

Νέοι ορίζοντες στη θεραπευτική αντιμετώπιση της Υποξικής-Ισχαιμικής Εγκεφαλοπάθειας

Σπάνδου Ευαγγελία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, ΑΠΘ

Αλληλογραφία: Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, ΑΠΘ
E-mail: spandou@med.auth.gr, Τηλ: 6973202636

Περίληψη

Η υποξική-ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια (ΥΙΕ), παρά τη βαθύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας και την πρόοδο της περιγεννητικής ιατρικής, αποτελεί ακόμη και σήμερα μια από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας ή νοσηρότητας των νεογνών. Μέχρι τώρα η εφαρμογή της υποθερμίας είναι η μόνη θεραπεία που εφαρμόζεται και βελτιώνει την έκβαση των νεογνών με μέτρια-σοβαρή ΥΙΕ. Η ανεύρεση όμως επιπρόσθετων θεραπευτικών παρεμβάσεων, οι οποίες θα προσφέρουν μεγαλύτερη νευροπροστασία και θα βελτιώσουν την έκβαση της σοβαρής ΥΙ εγκεφαλικής βλάβης είναι αναγκαία. Οι πρόσφατες πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους σε νευροπροστατευτικές ουσίες, οι οποίες δρουν σε διαφορετικά και πολλαπλά στάδια του παθοφυσιολογικού μηχανισμού. Η ερυθροποιητίνη, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη, ο G-CSF και η μελατονίνη αποτελούν παραδείγματα νευροπροστατευτικών ουσιών, οι οποίες εμφανίζουν πλειοτροπική δράση και κυρίως μπορούν να ενισχύσουν τους ενδογενείς μηχανισμούς αναγέννησης του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου. Παρ' όλα αυτά, η πληρέστερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΥΙ εγκεφαλικής βλάβης και η ανεύρεση της πιο αποτελεσματικής συνδυαστικής θεραπείας παραμένει μία σημαντική πρόκληση για το μέλλον.

Λέξεις κλειδιά: Υποξική-Ισχαιμική Εγκεφαλοπάθεια, ερυθροποιητίνη, Ν-ακετυλοκυστεΐνη, μελατονίνη, G-CSF

Εισαγωγή

Η υποξική-ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια (ΥΙΕ) αποτελεί σοβαρή εκδήλωση της περιγεννητικής ασφυξίας (ΠΑ), η οποία παρά τη βαθύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας και την πρόοδο της περιγεννητικής ιατρικής αποτελεί ακόμη και σήμερα μια από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας ή νοσηρότητας των νεογνών. Η υποξική-ισχαιμική βλάβη της περιγεννητικής περιόδου αποτελεί σημαντική αιτία χρόνιων νευρολογικών διαταραχών, όπως εγκεφαλικής παράλυσης και μαθησιακών προβλημάτων που φθάνουν μέχρι και την ενηλικίωση¹. Υπολογίζεται ότι από τα 130 εκατομμύρια νεογνά που γεννιούνται κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο τα 4 εκατομμύρια υφίστανται περιγεννητική ασφυξία και από αυτά 1 εκατομμύριο πεθαίνει και άλλα τόσα περίπου αναπτύσσουν νευρολογικά ελλείμματα². Οι αριθμοί αυτοί δείχνουν την τεράστια έκταση του προβλήματος της περιγεννητικής ασφυξίας. Η συχνότητα της περιγεννητικής ασφυξίας είναι μεγαλύτερη στις αναπτυσσόμενες χώρες συγκριτικά με τις αναπτυγμένες, αλλά ακόμη και σ' αυτές 2-6 νεογνά/1000 γεννήσεις εμφανίζουν ΥΙΕ, αριθμός που αντιστοιχεί σε 8000-25000 νεογνά στην Ευρώπη³.

Παθοφυσιολογία της ΥΙΕ

Η παθοφυσιολογία της ΥΙΕ αποτελεί μια πολύπλοκη και πολυεπίπεδη εξελικτική διαδικασία αποτελούμενη από μία σειρά νευροτοξικών φαινομένων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνα-

το (Σχήμα 1). Κατά την οξεία φάση (πρωτογενής φάση) του υποξικού-ισχαιμικού επεισοδίου, η απουσία των ενεργειακών υποστρωμάτων (οξυγόνο, γλυκόζη) προκαλεί τη μείωση των αποθεμάτων των νευρώνων σε μεταβολίτες υψηλής ενέργειας, γεγονός που οδηγεί σε διαταραχή της λειτουργίας Na⁺/K⁺-ΑΤΡασης και σταδιακή εκπόλωση των κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση του γαλακτικού οξέος και μείωση του pH με αποτέλεσμα την κυτταρική οξέωση. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση των διεγερτικών αμινοξέων αυξάνεται λόγω αυξημένης απελευθέρωσής του από τα νευρικά κύτταρα και μειωμένης επαναπρόσληψής τους από τα αστροκύτταρα. Η απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης, η εκπόλωση των κυττάρων και η αυξημένη διέγερση των γλουταμινεργικών υποδοχέων (NMDA, non-NMDA) οδηγεί στη ενδοκυττάρια συσσώρευση του Ca²⁺, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ωσμωτικής βαθμίδωσης και κυτταροτοξικού οιδήματος, την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω της ενεργοποίησης ενδοκυττάρων ενζύμων και τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Κατά την εξελικτική αυτή διαδικασία κινητοποιούνται μηχανισμοί νέκρωσης ή απόπτωσης που οδηγούν ορισμένους νευρώνες-ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από τη βαρύτητα και τη διάρκεια του ΥΙ επεισοδίου-στον κυτταρικό θάνατο^{4,5}.

Μετά την ανάνηψη αποκαθίσταται η παροχή O₂ και γλυκόζης, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η σύνθεση του ATP, αποκαθίσταται επίσης εν μέρει η εγκεφαλική ροή αίματος, ενώ

ταυτόχρονα ελαττώνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του γαλακτικού και το κυτταρικό οίδημα (φάση επαναιμάτωσης). Αν και ο μεταβολισμός του εγκεφάλου βελτιώνεται σταδιακά, στις πιο σοβαρές περιπτώσεις η λειτουργία των νευρώνων παραμένει εμφανώς ανώμαλη και ακολουθεί η «λανθάνουσα φάση» η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένη φλοιική ηλεκτρική δραστηριότητα και σε ορισμένες περιπτώσεις πλήρη ηλεκτροεγκεφαλογραφική σιγή. Η φάση αυτή μολονότι χαρακτηρίζεται «ήσυχη», στη διάρκειά της ξεκινούν πολλά σημαντικά γεγονότα. Παρατηρείται σχετική υπεροχή των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών (GABA) και καταστολή της συναπτικής δραστηριότητας, φαινόμενα που εξηγούν το ελαττωμένο επίπεδο συνείδησης και τη γενικευμένη υποτονία που παρουσιάζουν τις πρώτες ώρες της ζωής τα νεογνά που έχουν υποστεί σοβαρή ασφυξία. Η ροή του αίματος στα αγγεία του εγκεφάλου, ενώ αρχικά αποκαθίσταται μετά την επαναιμάτωση, μειώνεται εκ νέου με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποαιμάτωσης, η οποία μπορεί να διαρκέσει για πολλές ώρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης ξεκινά η έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και η φλεγμονώδης αντίδραση. Το «θεραπευτικό» παράθυρο θεωρείται ότι συμπίπτει με τη χρονική αυτή περίοδο, η διάρκεια της οποίας βρέθηκε ότι συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με τη βαρύτητα του ΥΙ ελλεισοδίου^{6,7}.

Περίπου 6 - 15 ώρες μετά το ΥΙ ελλεισοδίο, η λανθάνουσα περίοδος ακολουθείται από τη δευτερογενή φάση η οποία χαρακτηρίζεται από μια δευτερεύουσα επιδείνωση που διαρκεί πολλές ημέρες και χαρακτηρίζεται από σπασμούς, δευτεροπαθές κυτταροτοξικό οίδημα, συσσώρευση διεγερτικοτοξικών αμινοξέων, διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και τελικά την εμφάνιση του «καθυστερημένου» κυτταρικού θανάτου. Παρά το γεγονός ότι έχει αποκατασταθεί η παροχή O₂ και γλυκόζης υπάρχει προοδευτική ελάττωση των υψηλής ενέργειας φωσφορικών ενώσεων ATP και PCr, αύξηση του γαλακτικού οξέος αλλά διατήρηση του ενδοκυττάρου pH στα φυσιολογικά όρια^{8,9}. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη μίας τριτογενούς φάσης, η οποία μπορεί να διαρκεί εβδομάδες, μήνες ή ακόμη και χρόνια και κατά την οποία η συνεχής παρουσία ή η κινητοποίηση νευροτοξικών μηχανισμών παρεμποδίζουν την αποκατάσταση/αναγέννηση ή ακόμα επιδεινώνουν την εγκεφαλική βλάβη. Ανάμεσα στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται επιγενετικές αλλαγές, η εμμένουσα φλεγμονή και η μη ομαλή εξέλιξη της διαδικασίας της γλοίωσης που κάτω από άλλες συνθήκες είναι ζωτικής σημασίας για την επιδιόρθωση και αναγέννηση του ιστού¹⁰.

Νέοι θεραπευτικοί στόχοι στην αντιμετώπιση της ΥΙΕ

Δυο είναι οι στόχοι στην αντιμετώπιση της ΥΙΕ: 1. η προσπάθεια διατήρησης επαρκούς παροχής αίματος και θρεπτικών συστατικών στον εγκέφαλο με κάθε τρόπο και η παράλληλη αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκύπτουν από την πολυοργανική ανεπάρκεια και 2. η προσπάθεια διακοπής της εξέλιξης της εγκεφαλικής βλάβης με την κατάλληλη επιλογή της νευροπροστατευτικής παρέμβασης. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον, βασιζόμενο στην όλο και πληρέστερη γνώση της παθοφυσιολογίας της ΥΙ εγκεφαλικής βλάβης, εστιάζεται σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές που ξεκινούν αμέσως μετά την ανάνηψη. Μέχρι τώρα το μοναδικό θεραπευτικό μέσο που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη και εφαρμόζεται σε τελειόμηνα νεογνά με μέτρια-σοβαρού βαθμού

ΥΙΕ, είναι η υποθερμία. Η υποθερμία μειώνει τη θνητότητα και τις νευροαναπτυξιακές διαταραχές στην ηλικία των 12-24 μηνών, αλλά δε φαίνεται να προσφέρει πλήρη προστασία και ιδιαίτερα στα νεογνά με σοβαρού βαθμού ΥΙΕ. Πειραματικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι ανάμεσα στους παράγοντες εκείνους που μπορούν να επηρεάσουν τη νευροπροστατευτική δράση της υποθερμίας είναι η διάρκεια, το βάθος, ο χρόνος έναρξης καθώς επίσης και η ηλικία του νεογνού και η βαρύτητα της ΥΙ εγκεφαλικής βλάβης^{11,12}. Η ανάγκη, λοιπόν, ανεύρεσης αποτελεσματικής θεραπείας προκειμένου να μειωθεί η σοβαρότητα των μακροχρόνιων επιπλοκών της ΥΙΕ είναι εμφανής. Έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς την κατεύθυνση ανεύρεσης νευροπροστατευτικών παραγόντων με πλειοτροπικές δράσεις (ερυθροποιητίνη, N-ακετυλοκυστεΐνη, μελατονίνη), οι οποίοι χορηγούμενοι μόνοι τους αλλά και σε συνδυασμό με την υποθερμία θα μπορούσαν να δράσουν αθροιστικά ή συνεργικά διευρύνοντας το «θεραπευτικό παράθυρο» και αυξάνοντας έτσι τη νευροπροστασία.^{13,14} (Σχήμα 2).

Στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας του ΑΠΘ τα τελευταία 25 χρόνια εφαρμόζεται πειραματικό μοντέλο υποξίας-ισχαιμίας σε επίμνες 7 ημερών και γίνονται μελέτες σχετικές με την παθοφυσιολογία και τη θεραπευτική προσέγγιση της ΥΙΕ (χορήγηση MgSO₄, κεταμίνης, ερυθροποιητίνης, G-CSF, N-ακετυλοκυστεΐνης, ρεοβεραιτρίνης, εφαρμογή εμπλουτισμένου περιβάλλοντος)^{15-19,25,27,30,49,52,68}. Στην παρούσα ανασκόπηση θα γίνει αναφορά στους νευροπροστατευτικούς παράγοντες που έχουν μελετηθεί σε πειραματικό και κλινικό επίπεδο και ο ρόλος των οποίων στην ΥΙΕ έχει διερευνηθεί στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας.

Ερυθροποιητίνη

Η ερυθροποιητίνη (EPO) έχει συγκεντρώσει τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος του ερευνητικού ενδιαφέροντος για τον ρόλο της στον εγκέφαλο σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές συνθήκες^{20,21}. Η δράση της στον εγκέφαλο διαμεσολαβείται μέσω του ειδικού υποδοχέα της (EPOR), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων των κυτταροκινών τύπου I και θεωρείται ότι διαφέρει, τουλάχιστον σε ότι αφορά τη συγγένεια προς την EPO και το μοριακό βάρος, από τον υποδοχέα που συμμετέχει στην αιμοποίηση²². Η έκφραση της EPO και του υποδοχέα της στο ΚΝΣ εντοπίζεται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (νευρώνες, αστροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα) και σε μεγάλο αριθμό περιοχών (ιππόκαμπος, φλοιός, μέσος εγκέφαλος, αμυγδαλή, έσω κάψα)^{23,24}. In vitro και in vivo μελέτες σε τρωκτικά και στον άνθρωπο έχουν δείξει ότι η έκφραση του συμπλέγματος EPO/EPOR επάγεται σε υποξικές ή/και ισχαιμικές συνθήκες, ενώ αντίθετα η απουσία έκφρασής τους στον φυσιολογικό εγκέφαλο μειώνει την επιβίωση των νευρικών κυττάρων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην υποκοιλιακή ζώνη. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν σημαντικές ενδείξεις που υποδηλώνουν έναν πιθανό ρόλο του συμπλέγματος αυτού ως ενδογενές προστατευτικό σύστημα^{25,26}. Η χορήγηση της EPO σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ΥΙΕ νεογνών έδειξε ότι προσφέρει νευροπροστασία περιορίζοντας σημαντικά την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης και τα αισθητικοκινητικά και γνωστικά ελλείμματα^{27,28}.

Οι πλειοτροπικές δράσεις της EPO, μέσω των οποίων ασκεί τον νευροπροστατευτικό της ρόλο, αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν



Σχήμα 1. Οι φάσεις του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της εγκεφαλικής YI βλάβης.

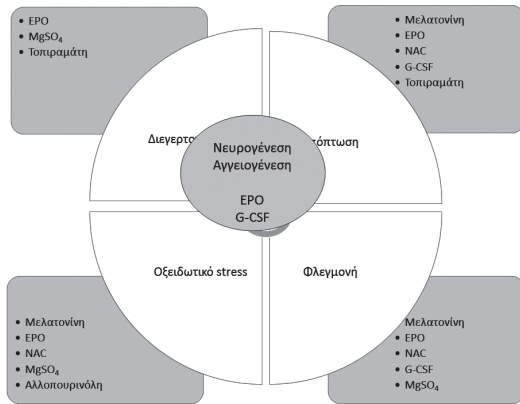
πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας νεογέννητων και ενήλικων πειραματόζωων έδειξαν ότι η EPO δρα προστατευτικά μέσω: α) της ελάττωσης της τοξικότητας του γλουταμινικού οξέος (excitotoxicity), παρεμποδίζοντας την εξωκυττάρωση του νευροδιαβιβαστή αλλά και τη δέσμευσή του στους μετασυναπτικούς γλουταμινεργικούς υποδοχείς (NMDA και non-NMDA)²⁹, β) της αντι-αποπτωτικής της δράσης, ενεργοποιώντας ενδοκυττάρους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς σηματοδότησης (JAK2, PI3-K/Akt, NF-kB) και επάγοντας την έκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων (Bcl-2/Bcl-xL)^{30,31}, γ) της αντι-οξειδωτικής της δράσης, μειώνοντας την έκφραση της επαγωγίσιμης συνθάσης του NO (iNOS), αυξάνοντας τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων στους νευρώνες (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καταλάση, υπεροξειδική διομοτάση) και περιορίζοντας τελικά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών³² και δ) της αντι-φλεγμονώδους δράσης, τροποποιώντας την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και ελέγχοντας έτσι την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών³³. Επιπρόσθετα, καθοριστική δράση της EPO θεωρείται η συμμετοχή της σε μηχανισμούς αναγέννησης και επιδιόρθωσης του εγκεφαλικού ιστού. Έχει βρεθεί ότι η χορήγησή της μετά από ένα YI επεισόδιο διεγείρει τη νευρογένεση, την ολιγοδενδρογένεση και την αγγειογένεση, προάγει τη μετανάστευση των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή της βλάβης και επάγει την έκφραση γονιδίων τα οποία συμμετέχουν σε μηχανισμούς συναπτικής πλαστικότητας (BDNF, Erg)^{34,35,36}.

Με βάση τα ενθαρρυντικά δεδομένα που έχουν προσφέρει μέχρι τώρα οι πειραματικές μελέτες σχετικά με την αποτελεσματική νευροπροστατευτική δράση, το ασφαλές προφίλ της EPO και την παρουσία ενός εκτεταμένου «θεραπευτικού παραθύρου» που εκτείνεται ακόμη και 6 ώρες μετά την έναρξη της υποξικής-ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης, έχουν σχεδιαστεί κλινικές μελέτες που αφορούν πρόωρα και τελειόμνα νεογνά. Ο μεγαλύτερος προβληματισμός που διατυπώθηκε αφορά στις δόσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μελέτες, προκειμένου να εμφανίσει η EPO τη νευροπροστατευτική δράση και οι οποίες είναι αρκετά υψηλότερες (1000-5000 U/kg/δόση) σε σύγκριση με αυτές που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την πρόληψη και θεραπεία την αναιμίας στα πρόωρα νεογνά.

Πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση υψηλής δόσης EPO (500-3000U/kg/δόση) σε πρόωρα νεογνά εμφάνισε καλή ανοχή και ασφάλεια χωρίς να προκαλέσει σημαντικές επιπλοκές και βελτίωσε την ωρίμανση της λευκής ουσίας χωρίς όμως να παρατηρηθεί καμία διαφορά κατά τη νευροαναπτυξιακή εκτίμηση 2 χρόνια μετά^{37,38,39}. Ενδείξεις νευροπροστασίας παρατηρήθηκαν σε μελέτες φάσης I και II, στις οποίες διερευνήθηκε το ασφαλές προφίλ και η αποτελεσματικότητα υψηλής δόσης EPO (1000 U/kg/δόση) όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό με υποθερμία σε τελειόμνα νεογνά με YIE. Η νευροαναπτυξιακή εκτίμηση των νεογνών στην ηλικία των 12 ή 22 μηνών έδειξε χαμηλή συχνότητα εμφάνισης μέτριας-σοβαρής δυσλειτουργίας και με βάση τα ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας μείωση της βαρύτητας της εγκεφαλικής βλάβης^{13,40}. Σημαντικός αριθμός μελετών φάσης II-IV που αφορούν στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της EPO σε διάφορες εγκεφαλικές παθήσεις πρόωρων ή τελειόμνων νεογνών βρίσκονται σε εξέλιξη⁴¹. Οι πλειοψηφικές ιδιότητες της EPO, μέσω των οποίων δρα σε πολλαπλά επίπεδα του παθοφυσιολογικού μηχανισμού της YIE, την καθιστούν έναν από τους πιο κατάλληλους υποψήφιους θεραπευτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση της YIE και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την ανεύρεση της βέλτιστης δοσολογίας και του θεραπευτικού σχήματος που θα προσφέρει τη καλύτερη δυνατή προστασία.

N-ακετυλοκυστεΐνη

Η N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine, NAC), η ακετυλιωμένη παραλλαγή του αμινοξέος L-cysteine, είναι μία άριστη πηγή σουλφυδρυλικών (SH) ομάδων, η οποία συμβάλλει στη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH) και του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ενώ θεωρείται επίσης ότι σχετίζεται με την αιματική ροή στη μικροκυκλοφορία και την ιστική οξυγόνωση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως βλεννολυτικός παράγοντας σε ποικίλες ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και ως αντίδοτο στην ηπατοτοξικότητα της ακεταμινοφένης. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι εμφανίζει ευεργετικά αποτελέσματα σε καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από μειωμένη GSH και οξειδωτικό stress, όπως οι καρδιακές παθήσεις, ο καρκίνος, το κάπνισμα, η HIV λοίμωξη⁴². Η αντιοξειδωτική δράση της NAC σχετίζεται με την ιδιότητά της να λειτουργεί ως «εκκαθαριστής» ελευθέ-



Σχήμα 2. Πιθανοί νευροπροστατευτικοί παράγοντες στην αντιμετώπιση της ΥΙΕ και θέσεις δράσης στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό.

ρων ριζών (free radical scavenger) και να ρυθμίζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλουταθειόνης, αποτρέποντας έτσι την τοξική δράση των ελευθέρων ριζών και δρώντας ταυτόχρονα και ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Η αγγειοδιασταλτική της δράση συνδέεται με τη συμμετοχή της στην παραγωγή και δράση του NO. Με βάση τα παραπάνω χαρακτηριστικά η NAC χαρακτηρίστηκε ένας δυναμικά νευροπροστατευτικός παράγοντας με πολλαπλές δράσεις. Μέχρι τώρα, αρκετές από τις παραπάνω δράσεις της NAC έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας ενήλικων πειραματόζωων και έχει επιβεβαιωθεί ο νευροπροστατευτικός της ρόλος, ο οποίος συνδέθηκε με αύξηση του επαγόμενου παράγοντα από την υποξία (HIF-1), περιορισμό της φλεγμονής, μείωση της απόπτωσης, μείωση της παραγωγής του NO, αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων και τελικά μείωση της έκτασης του εμφράκτου αλλά και των νευρολογικών ελλειμμάτων^{43,44,45}. Σε πειραματικά μοντέλα νεογνικής ΥΙ εγκεφαλικής βλάβης, η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης και αντιαποπτωτική δράση της NAC επιβεβαιώθηκε όταν χορηγήθηκε σε ένα εύρος δόσεων από 50-200mg/kg^{46,47}. Η NAC βρέθηκε ότι μειώνει την ΥΙ εγκεφαλική βλάβη και βελτιώνει τις αισθητικοκινητικές λειτουργίες και ότι η προστατευτική αυτή δράση αυξάνεται όταν χορηγείται σε συνδυασμό με την ερυθροποιητίνη⁴⁸. Επιπρόσθετα η χορήγησή της σε συνδυασμό με την εφαρμογή της υποθερμίας έδειξε ότι προσφέρει νευροπροστασία, μειώνοντας την έκταση της βλάβης, αυξάνοντας την έκφραση της μυελίνης και βελτιώνοντας τα λειτουργικά ελλείμματα. Η νευροπροστατευτική αυτή δράση βρέθηκε ότι είναι εξαρτώμενη από το φύλο^{43,49}.

Δυστυχώς μέχρι τώρα δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να αφορούν στη δράση της NAC στην ΥΙ εγκεφαλοπάθεια. Το ευρύ φάσμα δράσεων που εμφανίζει, η συμμετοχή της σε ενδογενείς βιοχημικές οδούς, η δυνατότητά της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τον πλακούντα-ανάλογα με τη δόση και την οδό χορήγησης- την καθιστά δυναμικά κατάλληλο προστατευτικό παράγοντα. Παρ' όλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη ότι η φαρμακοκινητική της NAC στα πρόωρα νεογνά εξαρτάται από το σωματικό βάρος και την ηλικία κύησης και

ότι η υψηλή δόση (1000mg/kg) σε πειραματικό μοντέλο νεογνικής ΥΙΕ επιδείνωσε τις ΥΙ αλλοιώσεις, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διερευνηθεί η δοσολογία, ο τρόπος και η διάρκεια χορήγησης που θα μπορούσε να προσφέρει το καλύτερο δυνατό προστατευτικό αποτέλεσμα σε διάφορες νευρολογικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένου της ΥΙΕ^{50,51}.

Αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF)

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες σχετικά με τη χρήση των αυξητικών παραγόντων για νευροπροστασία. Τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι πολύ ενθαρρυντικά για την ερυθροποιητίνη σε διάφορα νοσήματα του νευρικού συστήματος. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF) διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο ΚΝΣ με βασικούς κυτταρικούς μηχανισμούς δράσης παράλληλους με εκείνους που έχει στο αιμοποιητικό σύστημα και παρόμοιους σε μεγάλο βαθμό με εκείνους της ερυθροποιητίνης^{52,53}.

Πρόσφατα δεδομένα από πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του G-CSF είναι ζωτικής σημασίας τόσο στον υγιή εγκέφαλο όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις του εγκεφάλου. Η χορήγησή του σε υγιείς επίμυες, σε συνδυασμό με εξάσκηση νοητικών λειτουργιών, βελτίωσε τη χωρική μάθηση που εξαρτάται από τον ιππόκαμπο και αύξησε την επιβίωση των νεογέννητων νευρώνων στην οδοντωτή έλικα. Αντίθετα, ανεπάρκεια παραγωγής του G-CSF βρέθηκε ότι συνδέεται με μείωση των δενδριτικών απολήξεων των νευρώνων του ιππόκαμπου αλλά και των πρόδρομων νευρικών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα, καθώς και με διαταραχή των μηχανισμών νευρωνικής πλαστικότητας (μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση-LTP), η οποία εκφράζεται με διαταραχή των λειτουργιών της μνήμης και μάθησης^{54,55}.

Η αποτελεσματική δράση του G-CSF έχει περιγραφεί σε πειραματικά μοντέλα διαφόρων νευρολογικών παθήσεων π.χ. αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, αμνοτροφική πλάγια σκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές παθήσεις^{56,57}. Συγκεκριμένα, μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας/υποξίας υπογραμμίζουν τον νευροπροστατευτικό του ρόλο, δείχνοντας ότι η χορήγηση του αυξητικού παράγοντα μειώνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης και συμβάλλει σημαντικά στη λειτουργική αποκατάσταση^{58,59}.

Η βιολογική δράση του G-CSF στο ΚΝΣ εκδηλώνεται διαμέσου διέγερσης του ειδικού υποδοχέα του. Τόσο ο G-CSF όσο και ο υποδοχέας του εκφράζονται στα νευρικά κύτταρα σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα, πυρήνες εγκεφάλου, οφθαλμικός βολβός). Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι ο G-CSF εκφράζεται και στα αστροκύτταρα αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του εγκεφάλου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η είσοδός του στον εγκέφαλο μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω μεταφοράς δια του υποδοχέα του στα εγκεφαλικά τριχοειδή. Μετά τη σύνδεση με τον υποδοχέα του ο G-CSF συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων, κυρίως με την ενεργοποίηση των JAK / STAT, ERK / MAP και PI3K/ Akt ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης^{60,61}.

Η λειτουργία του G-CSF στον εγκέφαλο φαίνεται πως αντικατοπτρίζει τη δράση του στο αιμοποιητικό σύστημα: Αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και διεγείρει τη

διαφοροποίηση των προγονικών νευρικών κυττάρων. Η ευεργετική του δράση συνδυάζεται με αντιαποπτωτική και συστηματική αντιφλεγμονώδη δράση^{53,61}. Έχει βρεθεί ότι ενισχύει τη στρατολόγηση των προγονικών κυττάρων από το πλάγιο κοιλιακό τοίχωμα στις ισχαιμικές περιοχές και αυξάνει την νευρογένεση τόσο σε ισχαιμικές όσο και στον άθικτο υγιή ιστό και διεγείρει την αγγειογένεση. Σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας η χορήγηση του GCSF είχε ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τη μετανάστευσή τους μέσω της κυκλοφορίας και την εγκατάστασή τους στον ισχαιμικό ιστό. Η προστατευτική τους δράση σχετίστηκε είτε με αντικατάσταση των ισχαιμικών κυττάρων και αποκατάσταση των νευρωνικών κυκλωμάτων, είτε με αλληλεπίδρασή τους με τα εγκεφαλικά κύτταρα και διέγερση της παραγωγής από αυτά αυξητικών παραγόντων^{63,64}.

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες, στις οποίες διερευνήθηκε η νευροπροστατευτική δράση του G-CSF, αφορούν πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας ενήλικων πειραματόζωων, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί και στη μελέτη της δράσης του αυξητικού παράγοντα στον νεογνικό εγκέφαλο. Η πλειοψηφία των μελετών υποστηρίζει τον ευεργετικό ρόλο του G-CSF στην ΥΙΕ, η χορήγηση του οποίου οδήγησε σε μείωση της εγκεφαλικής βλάβης και αποκατάσταση των νευρολογικών ελλειμμάτων κυρίως μέσω της αντιαποπτωτικής, αντιφλεγμονώδους δράσης του αλλά και μέσω της κινητοποίησης μηχανισμών νευρωνικής πλαστικότητας⁶⁵⁻⁶⁷.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονισθεί ότι παρόλο που τα περισσότερα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν τον νευροπροστατευτικό ρόλο του G-CSF, υπάρχουν ορισμένες πειραματικές μελέτες με βάση τα αποτελέσματα των οποίων δεν αποδεικνύεται η ευεργετική του δράση. Οι αντικρουόμενες αυτές απόψεις οφείλονται κυρίως στη διαφορετική δοσολογία του G-CSF και στην εφαρμογή διαφορετικών πειραματικών μοντέλων (μόνιμη ή παροδική ισχαιμία). Με βάση τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές μελέτες που αφορούν στην επίδραση του G-CSF σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και οι οποίες έχουν δείξει ότι η χορήγησή του είναι καλά ανεκτή ακόμη και σε υψηλές δόσεις, χωρίς να προκαλεί σοβαρές επιπλοκές⁶⁸. Παρόλο που παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης του εμφράκτου, δε βρέθηκε καμία βελτίωση στα αποτελέσματα της κλινικής εκτίμησης⁶⁹. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να αφορούν στον ρόλο του G-CSF στην ΥΙΕ.

Μελατονίνη

Η μελατονίνη (N-ακετυλο-5-μεθοξυτροπταμίνη) παράγεται κυρίως από την επίφυση και τα επίπεδα των συγκεντρώσεών της στο αίμα αυξομειώνονται ακολουθώντας έναν ημερήσιο κύκλο, επιτρέποντας έτσι τη ρύθμιση του κερκάρδιου ρυθμού σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Εξαιτίας των λιπόφιλων ιδιοτήτων της, η μελατονίνη διασχίζει εύκολα τις περισσότερες κυτταρικές μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένου του πλακούντα και του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού⁷⁰. Η μελατονίνη ασκεί τη δράση της μέσω ειδικών υποδοχέων, αλλά και ανεξάρτητα από τη δέσμευσή της σε αυτούς ταυτόχρονα εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντι-αποπτωτική δράση, ρυθμίζοντας μηχανισμούς κυτταρικής σηματοδότησης και την έκφραση γονιδίων⁷¹⁻⁷³.

Η χορήγηση της μελατονίνης σε πειραματικά μοντέλα νεο-

γνικής υποξίας-ισχαιμίας έδειξε ότι μειώνει την έκταση της εγκεφαλικής βλάβης, περιορίζει τη βλάβη της λευκής ουσίας προάγοντας την ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων και βελτιώνει τα αισθητικοκινητικά και γνωστικά ελλείμματα⁷⁴⁻⁷⁶. Η προστατευτική της δράση θεωρείται ότι ασκείται μέσω της ενεργοποίησης αντι-οξειδωτικών^{71,72}, αντι-αποπτωτικών^{77,78} και αντι-φλεγμονωδών μηχανισμών^{79,80}. Έχει βρεθεί ότι η χορήγησή της μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, αυξάνει τη δραστηριότητα των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών παραγόντων, συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, επάγει αντιαποπτωτικούς και αναστέλλει αποπτωτικούς μηχανισμούς και καταστέλλει την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και ενζύμων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση (TNF-α, IL-6, κυκλοξυγενάση, συνθάση του NO).

Πρόσφατη κλινική μελέτη έδειξε ότι η συνδυασμένη χορήγηση της μελατονίνης με την εφαρμογή της υποθερμίας σε νεογέννητα με μέτρια ή σοβαρή υποξική-ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη μείωσε το οξειδωτικό στρες, βελτίωσε την επιβίωση και τα νευροαναπτυξιακά ελλείμματα στους 6 μήνες σε σύγκριση με την υποθερμία μόνη της⁸¹. Κλινικές μελέτες στις οποίες διερευνάται η αποτελεσματικότητα και η ασφαλής χορήγηση της μελατονίνης σε υψηλές και χαμηλές δόσεις, μεταγεννητικά σε πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά αλλά και προγεννητικά στη μητέρα βρίσκονται σε εξέλιξη⁸². Σύμφωνα με τα πρόσφατα πειραματικά δεδομένα η χορήγηση της μελατονίνης σε ένα ευρύ φάσμα δόσεων (0.005mg/kg-200mg/kg) έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της διαφόρων τύπων εγκεφαλικής βλάβης. Υπάρχουν επίσης σημαντικές ενδείξεις που υποστηρίζουν την ασφαλή προγεννητική και μεταγεννητική χορήγηση της μελατονίνης χωρίς τον κίνδυνο πρόκλησης τερατογένεσης ή άλλων τοξικών επιδράσεων^{83,84}. Ωστόσο απαιτείται η πραγματοποίηση περισσότερων μελετών προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη ελάχιστη δοσολογία, η οδός και η διάρκεια χορήγησης πριν τη μετάφραση των αποτελεσμάτων της έρευνας στην κλινική πράξη. Συμπερασματικά, μολονότι έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη βασική έρευνα, με στόχο την ανεύρεση και διερεύνηση του ρόλου διάφορων νευροπροστατευτικών παραγόντων στην ΥΙΕ, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να μεταφραστούν τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών στην κλινική πράξη. Απαιτείται, επίσης, η κατανόηση ορισμένων παθοφυσιολογικών μηχανισμών και ιδιαίτερα του ρόλου των ενδογενών νευροπροστατευτικών και αναγεννητικών μηχανισμών. Παρόλο που η υποθερμία, η οποία εφαρμόζεται ήδη στην κλινική πράξη και οι πιθανοί νευροπροστατευτικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, έχουν προσφέρει ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η συνδυαστική θεραπεία φαίνεται ότι συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και το πλεονέκτημα της δράσης σε διαφορετικές θέσεις-στόχους του παθοφυσιολογικού μηχανισμού, διευρύνοντας έτσι το «θεραπευτικό παράθυρο» και επιτυγχάνοντας μακροπρόθεσμα ευεργετικά αποτελέσματα σε ότι αφορά τη λειτουργική αποκατάσταση. Ωστόσο, παραμένουν ακόμα αναπάντητα τα ερωτήματα που αφορούν τη βέλτιστη δοσολογία και τον κατάλληλο χρόνο και διάρκεια χορήγησης των υποψήφιων θεραπευτικών παραγόντων, προκειμένου να εξασφαλισθεί η μεγαλύτερη δυνατή και μακροχρόνια νευροπροστασία χωρίς την παρουσία επιπλοκών.

New horizons in the treatment of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

Spandou E.

Laboratory of experimental Physiology, Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki.

Correspondence: Laboratory of experimental Physiology,
Faculty of Medicine, Aristotle University
of Thessaloniki.
E-mail: spandou@med.auth.gr,
Tel.: +30 6973202636

Summary

Despite major advances in perinatal medicine and knowledge in pathophysiology of brain ischemia, hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) remains a major cause of mortality and long-term morbidity. Currently, hypothermia is the only clinically effective intervention that improves the outcome of neonates with moderate-severe HIE. However, additional treatments that maximize neuroprotection and improve the prognosis of severe HIE are urgently needed. The most recent experimental and clinical studies have focused on promising neuroprotective agents that can act at multiple stages of the underlying pathophysiology of neonatal HIE. Erythropoietin, N-Acetylcysteine, G-CSF and melatonin are examples of neuroprotective agents that exert pleiotropic functions and most importantly increase the endogenous regenerative potential of the developing brain. However, further understanding of the mechanisms of HI brain injury and identification of the optimal combination therapy remain a significant challenge in the future.

Key words: Hypoxic-ischemic encephalopathy, erythropoietin, N-acetylcysteine, melatonin, G-CSF

Βιβλιογραφία

- Volpe JJ. Neurology of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2008.
- Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 2005;365:891-900.
- Ferriero DM. Controversies and advances in neonatal neurology: introduction. *Pediatric neurology* 2009;40:145-6.
- Hankins GD, Speer M. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 2003;102(3):628-36.
- Szylowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010;47:122-9.
- Lai, M.C.; Yang, S.N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011,2011, 609813.
- Iwata O, Iwata S, Bainbridge A, et al. Supra- and sub-baseline phosphocreatine recovery in developing brain after transient hypoxia-ischaemia: relation to baseline energetics, insult severity and outcome. *Brain* 2008;131(Pt 8):2220-6.
- Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatric research* 1994;36:699-706.
- Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 2011;69:743-58.
- Fleiss B, Gressens P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 2012;11:556-66.
- Davidson JO, Wassink G, van den Heuvel LG, Bennet L, Gunn AJ. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Where to from here? *Front Neurol.* 2015 Sep 14;6:198.
- Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr*

Opin Pediatr. 2015 Apr;27(2):152-7.

- Rogers EE, Bonifacio SL, Glass HC, Juul SE, Chang T, Mayock DE, Durand DJ, Song D, Barkovich AJ, Ballard RA, Wu YW. Erythropoietin and hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Neurol.* 2014 Nov;51(5):657-62.
- Nie X, Lowe DW, Rollins LG, Bentzley J, Fraser JL, Martin R, Singh I, Jenkins D. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neurosci Res.* 2016 Jul;108:24-33.
- Karalis F, Soubasi V, Georgiou T, Nakas CT, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O, Spandou E. Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2011 Nov 24;1425:98-110.
- Pazaiti A, Soubasi V, Spandou E, Karkavelas G, Georgiou T, Karalis P, Guiba-Tziampiri O. Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄. *Neonatology.* 2009;95(1):33-40.
- Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Augoustides-Savvopoulou P, Loizidis T, Pazaiti A, Karkavelas G, Guiba-Tziampiri O. Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci.* 2007 Oct;14(7):667-77.
- Spandou E, Karkavelas G, Soubasi V, Avgoustides-Savvopoulou P, Loizidis T, Guiba-Tziampiri O. Effect of ketamine on hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res.* 1999 Feb 20;819(1-2):1-7.
- Γρίβα Μ. Η επίδραση περιβάλλοντος με ενισχυμένα αισθητικοκινητικά/γνωσιακά ερεθίσματα και του αυξητικού παράγοντα των ουδετερόφιλων στην αποκατάσταση μετά από υποξική-ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια σε νεογέννητους επίμυες. Διδακτορική διατριβή, Ιατρική Σχολή, ΑΠΘ.
- Shein NA, Grigoriadis N, Alexandrovich AG, Simeonidou C, Spandou E, Tsenter J, Yatsiv I, Horowitz M, Shohami E. Differential neuroprotective properties of endogenous and exogenous erythropoietin in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2008 Feb;25(2):112-23.
- Merelli A, Czornyj L, Lazarowski A. Erythropoietin as a new therapeutic opportunity in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci.* 2015;125(11):793-7.
- Brines ML, Grasso G, Fiordaliso F et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-sub-unit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:14907-12.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 1998 Jan;43(1):40-9.
- Ott C, Martens H, Hassouna I, Oliveira B, Erck C, Zafeiriou MP, et al. Widespread expression of erythropoietin receptor in brain and its induction by injury. *Mol Med.* 2015 Sep 1. doi: 10.2119/molmed.2015.00192
- Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Kremenopoulos G, Guiba-Tziampiri O. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2004 Sep 24;1021(2):167-72.
- Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 2001 Mar;101(3):271-6.
- Spandou E, Papadopoulos Z, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Pazaiti A, Guiba-Tziampiri O. Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res.* 2005 May 31;1045(1-2):22-30.
- Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res.* 2004 Aug 12;153(1):77-86.
- Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(3):228-236.
- Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaiki-Astara A, Guiba-Tziampiri O. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett.* 2004 Aug 5;366(1):24-8.
- Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res.* 2005 Apr;57(4):481-7.
- Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate.* 2005;87(1):15-8.

33. Lan KM, Tien LT, Cai Z, Lin S, Pang Y, Tanaka S, Rhodes PG, Bhatt AJ, Savich RD, Fan LW. Erythropoietin Ameliorates Neonatal Hypoxia-Ischemia-Induced Neurobehavioral Deficits, Neuroinflammation, and Hippocampal Injury in the Juvenile Rat. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 26;17(3):289.
34. Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke.* 2007 Oct;38(10):2795-803.
35. Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. Enhancement of ventricular-subventricular zone derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives. *J Neurosci.* 2006 Jan 25;26(4):1269-74.
36. Mengozzi M, Cervellini I, Villa P, Erbayraktar Z, et al. Erythropoietin induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 12;109(24):9617-22.
37. Fauchère JC, Koller BM, Tschopp A, Dame C, Ruegger C, Bucher HU; Swiss Erythropoietin Neuroprotection Trial Group. Safety of high dose recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Brain.* 2015 Feb;138(Pt 2):388-97.
38. Natalucci G, Latal B, Koller B, Rügger C, Sick B, Held L, Bucher HU, Fauchère JC; Swiss EPO Neuroprotection Trial Group. Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016 May 17;315(19):2079-85.
39. Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: Pharmacokinetics and safety. *Pediatrics.* 2008 Aug;122(2):383-91.
40. Wu YW, Mathur AM, Chang T, McKinstry RC, Mulkey SB, et al. High dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy: A phase II trial. *Pediatrics.* 2016 Jun;137(6).
41. Rangarajan V1, Juul SE2. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol.* 2014 Oct;51(4):481-8.
42. Harrisson P, wendon Y, Gimson A. Improvement for acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. *N Eng J Med* 1991 324: 1852-57.
43. Nie X, Lowe DW, Rollins LG, Bentzley J, Fraser JL, Martin R, Singh I, Jenkins D. Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neurosci Res.* 2016 Jul;108:24-33.
44. Zhang Z, Yan J, Taheri S, Liu KJ, Shi H. Hypoxia-inducible factor 1 contributes to N-acetylcysteine's protection in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2014 Mar;68:8-21.
45. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res.* 15;76(4):519-27. 2004.
46. Jantzie LL, Cheung PY, Johnson ST, Bigam DL, Todd KG. Cerebral amino acid profiles after hypoxia-reoxygenation and N-acetylcysteine treatment in the newborn piglet. *Neonatology.* 2010;97(3):195-203.
47. Wang X, Svedin P, Nie C, Lapatto R, Zhu C, Gustavsson M, Sandberg M, Karlsson JO, Romero R, Hagberg H, Mallard C. N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol.* 2007 Mar;61(3):263-71.
48. Z Papadopoulou, E Spandou, C Simeonidou, I Papadopoulou, D Koutsonikolas and V Soubasi. Combination Therapy with Erythropoietin and N-Acetylcysteine Provides Pronounced Improvement of Long Lasting Sensorimotor and Neuropathological Disturbances following Perinatal Asphyxia in Rats. *Pediatric Research (2004) 56, 499-499.*
49. Jatana M, Singh I, Singh AK, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2006 May;59(5):684-9.
50. Aholo T, Fellman V, Laaksonen R, Laitila J, Lapatto R, Neuvonen PJ, Raivio KO. Pharmacokinetics of intravenous N-acetylcysteine in pre-term newborn infants. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999 Nov;55(9):645-50.
51. Παπαδοπούλου Ζ. Αντιμετώπιση των ισχαιμικών-υποξικών εγκεφαλικών βλαβών σε νεογνούς επίμυες. *Διαδακτορική διατριβή,* 2007.
52. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:2083-98.
53. Solaroglu I, Jadhav V, Zhang JH. Neuroprotective Effect of Granulocyte-Colony Stimulating Factor. *Frontiers in Bioscience* 2007;12:712.
54. Diederich K, Schäbitz W-R, Kuhnert K, Hellström N, Sachser N, Schneider A, et al. Synergetic effects of granulocyte-colony stimulating factor and cognitive training on spatial learning and survival of newborn hippocampal neurons. *PLoS one* 2009;4:e5303.
55. Diederich K, Sevimli S, Dörr H, Kösters E, Hoppen M, Lewejohann L, et al. The role of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in the healthy brain: a characterization of G-CSF-deficient mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2009;29:11572-8
56. Sanchez-Ramos J, Song S, Sava V, Catlow B, Lin X, Mori T, et al. Granulocyte colony stimulating factor decreases brain amyloid burden and reverses cognitive impairment in Alzheimer's mice. *Neuroscience* 2009;163:55-72.
57. Meuer K, Pitzer C, Teismann P, Krüger C, Göricke B, Laage R, et al. Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 2006;97:675-86.
58. Schäbitz W-R, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2003;34:745-51.
59. Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz W-R. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008;39:1855-61.
60. Zhao L-R, Navalitloha Y, Singhal S, Mehta J, Piao C-S, Guo W-P, et al. Hematopoietic growth factors pass through the blood-brain barrier in intact rats. *Experimental neurology* 2007;204:569-73.
61. Xiao B-G, Lu C-Z, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007;11:1272-90.
62. Ridwan S, Bauer H, Frauenknecht K, Hefti K, von Pein H, Sommer CJ. Distribution of the hematopoietic growth factor G-CSF and its receptor in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *J Anat.* 2014 Apr;224(4):377-91.
63. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:2083-98.
64. Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *European journal of pharmacology* 2003;458:327-8.
65. Li L, McBride DW, Doycheva D, Dixon BJ, Krafft PR, Zhang JH, Tang J. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol.* 2015 Oct;272:135-44.
66. Kim BR, Shim JW, Sung DK, Kim SS, Jeon GW, Kim MJ, Chang YS, Park WS, Choi ES. Granulocyte stimulating factor attenuates hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting apoptosis in neonatal rats. *Yonsei Med J.* 2008 Oct 31;49(5):836-42.
67. Griva M, Kokaraki G, Georgiou T, Karalis F, Simeonidou C, Grigoriadis N, Soubasi V, Spandou E. G-CSF prevents long-term behavioral deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Pediatr. Res* 2010, SUPPL 1:60
68. Schabitz WR, Laage R, Vogt G, et al. AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2010; 41:2545-51.
69. Ringelstein EB, Thijs V, Norrving B, Chamorro A, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke: results of the AX200 for Ischemic Stroke trial. *Stroke.* 2013 Oct;44(10):2681-7.
70. Menendez-Pelaez, A.; Reiter, R.J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 1993, 15, 59-69.
71. Eskioçak, S.; Tutunculer, F.; Basaran, U.N.; Taskiran, A.; Cakir, E. The Effect of melatonin on protein oxidation and nitric oxide in the brain tissue of hypoxic neonatal rats. *Brain Dev.* 2007, 29, 19-24.
72. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119-30.
73. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* 2007;52:11-28.
74. Carloni, S.; Perrone, S.; Buonocore, G.; Longini, M.; Proietti, F.; Balduini, W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J. Pineal Res.* 2008, 44, 157-164.
75. Alonso-Alconada, D.; Alvarez, A.; Lacalle, J.; Hilario, E. Histological study of the protective effect of melatonin on neural cells after neonatal hypoxia-ischemia. *Histol. Histopathol.* 2012, 27, 771-783.
76. Cetinkaya, M.; Alkan, T.; Ozyener, F.; Kafa, I.M.; Kurt, M.A.; Koksak, N. Possible neuroprotective effects of magnesium sulfate and melatonin as both pre- and post-treatment in a neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Neonatology* 2011,

99, 302–310.

77. Wang, X. The antiapoptotic effects of melatonin in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and adult ischemic stroke. *J Neurosurg Spine* 2, 133

78. Kilic, U.; Kilic, E.; Reiter, R.J.; Bassetti, C.L.; Hermann, D.M. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J. Pineal Res.* 2005, 38, 67–71.

79. Balduini, W.; Carloni, S.; Perrone, S.; Bertrando, S.; Tataranno, M.L.; Negro, S.; Proietti, F.; Longini, M.; Buonocore, G. The use of melatonin in hypoxic-ischemic brain damage: An experimental study. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 2012, 25, 119–124.

80. Pei, Z.; Cheung, R.T. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res.* 2004, 37, 85–91.

81. Aly H et al., 2015 Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia : a randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* 35, 186-191

82. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol.* 2014 Mar;41(1):119-31.

83. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *Journal of pineal research* 2001;31:343–9.

84. Gitto, E.; Reiter, R.J.; Cordaro, S.P.; La Rosa, M.; Chiurazzi, P.; Trimarchi, G.; Gitto, P.; Calabro, M.P.; Barberi, I. Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: Beneficial effects of melatonin. *Am. J. Perinatol.* 2004, 21, 209–216.