

Radicali liberi e danno cerebrale nel neonato con insulto ipossico-ischemico

Giuseppe BUONOCORE, Serafina PERRONE e Maria Carmela MURACA

*Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione,
Università degli Studi, Siena*

Riassunto. - I radicali liberi (RL), molecole instabili e altamente reattive per la presenza di elettroni spaiati sull'orbitale esterno, si formano normalmente in qualsiasi cellula vivente poiché sovrintendono alle reazioni di ossidoriduzione utili alla sua sopravvivenza. Quando prodotti in quantità eccessive diventano importanti mediatori di danno cellulare e tissutale. L'eccesso di produzione di RL è evenienza frequente nel neonato e può essere provocata in diverse condizioni metaboliche. Il sistema nervoso centrale del neonato è particolarmente a rischio di danno mediato dai RL per l'elevato contenuto nelle membrane neuronali di acidi grassi poliinsaturi, l'alto "uptake" di ossigeno e i relativamente bassi livelli di difese antiossidanti. Il metabolismo ossidativo mitocondriale e fosfolipidico, l'ossido nitrico, la flogosi, la disponibilità di ferro libero, l'attivazione di enzimi proteolitici sono potenziali sorgenti di RL durante un evento asfittico.

Parole chiave: ipossia-ischemia, danno cerebrale, radicali liberi, neonato.

Summary (*Free radicals and brain damage during hypoxia-ischaemia in newborns*). - Free radicals (FR) are highly reactive chemical molecules containing one or more unpaired electrons. Oxygen-derived free radicals, collectively termed reactive oxygen species (ROS), are normally produced in living organisms. When over produced, they are major mediators of cell and tissue injury. There is a critical balance between free radical generation and antioxidant defenses. Oxidative stress *in vivo* is a degenerative process due to the over production and propagation of FR reactions. FR reactions lead to oxidation of lipids, proteins, polysaccharides and to DNA damage. Newborns and particularly preterm infants are very susceptible to FR oxidative damage. In these subjects, there is evidence of an imbalance between antioxidant and oxidant-generating systems enhancing oxidant injury.

Key words: hypoxia-ischaemia, brain injury, free radicals, newborn.

Introduzione

Il danno cerebrale ipossico-ischemico è la principale causa di mortalità perinatale acuta e di morbidità neurologica dell'infanzia [1]. Le statistiche evidenziano in Europa un'incidenza di asfissia perinatale pari al 2-6% nuovi nati, di cui il 20-50% muore entro le prime settimane di vita [2-4]. Tra i sopravvissuti, più del 25% presenta sequele di ordine neuropsicologico in forma di ritardo mentale, paralisi cerebrale, anomalie del linguaggio, epilessia [5].

I notevoli progressi conseguiti nell'assistenza del neonato ad alto rischio hanno consentito una drastica riduzione della mortalità neonatale e del numero di handicap neurologici secondari a sofferenza perinatale. Ciò nonostante ancor oggi permangono evenienze patologiche pre e postnatali di difficile controllo, in quanto poco indagate. Tra gli aspetti di fisiopatologia perinatale ancora da chiarire vi sono tutte quelle condizioni in cui si può inaspettatamente verificare un danno da produzione di specie tossiche dell'ossigeno.

Biologia dello stress ossidativo

L'ossigeno, elemento fondamentale per la vita degli organismi eucarioti, è paradossalmente una sostanza tossica. La tossicità dell'ossigeno è principalmente legata alla possibilità di generare radicali liberi (RL): una serie di composti che contengono almeno un elettrone spaiato sull'orbitale esterno: O_2^- (anione superossido), HO^* (radicale idrossilico) e H_2O_2 (perossido d'idrogeno) [6-8]. La condizione di intrinseca instabilità rende ragione della fortissima reattività chimica posseduta da queste sostanze. Per raggiungere uno stato energetico più stabile, esse tendono a cedere il proprio elettrone o ad acquistarne uno dalla molecola con cui reagiscono la quale si ritroverà elettricamente instabile e nella necessità di cedere o assumere a sua volta un elettrone. Avvengono così una serie di reazioni autopropagantesi che portano alla formazione ulteriore di metaboliti tossici e a profonde modificazioni del substrato di partenza [9]. Le reazioni terminano allorché i RL incontrano una molecola simile o una sostanza "scavenger" oppure un sistema enzimatico in grado di metabolizzarle.

Numerosi studi sperimentali e clinici hanno ampiamente dimostrato come l'azione tossica dell'ossigeno e gli effetti dannosi dei RL svolgano un ruolo di primo piano nella patogenesi di molte malattie neonatali tra le quali la retinopatia della prematurità, la displasia broncopulmonare, l'enterocolite necrotizzante, l'insufficienza renale, la persistenza del dotto arterioso di Botallo, l'emorragia intraventricolare, la leucomalacia periventricolare [10-12]. E' verosimile che tali patologie non siano entità differenti ma aspetti diversi di un'unica, più ampia condizione definita come "malattia da radicali liberi nel neonato" [13]. I primi bersagli dei radicali liberi sono i fosfolipidi delle membrane biologiche che vanno incontro alla formazione di ulteriori radicali: lipoperossi (LOO^{*}), lipidi idroperossi (LOOH), lipidi alcossi (LO^{*}) e prodotti di frammentazione come la malondialdeide (MDA), alcani, ecc. Tutte queste sostanze possono esercitare la loro azione lesiva sul DNA e sulle strutture cellulari, mitocondriali e lisosomiali, con fuoriuscita di enzimi proteolitici, autodigestione della cellula, innesco dei processi di morte cellulare programmata.

Le specie reattive dell'ossigeno si formano normalmente in qualsiasi cellula vivente poiché sovrintendono a tutte le reazioni di ossidoriduzione utili alla sua sopravvivenza. Gli effetti biologici di modeste quantità di radicali dell'O₂, hanno talora estrema rilevanza, come la funzione *killling* del fagocita e la modulazione delle sostanze vasoattive rilasciate dall'endotelio, fondamentale per il mantenimento del circolo [14].

Quando *in vivo* si verifica una produzione continua di RL, tale da soverchiare la capacità antiossidante dell'organismo, si viene a creare una condizione di stress ossidativo, in cui non sono più garantiti il mantenimento del patrimonio antiossidante e il contenimento della produzione di RL [7].

Normalmente lo stress ossidativo è modesto e le difese della cellula possono aumentare tramite un complesso meccanismo che può coinvolgere l'espressione genica delle attività cosiddette *scavengers* [15]. Gli *scavengers* sono molecole che possono eliminare i RL e preservare i target molecolari cellulari potendo accettare e cedere elettroni mediante interconversione da uno stato ossidato ad uno ridotto. L' α -tocoferolo, la bilirubina, la cerulo-plasmina, l'acido urico, la transferrina, la vitamina C, i gruppi sulfidrilici del glutatone sono esempi di *scavengers* naturali. Un altro meccanismo di cui dispone l'organismo umano per la difesa del danno da RL è costituito dalle attività enzimatiche antiossidanti superossido-dismutasi, glutatone perossidasi, glutatone reduttasi e catalasi [16].

Patologia da radicali liberi

Il neonato è particolarmente predisposto al rischio di danno ossidativo, in conseguenza sia della maggiore produzione postnatale di radicali dell'O₂ (Fig. 1), sia



Fig. 1. - Meccanismi di produzione dei radicali liberi.

dell'incapacità dei sistemi di protezione di limitare le reazioni da loro indotte (Tab. 1). La nascita, comportando il passaggio da uno stato di ossigenazione fetale (PaO₂ 30-40 torr) ad una di tipo adulto (PaO₂ 60-70 torr), favorisce la formazione di RL in quantità tali da sovrastare le capacità di detossificazione ancora immature. La ipovalidità dei sistemi antiossidanti rende ancora più vulnerabile il neonato pretermine per l'accentuata povertà di sistemi di protezione enzimatica che giungono fisiologicamente a maturazione con il procedere della gestazione [17]. La maggiore disponibilità di substrati perossidabili nel SNC (acidi grassi insaturi) espone in egual misura i neonati a termine al danno da RL [18]. Il cervello del feto a termine è altresì a rischio perché possiede oligodendrociti con sistemi di valida captazione del ferro e recettori NMDA sufficientemente maturi per agevolare la progressione della catena di eventi metabolici che portano alla generazione e al danno da RL [19, 20].

La responsabilità della tossicità dei RL nel neonato coinvolge meccanismi complessi caratterizzati da una serie di reazioni, che, una volta innescate, si propagano a catena, potendosi amplificare attraverso circoli viziosi difficilmente arrestabili [21, 22]. E' pertanto estremamente difficile predire l'entità clinica e la presenza stessa del danno, la latenza rispetto al momento in cui l'insulto si è realizzato, la suscettibilità individuale del neonato, i tempi e i modi per eventuali interventi terapeutici.

Radicali liberi e meccanismi di danno cerebrale

L'encefalopatia ipossico-ischemica consegue ad un insulto asfittico che nella quasi totalità dei casi è subordinato alla interruzione del flusso utero-placentare e dello scambio O₂/CO₂. Il momento eziologico più spesso in causa è rappresentato dalla patologia del travaglio di parto ma l'evento precipitante spesso si è già realizzato in utero, prima ancora che il parto sia iniziato [23-25]. Gli eventi fondamentali determinanti il danno cerebrale da asfissia sono l'ipossiemia e l'ischemia; esse sono di regola associate, essendo l'una causa dell'altra, e sono in grado di innescare una catena di eventi di ordine me-

Tabella 1. - Difese antiossidanti nel neonato

↓ GSH-PX	↓ α-Proteinasi
↓ SOD	↓ Vit. E
↓ β-Carotene	↓ Selenio
↓ Riboflavina	↓ Rame
↓ Transferrina	↓ Zinco
↓ Ceruloplasmina	↓ Altri fattori plasmatici

GSH-PX: glutazione perossidasi; SOD: superossido dismutasi;
 ↓ : riduzione rispetto all'età successiva.

tabolico che costituiscono la via finale comune all'insulto ipossico-ischemico qualunque sia stato il fattore precipitante o determinante. La cronobiologia della sindrome ipossico-ischemica è bifasica contemplando due momenti fisiopatologicamente importanti [26]:

- insulto neuronale primario, determinato dal deficit di ossigeno e substrati energetici;
- insulto neuronale secondario, caratteristico della fase di ri-perfusione cerebrale.

E' recente l'acquisizione che la stessa ipossia, indipendentemente dalla fase di ri-perfusione, sia responsabile della sovrapproduzione di RL. Nostri studi hanno dimostrato come nel neonato la formazione di RL comporti un danno ossidativo alle lipoproteine plasmatiche in corso di ipossia [27, 28].

I meccanismi patogenetici del danno molecolare, cellulare e tissutale che consegue ad un insulto ipossico, coinvolgono una serie di eventi a cascata. Nelle fasi iniziali dell'ipossia il metabolismo anaerobio determina la progressiva deplezione delle riserve dei fosfati ad alta energia generando notevoli quantità di ADP, xantina, ipoxantina, NADH, FADH, acido lattico e ioni H⁺ [29, 30]. Alla riduzione delle riserve energetiche intracellulari segue:

- diminuzione dell'attività enzimatica delle pompe di membrana ATP-asi dipendenti;
- riduzione del potenziale di membrana;
- aumento del flusso intracellulare di Na⁺/K⁺, Cl⁻ e Ca²⁺;
- produzione di radicali liberi, danno perossidativo proteico e lipidico;
- edema citotossico [31-33].

L'aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ fa sì che si attivino numerosi enzimi calcio-dipendenti, quali fosfolipasi, endonucleasi, proteasi. L'attivazione delle fosfolipasi A₂ e C rilasciano acido arachidonico dal bilayer lipidico con contemporanea produzione di RL [34]. La fosfolipasi C catalizza inoltre la reazione che porta alla formazione di inositolo 3-fosfato, un secondo messaggero che induce il rilascio di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico [35]. Il Ca²⁺ può attivare anche la nitrossido sintetasi che porta alla formazione di ossido nitrico e radicale idrossile [36]. Il Ca²⁺, in corso di ipossia, entra nella cellula attraverso diversi meccanismi:

- attivazione di canali voltaggio dipendenti, e agonista-dipendenti quali i recettori per amino-idrossil-metil-isossazolo propionato (AMPA), kainato (KA), e N-metil D aspartato (NMDA);

- rilascio da parte dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico [22, 37]. Il progressivo aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ ne amplifica gli effetti devastanti determinando un circolo vizioso che esita inevitabilmente nei meccanismi di apoptosi e necrosi neuronale.

Nei neuroni l'afflusso unidirezionale di ioni interferisce con i sistemi di rilascio dei neuromediatrici a livello dei sinaptosomi corticali, e favorisce, in ultima analisi, l'accumulo extracitosolico del glutammato [38]. Il glutammato, interagendo con i recettori NMDA, contribuisce all'ulteriore corrente intracellulare di Ca²⁺.

L'eccesso di glutammato può, nelle cellule gliali ancora funzionanti, interscambiarsi con la cisteina del pool intracellulare, depauperando la riserva di antiossidanti quali il glutazione, di cui la cisteina è componente essenziale [26].

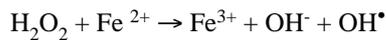
Il danno perossidativo endoteliale ha molteplici effetti: compromissione dell'autoregolazione del flusso cerebrale, aumento dell'espressione di molecole d'adesione per i PMN, loro marginazione, accumulo e attivazione intratissutale [39, 40]. Il *burst* leucocitario, che in condizioni di infezione si rivela meccanismo favorevole accelerando la *clearance* dei patogeni, in corso di insulto ipossico-ischemico diventa sorgente additiva di RL contribuendo all'intensificazione del danno cerebrale.

D'altra parte è noto che le infezioni neonatali precoci (associate a corioamniositi) sono condizioni favorevoli alla genesi dell'encefalopatia ipossico-ischemica, sia attraverso meccanismi diretti di processi flogistici vascolari o polmonari, sia attraverso un'incrementata produzione di RL da parte dei polimorfociti attivati dal gradiente locale di citochine [41-43]. Numerose cellule del SNC, tra cui microglia, astrociti e neuroni, sintetizzano e secernono in seguito a stimoli specifici e aspecifici (ad esempio in caso di danno tissutale) IL-1β e TNFα, citochine multifunzionali, direttamente implicate nello sviluppo del sistema nervoso centrale e nella patogenesi del danno cerebrale ipossico-ischemico [44, 45].

Ruolo del ferro libero

Elemento 26 nella tabella periodica, il ferro è indispensabile per la crescita e il benessere di tutti gli organismi viventi [46]. E' il metallo di transizione presente in quantità maggiore nel cervello ed è essenziale per il normale sviluppo neurologico del neonato [47]. L'essenzialità del ferro dipende dal suo coinvolgimento in un gran numero di processi metabolici quali reazioni di

sintesi, detossificazione difese antibatteriche, trasporto e utilizzazione dell'ossigeno [48, 49]. E' stato infatti dimostrato che la carenza di ferro durante i primi stadi di sviluppo del sistema nervoso centrale si associa ad alterazioni comportamentali, quali deficit della concentrazione e della memorizzazione mediati dall'ippocampo [50]. La carenza di ferro in altri distretti influenza negativamente la produzione di energia cellulare con compromissione della funzionalità dell'organo interessato [51]. Il ferro, però, si comporta come una lama a doppio taglio, potendo risultare altamente tossico quando presente in elevate quantità e non legato alle proteine [52]. In virtù della sua capacità di passare rapidamente dallo stato ferroso allo stato ferrico (da Fe^{2+} a Fe^{3+}), a seconda delle molecole con cui interagisce, il ferro diventa alternativamente ossidante o riducente [53]. La sua azione tossica si esplica mediante la reazione di Fenton, un processo di ossido riduzione in cui il ferro ferroso reagisce con il perossido di idrogeno generando radicale ossidrilico, il più potente agente ossidante di un sistema biologico [54]:



Normalmente il ferro è sequestrato da proteine di trasporto, quali la transferrina (Tf) e la lattoferrina, o immagazzinato in proteine di deposito quali la ferritina e l'emosiderina [55]. La ceruloplasmina agisce in sinergia con le proteine suddette, catalizzando l'ossidazione dello ione ferroso al meno reattivo ione ferrico, che si lega alla Tf [56]. E' noto che per essere *redox-cycling* attivo il Fe deve essere rilasciato dalle proteine di deposito e ridotto a Fe^{2+} . Condizioni come acidosi, ischemia, sovraccarico di ferro, attivazione dell'enzima emeossigenasi, sono in grado di accelerare i processi di compartimentalizzazione del Fe [57-59]. Dal momento che il ferro non può esistere nel plasma come ione, il termine ferro libero è stato coniato ad indicare il ferro a basso peso molecolare, privo di alta affinità di legame con la transferrina, e debolmente legato a citrati, lattati, fosfati, albumina o ad altre proteine plasmatiche [60, 61].

Il ferro può essere rilasciato all'interno dell'eritrocita dall'emoglobina come effetto del danno ossidativo e può innescare la perossidazione lipidica anche in assenza di HO^\bullet , reagendo direttamente con gli acidi grassi della membrana cellulare [57, 62, 63]. L'eritrocita può essere coinvolto direttamente nel danno cellulare mediato da radicali liberi sia come bersaglio che come sorgente dei RL. La predisposizione all'emolisi ossidativa dell'eritrocita del neonato è conosciuta da molto tempo essendo stata osservata da quasi mezzo secolo la bassa soglia del globulo rosso del neonato alla formazione di corpi di Heinz in incubazioni con farmaci e sostanze ossidanti. Basso contenuto di vitamina E, alta percentuale di acidi grassi insaturi di membrana e basse attivi-

tà enzimatiche antiossidanti avevano fatto ritenere la membrana del GR peculiarmente vulnerabile alla perossidazione lipidica mentre le pressioni parziali di ossigeno, più elevate nel neonato rispetto al feto, e la presenza di molecole di provenienza varia (tossine batteriche, farmaci) erano state considerate fattori scatenanti [64]. Indagini successive hanno dimostrato che la patogenesi dello stress ossidativo eritrocitario coinvolge la molecola dell'emoglobina (ed in particolare l'emoglobina fetale che più facilmente rilascia superossido) e le proteine di membrana prima ancora della componente lipidica [65, 66].

Agenti ossidanti provocano una rapida deplezione delle riserve di glutatione ed un aumento delle concentrazioni citosoliche di ferro libero [62]. Recenti indagini dimostrano che lo stress ossidativo eritrocitario è ancora più evidente in corso di ipossia analogamente a quanto accade durante l'incubazione di eritrociti *in vitro* con sostanze ossidanti e quanto accade *in vivo* nell'eritrocita del neonato gravemente asfittico [67, 68]. Precedenti nostri studi hanno segnalato che lo stress ossidativo alla nascita induce rilascio di ferro libero all'interno dell'eritrocita e aumentata produzione di RL nel plasma [27]. Gli idroperossidi totali e i prodotti avanzati di ossidazione proteica sono più elevati nel plasma dei neonati ipossici rispetto ai neonati sani [28]. Tanto maggiore è l'ipossia, valutabile in termini di diminuzione del pH ed aumento dell'ipoxantina, tanto maggiori sono i livelli di idroperossidi totali riscontrabili nel plasma e le concentrazioni intraeritrocitarie di ferro libero.

L'eritrocita è uno *scavenger* di RL e lo stress ossidativo può conseguire al metabolismo intraeritrocitario di xenobiotici, secondo il modello classico della fenilidralazina, oppure può avere origine da RL extraeritrocitari di varia provenienza (ischemia-riperfusion, *burst* leucocitario, metabolismo ossidativo fosfolipidico e mitocondriale) [69, 70]. E' probabile, per quanto non ancora dimostrato, che il ferro libero intraeritrocitario sia responsabile della ridotta emivita del globulo rosso e che l'eritrocita possa essere insieme bersaglio dei RL e possibile sorgente degli stessi in quanto fonte principale di ferro libero nell'organismo [71]. La concentrazione intraeritrocitaria di ferro libero sembra pertanto rappresentare un *marker* concreto dello stress ossidativo dell'eritrocita ed un indicatore del rischio di danno ossidativo in altri tessuti.

Il neonato è estremamente suscettibile al danno ossidativo indotto dal ferro libero per la fisiologica carenza dei sistemi antiossidanti alla nascita, per la diminuzione dei livelli di transferrina ormai già saturata dal ferro nel plasma e per le basse concentrazioni di ceruloplasmina nel liquido cerebrospinale [72, 73].

Nel neonato, in corso di asfissia, all'aumento del ferro libero plasmatico ed intraeritrocitario può seguire il rilascio di ferro libero nel parenchima cerebrale a causa

del danneggiamento della barriera emato-encefalica [74]. Addizionali sorgenti di Fe sono l'aumentato catabolismo dell'eme e la disfunzione del normale trasporto assonale di ferro cerebrale [75, 76].

Due ulteriori sorgenti di radicali dell'O₂ in corso di ipossia sono il processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale e l'attivazione dell'enzima nitrossido sintetasi (NOS).

Le specie reattive dell'O₂ sono continuamente generate all'interno dei mitocondri [77]. A livello della catena respiratoria, l'ossigeno viene ridotto ad H₂O dall'enzima citocromo ossidasi attraverso l'intermedia produzione di anione superossido [78]. L'O₂⁻ si forma nel corso delle operazioni del complesso I e III della catena respiratoria mediante la conversione del coenzima Q o ubiquinone in semiquinone in seguito alla perdita di un elettrone [79, 80]. I mitocondri sono dotati di un efficiente sistema antiossidante composto da superossido dismutasi, glutatione perossidasi, glutatione reduttasi, catalasi, NAD(P) transidrogenasi, vitamina A e C, e tiolo perossidasi SP-22 [81-83]. Pertanto il radicale superossido viene rapidamente dismutato ad acqua ossigenata [84]. In condizioni di sovrapproduzione o di deplezione del sistema antiossidante, l'H₂O₂ non viene eliminata creando una situazione di stress mitocondriale in cui l'H₂O₂ accumulata reagisce con il Fe e produce il metabolita idrossiradicale altamente reattivo [85].

Danno mitocondriale

Diverse condizioni fisiologiche e patologiche possono alterare la velocità basale di formazione di anione superossido all'interno del mitocondrio. Una di queste è l'accumulo di calcio che determina il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con conseguente produzione mitocondriale di radicali [86]. Nelle fasi precoci dell'ipossia-ischemia il normale *uptake* del Ca nella membrana interna del mitocondrio, peraltro necessario per la regolazione degli enzimi piruvato deidrogenasi e α -ossiglutarato deidrogenasi, aumenta favorendo alterazioni della struttura e del potenziale di membrana, inibizione della sintesi di ATP, disorganizzazione della catena respiratoria e generazione di radicali [87]. In condizioni di diminuita disponibilità di ossigeno al sito di riduzione energetica ove è posta la citocromo ossidasi, aumentano le forme ridotte degli enzimi componenti la catena di trasporto degli elettroni [88]. Uno di questi, la forma ridotta dell'ubiquinone, va incontro ad auto-ossidazione producendo RL. I mitocondri sono particolarmente sensibili al danno ipossico e svolgono un ruolo centrale nei processi di apoptosi e necrosi [89]. Una loro disfunzione porta al rilascio intracellulare di notevoli quantità di Ca e di specie reattive dell'ossigeno, responsabili a loro volta di ulteriore danno cellulare [87].

Ruolo dell'ossido nitrico

L'ossido nitrico (NO) è un radicale libero sintetizzato dall'enzima nitrossido sintetasi (NOS) nelle cellule endoteliali e neuronali in risposta all'incremento delle concentrazioni intracellulari di Ca⁺⁺ [90]. La NOS forma NO, citrullina ed H₂O₂ da arginina, NADPH e ossigeno [91]. Il NO reagisce con il radicale superossido e genera perossinitrite, che spontaneamente si decompone a formare metaboliti altamente reattivi, quali il radicale idrossile, il diossido d'azoto e il suo ione (NO₂⁺) [92]. Attualmente si conoscono tre isoforme di NOS: endoteliale (eNOS, Ca²⁺-dipendente, o NOS3), neuronale-gliale (nNOS o NOS1) e inducibile (iNOS, Ca²⁺-indipendente o NOS2) [93, 94]. L'enzima è ubiquitario. L'attività di tutte e tre le forme aumenta durante l'ischemia: la nNOS e l'eNOS entro pochi minuti e la iNOS dopo diverse ore [95]. Dal momento che in corso di ischemia non c'è disponibilità di ossigeno, il NO non può essere sintetizzato in questa fase nella quale però a livello mitocondriale si generano una notevole quantità di ioni superossido. La riperfusione consente la produzione di NO il quale, reagendo con gli ioni superossidi, conduce alla formazione del perossinitrito (ONOO⁻), molecola altamente instabile che spontaneamente si scinde nei radicali perossinitrile (NO₂[•]) e idrossile (OH[•]) [96-98]. Il NO₂[•] interagisce con molte molecole biologiche provocando perossidazione lipidica e nitrosilazione di tirosina e cisteina su enzimi intracellulari [92, 99]. Un altro metabolita del NO, potenzialmente nocivo, è il nitrite cloruro (NO₂Cl), che si forma dalla reazione del nitrite, un prodotto terminale del metabolismo dell'ossido nitrico, con l'acido ipocloroso (HOCl), prodotto dall'enzima mieloperossidasi dei neutrofili attivati [100]. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'iniziale effetto vasodilatatorio del NO con l'aumento della perfusione cerebrale che segue all'attivazione della eNOS è neuroprotettivo almeno durante le prime due ore dell'insulto ischemico [101]. Tuttavia, gli effetti globali e definitivi dell'attivazione delle tre forme di NOS in corso di ischemia rimangono deleteri per la cellula [102].

Il danno cellulare

Durante la fase di ipossia-ischemia il deficit di O₂ e di ATP innesca gli eventi metabolici responsabili della produzione di RL che procedono poi autonomamente mediante reazioni di amplificazione. Nella fase di riperfusione l'endotelio danneggiato non garantisce l'autoregolazione del flusso e i sistemi enzimatici cellulari non riescono a produrre energia perché ulteriormente compromessi dalla massiccia produzione

di RL amplificata dalla maggiore disponibilità di O₂. Nelle ore che seguono all'evento ipossico-ischemico l'attivazione dei programmi di apoptosi cellulare può comportare la perdita degli elementi cellulari apparentemente indenni [103].

I fattori che inducono apoptosi o morte cellulare programmata dopo la sequenza ipossia-ischemia-riperfusion sono noti solo in parte. Un ruolo di primo piano è svolto dalle caspasi [104]. Membri di una famiglia di cisteina-proteasi, le caspasi sono sintetizzate e secrete come precursori inattivi [105]. L'evento ipossico-ischemico e il conseguente danno mitocondriale comportano la loro attivazione mediante una sequenza di eventi a cascata [106]. E' possibile classificare le caspasi in tre gruppi funzionali principali: caspasi di regolazione (caspasi 2-8-9), caspasi effettrici (caspasi 3-6-7) caspasi pro-infiammatorie (caspasi -1 o *interleukin-1 β -converting enzyme*).

Le caspasi 3 e 9 sono direttamente coinvolte nei meccanismi di apoptosi. L'aumento della permeabilità delle membrane mitocondriali che consegue al danno ossidativo favorisce l'inibizione del sistema antiapoptotico Bcl-2 (proteina associata alla membrana esterna) e la traslocazione citosolica di alcuni sistemi proteici normalmente segregati nell'ambiente mitocondriale: la proteina Bax, il citocromo c, il fattore Apaf-1 e l'*apoptosis inducing factor* (AIF) [86, 103, 107]. Nel citoplasma la formazione del complesso trimolecolare citocromo c-Apaf-1-caspasi 9 è l'elemento critico per la conversione della caspasi 3 in forma attiva. Quest'ultima riconosce almeno tre substrati intracellulari: la ADP-ribosio-polimerasi (PARP), l'*inhibitor of caspase-activated Dnase* (ICAD/DFP) e la fodrina [108-111]. Il ruolo della PARP nel processo di apoptosi è controverso [112, 113]. L'enzima è deputato alla riparazione del DNA danneggiato, ma la reazione avviene a spese delle già scarse riserve di NAD⁺ e di ATP in corso di ischemia [97]. La PARP è attivata dall'interazione dei RL con i gruppi elettrofili della catena del DNA. La caspasi ne determina il clivaggio e l'inattivazione. L'ICAD è un enzima responsabile dei fenomeni di frammentazione del DNA nucleosomale e di condensazione della cromatina caratteristici del processo di apoptosi [110].

La fodrina è un componente chiave del citoscheletro, ovvero una proteina spectrina-simile non eritrocitaria che lega l'actina cellulare [111]. Il processo di apoptosi ha la caratteristica di essere energeticamente dispendioso perché richiede una vivace neosintesi proteica e la caspasi 3 è un sistema prezioso per portare a termine l'intero processo. Essa infatti proteolizza i propri substrati determinando il blocco della PARP al fine di preservare le molecole di ATP richieste dal processo di apoptosi, il danneggiamento del citoscheletro tramite la degradazione della fodrina e la frammentazione del DNA che andrà irrimediabilmente perduto.

Conclusioni

Le relazioni che intercorrono tra produzione di FR e danno cerebrale nel periodo perinatale sono molto complesse. L'origine dei FR è varia e sembra dipendere sia da alterazioni del metabolismo purinico, fosfolipidico, mitocondriale, sia dalla reazione di Fenton e dall'attivazione fagocitaria in corso di ipossia e/o di ischemia-riperfusion. Altre vie importanti che possono condizionare il rilascio di FR comprendono la degradazione di alcuni enzimi proteici o l'attivazione di altri quali la xantina ossidasi, la nitrossido sintetasi e le prostaciclina-sintetasi. Ciascuna delle molecole reattive prodotte da questi differenti meccanismi contribuisce in modo peculiare alla patogenesi del danno cerebrale perinatale, ma ciascun meccanismo è solo uno dei fattori coinvolti. La molteplicità dei processi implicati nella cascata ossidativa suggerisce che solo terapie combinate che agiscano in sinergia contro bersagli multipli possono costituire nuove strategie per la prevenzione del danno cerebrale nel neonato clinicamente compromesso.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

1. Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ (Ed.). *Neonatal-perinatal medicine IV*. Philadelphia: Mosby-Yearbook, Inc. 1997. p. 877-91.
2. Mulligan JC, Painter MJ, O'Donoghue PA, MacDonald HM, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 1980;96:903-7.
3. World Health Organization. *Child health and development: health of the newborn*. Geneva: World Health Organization; 1991.
4. Levene ML, Kornberg J, Williams THC. The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Hum Dev* 1985;11:21-6.
5. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant. Neuropathology, clinical aspects, pathogenesis and prevention. *Clin Perinatol* 1997;24:567-87.
6. Halliwell B: Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(suppl 3C):14-22.
7. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
8. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
9. Del Maestro R. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1992;492:153-68.
10. Mark JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1987;235:529-31.
11. Warner BB, Wispe JR. Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Semin Perinatol* 1992;16(1):47-57.

12. Saugstad OD. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: Implications for neonatal disease. *Acta Paediatr* 1996;85:1-4.
13. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:881-92.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
15. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318:231-40.
16. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res* 1995; 15:755-66.
17. Frank L, Sosenko IRS. Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr* 1987;110:9-14.
18. Torbati D, Wafapoor H, Peyman GA. Hyperbaric oxygen tolerance in newborn mammals-hypothesis on mechanism and outcome. *Free Radic Biol Med* 1993;14:695-703.
19. Ozawa H, Nishida A, Mito T, Takashima S. Development of ferritin-positive cells in cerebrum of human brain. *Pediatr Neurol* 1994;10:44-8.
20. Mishra OP, Delivoria Papadopoulos M. NMDA receptor modification in the fetal guinea pig brain during hypoxia. *Neurochem Res* 1992;17:1211-6.
21. Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:3-16.
22. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-4.
23. Bejar R, Wozniak P, Allard M, Benirschke K, Vaucher Y, Coen R *et al*. Antenatal origin of neurologic damage in newborn infant I. Preterm infant. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:357-63.
24. Grant A, O'Brien N, Joy M, Hennessy E, Macdonald D. Cerebral palsy among children born during the Dublin randomised trial of intrapartum monitoring. *Lancet* 1989;2:1233-6.
25. Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R *et al*. The nucleated red blood cell count at birth as index of perinatal brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1500-5.
26. Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinat* 1995; 22:481-517.
27. Buonocore G, Zani S, Perrone S, Caciotti B, Bracci B. Intraerythrocyte nonprotein-bound iron and plasma malondialdehyde in the hypoxic newborn. *Free Rad Biol Med* 1998;25:766-70.
28. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res* 2000;47:221-4.
29. Maulik D, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Direct detection of oxygen free radical generation during in utero hypoxia in the fetal guinea pig brain. *Brain Res* 1998;798:166-72.
30. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 1987;49:227-31.
31. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
32. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Dev Brain Res* 1989;45:129-35.
33. Buonocore G, Perrone S. Free radicals and brain damage. *Biol Neonate* 2001;79:180-6.
34. Wolfe LS. Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acid. *J Neurochem* 1982;38:1-14.
35. Huang H-M, Gibson GE. Phosphatidylinositol metabolism during *in vitro* hypoxia. *J Neurochem* 1989;52:830-5.
36. De Courten-Myers GM, Folgeson HM, Kleinholz M, Myers RE. Hypoxic brain and heart injury thresholds in piglets. *Biomed Biochem* 1989;48:S143-8.
37. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989;29:365-402.
38. Radzan B, Marro PJ, Tammela O, Goel R, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Selective sensitivity of synaptosomal membrane function to cerebral cortical hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 1994;600:308-14.
39. Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB *et al*. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996;132:1-8.
40. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 1995;154:2291-302.
41. Toti P, De Felice C. Chorioamnionitis and fetal/neonatal brain injury. *Biol Neonate* 2001;79:180-6.
42. Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST *et al*. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177: 797-802.
43. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system. II. Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 1995; 18:130-6.
44. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC *et al*. High expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177: 406-11.
45. Baud O, Ville Y, Zupan V, Boithias C, Lacaze-Masmonteil T, Gabilan JC *et al*. Are neonatal brain lesions due to intrauterine infarction related to mode of delivery? *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:121-4.
46. Crichton RR, Ward RJ. Iron species in iron homeostasis and toxicity. *Analyst* 1995;120:693-7.

47. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35:35-54.
48. Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1991;31:34-40.
49. Touati D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2000;1:1-6.
50. Felt BT, Lozoff B. Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *J Nutr* 1996;126:693-701.
51. Rao R, de Ungria M, Sullivan D, Wu P, Wobken JD, Nelson CA *et al*. Perinatal brain iron deficiency increases the vulnerability of rat hippocampus to hypoxic ischemic insult *J Nutr* 1999;129:199-200.
52. Gutteridge JMC, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993;1156:144-50.
53. Crichton RR, Ward RJ. Iron metabolism-new perspectives in view. *Biochemistry* 1992;31:11255-64.
54. Berger HM, Mumby S, Gutteridge JMC. Ferrous ions detected in iron-overloaded cord blood plasma from preterm and term babies: implications for oxidative stress. *Free Radical Res* 1995;22:555-9.
55. O'Connell M, Halliwell B, Moorhouse CP, Aruoma OI, Baum H, Peters TJ. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. Is haemosiderin formation a biological protective mechanism? *Biochem J* 1986;234:727-31.
56. Gutteridge JMC. Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact* 1985;56:113-20.
57. Halliwell B. Iron and damage to biomolecules. In: Lauffer RB (Ed.). *Iron and human disease*. Boca Raton: CRC Press;1992. p. 210.
58. Lefnesky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:129-46.
59. Ying W, Han S-K, Miller JW, Swanson RA. Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J Neurochem* 1999;73:1549-56.
60. Grootveld M, Bell JD, Halliwell B, Aruoma OI, Bomford A, Sadler PJ. Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1989;264:4417-22.
61. Weinberg ED. The iron-with-holding defense system. *Am Soc Microbiol News* 1993;59:559-62.
62. Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L, Comporti M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J* 1992;285:295-301.
63. Buonocore G, Zani S, Sargentini I, Gioia D, Signorini C, Bracci R. Hypoxia-induced free iron released in the red cells of newborn infants. *Acta Paediatr* 1998;87:77-81.
64. Bracci R, Benedetti PA, Ciambellotti V. Hydrogen peroxide generation in the erythrocytes of newborn infants. *Biol Neonate* 1970;15:135-41.
65. Bracci R, Buonocore G, Talluri B, Berni S. Neonatal hyperbilirubinemia. Evidence for a role of the erythrocyte enzyme activities involved in the detoxification of oxygen radicals. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:349-56.
66. Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett* 1995;362:165-70.
67. Vives Corrons JL, Puyades MA, Colomer D. Increase of enzyme activities following the *in vitro* peroxidation of normal human red blood cells. *Enzyme* 1998;39:1-7.
68. Buonocore G, Berni S, Gioia D, Bracci R. Characteristics and functional properties of red cells during the first days of life. *Biol Neonate* 1991;60:137-43.
69. Reuter A, Klinger W. The influence of systemic hypoxia and reoxygenation of the glutathione redox system of brain, liver, lung and plasma in newborn rats. *Exp Toxicol Pathol* 1992;44:339-43.
70. Ciccoli L, Signorini C, Alessandrini C, Ferrali M, Comporti M. Iron release, lipid peroxidation and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. *Exp Mol Pat* 1994;60:108-18.
71. Hwang J, Krebs C, Huynh BH, Edmondson DE, Theil EC, Penner-Hahn JE. A short Fe-Fe distance in peroxodiferric ferritin: control of Fe substrate versus cofactor decay? *Science* 2000;287:122-5.
72. Gutteridge JMC. Ferrous ions detected in cerebrospinal fluid by using bleomycin and DNA damage. *Clin Sci* 1992;82:315-20.
73. Bracci R, Buonocore G. The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants. *Semin Neonatol* 1998;3:191-7.
74. Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats. *Pediatr Res* 1996;39:39-47.
75. Dietrich RB, Bradley WG. Iron accumulation in the basal ganglia following severe ischemic-anoxic insults in children. *Radiology* 1998;68:203-6.
76. Kaur C, Ling EA. Increased expression of transferrin receptors and iron in amoeboid microglial cells in postnatal rats following an exposure to hypoxia. *Neurosci Lett* 1999;262:183-6.
77. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosc Rep* 1997;17:3-8.
78. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999;26:463-71.
79. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA. Mechanisms of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* 1999;38:15807-26.
80. Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂⁻ generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem* 1998;184:21-33.

81. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:22028-34.
82. Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelsol SK, Wright RM *et al*. Mitochondrial respiratory scavengers extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *J Clin Invest* 1995;96:1131-6.
83. Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N *et al*. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* 1997;249:52-60.
84. Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 1997;272:18515-7.
85. Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidative states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:53-60.
86. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett* 1996;378:150-2.
87. Taylor DL, Edwards AD, Mehemet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Patol* 1999;9:93-117.
88. Turrens JG, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985;237:408-14.
89. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-42.
90. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-7.
91. East SJ, Garthwaite J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cGMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 1991;123:17-9.
92. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-37.
93. Doyle CA, Slater P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience* 1997;76:387-95.
94. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp JC, Ding M *et al*. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997;48:372-84.
95. Dalkara T, Moskowitz MA. Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischemia. *Int Rev Neurobiol* 1997; 40:319-36.
96. Crow JP, Beckman JS. The importance of superoxide in nitric-oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv Exp Med Biol* 1996;387:147-61.
97. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997;1:373-85.
98. Ullrich V, Bachschmid M. Superoxide as a messenger of endothelial function. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;278:1-8.
99. Brune B, Dimmeler S, Molina Y, Vedia L, Lapetina EG. Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* 1994; 54:61-70.
100. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 91:393-7.
101. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9.
102. Dalkara T, Moskowitz MA. The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 1994;4:49-57.
103. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM *et al*. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998;17:3341-9.
104. Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate* 2001;79:172-9.
105. Stennicke HR, Slavesen GS. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochem Biophys Acta* 2000;1477:299-306.
106. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
107. Sastre J, Pallardo F, Asuncion JG, Vina J. Mitochondrial oxidative stress and aging. *Free Radicals Res* 2000;32:189-98.
108. Liu X, Zou H, Wang W. DFF a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-84.
109. Lazebnik YA, Kauffman SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994;371:346-7.
110. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
111. Blomgren K, Kawashima S, Saido T, Karlsson J, Elmered A, Hagberg H. Fodrin degradation and subcellular distribution of colpains after neonatal rat cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res* 1995;684:143-9.
112. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999; 9:119-31.
113. Leist M, Single B, Kunstle G, Volbracht C, Hentze H, Nicotera P. Apoptosis in the absence of poly-(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;233:518-22.