

Matej Panjan¹, Aneta Soltirovska Šalamon²

Nevroprotektivni učinki eritropoetina v neonatologiji

Neuroprotective Effects of Erythropoietin in Neonatology

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: novorojenček, eritropoetin, možganska okvara, nevroprotektivni učinek

Perinatalna možganska okvara je glavni vzrok slabšega nevrološkega razvoja otrok. Eritropoetin (EPO) predstavlja eno od možnih nevroprotektivnih strategij preprečevanja in zdravljenja možganske okvare nedonošenih in donošenih novorojenčkov. Prednosti EPO pred drugimi oblikami nevroprotektivnega zdravljenja sta varnost in vpliv na procese, ki v možganih potekajo še dolgo po poškodbi. EPO vzdržuje naravno obnovo možganov, saj deluje angiogeno, protiepileptično, nevrotrofično in spodbuja nevrogenezo. Vpliva tudi na neposredno zmanjšanje in omejevanje okvare, saj zavira apoptozo, deluje protivnetno in antioksidativno. Kljub obsežnim in obetavnim predkliničnim raziskavam pa uporabnost EPO v klinični praksi še ni povsem dorečena. Dokazali so učinkovitost EPO pri preprečevanju možganske okvare v sklopu hipoksične ishemične encefalopatije, potekajo pa raziskave, ki bodo opredelile vlogo EPO v kombinaciji s terapevtsko hipotermijo. Učinkovitost EPO pri preprečevanju možganske okvare nedonošenčkov ostaja zaradi nasprotujočih si rezultatov raziskav, neenotnih odmerkov in protokolov vnašan za zdaj še nedorečena. Poskusi na živalih kažejo obetavne rezultate tudi pri uporabi EPO po perinatalnem arterijskem ishemičnem infarktu, saj so dokazali, da se je volumen infarkta zmanjšal, izboljšala pa se je motorična in kognitivna funkcija pri tistih živalih, ki so takoj po nastanku infarkta prejemale EPO.

ABSTRACT

KEY WORDS: newborn, erythropoietin, brain injury, neuroprotective effect

Perinatal brain injury is the main cause of poor neurodevelopmental outcomes in children. Erythropoietin (EPO) use is a possible neuroprotective strategy to prevent and treat brain injury in preterm and term newborns. EPO is distinguished by its safety and ability to influence long term processes that develop after brain injury. With its angiogenic, antiepileptic, neurotrophic and neurogenetic properties, EPO helps maintain brain regeneration. It inhibits apoptosis, inflammation and oxidative damage, thereby directly reducing the extent of injury. Although extensive and promising clinical research has been done, clinical application of EPO is not yet clear. The role of EPO in preventing brain

¹ Matej Panjan, dr. med., Klinični oddelek za neonatologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

² Doc. dr. Aneta Soltirovska Šalamon, dr. med., Klinični oddelek za neonatologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; aneta.soltirovska@kclj.si

injury in hypoxic ischemic encephalopathy has been confirmed, with studies assessing its influence in combination with therapeutic hypothermia being underway. Due to conflicting results, differing dosing and application protocols, the benefits of EPO in preventing neonatal brain injury remain to be cleared. Tests on animals with perinatal arterial ischemic stroke are promising.

UVOD

Perinatalna možganska okvara je glavni razlog slabšega nevrološkega razvoja otrok in se kaže z motnjami gibanja, vida, sluha, govora, z duševno manjrazvitostjo in epileptičnimi napadi. Kandidati za neuroprotektivne ukrepe, ki so predmet intenzivnega raziskovanja v zadnjih dveh desetletjih, so skupine novorojenčkov s prenatalnimi in perinatalnimi dejavniki tveganja. Te skupine so: ekstremno nedonošeni novorojenčki (≤ 28 tednov gestacije), tisti s hipoksično ishemično encefalopatijo (angl. *hypoxic-ischemic encephalopathy*, HIE), perinatalnim arterijskim ishemičnim infarktom (PAII), cianotičnimi srčnimi napakami in vztrajajočo pljučno hipertenzijo (1).

Med neuroprotektivnimi pristopi, ki se že uporabljajo v klinični praksi, so prenatalno dajanje kortikosteroidov in postnatalno dajanje indometacina za preprečevanje možganske krvavitve pri nedonošenčkih, prenatalno dajanje magnezijevega sulfata, neinvazivne tehnike predihavanja in zmanjševanje stresa, odloženo pretisnjenje popkavnice, terapevtska hipotermija in trofični faktorji, kot so eritropoetin (EPO), inzulinu podobni rastni faktor 1 (angl. *insuline-like growth factor 1*, IGF-1) in njegova vezavna beljakovina (1). EPO, prvotno znan po svoji vlogi pri eritropoezi, se že dolgo uporablja za preprečevanje slabokrvnosti pri nedonošenčkih, v zadnjem času pa vse bolj proučujejo tudi njegove neuroprotektivne učinke.

Prednosti EPO pred drugimi oblikami neuroprotektivnega zdravljenja sta varnost in vpliv na procese, ki v možganih potekajo še dolgo po poškodbi. S tem je omogočen dolgotrajnejši vpliv na obnovo živčev-

ja, kar dolgoročno prispeva k zmanjševanju možganske okvare. Predklinična raziskava Larphaveesarp s sodelavci kaže, da je pri PAII učinkovit tudi, če se zdravljenje začne en teden po nastopu okvare (2). Po ishemičnem dogodku pride v možganih naravno do povečane aktivnosti EPO na prizadetem področju, s čimer se poveča obnovitvena sposobnost možganov. Vendar pa se neurogeneza, spodbujena na ta način, ne vzdržuje dovolj dolgo in tu ima mesto dodajanje EPO, ki poleg zmanjševanja obsega okvare tudi dolgoročno ohranja obnovitvene procese (3).

V nadaljevanju so opisani ključni mehanizmi možganske okvare pri novorojenčkih in principi neuroprotektivnega delovanja EPO.

MEHANIZMI NEVROLOŠKE OKVARE

Možganska okvara pri nedonošenčku, HIE in PAII sodijo med najpogostejše mehanizme možganske okvare pri novorojenčku. Tako pri HIE kot pri PAII ima ključno vlogo ishemija. HIE je posledica nenadnega hipoksično-ishemičnega dogodka, ki se zgodi v nosečnosti, pred ali med porodom, pri čemer hipoksično-ishemični dogodek v odvisnosti od jakosti in trajanja prizadene različne dele možganov. Pri PAII pa je možganska okvara zaradi ishemije omejena na povirje prizadete arterije.

V normalnih razmerah dobijo možgani energijo skoraj izključno iz aerobne presnove ob razgradnji glukoze. V primeru ishemije se zaloge energije v celicah hitro izrabijo, kar vodi v motnje vzpostavljanja ionskih gradientov; posledično se celice

depolarizirajo. Depolarizacija aktivira napestostno odvisne kalcijeve kanale v presinaptičnih membranah, zato se prehodno zveča sproščanje kemičnih prenašalcev v sinaptično špranjo. Med kemičnimi prenašalci so tudi ekscitatorne aminokisljine (glutamat), ki ga celice zaradi porušenega ionskega gradienta ne morejo v zadostni meri odstraniti. Nekateri glutamatni receptorji zaradi vezave liganda povzročijo vdor kalcijevih ionov v postsinaptične celice. Spremembe znotrajceličnega kalcija sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin in prispevajo k nabrekanju celic. Glede na svojo energijsko zalogo se celica usmeri bodisi v programirano celično smrt (apoptozo) bodisi v nekrozo (4, 5).

Pri energetsko bolj izčrpanih celicah pride do nekroze, celična vsebina, ki se sprosti po medcelični, sproži vnetni odziv, ki prizadene tudi celice v okolici. Pri energetsko manj izčrpanih celicah pa nastopi apoptoza. Celica se razdeli v z membrano obdane predelke, ki jih druge celice nadzorovano in brez vnetja odstranijo (4). Možganska okvara se širi z vnetjem, okvarjeno nevrogenezo, spremembami v sinaptogenezi in rasti nevrinov (aksonov). Mehanično celične smrti zvezno prehaja iz nekroze v apoptozo, sledi pa obnova tkiva (6).

Pri patofiziologiji možganske okvare nedonošenčka imata poleg hipoksije z ishemijo pomembno vlogo tudi okužba in vnetje. Nedonošenčkovi možgani so bolj dovzetni za okvare zaradi posebnih in značilnih razvojnih, genetskih in okoljskih vplivov. V času, ko so možganske okvare pri nedonošenčkih najpogostejše, med 28. in 32. tednom gestacije, se v možganih dogajajo hitre in pomembne razvojne spremembe, ki vključujejo migracijo nevronov, rast aksonov in dendritov, sinaptogenezo, razvoj žilja in mielinizacijo. V tem obdobju predstavljajo večino oligodendrocitne populacije, ki med drugim skrbi za mielinizacijo, preoligodendrociti. Ti so dovzetnejši za hipoksijo in ishemijo, okužbo in vnetje, oksi-

dativne poškodbe in celično smrt. Pri nedonošenčkih je posledično za okvaro predvsem dovzetna bela možganovina, vendar so za okvaro dovzetni tudi nevroni.

Možgani nedonošenčka nadalje niso sposobni proizvesti zadostne količine rastnih dejavnikov za zaščito in razvoj, poleg tega nezrelost imunskega sistema lahko botruje nastanku pretiranega, dolgotrajnega vnetja. K poškodbi prispeva tudi nezrel antioksidativni sistem. Vse skupaj vodi v glutamatno ekscitotoksičnost in okvaro zaradi prostih radikalov, kar neposredno poškoduje celice in posredno sproža apoptozo (7-11).

ERITROPOETIN

EPO je 30,4 kDa velik, kompleksen glikoprotein in citokin, ki ga v možganih tvorijo različne celice, kot so nevroni, astrociti, oligodendrociti in mikroglija (3). Deluje para- in avtokrino. Izražanje EPO in njegovega receptorja se poveča pri hipoksiji in pod vplivom vnetnih citokinov (12). Ta proces uravnava s hipoksijo sprožen transkripcijski faktor (angl. *hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1), ki v različnih časovnih oknih poveča izražanje receptorja za EPO na nevronih, astrocitih in mikrogliji (13). Da bi se izražanje EPO v možganih povečalo po naravni poti, je potrebna dolgotrajna ishemija. potrebna dolgotrajna ishemija. Če je ishemija le kratkotrajna, se izražanje EPO ne poveča, kljub nastali možganski okvari; v teh primerih ima za zagotovitev nevroprotekcije mesto umetno nadomeščanje EPO (8).

Nevroprotektivni učinki EPO se med seboj prepletajo. EPO na kratek rok zavira apoptozo, deluje protivnetno in antioksidativno, dolgoročno pa deluje tudi angiogeno, protiepileptično, nevrotrofično in spodbuja nevrogenezo. Od vseh učinkov je najpomembnejše zaviranje apoptoze. S svojim vplivom na glialne celice v okolici hipoksične okvare EPO preprečuje širjenje okvare na neprizadete predele možganov

Tabela 1. Mehanizmi zaščitnega delovanja eritropoetina na različne celice v možganih.

Nevron	Astrocit	Oligodendrocit	Mikroglia	Endotelijska celica
protiapoptotični	protiapoptotični	protiapoptotični	protivnetni	protiapoptotični
antioksidativni	antioksidativni	protivnetni	antioksidativni	antioksidativni
protivnetni	protivnetni	nevroprotektivni	nevroprotektivni	protivnetni
nevroprotektivni	nevroprotektivni	spodbuda diferenciacije	zmanjša nastajanje citokinov	angiogeni
nevrotrofični	nastajanje nevrotrofičnih dejavnikov			ohranjanje krvno-možganske pregrade

(12, 14, 15). Vpliv EPO se razlikuje glede na vrsto celice. Njegovi učinki so zbrani v tabeli 1.

Protiapoptotično delovanje

Večina raziskav, v katerih proučujejo nevroprotektivno delovanje EPO, se osredotoča na njegovo delovanje proti apoptozi (8).

Apoptoza se začne po intrinzični ali ekstrinzični poti, obe pa peljeta v celično smrt preko aktivacije kaspaz, ki razgradijo celične beljakovine. Intrinzična ali mitohondrijska pot je odvisna od ravnotežja med proti- in proapoptotičnimi beljakovinami. Modulacija protiapoptotičnih genov *Bcl* (angl. *B-cell lymphoma*) je eden od najbolj raziskanih protiapoptotičnih mehanizmov EPO. *In vitro* poskusi so pokazali, da EPO poveča izražanje genov *Bcl-xl* (angl. *B-cell lymphoma-extra large*) in zmanjša izražanje proapoptotičnih genov *Bax* (angl. *Bcl-2-associated X protein*) ter tako premakne razmerje *Bcl:Bax* v smer ustavljanja apoptoze (16).

Ekstrinzična pot pa se začne z zunanjimi signali, ki aktivirajo proapoptotične receptorje na površini celic, na primer z ligandom Fas ali s tumorje nekrotizirajočim faktorjem α (angl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α) (8). EPO preko izražanja jedrnega dejavnika κB (angl. *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*, NF- κB) sproži izražanje zaviralcev apoptoze (angl. *inhibitors of apoptosis*, IAP), ki zavirajo delovanje kaspaz. Učinek TNF- α na apoptozo

IAP zavrejo, tako da preprečijo aktivacijo kaspaze 8. NF- κB zavira apoptozo tudi preko neposredne aktivacije *Bcl-x* (angl. *B-cell lymphoma x*) (17). EPO sproži tudi nastajanje nevrotrofičnega dejavnika možganskega izvora (angl. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF), ki preko aktivacije tropomiozin kinaze B receptorja (angl. *tropomyosin receptor kinase B*, TrkB) deluje nevroprotektivno (14).

Protivnetno delovanje

Točni mehanizmi, preko katerih EPO deluje protivnetno, doslej še niso bili pojasnjeni. EPO zavira prehajanje levkocitov preko endotelija žil, saj ščiti endotelne celice pred posledicami ishemije. Na mišjem modelu avtoimunega encefalomielitisa so ugotovili, da je EPO zmanjšal vnetni infiltrat in demielinizacijo (18). Dokazali so tudi, da ima EPO zaščitno vlogo proti citotoksičnem delovanju interferona γ (IFN- γ) in lipopolisaharida (LPS) ter da zmanjša izločanje citokinov, aktivacijo astrocitov in rekrutacijo levkocitov ter mikroglije (19, 20).

Nevrotrofično delovanje

EPO spodbuja ponovno rast in tvorbo nevritov, brstenje dendritov in električno aktivnost nevronov (14). Spreminja sintezo in sproščanje živčnih prenašalcev. Dokazali so, da vpliva na plastičnost, sinaptično povezanost in aktivnost s spominom povezanih

živčnih povezav (21). Poleg tega aktivira transkripcijsko pot vezavnega proteina za odzivni element za cAMP (angl. *the cAMP response element binding protein*, CREB) ter povečuje izražanje in tvorbo BDNF v primarnih nevronih hipokampusa in s tem deluje nevroprotektivno (22).

Angiogeno delovanje

EPO deluje nevroprotektivno tudi zaradi vpliva na rast žil, s čimer izboljša prekrvavitev možganov. Ugotovili so, da poveča izražanje nekaterih genov, ki so v kulturah endotelnih celic udeleženi pri vaskularni funkciji, prenosu signalov in energijskem prenosu (23). Angiogeni učinek EPO so dokazali tudi v možganih, kjer so ugotovili od odmerka odvisno mitogeno aktivnost kapilarnih endotelnih celic (24).

Antioksidativno delovanje

Na podganjem modelu so ugotovili, da je dodajanje EPO materam preprečilo peroksidacijo maščob pri plodu po ishemično-reperfuzijski poškodbi (25).

EPO je pri poskusu na mišjih možganih deloval zaščitno tudi pri apoptotski nevrodegeneraciji in oksidativnem stresu, sproženima z alkoholom (26). Nenazadnje EPO tudi poveča eritropoezo, kar poveča porabo železa; to pomeni, da je v krvnem obtoku manj nevezanega železa, ki sproža nastanek škodljivih prostih radikalov (27).

Spodbujanje nevrogeneze

In vitro in *in vivo* raziskave potrjujejo vlogo EPO pri nevrogenezi (28).

S ponavljajočimi odmerki EPO takoj po hipoksično-ishemičnem dogodku so na živalskih modelih dokazali, da se je izboljšalo nevrovaskularno preoblikovanje in s tem nevrološki izid (29). Nadalje so ugotovili, da z vnašanjem EPO nekaj dni po hipoksično-ishemičnem dogodku spodbudijo oligodendrogenozo, zmanjšajo okvaro možganske beline ter hkrati povečajo nevrogenezo (30).

Protiepileptično delovanje

Preveliko vzdraženje nevronov po hipoksično-ishemičnem dogodku se lahko klinično pokaže z možganskimi napadi (31). Mehanizem protiepileptičnega delovanja EPO je blokada nastajanja epileptogenih celic, skupaj z modulacijo receptorja za neuropeptid Y (NPY) v hipokampusu, ki zmanjša vzdražnost nevronov in preprečuje apoptozo nevronov zaradi ekscitotoksičnosti (32).

POTENCIALNA UPORABNOST ERITROPOETINA V KLINIČNI PRAKSI

Na voljo je več oblik EPO, najpogosteje uporabljene sta rekombinantni eritropoetin in darbepoetin, ki ima podobno biološko aktivnost, a daljši razpolovni čas. Oba proizvajajo v kulturah živalskih celic (33).

Zdravljenje z EPO se je do sedaj izkazalo kot varno, kar so potrdile klinične raziskave na donošenih in nedonošenih novorojenčkih. Pri novorojenčkih, ki so prejeli EPO, niso zaznali stranskih učinkov, kot sta npr. tromboza in policitemija, ki ju opisujejo pri odraslih bolnikih. Tudi v raziskavi, v kateri so proučevali vpliv EPO na zmanjševanje možganske okvare pri nedonošenčkih, v skupini, ki je prejela EPO, niso zaznali povečanega tveganja za razvoj pogostejših zapletov zaradi nezrelosti, kot so bronhopulmonalna displazija, možganska krvavitev, odprt Botallov vod, nekrotizirajoči enterokolitis in retinopatija nedonošenčka (34).

Leta 2009 so Zhu in sodelavci raziskovali vpliv EPO na HIE in ugotovili manjši delež novorojenčkov z nevrološko prizadetostjo v skupini, v kateri so novorojenčki dva tedna prejeli nizke odmerke EPO v primerjavi s kontrolno skupino (35). Kasneje sta tudi Avasiloaie in Shimi s sodelavci na manjšem številu otrok ugotovila boljši nevrološki izid v skupini, zdravljeni z EPO, pri čemer so v tej raziskavi uporabili samo en odmerek EPO (36, 37). Malla in sodelavci

so 100 novorojenčkov s HIE razdelili v dve skupini; v skupini, v kateri so otroci prejeli EPO, je bil nevrološki izid v starosti 19 mesecev boljši kot v skupini, ki EPO ni prejela (38). Trenutno v okolju z omejenimi zdravstvenimi sredstvi poteka raziskava, v kateri bodo proučili vlogo EPO pri zmerni in hudi HIE (39). Ob dejstvu, da je v klinični praksi uveljavljeno zdravljenje zmerne in hude HIE s terapevtsko hipotermijo, obstaja samo ena raziskava, v kateri so raziskovali in potrdili učinkovitost zdravljenja HIE z EPO v kombinaciji s terapevtsko hipotermijo. V njej so 12 mesecev po rojstvu ocenili nevrološki razvoj in MRI, ki sta v skupini, ki je prejela kombinacijo hipotermije in visoke doze EPO, pokazala obetavnejši rezultat (40). Trenutno potekajo še raziskave, v katerih dodatno raziskujejo učinkovitost, varnost in režim odmerjanja EPO v kombinaciji s terapevtsko hipotermijo, katerih rezultate pričakujemo do leta 2022 in za katere upamo, da bodo razjasnile možnost uporabe EPO pri HIE v klinični praksi (41, 42).

Klinična slika PAII se pogosto pokaže z zamikom, ko zgodnje neuroprotektivno zdravljenje ne pride več v poštev. Tu ima mesto zdravljenje z EPO, ki spodbuja nevrogenezo in ima tudi nevrotrofične učinke (3). Predklinične raziskave na živalskih modelih PAII kažejo, da se je prostornina infarkta zmanjšala in izboljšala motorična ter kognitivna funkcija pri tistih živalih, ki so takoj po nastanku infarkta prejemale EPO (43). Dokazali so tudi histološko in funkcijsko izboljšanje, kadar so živalim vbrizgali EPO en teden po PAII, kar kaže na vlogo EPO kot trofičnega dejavnika, ki spodbuja nevrogenezo (2). To vlogo potrjuje tudi raziskava Gonzalesa in soavtorjev, v kateri so dokazali, da zdravljenje z EPO spodbudi proliferacijo progenitornih celic in njihovo selitev na mesto poškodbe (44).

Doslej je bila dokončana le ena klinična raziskava, kjer so PAII pri 21 novorojenčkih potrdili z MRI, nato pa so eni skupini

neposredno po diagnozi dali 1000 IU/kg rekombinantnega EPO in odmerki ponovili po 24 in 48 urah. Ponoven MRI pri treh mesecih starosti ni pokazal razlik v prostornini infarkta in nevrološkem razvoju otrok v primerjavi s skupino, ki EPO ni prejela (45). Trenutno poteka raziskava, v kateri raziskovalci želijo opredeliti vpliv zdravljenja PAII z darbepoetinom na obseg prizadetega področja ter nevrološki in razvojni izid otrok.

Uporabnost EPO pri zdravljenju možganske okvare nedonošenčka v klinični praksi doslej še ni povsem dorečena. Z metaanalizo štirih kontroliranih randomiziranih raziskava, v kateri je bilo skupno 1.133 nedonošenčkov gestacijske starosti od 28 do 32 tednov, so ugotovili, da je bil delež bolnikov, ki so ob sledenju imeli kognitivne primanjkljaje, v zdravljeni skupini manjši, ni pa bilo pomembnih razlik v motoričnem razvoju, razvoju vida in sluha v primerjavi z nezdravljeno skupino (46). Nasprotno pa v nedavni raziskavi 951 nedonošenčkov, rojenih pred 28. tednom nosečnosti, niso potrdili, da bi v skupini otrok, ki je do 32. tedna postmenstruacijske starosti prejela visoke odmerke EPO, bilo do drugega leta starosti manj nevroloških in razvojnih primanjkljajev (34). Dejstvo, da je dolgotrajnejše zdravljenje z majhnimi odmerki EPO bistveno izboljšalo nevrološke izide, pa kaže na to, da je pri zdravljenju nedonošenčkov z EPO potrebno nepretrgano zdravljenje. V trenutno potekajočih randomiziranih kontroliranih raziskavah o profilaktični uporabi EPO proučujejo protokole zdravljenja, ki združujejo strategijo zgodnjih in nepretrganih odmerkov.

ZAKLJUČEK

Dosedanje raziskave kažejo, da predstavlja EPO potencialno možnost preprečevanja posledic možganske okvare pri novorojenčkih. Njegova prednost je, da je varen in z vplivom na obnovo možganov tudi dolgoročno prispeva k omejevanju možganske

okvare. Pri preprečevanju možganske okvare v sklopu HIE so dokazali njegovo učinkovitost, potekajo pa raziskave, ki bodo opredelile vlogo EPO v kombinaciji s terapevtsko hipotermijo pri tej vrsti možganske okvare novorojenčka. Učinkovitost EPO pri preprečevanju možganske okvare nedonošenčkov ostaja, zaradi nasprotujočih si rezultatov raziskav, neenotnih odmerkov in protokolov vnašanja, za zdaj še nedoreče-

na. Poskusi na živalih kažejo obetavne rezultate tudi pri uporabi EPO po PAII, saj so dokazali, da se je prostornina infarkta zmanjšala in izboljšala motorična ter kognitivna funkcija pri tistih živalih, ki so takoj po nastanku infarkta prejemale EPO. Trenutno potekajo klinične raziskave, katerih rezultati bodo opredelili uporabnosti EPO pri PAII pri novorojenčkih.

LITERATURA

1. Singhi S, Johnston M. Recent advances in perinatal neuroprotection. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev-2031.
2. Larphaveesarp A, Georgevits M, Ferriero DM, et al. Delayed erythropoietin therapy improves histological and behavioral outcomes after transient neonatal stroke. *Neurobiol Dis*. 2016; 93: 57–63.
3. Wagenaar N, de Theije CGM, de Vries LS, et al. Promoting neuroregeneration after perinatal arterial ischemic stroke: neurotrophic factors and mesenchymal stem cells. *Pediatr Res*. 2018; 83(1-2): 372–84.
4. Zorec R. Celična smrt in znotrajcelični kalcij. In: Ribarič S, ed. *Temeljni patološke fiziologije*. Ljubljana: Littera picta. 2014. p. 31–5.
5. Zorec R. Možganska kap. In: Ribarič S, ed. *Temeljni patološke fiziologije*. Ljubljana: Littera picta. 2014. p. 292–4.
6. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, et al. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*. 2001; 8(2): 207–19.
7. Back SA. Cerebral white and gray matter injury in newborns: new insights into pathophysiology and management. *Clin Perinatol*. 2014; 41(1): 1–24.
8. Juul SE, Pet GC. Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. *Clin Perinatol*. 2015; 42(3): 469–81.
9. Pregnolato S, Chakkarapani E, Isles AR, et al. Glutamate Transport and Preterm Brain Injury. *Front Physiol*. 2019; 10: 417.
10. Gilles F, Gressens P, Dammann O, et al. Hypoxia-ischemia is not an antecedent of most preterm brain damage: the illusion of validity. *Dev Med Child Neurol*. 2018; 60(2): 120–5.
11. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, et al. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci*. 2011; 29(4): 423–40.
12. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol*. 2014; 51(4): 481–8.
13. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19(6): 643–51.
14. Kumral A, Tüzün F, Oner MG, et al. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. *Brain Dev*. 2011; 33(8): 632–43.
15. Jantzie LL, Corbett CJ, Firl DJ, et al. Postnatal Erythropoietin Mitigates Impaired Cerebral Cortical Development Following Subplate Loss from Prenatal Hypoxia-Ischemia. *Cereb Cortex*. 2015; 25(9): 2683–95.
16. Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, et al. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(4): 584–92.
17. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22(5): 503–14.
18. Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 2002; 952(1): 128–34.
19. Genc K, Genc S, Baskin H, et al. Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiol Res*. 2006; 55(1): 33–8.
20. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology*. 2007; 92(4): 269–78.
21. Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, et al. Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol*. 2008; 6: 37.
22. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, et al. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*. 2005; 93(2): 412–21.
23. Födinger M, Fritsche-Polanz R, Buchmayer H, et al. Erythropoietin-inducible immediate-early genes in human vascular endothelial cells. *J Investig Med*. 2000; 48(2): 137–49.
24. Yamaji R, Okada T, Moriya M, et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem*. 1996; 239(2): 494–500.
25. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, et al. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Child's Nerv Syst*. 2003; 19(1): 19–22.
26. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Dev Brain Res*. 2005; 160(2): 146–56.
27. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol*. 2014; 41(1): 119–31.

28. Shingo T, Todd Sorokan S, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001; 21(24): 9733–43.
29. Iwai M, Cao G, Yin W, et al. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke*. 2007; 38(10): 2795–803.
30. Iwai M, Stetler RA, Xing J, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke*. 2010; 41(5): 1032–7.
31. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, et al. Clinical Neonatal Seizures are Independently Associated with Outcome in Infants at Risk for Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *J Pediatr*. 2009; 155(3): 318–23.
32. Kondo A, Shingo T, Yasuhara T, et al. Erythropoietin exerts anti-epileptic effects with the suppression of aberrant new cell formation in the dentate gyrus and upregulation of neuropeptide Y in seizure model of rats. *Brain Res*. 2009; 1296: 127–36.
33. Jelkmann W. Recombinant EPO production—points the nephrologist should know. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(10): 2749–53.
34. Juul SE, Comstock BA, Wadhawan R, et al. A Randomized Trial of Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants. *N Engl J Med*. 2020; 382(3): 233–43.
35. Zhu C, Kang W, Xu F, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2009; 124(2): e218–26.
36. Avasiloaiei A, Dimitriu C, Moscalu M, et al. High-dose phenobarbital or erythropoietin for the treatment of perinatal asphyxia in term newborns. *Pediatr Int*. 2013; 55(5): 589–93.
37. El Shimi MS, Awad HA, Hassanein SMA, et al. Single dose recombinant erythropoietin versus moderate hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in low resource settings. *J Matern Neonatal Med*. 2014; 27(13): 1295–300.
38. Malla RR, Asimi R, Teli MA, et al. Erythropoietin monotherapy in perinatal asphyxia with moderate to severe encephalopathy: A randomized placebo-controlled trial. *J Perinatol*. 2017; 37(5): 596–601.
39. Ezenwa B, Ezeaka C, Fajolu I, et al. Impact of Erythropoietin in the management of Hypoxic Ischaemic Encephalopathy in resource-constrained settings: protocol for a randomized control trial. *BMC Neurol*. 2020; 20(1): 171.
40. Wu YW, Mathur AM, Chang T, et al. High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy: A phase II trial. *Pediatrics*. 2016; 137(6): e20160191.
41. Juul SE, Comstock BA, Heagerty PJ, et al. High-Dose Erythropoietin for Asphyxia and Encephalopathy (HEAL): A Randomized Controlled Trial - Background, Aims, and Study Protocol. *Neonatology*. 2018; 113(4): 331–8.
42. Razak A, Hussain A. Erythropoietin in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Perinat Med*. 2019; 47(4): 478–89.
43. van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, et al. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev*. 2008; 59(1): 22–33.
44. Gonzalez FF, Larphaveesarp A, McQuillen P, et al. Erythropoietin Increases neurogenesis and oligodendroglial cells of subventricular zone precursor cells after neonatal stroke. *Stroke*. 2013; 44(3): 753–8.
45. Benders MJ, Van Der Aa NE, Roks M, et al. Feasibility and safety of erythropoietin for neuroprotection after perinatal arterial ischemic stroke. *J Pediatr*. 2014; 164(3): 481–6.e62.
46. Fischer HS, Reibel NJ, Bührer C, et al. Prophylactic Early Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2017; 139(5): e20164317.