

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 2016

## 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, 12. 5. 2016

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 jejíchž 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 vyústí 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 (protein kinase B)  |
| AMPA                         | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) |
| ATP                          | adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)   |
| BDNF                         | neurotrofní faktor pocházející z mozku (brain-derived neurotrophic factor)   |
| CNS                          | centrální nervový systém (central nervous systém)  |
| CREB                         | CRE vazebný protein (cAMP response element-binding protein)  |
| DAPK1                        | smrt-asociovaná protein kináza 1 (death-associated protein kinase 1)   |
| DNA                          | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)   |
| EEG                          | elektroencefalogram (electroencephalography)   |
| EPO                          | Erythropoetin (Erythropoietin)   |
| ERK                          | extracelulárním signálem regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)                                     |
| GABA                         | $\gamma$ -amino máselná kyselina ( $\gamma$ -aminobutyric acid)  |
| HI                           | hypoxicko-ischemické (hypoxic-ischemic)  |
| INPP4A                       | inositol polyfosfát fosfatáza 4A (inositol polyphosphate phosphatase 4A)   |
| KA                           | kyselina kainová (kainic acid)   |
| KCC2                         | draselno-chloridový kotransportér 2 (potassium-chloride cotransporter 2)   |
| MK-801                       | dizocilpin (dizocilpine)   |
| NCX                          | sodno-vápenatý přenašeč (sodium-calcium exchanger)   |
| NKCC1                        | sodno-draselno-chloridový kotransportér 1 (sodium-potassium-chloride cotransporter 1)                                  |
| NMDA                         | <i>N</i> -methyl-D-aspartát ( <i>N</i> -methyl-D-aspartate)  |
| NO <sup>•</sup>              | oxid dusnatý (nitric oxide)  |
| NOS                          | syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)  |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | superoxid (superoxide)   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| P3 $\beta$ 5 $\alpha$  | 3 $\beta$ 5 $\alpha$ pregnanolon (isopregnanolon)   |
| P3 $\alpha$ 5 $\alpha$ | 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ pregnanolon (allopregnanolon)   |
| P3 $\alpha$ 5 $\beta$  | 3 $\alpha$ 5 $\beta$ pregnanolon (pregnanolon)  |
| P3 $\beta$ 5 $\beta$   | 3 $\beta$ 5 $\beta$ pregnanolon (epipregnanolon)  |
| PCP                    | fencyklidin (phencyclidine)   |
| PG                     | 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát (3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamate)            |
| PIKE-L                 | transkripční stimulátor fosfoinositidu 3 kinázy L (long form of phosphoinositide 3 kinase enhancer) |
| PIP                    | fosfatidylinositol monofosfátu (phosphatidylinositol monophosphate)                                 |
| PIP <sub>2e</sub>      | fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate)                            |
| PIP <sub>3</sub>       | fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)                       |
| PND                    | postnatální den (postnatal day)   |
| PNS                    | periferní nervový systém (peripheral nervous system)  |
| PSD95                  | protein postsynaptické hustoty 95 (postsynaptic density protein 95)                                 |
| PTEN                   | fosfatáza a tenzní homolog (phosphatase and tensin homolog)   |
| RNS                    | reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)  |
| ROS                    | reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)   |
| STEP                   | striatální obohacená tyrosin fosfatáza (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 .....  | 5  |
| 3. Hypoxicko-ischemické experimentální modely .....   | 7  |
| 3.1. Modely fokální mozkové ischemie.....   | 7  |
| 3.2. Modely globální mozkové ischemie .....   | 7  |
| 3.3. Hypoxicko-ischemické modely raných vývojových stádií .....                                     | 7  |
| 4. Hypoxicko-ischemická poškození u raných vývojových stádií.....                                   | 9  |
| 4.1. Neuropatologie hypoxicko-ischemického poškození .....  | 9  |
| 4.1.1. Excitotoxicita .....   | 10 |
| 4.1.2. Oxidační stres .....   | 11 |
| 4.1.3. Laktátová acidóza .....  | 11 |
| 4.1.4. Protizánětlivé reakce spojené s hypoxicko-ischemickým poškozením.....                        | 12 |
| 4.1.5. Dysfunkce hematoencefalické bariéry .....  | 12 |
| 5. NMDA receptory.....  | 13 |
| 5.1. Struktura NMDA receptoru .....   | 13 |
| 5.2. Aktivace NMDA receptoru.....   | 13 |
| 5.3. NMDA receptory během vývoje .....  | 14 |
| 5.4. Klíčová úloha NMDA receptoru v excitotoxicitě.....   | 14 |
| 5.5. Duální role NMDA receptoru .....   | 15 |
| 5.6. NMDA antagonismus .....  | 15 |
| 5.6.1. Kompetitivní antagonisté .....   | 16 |
| 5.6.2. Nekompetitivní antagonisté .....   | 17 |
| 5.6.3. Unkompetitivní antagonisté .....   | 18 |
| 5.6.4. Antagonisté glycinového vazebného místa .....  | 20 |
| 5.6.5. Modulátory polyaminového vazebného místa .....   | 20 |
| 6. Následné signální dráhy spojené s hypoxicko-ischemickým inzultem .....                           | 21 |
| 6.1. Akt a PTEN .....   | 21 |
| 6.2. CREB a BDNF .....  | 22 |
| 6.3. DAPK1 .....  | 22 |
| 6.4. PSD95 a nNOS .....   | 22 |
| 6.5. Calpain.....   | 23 |
| 7. Způsoby neuroprotektce v perinatologii.....  | 24 |
| 7.1. Strategie pro snížení dlouhodobého dopadu perinatálního poranění mozku .....                   | 24 |
| 7.1.1. Síran hořečnatý .....  | 24 |
| 7.1.2. Terapeutická hypotermie .....  | 24 |



|        |  |    |
|--------|--|----|
| 7.2.   | Strategie k zabránění perinatálního poranění mozku ..... | 25 |
| 7.3.   | Nové strategie .....                                     | 26 |
| 7.3.1. | Nespotřebovaná pupečnicková krev .....                   | 26 |
| 7.3.2. | Využití erythropoetinu .....                             | 26 |
| 7.3.3. | Experimentální farmaka .....                             | 26 |
| 8.     | Závěr.....   | 27 |
| 9.     | Seznam literatury.....                                   | 28 |

## 1. Úvod

Mozek je ve srovnání s jinými tkáněmi a orgány zvláště náchylný k hypoxicko-ischemickému poškození. Zatímco ve většině tkáních působí ischemie bezprostřední škody, přechodná doba mozkové ischemie může způsobit rozsáhlé poškození neuronů. Toto poškození se projeví nejen krátce po iktu, ale pokračuje postupně po celé měsíce. Jedno z vysvětlení pro zvláštní citlivost mozku na ischemické poškození jsou vysoké energetické potřeby, jež tato tkáň potřebuje. Avšak významná je rovněž přítomnost hlavního excitačního neurotransmiteru glutamátu. Tento důležitý neuropřenašeč je za fyziologického stavu esenciální pro život. Nicméně při hypoxicko-ischemickém inzultu způsobuje díky jeho excitotoxickému potenciálu patologické změny v ischemické tkáni.

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. V perinatologii je navíc situace značně komplikovaná. Perinatologové mají omezené možnosti farmakoterapie a ve většině případů 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 nepřijatelné.

Smyslem této práce bylo vytvořit rešerši o mechanismech hypoxicko-ischemického poškození v raném postnatálním období, přičemž důraz je kladen na glutamatergní 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

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, gliogeneze, synaptogeneze, myelinogeneze, tvorba hematoencefalické bariéry a změny na poli neurotransmiterových receptorů či změny v koncentracích neurosteroidů. Časový průběh jednotlivých neurovývojových procesů je znázorněn na Obr. 1. Klíčové neurovývojové procesy jsou pak shrnuty v Tab. 1.

### 2.1. Neurogeneze, gliogeneze, synaptogeneze, myelinogeneze a tvorba hematoencefalické bariéry

Neurogeneze je proces, při kterém se tvoří neurony z neuronálních kmenových buněk a progenitorových buněk, a je nejaktivnější při prenatálním vývoji. Kortikální neurogeneze pak může pokračovat až do 2 let [1]. Nicméně neurogeneze probíhá také v dospělém mozku, jako například v gyrus dentatus hipokampu nebo v subventrikulární zóně [2].

Gliogeneze je proces, při kterém se tvoří gliové buňky z multipotentních nervových kmenových buněk. Během procesu vznikají astrocyty, oligodendrocyty, ependymální buňky, mikroglie, Schwannovy buňky, satelitní buňky a další specializované buňky. Gliogeneze probíhá po celou dobu postnatálního vývoje [3]. Vrchol gliogeneze je v době, kdy vrcholí růst cév, dendritů a tvorba synapsí. To naznačuje, že mezi gliemi, cévním a synaptickým růstem vzniká spolupráce, která zajišťuje vhodné gliovo-cévní a gliovo-neuronální interakce [4\*].

Synaptogeneze je tvorba synapsí mezi neurony v nervové soustavě. Tento děj probíhá po celou dobu života, avšak vrchol synaptogeneze probíhá v raném vývoji, a to především během takzvané nevázané synaptogeneze mezi 3. až 15. měsícem [5]. 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. Tyto synaptické změny se vyskytují bez jakékoli významné ztráty neuronů, a pravděpodobně odráží zjemnění a zrání nervových obvodů během dětství a časného dospívání [4\*].

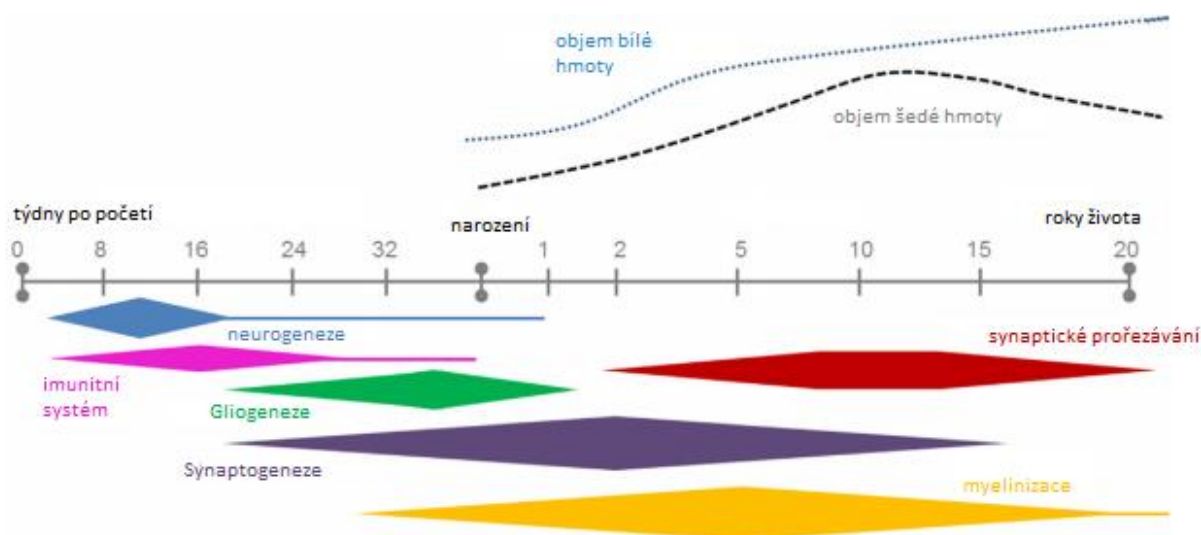
Myelinogeneze, neboli tvorba myelinových obalů, probíhá téměř v celém nervovém systému. Tyto obaly se tvoří kolem většiny axonů v lidském těle. Tvorba myelinového obalu je nezbytná pro vysokou rychlost nervového přenosu v savčím mozku. Myelin má funkci dielektrického materiálu. Za produkci myelinového obalu jsou zodpovědné oligodendrocyty a Schwannovy buňky. Oligodendrocyty jsou makroglie, jež se nachází v šedé i bílé hmotě CNS

---

\* hvězdička za číslem citace značí přehledové články

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, galaktocerebrosid a sfingomyelin. Mezi proteiny tvořící myelin patří myelinový bazický protein, proteolipidový protein a myelinový oligodendrocytový glykoprotein. Místo, kde je myelinový obal přerušen, se nazývá Ranvierův zářez. 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 [6\*]. Myelinogeneze začíná v embryu, ale vrcholu dosahuje v dětství a nadále pokračuje do třetí dekády života [7].

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. Pro její správnou funkci jsou nezbytné také 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 [8][9\*]. 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 přes epiteliální buňky. Tato endoplazmatická retikula pravděpodobně přispívají k vyšší koncentraci proteinů pocházejících z plazmy, jež se nacházejí v mozkomíšním moku novorozenců [9\*][10].



**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 [4\*].

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

**Tab. 1** Shrnutí klíčových neurovývojových procesů u srovnatelných věkových kategorií lidí a hlodavců (PND - postnatální dny). Upraveno podle [4\*].

## 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 aktivitu iontových kanálů, což může mít za následek změnu membránového potenciálu [11]. Podjednotkové složení neurotransmitterových receptorů ve vyvíjejícím se mozku podporuje excitaci, která převládá nad inhibicí, což usnadňuje rozvoj mozkových obvodů [12\*].

V  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátových (AMPA) receptorech se díky snížené expresi GluA2 podjednotky, zvyšuje propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Když je zvýšený poměr non-GluA2 / GluA2, zvyšuje se i propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$ , a ten podporuje hyperexcitabilitu. 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 [12\*].

Moje práce se z velké části zabývá *N*-methyl-D-aspartátovými (NMDA) receptory a jejich vlivem na postnatální ischemii. Z důvodu přehlednosti práce popíši vývoj NMDA receptorů v samostatné kapitole.

Vývojové změny se také týkají receptorů  $\gamma$ -amino máselné kyseliny (GABA) a transportérů chloridů. Ve vyvíjejících se neuronech je koncentrace  $\text{Cl}^-$  vyšší v intracelulárním prostoru oproti prostoru extracelulárnímu. Děje se tak díky rozdílné funkci GABA receptorů spojených s chloridovým kanálem během vývoje. Ve vyvíjejícím se neuronu probíhá export  $\text{Cl}^-$  a depolarizace (excitace), naopak v plně vyvinutém neuronu probíhá import  $\text{Cl}^-$  a hyperpolarizace (inhibice). Chloridové transportéry NKCC1 a KCC2 pak regulují koncentraci  $\text{Cl}^-$  v buňce. NKCC1, jež hromadí  $\text{Cl}^-$  v buňce, je hlavní chloridový transportér v nezralém neuronu a jeho exprese se snižuje v průběhu času. KCC2, který transportuje  $\text{Cl}^-$  ven z buňky, je v nezralém neuronu méně početný, ale jeho exprese se časem naopak zvyšuje. Důležité mohou být také změny v subjednotkovém složení GABA receptorů, kdy například  $\alpha 1$  podjednotka receptoru GABA je vývojově regulována a exprimována v nízkých hladinách v nezralém mozku [12\*].

## 2.3. Neurosteroidy

Jednou z možností modulace NMDA a GABA receptorů v mozku je působení neurosteroidů. Neurosteroidy jsou endogenní steroidy syntetizované v mozku, které rychle

mění dráždivost neuronů 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 [13\*]. Neurosteroidy jsou syntetizovány z cholesterolu a dalších steroidních molekul transportovaných krví do mozku. Primárně celá kaskáda začíná syntézou pregnenolonu, 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 [14\*]. Významnou úlohu hrají také během těhotenství a při nástupu porodu [15].

Jedním z klíčových endogenních neurosteroidů je pregnanolon ( $3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -pregnan-20-on), který je syntetizovaný z progesteronu. Je to pozitivní alosterický modulátor  $GABA_A$  receptorů [16]. Známé jsou pak především 4 pregnanolonové izomery: allopregnanolon ( $P3\alpha5\alpha$ ); isopregnanolon ( $P3\beta5\alpha$ ); pregnanolon ( $P3\alpha5\beta$ ); epipregnanolon ( $P3\beta5\beta$ ). 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).  $3\beta$  izomery pregnanolonu kompetují s  $3\alpha$  izomery pregnanolonu o vazebná místa na  $GABA_A$  receptorech. Přičemž inhibiční účinnost  $P3\beta5\alpha$  pro  $GABA_A$  receptor je srovnatelná s  $GABA_A$  receptorovou aktivační účinností  $P3\alpha5\alpha$ . Tyto neurosteroidy významně ovlivňují těhotenství. Například klesající tvorba  $P3\alpha5\beta$  se může podílet na zahájení porodu, díky jeho schopnosti potlačit aktivitu buněk produkujících oxytocin.  $P3\alpha5\alpha$  pak působí aktivačně na NMDA receptor v hypotalamu a vyvolává produkci oxytocinu [17].

Přirozeně se vyskytující pregnanolon sulfát je alosterický modulátor NMDA receptorů. Preferenčně inhibuje use-dependentním mechanismem aktivované NMDA receptory. Výsledky studií zabývající se pregnanolon sulfátem poskytují jedinečnou příležitost pro vývoj nových terapeutických neurosteroidů k léčbě nemocí spojených s dysfunkcí glutamátového systému [18].

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 [19].

### 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, především potkani a myši. Tato zvířata jsou vhodná pro studium ischemické cévní mozkové příhody. Jejich fyziologické funkce 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. Modely pro studium patofyziologických důsledků ischemické cévní mozkové příhody lze rozdělit na modely fokální a globální.

#### 3.1. Modely fokální mozkové ischemie

Fokální ischemie je charakterizována snížením 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 arterie (velká cévní okluze), okluze distální střední mozkové arterie (malá cévní okluze), trombotická okluze prostřednictvím injekce krevních sraženin či trombinu do střední mozkové arterie či fototrombóza po intravenózní injekci bengálské červeně [20\*].

#### 3.2. Modely globální mozkové ischemie

Globální ischemie je charakterizována snížením průtoku krve v celém mozku. Animální modely globální mozkové ischemie se nejčastěji používají ke studiu poškození mozku, které se vyskytuje v souvislosti s poruchou oběhové soustavy. Mezi tyto techniky patří metoda okluze čtyř cév, zahrnující okluze společných karotid a vertebrálních tepen, nebo okluze obou společných karotid spolu s indukcí hypotenze po omezenou dobu [20\*].

#### 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. Inzult 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% přídavkem kyslíku. Mláďata potkanů jsou takto schopné přežít 3 nebo více hodin. Pro tyto studie se často používá potkan ve stáří 7. postnatálního dne (PND), 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 [21\*].

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 endotelinu-1 do dorzálního hipokampu. Infuze endotelinu-1 vede ke glutamátové excitotoxicitě, následované rozvojem ischemických lézí a ischemii vyvolaných záchvatů [19].

## 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 [22]. Studie HI poškození v myším mozku poukazují na to, že regenerační reakce na HI inzult je paradoxní. Neurogeneze je po HI inzultu snížena v mladším mozku (PND 9) a zvýšena v PND 21. Avšak při neexistenci poškození je hipokampální neurogeneze podle očekávání několikrát vyšší v PND 9, ve srovnání s mozky při PND 21 [23].

Kromě toho je nezralá mozková tkáň podstatně odolnější vůči hypoxii a nedostatku ATP. Důvodem je pravděpodobně to, že má nižší hustotu axonů a dendritů, a obsahuje větší procento extracelulárního prostoru. Získání podobné velikosti poškození si mezi věkovými skupinami vyžaduje různou dobu trvání HI inzultu. Kromě toho, mechanismy poškození se mezi nezralým a dospělým mozkiem výrazně liší [24].

### 4.1. Neuropatologie hypoxicko-ischemického poškození

HI poškození nastává, když je do mozkové tkáně dodáváno menší množství kyslíku a glukózy, než jaké tato tkáň potřebuje. Snížené množství těchto pro mozek nepostradatelných látek dále způsobuje primární selhání energetického metabolismu [25\*]. Díky nízkým hladinám kyslíku se postupně snižuje produkce oxidativní fosforylace [26]. Energetický metabolismus buňky se poté mění z aerobního na anaerobní a dochází k vyčerpání zásob ATP. Anaerobní metabolismus vede ke shromažďování kyseliny mléčné a asociovaného  $H^+$  [27\*]. Původ sekundárního selhání energie je pravděpodobně multifaktoriální a je spojen s dlouhodobě zvýšenou koncentrací excitačního glutamátu, poškozením způsobeným reaktivními formami kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), imunocytotoxickou reakcí a snížením cerebrálního průtoku krve a zásobením kyslíkem v důsledku progresivního otoku mozku. Sekundární selhání energie nastupuje v závislosti na povaze poranění mezi 8 až 12 hodinami po počátečním inzultu [28].

Ztráta buněčné homeostáze vede k intracelulární akumulaci vápníku, sodíku, vody, a poté k membránové depolarizaci a k uvolňování excitačních neurotransmiterů způsobujících excitotoxicko-oxidativní kaskádu. [27\*].

Nadměrné hodnoty synaptického glutamátu společně s membránovou depolarizací otevírají NMDA receptory, které spouští excitotoxickou kaskádu. Otevřené NMDA receptory pak přivádějí do buňky  $Ca^{2+}$ . Významné je také následné uvolňování  $Ca^{2+}$  z vnitrobuněčných zásob.  $Ca^{2+}$  influx vede k aktivaci  $Ca^{2+}$  citlivých enzymů jako je neuronová NO syntáza (NOS).

NOS následně přispívá k oxidačnímu stresu, jež poškozuje mitochondrie. Z narušených mitochondrií je poté uvolňován cytochrom c, který aktivuje kaspázy, a také apoptózu indukující faktor, který kondenzuje chromatin a navozuje apoptózu. Cytosolový  $Ca^{2+}$  také aktivuje lipázy, proteázy a nukleázy, které degradují buněčné lipidy, proteiny a DNA. Následně dochází k takzvanému reperfučnímu poškození, kdy se se opět zprůchodní cévní řečiště a okolní tkáň zasáhnou nashromážděné ROS a RNS, čímž se ještě zvýší objem postižené tkáně [25\*].

Velmi těžké HI inzulty mohou způsobit selhání mitochondrií, což vede k rychlé destrukci buněčných membrán a nakonec k nekróze. Méně závažné inzulty mohou vyvolat kaskádu excitotoxicity a oxidačního stresu, která způsobí zpožděnou buněčnou smrt, především apoptózu. Kaskáda může trvat dny až týdny v závislosti na druhu, povaze a závažnosti počátečního inzultu a také na zasažené oblasti mozku. V perinatálním mozku jsou neurony ohrožené zejména excitotoxicitou, oxidačním stresem a následnou apoptózou [29\*].

#### 4.1.1. Excitotoxicita

Excitotoxicita je hlavní patologický proces HI poškození. Tento pojem vznikl na základě excitačních aminokyselin, které jsou excitotoxické. Excitotoxicita se dostala do středu zájmu především kvůli užívání glutamátu sodného v potravinářství, kde se zjišťovala bezpečnostní rizika potravin obsahujících tuto látku. Záhy se však ukázalo, že excitotoxicita je primární mechanismus poškození neuronů, které vzniká v důsledku cerebrální ischemie. Tento patologický proces může také přispět k dalším neurodegenerativním onemocněním, jako je například Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba nebo amyotrofni laterální skleróza. Pokud tedy předejdeme excitotoxicitě, zabráníme tím poškození, jež vzniká jako následek cerebrální ischemie [30\*].

Prvním krokem k excitotoxicitě je nadměrné uvolňování glutamátu z neuronů a glií, díky kterému dochází k jeho extracelulární akumulaci v ischemické oblasti mozku [31]. Mechanismus, kterým je glutamát uvolňován, je multifaktoriální a závisí na závažnosti ischemie. Glutamát a jiné analogické excitační aminokyseliny vděčí za svůj neurotoxicitý účinek schopnosti zvyšovat přísun vápníku do buňky. Mezi glutamátové analogy, které nejúčinněji zvyšují přísun vápníku, patří kyselina ibotenová či *N*-methyl-D-aspartát. Nadměrně aktivované NMDA receptory poté zvyšují koncentraci vápníku v buňce, díky čemuž se aktivují signální dráhy, které vedou k buněčné smrti [32]. Pojem excitotoxicita zavedl doktor John Olney, který dále uvádí, že glutamátové analogy, které napodobují jeho excitační a toxické účinky na neurony CNS, mohou vyvolat neurotoxicitu podle společného mechanismu [33].

Neuronální smrt, která je pozorována 24 hodin po nadměrné aplikaci glutamátu (či jeho analogu), je tak výrazně snížena odstraněním extracelulárního vápníku. Pokud naopak zvýšíme koncentraci extracelulárního vápníku, dochází k zvýšené úmrtnosti neuronů [34]. A konečně, látky, které snižují uvolňování glutamátu nebo antagonizují glutamátové receptory, mají neuroprotektivní účinky [31].

#### 4.1.2. Oxidační stres

Oxidační stres a apoptóza jsou v patofyziologii HI 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. ROS a RNS mohou reagovat s DNA, proteiny či lipidy, což způsobuje poškození buňky. Volné radikály, které jsou zapojené do ischemického poškození mozku, zahrnují např. superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) či oxid dusnatý ( $NO^{\cdot}$ ). Jejich škodlivé účinky lze omezit nebo jim zabránit pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů [35\*].

Primárním zdrojem ROS je během ischemie mitochondriální transportní řetězec. Mitochondrie produkují  $O_2^{\cdot-}$  během oxidativní fosforylace za patofyziologických podmínek [36]. Dalším důležitým zdrojem ROS je metabolismus kyseliny arachidonové [37].

$NO^{\cdot}$  (RNS) je endogenně syntetizován z L-argininu pomocí enzymu NOS. Neuronální izofoma NO syntázy (nNOS) vyžaduje pro svou aktivaci vápník [38]. Další izoformy jsou indukovatelná NO syntáza (iNOS) a endoteliální NO syntáza (eNOS). iNOS exprimují zánětlivé buňky a je aktivována nezávisle na vápníku [39]. eNOS je produkována v endotelu a má vazodilatační funkci [40]. Mozek během ischemie poškozuje především nNOS a iNOS. Aktivace NMDA a AMPA receptorů přispívá k produkci  $NO^{\cdot}$ , který poté hraje důležitou roli v excitotoxickém poškození [41].  $NO^{\cdot}$  se šíří přes membrány a může reagovat s  $O_2^{\cdot-}$  za vzniku peroxynitritu ( $ONOO^{\cdot-}$ ) [42]. Nadměrná koncentrace ROS a RNS pak může vést k apoptóze. K největšímu poškození dochází při reperfuzi, kdy se nahromaděné ROS a RNS najednou vyplaví a negativně působí na okolní tkáň [43][44][45][46].

#### 4.1.3. Laktátová acidóza

Jeden z nejdůležitějších zdrojů energie lidského těla je sacharid glukóza. Při metabolickém zpracování glukózy vzniká ATP, které se při buněčné práci hydrolyzuje, čímž se uvolní energie, vzniká ADP,  $P_i$  a také proton ( $H^+$ ). Mitochondrie tyto protony při dostatku kyslíku začleňuje zpět do ATP, čímž zabraňuje hromadění  $H^+$  a udržuje neutrální pH [47].

Při nedostatku kyslíku nemohou mitochondrie produkovat dostatečné množství ATP, jež buňka potřebuje. V této situaci se zvyšuje glykolýza, při které vzniká přebytek pyruvátu, ale

také potřebné ATP. Přebytek pyruvátu se poté převádí na laktát, 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 hydrolýze ATP. Koncentrace  $H^+$  proto stoupá a způsobuje acidózu [47]. Laktátová acidóza má škodlivé účinky na cévní autoregulaci a přispívá k excitotoxicitě [48][49].

#### 4.1.4. Protizánětlivé reakce spojené s hypoxicko-ischemickým poškozením

Astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie a neurony mohou v reakci na ischemii produkovat protizánětlivé mediátory. Tyto buňky aktivují transkripční faktory, čímž zvyšují expresi zánětlivých cytokinů, chemokinů a endotelových buněčných adhezních molekul. Rozhodující úlohu v zánětu mozkové tkáně mají mikroglie, které během ischemie produkují četné prozánětlivé cytokiny, toxické metabolity a enzymy. Vzhledem k ničivému i ochrannému charakteru mikroglíí (a astrocytů) se celková úloha glií může po ischemii lišit v různých časových bodech.

Také leukocyty hrají roli v patogenezi HI 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 [35\*].

#### 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 [35\*].

## 5. NMDA receptory

NMDA receptor je specifický druh ionotropního glutamátového receptoru nacházející se v nervových buňkách. NMDA receptor je pojmenován po jeho agonistovi, molekule NMDA, která se k němu selektivně váže. NMDA receptor je velmi důležitý pro řízení synaptické plasticity a má významnou paměťovou funkci.

### 5.1. Struktura NMDA receptoru

NMDA receptory jsou heterotetramery, které se skládají ze 7 podjednotek. Konkrétně to jsou podjednotky GluN1, GluN2A-D a GluN3A-B. Pro každou podjednotku existuje samostatný gen, avšak z genu pro podjednotku GluN1 vzniká alternativním sestřihem 8 různých izoform. Expresi funkčních rekombinantních NMDA receptorů v savčích buňkách vyžaduje současnou expresi alespoň jedné GluN1 podjednotky a jedné GluN2 podjednotky. Nejčastěji se můžeme setkat s NMDA receptory, které obsahují dvě GluN1 a dvě GluN2 podjednotky stejných nebo různých podtypů. Buňky mohou také exprimovat GluN3 podjednotku, která pak nahradí jednu ze dvou GluN2 podjednotek. Všechny podjednotky NMDA receptoru mají společnou topologii. N-konec proteinu se nachází na extracelulární straně a C-konec směřuje do cytoplasmy. V membráně jsou integrované 3 transmembránové domény TM1, TM3 a TM4. Doména M2 se pohybuje na intracelulární straně a vytváří iontově selektivní pór kanálu receptoru. Extracelulární část podjednotek NMDA receptorů se skládá ze dvou oblastí. První z nich je N-koncová doména, která u GluN2A a GluN2B podjednotky obsahuje vazebná místa pro alosterické inhibitory, jako je  $Zn^{2+}$  či ifenprodil. Druhá doména zahrnuje oblast pre-TM1 a TM3-TM4 smyčku a obsahuje agonistická vazebná místa [50\*][51\*].

### 5.2. Aktivace NMDA receptoru

Aktivace NMDA receptoru vyžaduje současné navázání dvou koagonistů - glutamátu a glycinu (nebo D-serinu). Glycin se váže na agonistickou vazebnou doménu v GluN1 a GluN3 podjednotkách, zatímco glutamát v GluN2 podjednotkách. Aktivace receptoru NMDA vyžaduje obsazení dvou nezávislých glycinových a dvou nezávislých glutamátových vazebných míst najednou. Pro aktivaci je také nutná depolarizace membrány, na které se receptor nachází. Při klidovém membránovém potenciálu je totiž iontový kanál receptoru blokován ionty  $Mg^{2+}$ . Při depolarizaci však tyto ionty disociují, což umožní iontům  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  vtok do buňky a iontům  $K^+$  ven z buňky. Na povrchu receptoru se pak nacházejí ještě další

vazebná místa pro jiné ligandy, jako jsou například polyaminy, neurosteroidy,  $Zn^{2+}$ ,  $H^+$  a další [50\*][51\*].

### 5.3. NMDA receptory během vývoje

Jednotlivé oblasti mozku obsahují různé subpopulace NMDA receptorů v závislosti na jejich podjednotkovém složení. Během vývoje mozku se navíc toto podjednotkové složení NMDA receptorů mění. Zatímco GluN1 podjednotka NMDA receptoru je distribuována v celém mozku v průběhu celého vývoje, podjednotky GluN2A-D jsou exprimovány specificky. GluN2A podjednotka je široce exprimována až v postnatálním mozku. GluN2B podjednotka se nachází v celém embryonálním mozku, ale v postnatálním mozku je jeho exprese omezena na přední mozek. GluN2C podjednotka se objevuje stejně jako GluN2A až po narození, a to převážně v mozečku. A podjednotka GluN2D je hojně exprimována v diencephalu a mozkovém kmeni u embryonálních i novorozeneckých stádií vývoje mozku [52]. Rozdílně jsou distribuovány podjednotky NMDA receptorů také v synapsích a extrasynapticky. Kortikální a hippokampální neurony v novorozeneckém předním mozku obsahují receptory NMDA s GluN2B podjednotkou jak v synapsích, tak v extrasynaptických místech, avšak kortikální neurony v dospělém mozku obsahují především zvýšené synaptické populace receptorů NMDA s GluN2A podjednotkou [53][54]. Podjednotkové složení NMDA receptoru se navíc může měnit i při odpovědi na fyziologické podněty [55]. U potkaního modelu nezralého mozku jsou GluN2B-D a GluN3A podjednotky nadměrně exprimovány. Zvýšený poměr non-GluN2A / GluN2A, podporuje hyperexcitabilitu [12\*].

### 5.4. Klíčová úloha NMDA receptoru v excitotoxicitě

NMDA receptor je v mozkové tkáni důležitý pro rozvoj neuronů a udržování buněk při životě. Je významný v běžném vývoji, ale i v ischemické mozkové tkáni. Jak Haringham a kol. prokázali, jednotlivé subpopulace NMDA receptorů, mají odlišný vliv na přežívání neuronů [56]. NMDA receptory jsou významné také v excitotoxicitě zprostředkované vápníkovými ionty [57]. Vtok  $Ca^{2+}$  do buňky přes NMDA receptory může mít odlišný účinek na genovou expresi [58]. Jedna z klíčových rolí NMDA receptoru je ta, že se jedná o zdroj vápníku, který signalizuje buněčnou smrt. To vede k teorii, podle které jsou vápníkem aktivované proapoptické proteiny úzce spojené s NMDA receptorem [57]. 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 [59].

### 5.5. Duální role NMDA receptoru

V závislosti na úrovni aktivity receptorů NMDA, mohou některé subpopulace těchto receptorů podporovat neuronální smrt nebo přežití. Zatímco stimulace NMDA receptoru nízkou dávkou excitačních aminokyselin, jako jsou glutamát či NMDA, podporuje přežívání neuronů v kulturách granulárních neuronů mozečku. Stimulace vysokou dávkou excitačních aminokyselin vyvolává neuronální smrt [60]. Tyto protichůdné funkce jsou zprostředkované odlišnými mechanismy následných signálních drah jednotlivých subpopulací NMDA receptorů [61].

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 mají antiapoptickou aktivitu a mohou podporovat přežití neuronů. Naproti tomu stimulace extrasynaptických NMDA receptorů, která probíhá, když je příliš mnoho glutamátu v ischemické oblasti mozkové tkáně, způsobuje buněčnou smrt [56][62].

Rozdílná funkce synaptických a extrasynaptických NMDA receptorů může být částečně vysvětlena odlišným podjednotkovým složením těchto receptorů. NMDA receptory obsahující GluN2A podjednotky se vyskytují častěji na synapsích a NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotky jsou naproti tomu lokalizované spíše extrasynapticky [63]. Selektivní antagonisté NMDA receptorů obsahujících GluN2B podjednotku jsou pak vysoce neuroprotektivní v modelech mozkové ischemie. A na rozdíl od toho, selektivní antagonisté NMDA receptorů obsahujících GluN2A podjednotku zhoršují neuronální poškození a činí neurony náchylnější k ischemickému poškození [64].

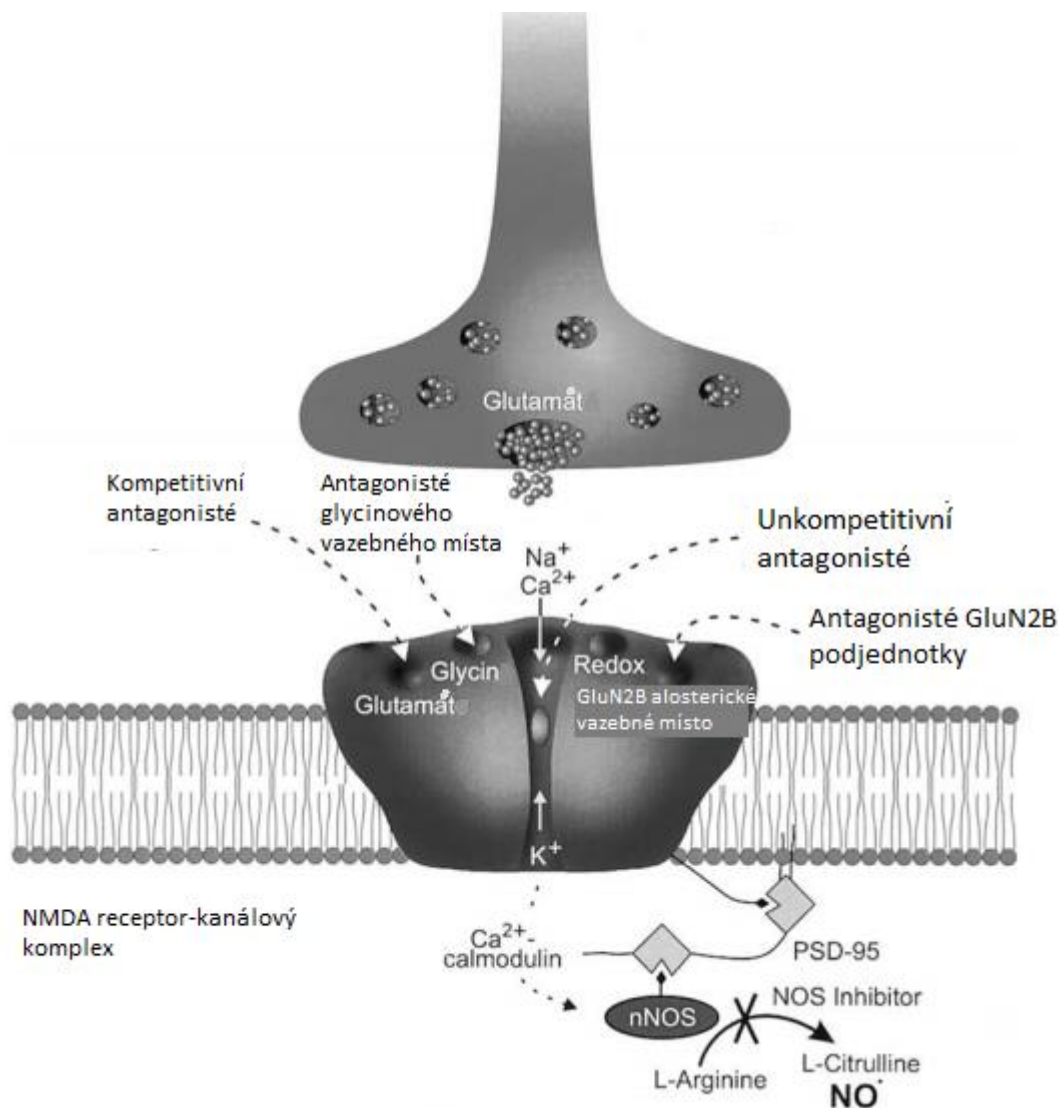
### 5.6. NMDA antagonismus

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, jsou pro své disociativní, halucinogenní a euforizační vlastnosti rozšířené rekreační drogy [65]. Rozhodující úloha NMDA receptoru v patogenezi cerebrální ischemie naznačuje, že antagonisté NMDA receptorů mohou být neuroprotektivní [66]. Přímý antagonismus NMDA receptoru se dokonce zdá být



dostatečně neuroprotektivní proti ischemickému poškození ve srovnání s antagonismem různých excitotoxických receptorů a zdrojů vápníku [67].

Z hlediska schopnosti a místa navázání lze antagonisty dělit na kompetitivní, nekompetitivní, unkompetitivní a antagonisty glycinového vazebného místa. Vazebná místa a regulační domény NMDA receptoru jsou znázorněny na Obr. 2. Jednotlivé skupiny se liší také svými vlivy na chování jedince a nežádoucími vedlejšími účinky. Antagonisté NMDA receptorů byly primárně zkoumány na plně vyvinuté nervové tkáni.



**Obr. 2** Schématické znázornění některých vazebných a regulačních domén NMDA receptoru. Upraveno podle [68].

### 5.6.1. Kompetitivní antagonisté

Kompetitivní antagonisté se váží na glutamátové vazebné místo NMDA receptoru. První známí kompetitivní antagonisté NMDA receptoru neprocházely hematoencefalickou bariérou, a to je činilo nevhodnými pro klinické využití. Proto se upřednostnily antagonisté,

kteře byly více lipofilní a mohly touto bariérou procházet. Kompetitivní antagonisté však nejsou velmi účinní, jelikož kompetitují o vazebné místo s glutamátem, jehož extracelulární hladina je zvýšena pouze přechodně při ischemickém poškození [69\*]. Mezi sloučeniny, které prochází hematoencefalickou bariérou, patří 3-(2-karboxypiperazin-4-yl)propyl-1-fosfonová kyselina (CPP) a jeho derivát d-CPPen. Tyto sloučeniny však měly závažné vedlejší účinky [70].

CGS19755 (Selfotel) byl intenzivně zkoumán u lidí. Při všech studiích se ale signifikantně projevíly jeho nežádoucí vedlejší účinky, jako jsou halucinace, paranoie, poruchy vědomí, pocit omámení či zvracení [71][72]. 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 [71].

### 5.6.2. Nekompetitivní antagonisté

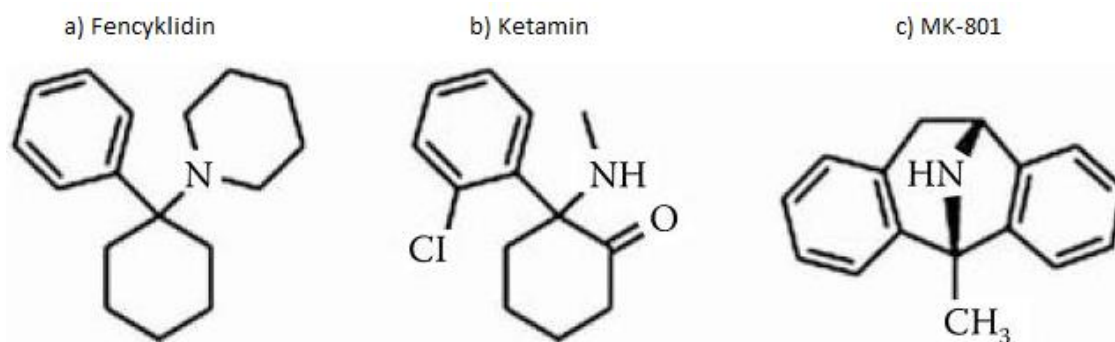
Nekompetitivní antagonisté se přednostně vážou do otevřeného póru kanálu NMDA receptoru. Jestli má vazba proběhnout, musí být také depolarizována membrána, aby pór kanálu opustil  $Mg^{2+}$  [73\*]. Nekompetitivní antagonisté procházejí účinně přes hematoencefalickou bariéru. První nekompetitivní antagonisté se vážaly do póru s vysokou afinitou, proto jejich disociace trvala dlouho a bránily tak běžným funkcím NMDA receptorů [69\*]. Proto se dnešní studie často zaměřují na nízkoafinitní antagonisty, které disociují rychleji, a tudíž by neměly mít tak závažné vedlejší účinky [73\*].

Fencyklidin (PCP) je nekompetitivní vysokoafinitní antagonist NMDA receptoru. Byl to vůbec první syntetizovaný antagonist NMDA receptoru vytvořený v roce 1950 jako anestetikum [74]. Následně bylo PCP použito zejména v psychiatrickém výzkumu jako farmakologický model schizofrenie [75] a je také zneužíván jako droga [76]. Jeho chemická struktura je znázorněna na Obr. 3a. Užívání PCP navozuje stav silné analgezie a halucinace [74]. Dávka 10 mg PCP poskytovala pacientům úlevu od bolesti a vyvolávala stav euforie, 20 mg byla adekvátní dávka jako anestetikum pro chirurgické zákroky. Po anestézii ale pacienti trpěli psychotickými reakcemi, cítili se výrazně neklidní a občas měli násilnické chování doprovázené halucinacemi a paranoidními reakcemi [77]. Změny v EEG pacientů, kteří užívali derivát PCP, ukazují disociaci mezi thalamo-neokortikálním a limbickým systémem, což vedlo k vytvoření termínu "disociativní anestetika" pro PCP a jiné nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů [78 cit. podle 79].

Ketamin je nekompetitivní a nízkoafinitní antagonist NMDA receptoru. Je to analog PCP s totožnými klinickými účinky, které jsou pouze kratší. Je široce používaný jako anestetikum a v některých případech jako analgetikum. V případě jeho využití jako anestetika

se podává souběžně s benzodiazepiny, které snižují jeho kardiovaskulární vedlejší účinky a přispívají k obnově normálních fyziologických funkcí po bezvědomí [79][80]. Jeho chemická struktura je znázorněna na Obr. 3b.

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 navozoval schizofrenii podobné chování [81][82]. Chemické struktury dizocilpinu si můžete povšimnout na Obr. 3c.



**Obr. 3** Chemické struktury a) fencyklidin, b) ketamin, c) MK-801. Upraveno podle [83].

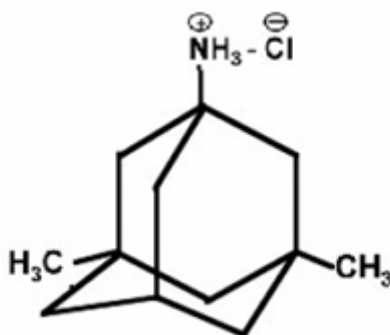
### 5.6.3. Unkompetitivní antagonisté

Unkompetitivní antagonisté se stejně jako nekompetitivní antagonisté vážou do otevřeného póru kanálu [50\*]. 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 tato alosterická místa [84\*]. 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 [73\*]. Ačkoli jsou unkompetitivní antagonisté strukturálně různorodé látky, všechny jsou nabitě kladně z důvodu vazebných míst v póru kanálu [50\*].

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 by předpokládané vedlejší účinky měly být menší. Stejně ale jako u ostatních vysokoafinitních nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů se při nižších dávkách projeví jeho sedativní účinky a ataxie, zatímco vyšší dávky byly spojeny s halucinacemi a paranoií [85].

Dextromethorphan je nízkoafinitní unkompetitivní antagonist NMDA receptoru. Roky se používal jako přípravek proti kašli. Dávka 60 mg čtyřikrát denně byla podávána pacientům, kteří byli ohrožováni mozkovou ischemií. Tato studie proběhla bez jakýchkoliv významných účinků [86]. Předávkování vedlo k podobným halucinogenním stavům, jaké nastávají po užití psilocybinu [87]. Při dávkách 60 až 260 mg·h<sup>-1</sup> (s následnou udržovací infuzí po dobu 11 nebo 23 hodin) vznikaly u zdravých dobrovolníků některé vedlejší účinky jako neklid, ospalost, závratě, hypotenze, nevolnost či zvracení [88].

Memantin je také nízkoafinitní unkompetitivní antagonist NMDA receptoru [89]. Je to dimethyl derivát amantidinu. Chemická struktura memantinu je znázorněná na Obr. 4. Používá se jako antiparkinsonikum a antispastikum v různých chronických neurologických onemocněních, včetně roztroušené sklerózy. Při dlouhodobém orálním podávání se projevují vedlejší účinky, mezi které patří neklid, závrat', a únava [73\*]. Jeho neuroprotektivní účinky byly prokázány na myším modelu fokální cerebrální ischemie. Memantin se dnes jeví jako slibný ochranný prostředek proti ischemické cévní mozkové příhodě [90].



**Obr. 4** Chemická struktura memantinu. Upraveno podle [91].

Mezi další nízkoafinitní unkompetitivní antagonisty NMDA receptoru patří Remacemid hydrochlorid a jeho hlavní aktivní metabolit desglycinyl. Remacemid se dlouhodobě perorálně používá jako antikonvulzivum [92]. Jeho neuroprotektivní účinky byly potvrzeny na kočičím modelu fokální cerebrální ischemie [93]. Bezpečnost Remacemidu byla zkoumána u pacientů s ischemickou cévní mozkovou příhodou. V této dvojitě zaslepené a placebem kontrolované studii se prokázalo, že maximální tolerovaná dávka je 400 mg dvakrát denně. Nejčastěji hlášené vedlejší účinky byly gastrointestinální obtíže a zvracení [94].

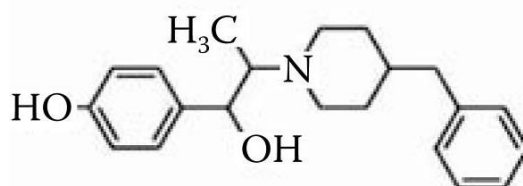
#### 5.6.4. Antagonisté glycinového vazebného místa

Antagonisté glycinového vazebného místa se oproti antagonistům kompetitivním ukazují jako bezpečnější. Avšak endogenní koncentrace glycinu je vysoká a vazebná místa jsou za normálních podmínek zcela nasycená. To představuje potenciální problém, protože pro funkční antagonismus je nutná extrémně vysoká synaptická koncentrace těchto látek [73\*]. Značná pozornost při klinických testech byla zaměřena na ACEA-1021 (5-nitro-6,7-dichlor-1,4-dihydro-2,3-quinoxalindion). ACEA-1021 se projevil jako neuroprotektivní na potkaním modelu fokální ischemie, kde vykazoval minimální nepříznivé vedlejší účinky [95].

Další zkoumanou látkou byl například GV150526, který se na animálním modelu mozkové ischemie projevil neuroprotektivně [96].

#### 5.6.5. Modulátory polyaminového vazebného místa

Tyto modulátory vážou N-koncovou doménu specifické podjednotky NMDA receptoru. Mezi látky, které se vážou na polyaminové vazebné místo patří ifenprodil a jeho deriváty [97]. Chemická struktura ifenprodilu je znázorněna na Obr. 5. Tyto látky jsou vysoce selektivní a vážou 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 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 a jsou také maximálně efektivní při trvale aktivovaných NMDA receptorech v průběhu excitotoxicity [98][99]. Ifenprodil a jeho deriváty se ukázaly jako neuroprotektivní na potkaních modelech Parkinsnovy choroby a neprojevily se u nich závažné vedlejší účinky [100].



**Obr. 5** Chemická struktura ifenprodilu. Upraveno podle [83].

## 6. Následné signální dráhy spojené s hypoxicko-ischemickým inzultem

NMDA receptor má klíčovou fyziologickou funkci v CNS, a tak jeho přímá inhibice může způsobit závažné vedlejší účinky [101]. Studium inhibitorů NMDA receptorů odhalilo vedlejší účinky, jako jsou psychomimetické efekty, neuronální vakuolizace, hypertenze, kardiotoxicita [102]. A i když se některá farmaka jeví slibně v preklinických studiích, selhávají ve studiích klinických. Mezi nejvýznamnější důvody patří kromě vedlejších účinků také relativně krátké terapeutické časové okno pro účinné podávání léčiva. Jakmile jsou NMDA receptory a jejich signální proteiny spojené s buněčnou smrtí aktivovány, farmaka, jež antagonizují tyto receptory, se stanou neúčinná. To platí i o lécích, které inhibují nadměrné uvolňování glutamátu. Tyto léky jsou neúčinné, jakmile se glutamát uvolní do ischemického mozku. Další důvod selhávání těchto farmak je ten, že animální modely cerebrální ischemie nedokážou zcela napodobit lidské HI poškození. Klinické studie pak kladou také důraz na behaviorální posuzování léčby, což u animálních modelů není zcela možné [103\*]. V posledním desetiletí výzkum HI poškození ukázal odlišné subpopulace NMDA receptorů a zejména několik následných signálních drah těchto receptorů, které podporují přežívání neuronů nebo naopak přispívají k excitotoxické neuronální smrti. Vývojem nových farmakoterapeutických přístupů, které budou inhibovat tyto proapoptické následné signální dráhy, bude pravděpodobně možné odstranit mnoho vedlejších účinků, které jsou pozorovány u procedur, jež se zaměřují na inhibici NMDA receptorů. Léky, které se zaměří na proteiny a signální dráhy spojené s buněčnou smrtí, jež jsou aktivovány několik hodin nebo dní po iktu, mohou navíc zůstat účinné i při opožděné léčbě. Přesný mechanismus následných signálních drah spojených s HI inzultem se prozatím zkoumá na plně vyvinuté nervové tkáni [104\*].

### 6.1. Akt a PTEN

NMDA receptory mohou aktivovat proteinkinázu Akt [105]. Akt se po aktivování přemístí do jádra, kde podporuje přežívání buněk. [106]. Během mozkové ischemie, proteinfosfatáza PTEN (fosfatáza a tenzín homolog) defosforyluje fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP<sub>3</sub>). Tato defosforylace vede ke snížené aktivitě proteinkinázy Akt. PTEN fyzicky asociuje s C-koncovou doménou podjednotky GluN1 NMDA receptoru, obsahujícího rovněž GluN2B podjednotku [107][108]. Při neuronálním ischemickém poškození se PTEN navíc translokuje do jádra, což přispívá k excitotoxickému poškození buňky [109]. Dále bylo také prokázáno, že fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (PIP<sub>2e</sub>), je excitotoxický tím, že převádí

GluN2B podjednotku NMDA receptoru do synapsí. Sasaki a kol. demonstrovali, že defosforylace excitotoxického PIP<sub>2</sub> do fosfatidylinositol monofosfátu (PIP) inositolovou polyfosfát fosfatázou 4A (INPP4A) je během excitotoxicity neuroprotektivní [110].

## 6.2. CREB a BDNF

Synaptické a extrasynaptické NMDA receptory mají opačné účinky na CRE vazebný protein (CREB), který ovlivňuje genovou expresi a podporuje přežívání neuronů [56]. Vstup vápníku přes synaptické NMDA receptory, obsahující GluN2A podjednotku, vede k aktivaci CREB [56][111]. Aktivovaný CREB se váže na CREB vazebný protein (CBP) a ovlivňuje transkripci genů citlivých na CRE, mezi které patří neurotrofní faktor pocházející z mozku (BDNF) [111][112]. Exprimovaný BDNF poté přispívá k vitalitě neuronů. Naproti tomu jsou během cerebrální ischemie stimulovány extrasynaptické NMDA receptory. Vstup vápníku přes extrasynaptické NMDA receptory vede k aktivaci CREB uzavírací dráhy a následnému snížení expresi BDNF [56].

## 6.3. DAPK1

Smrt-asociovaná protein kináza 1 (DAPK1) hraje klíčovou roli ve zprostředkování ischemického neuronálního poškození. V průběhu cerebrální ischemie nadměrný vtok vápníku přes NMDA receptor způsobí aktivaci kalcineurinu. Kalcineurin poté defosforyluje DAPK1, čímž ji aktivuje [113]. Aktivovaná DAPK1 se následně přímo váže na C-koncovou doménu GluN2B podjednotky NMDA receptoru. DAPK1 fosforyluje GluN2B podjednotku, a tím zvyšuje propustnost NMDA receptoru pro vápník, což podporuje excitotoxicitu [114]. Navíc, extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK) fosforyluje na serinu-735 DAPK1, čímž zvyšuje její katalytickou aktivitu. DAPK1 také inhibuje ERK nukleární translokaci, díky čemuž se ERK stává pro DAPK1 více dostupnou. Tato vzájemná regulace poté ještě více podporuje apoptickou aktivitu DAPK1 [115].

## 6.4. PSD95 a nNOS

V průběhu mozkové ischemie protein postsynaptické hustoty 95 (PSD95) sestavuje proteinový komplex s nNOS a NMDA receptorem obsahujícím GluN2B podjednotku [116][117]. Excitotoxický vtok vápníku přes komplex NMDA receptor-PSD95-nNOS vede k tvorbě ROS a RNS a k následné buněčné smrti [118]. nNOS, který je součástí proteinového komplexu, produkuje oxid dusnatý (NO<sup>•</sup>). Ten reaguje se superoxidem (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) za vzniku

peroxynitritu (ONOO<sup>-</sup>). Peroxynitrit poté může vyvolávat další neuronální poškození prostřednictvím řady mechanismů [119][120]. Vlivem nedostatku kyslíku jsou také často rozbité disulfidové můstky, které brání *S*-nitrosylaci. To využívá kation oxidu dusnatého (NO<sup>+</sup>), který indukuje *S*-nitrosylaci proteinů na volných cysteinových zbytcích [121]. *S*-nitrosylace pak může vést k aktivaci proapoptických proteinů [122].

## 6.5. Calpain

Nadměrná aktivace NMDA receptoru obsahujícího GluN2B podjednotku může vést k neurotoxicitě prostřednictvím vápníku, který aktivuje proteázu calpain [123][124]. Calpain následně zkracuje C-koncovou doménu metabotropního glutamátového receptoru (mGluR1). mGluR1 je i po zkrácení schopen propouštět do cytosolu vápník, avšak ztrácí schopnost aktivovat transkripční stimulátor fosfoinositidu 3 kinázy (PIKE-L), jež brání apoptóze [125][126]. Calpain také štěpí protein p35 na protein p25 [127]. p35 je aktivátor cyklin-dependentní kinázy 5 (cdk5), která je zodpovědná za správný vývoj CNS. Naproti tomu, p25 indukuje přeměrování cdk5 do jádra, což je proces, který podporuje neuronální poškození [128][129]. A navíc, calpain štěpí striatal obohacenou tyrosin fosfatázu 61 (STEP61) na STEP33. STEP33 na rozdíl od STEP61 neinhibuje apoptickou signalizaci proteinu p38 [130].



## 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 [131\*].

Hlavní příčina HI 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 [132] či jiné léky [133], provádí se tromboektomie a další neurochirurgické zákroky [134] nebo se zavádí stenty [135]. Avšak léčebné postupy HI 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 [136].

### 7.1. Strategie pro snížení dlouhodobého dopadu perinatálního poranění mozku

#### 7.1.1. Síran hořečnatý

V 90. letech bylo prokázáno, že výskyt intraventrikulárního krvácení a s tím spojené mozkové obrny byl nižší u dětí, jejichž matky byly vystavené působení síranu hořečnatého [137]. Síran hořečnatý výrazně snižuje riziko mozkové obrny u dětí, při podání do 34. týdne těhotenství [138]. Jiné studie naznačují, že ačkoli neexistuje žádný významný účinek síranu hořečnatého na dětskou úmrtnost, došlo k výraznému snížení neurologického poranění [139]. Síran hořečnatý se musí používat s opatrností, jelikož u matky a dítěte hrozí nebezpečí kostních abnormalit a poruch v distribuci vápníku či fosforu [140].

#### 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 zdravotních postižení spojených s terapeutickou hypotermií [141]. Hypotermie pomáhá zmírnit poškození nervové tkáně způsobené ischemií, a to hned v několika ohledech. Zmírňuje vazogenní edém, krvácení a infiltraci neutrofilů [142]. Snižuje uvolňování

excitačních neurotransmiterů, což omezuje intracelulární akumulaci vápníku [143][144]. Dále také omezuje produkci volných radikálů, chrání buňky během reperfuze, snižuje aktivace cytokinu a koagulační kaskády [145]. 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 [146]. Nicméně terapeutická hypotermie vyžaduje značné prostředky, které jsou obvykle k dispozici pouze v centrech terciární péče.

## 7.2. Strategie k zabránění perinatálního poranění mozku

Objem krve cirkulující v těle novorozence je částečně závislý na tom, kdy je pupeční šňůra odstrižena. Okamžité odstrižení pupeční šňůry bylo preferováno kvůli usnadnění rychlé resuscitace pro předčasně narozené děti a pro snížení mateřského krvácení. Nicméně existuje i množství literatury, které preferují zpožděné podvázání pupeční šňůry, jež by mohlo zabránit perinatálnímu poranění mozku, a to zejména mezi předčasně narozenými dětmi [131\*]. Zpožděné podvázání pupeční šňůry totiž zlepšuje okysličení mozku u předčasně narozených dětí [147]. Pokračující transfuze červených krvinek také snižuje riziko reperfuze a zajišťuje pro novorozence odpovídající srážecí faktory [148]. A v neposlední řadě, pupečnickové kmenové buňky mají neuroprotektivní účinky [149].

Mezi další strategie patří zamezení infekcím. Mateřské infekce všech druhů, jsou spojeny s výrazným zvýšením rizika mozkové obrny u dětí narozených v termínu a u dětí narozených předčasně [150][151]. Mezi nejrizikovější mateřské infekce pro plod patří infekce plodových obalů, tzv. chorioamniotidy [152]. Infekce způsobuje fetální poškození mozku prostřednictvím mateřské hypertermie, díky které je zvýšená buněčná metabolická aktivita a uvolňují se volné radikály či glutamát [153]. O závažnosti fetálního poškození mozku při infekci rozhoduje fetální imunitní systém a zánětlivé reakce v plodu [154]. Léčba mateřské horečky, augmentace porodu u pacientek s předčasně protrženou plodovou blánou a zamezení nadměrných cervikálních vyšetření v případech prasklé plodové blány mohou být důležité strategie pro zabránění perinatálního poranění mozku [131\*].

Perinatální poškození mozku také vysoce koreluje s nedonošeností. Proto jakákoliv strategie, která pomůže snížit počet předčasně narozených dětí, může snížit výskyt perinatálního poškození mozku. Avšak ani dnešní zdravotnictví nedokáže zcela úspěšně předvídat či zabránit předčasnému porodu. Zlepšení nastalo v prevenci u žen, které již alespoň jednou prodělaly předčasný porod a u žen, kterým byl diagnostikován krátký děložní krček.

Mezi vysoce rizikovými případy se pro prevenci předčasného porodu prokázalo jako výhodné podávání progesteronu [131\*].

### 7.3. Nové strategie

#### 7.3.1. Nespotřebovaná pupečnicková krev

Lidská pupečnicková krev obsahuje různé typy kmenových buňek, jakou jsou například hematopoetické nebo mezenchymální. Kmenové buňky z pupečnickové krve mají vysoký regenerační potenciál v mnoha typech tkání, včetně nervové tkáně [155]. Nespotřebovaná pupečnicková krev se využívá k léčbě celé řady onemocnění, jako jsou anémie či poruchy imunitního systému. Studie prováděná na modelu potkaního mláděte prokázala, že kmenové buňky získané z pupečnickové krve mají neuroprotektivní účinek pro neonatální HI poškození mozku [156].

#### 7.3.2. Využití erytropoetinu

Erytropoetin (EPO) je hematopoetický cytokin, který má neuroregenerativní, a protizánětlivé účinky v mozku. Zvířecí studie na nově narozených potkaních mládětech vystavených HI podmínkám prokázala příznivý neuroprotektivní účinek EPO [157].

Další studie, která byla již prováděna na dětech, ukázala významné zlepšení na elektroencefalogramu po užití EPO u HI postižených novorozenců ve 2. týdnu po narození. Po 6 měsících pak měli děti oštřené EPOem méně neurologických a vývojových abnormalit [158].

#### 7.3.3. Experimentální farmaka

I přes rozsáhlé variace léků, které jsou zkoumané a používané 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 [159]. Jako příslib do budoucna se ale jeví použití neurosteroidů, jež mozek významně ovlivňují a zároveň se v něm běžně vyskytují. Neuroaktivní steroid  $3\alpha5\beta$ -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 [19].

## 8. Závěr

Cerebrální ischemie vede k masivnímu uvolňování glutamátu, který stimuluje NMDA receptor a indukuje vtok vápníku přes tyto ionotropní receptory. S receptory jsou spojené proapoptické proteiny, které jsou aktivované právě vápníkem. Tyto proteiny spouští nepřehledné množství signálních kaskád, které pracují synergicky k vyvolání apoptózy.

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. Blokátory NMDA receptorů mají také krátké terapeutické okno pro podávání léků a jsou účinné pouze při podání před nebo bezprostředně po iktu. Kvůli těmto důvodům nebyl žádný z léků, který antagonizuje NMDA receptor, schválen pro léčbu ischemie.

Mezi nejúspěšnější zkoumané látky však patří selektivní modulatory NMDA receptorů obsahující GluN2B podjednotku a to kvůli proapoptickým drahám, které tato podjednotka váže. 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 klinické studie [160].

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 specializovaly 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 pak 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 v perinatologii zkoumají minimálně, a to především kvůli přísným nárokům na jejich toxicitu. Jako vhodné se do budoucna jeví neurosteroidy.

## 9. Seznam literatury

- [1] Gilmore, J. H. et al. Longitudinal Development of Cortical and Subcortical Gray Matter from Birth to 2 Years. *Cereb Cortex* 22, 2478–2485 (2012).
- [2] Eriksson, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317 (1998).
- [3] Roessmann, U. & Gambetti, P. Astrocytes in the developing human brain. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 70, 308–313 (1986).
- [4\*] 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).
- [5] Huttenlocher, P. R. & Dabholkar, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178 (1997).
- [6\*] Morell, P. & Quarles, R. H. *Myelin Formation, Structure and Biochemistry.* (1999).
- [7] Giedd, J. N. et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat. Neurosci.* 2, 861–863 (1999).
- [8] 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).
- [9\*] Saunders, N. R., Liddelow, S. A. & Dziegielewska, K. M. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol* 3, 46 (2012).
- [10] Mollgård, K. & Saunders, N. R. A possible transepithelial pathway via endoplasmic reticulum in foetal sheep choroid plexus. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 199, 321–326 (1977).
- [11] Neurotransmitter Receptors, Transporters, and Ion Channels. rnd systems a biotechnie brand (2015). at <<https://www.rndsystems.com/research-area/neurotransmitter-receptors--transporters--and-ion-channels>>
- [12\*] Sánchez Fernández, I. & Loddenkemper, T. Subunit composition of neurotransmitter receptors in the immature and in the epileptic brain. *Biomed Res Int* 2014, 301950 (2014).
- [13\*] Paul, S. M. & Purdy, R. H. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6, 2311–2322 (1992).
- [14\*] Mellon, S. H. & Griffin, L. D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 35–43 (2002).
- [15] Parížek, A. et al. Neuroactive pregnanolone isomers during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 395–403 (2005).
- [16] Callachan, H. et al. Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 231, 359–369 (1987).
- [17] 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).
- [18] Vyklicky, 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).
- [19] Kleteckova, L., Tsenov, G., Kubova, H., Stuchlik, A. & Vales, K. Neuroprotective effect of the 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neurosci. Lett.* 564, 11–15 (2014).
- [20\*] Bacigaluppi, M., Comi, G. & Hermann, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol J* 4, 34–38 (2010).
- [21\*] Vannucci, R. C. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J. Neurosci. Res.* 55, 158–163 (1999).
- [22] Vannucci, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 17, 113–120 (2000).
- [23] 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).
- [24] 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).
- [25\*] Lai, M.-C. & Yang, S.-N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 609813 (2011).

- [26] 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).
- [27\*] Dixon, B. J., Reis, C., Ho, W. M., Tang, J. & Zhang, J. H. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci* 16, 22368–22401 (2015).
- [28] Kusaka, T. et al. Relationship between cerebral interstitial levels of amino acids and phosphorylation potential during secondary energy failure in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr. Res.* 55, 273–279 (2004).
- [29\*] 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).
- [30\*] Lai, T. W., Zhang, S. & Wang, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188 (2014).
- [31] 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 Research Bulletin* 53, 767–776 (2000).
- [32] Berdichevsky, E., Riveros, N., Sánchez-Armáss, S. & Orrego, F. Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neuroscience Letters* 36, 75–80 (1983).
- [33] Olney, J. W., Rhee, V. & Ho, O. L. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research* 77, 507–512 (1974).
- [34] Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Letters* 58, 293–297 (1985).
- [35\*] Woodruff, T. M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6, 11 (2011).
- [36] Murakami, K. et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J. Neurosci.* 18, 205–213 (1998).
- [37] Henderson, L. M., Moule, S. K. & Chappell, J. B. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 211, 157–162 (1993).
- [38] Bredt, D. S. & Snyder, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 682–685 (1990).
- [39] Yuan, T., Vogel, H. J., Sutherland, C. & Walsh, M. P. Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent interactions between calmodulin and its binding domain of inducible nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 431, 210–214 (1998).
- [40] Schwarzmaier, S. M. et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 32, 731–738 (2015).
- [41] Bhardwaj, A. et al. Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats. *Stroke* 28, 850–856; discussion 856–857 (1997).
- [42] Figueroa, X. F., Lillo, M. A., Gaete, P. S., Riquelme, M. A. & Sáez, J. C. Diffusion of nitric oxide across cell membranes of the vascular wall requires specific connexin-based channels. *Neuropharmacology* 75, 471–478 (2013).
- [43] Lin, K. T., Xue, J. Y., Nomen, M., Spur, B. & Wong, P. Y. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16487–16490 (1995).
- [44] Karbowski, M. et al. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 396–409 (1999).
- [45] Qin, L. et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* 279, 1415–1421 (2004).
- [46] Granger, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255, H1269–1275 (1988).
- [47] Lactic Acidosis: Background, Etiology, Epidemiology. (2015). at <<http://emedicine.medscape.com/article/167027-overview>>

- [48] Xiang, Z., Yuan, M., Hassen, G. W., Gampel, M. & Bergold, P. J. Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures. *Exp. Neurol.* 186, 70–77 (2004).
- [49] Ong, B. Y., Greengrass, R., Bose, D., Gregory, G. & Palahniuk, R. J. Acidemia impairs autoregulation of cerebral blood flow in newborn lambs. *Can Anaesth Soc J* 33, 5–9 (1986).
- [50\*] Paoletti, P. & Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39–47 (2007).
- [51\*] Traynelis, S. F. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62, 405–496 (2010).
- [52] Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. & Mishina, M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138–1140 (1992).
- [53] Thomas, C. G., Miller, A. J. & Westbrook, G. L. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptor NR2 Subunits in Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 95, 1727–1734 (2006).
- [54] Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540 (1994).
- [55] Bessho, Y., Nawa, H. & Nakanishi, S. Selective up-regulation of an nmda receptor subunit mrna in cultured cerebellar granule cells by K<sup>+</sup>-induced depolarization and nmda treatment. *Neuron* 12, 87–95 (1994).
- [56] 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).
- [57] 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).
- [58] Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618–1623 (1994).
- [59] Tu, W. et al. DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke. *Cell* 140, 222–234 (2010).
- [60] 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).
- [61] Brenneman, D. E., Chang, Y. & Nelson, P. G. Multi-determinate regulation of neuronal survival: Neuropeptides, excitatory amino acids and bioelectric activity. *International Journal of Developmental Neuroscience* 8, 371–378 (1990).
- [62] Chandler, L. J., Sutton, G., Dorairaj, N. R. & Norwood, D. N-Methyl d-Aspartate Receptor-mediated Bidirectional Control of Extracellular Signal-regulated Kinase Activity in Cortical Neuronal Cultures. *J. Biol. Chem.* 276, 2627–2636 (2001).
- [63] Tovar, K. R. & Westbrook, G. L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *Journal of Neuroscience* 19, 4180–4188 (1999).
- [64] Chen, M. et al. Differential Roles of NMDA Receptor Subtypes in Ischemic Neuronal Cell Death and Ischemic Tolerance. *Stroke* 39, 3042–3048 (2008).
- [65] Sun, L. et al. Chronic ketamine exposure induces permanent impairment of brain functions in adolescent cynomolgus monkeys. *Addict Biol* 19, 185–194 (2014).
- [66] McDonald, J. W., Silverstein, F. S. & Johnston, M. V. MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* 140, 359–361 (1987).
- [67] 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).
- [68] 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](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-306-4_2)>

- [69\*] Santokh, G. & Pulido, Olga. *Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS.* (Springer Science & Business Media, 2007).
- [70] Park, C. K., McCulloch, J., Kang, J. K. & Choi, C. R. Efficacy of D-CPPene, a competitive N-methyl-D-aspartate antagonist in focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci. Lett.* 147, 41–44 (1992).
- [71] Grotta, J. et al. Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke* 26, 602–605 (1995).
- [72] Pérez-Pinzón, M. A. & Steinberg, G. K. CGS 19755 (Selfotel): A Novel Neuroprotective Agent Against CNS Injury. *CNS Drug Rev* 2, 257–268 (1996).
- [73\*] Muir, K. W. & Lees, K. R. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26, 503–513 (1995).
- [74] Greifenstein, F. E., Devault, M., Yoshitake, J. & Gajewski, J. E. A study of a 1-aryl cyclo hexyl amine for anesthesia. *Anesth. Analg.* 37, 283–294 (1958).
- [75] Murray, J. B. Phencyclidine (PCP): a dangerous drug, but useful in schizophrenia research. *J Psychol* 136, 319–327 (2002).
- [76] PCP Fast Facts. Available at: <https://www.justice.gov/archive/ndic/pubs4/4440/>. (Accessed: 21st April 2016)
- [77] Johnstone, M., Evans, V. & Baigel, S. Sernyl (c1–395) in Clinical Anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 31, 433–439 (1959).
- [78] Domino, E. F., Chodoff, P. & Corssen, G. PHARMACOLOGIC EFFECTS OF CI-581, A NEW DISSOCIATIVE ANESTHETIC, IN MAN. *Clin. Pharmacol. Ther.* 6, 279–291 (1965).
- [79] White, P. F., Way, W. L. & Trevor, A. J. Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 56, 119–136 (1982)
- [80] Pai, A. & Heining, M. Ketamine. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 7, 59–63 (2007).
- [81] Park, C. K., Nehls, D. G., Graham, D. I., Teasdale, G. M. & McCulloch, J. The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 24, 543–551 (1988).
- [82] Fix, A. S. et al. Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp. Neurol.* 123, 204–215 (1993).
- [83] 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/>>
- [84\*] Lipton, S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 803–808 (2007).
- [85] Muir, K. W., Grosset, D. G., Gamzu, E. & Lees, K. R. Pharmacological effects of the non-competitive NMDA antagonist CNS 1102 in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 38, 33–38 (1994).
- [86] Albers, G. W., Sáenz, R. E., Moses, J. A. & Choi, D. W. Safety and tolerance of oral dextromethorphan in patients at risk for brain ischemia. *Stroke* 22, 1075–1077 (1991).
- [87] Reissig, C. J. et al. High doses of dextromethorphan, an NMDA antagonist, produce effects similar to classic hallucinogens. *Psychopharmacology* 223, 1–15 (2012).
- [88] Albers, G. W., Atkinson, R. P., Kelley, R. E. & Rosenbaum, D. M. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl-D-aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. Dextrorphan Study Group. *Stroke* 26, 254–258 (1995).
- [89] Chen, H. S. & Lipton, S. A. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J. Physiol. (Lond.)* 499 ( Pt 1), 27–46 (1997).
- [90] Chen, Z.-Z. et al. Memantine mediates neuroprotection via regulating neurovascular unit in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Life Sci.* 150, 8–14 (2016).



- [91] Chen, H.-S. V. & Lipton, S. A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611–1626 (2006).
- [92] Schachter, S. C. & Tarsy, D. Remacemide: current status and clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 871–883 (2000).
- [93] Bannan, P. E., Graham, D. I., Lees, K. R. & McCulloch, J. Neuroprotective effect of remacemide hydrochloride in focal cerebral ischemia in the cat. *Brain Res.* 664, 271–275 (1994).
- [94] Dyker, A. G. & Lees, K. R. Remacemide hydrochloride: a double-blind, placebo-controlled, safety and tolerability study in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 30, 1796–1801 (1999).
- [95] Warner, D. S. et al. In vivo models of cerebral ischemia: effects of parenterally administered NMDA receptor glycine site antagonists. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 188–196 (1995).
- [96] Bordi, F., Pietra, C., Ziviani, L. & Reggiani, A. The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 145, 425–433 (1997).
- [97] Williams, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* 44, 851–859 (1993).
- [98] Perin-Dureau, F., Rachline, J., Neyton, J. & Paoletti, P. Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J. Neurosci.* 22, 5955–5965 (2002).
- [99] Mott, D. D. et al. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat. Neurosci.* 1, 659–667 (1998).
- [100] Nash, J. E., Hill, M. P. & Brotchie, J. M. Antiparkinsonian actions of blockade of NR2B-containing NMDA receptors in the reserpine-treated rat. *Exp. Neurol.* 155, 42–48 (1999).
- [101] Zhou, L. et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med* 16, 1439–1443 (2010).
- [102] Wood, P. L. & Hawkinson, J. E. N-methyl-D-aspartate antagonists for stroke and head trauma. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 6, 389–397 (1997).
- [103\*] Gladstone, D. J., Black, S. E., Hakim, A. M. & Recovery, for the H. and S. F. of O. C. of E. in S. Toward Wisdom From Failure Lessons From Neuroprotective Stroke Trials and New Therapeutic Directions. *Stroke* 33, 2123–2136 (2002).
- [104\*] Lai, T. W., Shyu, W.-C. & Wang, Y. T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in Molecular Medicine* 17, 266–275 (2011).
- [105] Perkinson, M. S., Ip, J. K., Wood, G. L., Crossthwaite, A. J. & Williams, R. J. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *J. Neurochem.* 80, 239–254 (2002).
- [106] Meier, R., Alessi, D. R., Cron, P., Andjelković, M. & Hemmings, B. A. Mitogenic Activation, Phosphorylation, and Nuclear Translocation of Protein Kinase B $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 272, 30491–30497 (1997).
- [107] Ning, K. et al. Dual Neuroprotective Signaling Mediated by Downregulating Two Distinct Phosphatase Activities of PTEN. *J. Neurosci.* 24, 4052–4060 (2004).
- [108] Stambolic, V. et al. Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39 (1998).
- [109] Zhang, S. et al. Critical Role of Increased PTEN Nuclear Translocation in Excitotoxic and Ischemic Neuronal Injuries. *J. Neurosci.* 33, 7997–8008 (2013).
- [110] Sasaki, J. et al. The PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature* 465, 497–501 (2010).
- [111] Chen, Q. et al. Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Activity-Dependent Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Regulation and Limbic Epileptogenesis. *J. Neurosci.* 27, 542–552 (2007).
- [112] Chrivia, J. C. et al. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. , Published online: 28 October 1993; | doi:10.1038/365855a0 365, 855–859 (1993).

- [113] Shamloo, M. et al. Death-associated Protein Kinase Is Activated by Dephosphorylation in Response to Cerebral Ischemia. *J. Biol. Chem.* 280, 42290–42299 (2005).
- [114] Tu, W. et al. DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke. *Cell* 140, 222–234 (2010).
- [115] Chen, C.-H. et al. Bidirectional signals transduced by DAPK/ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *The EMBO Journal* 24, 294–304 (2005).
- [116] Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A. & Bredt, D. S. PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the N-Methyl-D-aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 27467–27473 (1999).
- [117] Kornau, H.-C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. & Seeburg, P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737–1740 (1995).
- [118] Sattler, R. et al. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science* 284, 1845–1848 (1999).
- [119] Lipton, S. A. et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626–632 (1993).
- [120] 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. *PNAS* 93, 6770–6774 (1996).
- [121] Takahashi, H. et al. Hypoxia Enhances S-Nitrosylation-Mediated NMDA Receptor Inhibition via a Thiol Oxygen Sensor Motif. *Neuron* 53, 53–64 (2007).
- [122] Manabe, S., Gu, Z. & Lipton, S. A. Activation of Matrix Metalloproteinase-9 via Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to NMDA-Induced Retinal Ganglion Cell Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46, 4747 (2005).
- [123] Lee, K. S., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A. & Lynch, G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *PNAS* 88, 7233–7237 (1991).
- [124] Zhou, M. & Baudry, M. Developmental Changes in NMDA Neurotoxicity Reflect Developmental Changes in Subunit Composition of NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 26, 2956–2963 (2006).
- [125] Rong, R. et al. PI3 kinase enhancer–Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat Neurosci* 6, 1153–1161 (2003).
- [126] Xu, W. et al. Calpain-Mediated mGluR1 $\alpha$  Truncation: A Key Step in Excitotoxicity. *Neuron* 53, 399–412 (2007).
- [127] Lee, M. et al. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360–364 (2000).
- [128] O’Hare, M. J. et al. Differential Roles of Nuclear and Cytoplasmic Cyclin-Dependent Kinase 5 in Apoptotic and Excitotoxic Neuronal Death. *J. Neurosci.* 25, 8954–8966 (2005).
- [129] Patrick, G. N. et al. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615–622 (1999).
- [130] Xu, J. et al. Extrasynaptic NMDA Receptors Couple Preferentially to Excitotoxicity via Calpain-Mediated Cleavage of STEP. *J. Neurosci.* 29, 9330–9343 (2009).
- [131\*] Salmeen, K. E., Jelin, A. C. & Thiet, M.-P. Perinatal neuroprotection. *F1000Prime Rep* 6, 6 (2014).
- [132] 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).
- [133] Lees, K. R. et al. NXY-059 for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 354, 588–600 (2006).
- [134] 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
- [135] 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).

- [136] Rosenbaum, P. et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 109, 8–14 (2007).
- [137] 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).
- [138] 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).
- [139] 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
- [140] 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).
- [141] 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).
- [142] 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).
- [143] 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).
- [144] Thoresen, M. et al. Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. *Neuroreport* 8, 3359–3362 (1997).
- [145] 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).
- [146] 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).
- [147] 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).
- [148] 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).
- [149] Arien-Zakay, H. et al. Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors. *Exp. Neurol.* 216, 83–94 (2009).
- [150] Elovitz, M. A. et al. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 663–671 (2011).
- [151] Grether, J. K. & Nelson, K. B. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA* 278, 207–211 (1997).
- [152] Wu, Y. W. & Colford, J. M. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA* 284, 1417–1424 (2000).
- [153] Gunn, A. J., Gunn, T. R., de Haan, H. H., Williams, C. E. & Gluckman, P. D. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J. Clin. Invest.* 99, 248–256 (1997).
- [154] Romero, R. et al. Hematologic profile of the fetus with systemic inflammatory response syndrome. *J Perinat Med* 40, 19–32 (2011).
- [155] Guan, Y.-M. et al. Effect of human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation on neuronal metabolites in ischemic rabbits. *BMC Neurosci* 15, 41 (2014).
- [156] 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).
- [157] Kumral, A. et al. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol. Neonate* 83, 224–228 (2003).
- [158] Elmahdy, H. et al. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 125, e1135–1142 (2010).

- [159] 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](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003754.pdf)
- [160] 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).