

ASFIXIA PERINATALĂ – MECANISME DE PRODUCERE ȘI STRATEGII TERAPEUTICE ȚINTITE

Asist. Univ. Dr. Andreea Avasiloaiei, Prof. Dr. Maria Stamatina
Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

REZUMAT

Asfixia perinatală complicată cu leziuni hipoxic-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. În primele momente de după injurie, tratamentul se concentrează pe prevenirea formării radicalilor liberi, combaterea inflamației și efectele anti-apoptotice. În stadiile tardive, se urmărește regenerarea oligodendrogliei prin utilizarea medicației cu efect neurotrofic.

Cuvinte cheie: asfixie perinatală, leziune neuronală, strategii de neuroprotecție

Asfixia perinatală survine atunci când o leziune antepartum, intrapartum, postpartum sau orice combinație a acestora conduce la:

- reducerea eliberării O₂ către făt/nou-născut (hipoxemie);
- alterarea schimburilor respiratorii O₂-CO₂ (hipercapnie);
- perfuzie inadecvată tisulară și organică (ischemie).

Academia Americană de Pediatrie și Colegiul American de Obstetrică și Ginecologie definesc **indirect** asfixia cu ajutorul a 4 parametri:

1. pH-ul din sângele din cordon < 7;
2. Apgar sub 3 la 1 minut, care se menține sub 3 la 5 și 10 minute;
3. Semne de encefalopatie hipoxic-ischemică (tulburări de tonus și reflexe);
4. Modificări la nivelul altor organe (cord, rinichi, ficat, intestin).

Asfixia se produce între 50-91% antepartum și intrapartum, în general prin traumatism hipoxic, și doar 9% postpartum prin tulburări ventilatorii apărute la nou-născuții cu patologie pulmonară.

Incidența asfixiei perinatale este invers proporțională cu vârsta de gestație: 1-8‰ la nou-născutul la termen și mult mai mare la nou-născutul prematur (1).

Asfixia perinatală reprezintă un proces complex de afectare a sistemului nervos central prin interacțiunea dintre o serie de factori:

- circulatori – pierderea autoreglării fluxului sanguin cerebral;
- biochimici – creșterea aminoacizilor excita-tori, depolarizări membranare, scăderea metabolismului energetic neuronal, influxul intracelular de calciu, oxidarea proteinelor, peroxidarea acizilor grași nesaturați;
- metabolici – intensificarea metabolismului anaerob, ceea ce determină apariția **leziunilor de reperfuție**, intensificarea alterării celulare produse de ischemie, care constituie determinantul secundar al extinderii injuriei cerebrale.

Acești factori interacționează printr-o multitudine de mecanisme (Fig. 1):

1. Hipoxia

În timpul hipoxiei, modificările receptorului NMDA duc la creșterea influxului intracelular și intranuclear de calciu, influx proporțional cu gradul hipoxiei. Ca⁺⁺ activează proteazele, fosfolipazele și NO-sintaza, care ajută la eliberarea radicalilor liberi de oxigen, peroxidarea lipidelor membranei nucleare și activarea endonucleazelor, care la rândul

Adresa de corespondență:

Asist. Univ. Dr. Andreea Avasiloaiei, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Str. Universității Nr. 16, Iași
e-mail: andreea_avasiloaiei@ymail.com

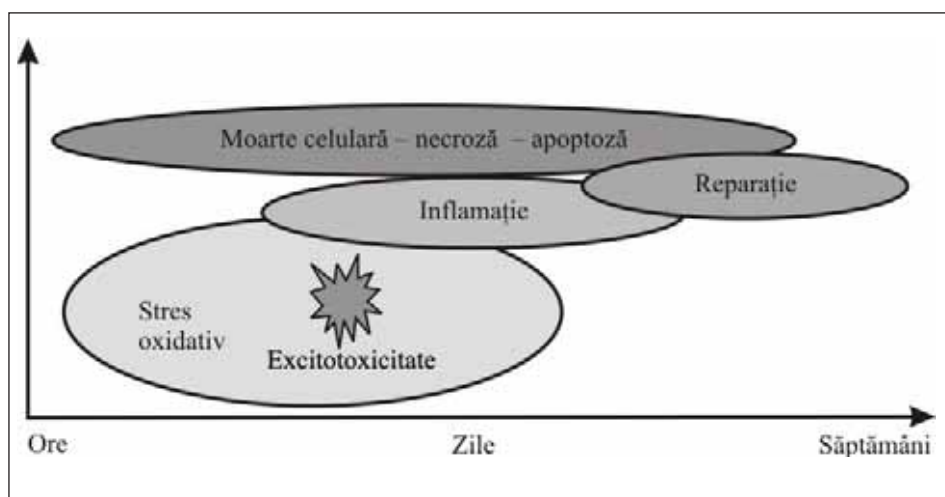


FIGURA 1. Secvența mecanismelor patogenice în leziunile neuronale postasfixice (adaptat după Ferrero) (3)

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.

2. Ischemia

În cazul nou-născutului 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-sintază sunt mai rezistenți.

3. Stresul oxidativ

Stresul oxidativ este generat de un dezechilibru între generarea excesivă de compuși de oxigen și insuficiența mecanismelor antioxidante de apărare. Reperfuzia/reoxigenarea țesuturilor ischemiate determină formarea speciilor reactive de oxigen (SRO), inclusiv anioni superoxid, peroxid de hidrogen, radicali hidroxil și specii reactive de azot, mai ales peroxinitrit.

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, produs sub acțiunea xantin-oxidazei, intră în spațiul extracelular cerebral unde se transformă în peroxid de hidrogen prin conversia de către superoxid dismutază (SOD). 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 (2). Creierul nou-născutului,

prin concentrația sa crescută de acizi grași nesaturați, consumul crescut de oxigen, concentrația scăzută de antioxidanți și disponibilitatea pentru fier redox-activ, este în mod particular vulnerabil la leziunile oxidative prin peroxidarea lipidelor de către oxigenul molecular (3). Lipidele fiind elemente constitutive ale membranelor biologice, peroxidarea lor determină severe modificări la nivelul structurii membranelor și astfel este alterată funcționarea normală a celulei. Alcoolii, aldehidele, hidrocarburiile volatile și hidroperoxidii, care sunt produșii finali ai peroxidării, inhibă sinteza de proteine și sunt răspunzători de alterarea permeabilității vasculare, de producerea răspunsului inflamator și activitate a chemotactică.

4. Excitotoxicitatea

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.

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, acesta 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-sintază sunt abundenți. Eliminarea acestor neuroni și întreruperea complexului postsinaptic care leagă NMDA la aceștia determină reducerea leziunii ischemice.

5. 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 β , 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 (BHE) și acțiune directă asupra parenchimului cerebral (4). 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) (5). 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 edematare celulară, distrugere a organitelor celulare și pierdere a integrității membranare (6). Inflamația duce la creșterea nivelului de glutamat, care la rândul său induce apoptoză.

6. Apoptoza

Moartea celulară programată este un proces activ, care implică activarea cascadei caspazelor (3, 8,9), un pas cheie în fragmentarea ADN-ului (7). Caspaza 3 activată fragmentează numeroase proteine intracelulare, care mențin structura celulară și inactivează numeroase enzime cu rol în repararea ADN. Această secvență de evenimente duce la modificările celulare și nucleare caracteristice apoptozei. 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.

STRATEGII TERAPEUTICE

Tratamentul profilactic este de bază și implică prevenirea asfixiei intrauterine prin recunoașterea factorilor de risc, monitorizare atentă antepartum și intrapartum, reanimare promptă în sala de naștere.

Tratamentul suportiv include: ventilație adecvată, prevenirea hipo/hiperoxemiei, hipo/hipercapniei, hiperamoniemiei, menținerea perfuziei optime și normoglicemiei, controlul convulsiilor, evitarea supraîncărcării cu fluide.

Terapii experimentale:

- Terapie antioxidantă pentru blocarea radicalilor liberi și creșterea capacității antioxidante

- Chelatori de fier: deferoxamina traversează BHE și leagă fierul feric, prevenind formarea radicalilor hidroxil și având efect neuroprotector asupra hipocampului (8).

- Scavengeri ai speciilor reactive de oxigen: melatonină, vitamina C (100 mg/kgc/zi, timp de 7 zile), catalază, SOD, glutation peroxidază, N-acetilcisteină, manitol. Melatonina a dovedit a avea efecte protectoare împotriva stărilor patologice datorate eliberării de radicali liberi de oxigen. Melatonina este un inhibitor direct al radicalului hidroxil, O₂ și NO, protejând împotriva injuriei cerebrale provocate de stresul oxidativ, atât în leziunea hipoxică experimentală, cât și în trialurile clinice preliminare (9). De asemenea, nou-născuții care au primit tratament cu melatonină exprimă cantități scăzute de citokine proinflamatorii și cantități crescute de enzime antioxidante (2).

N-acetil cisteina (NAC) este un precursor al glutationului, unul din cele mai importante mijloace de apărare antioxidantă. NAC poate fi administrată și antenatal, având abilitatea de a traversa bariera fetoplacentară. NAC are și rol în protecția substanței albe cerebrale și, de asemenea, reduce generarea nitrotirozinei. Glutacion peroxidaza are rol de a înlătura peroxidul de hidrogen din mitocondrie și de la nivelul citosolului, dar traversează cu dificultate BHE și are efect neuroprotector doar administrată profilactic.

- Inhibitori ai xantin-oxidazei: allopurinol (peste 10 mg/kgc, 40-160 mg/doză). Allopurinolul este în primul rând un inhibitor de xantin-oxidază prezentă în celulele endoteliale, dar, în cantități mari, are și efecte adiționale ca eliminator al SRO, mai ales sub formă de oxipurinol. S-a demonstrat că administrarea de allopurinol înaintea accidentului asfixic (în timpul travaliului) reduce afectarea perinatală a creierului și are efecte benefice asupra perfuziei cerebrale și activității electrice (10).

– Inhibitori ai peroxidării lipidelor: lazaroide, vitamina E (30 UI/zi, în primele zile), purpurogalin, triterpin, ginkgo biloba.

– Agenți reducători ai formării de radicali liberi: eritropoietină, fenobarbital.

Eritropoietina (EPO), citokină produsă la nivel cerebral de anumite populații de celule, joacă un rol protector împotriva injuriei hipoxice cerebrale. Relativă insuficiență a EPO endogene în timpul perioadei de stres ischemic poate aduce după sine apoptoza neuronală, care poate fi ameliorată prin administrarea de EPO exogenă. Eritropoietina 1.000-30.000 U/kgc/doză, administrată subcutanat/intraperitoneal contribuie la minimizarea leziunilor generate de radicalii liberi, manifestând un efect protector.

EPO este direct implicată în combaterea stresului oxidativ prin generarea de enzime antioxidante, scăderea producției citokinelor pro-inflamatorii, inhibiția eliberării de NO și a peroxidării lipidelor. EPO are efecte antiapoptotice și anti-inflamatorii în perioada acută, imediată post-injurie și efecte neurogenice și vasculogenice în perioada de recuperare. Tratamentul cu EPO în leziunile neurologice neonatale a determinat îmbunătățirea evoluției pe termen scurt și lung, atât în plan structural, cât și comportamental, atât în leziunile substanței cenușii, cât și cele ale substanței albe. Aceste efecte sunt prezente când EPO este administrată în perioada postlezională imediată sau în interval de 24h de la injurie (11-14).

Fenobarbitalul sodic intravenos în doză unică 40 mg/kgc acționează prin scăderea ratei metabolismului celular și a peroxidării lipidelor și reduce incidența complicațiilor neurologice pe termen lung (15).

– Inhibitori ai NO-sintazei: aminoguanidină, 7-nitroindazol, L-arginină, iminobiotină

– Antagoniști ai mediatorilor inflamației: antagoniști ai factorului de activare plachetară, inhibitori ai ciclo-oxigenazei (ibuprofen, indometacin), glucocorticoizi, IL-10

Alte efecte antioxidante: aminofilină, Cu, Zn, Se, tianeptin.

• Terapie care limitează excitotoxicitatea:

– Antagoniști ai receptorilor aminoacizilor excitaționali (NMDA): ketamina, dizocilipină (MK 801), topiramă, xenon – asigură protecția creierului în 95% dintre cazuri când sunt administrate după injuria asfxică, dar au toxicitate ridicată. Sulfatul de magneziu ($MgSO_4$), 125-250 mg/kgc determină niveluri ale magneziului considerate neuroprotectoare prin oprirea influxului de calciu la nivelul receptorilor glutamatergici (16). Mg are și efecte

hemodinamice, îmbunătățind fluxul sanguin cerebral prin reducerea vasoconstricției arterelor cerebrale. Xenonul în concentrații subanestezice, combinat cu hipotermia (chiar în cazul administrării neconcomitente) determină neuroprotecție, aspect demonstrat prin îmbunătățirea funcției neuromotorii după 30 de zile de la administrare (17).

– Canabinoizi – scad expresia glutamatului, citokinelor, eliberarea de NO și influxul intracelular de calciu (2).

– Blocanți ai canalelor de calciu: flunarizină, nimodipină.

– Hipotermia cerebrală/generalizată ușoară (1-3°C) – moderată (4-6°C), cu o durată de 48-72 ore, este cea mai promițătoare și studiată intervenție cu rol de neuroprotecție la momentul actual (18). Hipotermia scade la nivel cerebral consumul de oxigen și rata de utilizare a energiei. Cu cât este mai severă leziunea inițială, cu atât este mai necesară o perioadă mai îndelungată de hipotermie. Studiile efectuate recomandă ca răcirea să fie inițiată în timpul ferestrei terapeutice de maximum 6 ore postpartum, pentru a obține efectul scontat (19).

– Anti-inflamatoare: minociclina are efecte anti-inflamatorii la nivelul microgliei, modulează activarea celulelor sistemului imun și eliberarea de NO, scade expresia caspazelor 1 și 3, crescând expresia genelor antiapoptotice (2).

• Inhibitori ai apoptozei: inhibitori ai poli-ADN-riboz-polimerazei (PARP), inhibitori ai calpainei, inhibitori ai caspazei 3. În prezent, se efectuează studii pe animale care testează utilitatea compușilor cu litiu ca agenți anti-apoptotici (20).

• Factori neurotrofici (NGF, IGF-1, VEGF, BDNF).

• Terapie cu celule stem neurale. Implantarea intraventriculară a acestora după leziunea hipoxic-ischemică determină migrarea lor în zonele afectate. Celulele stem se diferențiază apoi în neuroni, astrocite, oligodendrocite și progenitori nediferențiați. Toate aceste celule nu numai că determină regenerarea zonelor afectate, dar fenotipurile non-neuronale inhibă inflamația și formarea de cicatrice, promovând în același timp angiogeneza în modelele experimentale (21).

Din cauza mării diversități a mecanismelor implicate în patogenia asfxiciei perinatale, s-a renunțat actualmente la descoperirea unui singur agent terapeutic, care să acționeze după modelul „glonțului magic”. Tendința actuală este de a asocia două sau mai multe mijloace terapeutice cu acțiune convergentă, acolo unde considerentele financiare și etice permit acest lucru.

În pofida progreselor realizate în ultimii ani în privința tratamentului, evoluția pe termen lung a nou-născuților cu asfixie perinatală este grevată de sechele neurologice importante, care pot merge

până la paralizie cerebrală. Astfel, tratamentul profilactic (monitorizarea sarcinii și a nașterii) este în continuare cel mai important.

Perinatal asphyxia – underlying mechanisms and targeted therapeutic strategies

Andreea Avasiloaiei, Maria Stamatina

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iasi

ABSTRACT

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. In the early stage, therapies are concentrated on prevention of the production of reactive oxygen species or free radicals, anti-inflammatory effects and anti-apoptotic interventions. In a later stage stimulation of neurotrophic properties in the neonatal brain can be targeted to promote neuronal and oligodendrocyte regeneration.

Key words: perinatal asphyxia, neuronal injury, neuroprotective strategies

Perinatal asphyxia occurs when an antepartum, intrapartum or postpartum injury or any combination or the three lead to:

- Poor delivery of oxygen to the foetus/newborn (hypoxemia)
- Altered gas exchange (hypercapnia)
- Low tissue and organic perfusion (ischaemia)

The American Academy of Pediatrics and the American College of Obstetricians and Gynecologists define **indirectly** perinatal asphyxia by 4 parameters:

1. Blood cord pH below 7
2. 1-minute Apgar score below 3, that remains low at 5 and 10 minutes
3. Signs of hypoxic-ischaemic encephalopathy
4. Multiorganic dysfunctions.

Perinatal asphyxia occurs in utero or intrapartum in 50-91% of cases, generally due to hypoxia and only in 9% it occurs postnatally through respiratory dysfunctions in newborns with pulmonary impairment.

The increased incidence of perinatal asphyxia is proportional to the decrease in gestational age: 1-8%

in term newborns and larger in preterm infants (1).

Perinatal asphyxia represents a complex process of central nervous system damage that occurs due to the interaction of several factors:

- Circulatory – loss of cerebral blood flow regulation
- Biochemical – increase of excitatory amino-acids, decrease in neuronal energy metabolism, intracellular calcium influx, protein oxidation, unsaturated fatty acids peroxidation.
- Metabolic – increase of cell alteration and anaerobic metabolism, which leads to the reperfusion injuries

These factors interact by several mechanisms (Fig. 1):

1. Hypoxia

During hypoxia, NMDA receptor alterations lead to the increase of intracellular calcium influx, which is proportional to the degree of hypoxia. Ca^{++} activates proteases, phospholipases and NO-synthase, which help the release of reactive oxygen species, peroxidation of membrane lipids and

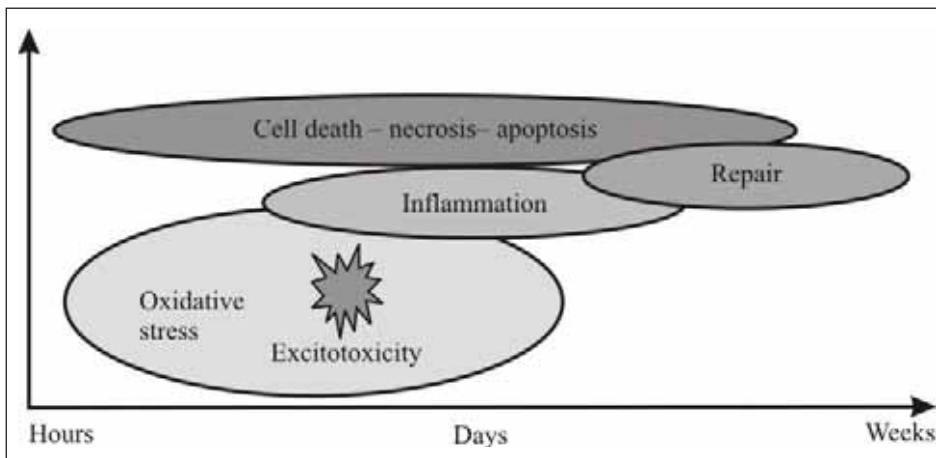


Figure 1. Sequence of underlying mechanisms in postasphyxial neuronal injury (adapted from Ferriero) (3)

endonuclease activation, that in turn, brakes the nuclear DNA. Nitric oxide reacts with the superoxide to form peroxynitrite, a toxic free radical, known for its capability of cellular membrane damage.

2. Ischaemia

In term newborns with ischaemic injury, the neurons located in the thalamus and in the periorlandic area are predisposed to cellular damage, as opposed to the neurons that produce NO-synthase, which are more resistant.

3. Oxidative stress

Oxidative stress is generated by an imbalance between the excessive release of oxygen compounds and the immature antioxidant defense mechanisms. Reperfusion leads to reactive oxygen and nitrogen species. These are powerful oxidant agents that can damage cells directly, by peroxidation of membranes, proteins, structural enzymes and nucleic acids. They regulate intracellular signaling pathways that modulate DNA and RNA synthesis and enzymatic activation. During hypoxia, the superoxide radical enters the extracellular cerebral space where it is converted to hydrogen peroxide by superoxide dismutase. Due to the high iron content of the immature cerebrospinal fluid, hydrogen peroxide reacts in the Fenton reaction with the superoxide radical to produce hydroxyl radicals². The neonatal brain, with its high contents of polyunsaturated fatty acids, high oxygen requirements and low concentration of antioxidants, is particularly vulnerable to lipid peroxidation by molecular oxygen (3). Lipids are constitutive elements of cellular membranes and their peroxidation leads to severe disruption of membrane structures, thus altering normal cellular functions. Alcohols, aldehydes and volatile hydrocarbons, as final products of peroxidation, inhibit protein synthesis and are responsible for the alteration of

vascular permeability, inflammatory response and chemotactic activity.

4. Excitotoxicity

Excessive activation of glutamate neurotransmission leads to cellular death. The initial trigger may be the defective glutamate uptake by the glial cells, which results in excessive receptor activation.

NO production by neurons resistant to hypoxic-ischaemic injury depends on the coupling and activation of NMDA-receptors and on the cellular intake of calcium in the thalamus and basal ganglia. As nitric oxide is produced excessively in these areas during oxidative stress, it contributes to free radical formation. Immature NO-generating neurons are resistant to hypoxic-ischaemic injury and NMDA-mediated excitotoxicity. These cells become more vulnerable as they grow older.

5. Inflammation

Maternal infection is linked to white matter injury in the immature brain. A cohort study suggests chorioamnionitis as an independent risk factor for cerebral palsy in term newborns with brain injury, due to the antenatal rise of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-9) in the amniotic fluid, foetal circulation and cerebrospinal fluid. Neutrophil accumulation in the cerebral blood vessels, and their activation seem to be the links between in utero exposure to infection and ischaemic cerebral injury. Inflammatory markers in the amniotic fluid of women in preterm labor or in the cord blood have been linked to myelination defects, periventricular leucomalacia and subsequent cerebral palsy. The cellular origins of the inflammation mediators that seem to accentuate hypoxic-ischaemic injury is still unclear. Systemic mediators affect the central nervous system either by vascular mechanisms or directly by crossing the

blood-brain barrier (BBB) (4). Lipopolysaccharide administration before the hypoxic-ischaemic events leads to an aggravation of the injury, thus ascertaining the role of inflammation as a predisposing factor (sensitization process) (5). The mechanisms that lead to this sensitization are still partly unknown, but could include gene transcription defects, and modified glutamate-receptor activity.

Inflammation is, on the other hand, caused by neuronal necrosis, a passive process of cellular swelling, organelle destruction and loss of organelle integrity (6). Inflammation leads to rises in glutamate levels, which in turn, cause apoptosis.

6. Apoptosis

Programmed cell death is an active process that involves the activation of caspases (3, 6, 9), a key step in DNA fragmenting (7). Activated caspase 3 fragments intracellular proteins which maintain cellular structures and inactivates numerous DNA-repairing enzymes. This sequence of events leads to both cellular and nuclear damage, ending in cell destruction. Apoptosis is of great importance in neonatal hypoxic-ischaemic injury, maybe overpowering necrosis during the reperfusion injury.

THERAPEUTIC STRATEGIES

Prophylactic treatment is capital and involves prevention of perinatal asphyxia by prompt recognition of risk factors, antepartum and intrapartum careful monitoring and immediate resuscitation in the delivery room.

Supportive treatment includes: adequate ventilation and perfusion, prevention of hypo/hyperoxemia, hypo/hypercapnia, normoglycaemia, seizure control, avoidance of fluid overload.

Experimental treatment:

- free radical blockers and drugs that improve antioxidant status
 - Iron chelators: deferoxamine crosses the BBB, binds non-protein bound iron and prevents the formation of hydroxyl radicals, thus protecting hippocampal neurons (8).
 - Reactive oxygen species (ROS) scavengers: melatonin, vitamin C (100 mg/kg/day, 7 days), catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, N-acetyl cysteine, mannitol. Melatonin proved to be protective against ROS-induced conditions, as it is a direct inhibitor of hydroxyl radicals, oxygen, and NO (9). Newborns who receive melatonin treatment express lower quantities of pro-inflammatory cytokines and higher levels of antioxidant enzymes (2).

N-acetyl cysteine (NAC) is a precursor of glutathione, one of the most important means of defense against ROS-induced injury. NAC can be administered antepartum to the mother, as it is capable of crossing to the foetal circulation. NAC is an important protective agent of the white cerebral matter and minimizes the formation of nitrotyrosine. Glutathione peroxidase removes hydrogen peroxide from the mitochondria and the cytosol, but needs prolonged time to penetrate the BBB and is protective only if administered many hours before the insult.

– Xanthine-oxidase inhibitors: allopurinol (40-160 mg/dose). It has been proven that when administered during labor, allopurinol is able to minimize perinatal brain injury and has beneficial effects on cerebral perfusion and electrical brain activity (10).

– Lipid peroxidation inhibitors: lazaroids, vitamin E (30 U/day, during the first few days), purpurogaline, triterpine, ginkgo biloba

– Drugs that prevent the formation of free radicals: erythropoietin, phenobarbital.

Erythropoietin (EPO) is an endogenous cytokine, with protective effects against hypoxic-ischemic injury. Its inadequate supply during ischaemic stress can lead to neuronal apoptosis. Exogenous subcutaneous/intraperitoneal EPO (1000-30000 U/kg/dose) contributes to the lessening of ROS-generated injury and has protective effects. EPO is directly involved in oxidative stress prevention with generation of antioxidant enzymes, decreased production of pro-inflammatory cytokines, inhibition of NO production and decrease of lipid peroxidation. EPO has anti-apoptotic and anti-inflammatory effects in the acute post injury period, with neurogenic and vasculogenic effects in the recovery period. EPO treatment of neonatal brain injury results in improved short and long-term outcomes, with both structural and behavioral improvement. Both white and grey matter injury shows improvement with EPO treatment. These effects are present when EPO is given immediately, or up to 24 hours following injury (11-14).

High-dose intravenous phenobarbital (40 mg/kg) decreases cellular metabolism and lipid peroxidation and improves long-term neurologic outcome (15).

– NO-synthase inhibitors: aminoguanidine, 7-nitroindazole, L-arginine, iminobiotine

– Inflammation mediators antagonists: PAF antagonists, COX inhibitors, glucocorticoids, IL-10

– Other antioxidant drugs: aminophylline, copper, zinc, selenium, tianeptine

- drugs that decrease excitotoxicity:
 - NMDA receptor antagonists: ketamine, MK 801, topiramate, xenon – protect the brain in 95% of cases, when administered in the acute phase, but are highly toxic. Magnesium sulfate (MgSO_4), 125-250 mg/kg is neuroprotective, as magnesium stops calcium influx to glutamate receptors (16). Mg also has hemodynamic effects, such as increasing cerebral blood flow and, thus, reducing the constriction of cerebral arteries. Xenon, in sub-anaesthetic concentrations, combined with hypothermia, is also neuroprotective, enhancing neuromotor functions in 30 days after administration (17).
 - Cannabinoids decrease glutamate, cytokines, NO and the intracellular influx of calcium (2)
 - Calcium blockers: flunarizine, nimodipine
 - Mild ($1-3^\circ\text{C}$) – moderate ($4-6^\circ\text{C}$) cerebral/systemic hypothermia, for 48-72 hours, is the most promising and well-studied neuroprotective intervention to date (18). It minimizes oxygen and energy demands of the brain. The more serious the initial injury, the longer hypothermia is needed. For optimal results, cooling should be started in the first 6 hours after the injury, during the “therapeutic window” period (19).
 - Anti-inflammatory drugs: aminocycline has anti-inflammatory effects on the microglia, modulates the activity of immune cells and the release of NO, decreases the activity of caspase-1 and caspase-3 and increases the expression of anti-apoptotic genes (2).

- Apoptose inhibitors. Currently, animal studies are trying to establish the efficiency of lithium as an anti-apoptotic agent (20).

- Neurotrophic factors: NGF, IGF-1, VEGF, BDNF

- Stem cell therapy. Intraventricular implantation of neural stem cells leads to their migration to the affected areas. Upon arriving, stem cells differentiate to neurons, oligodendrocytes, astrocytes and undifferentiated progenitor cells, leading to the regeneration of the affected areas, inhibiting inflammation and preventing scar-tissue formation (21). They also promote angiogenesis in experimental models.

Due to the high diversity of underlying mechanisms of perinatal asphyxia, quests for a single intervention that can act as a “magic bullet” have been abandoned. Single therapeutic agents may impact only one or two steps in the cascade of the complex neuronal injury process after hypoxic-ischemic injury. Modern tendencies are to associate multiple convergent therapies, if costs and ethical principles allow this approach.

Despite research progress, long-term outcome of newborns with perinatal asphyxia is still poor, marked by serious neurologic sequelae, such as cerebral palsy. This proves that prophylactic treatment (careful monitoring of pregnancy and childbirth) is still the most important therapy of perinatal asphyxia.

REFERENCES

1. Kurinczuk J.J., White-Koning M., Badawi N. – Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86:329-338
2. Gonzales E.F., Ferriero D.M. – Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Therap* 2008; 120:43-53
3. Ferriero D.M. – Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004; 351: 1985-1995
4. McLean C., Ferriero D. – Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol* 2004; 28:425-432
5. Degos V., Favrais G., Kaïndl A.M., Peineau S., Guerrot A.M., Verney C., Gressens P. – Inflammation processes in perinatal brain damage. *J Neural Transm* 2010; 117:1009-1017
6. Perlman J.M. – Summary Proceedings of the Neurology Group on Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* 2006; 117: S28-S33
7. Fritz K.I., Delivoria-Papadopoulos M. – Mechanisms of injury to the newborn brain. *Clin Perinatol* 2006; 33: 573-591
8. Papazisis G., Pourzitaki C., Sardeli C., Lallas A., Amaniti E., Kouvelas D. – Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res* 2008; (57):73-78
9. Tutunculer F., Eskiocak S., Basaran U.N., et al. – The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int* 2005; 47: 434-439
10. Buoncuore G., Groenendaal J. – Antioxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 287-295
11. Kumral A., Ozer E., Yilmaz O., Akhisaroglu M., Gokmen N., Duman N., Ulukus C., Genc S., Ozkan H. – Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2003; 83: 224-228
12. Juul S.E. – Erythropoietin as a neonatal neuroprotectant: basic and clinical studies. *Haematologica reports* 2006; 2(10):108-112
13. Sun Y., Calvert J.W., Zhang J.H. – Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005; 36: 1672-1678
14. Juul S., Felderhoff-Mueser U. – Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 250-258
15. Gathwala G., Marwah A., Gahlaut V., Marwah P. – Effect of high-dose phenobarbital on oxidative stress in perinatal asphyxia: an open label randomized controlled trial. *Indian Pediatr* 2010; 47:e1-e5
16. Bhat M.A., Charoo B.A., Bhat J.I., Ahmad S.M., Ali S.W., Mufti M.H. – Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled study. *Pediatrics* 2009; 123(5):e1-e6
17. Kelen D., Robertson N.J. – Experimental treatments for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86:369-377
18. Wachtel E.V., Hendricks-Muñoz K.D. – Current management of the infant who presents with neonatal encephalopathy. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011; 41:132-153
19. Shah P.S., Ohlsson A., Perlman M. – Hypothermia to treat neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(10): 951-958
20. Li Q, Li H., Roughton K., Wang X., Kroemer G., Blomgren K., Zhu C. – Lithium reduces apoptosis and autophagy after neonatal hypoxia-ischemia. *Cell Death Dis* 2010 1, e56; doi:10.1038/cddis.2010.33
21. Vawda R., Woodbury J., Covey M., Levinson S.W., Mehmet H. – Stem cell therapies for perinatal brain injuries. *Seminars Fetal Neonatal Med* 2007; 12:259-272