

Andreea Avasiloaiei, Maria Stamatina  
IMPLICAREA STRESULUI OXIDATIV ÎN ASFIXIA PERINATALĂ  
*Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa", Iași,  
Departamentul Medicina Mamei și Copilului, Disciplina de Neonatologie*

SUMMARY

THE INVOLVEMENT OF OXIDATIVE STRESS IN PERINATAL ASPHYXIA

**Key words: perinatal asphyxia, neuronal injury, biochemical markers.**

*Perinatal asphyxia complicated with multiorganic hypoxic-ischaemic injuries represents, despite current advances in neonatal medicine, the leading cause of morbidity and mortality in both term and premature newborns. The mechanisms of neuronal damage are heterogeneous and include the participation of circulatory, metabolic and biochemical factors. Various biochemical markers have been studied in order to determine the origin and the extension of neuronal injury, as well as the involvement of oxidative stress in its' pathogenesis. Up to this moment, there is no unique molecule to offer information on all studied parameters, but when used together, the markers we studied can provide useful data regarding the moment, extension and outcome of the neuronal injury, thus orienting therapy.*

REZUMAT

**Cuvinte cheie: asfixie perinatală, leziune neuronală, markeri biochimici.**

*Asfixia perinatală complicată cu leziuni hipoxice-ischemice multiorganice reprezintă, în pofida progreselor actuale din medicina neonatală, cea mai importantă cauză de morbiditate și mortalitate perinatală la nou-născutul la termen și prematur. Mecanismele lezionale sunt heterogene și au loc cu participarea factorilor etiologici circulatori, metabolici și biochimici. Variații markeri biochimici sunt studiați pentru a determina originea și extensia leziunilor neuronale, precum și implicarea stresului oxidativ în dezvoltarea acestora. Până în momentul actual, nu există o singură moleculă care să ofere informații asupra tuturor parametrilor studiați, dar, utilizați împreună, markerii expuși pot oferi date valoroase privind momentul, extensia și evoluția leziunilor, orientând astfel demersul terapeutic.*

Asfixia perinatală reprezintă una dintre cele mai frecvente cauze de leziuni cerebrale la nou-născutul la termen și prematur și este responsabilă de aproape un sfert din decesele survenite în perioada neonatală. Alți 25% dintre nou-născuții afectați prezintă sechele neurologice permanente, inclusiv paralizie cerebrală, întâzieri de dezvoltare neurologică, tulburări de învățare, tulburări vizuale și auditive, precum și tulburări din spectrul autist.

Mecanismul leziunilor cerebrale post-hipoxice este extrem de heterogen și include o varietate de factori:

- circulatori – dereglarea fluxului sanguin cerebral;
- biochimici: creșterea aminoacizilor excitatori, depolarizări membranare, scăderea metabolismului energetic neuronal, supraproducția de radicali liberi, activarea sintezei oxidului nitric, eliberarea de citokine, acumularea în exces a fierului, etc.

- metabolici celulari: intensificarea metabolismului anaerob, scăderea ATP-ului, hipoglicemia, hiperlactacidemia, etc.

Acești factori acționează și interacționează printr-o varietate de mecanisme:

**Hipoxia**

În timpul hipoxiei, modificările receptorului NMDA duc la creșterea influxului intracelular și intranuclear de Ca<sup>++</sup> prin activarea IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub> și ATP-azei cu afinitate mare pentru Ca<sup>++</sup>. Acest influx este proporțional cu gradul hipoxiei. Ca<sup>++</sup> activează proteazele, fosfolipazele și NO sintaza, care ajută la eliberarea radicalilor liberi de oxigen, peroxidarea lipidelor membranei nucleare și activarea endonucleazelor, care la rândul lor determină fragmentarea ADN-ului nuclear. Oxidul nitric afectează neuronii reacționând cu superoxidul pentru a forma peroxinitrit, un radical liber toxic, cunoscut pentru lezarea membranei celulare prin activarea Ca<sup>++</sup> ATP-azei și introducerea suplimentară a Ca<sup>++</sup> în celulă, printr-un mecanism de feed-back pozitiv.

**Ischemia**

Dacă leziunea ischemică survine devreme în cursul gestației și nou-născutul se naște prematur, unele oligodendrocite în curs de dezvoltare se pierd. Preoligodendrocitele și celulele progenitoare de oligodendrocite par să fie mai vulnerabile la injuria ischemică decât oligodendrocitele mature. În cazul nou-născu-

tului la termen cu leziuni ischemice, neuronii de la nivelul nucleilor profunzi și din cortexul perirolandic sunt mai predispuși la lezare, în timp ce neuronii care produc NO-sintetază sunt mai rezistenți. În ganglionii bazali, neuronii producători de NO-sintetază participă la procesele de stres oxidativ și excitotoxicitate, ceea ce determină moartea celulelor învecinate.

### **Stresul oxidativ**

Stresul oxidativ este generat de un dezechilibru între generarea excesivă de compuși de oxigen și insuficiența mecanismelor antioxidante de apărare. S-a demonstrat că în cursul dezvoltării fetale și neonatale, creierul nu beneficiază de suficiente sisteme antioxidante, iar răspunsul acestora la stresul oxidativ este mai slab comparativ cu componentele antioxidante din creierul adult.

Radicalii liberi de oxigen sunt generați printr-o varietate de mecanisme: hipoxie, ischemie, reperfuție, hiperoxie. Asfixia este caracterizată prin perioade prelungite de ischemie și hipoxie, care conduc la modificări celulare specifice care afectează activitatea enzimatică, funcțiile mitocondriale, structura citoscheletului, transportul transmembranar și apărarea antioxidantă. Toate aceste modificări predispun țesuturile la leziuni de reoxigenare. În timpul hipoxiei, disponibilitatea limitată a oxigenului scade fosforilarea oxidativă, ceea ce determină incapacitatea de sinteză a fosfaților, inclusiv ATP și fosfocreatină. Pompa membranară Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-dependență este alterată, favorizând influxul de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> și apă în celulă, producând edem citotoxic, în plus față de alte numeroase căi metabolice care lezează componentele structurale ale celulei. Mai mult, catabolismul adenin-nucleotidelor în timpul ischemiei determină acumularea intracelulară de hipoxantină, care este mai apoi convertită în specii reactive de oxigen.

În endoteliu, ischemia determină expresia anumitor produși inflamatori (molecule de adeziune leucocitară, citokine) și agenți bioactivi (endoteline, TxA<sub>2</sub>) și inhibă expresia altor produși protectori (prostaciclina, oxid nitric). Deci ischemia induce un status proinflamator care crește vulnerabilitatea tisulară la leziunile prin reperfuție.

Reperfuția/reoxigenarea țesuturilor ischemiate determină formarea speciilor reactive de oxigen. În mod normal, hipoxantina acumulată în timpul fazei ischemice este oxidată de xantin-dehidrogenază în xantină în acele celule care conțin această enzimă. Totuși, în timpul ischemiei, xantin-dehidrogenaza este convertită în xantin-oxidază. Xantin-oxidaza folosește oxigen, deci în timpul ischemiei nu poate cataliza transformarea hipoxantinei, ceea ce rezultă în acumularea tisulară de hipoxantină. Când oxigenul este reintrodus în timpul reperfuziei, hipoxantina se transformă sub acțiunea xantin-oxidazei în specii reactive de oxigen și în prezența oxidului nitric în specii reactive de azot.

Speciile reactive de oxigen și azot sunt agenți puternici reducători și oxidanți, cu acțiune lezională directă asupra structurilor celulare, de peroxidare a membranelor, proteinelor și enzimelor structurale și acizilor nucleici. În plus, sunt regulatori importanți ai căilor de semnalizare intracelulară care modulează sinteza de ADN și ARN, proteine, activarea enzimatică și influențează direct ciclul celular. În condiții de hipoxie, radicalul superoxid intră în spațiul extracelular cerebral unde se transformă în peroxid de hidrogen prin conversia de către superoxid dismutază (SOD). În condiții normale, când sistemele antioxidante funcționează, peroxidul de hidrogen este redus la apă sub acțiunea glutatation peroxidazei sau catalazei. Deoarece sistemele antioxidante ale nou-născutului sunt imature și lichidul cefalo-rahidian conține concentrații micromolare de fier liber, peroxidul de hidrogen reacționează în cadrul unei reacții catalizate de fier (Fenton) cu radicalul superoxid pentru a produce radicali hidroxil.

### **Excitotoxicitatea**

Observațiile clinice asupra nou-născuților cu EHI au demonstrat că hipoxia și ischemia determină scăderi ale nivelurilor de ATP și creșteri ale lactatului din cauza metabolismului anaerob al glucozei, ceea ce determină modificări ale ionilor, depolarizări membranare și eliberarea glutamatului. Leziunile celulare și modificările energetice induc o creștere dramatică a glutamatului, care se acumulează la nivelul sinapsei, în momentul în care astrocitele devin incapabile să realizeze un clearing adecvat. În cazul nou-născuților cu asfixie perinatală, concentrația de glutamat la nivelul lichidului cefalo-rahidian este semnificativ crescută în primele 16 ore postnatal. Efectele toxice ale acestor niveluri mari de glutamat asupra țesuturilor cerebrale sunt cunoscute ca excitotoxicitate și dăunează mult creierului în curs de dezvoltare, precedând moartea celulară prin necroză și apoptoză. Activarea excesivă a neurotransmisiei glutamatergice duce la moarte celulară. Factorul declanșator inițial poate fi un defect de preluare a glutamatului de către celulele gliale, ceea ce are ca rezultat supraactivarea receptorilor. Celulele precursorale ale oligodendrocitelor conțin receptori glutamatergici și receptori pentru acid kainic. Datele experimentale indică faptul că blocada acestor receptori protejează împotriva leziunilor hipoxic-ischemice ale substanței albe.

Producția de NO de către neuronii rezistenți la leziunile hipoxic-ischemice depinde de cuplarea și activarea receptorilor pentru NMDA și de intrarea calciului în celulele de la nivelul talamusului și ganglionilor bazali. Când oxidul nitric este produs în exces în aceste regiuni în timpul unei perioade de stres oxidativ, aceasta contribuie la producția de radicali liberi. Totuși, neuronii imaturi producători de oxid nitric sunt ei înșiși rezistenți atât la leziunea hipoxic-ischemică, cât și la excitotoxicitatea mediată de NMDA. Aceste celule devin vulnerabile pe măsură ce se maturizează. În

regiunile unde există receptori NMDA imaturi, cum ar fi ganglionii bazali, neuronii care produc NO-sintetază sunt abundenți. Eliminarea acestor neuroni și întreruperea complexului postsinaptic care leagă NMDA la aceștia determină reducerea leziunii ischemice.

### **Inflamația**

Infecția maternă se asociază cu leziuni ale substanței albe în cazul creierului imatur. Un studiu populațional care a folosit paralizia cerebrală ca măsură a lezării cerebrale neonatale sugerează corioamniotita ca fiind un factor de risc independent pentru paralizia cerebrală în cazul nou-născuților la termen, din cauza creșterii antenatale a expresiei citokinelor pro-inflamatorii (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-9) în lichidul amniotic, în circulația fetală și în lichidul cefalo-rahidian. Acumularea neutrofilelor la nivelul vaselor sanguine cerebrale și activarea acestora par să fie verigi de legătură între expunerea la infecție în utero și leziunea cerebrală ischemică. Markerii inflamatori din lichidul amniotic al femeilor aflate în travaliu prematur sau din sângele cordonului ombilical au fost asociați cu defecte ale mielinizării, leucomalacia periventriculară și paralizia cerebrală ulterioare. Originea celulară a mediatorilor inflamației care par să exacerbeze leziunile hipoxic-ischemice este încă neclară. Mediatorii care sunt produși la nivel sistemic (de către mamă sau făt) afectează sistemul nervos central fie prin mecanisme vasculare, fie prin traversarea barierei hemato-encefalice și acțiune directă asupra parenchimului cerebral. Modelele animale au arătat că administrarea de lipopolizaharid în doze mici înaintea injuriei hipoxic-ischemice crește această afectare, demonstrând faptul că inflamația acționează ca un factor predispozant, făcând creierul mai susceptibil la un al doilea factor stresant – leziunea hipoxic-ischemică (proces de sensibilizare). Mecanismele sensibilizării nu sunt în întregime cunoscute, dar ar putea include modificări ale transcripției unor gene și modificarea activității receptorilor pentru glutamat.

Inflamația este, pe de altă parte, provocată de necroza neuronală, un proces pasiv de edematiere celulară, distrugere a organitelor celulare și pierdere a integrității membranare. Inflamația duce la creșterea nivelului de glutamat, care la rândul său induce apoptoză.

### **Apoptoza**

Mulți dintre efectorii morții celulare programate care intervine în dezvoltarea normală sunt bine reprezentate la nivelul creierului, făcându-l susceptibil la activarea accidentală a apoptozei. În momentul expunerii celulelor la diferiți factori stresanți, sunt posibile declanșarea și supraactivarea căilor metabolice care conduc la moartea celulară. Stresul oxidativ este unul din mecanismele care pot declanșa apoptoza la nivelul creierului imatur.

Moartea celulară programată este un proces activ, care implică activarea cascadei caspazelor (3, 8, 9), un pas cheie în fragmentarea ADN-ului. Caspaza 3 acti-

vată fragmentează numeroase proteine intracelulare, cum ar fi actina, fodrina și lamininele, care mențin structura celulară. De asemenea, inactivează numeroase enzime cum ar fi PARP, enzimă de reparare a ADN-ului, și ICAD, ceea ce duce la încetarea reparării ADN și activarea ADN-azei dependente de caspaze, care determină fragmentarea ADN-ului cromosomal. Această secvență duce la modificările celulare și nucleare caracteristice apoptozei. Cascada caspazelor poate fi activată pe cale intrinsecă sau extrinsecă. Mecanismul intrinsec sau calea dependentă de mitocondrii activează caspazele 3 și 9, este declanșat de eliberarea de citocrom C din mitocondrie și este controlat de familia de receptori Bcl-2, iar mecanismul extrinsec care activează caspaza 8 este declanșat de activarea receptorilor apoptotici, un subgrup al superfamiliei receptorilor factorilor de necroză tumorală. Apoptoza joacă un rol important în evoluția leziunilor hipoxic-ischemice cerebrale la nou-născut și poate fi chiar mai importantă decât necroza în faza postleziunală. Semnalele receptorilor citokinici apoptotici determină necroză mediată de oxid nitric când inhibitorii endogeni ai apoptozei sunt abundenți și determină apoptoză când inhibitorii sunt deficitari.

Precursorii oligodendroglii proliferază și mor prin apoptoză controlată de factori trofici, cum ar fi factorul de creștere derivat din plachete și factorul de creștere insulin-like. Activarea receptorilor citokinici pe suprafața oligodendrocitelor poate duce la moartea acestor celule. Oligodendrocitele sunt vulnerabile și la stresul oxidativ din cauza depleției de glutatation. Inflamația duce la creșterea nivelului de glutamat, care la rândul său induce apoptoză. Toxicitatea glutamatului depinde de stadiul maturării oligodendrocitelor și este mediată de receptorul AMPA.

### **Markeri biochimici ai stresului oxidativ în afectarea neurologică perinatală**

**Capacitatea antioxidantă totală a serului (TAS)** măsoară acțiunea cumulativă a tuturor antioxidantilor prezenți în plasmă, furnizând un parametru integrat, spre deosebire de simpla sumă a antioxidantilor măsurabili. Se evaluează capacitatea antioxidantilor cunoscuți și necunoscuți și interacțiunea lor sinergică, oferind o privire de ansamblu asupra echilibrului fragil in vivo între oxidanți și antioxidanți. Măsurarea TAS poate ajuta în evaluarea factorilor fiziologici, nutriționali și de mediu care influențează statusul redox al organismului și în identificarea condițiilor care pot afecta acest status (expunerea la ROS, suplimentarea cu antioxidanți, precum și absorbția și biodisponibilitatea acestora).

**Malon dialdehida (MDA)**, metabolitul înalt reactiv rezultat în urma peroxidării acizilor grași cu trei sau mai multe duble legături și care este un indiciu al peroxidării lipidice, persistând un timp îndelungat în plasmă, este cauza formării legăturilor "cross-linking", a polimerizării componentelor membranari și ai reacțiilor cu bazele azotate din structura ADN. Concentrațiile

plasmatice ale MDA cresc de până la 4 ori în 12-24 ore de la leziunile determinate de asfixia perinatală. Nivelurile crescute ale MDA pot fi asociate cu deficitul de glucoză-6-fosfat dehidrogenază, deoarece aceasta are un rol important în menținerea nivelului de glutatation, important în combaterea peroxidării lipidice.

**Superoxid dismutaza** (SOD) este prezentă în organism sub trei forme: SOD1 (Cu/Zn-SOD), SOD2 (Mn-SOD) and SOD3 (EC-SOD). SOD1 este cea mai abundentă fracție intracelulară și se găsește mai ales la nivelul citosolului și fracțiilor lizozomale, dar și în spațiul intermembranar mitocondrial, în timp ce SOD2 este localizată în matricea mitocondrială. Disfuncția acestor fracții se asociază cu patologii mediate de speciile reactive de oxigen. Evoluția neurologică a șoarecilor adulți cu deficit de SOD2 a fost nefavorabilă în caz de ischemie tranzitorie sau permanentă. Activitatea excesivă a SOD2 a prevenit apoptoza și a redus leziunile tisulare după ischemie focală. În mod similar, activitatea excesivă a SOD1 a redus înjurarea după ischemie focală tranzitorie la șoarecii adulți, dar a agravat leziunile tisulare în cazul creierului imatur. În 1982, o a treia izoenzimă a fost descoperită de Marklund care a denumit-o SOD extracelulară, deoarece s-a dovedit a fi fracția predominantă în lichidele extracelulare (limfă, lichid sinovial, plasmă). SOD catalizează dismutarea anionului radical superoxid la peroxid de hidrogen și oxigen, contribuind la difuzia limitată a acestui anion radical. De asemenea, enzima minimizează formarea peroxinitritului prin degradarea anionului radical superoxid, iar peroxidul format va fi transformat în apă în prezența peroxidazei. SOD poate juca un rol important în extensia necrozei neuronale la nivelul hipocampului. După 24 ore de reperfuzie, neuronii corticali exprimă SOD, sugerând faptul că abilitatea anumitor populații celulare de a-și crește nivelurile de antioxidanți poate determina protecția neuronală. Deși se presupune că creierul este slab protejat împotriva oxidanților, ~0,5% din totalul proteinelor solubile de la acest nivel sunt reprezentate de SOD1.

**Glutacion peroxidaza** (GPx) mitocondrială este un antioxidant cu rol detoxifiant, care se găsește sub forma a patru izoenzime: GPx1 (GPx clasică), GPx2, GPx3 (GPx plasmatică) și PHGPx (fosfolipid-hidroperoxid GPx). Toate aceste forme catalizează oxidarea glutationului redus la glutatation oxidat în prezența peroxizilor organici sau anorganici. GPx este o enzimă cu potențial antioxidant mai mare decât SOD și catalază, datorită specificității largi de substrat și inducibilității în plămâni și hematiile adulte.

**Catalaza** (CAT) de la nivelul peroxizomilor intervine în detoxifierea peroxidului de hidrogen produs prin reacția catalizată de SOD, dar se găsește în cantitate scăzută în creierul imatur, care are astfel o capacitate limitată de a converti peroxidul de hidrogen la apă și oxigen. CAT este mai abundentă în astrocite, față de neuroni și în substanța albă, față de cea cenușie,

dar poate fi indusă în neuroni cu ajutorul neurotrofinelor. CAT este inactivată ireversibil prin oxidare și are activitate scăzută în urma leziunilor de ischemie-reperfuzie.

**Enolaza neuron-specifică** (NSE) este enzima glicolică intracitoplasmatică de la nivelul neuronilor. Enolaza are cinci izoenzime, iar cele care conțin subunitatea  $\gamma$ , cu localizare preponderentă la nivelul sistemului nervos, atât central, cât și periferic, se numesc NSE.

Caracteristica majoră a NSE, comparativ cu celelalte enolaze este gradul său înalt de stabilitate. În urma leziunilor celulare ireversibile, neuronii mor prin necroză și apoptoză, ceea ce determină eliberarea enzimelor citoplasmatică, așa cum este NSE. Un nivel crescut al NSE în lichidul cefalo-rahidian este considerat a fi rezultatul leziunilor neuronale și poate reprezenta un bun biomarker al disfuncției SNC. S-a demonstrat o corelație puternică între concentrația NSE în LCR și severitatea EHI, extensia leziunilor cerebrale și evoluția ulterioară a nou-născutului. Nivelurile NSE în LCR au o valoare predictivă pozitivă mai bună decât cele serice în ceea ce privește evoluția pe termen lung.

**Citokinele** (IL-1b, IL-6) determinate în ser și LCR. Recent, citokinele au suscitat un interes deosebit ca și cale finală comună în patogeniza leziunilor cerebrale. Măsurarea nivelului expresiei proteinelor codate de IL-1b și IL-6 în cursul perioadei de reperfuzie după leziunea hipoxic-ischemică a demonstrat la șobolani creșteri semnificative. IL-1b rămâne crescută la 3, 6 și 10 ore după ischemie. Rolul IL-1b este susținut și de studiile efectuate pe șoareci transgenici deficitari în activarea IL-1b care nu au prezentat leziuni cerebrale semnificative în urma episoadelor de hipoxie-ischemie. Studiile pe subiecți umani care au utilizat spectroscopia prin rezonanță magnetică au demonstrat că nivelurile serice crescute ale IL-1b și IL-6 se corelează cu un raport crescut lactat/colină în nucleii cerebrali profunzi, sugerând asocierea nivelurilor citokinelor cu leziunile cerebrale.

**Isoprostanii** reprezintă o serie unică de compuși asemănători prostaglandinelor, formați in vivo printr-un mecanism neenzimatic care implică peroxidarea acidului arahidonic. Isoprostanii sunt recunoscuți de peste 10 ani ca markeri ai stresului oxidativ, atât în studiile pe animale, cât și în cele pe subiecți umani. **Neuroprostanii** provin din peroxidarea acidului docosahexaenoic (DHA) mediată de radicalii liberi. DHA este prezent la nivelul sistemului nervos central sub formă de fosfolipide esterificate, fiind astfel extrem de predispus la oxidare. Nivelurile neuroprostaniilor provenite în urma leziunilor cerebrale post-hipoxice sunt de 3-4 ori mai mari decât cele ale isoprostaniilor, fiind astfel markeri puternici de stres oxidativ la nivel cerebral, dar cu aplicabilitate limitată in vivo.

## Bibliografie

1. Modabbernia A, Mollon J, Boffetta P, Reichenberg A. Impaired gas exchange at birth and risk of intellectual disability and autism: a meta-analysis. *J Autism Dev Dis* 2016;46(5):1847-59
2. Zanelli S, Numagami Y, McGowan J, et al. NMDA receptor mediated calcium influx in cerebral cortical synaptosomes of the hypoxic guinea pig fetus. *Neurochem Res*. 1999;24:437-46
3. Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 1999;31:261-72
4. Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull*. 1999;48:233-8
5. Maulik D, Qayyum I, Powell S, et al. Post-hypoxic magnesium decreases nuclear oxidative damage in the fetal guinea pig brain. *Brain Res*. 2001;890:130-6
6. Numagami Y, Zubrow A, Mishra O, et al. Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet. *J Neurochem*. 1997;69:1542-7
7. Gavini G, Zanelli S, Ashraf Q, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibition on high affinity Ca<sup>2+</sup>-ATPase during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res*. 2000;887(2):385-90
8. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*. 2004;351:1985-95
9. Haynes RL, Folkerth RD, Keefe RJ, et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:441-50
10. Ferriero DM, Arcavi LJ, Sagar SM, McIntosh TK, Simon RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 1988;24:670-6
11. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59:1609-23
12. Ferriero DM, Holtzman DM, Black SM, Sheldon RA. Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury. *Neurobiol Dis*. 1996;3:64-71
13. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000;2:649-71,
14. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005;79:157-65,
15. McQuillen PS, Ferreiro DM. Selective vulnerability in the developing central system. *Pediatr Neurol* 2004;30:227-35
16. Madan A, Hamrick SEG, Ferriero DM. Hypoxic-ischemic reperfusion injury in the newborn. In: Taeusch HW, Ballard RA, Gleason CA, editors. *Avery's Diseases of the Newborn*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Publisher; 2005. p.969-77
17. Vento M, Saugstad OD. Oxidative stress – Pathophysiological background in Fanaroff and Martin's *Neonatal Perinatal Medicine*, 8th edition, Mosby-Elsevier, 2006
18. Gonzales EF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Therap*. 2008;120:43-53
19. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003;23:876-82
20. Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F. Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 1982;32:1239-46
21. Prins ML, Fujima LS, and Hovda DA. Age-dependent reduction of cortical contusion volume by ketones after traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2005;82:413-20
22. Olney JW. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:101-9
23. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory aminoacids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 1990; 15:41-70
24. Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7751-6
25. Ferriero DM, Ashwal S. Effects of nitric oxide on neuronal and cerebrovascular function. In: Donn SM, Sinha SK, Chiswick ML, eds. *Birth asphyxia and the brain: basic science and clinical implications*. Armonk, N.Y.: Futura Publishing, 2002: 153-88
26. Beckman JS, Viera L, Estevez AG, Teng R. Nitric oxide and peroxynitrite in the perinatal period. *Semin Perinatol*. 2000;24:37-41
27. Ferriero DM, Arcavi LJ, Simon RP. Ontogeny of excitotoxic injury to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase reactive neurons in the neonatal rat striatum. *Neuroscience* 1990;36:417-24
28. Black SM, Bedolli MA, Martinez S, Bristow JD, Ferriero DM, Soifer SJ. Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain. *Neurobiol Dis*. 1995;2:145-55
29. Aarts MM, Tymianski M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:877-86
30. Wu YW, Escobar GJ, Grether JK, Croen LA, Greene JD, Newman TB. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and nearterm infants. *J Am Med Assoc*. 2003;290:2677-84
31. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol*. 2004;28:425-32
32. Edwards AD, Tan S. Perinatal infections, prematurity and brain injury. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18:119-24
33. Degos V, Favrais G, Kaindl AM, Peineau S, Guerrot AM, Verney C, Gressens P. Inflammation processes in perinatal brain damage. *J Neural Transm*. 2010;117:1009-17
34. Perlman JM. Summary Proceedings from the Neu-

rology Group on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* 2006; 117: S28-S33

35. Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;14(8):1535-50

36. Khurana P, Ashraf Q, Mishra O, et al. Effect of hypoxia on caspase-3,-8 and -9 activity and expression in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurochem Res*. 2002;27:931-8

37. Nicholson D, Thornberry N. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 229-306, Mukae N, Enari M, Shahira H, et al. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated Dnase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9123-8

38. Raoul C, Estevez AG. Nishimune H et al. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 2002;35:1067-83

39. Graham EM, Sheldon RA, Flock DL et al. Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2004;17:89-98

40. Koskiniemi M, Kyykka T, Nybo T, and Jarho L. Long-term outcome after severe brain injury in preschoolers is worse than expected. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1995;149:249-54

41. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62

42. Robinson BH. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J. Inherit. Metab Dis*. 1998;21:598-603

43. Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia-reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002;33:809-15

44. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-213

45. Keller JN, Kindy MS, Holtzberg FW, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neuronal apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 1998;18:687-97

46. Ditelberg JS, Sheldon RA, Epstein CJ, Ferriero DM. Brain injury after perinatal hypoxia-ischemia is exacerbated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Pediatr Res*. 1996;39:204-8

47. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982;126:41-51

48. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 1995;64:97-112

49. Sheng H, Kudo M, Mackensen GB, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to global cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2000;163:392-8

50. Fukui S, Ookawara T, Nawashiro H, Suzuki K, Shima K. Postischemic transcriptional and translational responses of ECSOD in mouse brain and serum. *Free Radic Biol Med* 2002;32:289-98

51. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Rad Biol Med* 2003;35(3):236-66

52. Dugan LL, Behrens MM, Ali SS. Oxidative stress in hypoxic-ischemic brain injury. In Haddad GG, Yu SP (eds.). *Brain hypoxia and ischemia with special emphasis on development*, Humana Press, New York, 2009, 239-54

53. Fullerton HJ, Ditelberg JS, Chen SF, Sarco DP, Chan PH, Epstein CJ, and Ferriero DM. Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann Neurol* 1998;44:357-64

54. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem*. 1965; 240:1647-53

55. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1998;28:1956-60

56. Vasiljević B, Maglajlić-Djukić S, Gojnić M, Stanković S. The role of oxidative stress in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Srp Arh Celok Lek*. 2012;140(1-2):35-41

57. Vasiljevic B, Gojnic M, Antonovic A, Lutovac D, Ignjatovic S, Maglajlic Djukic S. The prediction of adverse neurodevelopmental outcome after perinatal asphyxia using neuron specific enolase, cerebral function monitor and color Doppler ultrasonography. *Acta Paediatrica*. 2009; 98(Suppl 460):258-9

58. Tekgul H, Yalaz M, Kutukculer N, Ozbek S, Kose T, Akisu M, Kultursay N, Gokben S. Value of biochemical markers for outcome in term infants with asphyxia. *Pediatr Neurol*. 2004;31:326-32

59. Bartha AI, Foster-Barber A, Miller SP, et al. Neonatal encephalopathy: Association of cytokines with MR spectroscopy and outcome. *Pediatr Res* 2004;56:960-6

60. Foster-Barber A, Dickens B, Ferriero DM. Human perinatal asphyxia: Correlation of neonatal cytokines with MRI and outcome. *Dev Neurosci* 2001;23:213-8

61. Hagberg H, Gilland E, Bona E, et al. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996;40:603-9

62. Liu XH, Kwon D, Schielke GP, Yang GY, Silverstein FS, Barks JD. Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1099-108

63. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol* 2009;40:215-26