

Isoprostani e stress ossidativo nel danno cerebrale del neonato

Luisa MINGHETTI, Antonietta BERNARDO e Anita GRECO

*Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Riassunto. - Gli isoprostani sono una famiglia di lipidi biologicamente attivi recentemente identificata come una nuova classe di indici specifici e affidabili di perossidazione lipidica e di danno ossidativo *in vivo* e *ex vivo*. Queste molecole sono stabili, relativamente abbondanti e misurabili mediante tecniche analitiche sensibili e di facile impiego. In questi ultimi anni la determinazione dei livelli di isoprostani nei tessuti e nei liquidi biologici ha significativamente migliorato la nostra conoscenza sul ruolo svolto dallo stress ossidativo in molte patologie neurologiche. Sebbene l'utilizzo di queste molecole nell'ambito delle patologie neonatali sia ancora limitato, l'analisi dei loro livelli e delle loro funzioni può rappresentare un valido strumento per migliorare la comprensione dei meccanismi coinvolti nel danno cerebrale in seguito a eventi ipossico-ischemici o infiammatori durante il periodo fetale e perinatale.

Parole chiave: isoprostani, danno cerebrale, radicali liberi, oligodendrociti.

Summary (*Isoprostanes and oxidative stress in brain damage of the newborn*). - Isoprostanes are a family of biologically active molecules recently characterized, which is emerging as a new class of specific and reliable markers of *in vivo* and *ex vivo* lipid peroxidation and oxidative damage. These molecules are stable, relatively abundant and easily detectable by sensitive and specific analytical methods. In the last years, the measurement of their levels in tissue homogenates or biological fluids has significantly improved our knowledge on the involvement of oxidative stress in several neurological diseases. Here we present evidence indicating that isoprostanes can be successfully used also to study the mechanisms involved in free radical brain damage following hypoxic-ischaemic or inflammatory conditions in newborns and preterm infants.

Key words: isoprostanes, brain damage, free radicals, oligodendrocytes.

Introduzione

Durante lo sviluppo fetale molti fattori esterni possono indurre stati di ipossia o di infiammazione e mettere a rischio l'integrità funzionale del sistema nervoso centrale (SNC). Indipendentemente dal tipo di evento patologico specifico (infezioni uterine, diminuito scambio materno-fetale, ipossia perinatale), l'eccessiva formazione di radicali liberi da parte di cellule che risiedono nel SNC (neuroni, cellule gliali attivate, cellule endoteliali), o da parte di cellule infiammatorie ematiche (granulociti e monociti/macrofagi) infiltrate nel tessuto cerebrale danneggiato, costituisce uno dei principali meccanismi di danno cerebrale fetale e perinatale [1, 2].

I radicali liberi sono molecole altamente reattive e instabili, a causa della presenza di un elettrone spaiato sull'orbitale esterno. La loro tossicità è dovuta alla capacità di cedere (radicali riducenti) o di catturare (radicali ossidanti) elettroni da altre molecole, come lipidi, proteine e acidi nucleici, modificandone struttura e funzioni. La formazione di radicali liberi è un evento fisiologico - essendo parte di tutte le reazioni di ossidoriduzione del metabolismo cellulare - e la cellula è in grado di difendersi dall'azione di queste molecole

attraverso una batteria di sistemi anti-ossidanti enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi) e chimici (glutazione ridotto e vitamine antiossidanti quali C, E, retinolo). Nel corso di eventi patologici, quali ad esempio eventi ipossico-ischemici o infiammatori, i sistemi di produzione di radicali liberi ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^-$) possono superare i sistemi di neutralizzazione di tali radicali, instaurando una condizione di stress ossidativo (si veda per maggior dettaglio Buonocore *et al.*, in questo stesso fascicolo).

Radicali liberi, perossidazione lipidica e danno cerebrale

Il cervello è un organo particolarmente suscettibile al danno ossidativo a causa dell'elevato consumo di ossigeno, dell'alto contenuto di ferro (un potente catalizzatore delle reazioni che portano alla formazione di radicali) e di lipidi poli-insaturi (substrati facilmente ossidabili) e dei limitati sistemi endogeni anti-ossidanti. Numerosi studi clinici e sperimentali hanno dimostrato il ruolo dello stress ossidativo nelle patologie neurologiche. Tuttavia questi studi sono stati in parte osta-

colati da una serie di difficoltà tecniche dovute all'elevata reattività ed instabilità delle specie radicaliche. La risonanza elettronica paramagnetica (EPR) è attualmente l'unica tecnica in grado di misurare in modo diretto i radicali liberi, ma purtroppo le concentrazioni di queste specie *in vivo* non sono sufficienti per ottenere un segnale efficacemente rilevabile. Per ovviare a questo problema vengono generalmente utilizzate come indicatori di avvenuto stress ossidativo alcune molecole che derivano dalla reazione dei radicali con molecole bersaglio quali DNA, proteine e lipidi poli-insaturi [3]. L'abbondante presenza di acidi grassi poli-insaturi esterificati nei fosfolipidi di membrana (tra i quali l'acido arachidonico, precursore di mediatori lipidici quali prostaglandine, trombossano e leucotrieni) fa sì che la perossidazione lipidica sia l'evento di maggiore entità nel danno ossidativo cerebrale. Da queste reazioni originano una serie di derivati, tra cui malondialdeide e dieni coniugati ampiamente utilizzati come indicatori di stress ossidativo. La loro determinazione presenta però delle limitazioni che devono essere tenute in considerazione per una corretta valutazione dell'entità del danno ossidativo. Ad esempio, la malondialdeide è soggetta a metabolismo *in vivo* e sintesi *ex vivo* e il metodo impiegato per il suo dosaggio non è specifico, in quanto il reagente su cui si basa (l'acido tiobarbiturico) può reagire con altre sostanze e dare falsi positivi. Anche la determinazione dei dieni coniugati presenta problemi di specificità a causa di possibili interferenze di composti che non derivano da perossidazione lipidica [4, 5].

Recentemente è stata caratterizzata un'altra classe di prodotti derivati dalla perossidazione lipidica, gli isoprostani, che presentano alcuni importanti vantaggi rispetto agli indicatori di stress ossidativo classicamente utilizzati. Tali vantaggi sono prevalentemente associati alla loro stabilità, relativa abbondanza e disponibilità di metodi analitici specifici e sensibili per la loro misurazione in tessuti e liquidi biologici [6].

Isoprostani

Gli isoprostani sono composti strutturalmente simili alle prostaglandine, sintetizzati *in vivo* in seguito a perossidazione lipidica dell'acido arachidonico da parte di radicali liberi dell'ossigeno [7]. L'azione dei radicali sull'acido arachidonico avviene quando l'acido grasso è esterificato nei fosfolipidi di membrana, dando luogo a fosfolipidi contenenti isoprostani in posizione sn₂. Questi nuovi fosfolipidi, più polari e meno flessibili, possono contribuire a determinare la profonda alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle membrane che consegue al danno ossidativo [8]. I modelli molecolari di fosfolipidi contenenti isoprostani ne mostrano infatti la struttura "distorta" rispetto al fosfolipide nativo (Fig. 1). L'enzima maggiormente coinvolto nella

liberazione dell'acido arachidonico esterificato in posizione sn₂ è la fosfolipasi A₂ di cui sono state identificate numerose isoforme, classificabili sommariamente in due gruppi, citosoliche e secretorie, sulla base della selettività per l'acido grasso esterificato, dipendenza dal Ca²⁺, e sensibilità ad inibitori specifici. Si ritiene che queste stesse fosfolipasi siano coinvolte nel rilascio degli isoprostani dagli "iso-fosfolipidi" di membrana, e che alcune isoforme abbiano una maggiore affinità per questi fosfolipidi modificati. La liberazione degli isoprostani dagli iso-fosfolipidi contribuirebbe al recupero della struttura nativa e spiegherebbe il ruolo protettivo della fosfolipasi A₂ sulle membrane danneggiate dai radicali dell'ossigeno [9].

Una volta liberati dalle membrane gli isoprostani raggiungono diversi liquidi biologici (liquor, plasma), dove persistono grazie alla loro stabilità chimica e all'abbondanza relativa rispetto agli altri prodotti di perossidazione lipidica (oltre 10 volte) [10], e successivamente eliminati nelle urine. In modelli animali di stress ossidativo, gli isoprostani esterificati nei tessuti bersaglio ed i livelli circolanti e urinari di isoprostani liberi risultano notevolmente aumentati, indicando che queste molecole sono indici d'elezione dello stress ossidativo *in vivo* [11].

Per le caratteristiche di stabilità e abbondanza, e grazie alle tecniche analitiche semplici ed affidabili che sono state sviluppate ed affinate nell'ultimo decennio, gli isoprostani sono stati impiegati con successo come indicatori clinici del danno ossidativo associato a varie patologie e per valutare l'efficacia di farmaci antiossidanti [12, 13].

Oltre a rappresentare un importante indice di perossidazione lipidica *in vivo*, gli isoprostani possono anche svolgere un ruolo di mediatori lipidici con specifica attività biologica [14, 15]. Analogamente ai derivati enzimatici dell'acido arachidonico (prostaglandine, trombossano e leucotrieni) che regolano le funzioni cellulari attraverso l'attivazione di recettori di membrana [16], gli isoprostani sono in grado di legare in modo specifico e di saturare alcuni di questi stessi recettori, in particolare il recettore del trombossano A₂ (TXA₂). Al contrario di TXA₂ caratterizzato da un tempo di emivita estremamente breve [17, 18], l'8-epi-PGF_{2α}, uno dei più abbondanti isoprostani sintetizzati *in vivo*, è estremamente stabile e attraverso l'interazione con il recettore del TXA₂ potrebbe esercitare effetti biologici prolungati e potenzialmente patologici. In accordo con questa ipotesi, è stato osservato che l'8-epi-PGF_{2α} modula la funzione piastrinica e l'adesione delle piastrine alle cellule endoteliali [19, 20], è un potente vasocostrittore sia *in vitro* che *in vivo* [21] e che tali funzioni sono mediate dal recettore per il TXA₂ in quanto prevenute da antagonisti specifici per questo recettore.

Alcuni studi suggeriscono inoltre l'esistenza di un recettore specifico per l'8-epi-PGF_{2α} sebbene non siano state ancora fornite evidenze molecolari dell'esistenza di due recettori distinti [22, 23].

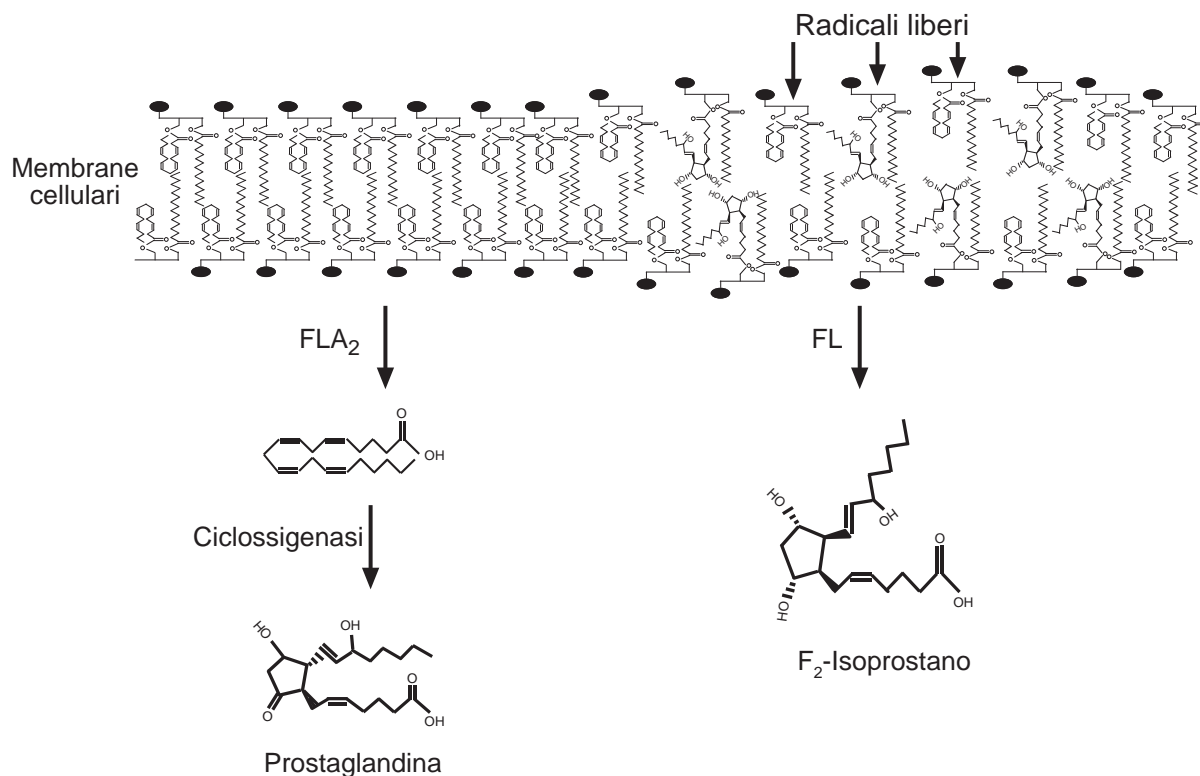


Fig. 1. - Rappresentazione schematica della formazione di isoprostani e per confronto delle prostaglandine. Gli isoprostani (F₂-isoprostani) vengono sintetizzati attraverso l'azione dei radicali liberi sull'acido arachidonico esterificato nei fosfolipidi di membrana. Una volta formati, vengono liberati dall'azione delle fosfolipasi (FL). Al contrario, la sintesi di prostaglandine avviene per opera dell'enzima ciclossigenasi sull'acido arachidonico già in forma libera. La figura mostra inoltre l'analogia strutturale tra isoprostani e prostaglandine dovuta alla presenza di un anello ciclopentanico. Nel caso dell'isoprostano, le due catene laterali sono in posizione *cis* rispetto all'anello, mentre nel caso della prostaglandina sono in forma *trans*. Questa diversità strutturale spiegherebbe il loro differente comportamento biologico.

Isoprostani e patologie neurologiche

La disponibilità di tecniche di misurazione sensibili, specifiche e di facile utilizzo, ha consentito in questi ultimi anni un rapido sviluppo delle conoscenze sugli isoprostani e sul loro impiego come indici della formazione di radicali liberi in molte patologie [3, 12, 24]. La possibilità di misurare questi marcatori della perossidazione lipidica in liquidi biologici, quali ad esempio plasma, urina e saliva, fornisce infatti un metodo affidabile e non invasivo per determinare, *in vivo* o *ex vivo*, l'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo, di seguirne l'evoluzione e di verificare l'efficacia di eventuali interventi farmacologici. La determinazione dei livelli di isoprostano nel liquido cerebrospinale ha fornito una evidenza diretta ed inequivocabile della presenza di un danno ossidativo in diverse patologie neurologiche dell'adulto (recentemente passate in rassegna da Greco *et al.* [25]). Ad esempio, ricerche condotte dal nostro gruppo hanno dimostrato la presenza di livelli aumentati di isoprostano in una malattia

neurodegenerativa quale la malattia di Creutzfeldt-Jakob [26] ed in una malattia su base autoimmune, quale la sclerosi multipla [27]. Nell'ambito delle patologie materno-fetali e neonatali, sono stati condotti, ad oggi, alcuni interessanti studi che riportano la presenza di livelli alterati di isoprostano in patologie della gravidanza caratterizzate da grave sofferenza fetale, quali la pre-eclampsia e il diabete.

La pre-eclampsia è una delle principali cause di ritardo della crescita del feto, di nascita prematura e di basso peso alla nascita. Questa patologia della gravidanza è caratterizzata da una aumentata vasocostrizione che genera ipertensione nella madre e un diminuito apporto di sangue e ossigeno a vari organi e tessuti, inclusi reni, utero e placenta. Altre anomalie associate alla pre-eclampsia sono l'aumentata aggregazione piastrinica con coagulazione intravasale disseminata, disfunzioni dell'endotelio, proteinuria ed edema. Nonostante gli intensi studi, la causa della patologia è ancora sconosciuta e l'unica strategia di intervento al momento disponibile è la rimozione del feto e della placenta. La presenza nel

plasma di donne affette da pre-eclampsia di lipidi perossidi e di anticorpi contro forme ossidate di lipoproteine a bassa densità [28, 29], suggerisce che anche in questa patologia si verifichi una condizione di stress ossidativo. Recentemente questa ipotesi è stata confermata da uno studio clinico in cui sono stati misurati i livelli plasmatici, urinari e salivari di 8-epi-PGF_{2α}. In questo studio [30] è stato dimostrato che i livelli plasmatici di 8-epi-PGF_{2α} sono significativamente aumentati in gravi forme di pre-eclampsia o di eclampsia. Al contrario, i livelli urinari risultano diminuiti rispetto a quelli di donne con forme meno gravi di pre-eclampsia o con gravidanze normotensive, probabilmente a causa della ridotta funzionalità renale delle pazienti affette da pre-eclampsia in forma grave. È stato inoltre dimostrato che la concentrazione tissutale e la capacità di sintesi di 8-epi-PGF_{2α} della placenta sono fortemente aumentate nel caso di pre-eclampsia rispetto a gravidanze normali [31]. Gli autori suggeriscono inoltre che l'aumentata produzione di 8-epi-PGF_{2α} nei tessuti ottenuti da placente di pazienti affette da pre-eclampsia e eclampsia rappresenti non solo un indice diretto del danno ossidativo che si verifica in questa condizione, ma anche un possibile meccanismo patogenetico mediante l'azione che 8-epi-PGF_{2α} può esercitare sui recettori per il TXA₂ presenti a livello delle cellule endoteliali materne e fetali, provocando o amplificando la vasocostrizione, il danno endoteliale e la sofferenza materno-fetale.

La presenza di diabete in corso di gravidanza è un'altra condizione patologica che può risultare in importanti malformazioni fetali. Circa il 25% delle gravidanze in presenza di diabete evolvono in pre-eclampsia. Nonostante il ruolo dello stress ossidativo nelle complicanze da diabete e nella pre-eclampsia siano note, non sono ad oggi disponibili studi clinici che confermino un ruolo dei danni da radicali nel corso di gravidanze diabetiche. In uno studio recente su un modello di diabete sperimentale murino sono stati riportati livelli plasmatici di 8-epi-PGF_{2α} più elevati nelle femmine affette di diabete rispetto al gruppo di controllo. I livelli di 8-epi-PGF_{2α} non erano ulteriormente alterati nel corso della gravidanza. Allo stesso tempo, i livelli plasmatici fetali di 8-epi-PGF_{2α} erano notevolmente più alti nei feti nati da madri diabetiche rispetto a quelli nati da madri non diabetiche [32]. In un altro studio, l'aumento dei livelli fetali di 8-epi-PGF_{2α} e le evidenti anomalie morfologiche fetale venivano ridotti dalla somministrazione *in vivo* ed *in vitro* di un anti-ossidante quale la N-acetil-cisteina [33]. Questi studi indicano che l'induzione di diabete sperimentale genera stress ossidativo sia nelle madri che nel feto e suggeriscono che il danno ossidativo o gli stessi isoprostani possano essere implicati nelle malformazioni embrionali associate al diabete [34, 35].

Oligodendrociti e leucomalacia periventricolare

La leucomalacia periventricolare (LPV) è una patologia caratterizzata da gliosi e necrosi focale della sostanza bianca cerebrale adiacente agli angoli esterni dei ventricoli, che colpisce prevalentemente bambini prematuri con peso alla nascita molto basso (< 1500 g) ed è una delle più comuni cause di paresi cerebrali, danni cognitivi e motori nei bambini che sopravvivono. Il rischio di LPV è particolarmente elevato in un determinato periodo dello sviluppo del cervello umano, compreso tra la 23 e 32 settimana di gestazione. Questa finestra di elevata suscettibilità è probabilmente dovuta alla immaturità cerebro-vascolare che rende la sostanza bianca cerebrale particolarmente sensibile al danno ipossico ischemico [36]. Le evidenti anomalie dei processi di mielinizzazione, caratteristiche della LPV suggeriscono che il principale bersaglio cellulare in questa patologia siano gli oligodendrociti, le cellule responsabili della formazione di mielina nel SNC [37, 38]. Durante lo sviluppo ed i processi riparativi, gli oligodendrociti estendono i loro processi formando guaine multilamellari che circondano l'assone neuronale, aumentando la velocità di conduzione nervosa. La formazione, la crescita e il mantenimento della guaina mielinica sono fondamentali per lo sviluppo e l'integrità funzionale del SNC. Tra le cellule del cervello, gli oligodendrociti hanno l'attività metabolica ossidativa più elevata [39] e segnali ambientali avversi o situazioni di stress che riducano tale metabolismo possono ritardare o inibire la corretta formazione della guaina mielinica.

Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che gli oligodendrociti maturi derivano da cellule progenitrici attraverso un numero di stadi distinti (pre-oligodendrociti, oligodendrociti immaturi, e oligodendrociti maturi) definiti dall'espressione di molecole di superficie e rispondenti a specifici fattori di crescita [40]. La mancanza di modelli sperimentali che riproducano nella loro interezza i processi di demielinizzazione osservabili nella LPV ha reso difficile lo studio *in vivo* dei meccanismi alla base dei disturbi al processo di differenziamento della linea oligodendrocitaria e di formazione di mielina. Recentemente, uno studio autoptico [41], eseguito su 26 cervelli umani di età compresa tra 18 e 41 settimane di gestazione con cause di decesso non imputabili a LPV, ha dimostrato che durante il periodo di maggiore vulnerabilità, i pre-oligodendrociti (caratterizzati dalla positività per gli anticorpi NG2 e O4, specifici rispettivamente per un proteoglicano e un sulfatide di membrana [42], ma negativi all'anticorpo O1 che riconosce un ganglioside di membrana espresso in tempi successivi del differenziamento) sono gli elementi predominanti, corrispondendo a circa il 90% delle cellule totali derivate dalla linea oligodendrocitaria. Gli oligodendrociti immaturi (identificati dalla marcatura per anticorpo O4 e O1) rappre-

sentano una esigua popolazione tra la 18^a e 27^a settimana, per aumentare significativamente di numero a partire dalla 30^a settimana in coincidenza con una ristretta localizzazione nella materia bianca periventricolare di guaine mieliniche positive per la proteina basica della mielina, caratteristica degli oligodendrociti maturi.

La maggior vulnerabilità delle forme immature al danno ipossico-ischemico è suggerita anche da studi *in vitro* che utilizzano colture altamente purificate di precursori di oligodendrociti di ratto in grado di differenziarsi *in vitro* in presenza di fattori di crescita specifici [38, 43-46]. In particolare, studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato che i precursori degli oligodendrociti sono i più vulnerabili a qualsiasi tipo di insulto da radicali liberi, mentre popolazioni più differenziate (oligodendrociti immaturi) presentano una maggiore resistenza. Popolazioni di oligodendrociti maturi (con > 95% di cellule positive per la proteina basica della mielina), mostrano invece una resistenza intermedia rispetto agli altri stadi meno differenziati (perioligodendrociti e oligodendrociti maturi). In accordo con questi risultati, abbiamo osservato una maggiore produzione di 8-epi-PGF_{2α} in seguito ad esposizione a donatori di O₂[•], NO[•], ONOO⁻ in colture immature o più differenziate rispetto alle forme maturative intermedie. Alla base della diversa vulnerabilità al danno ossidativo dei vari stadi di maturazione oligodendrocitaria potrebbero essere sia la composizione lipidica della membrana, che viene modificata nel corso del differenziamento, sia il differente corredo di enzimi capaci di eliminare o ridurre l'accumulo dei radicali liberi (catalasi, superossido dismutasi Cu/Zn, superossido dismutasi Mn, glutazione perossidasi) [47].

Infine, è interessante ricordare il potenziale ruolo gli isoprostani nei meccanismi di danno oligodendrocitario da stress ossidativo. Come accennato precedentemente, gli isoprostani possono svolgere una azione biologica attraverso il riconoscimento del recettore per il TXA₂, recentemente identificato e caratterizzato in colture miste di oligodendrociti immaturi [48]. Altri autori [49] hanno dimostrato che gli oligodendrociti sono più sensibili agli effetti di un aumento di calcio intracellulare rispetto ad altre cellule gliali, ad esempio gli astrociti. L'attivazione del recettore TP da parte di 8-epi-PGF_{2α} potrebbe contribuire attraverso questa via al danno a carico degli oligodendrociti. Sarà quindi importante in futuro stabilire se il recettore per TXA₂ o il recettore specifico per 8-epi-PGF_{2α} siano espressi dagli oligodendrociti anche *in vivo* ed in maniera dipendente dal loro stadio maturativo.

Conclusioni

Le conoscenze sugli isoprostani come indici affidabili di perossidazione lipidica endogena sono di recente acquisizione [7], tuttavia gli studi di questi ultimi anni

forniscono prove convincenti sull'utilità di queste molecole nello studio dello stress ossidativo in molte importanti patologie umane. La misurazione dei livelli di isoprostani in liquidi biologici, come plasma urina e liquido cerebrospinale fornisce infatti un valido strumento per valutare la presenza di una condizione di stress ossidativo *in vivo* o *ex vivo* e soprattutto per seguire con metodi non invasivi la progressione dei fenomeni di danno ossidativo. Sebbene utilizzo di questi marcatori si sia rapidamente diffuso nell'ambito delle neuropatologie dell'adulto [25], il loro impiego nelle patologie fetali e neonatali è ancora limitato. Gli esempi riassunti in questo articolo indicano che lo studio di queste molecole può essere di grande aiuto anche in questo tipo di patologie. L'interesse per questa classe di lipidi è inoltre rafforzato dall'azione biologica che gli isoprostani possono svolgere in molte condizioni patologiche. Una migliore conoscenza delle loro funzioni e la caratterizzazione del loro recettore potrà contribuire alla definizione di nuovi potenziali meccanismi patogenetici del danno da radicali.

Ringraziamenti

Questo contributo è stato realizzato nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata dell'Istituto Superiore di Sanità "Danno cerebrale ipossico/ischemico nel neonato: studi epidemiologici e sperimentali su diagnosi, terapie e recupero".

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 19 luglio 2001.

BIBLIOGRAFIA

- Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* 1999;30:107-34.
- Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999;9:93-117.
- Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J *et al.* Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 1999;52:203-22.
- Halliwell B, Gutteridge MC. The measurement of free radical reactions in human. *FEBS Lett* 1987;213:9-14.
- Halliwell B, Gutteridge MC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human diseases: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-618.
- Sodergren E, Vessby B, Basu S. Radioimmunological measurement of F₂-isoprostanines after hydrolysis of lipids in tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63(3):149-52.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383-7.
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanines) are formed *in situ* on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10721-5.

9. Sevanian A, Kim E. Phospholipase A₂ dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1:263-71.
10. Longmire AW, Swift LL, Roberts LJ 2nd, Awad JA, Burk RF, Morrow JD. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994;47(7):1173-7.
11. Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci* 1999;6:226-35.
12. Awad JA, Roberts II LJ, Burk RF, Morrow JD. Isoprostanes: prostaglandin-like compounds formed *in vivo* independently of cyclooxygenase: use as clinical indicators of oxidant damage. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:409-17.
13. Souvignet C, Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Bessard G. Are isoprostanes a clinical marker for antioxidant drug investigation? *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:1-10.
14. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
15. Roberts II LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochem Biophys Acta* 1997;1345:121-35.
16. Narumiya S. Prostanoid receptors and signal transduction. *Prog Brain Res* 1996;113:231-41.
17. Takabashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ *et al*. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂α in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest* 1992; 90(1):136-41.
18. Kinsella BT, O'Mahony DJ, FitzGerald GA. The human thromboxane A₂ receptor a isoform (TPa) functionally couples to the G-proteins Gq and G11 *in vivo* and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F₂α. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:957-64.
19. Yin K, Halushka PV, Yan YT, Wong PY. Antiaggregatory activity of 8-epi-prostaglandin F₂α and other F-series prostanoids and their binding to thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1192-6.
20. Leitinger N, Blazek I, Sinzinger H. The influence of isoprostanes on ADP-induced platelet aggregation and cyclic AMP-generation in human platelets. *Thromb Res* 1997;86:337-42.
21. Hill AA, Coleman RA, Taylor GW, Moore KP, Taylor IK. Effect of the isoprostanes, 8-iso prostaglandin E₂ and 8-iso prostaglandin F₂α, on the rabbit lung *in vivo*. *Prostaglandins* 1997;53:69-82.
22. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 1):C16,19-24.
23. Praticò D, Smyth E, Violi F, FitzGerald G A. Local amplification of platelet function by 8-epi-prostaglandin F₂α is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271:14916-24.
24. Patrono C, Fitzgerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2309-15.
25. Greco A, Minghetti L, Levi G. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Neurochem Res* 2000;25 (9/10):1357-64.
26. Minghetti L, Greco A, Cardone F, Puopolo M, Ladogana A, Almonti S *et al*. Increased brain synthesis of prostaglandin E₂ and F₂-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(10):866-71.
27. Greco A, Minghetti L, Sette G, Fieschi C, Levi G. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53(8):1876-9.
28. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1981;18(Pt 3):158-62.
29. Wang Y, Walsh SW, Guo J, Zhang J. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with and imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1695-700.
30. McKinney ET, Shouri R, Hunt RS, Ahokas RA, Sibai BM. Plasma, urinary and salivary 8-epi-prostaglandin F₂α levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(4):874-7.
31. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts II KJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *Faseb J* 2000;14:1289-96.
32. Gerber RT, Holemans K, O'Brien-Coker I, Mallet AI, Van Bree R, Van Assche A *et al*. Increase of isoprostane 8-isoprostaglandin F₂α in maternal and fetal blood of rats with streptozotocin-induced diabetes: evidence of lipid peroxidation. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1035-40.
33. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E₂ levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes* 1999;48(4):813-20.
34. Eriksson UJ. Oxidative DNA damage and embryo development. *Nat Med* 1999;5(7):715.
35. Eriksson UJ, Borg LA, Cederberg J, Nordstrand H, Siman CM, Wentzel C *et al*. Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Ups J Med Sci* 2000;105(2):53-84.
36. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol* 1998;5:135-51.
37. Back SA, Volpe JJ. Cellular and molecular pathogenesis of periventricular white matter injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1997;3:96-107.
38. Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci* 2000;20:34-42.
39. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansa RB. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 1993;3:191-7.
40. Miller RH. Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* 1996;19: 92-6.

41. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001;21:1302-12.
42. Gard AL, Williams WC, Burrell MR. Oligodendroblasts distinguished from O-2A glial progenitors by surface phenotype (O4(+)/GalC(-)) and response to cytokines using signal transducer LIFR beta. *Dev Biol* 1995;167:596-608.
43. Juurlink BHJ, Thorburne SK, Hertz L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* 1998;22:371-8.
44. Back SA, Gan X-D, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation - dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998; 18:6241-53.
45. Jelinski SE, Yager JY, Juurlink BHJ. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res* 1999;815:150-3.
46. Skoff RP, Bessert DA, Barks JDE, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Devl Neurosci* 2001;19:197-208.
47. Bernardo A, Greco A, Ajmone-Cat MA, Levi G, Minghetti L. *In vitro* studies on oligodendrocyte vulnerability to oxidative stress. *J Neurochem* 2001;76 (suppl. 1):36(P04-02).
48. Blackman SC, Dawson G, Antonakis K, Le Breton GC. The identification and characterization of oligodendrocyte thromboxane A₂ receptors. *J Biol Chem* 1998;273:475-83.
49. Smith KJ, Hall SM. Central demyelination induced *in vivo* by the calcium ionophore ionomycin. *Brain* 1994;117:1351-6.