhibuje smrtelnou signalizaci proteinu p38 z MAP kinázové rodiny do neaktivní formy STEP33 a tím přispívá k excitotoxicitě [99].

7. Způsoby neuroprotektce v perinatologii

Perinatální poškození mozku může mít celoživotní následky. Jeho příčinami mohou být například hypoxie, trombózy, krvácení, infekce nebo úrazy. Dlouhodobé následky závisí na stádiu těhotenství a na závažnosti a délce kritické události. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro perinatální poranění mozku je předčasný porod. Nicméně v absolutních číslech většinu postižených dětí představují novorozenci narození v řádném termínu [100].

Hlavní příčina hypoxicko-ischemického poškození je v perinatologii přisuzována těžkému porodu. Naproti tomu u dospělých lidí jsou jako hlavní příčiny uváděny trombózy, embolie či aneurysmata. U dospělých lidí se pro léčbu užívají trombolytika [101] či jiné léky [102], provádí se tromboektomie a další neurochirurgické zákroky [103], nebo se zavádí stenty [104]. Avšak léčebné postupy hypoxicko-ischemického poškození v perinatologii jsou omezené především v oblasti farmakoterapie.

Výzkum perinatální neuroprotektce se obvykle zaměřuje na výskyt mozkové obrny, jež je definována jako skupina trvalých poruch vývoje pohybu a držení těla, což způsobuje omezení činnosti, které jsou připisovány neprogresivním poruchám, ke kterým došlo ve vyvíjejícím se plodu nebo mozku kojence. Často je doprovázena poruchami smyslového

vnímání, percepce, kognice, komunikace a chování [105]. V 65 % případů je mozková obrna spojena s intraventrikulárním krvácením [106].

7.1. Strategie pro snížení dlouhodobého dopadu perinatálního poranění mozku

7.1.1. Síran hořečnatý

V 90. letech bylo prokázáno, že míra intraventrikulárního krvácení a mozkové obrny byla nižší u dětí, jejichž matky byly vystavené působení síranu hořečnatého [107]. Síran hořečnatý výrazně snižuje riziko mozkové obrny u dětí, při podání do 34. týdne těhotenství [108]. Jiné studie naznačují, že ačkoli neexistuje žádný významný účinek síranu hořečnatého na dětskou úmrtnost, došlo k výraznému snížení neurologického poranění [109]. Síran hořečnatý se musí používat s opatrností, jelikož u matky a dítěte hrozí nebezpečí kostních abnormalit a poruch v distribuci vápníku, fosforu a hořčíku [110].

7.1.2. Terapeutická hypotermie

Terapeutická hypotermie chrání neurony před sekundárním poškozením, než se metabolismus mozku vrátí do normálu po asfyktické události. Řada studií prokázala snížení úmrtnosti a/nebo zdravotních postižení spojených s terapeutickou hypotermií [111]. Hypotermie pomáhá zmírnit poškození nervové tkáně způsobené ischemií, a to hned v několika ohledech. Zmírňuje vazogenní edém, krvácení a infiltraci neutrofilů [112]. Snižuje uvolňování excitačních neurotransmiterů, což omezuje intracelulární akumulaci vápníku [113] [114]. Dále také omezuje produkci volných radikálů, chrání buňky během reperfuze, snižuje aktivace cytokinu a koagulační kaskády [115]. Tyto účinky mohou tedy snížit počet buněk, které by jinak musely podstoupit apoptózu.

Nejčastěji se provádí ochlazení dítěte na 33° C po dobu tří dnů od narození. Díky své jednoduchosti a účinnosti patří hypotermie mezi nejčastěji užívané terapie při perinatální ischemii [116]. Nicméně terapeutická hypotermie vyžaduje značné prostředky, které jsou obvykle k dispozici pouze v centrech terciární péče [122].

7.2. Strategie k zabránění perinatálního poranění mozku

Je nesporné, že objem krve cirkulující v těle novorozence je částečně závislý na tom, kdy je pupeční šňůra odstřižena [117]. Okamžité odstřížení pupeční šňůry bylo historicky

obhajováno s cílem usnadnit rychlou resuscitaci pro předčasně narozené děti, z důvodu usnadnění odběru plynů z pupečnickové krve a pro snížení mateřského krvácení [118]. Nicméně existuje i množství literatury podporující zpožděné podvázání pupeční šňůry, aby se zabránilo perinatálnímu poranění mozku, a to zejména mezi předčasně narozenými dětmi [100]. Zpožděné podvázání pupeční šňůry zahrnuje snížené riziko hypoperfuze a zlepšení dodávek kyslíku do mozku [119]. Kromě toho, pokračující transfuze červených krvinek může snížit riziko reperfuze a zajišťuje pro novorozence odpovídající srážecí faktory [120]. A konečně, pupečnickové kmenové buňky se zdají být neuroprotektivní, jak již bylo prokázáno na zvířecích modelech [121].

Mezi další strategie patří zamezení infekcím. Mateřské infekce jakéhokoliv druhu, především ale infekce plodových obalů (chorioamnionitidy), jsou spojeny s rozvojem mozkové obrny u dětí narozených v termínu a u dětí narozených předčasně [100]. Mechanismy fetálního poranění mozku v důsledku infekce jsou pravděpodobně spojené se zvýšenou mateřskou teplotou, uvolňováním cytokinů, volných radikálů a glutamátu, a cévním poškozením spojeným s infekcí [122]. Existují důkazy, že o poranění mozku při infekci rozhoduje fetální imunitní systém a zánětlivé reakce v plodu [123]. Léčba mateřské horečky, augmentace porodu pro pacienty a děti narozených v termínu s předčasně protrženou plodovou blánou a zamezení nadměrných cervikálních vyšetření poté, co praskla plodová blána, mohou být důležité strategie pro zabránění perinatálního poranění mozku [100].

Vzhledem k vysoké korelaci perinatálního poškození mozku a nedonošenosti každá strategie, která snižuje předčasně narození, také snižuje výskyt perinatálního poškození mozku. Bohužel, schopnost předvídat nebo zabránit předčasnému porodu je velmi omezená. Zlepšení nastalo v prevenci u žen, které již aspoň jednou prodělaly předčasný porod a u žen, kterým byl diagnostikován krátký děložní krček. Mezi některými vysoce rizikovými ženami se pro prevenci předčasného porodu prokázalo jako výhodné podávání progesteronu [100].

7.3. Nové strategie

7.3.1. Nespotřebovaná pupečnicková krev

Lidská pupečnicková krev je bohatá na pluripotentní buněčné druhy, jako například mezenchymální kmenové buňky, které mají vysoký regenerační potenciál v mnoha typech tkání, včetně nervové tkáně. Nespotřebovaná pupečnicková krev má již po desetiletí využití

jako zdroj kmenových buněk k léčbě celé řady onemocnění jako jsou hematologické zděděné anemie či hematologické malignity [124]. Několik studií na hlodavčím modelu ukazují, že kmenové buňky získané z pupečnickové krve mohou mít terapeutický potenciál pro hypoxicko-ischemickou encefalopatii [125].

7.3.2. Využití erythropoetinu

Erythropoetin (EPO) je hematopoetický cytokin, který má neuroregenerativní, angiogenní a protizánětlivé účinky v mozku. Několik zvířecích studií prokázalo přibližně 40% až 50% zlepšení u hlodavců vystavených HI podmínkám a následnou reakcí s EPO [126].

Další studie, která byla již prováděna na dětech, ukázala významné zlepšení na elektroencefalogramu po užití EPO u HI postižených novorozenců, kdy navíc došlo ke snížení koncentrací oxidu dusnatého po 2 týdnech života. Po 6 měsících se u EPO ošetřených dětí zlepšily neurologické a vývojové výsledky [127].

7.3.3. Experimentální farmaka

I přes rozsáhlé variace léků, které jsou zkoumané a používány u dospělých lidí, v perinatologii jsou tyto potenciální farmaka méně prostudována. Jeden z důvodů jsou etické problémy případných klinických testů, které omezují použití léčiv. Jednou z podmínek je také podmínka minimální toxicity a výskytu nežádoucích účinků, kterou u valné většiny léčiv nelze dosáhnout. Perinatologové mají tedy omezené možnosti farmakoterapie [130]. Jako příslib do budoucna se ale jeví použití neurosteroidů, jež mozek významně ovlivňují a zároveň se v něm běžně vyskytují. Neuroaktivní steroid 3 β -pregnanolon glutamát (PG) je antagonistou receptoru NMDA. Pro svoji činnost vyžaduje, aby byl receptor aktivován. PG byl zkoumán na modelu fokální mozkové ischemie potkaního mláděte v PND 12. Výsledky této studie poukazují na neuroprotektivní potenciál PG, který by mohl sloužit při vývoji terapeutických strategií pro poškození mozkové tkáně vyvolané excitotoxicitou [29].

8. Závěr

Cerebrální ischemie vede k masivnímu uvolňování glutamátu, který stimuluje NMDA receptor a indukuje příliv vápníku přes tyto ionotropní receptory. Bezprostředně za receptory jsou vápníkem aktivované proteiny, které signalizují smrt. Tyto proteiny spouští nepřeborné množství signálních kaskád, které pracují synergicky k vyvolání neuronální smrti.

Blokáda receptoru NMDA je upřednostňovanou neuroprotektivní strategií v studiích hypoxicko-ischemického poškození. Unkompetitivní antagonisté jsou farmakologicky atraktivní, protože by mohly být soustředěny v ischemických oblastech, kde je patologická aktivace glutamátových receptorů největší. Nízkoafinitní antagonisté jsou pak díky své vazebné kinetice vhodné pro dlouhodobé podávání. Hlavní nevýhodou antagonistů NMDA receptorů jsou ale jejich vedlejší účinky, včetně dysfunkcí neurologických procesů. Znakem obvyklého antagonismu NMDA receptorů je tvorba psychomimetických vedlejších účinků, které jsou jednou z hlavních příčin klinického selhání. Blokátory NMDA receptorů mají také krátké terapeutické okénko pro podávání léků a jsou účinné pouze při podání před nebo bezprostředně po iktu. Kvůli těmto důvodům nebyl žádný z léků, který funguje jako antagonist NMDA receptorů, schválen pro léčbu ischemie.

Mezi neúspěšnější zkoumané látky však patří selektivní modulátory NMDA receptorů obsahujících GluN2B podjednotku a to kvůli proapoptickým drahám, které tato podjednotka váže. Zároveň NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotku zůstávají plně aktivní pro své běžné funkce. Tyto modulátory proto nemají velké neurologické nežádoucí účinky [128]. Mezi tyto látky patří například ifenprodil a jeho deriváty eliprodil a traxoprodil. U traxoprodilu nebyly prokázány žádné neurologické vedlejší účinky a jeho účinnost na ischemii byla potvrzena během druhé fáze studie. Třetí fáze klinické studie tohoto léku probíhají v současné době [129]. Nicméně i NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotku mají důležité fyziologické funkce, například reakce na stres nebo učení a paměť. Proto se předpokládá, že i tyto modulátory by mohly mít klinická omezení.

V posledních letech se řada studií zaměřila na mechanismus následných signálních drah, které vedou k buněčné smrti po hypoxicko-ischemickém poškození mozku. Léčba, která by inhibovala tyto následné signální dráhy, by pravděpodobně měla výrazně nižší počet klinických omezení, než postupy, které se zaměřují na blokádu NMDA receptorů. Kromě toho

léky, které by se zaměřovaly na signální dráhy spojené s buněčnou smrtí či proteiny, jež běžně nemají žádné fyziologické funkce, by neměly mít negativní vedlejší účinky.

Mezi nejčastěji užívané terapie při perinatální ischemii patří hypotermie. Terapeutická hypotermie je úspěšná, přičemž je také bezpečná a má minimální vedlejší účinky. Nicméně tato metoda pouze zmírňuje dopady ischemického poškození. Potenciální léky se pak v perinatologii zkoumají minimálně, a to především kvůli přísným nárokům na jejich toxicitu. Jako vhodné se ale do budoucna jeví neurosteroidy. Problematiku neurosteroidů bych chtěl rozpracovat během magisterského studia na katedře fyziologie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy.

9. Seznam literatury

- [1] Lai, T. W., Zhang, S. & Wang, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188 (2014).
- [2] Graham, E. M., Ruis, K. A., Hartman, A. L., Northington, F. J. & Fox, H. E. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 587–595 (2008).
- [3] Prins, M. L. & Hovda, D. A. Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J. Neurotrauma* 20, 123–137 (2003).
- [4] Eriksson, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317 (1998).
- [5] Rajkowska, G. & Miguel-Hidalgo, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6, 219–233 (2007).
- [6] Roessmann, U. & Gambetti, P. Astrocytes in the developing human brain. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 70, 308–313 (1986).
- [7] Bautch, V. L. & James, J. M. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr* 3, 199–204 (2009).
- [8] Huttenlocher, P. R. & Dabholkar, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178 (1997).
- [9] Andersen, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27, 3–18 (2003).
- [10] Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106-107, 1–16 (2013).
- [11] From, R. et al. Oligodendrogenesis and myelinogenesis during postnatal development effect of glatiramer acetate. *Glia* 62, 649–665 (2014).
- [12] Hartline, D. K. What is myelin? *Neuron Glia Biol.* 4, 153–163 (2008).
- [13] Giedd, J. N. et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat. Neurosci.* 2, 861–863 (1999).
- [14] Butt, A. M., Jones, H. C. & Abbott, N. J. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol. (Lond.)* 429, 47–62 (1990).
- [15] Saunders, N. R., Liddelow, S. A. & Dziegielewska, K. M. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol* 3, 46 (2012).
- [16] Neurotransmitter Receptors, Transporters, and Ion Channels. rnd systems a biotechne brand (2015). at <<https://www.rndsystems.com/research-area/neurotransmitter-receptors--transporters--and-ion-channels>>

- [17] Sánchez Fernández, I. & Loddenkemper, T. Subunit composition of neurotransmitter receptors in the immature and in the epileptic brain. *Biomed Res Int* 2014, 301950 (2014).
- [18] Barks, J. D. E. Technical aspects of starting a neonatal cooling program. *Clin Perinatol* 35, 765–775, vii (2008).
- [19] Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. & Zukin, R. S. Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci. Lett.* 144, 65–69 (1992).
- [20] Talos, D. M. et al. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. *J. Comp. Neurol.* 497, 42–60 (2006).
- [21] Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739 (2002).
- [22] Dunning, D. D., Hoover, C. L., Soltesz, I., Smith, M. A. & O’Dowd, D. K. GABA(A) receptor-mediated miniature postsynaptic currents and alpha-subunit expression in developing cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 82, 3286–3297 (1999).
- [23] Paul, S. M. & Purdy, R. H. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6, 2311–2322 (1992).
- [24] Mellon, S. H. & Griffin, L. D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 35–43 (2002).
- [25] Vyklícký, V. et al. Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Sci Rep* 5, 10935 (2015).
- [26] Parížek, A. et al. Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 395–403 (2005).
- [27] Reddy, D. S. Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol* 15, 197–234 (2003).
- [28] Kancheva, R. et al. Relationships of circulating pregnanolone isomers and their polar conjugates to the status of sex, menstrual cycle, and pregnancy. *J. Endocrinol.* 195, 67–78 (2007).
- [29] Kleteckova, L., Tsenov, G., Kubova, H., Stuchlik, A. & Vales, K. Neuroprotective effect of the 3 α 5 β -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neurosci. Lett.* 564, 11–15 (2014).
- [30] Bacigaluppi, M., Comi, G. & Hermann, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol J* 4, 34–38 (2010).
- [31] Carmichael, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2, 396–409 (2005).
- [32] Vannucci, R. C. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J. Neurosci. Res.* 55, 158–163 (1999).

- [33] Yager, J. Y. & Thornhill, J. A. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 167–174 (1997).
- [34] Qiu, L. et al. Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 785–794 (2007).
- [35] Zhu, C. et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 12, 162–176 (2005)
- [36] Perlman, J. M. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 117, S28–33 (2006).
- [37] Lai, M.-C. & Yang, S.-N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 609813 (2011).
- [38] Johnston, M. V., Trescher, W. H., Ishida, A. & Nakajima, W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr. Res.* 49, 735–741 (2001).
- [39] Penrice, J. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain during acute hypoxia-ischemia and delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr. Res.* 41, 795–802 (1997).
- [40] McQuillen, P. S. & Ferriero, D. M. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr. Neurol.* 30, 227–235 (2004).
- [41] Jantzie, L. L., Cheung, P.-Y., Johnson, S. T., Bigam, D. L. & Todd, K. G. Cerebral amino acid profiles after hypoxia-reoxygenation and N-acetylcysteine treatment in the newborn piglet. *Neonatology* 97, 195–203 (2010).
- [42] Hirose, K. & Chan, P. H. Blockade of glutamate excitotoxicity and its clinical applications. *Neurochem. Res.* 18, 479–483 (1993).
- [43] Gilland, E., Puka-Sundvall, M., Hillered, L. & Hagberg, H. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 297–304 (1998).
- [44] Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, C. I. & Xiaoyang Wang, null. Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria. *J. Child Neurol.* 24, 1141–1146 (2009).
- [45] Northington, F. J., Ferriero, D. M., Graham, E. M., Traystman, R. J. & Martin, L. J. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 8, 207–219 (2001).
- [46] Dawson, L. A., Djali, S., Gonzales, C., Vinegra, M. A. & Zaleska, M. M. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res. Bull.* 53, 767–776 (2000).
- [47] Buchan, A. M. & Pulsinelli, W. A. Septo-hippocampal deafferentation protects CA1 neurons against ischemic injury. *Brain Res.* 512, 7–14 (1990).

- [48] Berdichevsky, E., Riveros, N., Sánchez-Armáas, S. & Orrego, F. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 36, 75–80 (1983).
- [49] Olney, J. W., Rhee, V. & Ho, O. L. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.* 77, 507–512 (1974).
- [50] Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* 58, 293–297 (1985).
- [51] Bano, D. et al. Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275–285 (2005).
- [52] Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. & Meldrum, B. S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226, 850–852 (1984).
- [53] Suh, S. W. et al. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann. Neurol.* 64, 654–663 (2008).
- [54] Woodruff, T. M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6, 11 (2011).
- [55] Lactic Acidosis: Background, Etiology, Epidemiology. (2015). at <<http://emedicine.medscape.com/article/167027-overview>>
- [56] Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L. & Tator, C. H. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* 13, 2085–2104 (1993).
- [57] Moriyoshi, K. et al. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31–37 (1991).
- [58] Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. & Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438, 185–192 (2005).
- [59] Li, F. & Tsien, J. Z. Memory and the NMDA receptors. *N. Engl. J. Med.* 361, 302–303 (2009).
- [60] Kleteckova, L. L. A neuroprotective effect of 3 α 5 β -pregnanolon glutamate in the animal model of ischemic brain injury. (Charles University, 2012).
- [61] Ishii, T. et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268, 2836–2843 (1993).
- [62] Liu, Y. et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 27, 2846–2857 (2007).
- [63] Wong, H.-K. et al. Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 450, 303–317 (2002).
- [64] Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618–1623 (1994).

- [65] Yan, G. M., Ni, B., Weller, M., Wood, K. A. & Paul, S. M. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 656, 43–51 (1994).
- [66] Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N. H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369–1374 (1984).
- [67] Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. & Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5, 405–414 (2002).
- [68] Sun, L. et al. Chronic ketamine exposure induces permanent impairment of brain functions in adolescent cynomolgus monkeys. *Addict Biol* 19, 185–194 (2014).
- [69] Choi, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18, 58–60 (1995).
- [70] Goldberg, M. P. & Choi, D. W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* 13, 3510–3524 (1993).
- [71] Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61 (1999).
- [72] Witkin, J. M., Kaminski, R. & Rogawski, M. A. in *Glutamate and Addiction* (eds. Herman, B. H. et al.) 23–49 (Humana Press, 2002). at http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-306-4_2
- [73] Santokh, G. & Pulido, Olga. *Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS.* (Springer Science & Business Media, 2007).
- [74] Muir, K. W. & Lees, K. R. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503–513 (1995).
- [75] Monaghan, D. T. & Jane, D. E. in *Biology of the NMDA Receptor* (ed. Van Dongen, A. M.) (CRC Press, 2009). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5282/>
- [76] Paoletti, P. & Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39–47 (2007).
- [77] Lipton, S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 803–808 (2007).
- [78] Chen, H.-S. V. & Lipton, S. A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611–1626 (2006).
- [79] Lafon-Cazal, M., Perez, V., Bockaert, J. & Marin, P. Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *European Journal of Neuroscience* 16, 575–583 (2002).

- [80] Klippel, A., Kavanaugh, W. M., Pot, D. & Williams, L. T. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17, 338–344 (1997).
- [81] Endo, H., Nito, C., Kamada, H., Nishi, T. & Chan, P. H. Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1479–1489 (2006).
- [82] Pekarsky, Y. et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3028–3033 (2000).
- [83] Stambolic, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39 (1998).
- [84] Ning, K. et al. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J. Neurosci.* 24, 4052–4060 (2004).
- [85] Zhang, S. et al. Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *J. Neurosci.* 33, 7997–8008 (2013).
- [86] Sasaki, J. et al. The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature* 465, 497–501 (2010).
- [87] Hardingham, G. E., Arnold, F. J. & Bading, H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat. Neurosci.* 4, 261–267 (2001).
- [88] Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. & Bading, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5, 405–414 (2002).
- [89] Jiang, X. et al. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 94, 713–722 (2005).
- [90] Tu, W. et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140, 222–234 (2010).
- [91] Sattler, R. et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284, 1845–1848 (1999).
- [92] Zhou, L. et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat. Med.* 16, 1439–1443 (2010).
- [93] Xia, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Snyder, S. H. & Zweier, J. L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6770–6774 (1996).
- [94] Takahashi, H. et al. Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. *Neuron* 53, 53–64 (2007).

- [95] Manabe, S.-I., Gu, Z. & Lipton, S. A. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 4747–4753 (2005).
- [96] Rong, R. et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat. Neurosci.* 6, 1153–1161 (2003).
- [97] Xu, W. et al. Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron* 53, 399–412 (2007).
- [98] Lee, M. S. et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360–364 (2000).
- [99] Xu, J. et al. Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J. Neurosci.* 29, 9330–9343 (2009).
- [100] Salmeen, K. E., Jelin, A. C. & Thiet, M.-P. Perinatal neuroprotection. *F1000Prime Rep* 6, 6 (2014).
- [101] Deb, P., Sharma, S. & Hassan, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 17, 197–218 (2010).
- [102] Lees, K. R. et al. NXY-059 for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 354, 588–600 (2006).
- [103] Sardar, P. et al. Endovascular therapy for acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur. Heart J.* (2015). doi:10.1093/eurheartj/ehv270
- [104] Derdeyn, C. P. & Chimowitz, M. I. Angioplasty and stenting for atherosclerotic intracranial stenosis: rationale for a randomized clinical trial. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 17, 355–363, viii–ix (2007).
- [105] Rosenbaum, P. et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 109, 8–14 (2007).
- [106] Crowley, P. A. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 322–335 (1995).
- [107] Kuban, K. C. et al. Maternal toxemia is associated with reduced incidence of germinal matrix hemorrhage in premature babies. *J. Child Neurol.* 7, 70–76 (1992).
- [108] Conde-Agudelo, A. & Romero, R. Antenatal magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy in preterm infants less than 34 weeks' gestation: a systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 595–609 (2009).
- [109] Doyle, L. W., Crowther, C. A., Middleton, P., Marret, S. & Rouse, D. Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev* CD004661 (2009). doi:10.1002/14651858.CD004661.pub3
- [110] Wedig, K. E., Kogan, J., Schorry, E. K. & Whitsett, J. A. Skeletal demineralization and fractures caused by fetal magnesium toxicity. *J Perinatol* 26, 371–374 (2006).

- [111] Jacobs, S. E. et al. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med* 165, 692–700 (2011).
- [112] Smith, S. L. & Hall, E. D. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J. Neurotrauma* 13, 1–9 (1996).
- [113] Busto, R. et al. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20, 904–910 (1989).
- [114] Thoresen, M. et al. Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. *Neuroreport* 8, 3359–3362 (1997).
- [115] Globus, M. Y., Alonso, O., Dietrich, W. D., Busto, R. & Ginsberg, M. D. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J. Neurochem.* 65, 1704–1711 (1995).
- [116] Robertson, N. J. et al. Therapeutic hypothermia for birth asphyxia in low-resource settings: a pilot randomised controlled trial. *The Lancet* 372, 801–803 (2008).
- [117] Yao, A. C. & Lind, J. Blood flow in the umbilical vessels during the third stage of labor. *Biol. Neonate* 25, 186–193 (1974).
- [118] McCAUSLAND, A. M., Holmes, F. & Schumann, W. R. Management of cord and placental blood and its effect upon the newborn. Part II. *West J Surg Obstet Gynecol* 58, 591–608 (1950).
- [119] Baenziger, O. et al. The influence of the timing of cord clamping on postnatal cerebral oxygenation in preterm neonates: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 119, 455–459 (2007).
- [120] Bonnar, J., McNicol, G. P. & Douglas, A. S. The blood coagulation and fibrinolytic systems in the newborn and the mother at birth. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 78, 355–360 (1971).
- [121] Park, D.-H. et al. Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia. *Cell Transplant* 18, 985–998 (2009).
- [122] Kasdorf, E. & Perlman, J. M. Hyperthermia, inflammation, and perinatal brain injury. *Pediatr. Neurol.* 49, 8–14 (2013).
- [123] Romero, R. et al. Hematologic profile of the fetus with systemic inflammatory response syndrome. *J Perinat Med* 40, 19–32 (2011).
- [124] Gluckman, E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev.* 25, 255–259 (2011).
- [125] Pimentel-Coelho, P. M. et al. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev.* 19, 351–358 (2010).
- [126] Kumral, A. et al. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol. Neonate* 83, 224–228 (2003).

- [127] Elmahdy, H. et al. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 125, e1135–1142 (2010).
- [128] Blanchet, P. J. et al. Differing effects of N-methyl-D-aspartate receptor subtype selective antagonists on dyskinesias in levodopa-treated 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1034–1040 (1999).
- [129] Yurkewicz, L., Weaver, J., Bullock, M. R. & Marshall, L. F. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 22, 1428–1443 (2005).
- [130] European Medicines Agency. Guideline on the investigation of Medicinal Products in the term and preterm Neonate, London, (2007).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003754.pdf