

# Perinatal brain damage : possible therapeutic approaches to hypoxic-ischemic cerebral injury, studied in fetal animals

Citation for published version (APA):

Garnier, Y. (2003). *Perinatal brain damage : possible therapeutic approaches to hypoxic-ischemic cerebral injury, studied in fetal animals*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Shaker Verlag. <https://doi.org/10.26481/dis.20030117yg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2003

## DOI:

[10.26481/dis.20030117yg](https://doi.org/10.26481/dis.20030117yg)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

# Chapter 10

## SUMMARY, CONCLUSIONS, AND FUTURE PERSPECTIVES

Although perinatal brain injury is a major contributor to perinatal morbidity and mortality, present clinical strategies are not capable of reducing the incidence of perinatal hypoxic-ischemic brain damage significantly. However, a wealth of experimental studies has emerged describing the pathophysiological mechanisms that are implicated in perinatal brain injury (Chapter 2). These involve the acute breakdown of cerebral energy metabolism leading to the release of excitatory amino acids such as glutamate and aspartate. Glutamate binds to postsynaptically located glutamate receptors that regulate calcium channels. The resulting calcium influx activates proteases, lipases and endonucleases which in turn destroy the cellular skeleton. The acute lack of cellular energy arising during ischemia induces almost complete inhibition of cerebral protein biosynthesis. Once the ischemic period is over, protein biosynthesis returns to preischemic levels in non-vulnerable regions of the brain, while in more vulnerable areas it remains inhibited. The inhibition of protein synthesis therefore appears to be an early indicator of subsequent neuronal cell death. A second wave of neuronal cell damage occurs during the reperfusion phase. This cell damage is thought to be caused by the postischemic release of oxygen radicals, synthesis of nitric oxide, inflammatory reactions and an imbalance between the excitatory and inhibitory neurotransmitter systems. Part of the secondary neuronal cell damage may be caused by induction of a kind of cellular suicide programme known as apoptosis. Recent studies have shown that inflammatory reactions not only exacerbate secondary neuronal damage after cerebral ischemia, but may also injure the immature brain directly. This damage seems to be brought about by the cardiovascular effects of endotoxins leading to cerebral hypoperfusion and by activation of apoptotic pathways in oligodendrocyte progenitors through the release of  $\text{TNF-}\alpha$ .

Since a significant proportion of neuronal cell damage is brought about by pathophysiological processes that first begin several hours or even days after an ischemic insult, the setting up of a therapeutic window would be feasible. Knowledge of these pathophysiological mechanisms has enabled scientists to develop new therapeutic strategies with successful results in animal experiments. The potential of such therapies was subject of the studies presented in this thesis, particularly the promising effects of the application of the calcium-antagonist flunarizine, the administration of magnesium and postischemic induction of mild cerebral hypothermia.

### *Flunarizine*

Since flunarizine, a class IV calcium antagonist, is a potent vasodilator, the neuroprotective properties of this drug may be counteracted by its cardiovascular side-effects. To clarify this point we subjected mature fetal sheep to acute intrauterine asphyxia (*Chapter 4*). Fetuses from the study group received flunarizine i.v. before asphyxia. During acute asphyxia there was a redistribution of cardiac output towards the central organs accompanied by a pronounced bradycardia and a progressive increase in arterial blood pressure. Fetuses of the study group had higher plasma catecholamine levels than the control group. After asphyxia, circulatory centralization did not resolve quite as rapidly as it had developed, but was almost completely recovered at 30 min after the insult. There were hardly any differences between treated animals and controls in the time course of physiological and cardiovascular variables measured before, during and after acute intrauterine asphyxia.

Given the key significance of the so-called calcium overload for the development of neuronal cell death we tested the neuroprotective effect of flunarizine, an antagonist of voltage-dependent calcium channels in a fetal sheep model (*Chapter 5*). Ischemic brain injury was caused by occlusion of both carotid arteries for 30 min. One hour before the insult we applied the calcium-antagonist flunarizine at a concentration of 1 mg/kg fetal body weight i.v. This regimen reduced neuronal cell damage significantly, especially in the parasagittal cortex (*Chapter 5*). We conclude that pretreatment by low dose flunarizine protects the brain of fetal sheep near term from ischemic injury. We further conclude that this neuroprotective effect is not mediated by drug dependent changes in cerebral blood flow. Since low dose flunarizine does not alter the response of the fetal cardiovascular system to asphyxia, its clinical use should be reconsidered, particularly in fetuses that are at risk of hypoxic-ischemic encephalopathy.

### *Lubeluzole*

During the last decade several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that the benzothiazole compound lubeluzole is able to protect the brain from hypoxic-ischemic injury. In clinical studies the results were controversial. Protective and non-protective effects were seen in adult patients suffering from acute ischemic stroke. However, the knowledge on the safety profile and efficiency of lubeluzole seemed to be promising enough to warrant further studies in immature animals. We firstly studied the effects of lubeluzole on the fetal cardiovascular system (*Chapter 6*). Lubeluzole did not affect fetal circulatory centralisation during acute asphyxia in term fetal sheep. This mechanism is of major importance, since it protects the fetal brain from neuronal injury by increasing blood

flow to the central organs, i.e. brain, heart, adrenals, when oxygen is in short supply. Because of these promising results, we further evaluated the neuroprotective properties of lubeluzole in fetal sheep. Unfortunately, we were unable to show any cerebroprotective effect of the drug on neuronal cell damage induced by transient global cerebral ischemia. This appears to be inconsistent with investigations in adult human beings (for detailed discussion see *Chapter 7*). However, in almost all of these studies models of focal instead of global cerebral ischemia were used. This type of cerebral ischemia is characterized by an ischemic core and a peri-infarct region known as ischemic penumbra. In this area, brain tissue is perfused at a level between the thresholds of functional impairment and of morphological integrity. Unless cerebral blood flow is rapidly improved in this region within a few hours after the insult, neuronal cell damage is the inevitable result. As shown previously, glutamate is released in tremendous amounts from the infarct core into the extracellular space after focal ischemia. The released glutamate activates the neuronal NO-synthase via calcium influx through NMDA-regulated calcium channels. In focal ischemia this pathway may be of greater importance for the development of neuronal cell damage than in global ischemia, since in the latter type of ischemia only a moderate and short-lasting increase in glutamate release has been observed. This may explain in part the differences in neuronal outcome between the present study and previous investigations after treatment of brain injury by lubeluzole.

### *Magnesium*

In the clinical setting,  $MgSO_4$  has been widely used in obstetric practice for over 60 years. Its indications include suppression of preterm labor and management of pregnancy-induced hypertension. A retrospective epidemiological study by Nelson and Grether (1995) suggested that premature fetuses whose mothers received  $MgSO_4$  for the treatment of preeclampsia or as a tocolytic agent are less likely to develop cerebral palsy compared to a gestational age-matched group of fetuses not exposed to the drug. This difference was statistically highly significant. Almost identical results were obtained in a retrospective study carried out by Schendel and co-workers (1996).

The neuroprotective efficacy of magnesium has been attributed to a variety of effects of this molecule on pathophysiological mechanisms during and after cerebral ischemia, i.e. vasodilation, inhibition of the NMDA-receptor, anti-convulsive properties. Furthermore, magnesium reduces the ischemia induced release of NO by blocking the NO-synthase (*Chapter 8*). NO is a free radical synthesized by NO-synthase in neurones and other cell types in response to rises in levels of intracellular calcium during and after ischemia. During reperfusion, NO and superoxide radicals combine to produce peroxynitrite, leading

to the formation of more potent radicals. Destruction of cerebral tissue is the inevitable result. Since magnesium has been reported to block cerebral NMDA-receptors which themselves control calcium channels, the neuroprotective effect of magnesium may be mediated through an inhibition of NO-production after ischemia brought about by a reduction of neuronal calcium influx. On the strength of these results, several clinical studies have been conducted to test the effect of magnesium on the incidence of cerebral palsy in preterm fetuses. Recently, Mittendorf and co-workers (2002) reported a significant association between tocolytic  $MgSO_4$  exposure and total pediatric mortality rates from the MagNET trial. Children who had cord blood ionized magnesium levels above the measured cohort median level had significantly more adverse events – i.e. periventricular leukomalacia, intraventricular hemorrhage, cerebral palsy, and death – than occurred in those infants who had levels below the median. Thus, they found that combined adverse outcomes were associated with magnesium exposure in a dose-related fashion. Therefore, future studies have to be conducted to test the putative neuroprotective benefits of antenatal  $MgSO_4$  in the setting of premature labor.

#### *Mild hypothermia*

The induction of mild hypothermia has raised interesting possibilities for neuroprotection in cerebral ischemia. Over the last few years, the effect of mild hypothermia in protecting the brain from ischemically induced damage has been examined. Experimental studies on adult animals have shown that lowering of the brain temperature by 3–4°C during global cerebral ischemia reduces neuronal cell damage dramatically. Furthermore, treated animals were found to perform better than controls in subsequent learning and behavioural tests. In the present study, we evaluated the exact interrelation between the postischemic time delay and the degree of mild hypothermia by which neuroprotective effects on ischemic insults of different severity can be achieved (*Chapter 9*). Therefore, we used the well described model of oxygen-glucose deprivation (OGD) in hippocampal tissue slices derived from mature fetal guinea pigs. Hypothermia initiated directly after OGD significantly improved the recovery of energy metabolism and protein synthesis. If there was a time delay of 2 h before the onset of hypothermia, neuroprotection depended on the degree of hypothermia. Reduction of the incubation temperature to 31°C diminished the disturbances of energy metabolism and protein synthesis, whereas lowering the bath temperature to only 34°C was not effective. Inducing hypothermia 4 h after OGD did not have any influence on the recovery of energy metabolism and protein synthesis. These results tie in with studies performed in fetal sheep. Based on these results, many authors now consider the induction of hypothermia during and particularly after a hypoxic-ischemic insult to be an effective therapeutic strategy. In fact, recent clinical safety studies have demonstrated that induction

of mild cerebral hypothermia in newborn infants after perinatal asphyxia has no harmful side-effects and improves outcome in infants who suffered from moderate to severe encephalopathy (Gunn et al. 1998; Battin et al. 2001).

## **FUTURE PERSPECTIVES ON PERINATAL NEUROPROTECTION**

Significant advances have been made over the past few years concerning the cellular and molecular events underlying hypoxic-ischemic brain injury. There are several new neuroprotective therapies available that have shown promise in animal and adult studies. Additional controlled, prospective trials are warranted, which hopefully will be designed and conducted within the next few years. The following paragraphs will briefly provide some new strategies which are currently under investigation (Table 3).

### *Combination therapy*

The deleterious cascades that ensue following ischemia are many. It, therefore, stands to reason that an approach to neuroprotection that targets a single mechanism of action (e.g., either calcium, glutamate or free radicals) is unlikely to be of maximal benefit. Consequently, some investigators have looked to combination treatments to try to achieve a beneficial synergistic or additive effect. Combination therapy may include, initially, a neuroprotective agent that preferably acts at multiple sites in the ischemic cascades (e.g., magnesium) to protect the brain from subsequent injury. This may be followed by prevention of reperfusion injury, and finally we might administer treatment to improve plasticity in the developing brain (e.g., growth factors, gene therapy, or stem cells).

### *Creatine*

Mathews and co workers (1998) reported, that creatine protects the brain against malonate-induced increases in hydroxyl radical production and 3-nitropropionic-caused rise in 3-nitrotyrosine concentration, a marker of peroxynitrite-mediated oxidative injury. In fetal and neonatal animals creatine supplementation alleviates inhibition of protein synthesis and reduces hypoxic-ischemic brain injury (Berger et al. in press). In vitro it was found, that the glutamate uptake into synaptic vesicles is stimulated by phosphocreatine even in the absence of added ATP. At a glutamate concentration of 50  $\mu\text{M}$ , maximal phosphocreatine-stimulated glutamate uptake was significantly higher than that maximally stimulated by ATP (Xu et al., 1996). A mechanism by which creatine supplementation

might protect the immature brain from ischemic injury could therefore be the activation of glutamate uptake into synaptic vesicles. Since creatine crosses the placental barrier and has been reported to accumulate in the brain of adults after oral supplementation (Dechent et al., 1999), further studies should be performed to test the neuroprotective efficacy of creatine on hypoxic-ischemic perinatal brain damage.

**Table 3.** New Therapies for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

---

|  |
|--|
| Hypothermia, brain only                            |
| MgSO <sub>4</sub>                                  |
| Oxygen-free radical inhibitors, e.g. allopurinol   |
| Calcium channel blockers, e.g. flunarizine         |
| Inhibitors of nitric oxide production              |
| Monoganglioside GM                                 |
| NMDA receptor antagonists, e.g. MK-801             |
| Creatine   |
| Phenobarbital                                      |
| Melatonin  |
| Cannabidiol  |
| Nerve growth factor (NGF)                          |
| Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) |
| CO <sub>2</sub> control                            |
| Glucocorticosteroids ?                             |
| Gene therapy ?                                     |
| Stem cells ?                                       |
| Combination of above                               |

---

#### *Selective Nitric Oxide Synthase Inhibition by 2-Iminobiotin*

Recently, Peeters-Scholte and coworkers reported about the neuroprotective properties of selective NOS inhibition in the newborn piglet model of perinatal hypoxia-ischemia (Peeters-Scholte, 2002). They investigated the effects of NOS inhibition by 2-iminobiotin on histological outcome and clinical parameters, such as cerebral oxygenation, hemodynamics, and electrocortical brain activity. The drug provides selective inhibition of neuronal (nNOS) and inducible (iNOS), but not endothelial (eNOS) nitric oxide synthase. Intravenous application of 2-iminobiotin preserved cerebral oxygenation and hemodynamics, and electrocortical brain activity. Moreover, 2-iminobiotin treatment improved cerebral energy state, reduced the amount of vasogenic edema, and decreased the apoptosis-related neuronal cell death. These promising neuroprotective effects of 2-iminobiotin treatment after hypoxia-ischemia remain to be confirmed in the human.



### *Melatonin*

Another interesting molecule under investigation is melatonin, a secretory product of the vertebrate pineal gland. Melatonin was recently shown to possess free radical scavenging activity, especially in the brain (for review: Reiter et al. 2001). This high efficacy may relate to the ease with which melatonin crosses the blood-brain barrier and to the fact that melatonin levels in the cerebrospinal fluid are orders of magnitude higher than in the blood. Furthermore, melatonin seems to lack significant toxicity and preliminary evidence in humans suggests that it may be protective against neurodegenerative disorders.

### *Cannabidiol*

The non-psychoactive marijuana constituent, cannabidiol, can prevent both hypoxia-ischemia induced glutamate neurotoxicity and oxygen radical induced cell death (for review: Hampson et al. 2000). Tetrahydrocannabinol the psychoactive constituent of Cannabis, also blocks neurotoxicity with a potency similar to that of cannabidiol. Using a glutamate neuronal toxicity model cannabidiol was demonstrated to be significantly more protective than either of the antioxidant vitamins,  $\beta$ -tocopherol or ascorbate. These properties of cannabinoids suggest they may have a therapeutic role as neuroprotectants, and the particular properties of cannabidiol make it a good candidate for such development.

### *Glial cell line-derived neurotrophic factor*

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a protein in transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, was initially considered to be a specific trophic factor and neuroprotective agent for dopaminergic neurons (for review: Wang et al. 2002). Recent studies indicate that GDNF can protect the cerebral hemispheres from damage induced by middle cerebral arterial ligation. These effects are mediated through specific GDNF receptor alpha-1 (GFR1). Furthermore, it was shown that hypoxia-ischemia induced nitric oxide synthase (NOS) activity can be attenuated by GDNF.

### *Gene Therapy*

Recently, it is becoming clear that some of genes induced during cerebral ischemia may actually serve to rescue the cell from death. However, the injured cell may not be capable of expressing protein at high enough levels to be protective. One interesting arena of such intervention is the use of viral vectors to deliver potentially neuroprotective genes at high levels (for review: Yenari et al. 2001). Recent scientific advances in the area of stroke and

neurodegeneration have led to the discovery of specific cellular events that occur during necrosis and apoptosis. It is now possible to therapeutically target these events with the hope of rescuing brain cells from death. Several studies have shown that cerebral ischemia alters gene expression and that some of the induced genes may serve a protective or damaging role. Among the many genes that have been identified to participate in ischemia, those possessing neuroprotective properties may be candidates for gene therapy.

## FINAL COMMENT

Neuroprotection of the developing brain can have an enormous impact on the quality of life of an individual and on public health. In the absence of appropriate neuroprotection, severe injury of a fetal or infant brain will result in lifelong disability. Neuroprotection of the immature brain is feasible, since short-term neuroprotection during critical periods of brain development can have life long effects in preserving normal neurological function. However, identification of the critical periods for neuroprotection against various insults remains an area in need of continued intensive study.

*For the future, it is important to know what we don't know.*

## REFERENCES

1. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ 2001 Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics*. 107:480-484.
2. Berger R, Middelans J, Vaihinger HM, Mies G, Wilken B, Jensen A 2002 Creatine protects the immature brain from hypoxic-ischemic injury. *Pediatr Res*, in press.
3. Dechent P, Pouwels JW, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J 1999 Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 277:R698-R704.
4. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR 1998 Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics*. 102:885-892.

5. Hampson AJ, Grimaldi M, Lolic M, Wink D, Rosenthal R, Axelrod J 2000 Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci* 899:274-282.
6. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF 1998 Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156-163.
7. Mittendorf R, Dambrosia J, Pryde PG, Lee KS, Gianopoulos JG, Besinger RE, Tomich PG 2002 Association between the use of antenatal magnesium sulfate in preterm labor and adverse health outcomes in infants. *Am J Obstet Gynecol* 186:1111-1118.
8. Nelson KB, Grether JK 1995 Can magnesium sulfate reduce risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics* 95:263-269.
9. Peeters-Scholte CM 2002 Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia. Proefschrift. University of Utrecht, The Netherlands.
10. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S 2001 Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 939:200-215.
11. Schendel DE, Berg CJ, Ycargin-Allsopp M, Boyle CA, Decougle P 1996 Prenatal magnesium sulfate exposure and the risk of cerebral palsy or mental retardation among very low-birth-weight children aged 3 to 5 years. *JAMA* 276:1805-1810.
12. Wang Y, Chang CF, Morales M, Chiang YH, Hoffer J 2002 Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 962:423-437.
13. Yenari MA, Dumas TC, Sapolsky RM, Steinberg GK 2001 Gene therapy for treatment of cerebral ischemia using defective herpes simplex viral vectors. *Neurol Res* 23:543-552.
14. Xu CJ, Klunk WE, Kanfer JN, Xiong Q, Miller G, Pettegrew JJW 1996 Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with ATP-dependent glutamate uptake. *J Biol Chem* 271:13435-13440.

---

# **Hoofdstuk 10**

## **SAMENVATTING, CONCLUSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEF**

Perinatale hersenbeschadiging is een belangrijke oorzaak van perinatale morbiditeit en mortaliteit. Met de huidige klinische detectiemethoden is het echter niet mogelijk de incidentie van perinatale hersenbeschadiging ten gevolge van hypoxie en/of ischaemie daadwerkelijk te beïnvloeden. Er zijn echter wel vele experimentele studies uitgevoerd die de pathofysiologische processen analyseren welke ten grondslag liggen aan perinatale hersenbeschadiging. Dit betreft onder meer de acute stilstand van de energievoorziening van de hersenen leidende tot het vrijkomen van prikkelende aminozuren zoals glutamaat en aspartaat. Glutamaat bindt zich aan postsynaptische glutamaat receptoren welke de calcium kanalen reguleren. De hieruit resulterende calcium influx activeert proteases, lipases en endonucleases welke vervolgens het cellulaire skelet vernielen. Het acute tekort aan cellulaire energie dat optreedt tijdens ischaemie veroorzaakt een nagenoeg algehele remming van de cerebrale eiwit aanmaak. Wanneer de ischaemische periode voorbij is, herstelt de eiwitsynthese zich tot het pre-ischaemische niveau in de minder kwetsbare gebieden van de hersenen terwijl deze productie op een lager niveau blijft in de meer kwetsbare gebieden.

Dientengevolge lijkt de verminderde eiwitproductie een vroege indicator te zijn voor de daaropvolgende dood van de zenuwcellen. Een tweede fase van zenuwcel beschadiging treedt op tijdens de reperfusie fase. Men veronderstelt dat deze celbeschadiging wordt veroorzaakt door het vrijkomen van zuurstof radicalen, de synthese van NO, ontstekingsreacties en een uit balans raken van stimulerende en remmende neurotransmitter systemen na de ischaemie. Een deel van deze secundair optredende neurogene schade wordt mogelijk veroorzaakt door het op gang komen van een cellulaire suïcideproces, apoptose genaamd. Recente studies lieten zien dat na cerebrale ischaemie ontstekingsreacties niet alleen secundaire neurogene schade bevorderen maar ook de immature hersenen direct beschadigen. Deze beschadiging lijkt te worden veroorzaakt door de cardiovasculaire effecten van endotoxinen waardoor cerebrale hypoperfusie ontstaat en door het activeren van apoptotische processen in voorlopers van de oligodendrocyten ten gevolge van het vrijkomen van TNF- $\alpha$ .

Daar een belangrijk deel van de zenuwcelbeschadiging ontstaat door pathofysiologische processen, die pas uren of zelfs dagen na het ischaemisch insult beginnen, is het kunnen vaststellen van de juiste therapeutische periode van groot belang. De kennis van deze pathofysiologische mechanismen heeft het wel al mogelijk gemaakt nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen met goede resultaten in dierexperimenten. De mogelijke effectiviteit van zulke therapieën was het onderwerp van de studies gepresenteerd in dit

proefschrift in het bijzonder de veelbelovende effecten van het toepassen van de calcium-antagonist flunarizine, het toedienen van magnesium en het aanwenden van milde cerebrale hypothermie in de post ischaemische periode.

#### *Flunarizine*

Daar flunarizine, een klasse IV calcium antagonist, een krachtige vaatverwijder is, kunnen de beschermende eigenschappen van deze stof op het centrale zenuwstelsel geheel of gedeeltelijk teniet worden gedaan door de cardiovasculaire neveneffecten. Om dit probleem te analyseren onderwierpen we mature foetale schapen aan acute intrauteriene asphyxie (*Hoofdstuk 4*). Foetale lammeren uit de studiegroep kregen flunarizine intraveneus toegediend vóór het begin van de asphyxie. Tijdens acute asphyxie was er een herverdeling van de cardiac output naar de centrale organen, samen met een uitgesproken bradycardie en een toenemende arteriële bloeddruk. Foetale lammeren in de studiegroep hadden hogere plasma catecholamine spiegels dan in de controlegroep. Na de asphyxie, normaliseerde de centralisatie van de circulatie niet zo snel als deze was ontstaan: het herstel duurde ongeveer 30 minuten. Tussen de dieren in studie en de controlegroep bestonden nauwelijks verschillen in het tijdsverloop van de geregistreerde fysiologische en cardiovasculaire parameters voor, tijdens en na acute intrauteriene asphyxie.

Gezien de sleutelrol van de overmaat aan Ca-influx voor het ontstaan van celdood in het centrale zenuwstelsel werd de beschermende invloed van flunarizine, een Ca-influx antagonist, op het hersenweefsel van het foetale lam getest (*Hoofdstuk 5*). Hieruit werd de conclusie getrokken dat voorbehandeling met een lage dosis flunarizine de hersenen van het bijna à terme foetale lam beschermt tegen ischaemische schade. Tevens werd de conclusie getrokken dat deze bescherming niet verloopt via flunarizine afhankelijke veranderingen in cerebrale bloeddorstroming. Daar een lage dosering flunarizine de reactie van het cardiovasculaire systeem op asphyxie niet verandert zou klinisch gebruik heroverwogen moeten worden, vooral bij foetus welke risico lopen op hypoxische- ischaemische hersenbeschadiging.

#### *Lubeluzol*

In vitro en in vivo studies uit de laatste tien jaar toonden aan dat het benzothiazol derivaat lubeluzol in staat is de hersenen te beschermen tegen hypoxische- ischaemische schade. In klinische studies waren de resultaten tegenstrijdig. Beschermende en niet beschermende effecten werden waargenomen bij volwassen patiënten met acuut herseninfarct. Echter het veiligheidsprofiel en effectiviteit van lubeluzol leek veelbelovend genoeg om verdere

studies bij immature dieren te rechtvaardigen. Eerst werd het effect van lubeluzol op het foetale cardiovasculaire systeem onderzocht (*Hoofdstuk 6*). Lubeluzol beïnvloedde de centralisatie in de foetale circulatie niet tijdens acute asphyxie in voldragen foetale lammeren. Dit mechanisme is van groot belang daar het de foetale hersenen beschermt tegen celdood schade door de bloeddorstrooming naar de centrale organen (zoals hersenen, hart, bijnieren) te verhogen wanneer er zuurstoftekort dreigt. Op grond van deze veelbelovende resultaten werden voorts de beschermende effecten van lubeluzol op de hersenen van het foetale schaap onderzocht. Helaas kon geen enkel beschermend effect van deze stof op de schade in het centrale zenuwstelsel, geïnduceerd door kortdurende algehele cerebrale ischaemie, worden gevonden. Dit lijkt in strijd met de bevindingen bij volwassenen (zie voor gedetailleerde overwegingen *Hoofdstuk 7*).

Echter in bijna al deze studies werd focale in plaats van globale cerebrale ischaemie gebruikt. Dit type cerebrale ischaemie wordt gekenmerkt door een ischaemische kern en een gebied hieromheen, ischaemische penumbra genoemd. In dit gebied wordt het hersenweefsel doorstroomd op een niveau gelegen tussen de grens van functionele beperkingen en/of morfologische integriteit. Tenzij de hersendoorbloeding binnen een paar uur na het insult snel verbetert in dit gebied, is celbeschadiging het onvermijdbare resultaat. Zoals voorheen aangetoond, wordt glutamaat in grote hoeveelheid geproduceerd centraal in het infarct en getransporteerd naar de extracellulaire ruimte. Het vrijgekomen glutamaat activeert de productie van NO in de hersenen door middel van  $Ca^{2+}$ -influx via de NMDA-gereguleerde calcium kanalen. Bij focale ischaemie is dit mechanisme waarschijnlijk belangrijker voor het ontstaan van neurogene celbeschadiging dan bij globale ischaemie, daar bij globale ischaemie slechts een lichte en kortdurende stijging in de glutamaat productie wordt gezien. Dit zou gedeeltelijk het verschil in uitkomst tussen de huidige studie en voorafgaand onderzoek na behandeling van hersenbeschadiging met lubeluzol, kunnen verklaren.

### *Magnesium*

In de klinische obstetrie wordt magnesium sulfaat reeds meer dan zestig jaar gebruikt voor de indicaties premature weeënactiviteit en de behandeling van pre-eclampsie. Nelson en Grether (1995) stelden op grond van een retrospectieve epidemiologische studie vast, dat in de groep prematuur geboren kinderen wiens moeders waren behandeld met magnesium sulfaat, hetzij wegens pre-eclampsie hetzij wegens premature weeënactiviteit, minder frequent ischaemische encephalopathie voorkwam dan in een voor de zwangerschapsduur gematchte groep kinderen waarvan de moeders niet met dit middel waren behandeld. Dit

verschil was statistisch zeer significant. Vrijwel dezelfde resultaten werden vastgesteld in een retrospectieve studie uitgevoerd door Schendel et al. (1996).

Deze beschermende eigenschap van magnesium voor zenuwcellen wordt toegeschreven aan verschillende effecten van dit molecuul op de pathofysiologische mechanismen tijdens en na cerebrale ischaemie zoals vaatverwijding, remming van de NMDA-receptor, anti-convulsieve eigenschappen. Verder reduceert magnesium de door ischaemie geïnduceerde NO-productie door het blokkeren van de NO-synthase (*Hoofdstuk 8*). NO is een vrije radicaal gesynthetiseerd door NO-synthase in neuronen en andere celsoorten als reactie op de toename van intracellulair calcium tijdens en na ischaemie. Tijdens reperfusie produceren NO en vrije zuurstof radicalen samen peroxyd, hetgeen leidt tot de vorming van krachtiger radicalen, welke het hersenweefsel irreversibel beschadigen. Daar van magnesium is beschreven dat het cerebrale NMDA-receptoren kan blokkeren, die de calcium kanalen controleren, zou de beschermende werking van magnesium voor de hersencellen kunnen berusten op de remming van NO-productie na ischaemie door een reductie van Ca-influx in de neuronen. Gebaseerd op de deze veelbelovende bevindingen zijn verschillende klinische studies uitgevoerd om het effect van magnesium op de incidentie van ischaemische encephalopathie na te gaan bij de premature foetus.

Recent rapporteerde Mittendorf et al. (2002) een significante associatie tussen  $MgSO_4$  toegediend als weëremmer en de totale kindersterfte in de MagNet studie. Kinderen die navelstreng bloedspiegels van geïoniseerd magnesium hadden boven de vastgestelde mediaan van het bestudeerde cohort vertoonden significant meer negatieve gevolgen, onder meer PVL, IVH, CP, sterfte, dan kinderen waarbij deze concentratie zich onder de mediaan bevond. Dus zij vonden dat gecombineerde negatieve uitkomsten geassocieerd waren met het blootgesteld worden aan magnesium in een dosisafhankelijke relatie. Dientengevolge moeten nieuwe studies worden uitgevoerd met  $MgSO_4$  om de veronderstelde beschermende werking op de hersenen van het voor de geboorte toedienen van deze stof als weëremmer bij partus prematurus, nader te onderzoeken.

### *Milde hypothermie*

De beschermende werking van milde hypothermie op de hersenen is de laatste jaren onderzocht en het toepassen hiervan biedt interessante mogelijkheden tot neuroprotectie. Experimentele studies bij volwassen dieren lieten zien dat verlaging van de hersentemperatuur met 3-4°C, tijdens globale cerebrale ischaemie, de neurogene schade sterk beperkt. Daarenboven presteerden de behandelde dieren nadien beter dan de controledieren in leer- en gedragtesten. In deze studie onderzochten we de precieze relatie



tussen het postischaemische tijdsverloop en de mate van milde hypothermie waarbij de beschermende werking kon worden bereikt bij ischaemische insulten van verschillende ernst (*Hoofdstuk 9*). Hiertoe maakten we gebruik van weefselcoupes uit de hippocampus van à terme foetal cavia's die werden blootgesteld aan een tekort aan zuurstof en glucose (het OGD model).

Hypothermie, toegepast direct na OGD, verbeterde het herstel van het energiemetabolisme en eiwitsynthese significant. Bij een interval van twee uur tussen noxe en hypothermie was de beschermende werking afhankelijk van de mate van hypothermie. Het terugbrengen van de incubatietemperatuur tot 31°C verminderde de verstoringen in het energiemetabolisme en de eiwitsynthese, terwijl het verlagen van de temperatuur tot maar 34°C niet effectief bleek. Het toepassen van hypothermie 4 uur na OGD had geen enkele invloed op het herstel van het energiemetabolisme en eiwitproductie. Deze resultaten zijn in overeenstemming met studies uitgevoerd bij foetale schapen. Gebaseerd op deze resultaten, beschouwen vele onderzoekers het toepassen van hypothermie, tijdens en vooral na een hypoxisch ischaemisch insult, als een effectieve therapeutische benadering. Recente klinische veiligheidsstudies toonden aan dat, milde cerebrale hypothermie bij asphyctische pasgeborenen, geen schadelijke bijwerkingen veroorzaakte en de uitkomst bij kinderen met matige tot ernstige encephalopathie verbeterde (Gunn et al. 1998; Bathin et al. 2001).

## DE TOEKOMST VAN PERINATALE NEUROPROTECTIE

Gedurende de laatste jaren is er belangrijke voortgang geboekt in het ontrafelen van de cellulaire en moleculaire processen die ten grondslag liggen aan hypoxische-ischaemische hersenbeschadiging. Er zijn verschillende nieuwe neuroprotectieve therapieën beschikbaar gekomen die zowel in dierexperimenten als bij volwassenen veelbelovend zijn. Echter prospectieve gecontroleerde studies zijn noodzakelijk. De volgende paragrafen beschrijven kort enkele nieuwe strategieën welke momenteel onderwerp van studie zijn (Tabel 3).

### *Combinatie therapie*

Na ischaemie doen zich vele schadelijke processen voor die met elkaar zijn verweven. Het is daarom zeer onwaarschijnlijk dat goede neuroprotectie bewerkstelligd kan worden via één enkel werkingsmechanisme (bijvoorbeeld of calcium, glutamaat of vrije radicalen). Dientengevolge hebben sommige onderzoekers gezocht naar combinatie therapieën om

synergische effecten te bereiken. Combinatie therapie kan initieel een neuroprotectieve stof betreffen, die bij voorkeur werkt op meerdere aangrijpingspunten in de keten van processen die op gang komen bij ischaemie (bijvoorbeeld magnesium). De volgende stap is het voorkomen van reperfusieschade, en tenslotte kan het toedienen van stoffen overwogen worden welke de plasticiteit van de zich ontwikkelende hersenen verbetert (bijvoorbeeld groeifactoren, gentherapie, stamcellen).

**Tabel 3** Nieuwe Therapieën Bij Hypoxische-Ischaemische Encephalopathie

---

|  |
|--|
| Hypothermie van de hersenen alleen                           |
| MgSO <sub>4</sub>  |
| Remmers van vrije zuurstofradicalen bijvoorbeeld allopurinol |
| Calcium kanaal blokkers bijvoorbeeld flunarizine             |
| Remmers van NO productie                                     |
| Monoganglioside GM   |
| NMDA receptor antagonisten, bijvoorbeeld MK-801              |
| Creatine   |
| Phenobarbital  |
| Melatonine   |
| Cannabidiol  |
| Nerve growth factor (NGF)                                    |
| Gliaal cell line derived neurotrophic factor (GDNF)          |
| CO <sub>2</sub> controle                                     |
| Glucocorticoiden ?   |
| Gen therapie ?   |
| Stamcellen ?   |
| Combinatie van bovenstaande                                  |

---

### *Creatine*

Mathews et al. (1998) rapporteerden dat creatine de hersenen beschermt tegen de door maloneaat veroorzaakte toename van hydroxyl radicalen, en tegen de door 3-nitropropion veroorzaakte stijging van 3-nitrotyrosine, een marker van peroxynitriet gestuurde oxydatieve beschadiging. Bij foetale en neonatale dieren vermindert creatine de remming van eiwitsynthese en vermindert daarmee de mate van hypoxische ischaemische hersenbeschadiging (Berger et al., in druk). In vitro werd vastgesteld dat de glutamaat opname in de synaptische blaasjes wordt gestimuleerd door fosfocreatine zelfs in afwezigheid van toegevoegd ATP. Bij een glutamaat concentratie van 50µM, was de maximale fosfocreatine gestimuleerde glutamaat opname significant hoger dan die welke maximaal gestimuleerd kon worden met ATP (Xu et al. 1996). Een mogelijk mechanisme waardoor creatine toediening de immature hersenen zou kunnen beschermen tegen

ischaemische schade, zou het activeren van de glutamaat opname in de synaptische blaasjes kunnen zijn. Daar creatine de placenta passeert en bekend is dat het zich ophoopt in de hersenen van volwassenen (Dechent et al. 1999), zijn verdere studies welke de neuroprotectieve werking van creatine op hypoxische-ischaemische perinatale hersenschade bestuderen voor de hand liggend.

#### *Selectieve Nitric Oxide Synthase Inhibitie door 2-Iminobiotine*

In een recente publicatie van Peeters-Scholte et al. (2002) werden de neuroprotectieve eigenschappen van selectieve NOS inhibitie na perinatale hypoxie-ischemie in een neonataal biggenmodel beschreven. Zij onderzochten de effecten van NOS inhibitie door 2-iminobiotine op hersenweefsel en klinische parameters zoals cerebrale oxygenatie, hemodynamiek en elektrische hersenactiviteit. 2-Iminobiotine veroorzaakte selectieve inhibitie van het neuronale (nNOS) en induceerbare (iNOS) NO synthase maar niet van het endotheliale (eNOS) enzym. Intraveneuze toediening van 2-iminobiotine hield de cerebrale oxygenatie, hemodynamiek en elektrische hersenactiviteit in stand. Bovendien werd de energie status van de hersenen door 2-iminobiotine behandeling verbeterd, verminderde de hoeveelheid vasogeen oedeem en nam de kwantiteit van door apoptose geïnduceerde celdood af. Of deze veelbelovende neuroprotectieve eigenschappen van 2-iminobiotine na een episode van hypoxie-ischemie ook bij de mens effectief zijn, dient in verder onderzoek bevestigd te worden.

#### *Melatonine*

Een ander interessante stof in dit verband is melatonine, een stof geproduceerd bij vertebraten door de glandula pinealis. Van melatonine werd recent bekend dat het vooral in de hersenen vrije radicalen opruimt (voor overzicht zie Reiter et al. 2001). De grote efficiëntie waarmee dit gebeurt kan te danken zijn aan de gemakkelijke passage van melatonine door de bloed-hersen barrière alsmede aan het feit dat de melatonine concentratie in de cerebrospinale vloeistof zeer veel hoger is dan de concentratie in het bloed. Daarenboven lijkt melatonine niet giftig te zijn en voorlopige gegevens bij mensen suggereren dat het kan beschermen tegen neuro-degeneratieve ziekten.

#### *Cannabidiol*

Het niet psychoactieve marihuana bestanddeel, cannabidiol, kan zowel de door hypoxie-ischaemie geïnduceerde glutamaat neurotoxiciteit als de door vrije zuurstof radicalen geïnduceerde celdood voorkomen (voor overzicht zie Hampson et al. 2000). Tetrahydro-

cannabinol, het psychoactieve bestanddeel van cannabis, blokkeert neurotoxiciteit eveneens in dezelfde mate als cannabidiol. In een glutamaat neurotoxisch model werkte cannabidiol significant beter beschermend dan de antioxidatieve vitaminen  $\beta$ -tocopherol of ascorbinezuur. Deze eigenschappen van cannabinoiden wekken de suggestie dat ze een therapeutische rol kunnen spelen bij neuroprotectie en de specifieke eigenschappen van cannabidiol maken het voor dit doel een goede kandidaat.

#### *Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)*

GDNF, een eiwit uit de transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) super familie, werd aanvankelijk beschouwd als een specifieke trophische factor en als een beschermende stof voor dopaminerge neuronen (voor overzicht zie Wang et al. 2002). Recente studies laten zien dat GDNF de cerebrale hemisferen kan beschermen tegen schade geïnduceerd door het afklemmen van de a. cerebri media. Deze effecten verlopen via de specifieke GDNF receptor alpha-1 (GFR1). Voorts kon worden aangetoond dat door hypoxie-ischaemie geïnduceerde NO-synthase (NOS) activiteit kan worden onderdrukt door GDNF.

#### *Gen therapie*

Recent is het duidelijk geworden dat het tot expressie komen van bepaalde genen tijdens cerebrale ischaemie tot doel heeft het voorkomen van celdood. Echter de beschadigde cel zou niet in staat kunnen zijn voldoende eiwit te produceren om de beschermende werking te kunnen waarborgen. Een interessant onderzoeksgebied in dit opzicht is het gebruik van virale vectoren om mogelijke neuroprotectieve genen tot expressie te laten komen (voor overzicht zie Yenari et al. 2001). Recente wetenschappelijke resultaten op het terrein van stroke en neurodegeneratie hebben geleid tot de ontdekking van specifieke cellulaire processen die optreden tijdens necrose en/of apoptose. Het is nu mogelijk deze specifieke cellulaire processen te beïnvloeden met als doel de dood van hersencellen te voorkomen. Uit verschillende studies blijkt dat cerebrale ischaemie de genexpressie verandert en dat sommige van de tot expressie gebrachte genen een beschermende of een beschadigende rol hebben. Onder de vele genen die een rol spelen bij ischaemie zijn die welke neuroprotectieve eigenschappen hebben kandidaten voor gen therapie.

## SLOTCONCLUSIE

Bescherming van de zich ontwikkelende hersenen bij dreigende schade kan van grote betekenis zijn op de kwaliteit van leven van een individu en op de maatschappij als geheel. Zolang de mogelijkheid van daadwerkelijke bescherming echter ontbreekt zal ernstige beschadiging van de foetale of neonatale hersenen uitmonden in levenslange invaliditeit. Indien het mogelijk wordt de exacte intervallen tussen het hypoxische-ischaemische insult en de mogelijke adequate therapie waarbinnen deze moet worden ingesteld, te definiëren dan lijkt bescherming van de hersenen haalbaar.

*Voor de toekomst is het belangrijk te weten wat we niet weten.*

## REFERENCES

1. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ 2001 Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hyperthermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics*. 107:480-484.
2. Berger R, Middelani J, Vaibinger HM, Mies G, Wilken B, Jensen A 2002 Creatine protects the immature brain from hypoxic-ischemic injury. *Pediatr Res*, in press.
3. Dechent P, Pouwels JW, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J 1999 Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 277:R698-R704.
4. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR 1998 Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics*. 102:885-892.
5. Hampson AJ, Grimaldi M, Lolic M, Wink D, Rosenthal R, Axelrod J 2000 Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Ann N Y Acad Sci* 899:274-282.
6. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF 1998 Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156-163.
7. Mittendorf R, Dambrosia J, Pryde PG, Lee KS, Gianopoulos JG, Besinger RE, Tomich PG 2002 Association between the use of antenatal magnesium sulfate in preterm labor and adverse health outcomes in infants. *Am J Obstet Gynecol* 186:1111-1118.
8. Nelson KB, Grether JK 1995 Can magnesium sulfate reduce risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics* 95:263-269.

9. Peeters-Scholte CM 2002 Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia. Proefschrift. University of Utrecht, The Netherlands.
10. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S 2001 Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 939:200-215.
11. Schendel DE, Berg CJ, Ycargin-Allsopp M, Boyle CA, Decougle P 1996 Prenatal magnesium sulfate exposure and the risk of cerebral palsy or mental retardation among very low-birth-weight children aged 3 to 5 years. *JAMA* 276:1805-1810.
12. Wang Y, Chang CF, Morales M, Chiang YH, Hoffer J 2002 Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 962:423-437.
13. Yenari MA, Dumas TC, Sapolsky RM, Steinberg GK 2001 Gene therapy for treatment of cerebral ischemia using defective herpes simplex viral vectors. *Neurol Res* 23:543-552.
14. Xu CJ, Klunk WE, Kanfer JN, Xiong Q, Miller G, Pettegrew JJW 1996 Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with ATP-dependent glutamate uptake. *J Biol Chem* 271:13435-13440.

1. De eerste twee termen van een rekenkundige rij zijn 3 en 7. De som van de eerste tien termen is 100. Bereken de tiende term van de rij.

2. De eerste twee termen van een rekenkundige rij zijn 5 en 11. De som van de eerste tien termen is 100. Bereken de tiende term van de rij.

3. De eerste twee termen van een rekenkundige rij zijn 2 en 8. De som van de eerste tien termen is 100. Bereken de tiende term van de rij.

4. De eerste twee termen van een rekenkundige rij zijn 1 en 5. De som van de eerste tien termen is 100. Bereken de tiende term van de rij.

5. De eerste twee termen van een rekenkundige rij zijn 4 en 10. De som van de eerste tien termen is 100. Bereken de tiende term van de rij.