



**Università
di Genova**

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
FARMACIA**

TESI DI LAUREA

Eccitotossicità glutammatergica nell'ischemia cerebrale

Relatore:

Prof. Ernesto Fedele

Candidata:

Beatrice Canepa

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

1. INTRODUZIONE: L'ISCHEMIA CEREBRALE.....	3
1.1 Ischemia focale e globale.....	3
1.2 Fasi dell'ischemia.....	5
1.3 Conseguenze dell'evento ischemico.....	6
2. IL SISTEMA GLUTAMMATERGICO.....	8
2.1 I recettori del glutammato.....	9
2.1.1 I recettori NMDA.....	10
2.1.2 I recettori AMPA.....	11
2.1.3 I recettori Kainato.....	13
2.1.4 I recettori metabotropi.....	14
2.2 I trasportatori del glutammato.....	15
3. CONTRIBUTO DEL GLUTAMMATO NEL DANNO ISCHEMICO.....	17
3.1 L'eccitotossicità glutammatergica.....	17
3.1.1 Il rilascio di glutammato da neuroni, astrociti, oligodendrociti e microglia in condizioni ischemiche.....	18
3.1.2 Il ruolo dei trasportatori.....	21
3.1.3 I recettori del glutammato nell'ischemia.....	21
3.2 Conseguenze dell'eccitotossicità glutammatergica.....	28
3.3 Morte cellulare.....	32
4. POSSIBILI APPROCCI TERAPEUTICI.....	35
4.1 Strategie di neuroprotezione.....	36
4.2 Ipotermia Terapeutica.....	41
 BIBLIOGRAFIA.....	 48
 RINGRAZIAMENTI.....	 78

1. INTRODUZIONE: L'ISCHEMIA CEREBRALE

Il cervello umano adulto, nonostante rappresenti solo circa il 2% del peso corporeo, richiede un elevato afflusso di sangue e nutrienti in quanto è in grado di consumare circa il 20% del bilancio energetico dell'intero corpo (Doyle et al., 2008; Kirdajova et al., 2020). In condizioni fisiologiche, il flusso sanguigno cerebrale (FSC) è di circa 750-1000 ml/min e quando questo valore scende al di sotto di 300-400 ml/min, cioè si riduce di più del 60%, ci troviamo di fronte ad un'ischemia cerebrale; se il FSC si riduce al 18-20% del valore fisiologico, si verifica un danno rapido e irreversibile. (Matsumoto et al., 1990; Baron, 2001; Heiss, 2004; Doyle et al., 2008; Baltan, 2016; Kirdajova et al., 2020). L'ischemia cerebrale è, quindi, una condizione clinica caratterizzata da uno scarso afflusso di sangue al cervello e, di conseguenza, da una significativa riduzione dell'apporto di ossigeno e glucosio che causa morte dei neuroni, cellule ad elevato metabolismo aerobico, cui si accompagna diminuzione delle cellule gliali, soprattutto nel parenchima cerebrale (Kirdajova et al., 2020). I sintomi che caratterizzano l'evento ischemico variano da lievi a gravi e possono comprendere vertigini, disturbi della vista e dei movimenti del corpo, difficoltà a parlare, problemi di coordinazione e perdita di coscienza (Nadarajan et al., 2014; Kirdajova et al., 2020). L'ictus ischemico è di certo una delle principali cause di mortalità a livello mondiale, secondo solo al cancro e alle malattie cardiovascolari, con tassi di mortalità inferiori nei paesi sviluppati (circa il 15%) e con un rischio di andare incontro ad ictus cerebrale di 1 adulto su 6 nella fascia di età 55-75 anni (Marini et al., 1999; Sehadri et al., 2006; Kirdajova et al., 2020). L'ischemia cerebrale può essere suddivisa in due tipologie principali sulla base della localizzazione ed estensione del danno cerebrale; infatti, possiamo distinguere l'ischemia cerebrale focale, che è causata dall'occlusione di specifiche arterie cerebrali e interessa aree limitate di tessuto, e l'ischemia cerebrale globale, che origina da una diminuzione generalizzata del flusso sanguigno cerebrale con un danno di solito più esteso (Yao et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

1.1 ISCHEMIA CEREBRALE FOCALE E GLOBALE

L'ischemia cerebrale focale interessa una determinata regione del cervello in cui si verifica il blocco o riduzione del flusso sanguigno causato da trombosi, cioè dal formarsi di un coagulo di sangue che ostacola la circolazione all'interno del vaso, o da un embolo, cioè da parti più piccole di un trombo che si è frammentato (VanGilder et al., 2012; Kirdajova et al., 2020). In questo tipo di ischemia, possiamo distinguere due zone nel tessuto cerebrale circostante il vaso occluso che sono il core ischemico, dove l'evento ischemico è di massima intensità per cui i neuroni vanno incontro ad una morte di tipo necrotico, e la penombra ischemica, dove l'evento ischemico è di intensità minore rispetto al core, ma che comunque è in grado di causare morte neuronale; inizialmente, le due zone

hanno un'estensione simile ma, con il progredire della lesione ischemica in assenza di intervento, la penombra diventa anch'essa parte del core (Zhao et al., 1997; Ginsberg, 2003; Rossi et al., 2007; Kirdajova et al., 2020).

Il core ischemico è caratterizzato da un insieme di parametri che si discostano notevolmente da quelli fisiologici, tra i quali ricordiamo la pressoché totale assenza di ATP, una grave alterazione dell'omeostasi ionica, concentrazioni di glutammato estremamente elevate e acidosi tissutale che, insieme anche all'incapacità degli astrociti di fornire nutrienti ai neuroni; causa morte cellulare entro i primi minuti dopo l'inizio del danno ischemico (Chisholm & Sohrabji, 2016; Wetterling et al., 2016; Kirdajova et al., 2020).

Per quanto riguarda la penombra ischemica, in questa zona si riscontra un flusso sanguigno residuo supportato da arterie collaterali, una riduzione comunque significativa di ATP, minori alterazioni ioniche, lo svilupparsi di onde ricorrenti di depolarizzazione che si propagano dal core (*spreading depression* o *spreading depolarization*) contribuendo al danno cellulare e apoptosi come tipica morte cellulare (Harukuni & Bhardwaj, 2006; Rossi et al., 2007; Doyle et al., 2008; Hinzman et al., 2015; Jung et al., 2017; Oliveira-Ferreira et al., 2019; Kirdajova et al., 2020). Inoltre, proprio in quest'area di penombra, gli astrociti e le cellule gliali che esprimono il proteoglicano NG2, una proteina marker di cellule in maturazione con un potenziale di differenziazione multipotente, formano quella che viene definita una "cicatrice" gliale che sembra avere lo scopo di impedire a sostanze dannose di penetrare nel tessuto sano (Honsa et al., 2012; Adams & Gallo, 2018; Kirdajova et al., 2020).

Nel caso dell'ischemica cerebrale globale, questa deriva essenzialmente da un arresto cardiaco transitorio che causa una cessazione del flusso sanguigno nell'intero parenchima cerebrale, portando a un danno ischemico caratterizzato da morte neuronale ritardata, soprattutto in aree cerebrali specifiche (ad es., corteccia, ippocampo e corpo striato) a seguito, appunto, del mancato apporto di ossigeno e nutrienti indispensabili per la sopravvivenza dei neuroni, cui si accompagna proliferazione e attivazione di cellule gliali e astrociti con un'aumentata espressione di canali ionici permeabili al calcio che possono, quindi, influenzare il risultato dell'insulto ischemico (Kirino & Sano, 1984; Harukuni & Bhardwaj, 2006; Anderova et al., 2011; Butenko et al., 2012; Guo et al., 2019; Kirdajova et al., 2020).

In entrambi i tipi di ischemia, il ripristino del flusso sanguigno (riperfusion) è essenziale per la protezione del tessuto cerebrale, ma è ormai ampiamente dimostrato che la riperfusion stessa può portare ad un aggravamento del danno ischemico, essenzialmente per attivazione di meccanismi patologici calcio-dipendenti e per l'instaurarsi di processi di stress ossidativo che causano ulteriore morte delle cellule nervose (Zhang et al., 2022). Infine, la riduzione dell'integrità della barriera ematoencefalica, in parte dovuta anche a disfunzione delle cellule astrocitarie, può causare edema

vasogenico e un'estesa compressione del cervello (Kahles et al., 2007; Thompson & Ronaldson, 2014; Kirdajova et al., 2020). Lo studio dei numerosi meccanismi che portano al danno ai diversi tipi cellulari del SNC è stato possibile soprattutto per lo sviluppo di numerosi modelli preclinici di ischemia in vitro e in vivo. Tra i modelli in vitro, quelli più utilizzati sono sezioni (fettine) di diverse aree cerebrali o colture di diversi tipi cellulari esposte a condizioni di deprivazione di ossigeno e glucosio (ODG, oxygen glucose deprivation). Per quanto riguarda i modelli in vivo, si possono distinguere quelli che simulano l'ischemia focale, come l'occlusione dell'arteria cerebrale mediana (MCAO, middle cerebral artery occlusion) con o senza riperfusione, e quelli che simulano l'ischemia globale, come l'occlusione dei 4 vasi (4VO, four-vessel occlusion) con blocco permanente delle due arterie vertebrali e il blocco temporaneo delle due carotidi (Li & Zhang, 2021; Pilipovic et al., 2023)

1.2 FASI DELL'ISCHEMIA

Il danno ischemico può presentarsi con diversi gradi di gravità che sono sostanzialmente in funzione della durata del blocco del flusso sanguigno al tessuto cerebrale (Heiss et al., 2004; Kirdajova et al., 2020). In generale, un evento ischemico lieve, cioè con un FSC di 30 ml/100 g/min, normalmente non causa morte cellulare entro le 6 ore successive, mentre un'ischemia moderata (FSC tra 12 e 30 ml/100 g/min) o un'ischemia grave (FSC < 12 ml/100 g/min) portano alla morte delle cellule nervose in tempi minori (3 e 1 ora, rispettivamente; Sakoh et al., 2000; Kirdajova et al., 2020). Secondo quanto riportato in letteratura, nella progressione dell'evento ischemico si possono distinguere 3 fasi temporalmente successive: fase acuta, fase subacuta e fase cronica (Kirdajova et al., 2020). La fase acuta iniziale è caratterizzata da una sequenza di processi molecolari e cellulari indotti dall'improvvisa riduzione del flusso sanguigno cerebrale, con conseguente deplezione energetica causata dall'esaurimento di ossigeno e nutrienti, successiva eccitotossicità glutammatergica e morte cellulare, che vede i neuroni come le cellule più vulnerabili alla deprivazione di ossigeno e glucosio seguiti dagli astrociti, mentre le cellule gliali NG2 non sembrano interessate da alterazioni patologiche significative (Lai et al., 2014; Cuartero et al., 2016; Du et al., 2018; Kirdajova et al., 2020). Per quanto riguarda le cellule della microglia, queste sono meno vulnerabili al danno ischemico eccitotossico perché esprimono i recettori del glutammato solo quando, dopo l'evento patologico, passano dallo stato quiescente allo stato attivo (microglia reattiva; Gottlieb & Matute; 1997; Kirdajova et al., 2020). La fase subacuta, che si manifesta dalle 24 alle 72 ore dopo l'evento ischemico, è caratterizzata dallo sviluppo di edema vasogenico, ovvero un evento conseguente ad alterazioni delle giunzioni occludenti con danneggiamento della barriera ematoencefalica, che porta allo stravasamento di proteine e liquidi plasmatici nel parenchima cerebrale circostante, mentre nella fase cronica, che si verifica anche settimane dopo l'insorgenza dell'evento

ischemico, si può osservare un ulteriore danno tissutale dovuto ad una neurodegenerazione ritardata indotta da fenomeni di stress ossidativo e dall'attivazione del sistema immunitario (Wetterling et al., 2016; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, nella fase cronica si osserva anche l'induzione di una serie di processi molecolari e cellulari con la produzione di mediatori antiinfiammatori e fattori neurotrofici che portano alla formazione della cicatrice gliale e attivano meccanismi di riparazione, quali neurogenesi e angiogenesi (Jurcao & Simion, 2022). Per quanto riguarda la tipologia di morte cellulare, la necrosi neuronale si verifica nella fase acuta ischemica e, nel caso dell'ischemia focale, soprattutto nella zona del core, mentre morte cellulare di tipo apoptotico emerge in maniera ritardata diversi giorni o addirittura settimane dopo l'evento ischemico (Du et al., 1996; Zhang et al., 2012; Kirdajova et al., 2020). Inoltre, studi preclinici recenti in vitro e in vivo indicano che il danno ischemico attiva anche altri meccanismi di morte cellulare, quali la necroptosi e la piroptosi (Liao et al., 2020; Yan et al., 2022)

1.3 CONSEGUENZE DELL'EVENTO ISCHEMICO

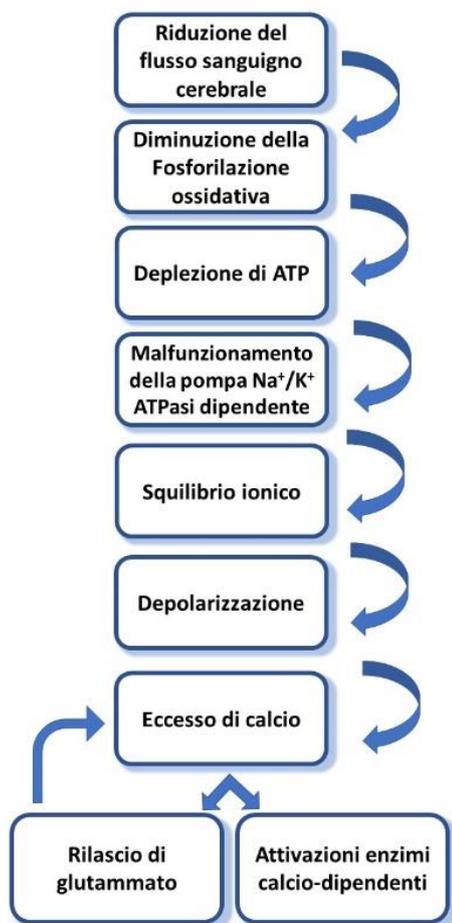


Figura 1. Eventi cellulari e molecolari indotti dall'ischemia cerebrale.

Riferimento: Kirdajova et al., 2020

La figura a lato riassume i diversi eventi cellulari e molecolari che avvengono nel tessuto nervoso in seguito ad ischemia cerebrale causata da arresto cardiaco o ictus e che causano la morte di neuroni e cellule gliali in un arco temporale da minuti a giorni dopo l'insulto ischemico (Kirdajova et al., 2020).

Questa serie di eventi è indotta dalla riduzione/cessazione del flusso sanguigno che, quindi, porta ad un insufficiente apporto di ossigeno e glucosio necessari per la fosforilazione ossidativa, processo fisiologico che avviene a livello mitocondriale e che è essenziale per soddisfare le richieste di energia sotto forma di ATP; infatti, poiché la maggior parte di energia che si forma a livello cerebrale è dovuta all'ossidazione del glucosio in anidride carbonica e acqua, la carenza di glucosio e ossigeno provoca l'esaurimento di ATP in pochi minuti, anche in considerazione del fatto che non esistono scorte di energia a lungo termine a livello cerebrale (Erecinska & Silver, 2001; Doyle, 2008; Rama & Garcia 2016; Kirdajova et al., 2020). La mancanza di ATP provoca l'alterazione del funzionamento della pompa Na^+/K^+ ATPasi di membrana e le cellule nervose non riescono a mantenere i gradienti

elettrochimici, andando incontro a depolarizzazione con influsso di Na^+ cui segue efflusso di K^+ ; la depolarizzazione prolungata provoca l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e l'inversione del funzionamento dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), due eventi che, insieme alla ridotta funzionalità dei meccanismi ATP-dipendenti di sequestro intracellulari e di estrusione del Ca^{2+} dalla cellula, portano a un abnorme aumento delle concentrazioni citosoliche di questo ione (Ahad et al., 2020; Kirdajova et al., 2020). Inoltre, la depolarizzazione e il forte influsso di Ca^{2+} a livello dei neuroni glutammatergici provoca un massiccio rilascio di acido glutammico che, attivando eccessivamente soprattutto i propri recettori ionotropi, contribuisce al danno ischemico nei neuroni e nelle cellule gliali (Ahad et al., 2020, Kirdajova et al., 2020). Infatti, l'acido glutammico, che in condizioni fisiologiche rappresenta il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale (SNC), quando presente in concentrazioni molto elevate a livello sinaptico ed extrasinaptico, in seguito ad un eccessivo rilascio ma anche ad una ridotta capacità di ricaptazione soprattutto da parte degli astrociti, sovrastimola i propri recettori di membrana causando un ulteriore aumento dell'ingresso di Ca^{2+} all'interno delle cellule. Il sovraccarico di calcio, a sua volta, provoca ulteriori alterazioni della funzionalità mitocondriale, produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e stimolazione patologica di endonucleasi, proteasi e fosfolipasi Ca^{2+} -dipendenti che, degradando le principali macromolecole cellulari, causano morte cellulare di tipo necrotico o apoptotico in seguito ad attivazione della cascata delle caspasi (Ahad et al., 2020, Kirdajova et al., 2020).

Infine, nel caso dell'ischemia focale, il danno cellulare si espande dal core nel tessuto circostante in seguito a depolarizzazioni peri-infartuali che, secondo le attuali conoscenze, sarebbero indotte dall'aumento dei livelli di K^+ extracellulare, di calcio intracellulare e del rilascio di glutammato da neuroni e astrociti e che porterebbero ad una espansione del danno alla zona della penombra (Hossmann, 1996; Somjen et al., 2001; Hinzman et al., 2015; Hartings et al., 2017; Rakers & Petzold, 2017; Kirdajova et al., 2020).

2. IL SISTEMA GLUTAMMATERGICO

L'acido glutammico, come già accennato precedentemente, è il neuro/gliotrasmettitore aminoacidergico di tipo eccitatorio più abbondante a livello del SNC dove interviene nella comunicazione tra neuroni e tra astrociti e neuroni, e media numerosi processi fisiologici, inclusi apprendimento e formazione/consolidamento della memoria, ovvero i processi di plasticità sinaptica (Angulo et al., 2004; Marmioli & Cavaletti, 2012; Pinky et al., 2018; Kirdajova et al., 2020). Sebbene una percentuale importante di acido glutammico presente nell'organismo provenga dalla dieta, questo amminoacido non è in grado di passare la barriera ematoencefalica per diffusione e viene trasportato all'interno del SNC in quantità minime (Hawkins et al., 2006; Klin et al., 2010; Kirdajova et al., 2020, Gruenbaum et al., 2022); per questo motivo, l'acido glutammico viene sintetizzato direttamente all'interno del SNC dalle cellule nervose. In quest'ottica, l'acido glutammico nei neuroni viene in parte sintetizzato dal suo precursore α -chetoglutarato, intermedio chiave nel ciclo di Krebs, nella reazione reversibile catalizzata dall'enzima glutammato deidrogenasi, ma soprattutto viene ottenuto per conversione della glutammina ad opera di una glutaminasi; questo amminoacido, a sua volta, è prodotto nelle cellule astrocitarie per azione della glutammina sintetasi a partire dall'acido glutammico che viene ricaptato dallo spazio sinaptico, in quello che viene definito il ciclo glutammato-glutammina (Mark et al., 2001; Rowley et al., 2012; Diaz-Ruiz et al., 2016; Hu et al., 2018; Kirdajova et al., 2020). Nelle normali condizioni fisiologiche, i neuroni glutamatergici, presenti all'interno di specifiche aree cerebrali (interneuroni) o che collegano diverse regioni del SNC, rilasciano glutammato principalmente secondo il classico meccanismo di esocitosi Ca^{2+} -dipendente alla base della neurotrasmissione chimica e che, in condizioni fisiologiche, vede la fusione delle vescicole sinaptiche contenenti il neurotrasmettitore con la membrana plasmatica e la sua liberazione nello spazio sinaptico dove, attivando i propri recettori postsinaptici, trasmette il segnale alle altre cellule nervose (Rowley et al., 2012; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, questa visione neurocentrica della trasmissione del segnale all'interno del SNC è stata superata dagli studi degli ultimi trent'anni che hanno dimostrato come l'acido glutammico e altri trasmettitori (quindi definiti gliotrasmettitori) vengano rilasciati anche dagli astrociti, sebbene con meccanismi in parte diversi, in quella che è stata definita la sinapsi tripartita che permette la trasmissione e la modulazione delle informazioni non più solo tra neuroni ma anche tra astrociti e neuroni (Goenaga et al., 2023).

2.1 I RECETTORI DEL GLUTAMMATO

Come accennato nel paragrafo precedente, una volta rilasciato dai neuroni presinaptici, l'acido glutammico svolge la sua azione di neurotrasmettitore attraverso l'attivazione di propri recettori presenti sulla membrana dei neuroni che possono essere ionotropi (iGluR) o metabotropi (mGluR).

I iGluR sono recettori ligando-dipendenti associati a canale ionico e, a loro volta, sono suddivisi in recettori NMDA (dal ligando selettivo acido N-metil-D-aspartico) e recettori non-NMDA, dei quali fanno parte i recettori Kainato (dal ligando selettivo acido kainico) e AMPA (dal ligando selettivo acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico) (Atoji & Sarkar, 2019; Kirdajova et al., 2020). A differenza dei classici recettori ionotropi pentamerici, i recettori ionotropi del glutammato sono formati dall'assemblaggio di quattro subunità (tetrameri). Ogni subunità possiede un dominio extracellulare N-terminale (NTD), tre eliche transmembrana (M1,3,4), un loop che rientra nella membrana nel versante intracellulare (M2) e un dominio C-terminale (CTD) intracellulare; nel loro insieme, le regioni M1-M4 formano il dominio transmembrana (TMD), mentre il dominio di legame del neurotrasmettitore (LBD) è formato da un segmento della catena polipeptidica che porta il dominio N-terminale (S1) ed il loop polipeptidico extracellulare che unisce M3 e M4 (S2). Nell'assemblaggio del recettore tetrameric, l'insieme dei quattro TMD forma il canale ionico (Hansen et al., 2021).

I recettori metabotropi glutammatergici sono costituiti da due subunità (dimeri) legate fra loro da un ponte disolfuro; ogni subunità comprende un NTD extracellulare molto grande, 7 eliche transmembrana e un CTD intracellulare. In questi recettori il LBD è formato dall'insieme dei NTD delle due subunità che formano il recettore ed è stato denominato dominio Venus Flytrap (VFD) per somiglianza della struttura alla pianta carnivora *Dionaea muscipula*. I recettori metabotropi del glutammato sono accoppiati a proteine Gi e Gq eterotrimeriche costituite da subunità α , β e γ che legano i nucleotidi della guanina (GDP e GTP) e che trasducono il segnale recettoriale a enzimi intracellulari e/o a canali ionici, ma possono anche usare vie alternative di segnale (Niswender & Conn, 2010).

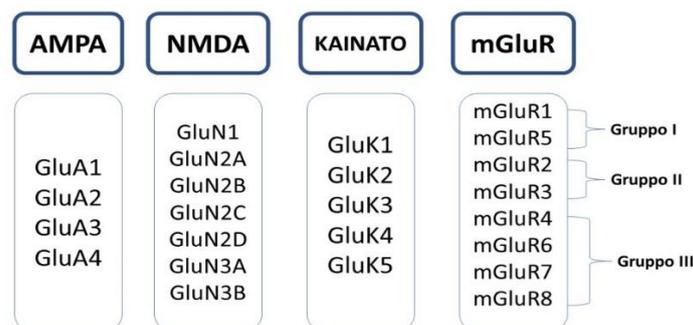


Figura 2. Composizione dei recettori ionotropi e metabotropi dell'acido glutammico

2.1.1 I RECETTORI NMDA

I recettori NMDA sono recettori ionotropi ligando-dipendenti, il cui canale è permeabile allo ione Ca^{2+} e sono ampiamente espressi nel cervello dove svolgono un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici (ad esempio, apprendimento e memoria) e fisiopatologici (ad esempio, danno eccitotossico). Sono costituiti dalle subunità GluN1, GluN2, di cui si conoscono 4 diversi tipi (GluN2A/B/C/D), e GluN3, di cui si conoscono 2 tipi diversi (GluN3A/B), che si assemblano in membrana a formare un complesso eterotetramerico (Lau & Tymianski, 2010; Hansen et al., 2021). Dal punto di vista della localizzazione, le subunità GluN1, GluN2A e GluN3A sono presenti in pressoché tutte le aree del SNC dell'adulto, la subunità GluN2B si trova principalmente espressa nel proencefalo, la subunità GluN2C soprattutto nel cervelletto, la subunità GluN2D soprattutto nel talamo e la GluN3B in particolare nel mesencefalo e nel midollo spinale (Lau & Tymianski, 2010; Hansen et al., 2021).

I recettori NMDA rappresentano ad oggi l'unico esempio di recettori ionotropi che per l'attivazione necessitano del legame di due agonisti endogeni, rappresentati dal glutammato e dalla glicina (o dalla D-serina), e di una contemporanea depolarizzazione che ha lo scopo di allontanare lo ione Mg^{2+} che blocca il canale ionico in maniera voltaggio-dipendente e permettere il flusso di ioni, soprattutto Ca^{2+} . I classici recettori NMDA sono formati dall'assemblaggio di due subunità GluN1 e due subunità GluN2 (A-D), ma sono stati anche riportati recettori composti da due subunità GluN1, una subunità GluN2 e una subunità GluN3 (A o B) che mostrano proprietà diverse, quali una minore permeabilità al Ca^{2+} ed una minore sensibilità al blocco da Mg^{2+} (Lau & Tymianski, 2010; Hansen et al., 2018).

La subunità GluN1, di cui esistono 8 varianti di splicing, contiene il sito di legame per il glutammato, mentre la subunità GluN2 (e GluN3) porta il sito di legame per la glicina; inoltre, i recettori NMDA possiedono altri siti (sito redox, sito protonico, siti per lo Zn^{2+} , siti per modulatori allosterici negativi) che sono in grado di regolare l'attività del recettore, aumentandola o diminuendola, in maniera diversa in funzione della diversa composizione in subunità (Lau & Tymianski, 2010; Hansen et al., 2018).

Infine, le subunità GluN2A-B, attraverso i loro domini C-terminali, sono in grado, attraverso il legame con proteine scaffold, di tenere in stretta associazione diverse proteine funzionali postsinaptiche con il recettore NMDA, creando così specifici microambienti postsinaptici che, attivati dal flusso di Ca^{2+} attraverso il recettore NMDA, svolgono un ruolo chiave in importanti processi fisiologici, incluso la stabilizzazione e il trafficking dei recettori NMDA stessi; tuttavia, queste interazioni del recettore NMDA con altre proteine intracellulari possono essere anche coinvolte in situazioni patologiche, inclusa l'ischemia cerebrale (Gardoni & Di Luca, 2021).

Nonostante i recettori NMDA siano recettori ionotropi e, quindi, i loro effetti siano dipendenti dal flusso di ioni attraverso il canale recettoriale, negli ultimi 10 anni numerosi studi hanno anche

evidenziato effetti indipendenti dal flusso ionico e mediati da vie di segnale di tipo metabotropo per interazioni dirette tra subunità del recettore e diversi enzimi intracellulari (Li et al., 2022).

2.1.2 I RECETTORI AMPA

La maggior parte della trasmissione eccitatoria rapida è mediata da un altro tipo di recettori glutammatergici rappresentato dai recettori AMPA che sono costituiti da complessi omo o eterotetramericici di quattro diverse subunità, denominate GluA1-4, a formare canali ionici permeabili a ioni Na^+ o Ca^{2+} in funzione della loro composizione che richiedono il solo legame con il glutammato per la loro attivazione (Diering & Huganir, 2018; Sun et al., 2019). Infatti, è ampiamente dimostrato che la conduttanza del canale agli ioni Ca^{2+} è influenzata dalla presenza o meno della subunità GluA2, in quanto i recettori che hanno nella loro struttura tale subunità sono impermeabili al catione bivalente, mentre quelli in cui la subunità GluA2 è assente sono permeabili al calcio e, perciò, possono essere coinvolti in fenomeni di plasticità cellulare ma anche in processi di tossicità cellulare (Kwak & Weiss, 2006; Sun et al., 2019).

Nel cervello adulto, in condizioni fisiologiche, la maggior parte dei recettori AMPA sono impermeabili al calcio e sono formati da eterotetrameri GluA1/GluA2 e GluA2/GluA3, anche se in diverse regioni cerebrali sono presenti recettori AMPA permeabili al calcio la cui espressione può essere regolata in maniera dinamica (Man, 2011). A livello genico, il pre-mRNA che codifica la subunità GluA2 porta un codone CAG che esprimerebbe un residuo di glutamina (Q) a livello del TMD2 ma va incontro ad un processo conosciuto come Q/R editing che, ad opera dell'enzima ADAR2 (Adenosine Deaminase Acting on RNA type 2), modifica l'adenosina in inosina con il risultato che il codone esprime un residuo di arginina (R) che conferisce alla subunità GluA2 la funzione di rendere il recettore AMPA impermeabile al calcio; in condizioni fisiologiche il processo di Q/R editing ha un'efficienza quasi del 100%, per cui pressoché tutte le subunità GluA2 quando presenti nella struttura del recettore AMPA conferiscono impermeabilità al Ca^{2+} (Barbon & Barlati, 2011; Guo & Ma, 2021). Tuttavia, come si vedrà in seguito, questo processo può venire alterato in condizioni patologiche e portare alla formazione di una maggior quantità di recettori AMPA permeabili allo ione calcio.

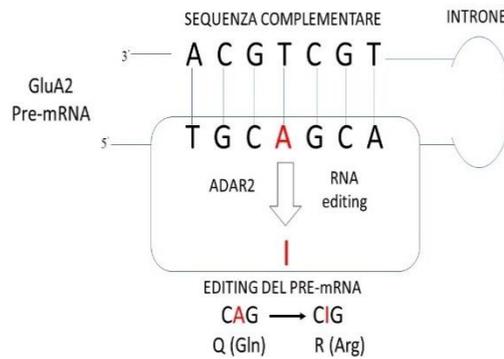
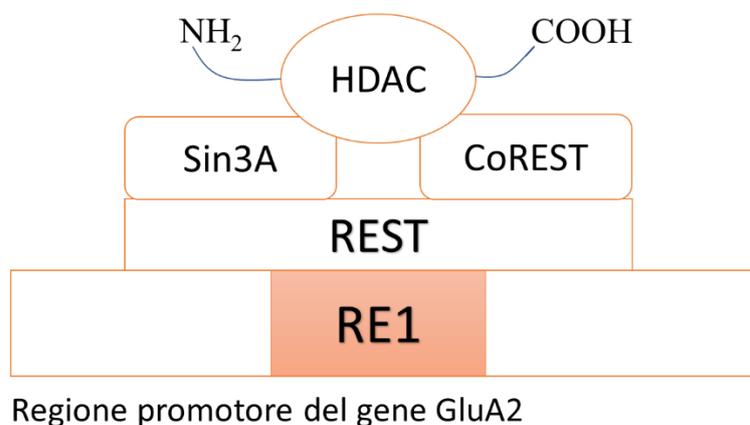


Figura 3. Q/R editing della subunità GluA2 del recettore AMPA.

Riferimento: Guo & Ma, 2021

Un altro meccanismo in grado di portare alla formazione di recettori AMPA permeabili al calcio è rappresentato dal rimodellamento della cromatina per repressione trascrizionale che porta a una riduzione dell'espressione della subunità GluA2, un processo operato dal repressore della trascrizione genica chiamato REST (Repressor Element-1 Silencing Transcription factor) che agisce a livello di una sequenza di DNA chiamata elemento repressivo 1 o RE1. Questo elemento regolatore repressivo impedisce l'espressione di geni neuronali importanti per la plasticità sinaptica inclusa anche l'espressione della subunità GluA2 (Schoenherr & Anderson, 1995; Guo & Ma, 2021).



Regione promotore del gene GluA2

Figura 4. Repressione trascrizionale del gene della subunità GluA2 del recettore AMPA da parte di REST. REST (repressore trascrizionale); RE1 (elemento repressivo); HDAC (istone deacetilasi); Sin3A (co-repressore); CoREST (co-repressore). Riferimento: Guo & Ma, 2021

Un altro importante fattore da considerare riguarda i meccanismi di assemblaggio dei recettori AMPA che, nella maggior parte dei casi, sono complessi tetramericici di eteromeri GluA1/2 e GluA2/3 (Guo & Ma, 2021). Nelle cellule si trovano dei pool intracellulari di subunità GluA2 concentrate nel reticolo endoplasmatico che hanno la duplice funzione di garantire la disponibilità di questa subunità

e di facilitarne l'incorporazione nel recettore AMPA attraverso meccanismi di trafficking e assemblaggio che sono strettamente regolati da diverse proteine. (Greger et al., 2002; Pick & Ziff, 2018; Guo & Ma, 2021) Ad esempio, le proteine di ancoraggio GRIP1 e GRIP2 (Glutamate Receptor Interacting Protein 1-2), ABP (AMPA Binding Protein) e PICK1 (Protein Interacting with C Kinase 1) sono in grado di legarsi, attraverso domini PDZ (Postsynaptic Density protein 95/Disc large/Zona occludens-1), al dominio C-terminale della subunità GluA2 in maniera diversa a seconda della fosforilazione della subunità GluA2, regolando così la stabilizzazione o la rimozione dei recettori AMPA contenenti la subunità GluA2 (Carroll et al., 2001; Shi et al., 2001; Barry & Ziff, 2002; Guo & Ma, 2021). In particolare, la fosforilazione del residuo di serina S880 della subunità GluA2 da parte della PKC causerebbe la dissociazione di GRIP/ABP dalla GluA2 e l'associazione di PICK1 con conseguente internalizzazione delle subunità GluA2 e loro confinamento nel reticolo endoplasmatico, il che potrebbe portare ad una riduzione nella membrana di recettori AMPA impermeabili al calcio ed un aumento di quelli permeabili al catione (Guo & Ma, 2021).

Infine, bisogna ricordare che anche nel caso dei recettori AMPA alcuni effetti sono mediati da interazioni di tipo metabotropo attraverso l'attivazione di proteine G (Valbuena & Lerma, 2016).

2.1.2 I RECETTORI KAINATO

I recettori Kainato sono costituiti da cinque subunità denominate GluK1-5 che si possono assemblare in omo- ed etero-tetrameri, hanno proprietà simili a quelle dei recettori AMPA in quanto consentono il flusso ionico quando attivati dal legame con il glutammato e sono per lo più impermeabili agli ioni calcio per la presenza delle subunità GluK1-2 che, come visto per la subunità GluA2 dei recettori AMPA, vanno incontro al processo di Q/R editing (Chalupnik & Szymanska, 2023). Sebbene i recettori AMPA siano principalmente localizzati sulla membrana postsinaptica, diversi studi hanno mostrato che i recettori kainato possono essere localizzati sia a livello postsinaptico che a livello presinaptico dove possono agire riducendo o aumentando il rilascio di glutammato e GABA, anche se in questo caso si tratterebbe di recettori kainato atipici che agirebbero in maniera indipendente dal flusso ionico attraverso meccanismi di tipo metabotropo (Valbuena & Lerma, 2016; Chalupnik & Szymanska, 2023).

2.1.4 I RECETTORI METABOTROPI

I recettori metabotropi del glutammato (mGluR) sono omo- o eterodimeri formati da subunità proteiche con sette domini transmembrana che possono trasdurre il segnale sia attraverso il classico sistema di accoppiamento a proteine G sia attraverso vie proteine G-indipendenti; ad oggi sono stati identificati otto diversi recettori metabotropi glutammatergici (mGluR1-8) e sono classificati in tre gruppi (gruppi I, II e III) sulla base dell'omologia di sequenza, dei loro meccanismi di trasduzione del segnale e della caratterizzazione farmacologica (Heuss et al, 1999; Lau & Tymianski, 2010; Ribeiro et al., 2017; Acher et al., 2022).

I recettori metabotropici del gruppo I includono i mGluR1 e mGluR5 la cui stimolazione porta, tramite una proteina Gq, all'attivazione della fosfolipasi C che, a sua volta, agisce sui fosfolipidi di membrana producendo inositolo trifosfato, con successiva mobilizzazione del calcio intracellulare dal reticolo endoplasmatico, e diacilglicerolo che stimola l'attività della protein chinasi C; questo gruppo di recettori modula anche altre funzioni cellulari in modo indipendente dalla proteina G, ad esempio tramite tirosin-chinasi della famiglia Src (Abe T et al., 1992; Aramori & Nakanishi, 1992; Heuss et al., 1999; Gee & Lacaille, 2004; Topolnik et al., 2006; Kubota et al., 2014; Kirdajova et al., 2020).

Il gruppo II dei recettori metabotropici include mGluR2 e mGluR3 la cui stimolazione causa l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi via proteina Gi, riduzione dei livelli di cAMP e conseguente inibizione dei canali calcio voltaggio-dipendenti (Chavis et al, 1994; Tanabe et al., 1993; Lau & Tymianski, 2010).

I recettori del gruppo III includono mGluR4/6/7/8, che mostrano meccanismi di trasduzione del segnale simili ai recettori del gruppo II, essendo anch'essi associati, via Gi, alla diminuzione dell'attività dell'adenilato ciclasi e inibizione a valle dei canali calcio voltaggio-dipendenti (Lau & Tymianski, 2010; Kirdajova et al., 2020).

Oltre ad agire a livello postsinaptico, i recettori glutammatergici metabotropi dei tre gruppi sono localizzati anche a livello presinaptico dove modulano il rilascio di diversi neurotrasmettitori (Olivero et al., 2020). La prima fase, dalla durata di pochi minuti, è caratterizzata da un aumento graduale della concentrazione extracellulare di K^+ e da piccoli cambiamenti nella concentrazione dei principali ioni. La seconda fase è caratterizzata da una depolarizzazione anossica, che determina la perdita dei principali gradienti ionici ed un accumulo di glutammato nel cervello. Inoltre, lo stress ossidativo che si verifica a seguito di una ri-perfusione post-ischemia è stato proposto come ulteriore innesco del rilascio di glutammato (Tretter & Adam-Vizi, 2002; Kirdajova et al., 2020).

2.2 I TRASPORTATORI DEL GLUTAMMATO

I sistemi di ricaptazione del glutammato tramite i trasportatori per gli amminoacidi eccitatori, più conosciuti come EAAT (Excitatory Amino Acid Transporters), rappresentano il meccanismo principale per regolare la quantità di glutammato nelle sinapsi ai fini dell'attivazione di recettori postsinaptici e presinaptici, e anche per evitare che la sua concentrazione diventi eccessivamente alta, scatenando fenomeni di tossicità cellulare. Nel caso del glutammato, questo compito è principalmente, ma non esclusivamente, realizzato dagli astrociti che, in seguito, convertono il glutammato in glutamina (cfr. capitolo 2) o lo utilizzano anche come gliotrasmettitore nella comunicazione astrocita-neurone.

Gli EAAT fanno parte della famiglia dei trasportatori SLC1 e, come si intuisce dalla loro denominazione, non trasportano solo glutammato ma anche altri amminoacidi eccitatori (ad esempio, acido aspartico). Inoltre, bisogna ricordare che sono in grado di trasportare L- e D-aspartato ma solo L-glutammato (Drejer et al., 1982; Bender et al., 1998; Kirdajova et al., 2020). Fino ad oggi, sono stati identificati e caratterizzati cinque diversi membri della famiglia di questi trasportatori denominati EAAT1-5 che, a seconda della localizzazione cellulare predominante, sono stati ulteriormente classificati in trasportatori gliali (EAAT1 e EAAT2) e neuronali (EAAT3, EAAT4 e EAAT5) (Malik & Willnow, 2019; Kirdajova et al., 2020). La famiglia dei trasportatori gliali include EAAT1 e EAAT2 mentre la famiglia dei trasportatori neuronale è costituita da EAAT3/4 e 5. Tuttavia, l'espressione dell'mRNA per EAAT2 era stata osservata anche a livello neuronale fin dal 1997 e il contributo funzionale di questo trasportatore presinaptico sulla ricaptazione di glutammato a livello dei neuroni è stata dimostrata con tecniche di immunistochemical e knockout condizionale (Torp et al., 1997; Kanai & Hediger, 2004; Furness et al., 2008; Kirdajova et al., 2020).

Dal punto di vista della distribuzione, l'espressione degli EAAT è chiaramente diversificata nelle varie aree cerebrali e cambia durante lo sviluppo: i trasportatori EAAT1 sono preferibilmente espressi nel cervelletto e in alcune altre regioni come gli organi circumventricolari, mentre nelle altre regioni del CNS prevale l'espressione dei trasportatori EAAT2 che, quindi, rappresentano i principali trasportatori responsabili della ricaptazione del glutammato (Shibata et al., 1997; Lehre & Danbolt, 1998; Berger & Hediger, 2000; Kugler & Schleyer, 2004; Kirdajova et al., 2020); i trasportatori neuronali EAAT3 hanno una localizzazione predominante a livello dell'ippocampo, mentre i trasportatori EAAT4 sono particolarmente espressi nelle cellule di Purkinje del cervelletto (Furuta et al., 1997; Shashidharan et al., 1997; Dehnes et al., 1998; Massie et al., 2008; Kirdajova et al., 2020). A livello cellulare, una maggiore densità di EAAT1 e EAAT2 è stata osservata su membrane che si affacciano su assoni e terminazioni nervose, mentre EAAT3 e EAAT4 sono localizzati sui corpi cellulari e sui dendriti dei neuroni (Chaudhry et al., 1995; Kirdajova et al., 2020).

Per quanto riguarda la funzionalità, i trasportatori EAAT accoppiano alla ricaptazione del glutammato il sinporto di tre ioni sodio e di un idrogenione, seguito dall' antiporto di uno ione potassio, una stechiometria che fornisce l'energia necessaria per il trasporto di glutammato contro gradiente di concentrazione; inoltre, l'entrata di cariche positive è compensata da un flusso disaccoppiato di ioni cloruro (Fairman et al., 1995; Wadiche et al., 1995; Kirdajova et al., 2020).

3. CONTRIBUTO DEL GLUTAMMATO NEL DANNO ISCHEMICO

I livelli di glutammato extracellulari richiedono una fine regolazione fisiologica al fine di permettere un'ottimale modulazione della neurotrasmissione eccitatoria a livello neuronale ed evitare effetti eccitotossici. Da ciò ne consegue che il glutammato deve essere presente nelle giuste concentrazioni, non troppo elevate, perché diventerebbe dannoso, ma nemmeno troppo basse perché non esplicherebbe la sua attività fisiologica. I principali meccanismi cellulari essenziali al mantenimento di questa omeostasi sono rappresentati dai trasportatori, soprattutto quelli astrocitari, che sono in grado di sequestrare il glutammato dalla fessura sinaptica evitando così il suo accumulo (Bylicky et al., 2018; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, in diverse situazioni patologiche, quali l'ischemia cerebrale o le malattie neurodegenerative, ma anche durante il processo di invecchiamento, questi meccanismi di ricaptazione possono subire alterazioni portando ad un aumento eccessivo della concentrazione di glutammato nello spazio sinaptico, con conseguente tossicità per le cellule del tessuto nervoso circostante e ostacolando le normali funzioni cerebrali (Volterra et al., 1994; Harvey et al., 2011; Lewis et al., 2012; Zhang et al., 2019; Kirdajova et al., 2020). Oltre ad un'alterata capacità dei sistemi di ricaptazione nel mantenere entro livelli fisiologici le concentrazioni extracellulari di glutammato, i fenomeni di tossicità cellulare possono essere anche indotti da un aumento del rilascio di glutammato e da alterazioni nella funzionalità dei suoi recettori.

3.1 L'ECCITOTOSSICITÀ GLUTAMMATERGICA

Il termine di eccitotossicità si riferisce ad un fenomeno di tossicità cellulare indotto da alterazioni dei meccanismi fisiologici alla base della neurotrasmissione glutamatergica che causano una patologica sovrastimolazione dei recettori. L'interesse nei confronti dell'eccitotossicità glutamatergica e dei meccanismi che la mediano è dato dal fatto che questo processo di danno neuronale si riscontra non solo nell'ischemia cerebrale ma in numerose altre patologie psichiatriche e neurologiche, tra cui la schizofrenia, la depressione, l'autismo, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la malattia di Alzheimer (AD) e la malattia di Parkinson (Olloquequi et al., 2018; Pajarillo et al., 2019).

3.1.1 IL RILASCIO DI GLUTAMMATO DA NEURONI, ASTROCITI, OLIGODENDROCITI E MICROGLIA IN CONDIZIONI ISCHEMICHE

Come descritto in precedenza, le concentrazioni extracellulari di glutammato nel SNC sono finemente regolate da fisiologici processi di rilascio e ricaptazione che avvengono a livello di neuroni ed astrociti e che rappresentano un preciso meccanismo di messa a punto della trasmissione centrale eccitatoria, ma che, in condizioni patologiche come l'ischemia cerebrale, possono andare incontro ad alterazioni funzionali che sono causa di eccitotossicità (Hamilton & Attwell, 2010; Araque et al., 2014; Gundersen et al., 2015; Allen & Eroglu, 2017; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, nel considerare il danno ischemico nel sistema nervoso centrale, si dovrebbero tenere in considerazione diversi fattori, quali le diverse età a cui si può verificare l'evento, la gravità e il tipo di ischemia (globale o focale), la specificità regionale (sostanza bianca o sostanza grigia, ippocampo, corteccia, corpo striato, etc.) e la fase acuta o tardiva dell'evento stesso, che possono influenzare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel rilascio di glutammato (Kirdajova et al., 2020). In particolare, sono state identificate due principali fasi nella ischemia cerebrale grave in vivo di cui la prima, della durata di pochi minuti, vede un aumento graduale della concentrazione di K^+ extracellulare e lievi cambiamenti delle concentrazioni di altri ioni principali, mentre la seconda è caratterizzata da una depolarizzazione anossica, con perdita dei principali gradienti ionici e accumulo abnorme di glutammato; inoltre, va ricordato anche lo stress ossidativo, indotto dall'eventuale riperfusione post-ischemia che potrebbe contribuire ad ulteriore rilascio di glutammato (Astrup et al., 1977; Hansen & Nedergaard, 1988; Tretter & Adam-Vizi, 2002; Rossi et al., 2007; Kirdajova et al., 2020).

Per quanto riguarda i neuroni, utilizzando modelli di ischemia in vitro e in vivo, è stato dimostrato che questi rilasciano glutammato sia per esocitosi vescicolare sia per inversione della funzione dei trasportatori EAAT che giocano un ruolo chiave nella generazione della depolarizzazione anossica (Katayama et al., 1991; Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000; Fujimoto et al., 2004; Andrade & Rossi, 2010; Lee & Kim, 2015; Doyle et al., 2018; Kirdajova et al., 2020; Wang et al., 2022). Per quanto riguarda i meccanismi alla base del rilascio di glutammato durante l'insulto ischemico, diversi studi indicano come, nelle fasi iniziali, il rilascio vescicolare sia causato da processi indipendenti dall'aumento della concentrazione di ioni calcio ma dipendenti dalla depolimerizzazione dei filamenti di actina indotta dall'aumento di calcio, piuttosto che da processi calcio-dipendenti in cui l'entrata di calcio attraverso la membrana plasmatica avviene principalmente ad opera dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} (NCX) (Andrade & Rossi, 2010; Lee & Kim, 2015; Kirdajova et al., 2020; Wang et al., 2022). Nella fase acuta dell'ischemia, caratterizzata dalla depolarizzazione anossica, si ha un massiccio aumento della concentrazione di calcio intracellulare che è causato sia dal suo influsso attraverso i canali di membrana voltaggio-dipendenti (VDCC) sia dal suo rilascio dai depositi

intracellulari e che ulteriormente contribuisce al rilascio vescicolare di glutammato (Kirdajova et al., 2020; Wang et al., 2022). Infine, uno studio ha riportato che le correnti sinaptiche misurate in neuroni corticali piramidali sottoposti ad ischemia in vitro (ODG) ed il danno neuronale erano ridotti dall'inibizione farmacologica dello scambiatore cistina-glutammato (xCT), ma non erano influenzati dal blocco dei trasportatori EAAT o del rilascio vescicolare di glutammato, indicando che lo scambiatore xCT rappresenta un ulteriore meccanismo di rilascio di glutammato in condizioni ischemiche che potrebbe contribuire ai processi di eccitotossicità; tuttavia, poiché lo scambiatore è presente sia sui neuroni che su astrociti, oligodendrociti e microglia, sarà necessario capire se questo meccanismo di rilascio interessa anche questi tipi cellulari (Soria et al., 2014; Kirdajova et al., 2020). Un altro aspetto interessante riguarda il coinvolgimento del rilascio vescicolare di glutammato nel danno ischemico alla mielina; infatti, è stato documentato che, in modelli di ischemia in vitro ed in vivo, la lesione della mielina nella sostanza bianca inizia con il rilascio di glutammato vescicolare, ma non quello dovuto a inversione dei trasportatori, dagli assoni dei neuroni che porta ad una sovrastimolazione dei recettori NMDA mielinici contenenti le subunità GluN2C e GluN2D, con conseguenti effetti citotossici (Doyle et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

A livello degli astrociti, i meccanismi che portano al rilascio di glutammato come gliotrasmettitore e il suo ruolo nell'eccitotossicità in diverse patologie centrali, inclusa l'ischemia, sono ancora non del tutto chiariti e materia di dibattito nella comunità scientifica. Secondo numerosi studi, gli astrociti rilasciano glutammato vescicolare con meccanismi di esocitosi Ca^{2+} -dipendenti simili a quelli descritti per il rilascio dai neuroni; in effetti, la presenza intracellulare di vescicole contenenti glutammato, di trasportatori vescicolari VGLUT 1 e 2, nonché di specifiche proteine vescicolari (ad esempio, v-SNARE), così come la possibilità di un rilascio dipendente dal Ca^{2+} extracellulare piuttosto che da quello liberato dai depositi intracellulari, sono state dimostrate negli astrociti da diversi gruppi di ricerca (Bezzi et al., 2001, 2004; Montana et al., 2004; Ni & Parpura, 2009; Bergersen et al., 2012; Bohmbach et al., 2018; Savtchouk & Volterra, 2018; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, secondo altri ricercatori, gli astrociti non possiedono l'insieme delle proteine necessarie per il rilascio vescicolare e, comunque, il rilascio vescicolare calcio-dipendente di glutammato da astrociti è causato da stimoli aspecifici e non ha rilevanza, quantomeno in condizioni fisiologiche (Barres, 2008; Fiacco & McCarthy, 2018; Kirdajova et al., 2020).

Inoltre, bisogna ricordare che sono stati descritti anche diversi meccanismi di rilascio non vescicolare (Nedergaard et al., 2002; Hamilton & Attwell, 2010; Gundersen et al., 2015; Kirdajova et al., 2020). Nell'ischemia cerebrale, il glutammato viene rilasciato dagli astrociti principalmente per inversione del suo trasportatore in condizioni di deplezione di ATP, un evento che, dato l'elevato fabbisogno energetico per il trasporto attivo, viene preceduto dalla riduzione della sua funzione di ricaptazione

del trasmettitore che inizia a contribuire al fenomeno eccitotossico, dato anche il rilascio neuronale di glutammato sempre mediato da inversione del trasportatore (Kirdajova et al., 2020). È stato anche dimostrato che condizioni di ischemia e ipossia sono in grado di provocare la riduzione dell'espressione di entrambi i trasportatori del glutammato (EAAT1 e EAAT2) negli astrociti portando così ad un ulteriore accumulo di glutammato extrasinaptico, e questo fenomeno può avvenire per alterazione di diversi processi che mediano l'espressione la funzionalità di queste proteine, quali la regolazione trascrizionale, lo splicing dell'RNA, la modulazione epigenetica (ad esempio, metilazione del DNA, metilazione e acetilazione degli istoni), la glicosilazione e fosforilazione post-traduzionale (Sheldon & Robinson, 2007; Ketheeswaranathan et al., 2011; Pajarillo et al. 2019; Kirdajova et al., 2020).

Altre ricerche hanno evidenziato che, in condizioni ischemiche, il glutammato può essere rilasciato dagli astrociti principalmente attraverso diversi canali ionici, come i canali MAC (maxi-anion channels) o i canali VRAC (volume-sensitive outwardly-rectifying anion channels), piuttosto che per rilascio vescicolare, per inversione del trasportatore o via emicanali delle giunzioni comunicanti (Liu et al., 2006; Kirdajova et al., 2020). In effetti, uno studio in vivo con MCAO transitoria, in cui è stata utilizzata la tecnica della microdialisi intracerebrale e inibitori di EAAT2 e VRAC, ha dimostrato che questi canali, ma non i trasportatori, rappresentano il meccanismo principale di rilascio di glutammato in condizioni sperimentali che mimano la penombra ischemica, un risultato in parte supportato anche dall'osservazione di un ridotto volume di danno ischemico cerebrale in topi con knockout condizionale per il gene della proteina SWELL1 che, insieme ad altre sue omologhe, si associa a formare VRAC eteromerici (Feustel et al., 2004; Yang et al., 2019; Kirdajova et al., 2020).

In letteratura, inoltre, sono stati descritti altri meccanismi non vescicolari per il rilascio di glutammato dagli astrociti (ad esempio, attraverso il canale Ca^{2+} -dipendente Bestrophin 1, i canali per il K^+ TWIK1 e TREK1 e i recettori purinergici P2X7 attivati dall'ATP) di cui però non è ancora chiaro il ruolo nell'ischemia cerebrale (Duan et al., 2003; Woo et al., 2012; Ryoo & Park, 2016; Kirdajova et al., 2020).

Astrociti e neuroni esprimono, inoltre, emicanali con grandi pori che, in risposta a vari stimoli, possono rilasciare ATP e glutammato e che possono aumentare di espressione dopo uno stato di ipossia/ischemia, come nel caso di Cx43 che potrebbe svolgere un ruolo importante nel danno e nella morte neuronale (Davidson et al., 2013; Ma et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

Gli oligodendrociti, le loro cellule precursori e gli assoni mielinizzati sono particolarmente vulnerabili alla riduzione di energia e, in condizioni di deprivazione di ossigeno e glucosio, gli oligodendrociti mostrano alcuni cambiamenti morfologici, in particolare il rigonfiamento del loro soma che interessa i processi mielinici e, successivamente, si traduce in una serie di rigonfiamenti lungo l'assone (Fern

& Moller, 2000; Baltan, 2014; Kirdajova et al., 2020). Inoltre, anche gli oligodendrociti possiedono trasportatori del glutammato (principalmente EAAT1, ma anche EAAT3) con proprietà simili a quelle osservate negli astrociti e che, in condizioni di deprivazione energetica, possono operare in modalità inversa, rilasciando così glutammato nello spazio extracellulare (Matute et al., 2006; Kirdajova et al., 2020).

Nel caso delle cellule di microglia, in seguito a loro attivazione, queste possono rilasciare quantità elevate di glutammato, ad esempio attraverso lo scambiatore xCT, attraverso i canali VRAC o gli emicanali delle giunzioni comunicanti, che potrebbero contribuire così al danno eccitotossico a seguito di un evento ischemico (Takeuchi et al., 2006; Harrigan et al., 2008; Bridges et al., 2012; Persson & Rönnbäck, 2012; Umebayashi et al., 2014; Socodato et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

3.1.2 IL RUOLO DEI TRASPORTATORI NELL'ISCHEMIA

I trasportatori del glutammato (EAAT) svolgono un ruolo critico nella regolazione dei livelli del neuro/gliotrasmettitore eccitatorio nelle sinapsi e, come abbiamo visto, sono accoppiati al sinporto di Na^+/H^+ e all'antiporto di K^+ . L'insufficiente apporto energetico causato dall'insulto ischemico si traduce in una diminuzione dell'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi e successiva alterazione dei gradienti di concentrazione transmembrana di Na^+ e K^+ che, a sua volta, porta ad una riduzione della capacità di ricaptazione degli EAAT fino all'inversione del loro funzionamento, con conseguente aumento della concentrazione di glutammato extracellulare (Rossi et al., 2000; Allen et al., 2004; Kirdajova et al., 2020). Per quanto riguarda l'espressione degli EAAT in seguito ad ischemia, i risultati degli studi riportati in letteratura sono contrastanti, con diversi ricercatori che hanno osservato una riduzione di alcuni EAAT mentre altri ne hanno riportato una sovraespressione (EAAT1 e EAAT2) (Fukamachi et al., 2001; Rao et al., 2001; Chen et al., 2005; Arranz et al., 2010; Kirdajova et al., 2020).

3.1.3 I RECETTORI DEL GLUTAMMATO NELL'ISCHEMIA

L'iperattivazione dei recettori glutammatergici, a seguito di aumento eccessivo di glutammato in un evento ischemico, porta ad un massiccio afflusso di ioni Ca^{2+} . Se le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare superano la capacità delle cellule di sequestrare ed estrarre questo catione, si innescano diversi processi patologici, tra i quali tossicità mitocondriale, stress ossidativo e nitrosativo, attivazione eccessiva di fosfolipasi e proteasi calcio-dipendenti, alterazioni del citoscheletro e danni al DNA, che portano a morte cellulare.

I RECETTORI NMDA

Come riportato nel paragrafo 2.1.1, i recettori NMDA sono recettori ionotropi permeabili allo ione Ca^{2+} e ampiamente espressi nel SNC dove svolgono un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici e fisiopatologici. Sono l'unico esempio ad oggi di recettori che per l'attivazione necessitano di due agonisti, glutammato e glicina, e di depolarizzazione per liberare il canale dal blocco voltaggio-dipendente dello ione Mg^{2+} , sebbene anche per questi recettori vi siano delle eccezioni. Un gran numero di studi preclinici in vitro ed in vivo ha dimostrato il coinvolgimento dei recettori NMDA nei fenomeni di morte neuronale. Di seguito sono riportate alcune delle principali evidenze sperimentali che indicano il contributo delle diverse subunità del recettore NMDA nel danno eccitotossico in seguito ad insulto ischemico.

- La subunità GluN1 è l'unica subunità sempre presente in tutti i recettori NMDA ed è stato dimostrato che bloccando il sito di legame della glicina su questa subunità con antagonisti selettivi come il gavestinel e licostinel si ha un effetto protettivo contro il danno neuronale in vivo (Lai et al., 2014; Sun et al., 2019). Altri dati sperimentali indicano che potrebbe essere possibile intervenire anche su altri domini della subunità GluN1; infatti, è stato osservato come un anticorpo policlonale contro le sequenze amminoacidiche 19-371 della GluN1 sia in grado di inibire l'interazione tra l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e la subunità stessa, riducendo così l'effetto proeccitotossico del tPA e permettendo anche un ampliamento della finestra terapeutica della trombolisi con questo farmaco (Macrez et al., 2011; Sun et al., 2019).
- Per quanto riguarda la subunità GluN2A, diversi studi indicano che l'attivazione dei recettori contenenti questa subunità abbia effetti neuroprotettivi, come dimostrato dal fatto che l'applicazione di un antagonista preferenziale per i recettori NMDA che contengono questa subunità (NVP-AAM077) è in grado di aumentare in vitro l'eccitotossicità indotta da NMDA o da acido DL-treo-betaidrossiaspartico e l'apoptosi indotta dalla deprivazione di ossigeno e glucosio in colture cellulari, e di aumentare in vivo il danno cerebrale in seguito ad ischemia transitoria globale o focale (Liu et al., 2007; Choo et al., 2012; Zheng et al., 2012; Liu et al., 2007; Sun et al., 2019).

Al contrario, altri ricercatori hanno osservato che la riduzione delle subunità GluN2A con tecniche di knockdown genico riduceva il danno neuronale causato in vitro da NMDA o in vivo da ischemia focale (Morikawa et al., 1998; Zhou et al., 2013; Sun et al., 2019). Inoltre, il blocco dei recettori NMDA con subunità GluN2A, indotto da NVP-AAM077 o Zn^{2+} , riduce l'eccitotossicità causata da NMDA in neuroni corticali o ippocampali coltivati per più di 21 giorni in vitro (von Engelhardt et al., 2007; Stanika et al., 2009; Zhou et al., 2013; Sun et al.,

2019). La fosforilazione della subunità GluN2A, ad opera della chinasi 5 ciclina-dipendente (Cdk5), potrebbe essere coinvolta nel conferire alla subunità una funzione eccitotossica, come suggerito dall'osservazione che il danno ischemico a neuroni ippocampali veniva ridotto in seguito a blocco dell'interazione tra Cdk5 e subunità GluN2A (Wang et al., 2003; Sun et al., 2019). In conclusione, i dati in letteratura sul ruolo della subunità GluN2A nell'ischemia sono discordanti ed è stato ipotizzato che essa potrebbe avere un ruolo neurotossico nella fase acuta ed un ruolo neuroprotettivo nelle fasi successive (Wang et al., 2003; Sun et al., 2018, 2019).

- Nel caso della subunità GluN2B, i risultati delle numerose ricerche sono concordi nell'indicare che la sovrastimolazione dei recettori NMDA che la contengono è responsabile dei fenomeni di eccitotossicità e conseguente morte neuronale in seguito a ischemia cerebrale. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che l'utilizzo di antagonisti per tali recettori, come ifendropil, CP-101, 606, Ro 25-6981 e Co 101244, così come il knockdown genico di questa subunità sono in grado di prevenire la morte eccitotossica in modelli in vitro ed in vivo, inclusi i modelli di ischemia focale (Liu et al., 2007; von Engelhardt et al., 2007; Chen et al., 2008; Stanika et al., 2009; Choo et al., 2012; Zhou et al., 2013; Sun et al., 2019).

Inoltre, la fosforilazione della subunità, che si osserva dopo l'evento ischemico, potrebbe produrre un aumento dell'attività del recettore NMDA con conseguente aggravamento della lesione cerebrale, per cui l'inibizione selettiva della fosforilazione della subunità potrebbe rappresentare una potenziale strategia terapeutica per il trattamento del danno ischemico (Sun et al., 2016, 2019).

- Anche per quanto riguarda il ruolo dei recettori NMDA contenenti la subunità GluN2C nell'ischemia cerebrale, gli studi in letteratura non riportano dati univoci. Un primo studio ha riportato una riduzione della lesione infartuale ischemica in topi knockout per la subunità GluN2C, mentre in un altro studio più recente si è osservato che, sebbene questo tipo di topi avessero aree di infarto simili ai topi in cui la subunità era presente, essi mostravano una diminuzione dell'edema cerebrale e un migliore recupero neurologico (Kadotani et al., 1998; Holmes et al., 2018; Sun et al., 2019). Altri ricercatori hanno riportato che, in condizioni ischemiche, il rilascio di glutammato nello spazio periaxsonale potrebbe indurre l'attivazione dei recettori NMDA contenenti subunità GluN2C/2D a livello degli oligodendrociti, contribuendo così a danni alla guaina mielinica (Doyle et al., 2018; Sun et al., 2019). Questi risultati indicano, quindi, come la stimolazione di recettori NMDA con subunità GluN2C potrebbe avere effetti eccitotossici nell'ischemia cerebrale.

Tuttavia, altri dati riportati in letteratura sembrano indicare il contrario. Infatti, è stato evidenziato come la sovraespressione delle subunità GluN2C in neuroni granulari di cervelletto sia in grado di proteggerli dalla tossicità indotta da NMDA, mentre topi con knockout genico di queste subunità mostravano una maggiore morte neuronale nell'area CA1 dell'ippocampo e una ridotta memoria spaziale in seguito ad ischemia cerebrale rispetto ad animali di controllo (Chen & Roche, 2009; Chung et al., 2016; Sun et al., 2019).

- Per i recettori NMDA contenenti la subunità GluN3A, diverse evidenze sperimentali indicano che la loro stimolazione media effetti neuroprotettivi, come suggerito dai risultati ottenuti con tecniche di knockout genico. Infatti, è stato riportato che la mancanza della subunità GluN3A causa un aumento di morte neuronale in seguito ad applicazione di NMDA in colture di neuroni corticali e un aumento del danno corticale in un modello in vivo di ipossia-ischemia neonatale; risultati simili sono stati ottenuti in topi adulti senza subunità GluN3A sottoposti a ictus ischemico che hanno riportato un aumento significativo del volume di tessuto cerebrale danneggiato e un ridotto recupero delle funzioni sensomotorie (Nakanishi et al., 2009; Lee et al., 2015; Sun et al., 2019).

Infine, è stato anche dimostrato che la sovraespressione della subunità GluN3A in diversi modelli di colture neuronali conferisce protezione nei confronti della tossicità indotta da ischemia in vitro (deprivazione di ossigeno e glucosio) o in vivo (Nakanishi et al., 2009; Wang et al., 2013; Sun et al., 2019).

Per quanto riguarda i livelli delle diverse subunità, è stato osservato che nell'ippocampo, una delle regioni cerebrali più sensibili all'insulto eccitotossico, l'ischemia cerebrale porta ad una diminuzione significativa dell'espressione delle subunità GluN2A e GluN2B, mentre aumenta l'espressione delle subunità GluN2C e GluN3A (Zhang et al., 1997; Hsu et al., 1998; Dos-Anjos et al., 2009a,b; Liu et al., 2010; Fernandes et al., 2014; Chung et al., 2016; Han et al., 2016; Sun et al., 2019).

I RECETTORI AMPA

L'interesse della ricerca si è rivolto verso i recettori AMPA permeabili al calcio, come possibili bersagli di strategie neuroprotettive nell'ischemia cerebrale, piuttosto che sui recettori NMDA in base a diverse considerazioni, incluso il fatto che l'antagonismo dei recettori NMDA è associato a effetti collaterali importanti, che l'antagonista dei recettori NMDA memantina (farmaco ben tollerato e approvato per la malattia di Alzheimer) ha dato scarsi risultati in sperimentazioni cliniche e che è ampiamente dimostrato come l'utilizzo di antagonisti dei recettori AMPA, quali perampanel, PNQX, EGIS-8332, GYKI, 53405, Naspn e ZK 187638, porti ad un effetto neuroprotettivo nel danno ischemico in diversi modelli in vitro e in modelli in vivo di ischemia globale o focale (Noh et al., 2005; Elger et al., 2006; Matucz et al., 2006; Montero et al., 2007; Nakajima et al., 2018; Sun et al., 2019; Guo & Ma, 2021).

Uno degli effetti provocati dall'ischemia riguarda l'aumento dei recettori AMPA permeabili al Ca^{2+} che, in condizioni fisiologiche, sono nettamente minoritari rispetto a quelli che ne sono impermeabili e permettono l'influsso di ioni Na^+ . In quest'ottica, molti studi hanno documentato che, nella regione CA1 dell'ippocampo, il danno neuronale, che in molti casi si manifesta in maniera ritardata, è dovuto ad una significativa riduzione nell'espressione della subunità GluA2 che, come visto in precedenza, è quella che conferisce ai recettori AMPA impermeabilità al Ca^{2+} (Pellegrini-Giampietro et al., 1992; Gorter et al., 1997; Liu et al., 2004, 2006; Quintana et al., 2015; Koszegi et al., 2017; Mazzocchetti et al., 2020; Guo & Ma, 2021). Inoltre, è stato dimostrato che l'ischemia globale aumenta l'espressione della proteina REST che, come abbiamo visto nel paragrafo 2.1.2, sopprime l'attività del promotore del gene che esprime la subunità GluA2, riducendone così la sua trascrizione; in effetti, è stato riportato che il knockdown di REST con specifici oligonucleotidi ha prevenuto la riduzione della subunità GluA2 e ha protetto i neuroni da morte cellulare in un modello di ischemia in vitro (Calderone et al., 2003; Guo & Ma, 2021).

Un altro effetto osservato in un modello in vivo di ischemia cerebrale globale è stata una riduzione significativa dell'espressione dell'enzima ADAR2 nei neuroni ippocampali dell'area CA1 (ma non negli interneuroni GABAergici o negli astrociti) che causa una diminuita efficienza dell'editing Q/R e, di conseguenza una maggior presenza di recettori AMPA permeabili al calcio; questo effetto è stato prevenuto mediante trasfezione con un gene esogeno per ADAR2b oppure con un gene costitutivamente attivo VP-16-CREB in grado di indurre l'espressione genica di ADAR2 endogena, proteggendo dall'ischemia i neuroni vulnerabili dell'ippocampo (Peng et al., 2006; Guo & Ma, 2021). Ad ulteriore prova del coinvolgimento di alterazioni del processo di editing Q/R nel danno neuronale ischemico, è stato dimostrato che il silenziamento genico di ADAR2 in vivo con siRNA (small interfering RNA) causa una mancata modifica della subunità GluA2 e porta alla degenerazione anche

dei neuroni ippocampali insensibili all'insulto ischemico che, però, possono essere protetti dall'introduzione diretta, sempre con tecniche genetiche, di subunità GluA2 correttamente editate (Peng et al., 2006; Guo & Ma, 2021).

Oltre agli effetti sopramenzionati, è stato anche riportato che l'ischemia cerebrale promuove l'internalizzazione dei recettori membranali AMPA contenenti subunità GluA2 e l'inserimento in membrana di recettori AMPA senza GluA2, attraverso un meccanismo che prevede l'attivazione della PKC, la dissociazione di GluA2 da ABP e l'associazione con PICK1 (vedi paragrafo 2.1.2) (Liu et al., 2006; Guo & Ma, 2021).

Infine, altri studi hanno documentato come, in seguito ad ischemia cerebrale sia in vitro che in vivo, a livello extracellulare si abbia interazione tra la subunità GluA2 e la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) con internalizzazione del complesso GluA2/GAPDH e attivazione di meccanismi di morte cellulare che, tuttavia, può essere evitata utilizzando un peptide in grado di interferire proprio con l'interazione tra la subunità del recettore AMPA e l'enzima (Wang et al., 2012; Zhai et al., 2013; Yongjun Sun et al., 2019).

I RECETTORI KAINATO

Diverse evidenze sperimentali riportate in letteratura indicano che la subunità GluK2 potrebbe svolgere un ruolo significativo nel contribuire alla morte neuronale indotta da ischemia, come dimostrato dalla riduzione della degenerazione neuronale causata da ischemia cerebrale globale in seguito a somministrazione di un oligonucleotide antisenso GluK2 o di un peptide di fusione contenente il peptide Tat e il peptide C-terminale della subunità GluK2 (Tat-GluK2-9c) in grado di interferire con l'interazione tra GluK2, PSD-95 (Postsynaptic Density protein 95) e MLK3 (Mixed-lineage protein kinase 3) (Pei et al., 2005, 2006; Guo & Ma, 2021). Altri studi suggeriscono che, oltre alla subunità GluK2, anche la subunità GluK4 è coinvolta nel danno ischemico; infatti, in topi knockout per la subunità GluK4, il danno neuronale nelle varie regioni dell'ippocampo, causato da uno stato di ipossia-ischemia era significativamente ridotto (Lowry et al., 2013; Guo & Ma, 2021). Al contrario, la stimolazione dei recettori kainato contenenti la subunità GluK1 con l'agonista selettivo ATPA ha mostrato un effetto neuroprotettivo contro la morte neuronale indotta da ischemia globale e riperfusione, mentre l'antagonista selettivo per la subunità GluK1, NS3763, o l'oligonucleotide antisenso GluK1 hanno avuto effetti opposti (Xu et al., 2008; Lv et al., 2012; Guo & Ma, 2021).

I RECETTORI METABOTROPI

I recettori metabotropi mGluR, come indicato precedentemente, sono costituiti da otto sottotipi recettoriali (mGluR1-8) suddivisi a loro volta in gruppo I (mGluR1-5), gruppo II (mGluR2-3) e infine gruppo III (mGluR4,6-8) in base all'omologia di struttura, al profilo farmacologico e alle vie di trasduzione del segnale. Di seguito sono riassunte le principali evidenze sperimentali del loro ruolo nell'ischemia cerebrale.

- Per quanto riguarda i recettori del gruppo I, numerosi studi hanno dimostrato effetti neuroprotettivi utilizzando antagonisti selettivi per il sottotipo mGluR1, come LY3673385, YM-202074, EMQMCM, CBPG, 3-MATIDA, BAY 36-7620 e AIDA, in modelli di ischemia in vivo, mentre questo effetto non si osservava in topi knockout per mGluR1 (Ferraguti et al., 1997; Bruno et al., 1999; Pellegrini-Giampietro et al., 1999a,b; De Vry et al., 2001; Cozzi et al., 2002; Meli et al., 2002; Moroni et al., 2002; Szydłowska et al., 2007; Murotomi et al., 2008; Kohara et al., 2008; Li et al., 2013; Guo & Ma et al., 2021). Dal punto di vista meccanicistico, sulla base di alcune evidenze sperimentali è stato ipotizzato che l'effetto neurotossico potrebbe essere mediato dalla calpaina che, troncando il dominio C-terminale del recettore mGluR1, fa perdere al recettore la capacità di attivare vie di segnalazioni neuroprotettive mediate da PI3K-Akt, mantenendo però la capacità di aumentare i livelli di calcio citosolico e contribuire ai fenomeni di eccitotossicità; in effetti la somministrazione di un peptide di fusione costituito dalla trasduzione del dominio della proteina Tat e della sequenza mGluR1 (Tat-mGluR1), in grado di bloccare la scissione del dominio C-terminale di mGluR1 mediata dalla calpaina, ha dimostrato effetti neuroprotettivi contro l'eccitotossicità sia in vitro sia in vivo, inclusa quella da ipossia/ischemia neonatale (Xu et al., 2007; Zhou et al., 2009; Guo & Ma et al., 2021).

A tutt'oggi, il ruolo del sottotipo mGluR5 nell'ischemia cerebrale non è stato ancora del tutto chiarito e ci sono dati discordanti in letteratura. Diversi studi hanno dimostrato che gli antagonisti selettivi del recettore mGluR5 MPEP o MTEP hanno effetti neuroprotettivi in modelli di ischemia cerebrale globale e focale, mentre in altri casi sarebbe la stimolazione del recettore mGluR5 con l'agonista selettivo CHPG a conferire protezione a cellule BV2 (linea cellulare di microglia) da ischemia in vitro (OGD), o a ridurre il volume di danno tissutale in un modello di ischemia focale in vivo ha dimostrato effetti protettivi contro lesioni cerebrali traumatiche o danni da ischemia cerebrale focale in vivo (Bao et al., 2001; Szydłowska et al., 2007; Takagi et al., 2010, 2012; Li et al., 2013; Ye et al., 2017; Guo & Ma, 2021). Infine, altri studi hanno osservato che il blocco del recettore mGluR5 con gli antagonisti MPEP o

MTEP o la stimolazione con l'agonista CGPG non avevano effetti neuroprotettivi contro il danno neuronale in seguito ad ischemia in vitro e in vivo (Meli et al., 2002; Riek-Burchardt et al., 2007; Makarewicz et al., 2015; Guo & Ma, 2021).

- Nel caso dei recettori del gruppo II, in letteratura è riportato l'effetto neuroprotettivo dell'agonista non selettivo per questo gruppo LY379268 nei confronti della morte neuronale indotta da NMDA in colture cellulari miste neuroni/astrociti, effetto che non si osservava in colture ottenute da topi knockout per i sottotipi mGluR3, mentre era maggiore nelle colture ottenute da topi knockout per i sottotipi mGluR2, suggerendo che la stimolazione dei primi sia in grado di proteggere le cellule dalla morte che, invece, è mediata dai secondi (Corti et al., 2007; Guo & Ma, 2021). In linea con questi risultati, altri studi hanno dimostrato che il trattamento con ADX92639, un modulatore allosterico negativo (NAM) selettivo del recettore mGluR2, risultava altamente neuroprotettivo mentre la somministrazione del modulatore allosterico positivo LY487379 aumentava il danno neuronale a livello dell'ippocampo nel modello sperimentale di ischemia globale transitoria 4VO; inoltre, il knockout genico dei recettori mGluR2 ha ridotto il danno cerebrale e la disabilità neurologica in due modelli di ischemia focale transitoria in vivo (Motolese et al., 2015; Mastroiacovo et al., 2017; Guo & Ma, 2021).
- I dati ottenuti per i recettori del gruppo III (mGluR4,6-8) sembrano indicare che la loro attivazione può essere terapeuticamente utile per la neuroprotezione negli eventi ischemici, anche se un primo studio con l'agonista selettivo per il gruppo III (R,S)-4-fosfonofenilglicina, non aveva mostrato effetti significativi sul danno neuronale in modelli di ischemia sia focale che globale (Henrich-Noack et al., 2000; Guo & Ma, 2021). Tuttavia, ricerche successive hanno dimostrato effetti neuroprotettivi dell'agonista del gruppo III ACPT-I, del modulatore allosterico positivo dei recettori mGluR4 PHCC o della loro delezione genica, e dell'agonista allosterico dei recettori mGluR7 AMN082 in diversi modelli di ischemia in vitro ed in vivo (Moyanova et al., 2011; Domin et al., 2014,2015,2018; Guo & Ma, 2021).

3.2 Conseguenze dell'eccitotossicità glutammatergica

L'esposizione di neuroni e di cellule gliali ad alti livelli di glutammato extracellulare durante un evento ischemico porta ad un massiccio ingresso di ioni Ca^{2+} nelle cellule, a livello sia della materia bianca che di quella grigia, che innesca l'attivazione di meccanismi molecolari neurotossici, tra cui ricordiamo la sovrastimolazione di enzimi quali proteasi, fosfolipasi, fosfatasi ed endonucleasi, danno

mitocondriale, stress ossidativo e nitrosativo, frammentazione del DNA che, in ultimo, culminano in una morte cellulare necrotica o apoptotica (Lai et al., 2014; Kirdajova et al., 2020; Plotegher et al., 2021).

Nelle prime fasi dell'ischemia si verifica la formazione di un edema citotossico in seguito all'accumulo di ioni a livello intracellulare che causa poi ingresso di acqua dallo spazio extracellulare; successivamente si ha la formazione di un ulteriore edema ionico come risultato della diminuzione della concentrazione di ioni e dei livelli di acqua nello spazio extracellulare, che porta ad un flusso di ioni e dell'equivalente osmotico di acqua dai capillari. Infine, non dobbiamo dimenticare la formazione di edema vasogenico che si osserva in conseguenza di alterazioni della barriera ematoencefalica, con afflusso di acqua e macromolecole dal torrente circolatorio allo spazio extracellulare del tessuto cerebrale e che, di solito, si manifesta nelle fasi più avanzate dell'ischemia cerebrale (Kirdajova et al., 2020).

L'abnorme rilascio di glutammato causato dall'ischemia che, come affrontato nei capitoli precedenti, non è esclusivamente neuronale ma origina anche da assoni e cellule gliali, stimola in maniera eccessiva i propri recettori ionotropi e metabotropi localizzati a livello delle cellule nervose ma anche sulle cellule gliali nella materia grigia e bianca (Ceprian & Fulton, 2019; Cuellar-Santoyo et al., 2023). Negli astrociti i recettori NMDA, che secondo alcuni studi funzionali sembrano coinvolti principalmente della comunicazione neurone-astrocita e presentano una composizione tri-eteromera contenente le subunità GluN1, GluN2C/D e GluN3, aumentano la loro espressione in seguito a un insulto ischemico (Gottlieb & Matute, 1997; Shelton & McCarty, 1999; Krebs et al., 2003; Lalo et al., 2006, Serrano et al., 2008; Palygin et al., 2011; Kirdajova et al., 2020). Tuttavia, quale possa essere il loro ruolo nel danno ischemico non è ancora chiaro. Per quanto riguarda i recettori AMPA astrocitari, questi sono presenti nella maggior parte delle regioni nel SNC con una composizione in subunità che è diversa nelle diverse regioni cerebrali e che, quindi, porta ad una diversa distribuzione dei recettori AMPA permeabili ed impermeabili al calcio; tuttavia gli astrociti con recettori AMPA non sembrano vulnerabili al danno eccitotossico data la loro bassa permeabilità al calcio, un dato in linea con l'osservazione di una netta prevalenza della subunità GluA2 nei recettori AMPA in astrociti corticali ed ippocampali (Ceprian & Fulton, 2019) portando di conseguenza ad una variabilità alla permeabilità al Ca^{2+} . I recettori astrocitari AMPA non sembrerebbero risentire a condizioni patologiche associate all'eccitotossicità glutammatergica a causa della loro bassa permeabilità al calcio. Questi risultati e similari osservazione sulla resistenza degli astrociti sono supportati da dati di RNA-seq, che mostrano come il dominio di GluA2 inibisce la permeabilità al Ca^{2+} sia a livello corticale che negli astrociti ippocampali in situ (Rothman, 1984; Li & Stys, 2000; Mölders et al., 2018; Kirdajova et al. 2020).

Gli oligodendrociti sono noti per essere estremamente sensibili alle condizioni di deprivazione di ossigeno e glucosio indotte dall'ischemia che, analogamente a quanto avviene nei neuroni, causa eccitotossicità per eccessiva attivazione dei diversi recettori glutammatergici e abnorme ingresso di calcio che porta, di conseguenza, a morte degli oligodendrociti con danno sia nella sostanza grigia sia in quella bianca; in particolare, gli oligodendrociti possiedono recettori AMPA particolarmente permeabili al calcio e recettori NMDA solo debolmente bloccati dal Mg^{2+} (Káradóttir et al., 2005; Káradóttir & Attwell, 2007; Ransom & Baltan, 2009; Matute, 2011; Kirdajova et al., 2020). Infatti, è stato dimostrato come la sovrastimolazione di recettori AMPA, kainato e NMDA causa morte degli oligodendrociti e danno alla mielina, effetti che possono essere bloccati da antagonisti di questi recettori come CNQX, NBQX, D-AP5, MK-801 o memantina (McDonald et al., 1998; Alberdi et al., 2002; Salter & Fern, 2005; Micu et al., 2006, 2007; Sánchez-Gómez et al., 2011; Kirdajova et al., 2020). Sensibili al danno da OGD risultano anche i precursori degli oligodendrociti e gli oligodendrociti immaturi, attraverso meccanismi dovuti all'ingresso di calcio attraverso recettori AMPA/kainato (Fern & Moller, 2000; Kirdajova et al., 2020).

Le cellule di microglia esprimono tutti i tipi di recettori del glutammato, sia ionotropi sia metabotropi che possono avere effetti neurotossici o neuroprotettivi. Infatti, l'attivazione di quelli ionotropi causa un aumento del rilascio di fattori pro-infiammatori quali $TNF\alpha$, IL-1 e NO o, come nel caso dei recettori AMPA la cui espressione aumenta nella materia bianca in condizioni ipossiche, sensitizza le cellule di microglia al glutammato provocando la riduzione del rilascio del fattore neuroprotettivo IGF-1 e l'aumento del rilascio di $TNF\alpha$ e IL-1 β (Noda et al., 2000; Sivakumar et al., 2010; Murugan et al., 2011; Kirdajova et al., 2020). Per quanto riguarda i recettori metabotropi del glutammato, è stato riportato che le cellule di microglia esprimono diversi sottotipi (mGluR2-6 e 8) che regolano la loro trasformazione in fenotipo neurotossico o neuroprotettivo (ad es., recettori gruppo II vs recettori gruppo III) (Pocock & Kettenmann, 2007; Kirdajova et al., 2020); tuttavia, quale sia il loro ruolo in condizioni ischemiche non è ben chiaro.

Un importante contributo al danno eccitotossico e, di conseguenza, alla morte neuronale lo svolge lo stress ossidativo, una condizione in cui la produzione di radicali liberi supera le capacità delle difese antiossidanti di mantenerne i livelli di concentrazione al di sotto della soglia di tossicità attraverso diversi enzimi, quali la superossido dismutasi, la catalasi e il sistema antiossidante del glutatione e della tioredossina (Kudin et al., 2012; Kirdajova et al., 2020). I radicali liberi sono una qualsiasi specie chimica che possiede uno o più elettroni spaiati e quelli più comunemente prodotti in seguito a fenomeni di eccitotossicità glutammatergica sono molecole derivate dall'ossigeno (O_2) e dal monossido d'azoto (NO), che fanno parte, rispettivamente, delle specie reattive dell'ossigeno o ROS (radicale superossido, radicale idrossile e perossido di idrogeno) e delle specie reattive dell'azoto o

RNS (NO, perossinitrito, diossido d'azoto) (Coob & Cole, 2015); essendo specie chimiche particolarmente reattive, possono reagire con le macromolecole cellulari causando diversi tipi di danni a proteine, lipidi e DNA che contribuiscono alla morte cellulare (Sugawara et al., 2002; Kalogeris et al., 2014; Kirdajova et al., 2020). Sebbene sia neuroni che cellule gliali posseggano sistemi antiossidanti, gli astrociti sono le cellule del SNC che possiedono maggiori capacità di difesa contro lo stress ossidativo, con i più alti livelli di glutazione che ne determina la capacità di detossificare grandi quantità di ROS e RNS; inoltre, gli astrociti possiedono una maggiore espressione di Nrf2 che va a sovraregolare geni antiossidanti (glutazione reduttasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi, transchetolasi, transaldolasi etc.), rilasciano un fattore che induce l'attività di Nrf2 e di eme-ossigenasi 1 (HO-1) nella microglia, riportandola nello stato di riposo e riducendo così l'infiammazione, e producono molecole scavenger per i ROS prodotti nell'ischemia, come la metallotioneina-II, andando così ad aumentare la neuroprotezione. Tutti questi fattori antiossidanti che vengono espressi sopprimono ROS e RNS tornando così ad uno stato di equilibrio. Gli astrociti proteggono anche il cervello dallo stress ossidativo, associato all'ischemia, producendo scavenger contro i ROS come la metallotioneina-II (Trendelenburg et al., 2002; Lee et al., 2003; Shih et al., 2003; Min et al., 2006; Sun et al., 2006; Waller et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

Gli oligodendrociti sono meno vulnerabili allo stress ossidativo rispetto ai neuroni ma comunque più vulnerabili di altre cellule gliali, probabilmente in funzione del fatto che hanno più alti livelli di ferro legato a proteine, che potrebbe aumentare la produzione di radicali ossidrilici catalizzando la conversione del perossido di idrogeno attraverso la reazione di Fenton, hanno meno della metà del contenuto di glutazione rispetto agli astrociti, per cui potrebbero avere una capacità detossificante del perossido di idrogeno meno efficace a causa di una minore attività del glutazione perossidasi, e hanno anche un'elevata attività metabolica con una maggiore generazione di ROS (Husain & Juurlink, 1995; Connor & Menzies, 1996; Juurlink et al., 1998; Mifsud et al., 2014; Kirdajova et al., 2020). A questo si aggiunge una riduzione di oligodendrociti maturi in quanto è stato riportato che lo stress ossidativo riduce l'espressione di geni che promuovono la differenziazione di queste cellule mentre aumenta l'espressione di geni che la inibiscono; inoltre, le cellule precursori degli oligodendrociti sono ancora più sensibili allo stress ossidativo e questo sembrerebbe essere dovuto ad una sovraregolazione dei recettori AMPA e a un aumento transitorio dell'espressione del trasportatore EAAT2 del glutammato (Itoh et al., 2002; Desilva et al., 2007; French et al., 2009; Kirdajova et al., 2020).

In aggiunta allo stress ossidativo, l'eccitotossicità glutammatergica indotta dall'ischemia si traduce anche in disfunzione mitocondriale causata da danni alle proteine mitocondriali, alle membrane e al DNA, compromettendo così la capacità dei mitocondri di sintetizzare ATP e svolgere le loro molteplici funzioni metaboliche; inoltre, la depolarizzazione della membrana mitocondriale

contribuisce ulteriormente a ridurre la produzione di ATP ed aumentare quella di ROS, mentre il sovraccarico di Ca^{2+} porta all'apertura di pori di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP) presenti sulla membrana, provocando il rilascio di fattori pro-apoptotici, come AIF, citocromo C e Smac/Diablo che partecipano all'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi (Lazarou et al., 2015; Rama & García, 2016; Yang et al., 2018). In risposta a questi insulti, le cellule mettono in atto meccanismi di riparazione dei mitocondri danneggiati, ad esempio attraverso la fusione con mitocondri sani, o la loro eliminazione mediante mitofagia; in aggiunta a questi meccanismi, è stato osservato che i neuroni possono rilasciare mitocondri che sono internalizzati e degradati da astrociti adiacenti, così come gli astrociti, in seguito ad ischemia focale transitoria, rilasciano mitocondri per i neuroni con un processo calcio-dipendente che, se bloccato, porta ad un peggioramento del quadro neurologico in un modello di ischemia sperimentale focale transitoria in vivo, indicando un effetto neuroprotettivo di questo fenomeno di scambio transcellulare neurogiale (Davis et al., 2014; Hayakawa et al., 2016; Kirdajova et al., 2020).

3.3 MORTE CELLULARE

La morte cellulare può avvenire secondo molteplici meccanismi quali la necrosi, l'apoptosi, l'autofagia e necrosi regolata (necroptosi, ferroptosi, piroptosi e parthanatos) a seconda dell'esordio e della gravità dell'evento ischemico (Kroemer et al., 2009; Fricker et al., 2018; Chen et al., 2022; Mao et al., 2022).

La necrosi è un meccanismo non regolato di morte cellulare che si verifica principalmente nel core ischemico e nell'arco di minuti a causa di un grave deficit o totale assenza di ossigeno e glucosio e che vede un iniziale rigonfiamento della cellule e dei mitocondri, picnosi, carioressi e cariolisi a livello nucleare, degradazione degli organelli e del citoscheletro, e finale rottura della membrana e lisi cellulare con rilascio del contenuto nello spazio extracellulare e induzione di infiammazione secondaria. Al contrario, l'apoptosi è un processo di morte regolata che necessita di un certo livello di energia, che avviene nella penombra ischemica dove i livelli di ossigeno e glucosio rimangono tali da permettere di mantenere una sufficiente funzionalità delle cellule, che si sviluppa da ore a giorni dopo l'evento ischemico e che, dal punto di vista morfologico, vede in una prima fase la cellula contrarsi, la cromatina condensarsi lungo la membrana nucleare ed il nucleo frammentarsi in diverse parti avvolte dalla membrana nucleare; successivamente, i frammenti nucleari e gli organelli cellulari vengono confinati in protrusioni della membrana plasmatica che si saldano e formano i "corpi apoptotici" che vengono fagocitati da altre cellule.

Tuttavia, la suddivisione tra morte cellulare con meccanismo di necrosi nel core ischemico e con meccanismo apoptotico nella penombra ischemica non è rigorosa in quanto la morte apoptotica è stata dimostrata anche nel core ischemico così come la morte necrotica è stata osservata nella penombra (Onténiente et al., 2003; Kirdajova et al., 2020).

Come è noto, l'apoptosi può essere innescata da due vie differenti conosciute come la via estrinseca, mediata dall'attivazione dei cosiddetti recettori della morte, come TNFR, CD95/Fas o TRAIL espressi sulle membrane cellulare, e la via intrinseca attivata da danno mitocondriale indotto da diversi tipi di insulti, compresi lo stress ossidativo e/o l'eccessiva concentrazione di Ca^{2+} citosolico. Nel primo caso, la stimolazione dei recettori della morte porta, attraverso la formazione di complessi proteici di segnalazione intracellulare, all'attivazione di caspasi iniziatrici (ad es., caspasi-8) che, a loro volta, causano la morte apoptotica innescando direttamente caspasi effettrici (ad es., caspasi 3) e/o indirettamente attivando, per mezzo delle proteine BH3-only, proteine pro-apoptotiche (ad es., Bid) e, quindi, la via mitocondriale (Gupta et al., 2003; Kirdajova et al., 2020). Nel secondo caso, invece, l'attivazione della via intrinseca vede giocare un ruolo chiave da parte di alterazioni mitocondriali con rilascio del citocromo C in seguito alla formazione di pori nella membrana mitocondriale esterna indotti da un aumento dell'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bax, Bak e BAD rispetto a proteine anti-apoptotiche, quali Bcl2, Bcl-XL e Mcl-1 (Doyle et al., 2008; Uzdensky, 2019; Kirdajova et al., 2020). Il citocromo C rilasciato nel citosol, a sua volta si lega al fattore di attivazione della proteasi apoptotica-1 (Apaf-1), che oligomerizza inducendo così il legame e l'autoattivazione della pro-caspasi 9 in un complesso multimerico chiamato apoptosoma; la caspasi-9 attivata, a sua volta attiva le caspasi effettrici 3 e 7 che inducono la morte per apoptosi (Niizuma et al., 2010; Kirdajova et al., 2020). Oltre ad una morte apoptotica mediata da caspasi, bisogna ricordare che l'apoptosi può essere innescata anche da meccanismi caspasi-indipendenti, come nel caso del fattore di induzione dell'apoptosi (AIF) che, rilasciato dai pori mPTP che si aprono nei mitocondri, trasloca nel nucleo dove provoca una frammentazione del DNA su larga scala (Broughton et al., 2009; Kirdajova et al., 2020).

I neuroni e gli oligodendrociti sono gli elementi cellulari più sensibili e vengono danneggiati nelle fasi iniziali di un evento ischemico o successivamente vanno incontro ad una morte cellulare ritardata mentre, al contrario, le cellule di microglia e gli astrociti sono meno vulnerabili ad uno stato di ipossia-ipoglicemia (Lyons & Kettenmann, 1998; Kirdajova et al. 2020). Inizialmente, è stato ipotizzato come, nei neuroni, l'ictus provochi principalmente una morte apoptotica mediata dall'attivazione della caspasi, ma recenti studi hanno rilevato che l'apoptosi è molto diffusa anche nelle cellule non neuronali e che anche meccanismi indipendenti dalle caspasi hanno un ruolo principale nella loro morte, come osservato in modelli di ischemia in vivo ed in colture cellulari

sottoposte ad ipossia, nonché in cellule gliali NG2 positive che producono una proteina proapoptotica della famiglia Bcl-2 denominata BNIP3 (Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3) in grado di indurre una maggiore mitofagia e morte cellulare simile all'autofagia; in effetti, rispetto ad altre cellule gliali (astrociti, microglia e oligodendrociti mielinizzati), questo tipo di cellule forse sono più vulnerabili all'insulto ischemico e questo potrebbe rappresentare un fattore cruciale nei processi di demielinizzazione assonale e morte neuronale (Li et al., 2013; Uzdensky, 2019; Kirdajova et al. 2020).

Nell'apoptosi astrocitaria è stato dimostrato che l'espressione della proteina PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), che fa parte della famiglia Bcl2 e che è richiesta per forme di apoptosi dipendenti e indipendenti da p53, è aumentata durante l'ischemia e la sua riduzione può proteggere gli astrociti dall'apoptosi e ridurre la vulnerabilità dei neuroni all'insulto ischemico (Ouyang et al., 2013; Chen et al., 2015; Kirdajova et al. 2020). È stato anche riportato che l'apoptosi negli astrociti è inibita in topi knockout per i canali TRPC3/6/7 (transient receptor potential cation channel) sottoposti ad ischemia, un effetto che potrebbe essere dovuto alla riduzione della fosforilazione del fattore nucleare kB (NFkB) pro-apoptico e a una riduzione dell'espressione di proteine pro-apoptiche della famiglia Bcl2 come Bax (Chen et al., 2017; Kirdajova et al., 2020).

Nel caso delle cellule della microglia, quando queste sono attivate in seguito ad un evento ischemico attraverso il recettore Toll-like 4, viene attivata la via NFkB che porta all'espressione e al rilascio di citochine pro-infiammatorie, come IL-6 e TNF α , aggravando così ulteriormente il danno neuronale e l'apoptosi; in modo simile, la proteina Hsp70 (heat shock protein 70), che si trova nella microglia ma anche in altri tipi cellulari e la cui espressione aumenta dopo un evento ischemico, è in grado di attivare citochine pro-infiammatorie, ma può anche avere effetto neuroprotettivo riducendo l'espressione della dinamina che è responsabile della traslocazione del recettore della morte Fas sulla superficie cellulare, inducendo l'apoptosi (Zhao S. C. et al., 2017; Gülke et al., 2018; Kirdajova et al., 2020).

L'apoptosi caspasi-dipendente è un meccanismo di morte che colpisce anche gli oligodendrociti, come dimostrato in modelli di ischemia cerebrale focale permanente in cui si è osservato una riduzione del danno in oligodendrociti con sovraespressione dell'inibitore delle caspasi p53 (Shibata et al., 2000; Kirdajova et al., 2020).

4. POSSIBILI APPROCCI TERAPEUTICI

Attualmente, l'approccio terapeutico a seguito di un ictus dipende dal tipo di evento in quanto possiamo avere l'ictus emorragico o l'ictus ischemico; infatti, nel primo caso si richiede l'interruzione immediata del sanguinamento, mentre, nel secondo caso l'intervento richiede un rapido ripristino del flusso sanguigno, e questo necessita sicuramente di una diagnosi corretta, al fine di non aggravare ulteriormente il danno a livello cerebrale. Una volta diagnosticato l'ictus ischemico, che si tratta di un evento ischemico, l'intervento mira alla riperfusione del tratto occluso attraverso l'utilizzo di farmaci trombolitici oppure attraverso una trombectomia meccanica (Dong et al., 2020; Kaplan-Arabaci et al., 2022). Nel caso di intervento farmacologico, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA o alteplase), prodotto con tecnica del DNA ricombinante, è l'unico farmaco trombolitico approvato oggi nel trattamento dell'ictus ischemico, in grado di idrolizzare il legame peptidico tra arginina e valina attivando in questo modo il plasminogeno in plasmina, che deve essere somministrato per via endovenosa entro 3 ore a partire dall'inizio dei sintomi o, se applicato direttamente nell'area interessata, entro le 4,5 ore dall'evento ischemico (Lijnen & Collen, 1988; Kaplan-Arabaci et al., 2022) (Kwiatkowski et al., 1999; Hacke et al., 2008; Bansal et al., 2013; Powers et al., 2019; Kaplan-Arabaci et al., 2022).

La trombectomia meccanica è una procedura minimamente invasiva che prevede la rimozione del coagulo dall'arteria del paziente utilizzando un microcatetere e rappresenta l'unica strategia che può essere applicata, comunque entro le prime otto ore, se la dimensione del coagulo è troppo grande per la trombolisi farmacologica o il tempo necessario per la somministrazione di tPA è ormai superato; è stato riportato che questo tipo di intervento ha raddoppiato il tasso di sopravvivenza e ha diminuito il grado di disabilità in pazienti con ictus ischemico (Smith et al., 2008; Jovin et al., 2015; Kaplan-Arabaci et al., 2022).

Un trattamento neuroprotettivo volto a ridurre quello che è il danno eccitotossico, in un evento ischemico, potrebbe essere diretto a molteplici punti della lunga catena di eventi che si succedono, dall'accumulo di glutammato a livello extracellulare all'attivazione a valle delle vie che regolano i processi di morte cellulare. Intervenire sui processi a monte che inducono il danno ischemico ha sicuramente il vantaggio di bloccare/ridurre quei segnali che attivano poi tutti i diversi meccanismi che a valle causano morte, ma richiede un intervento precoce che potrebbe risultare problematico in termini di possibili effetti collaterali ma anche di interferenza con meccanismi a valle che, invece, potrebbero contrastare il danno cellulare; d'altra parte, bersagliare farmacologicamente i meccanismi a valle ha il vantaggio di poter avere una finestra terapeutica temporalmente più ampia, maggiore specificità e minori effetti collaterali, ma rischia di avere un'efficacia minore se non si bloccano tutte

le vie di segnale che, una volta attivate, sono in grado di indurre morte cellulare in maniera indipendente una dall'altra (Choi, 2020).

Considerando il fatto che i diversi tipi recettoriali contribuiscono al danno ischemico in fase acuta, si potrebbe adottare una strategia attraverso la quale si utilizzano diversi antagonisti per migliorare l'effetto neuroprotettivo. Diversi studi preclinici hanno riportato che l'intervento combinato con antagonisti selettivi dei recettori NMDA (ad es., MK-801) e AMPA (ad es., NBQX e CNQX) o dei recettori NMDA (MK-801) e metabotropi (AP3) potrebbe portare ad un effetto protettivo additivo in modelli di ischemia in vitro o in vivo, ma potrebbe avere un impatto eccessivo sulla neurotrasmissione e sulle funzioni fisiologiche, rendendo difficile la traslazione di questa strategia farmacologica in ambito clinico (Mosinger et al., 1991; Lippert et al., 1994; McManigle et al., 1994; Virgili et al., 1995; Zagrean et al., 2014; Sun et al., 2019). Nella fase post-acuta dell'ischemia, il ruolo principale dei recettori del glutammato potrebbe essere anche quello di stimolare la sopravvivenza neuronale e, quindi, si potrebbe anche pensare di intervenire con una strategia farmacologica che blocca l'attivazione di meccanismi citotossici e stimola, o comunque non interferisce, con i diversi meccanismi che inducono la sopravvivenza neuronale; in effetti, considerando gli effetti pro-sopravvivenza indotti dalla stimolazione dei recettori NMDA contenenti la subunità GluN2A e dei recettori metabotropi del gruppo II e III del glutammato, gli agonisti di questi recettori potrebbero rivelarsi possibili farmaci da utilizzare nella fase post-acuta dell'ischemia (Domin et al., 2016; Wang et al., 2017; Sun et al., 2019; Domin, 2022). Un'altra strategia che potrebbe avere efficacia terapeutica consiste nel bloccare/ridurre i meccanismi a valle responsabili della morte cellulare, come dimostrato in uno studio in cui la somministrazione di inibitori dell'istone deacetilasi 2, nei 5-7 giorni successivi all'evento ischemico, ha favorito il recupero delle funzioni motorie, senza però ridurre il danno tissutale (Lin et al., 2017; Sun et al., 2019).

4.1 STRATEGIE DI NEUROPROTEZIONE

Sicuramente si può affermare che l'eccitotossicità ha rappresentato uno degli obiettivi primari delle strategie di neuroprotezione a causa dei suoi effetti precoci nella cascata ischemica che inducono danno cerebrale (Davis et al., 2000; Katz et al., 2022).

Al fine di ridurre l'elevata concentrazione di glutammato nello spazio extracellulare sono state proposte strategie "scavenging" utilizzando molecole in grado di eliminare l'amminoacido eccitatorio trasformandolo in altri metaboliti. La strategia scavenging del glutammato a livello sistemico si basa sulla sua conversione, in presenza di ossalacetato, ad α -chetoglutarato e aspartato da parte dell'enzima glutammato-ossalacetato transaminasi (GOT) presente nel sistema circolatorio, anche noto con il nome di aspartato aminotransferasi (AST), e che necessita del cofattore piridossal-5-fosfato (P5P)

(Westerhuis & Hafkenschied, 1983; Tutor-Crespo et al., 2004; Campos et al., 2012; Kaplan-Arabaci et al., 2022). Inoltre, ricordiamo anche la glutammato-piruvato transaminasi (GPT), nota anche con il nome di alanina aminotransferasi (ALT) che catalizza la reazione di trasformazione del glutammato, in presenza di piruvato, in alanina e α -chetoglutarato. Il vantaggio principale di questa strategia con scavenger è che agiscono nel sangue e riducono il glutammato nelle regioni cerebrali che ne hanno un alto contenuto, mentre le regioni con livelli normali di glutammato non risentono di questo meccanismo, portando quindi a minori effetti collaterali (Kaplan-Arabaci et al., 2022). Basandosi sul meccanismo di scavenging sistemico, in un primo studio è stato effettivamente dimostrato che la somministrazione di piruvato e ossalacetato era in grado di ridurre i livelli di glutammato nel torrente circolatorio, nel liquido cerebrospinale e nel cervello, livelli che erano stati aumentati in seguito alla somministrazione dell'amminoacido per via intracerebroventricolare; studi successivi hanno riportato che la somministrazione periferica di GOT e GPT, con o senza ossalacetato e piruvato, causava una diminuzione significativa dei livelli di glutammato nel sangue (Gottlieb et al., 2003; Zlotnik et al., 2007; Boyko et al., 2012a,b; Kaplan-Arabaci et al., 2022). È interessante notare che analisi del trascrittoma e di qPCR hanno evidenziato livelli maggiori di GOT nel modello di ictus ischemico con MCAO in ratti trattati con ossigeno e che l'aumento di GOT, mediante terapia genica, riduceva notevolmente il danno ischemico che veniva, invece esacerbato, dal knockdown genico dell'enzima (Rink et al., 2010, 2011; Kaplan-Arabaci et al., 2022). Ulteriori studi hanno riportato che tra pazienti con ictus ischemico, quelli con più ampio danno cerebrale grave mostravano livelli ematici di glutammato maggiori e livelli di GOT inferiori e che la singola somministrazione di un bioconiugato ricombinante umano di glutammato-ossalacetato transaminasi (hrGOT) ha portato ad una drastica diminuzione dei livelli di glutammato nel sangue per circa una settimana, alla diminuzione del volume infartuale e al miglioramento delle funzioni sensomotorie in ratti sottoposti a ischemia focale transitoria con MCAO, indicando che l'attività di scavenging del glutammato nel sangue è un'efficace tecnica per la neuroprotezione nell'ictus (Zaghmi et al., 2020; Kaplan-Arabaci et al., 2022).

Sempre in quest'ottica, numerose sono le evidenze di effetti neuroprotettivi in seguito alla somministrazione di ossalacetato e piruvato. Ad esempio, utilizzando diversi modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale e globale, è stato dimostrato che l'ossalacetato riduce i livelli di glutammato nel sangue e nel cervello, riduce il danno del tessuto cerebrale, protegge i fenomeni di plasticità sinaptica ippocampali e le risposte evocate somatosensoriali (Marosi et al., 2009; Nagy et al., 2009; Teichberg et al., 2009; Campos et al., 2011a, 2012; Knapp et al., 2015; Castillo et al., 2016; Kaplan-Arabaci et al., 2022).

Il ruolo di scavenging del glutammato e l'attività neuroprotettiva del piruvato e di suoi derivati, come l'etil-piruvato, sono stati documentati in diversi modelli sperimentali di danno cerebrale, inclusa l'ischemia (Lee et al., 2001; Kim et al., 2005; Yi et al., 2007; Zlotnik et al., 2008; Boyko et al., 2011; Kaplan-Arabaci et al., 2022). Tuttavia, il piruvato potrebbe avere anche altri meccanismi attraverso i quali potrebbe esercitare effetti neuroprotettivi. Infatti, a concentrazioni millimolari, il piruvato si è dimostrato in grado di ridurre in vitro la neurotossicità dello ione Zn^{2+} , un altro ione coinvolto nei fenomeni di morte cellulare anche in seguito ad ischemia; questo effetto neuroprotettivo potrebbe essere dovuto al fatto che il piruvato è in grado di chelare lo zinco intracellulare, ha effetti positivi sui depositi cellulari di NAD^+ e ATP e ha anche effetti antiinfiammatori (Sheline et al., 2000; Wang, 2009; Sul et al., 2016; Choi, 2020). Effettivamente, è stato riportato che alte dosi di piruvato (500 mg/kg) bloccano la morte selettiva dei neuroni nell'ippocampo in un modello di ischemia globale, mentre il trattamento ritardato con dosi più basse (62,5-125 mg/kg) riduce il danno tissutale nel modello di ischemia focale con MCAO; infine, la somministrazione cronica di piruvato, alle dosi di 22-44 g/al giorno per 4 settimane, non ha mostrato particolari effetti collaterali, ad eccezione di fenomeni di diarrea, risultando quindi ben tollerata nella dieta dei pazienti (Stanko et al., 1994; Lee et al., 2001; Yi et al., 2007; Choi, 2020).

Per quanto riguarda le strategie farmacologiche di neuroprotezione a valle dell'aumento del glutammato, inizialmente queste si sono rivolte verso il blocco dell'attivazione dei recettori NMDA con antagonisti selettivi che avevano mostrato un'ottima efficacia negli studi preclinici; tuttavia, uno studio di fase 3 con il selfotel, un antagonista competitivo del recettore NMDA, ha rivelato importanti effetti avversi, incluse allucinazioni, alterazione dello stato mentale e anche un aumento della mortalità; in effetti, una successiva analisi retrospettiva di sperimentazioni con antagonisti NMDA ha indicato che, sebbene il blocco dell'eccessiva attivazione di questi recettori porti ad un effetto neuroprotettivo, impedirne le normali funzioni fisiologiche causa molteplici effetti indesiderati anche gravi (Morris et al., 1999; Lipton, 2006; Kats et al., 2022).

La Memantina è il prototipo di antagonista NMDA uso-dipendente a bassa affinità con ridotti effetti collaterali, approvato nel 2003 per il trattamento del deficit cognitivo in pazienti affetti da malattia di Alzheimer, che a basse dosi, è in grado di bloccare efficacemente i recettori NMDA eccessivamente attivati, soprattutto quelli localizzati a livello extrasinaptico, non interferendo in maniera significativa con quelli che mediano segnali fisiologici (Morris et al., 1999; Lipton, 2004; Xia et al., 2010; Katz et al., 2022). Questo farmaco si è dimostrato neuroprotettivo nei confronti dell'eccitotossicità indotta da NMDA in diversi studi in cui sono stati utilizzati diversi modelli preclinici in vitro, come colture di neuroni corticali, cerebellari, ippocampali o di cellule gangliari retiniche, e in vivo, come il modello di ischemia focale transitoria MCAO dove ha ridotto la permeabilità della barriera ematoencefalica,

l'edema cerebrale e l'area di danno tissutale (Erdo & Schafer, 1991; Chen et al., 1992; Gorgulu et al., 2000; Volbracht et al., 2006; Chen et al., 2017; Choi, 2020; Katz et al., 2022). Inoltre, la memantina ha anche dimostrato effetti benefici in pazienti con trauma cranico moderato o con ictus, sebbene siano necessari ulteriori studi clinici per determinarne l'efficacia (Pichardo-Rojas et al., 2023).

Un'altra strategia terapeutica è quella di utilizzare come fattore neuroprotettivo il magnesio che, come abbiamo visto, è il catione endogeno che blocca il canale del recettore NMDA in maniera voltaggio-dipendente, modulandone l'attivazione e l'influsso di calcio.

Sperimentazioni precliniche condotte in modelli animali hanno dimostrato una significativa riduzione dell'attività glutammatergica e una riduzione del danno cerebrale (McDonald et al., 1990; Lin et al., 2002; Katz et al., 2022). Al contrario, in uno studio randomizzato (IMAGES, Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke) su 2589 pazienti, che entro 12 ore dall'evento ischemico, avevano ricevuto infusione di magnesio per 24 ore, non si sono osservati cambiamenti significativi in termini di morte o di invalidità, ma l'analisi di sottogruppi di pazienti ha mostrato effetti significativi nei casi di ictus in cui non era coinvolta la corteccia cerebrale; risultati negativi si sono avuti anche nello studio FAST-Mag dove non si è osservato miglioramento della sopravvivenza o dello stato funzionale quando il magnesio è stato somministrato entro le 2 ore dall'insorgenza dell'evento ischemico in 1700 pazienti o nello studio MAGIC dove il magnesio è stato somministrato in pazienti in arresto cardiaco, anche se in alcuni di essi si è dimostrata una ridotta disabilità e una migliore indipendenza funzionale (Thel et al., 1997; Muir et al., 2004; Saver et al., 2015; Katz et al., 2022). Complessivamente, sembra che ci siano prove tra loro contrastanti su quello che effettivamente è l'utilizzo di magnesio come agente neuroprotettivo.

Oltre ai recettori NMDA, oggi è ormai chiaro come i recettori AMPA svolgano un ruolo altrettanto importante nei meccanismi di eccitotossicità, in particolar modo negli stati ischemici in cui questi recettori diventano permeabili al Ca^{2+} e la crescente acidità dell'ambiente extracellulare potrebbe limitare l'attività dei recettori NMDA (Giffard et al., 1990; Buchan et al., 1993; Katz et al., 2022). In effetti, antagonisti dei recettori AMPA, come talampanel, YM872, EGIS 8332, ZK 200775 e GYKI53505, hanno mostrato di poter attenuare il danno cellulare in pazienti che hanno subito un'ischemia cerebrale focale o globale; tuttavia, queste molecole presentano diverse problematiche importanti (ad esempio scarsa solubilità, breve emivita e cristallizzazione a livello renale) che possono limitarne l'utilità clinica (Suda & Kimura, 2019; Kats et al., 2022).

Un esempio di antagonista AMPA che è entrato in commercio è il Perampanel, approvato nel 2012 come antiepilettico con indicazioni terapeutiche per le crisi epilettiche refrattarie e che possiede un buon profilo per quanto riguarda gli effetti indesiderati, forse dovuto anche al fatto che si tratta di un antagonista parziale dei recettori AMPA (Choi, 2020). Diversi studi preclinici hanno dimostrato che

il perampanel è in grado di conferire neuroprotezione in modelli di ischemia in vitro o in vivo, come nel caso di ischemia focale transitoria indotta con MCAO in cui si è osservato riduzione dell'edema cerebrale, della morte neuronale, del volume di danno tissutale, dei deficit neurologici e dell'espressione di citochine proinfiammatorie (TNF α , IL-1 β), e aumento invece dei livelli di quelle antiinfiammatorie (TGF- β 1, IL-10)(Nakajima et al., 2018; Niu et al., 2018; Mazzocchetti et al., 2020). Un altro farmaco sperimentato nell'ischemia cerebrale è la minociclina, un antibiotico ampiamente utilizzato appartenente alla famiglia delle tetracicline che riesce a penetrare la barriera ematoencefalica e raggiungere il SNC, e che ha mostrato effetti neuroprotettivi in una vasta gamma di modelli di malattie acute e croniche, compresa l'ischemia focale in quasi 20 studi preclinici (Garrido-Mesa et al., 2013; Naderi et al., 2019; Choi, 2020). Questa sua attività di neuroprotezione, che si osserva alle dosi antimicrobiche standard, è stata in gran parte attribuita all'inibizione delle MMP, ovvero le metalloproteinasi della matrice, alcune delle quali (ad es., la MMP-9) aumentano di espressione e sono rilasciate nello spazio extracellulare in seguito a ischemia, contribuendo probabilmente all'infiammazione e all'alterazione della membrana ematoencefalica; tuttavia, la minociclina inibisce anche la poli(ADP ribosio) polimerasi (PARP) a dosi minori rispetto a quelle necessarie per le MMP, un meccanismo che potrebbe essere anch'esso coinvolto nelle sue proprietà neuroprotettive (Koistinaho et al., 2005; Alano et al., 2006; Chaturvedi & Kaczmarek, 2014; Choi, 2020). In effetti, la minociclina è stata testata in tre sperimentazioni pilota come monoterapia in soggetti che sono andati incontro ad ictus, mostrando potenziali benefici su alcune scale di valutazione solo in due casi (Lampl et al., 2007; Padma Srivastava et al., 2012; Kohler et al., 2013; Choi, 2020).

Il Propofol, invece, è un agente ipnotico-sedativo a breve durata d'azione, che viene comunemente utilizzato nelle unità di terapia intensiva per la sua rapida insorgenza d'azione e la sua capacità di attraversare rapidamente la membrana ematoencefalica per entrare nel SNC dove agisce aumentando l'attività dei recettori GABA $_A$, riducendo quella dei recettori NMDA, modulando l'influsso di ioni calcio attraverso i canali lenti e riducendo il metabolismo cellulare, un insieme di effetti che potrebbero essere alla base di una significativa neuroprotezione (Alkire et al., 1995; Kotani et al., 2008; Kats et al., 2022). E' stato, in effetti, riportato che il propofol ha determinato un'attenuazione del danno cellulare in colture neuronali esposte ad insulto eccitotossico da glutammato, come dimostrato da una diminuzione dei livelli di enolasi neurone-specifico, ha provocato una riduzione del 21% del volume totale dell'area di infarto in ratti sottoposti a MCAO rispetto al trattamento con isoflurano, ha protetto i neuroni ippocampali in modelli di ischemia globale, è stato in grado di ridurre l'apoptosi neuronale quando infuso per 30 min all'inizio del danno da riperfusione, ha ridotto i livelli

di proteine pro-apoptotiche come Bax e aumentato quelli di proteine antiapoptotiche come Bcl-2 (Hans et al., 1994; Young et al., 1997; Fan et al., 2015; Kats et al., 2022).

Come indicato nel capitolo precedente, l'ideale sarebbe un approccio con una combinazione di farmaci anti-eccitotossici che possano agire sia a valle che a monte dell'intero processo, anche se la sperimentazione e l'approvazione di regimi di polifarmacoterapia è più complicata rispetto alle monoterapie, ma comunque non insormontabile, soprattutto se, insieme a un farmaco nuovo, si utilizzano farmaci già sviluppati e di cui, quindi, si conosce bene il profilo di tolleranza e di rischio/beneficio e che risultano facilmente disponibili, come alcuni di quelli descritti in precedenza (Choi, 2020).

4.2 IPOTERMIA TERAPEUTICA

Con il termine ipotermia terapeutica (IT), anche conosciuta come gestione mirata della temperatura (TTM, targeted temperature management), ci si riferisce alla procedura utilizzata per il raffreddamento intenzionale della temperatura corporea a 34-35 °C. Diversi studi preclinici e clinici hanno indicato che l'IT è in grado di ridurre la morte cellulare a livello cerebrale con effetti benefici nei casi di arresto cardiaco e nelle encefalopatie ipossiche neonatali, riducendo il danno da ischemia-riperfusion, anche se altre sperimentazioni cliniche e metanalisi non sembrano confermarlo (Lindsay et al., 2018; Hong et al., 2022; Belur et al., 2023). Le linee guida internazionali raccomandano la IT nei pazienti comatosi dopo arresto cardiaco che rimangono non responsivi anche dopo la rianimazione e il ritorno della circolazione spontanea (Donnino et al., 2015; Nolan et al., 2015; Pancal et al., 2020). L'effetto neuroprotettivo del raffreddamento è spiegato attraverso diversi meccanismi indotti dalla diminuzione della temperatura corporea, quali la riduzione del metabolismo, un ridotto fabbisogno di ossigeno ed energia, riduzione dell'eccitotossicità, riduzione dello stress ossidativo, riduzione dello stato infiammatorio, riduzione dell'apoptosi, effetti anticoagulanti e riduzione delle alterazioni della barriera ematoencefalica (Moore et al., 2011; Kurisu & Yenari, 2018; Hong et al., 2022). Esperimenti eseguiti su diversi tipi di animali (ad es., roditori, maiali, conigli) sottoposti ad ischemia sperimentale e ipotermia hanno dimostrato come questa abbia effetti neuroprotettivi che si riflettono nella riduzione dell'area infartuale e nel miglioramento delle prestazioni neuro-comportamentali senza aumentare il rischio di gravi complicanze (Olai et al., 2020; Arrich et al., 2021; Hong et al., 2022). L'IT sistemica, con abbassamento della temperatura corporea intorno ai 33-35°C, si è dimostrata utile non solo nei neonati con encefalopatia ischemica, ma anche nei pazienti adulti in coma a seguito di arresto cardiaco extraospedaliero con ritmo cardiaco sia defibrillabile sia non defibrillabile; inoltre, bisogna ricordare che interventi di cardiocirurgia sono eseguiti di routine con raffreddamento del sangue in circolazione extracorporeo o un raffreddamento controllato che causa così una profonda ipotermia

riducendo la temperatura corporea a un valore uguale o inferiore ai 25°C, in modo tale che venga protetto il cervello da un possibile danno ischemico durante l'interruzione della circolazione o il clampaggio dei vasi (Cotten & Shankaran, 2010; Sinha et al., 2012; Chang, 2013; Zhang et al., 2015; Seyedsaadat et al., 2020; Hong et al., 2022). Tuttavia, l'ipotermia sistemica può causare diverse complicanze cardiache, ematologiche, immunologiche e metaboliche che possono aumentare la morbilità e la mortalità, inducendo effetti avversi quali iperglicemia, brividi, bradicardia, alterazioni elettrolitiche, danno renale acuto, polmoniti e disordini da iper- o ipocoagulazione che richiedono ulteriori interventi farmacologici e non (Polderman, 2009; MacLaren et al., 2014; Andresen et al., 2015; Polderman, 2016; Sun et al., 2019; Hong et al., 2022). Recentemente, al fine di evitare le complicanze indotte da un'ipotermia sistemica, ha destato molto interesse la possibilità di indurre ipotermia con l'utilizzo di farmaci in grado di interferire con la termoregolazione, come nel caso dell'attivazione dei recettori della neurotensina o dei canali TRPV1 che si è dimostrata efficace in un modello animale di arresto cardiaco e in un modello di ischemia focale sperimentale (Cao et al., 2014; Liu et al., 2016; Li et al., 2019; Hong et al., 2022).

Per quanto riguarda i meccanismi di protezione, gli effetti dell'ipotermia sul metabolismo a livello cerebrale e sul flusso del sangue sono quelli che sono stati maggiormente riportati; infatti, è ben documentato che un abbassamento della temperatura riduce il consumo di ossigeno e di glucosio di circa il 5% per ogni grado centigrado, riduce i livelli di lattato, preserva le fonti energetiche per il cervello, quale l'ATP, e mantiene stabile il pH tissutale (Yenari et al., 2008; Kurisu & Yenari, 2018). Più complesso è l'effetto dell'ipotermia terapeutica sul flusso ematico, in quanto in condizioni fisiologiche il flusso sanguigno cerebrale diminuisce linearmente con temperature tra i 18 e i 37°C, mentre, in condizioni ischemiche, il flusso cerebrale è già marcatamente ridotto a causa dell'occlusione del vaso; tuttavia, nel momento in cui il flusso sanguigno viene ripristinato (riperfusion) si osserva un'iniziale iperemia seguita poi da una temporanea riduzione del flusso sanguigno cerebrale, dovuta ad un restringimento della microvascolatura che l'IT sembrerebbe essere in grado di attenuare, migliorando la microcircolazione nella fase acuta (Yenari et al., 2008; Ito et al., 2011; Kurisu et al., 2016b; Kurisu & Yenari, 2018).

L'IT è anche in grado di prevenire il rilascio e l'accumulo di glutammato, riducendo così l'eccitotossicità, probabilmente in quanto, come detto precedentemente, la riduzione della temperatura riduce il metabolismo ed è in grado di preservare quelle che sono le riserve energetiche di ATP, che è fondamentale per mantenere i gradienti ionici; inoltre, l'IT è in grado di attenuare la downregulation della subunità GluA2 indotta dall'ischemia, andando quindi a ridurre l'afflusso di ioni calcio attraverso i recettori AMPA (Colbourne et al., 2003; Yenari et al., 2008; Yenari & Han, 2012; Kurisu & Yenari, 2018).

Oltre a questi processi, l'ipotermia è in grado di influire su altri processi associati all'ischemia in fase acuta quali, ad esempio, l'induzione dell'espressione dei geni precoci immediati (immediate early genes) e la risposta cellulare allo stress; ad esempio, l'ipotermia aumenta l'espressione della proteina HSP70 (heat shock protein 70) che ha proprietà neuroprotettive (Kamme et al., 1995; Yenari et al., 2005; Terao et al., 2009a; Yenari & Han, 2012; Kurisu & Yenari, 2018). Altre proteine indotte da shock termico sono quelle che vengono espresse da condizioni di riduzione della temperatura (cold shock proteins) e che sono rilevanti ai fini della neuroprotezione da IT, come la CIRBP (cold-inducible RNA-binding protein) e la RBM3 (RNA-binding motif protein 3) che potrebbero avere un ruolo nel contrastare il danno ischemico (Liu et al., 2010; Chip et al., 2011; Yenari & Han, 2012; Kurisu & Yenari, 2018).

Infine, sono stati recentemente oggetto di studio in modelli di lesioni cerebrali, tra cui l'ictus, i micro-RNA (miRNA), piccole parti di RNA non codificante a singolo filamento che hanno la funzione di regolare l'espressione genica che aumentano già dopo due ore l'evento ischemico, per cui è ipotizzabile che possano avere un ruolo rilevante nella patogenesi dell'ictus e che possano rappresentare un bersaglio terapeutico per l'ischemia cerebrale (Neag et al., 2022; Todoran et al., 2023).

Oltre ad influenzare eventi acuti, diverse linee di ricerca indicano che l'IT ha effetti neuroprotettivi aggiuntivi che interessano anche la fase subacuta (ore-giorni) e cronica (settimane-mesi) dell'ictus ischemico (Kurusu et al., 2016a; Yenari et al., 2008; Kurisu & Yenari, 2018). Ad esempio, è stato dimostrato che l'ipotermia terapeutica è in grado di influenzare diversi aspetti della morte cellulare per apoptosi, andando a influenzare sia la via estrinseca che quella intrinseca. Infatti, per quanto riguarda la via estrinseca, l'ipotermia è in grado di sopprimere l'espressione del recettore della morte FAS e del suo ligando FASL nonché di prevenirne il legame al recettore, probabilmente bloccando la produzione della sua forma attiva ad opera delle metalloproteinasi della matrice (MMP) che sembra essere essenziale per il legame al recettore (Powell et al., 1999; Lee et al., 2005; Liu et al., 2008).

Nel caso della via intrinseca, ovvero quella mitocondriale, è stato osservato che questa viene bloccata dalla riduzione della temperatura attraverso la regolazione dell'espressione delle proteine della famiglia Bcl-2 (aumento di Bcl-2 anti-apoptotica e riduzione di BAX pro-apoptotica), la riduzione del rilascio di citocromo C e la diminuzione dell'attivazione delle caspasi; inoltre, l'IT blocca la traslocazione della protein chinasi C delta (PKC δ) al nucleo e ai mitocondri, dove attiva l'apoptosi, mentre previene la riduzione della protein chinasi C epsilon (PKC ϵ) ad attività anti-apoptotica indotta dall'insulto ischemico (Liu & Yenari, 2007; Shimohata et al., 2007; Kurisu & Yenari, 2018). Un'altra molecola studiata più recentemente, che è coinvolta nei meccanismi di apoptosi, è PTEN

(phosphatase and tensin homolog), un oncosoppressore con funzioni pro-apoptiche che è inattivo quando fosforilato; nell'ischemia cerebrale si riduce la fosforilazione di PTEN che, attivata, promuove la morte apoptotica, un effetto che viene prevenuto dall'IT determinando neuroprotezione (Zhao et al., 2007; Lee et al., 2009; Kurisu & Yenari, 2018).

L'ipotermia promuove anche l'attivazione di AKT, una serina/treonina protein chinasi che svolge molteplici ruoli nel metabolismo glucidico, nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi, nella trascrizione genica e nella migrazione cellulare; AKT attivata fosforila e, quindi, inattiva proteine pro-apoptiche come la glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK3 β) e BAD, promuovendo sopravvivenza cellulare (Zhao et al., 2005; Kurisu & Yenari, 2018).

Numerose ricerche su modelli animali hanno dimostrato che l'ipotermia è in grado di inibire gli effetti dannosi indotti da stati di neuroinfiammazione che si hanno nella fase post-ischemica, con effetti benefici sugli esiti neurologici; in effetti, l'ipotermia riduce il numero di neutrofili infiltranti e di cellule di microglia attive nell'area ischemica, diminuisce l'espressione di mediatori infiammatori, tra cui ROS, molecole di adesione, citochine pro-infiammatorie (come IL-1 β , TNF α e IL-6) e diverse chemochine (Deng et al., 2003; Wang et al., 2007; Ceulemans et al., 2010; Perrone et al., 2010; Kurisu & Yenari, 2018). L'ipotermia terapeutica è inoltre in grado di modulare la trascrizione di fattori coinvolti nell'infiammazione, come dimostrato in modelli animali di ischemia in cui blocca l'attivazione di NF- κ B prevenendone la traslocazione nel nucleo e il legame con il DNA inibendo l'attività dell'enzima IKK (inhibitor of κ B kinase), così come influenza anche l'attività della MAPK (mitogen activated protein kinase) (Yenari & Han, 2006; Choi et al., 2011; Kurisu & Yenari, 2018). Un altro effetto dell'IT è quello di proteggere la barriera ematoencefalica dal danno ischemico impedendo l'attivazione di proteasi responsabili della degradazione della matrice extracellulare, come le metalloproteasi della matrice (MMP) (Lee et al., 2005; Kurisu & Yenari, 2018).

Infine, studi recenti si sono interessati dei possibili effetti a lungo termine della IT per comprendere se la riduzione della temperatura potesse influenzare i processi riparativi endogeni che si attivano dopo la fase acuta e subacuta dell'ischemia; tuttavia, i risultati non sono univoci in quanto ci sono ricerche che mostrano come l'ipotermia possa promuovere la proliferazione delle cellule staminali neurali e la maturazione delle cellule progenitrici neurali, favorendo la neurogenesi e la sinaptogenesi, mentre altri studi non hanno osservato alcun effetto sulla neurogenesi (Lasarzik et al., 2009; Kernie & Parent, 2010; Xiong et al., 2011; Kurisu & Yenari, 2018).

Il raffreddamento cerebrale selettivo (SBC, selective brain cooling) è un approccio alternativo sviluppato negli ultimi decenni che permette di evitare gli effetti negativi dell'ipotermia sistemica; nel SBC, il cervello viene fatto raffreddare in maniera selettiva al fine ottenere neuroprotezione mentre la temperatura corporea viene mantenuta entro il range normale, permettendo di raggiungere

la temperatura desiderata più velocemente e con costi minori rispetto al raffreddamento sistemico (Leung et al., 2018; Cattaneo & Meckel, 2019; Hong et al., 2022). SBC può essere effettuata su pazienti ospedalizzati così come in situazioni di emergenza (ad es. in soggetti in arresto cardiaco) utilizzando dispositivi di dimensioni ridotte, non richiede l'utilizzo di farmaci per prevenire malessere e brividi a temperature inferiori ai 35°C, e riduce gli effetti collaterali del raffreddamento sistemico, come polmonite, trombosi venosa e ipotensione (Koehn et al., 2012; Nordberg et al., 2019; Assis et al., 2019; Zhao et al., 2019; Ziai et al., 2019; Hong et al., 2022). Tuttavia, anche il metodo di SBC è associato a effetti collaterali come irritazioni locali, sanguinamenti e vasocostrizione; inoltre, un rapido aumento della pressione arteriosa può essere osservato in pazienti con ictus nelle prime fasi immediatamente dopo il raffreddamento intranasale ma non in pazienti in coma a seguito di un arresto cardiaco (Polderman & Girbes, 2002; Castrén et al., 2010; Poli et al., 2014; Honore et al., 2020; Hong et al., 2022).

È importante ricordare che diversi studi hanno dimostrato che l'attività dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) diminuisce al diminuire della temperatura (circa 0,5% di riduzione dell'effetto litico per ogni grado centigrado), per cui l'ipotermia terapeutica può influenzare l'efficacia trombolitica, un fattore importante da considerare quando si applica una terapia con tPA insieme a SBC in contesti acuti (Shaw et al., 2007; Tang et al., 2013; Hong et al., 2022).

Per quanto riguarda le tecniche utilizzate per il raffreddamento cerebrale selettivo, ricordiamo il raffreddamento superficiale, il raffreddamento endovascolare e il raffreddamento intranasale.

Il raffreddamento superficiale locale, mediante l'utilizzo di cappucci, caschi e collari, può migliorare i risultati neurologici; infatti, studi clinici randomizzati hanno dimostrato che è possibile utilizzare SBC immediatamente dopo la nascita per ridurre le conseguenze di una encefalopatia neonatale (Gluckman et al., 2005; Hong et al., 2022). Tuttavia, per i metodi di raffreddamento superficiali, sebbene non siano invasivi e facili da applicare, non è stata dimostrata una riduzione della temperatura interna cerebrale (Poli et al., 2013; Zhao et al., 2019; Koehn et al., 2020; Hong et al., 2022). Il raffreddamento superficiale con caschi riduce la temperatura prevalentemente nelle aree cerebrali superficiali, è quindi è più indicato per lesioni corticali, mentre l'ipotermia sistemica può fornire una migliore neuroprotezione in lesioni cerebrali profonde; la riduzione della temperatura della testa con caschi può essere combinata con quella del collo mediante collari raffreddanti, che però può portare ad un aumento della pressione e riduzione del battito cardiaco (Wang et al., 2004; Zhu, 2000; Koehn et al., 2020; Fedinec et al., 2021; Hong et al., 2022). Il raffreddamento del solo collo potrebbe causare meno problemi rispetto ad un raffreddamento combinato di testa e collo, può avere un effetto maggiore sui vasi sanguigni e sui tessuti molli, e può essere più utile del solo raffreddamento della

testa in quanto non vi è l'azione di isolante termico rappresentata dalle ossa del cranio (Yin et al., 2019; Hong et al., 2022).

Un'altra metodologia di abbassamento controllato della temperatura è il raffreddamento endovascolare che ha dimostrato di essere efficace come metodo neuroprotettivo, con il vantaggio di raffreddare direttamente la regione ischemica, di poter essere applicata insieme a trombectomia, di mantenere una temperatura costante della zona e controllare la velocità di riscaldamento durante la fase di ritorno alla temperatura normale; tuttavia, si tratta di una procedura invasiva che quindi può, almeno in teoria, essere associata a complicanze procedurali quali la dissezione arteriosa (Holzer et al., 2006; Choi et al., 2010; Faridar et al., 2011; Cattaneo et al., 2016; Hong et al., 2022). Tra i diversi metodi, studi preclinici e clinici hanno indicato che l'infusione di una soluzione fisiologica (0.9% NaCl) a 4 °C nell'arteria carotide interna, ad una velocità di 30 ml/min per 10 min, è una tecnica di raffreddamento pratica, efficace e sicura per i pazienti con ictus ischemico acuto, con una diminuzione della temperatura della zona ischemica di almeno 2°C e di quella corporea di 0,3°C, e una riduzione dell'area infartuale; l'infusione può anche essere effettuata attraverso un microcatetere durante la trombectomia per la ricanalizzazione del vaso bloccato (Cattaneo et al., 2016, 2019; Chen et al., 2016; Wu et al., 2018; Liddle et al., 2020; Wang et al., 2021; Hong et al., 2022).

È interessante riportare che studi preclinici hanno riportato che la combinazione di soluzione fisiologica fredda e solfato di magnesio (che agisce come antagonista del recettore N-metil-D-aspartato, andando a prevenire il danno eccitotossico) o albumina a basso dosaggio, apporta maggiori proprietà neuroprotettive rispetto al solo utilizzo della soluzione salina fredda, ma la sicurezza e la validità di questa procedura deve ancora essere verificata con studi clinici randomizzati (Holzer et al., 2006; Esposito et al., 2014; Wu et al., 2020, 2022). Per quanto riguarda possibili eventi avversi di questo metodo, l'utilizzo di cateteri endovascolari può aumentare il rischio di trombosi (Maze et al., 2014).

Il raffreddamento attraverso la struttura rinofaringea può essere un approccio più efficiente per la SBC in quanto il flusso di sangue al cervello scorre dall'arteria carotide interna al seno cavernoso e entra in contatto con la parte profonda del cervello; l'effetto di raffreddamento è determinato dalla portata, l'umidità e la temperatura dell'aria ed è stato dimostrato che l'approccio intranasale, con un elevato flusso di aria secca, è in grado di indurre e mantenere in modo sicuro normotermia o ipotermia (Wang et al., 2010; Bakhsheshi et al., 2016; Chava et al., 2017; Ferreira et al., 2021; Assis et al., 2019; Ziai et al., 2019; Hong et al. 2022).

Il dispositivo di raffreddamento intranasale vaporizza perfluorocarburi e ossigeno con una portata che va dai 40 ai 60 L/min utilizzando un catetere posizionato nella cavità nasale, portando ad una rapida induzione dell'ipotermia che aumenta la sopravvivenza e gli esiti neurologici in seguito ad arresto

cardiaco; questo tipo di metodo non è invasivo e può essere eseguito anche in corso di arresto cardiaco assicurando un raffreddamento continuo, principalmente a livello cerebrale (Fazel Bakhsheshi et al., 2018; Nordberg et al., 2019; Hong et al., 2022). Tuttavia, sebbene la somministrazione di ossigeno contenente perfluorocarburi e aria compressa può raffreddare il cervello, questo metodo non garantisce un accurato controllo della temperatura e ha ancora dei problemi di sicurezza in termini di sovraraffreddamento localizzato, danno tissutale al naso e alle guance a causa proprio del congelamento (Busch et al., 2010; Fazel Bakhsheshi et al., 2018; Hong et al., 2022). Studi effettuati con il dispositivo di raffreddamento intranasale in pazienti con sindrome da arresto post-cardiaco, hanno dimostrato che la procedura è fattibile e sicura, e che il dispositivo diminuisce la temperatura timpanica (presa come misura della temperatura cerebrale) a 34.2 °C entro una media di 34 min, a differenza del raffreddamento sistemico che di solito richiede un tempo di induzione che va da 1 a 7.4 ore, un'efficacia del dispositivo confermata anche in un recente studio sull'ictus in cui la temperatura cerebrale è stata abbassata di 1.2 °C in 58 min (Castrén et al., 2010; Per Nordberg et al., 2013; Hong et al., 2022).

BIBLIOGRAFIA

- Abe T. et al. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267, 13361–68.
- Acher F.C. et al. (2022) Metabotropic glutamate receptor orthosteric ligands and their binding sites. *Neuropharmacology* 204, 108886.
- Adams K. L., Gallo V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. *Nat. Neurosci.* 21, 9–15.
- Ahad M.A. et al. (2020) Insights into the neuropathology of cerebral ischemia and its mechanisms. *Rev. Neurosci.* 31(5), 521-38.
- Alano C.C. et al. (2006) Minocycline inhibits poly (ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9685–9690.
- Alberdi E. et al. (2002) Ca²⁺ influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol. Dis.* 9, 234–243.
- Alkire M.T. et al. (1995) Cerebral metabolism during propofol anesthesia in humans studied with positron emission tomography. *Anesthesiology* 82, 393– 403; discussion 327A.
- Allen N. J. et al. (2004) Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. *Pflugers Arch.* 449, 132–142.
- Allen N. J., Eroglu C. (2017) Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron* 96, 697–708.
- Anderova M., et al. (2011) Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 894–907.
- Andrade A. L., Rossi D. J. (2010) Simulated ischaemia induces Ca²⁺-independent glutamatergic vesicle release through actin filament depolymerization in area CA1 of the hippocampus. *J. Physiol.* 588, 1499–1514.
- Andresen M. et al. (2015) Therapeutic hypothermia for acute brain injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 23, 42.
- Angulo M. C. et al. (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 24, 6920–6927.
- Anthony L., Michael T. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration.
- Aramori I., Nakanishi S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8, 757–765.
- Araque A. et al. (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.
- Arranz A. M. et al. (2010) Increased expression of glutamate transporters in subcortical white matter after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 37, 156–165.

- Arrich J. et al. (2021) Targeted temperature management after cardiac arrest. A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Resuscitation* 162:47–55.
- Assis FR. et al. (2019) Efficacy and safety of transnasal coolstat cooling device to induce and maintain hypothermia. *Ther Hypothermia Temp Manag* 9, 108–17.
- Astrup J. et al. (1977) Cortical evoked potential and extracellular K^+ and H^+ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51–57.
- Atoji Y., Sarkar S. (2019) Localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor mRNAs in the pigeon cerebellum. *J. Chem. Neuroanat.* 98, 71–79.
- Bakhsheshi MF. et al. (2016) Rapid and selective brain cooling method using vortex tube: a feasibility study. *Am J Emerg Med* 34, 887–94.
- Baltan S. (2014) Excitotoxicity and mitochondrial dysfunction underlie age-dependent ischemic white matter injury. *Adv. Neurobiol.* 11, 151–170.
- Baltan S. (2016) Age-specific localization of NMDA receptors on oligodendrocytes dictates axon function recovery after ischemia. *Neuropharmacology* 110, 626–632.
- Bansal S. et al. (2013) Drug Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 13 (1), 57–69.
- Bao W. L. et al. (2001) Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 922, 173–179.
- Barbon A., Barlati S. (2011) Glutamate receptor RNA editing in health and disease. *Biochemistry* 76(8), 882–89.
- Baron J. C. (2001) Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc. Dis.* 11, 2–8.
- Barres B. A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–440.
- Barry M. F., Ziff E. B. (2002) Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 279–286.
- Belur A.D. et al., (2023) Targeted Temperature Management in Cardiac Arrest: An Updated Narrative Review. *Cardiol. Ther.* 12, 65–84.
- Bender A. S. et al. (1998) Ionic mechanisms in glutamate-induced astrocyte swelling: role of K^+ influx. *J. Neurosci. Res.* 52, 307–321.
- Beretta S. et al. (2018) Efficacy and safety of perampanel oral loading in postanoxic super-refractory status epilepticus: a pilot study. *Epilepsia* 59(Suppl. 2), 243–248.
- Berger U. V., Hediger M. A. (2000) Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 421, 385–399.

- Bergersen L. H. et al. (2012) Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb. Cortex* 22, 1690–1697.
- Bezzi P. et al. (2001) Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Prog. Brain Res.* 132, 255–265.
- Bezzi P. et al. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613–620.
- Bhaskar S. et al. (2018) Reperfusion Therapy in Acute Ischemic Stroke: Dawn of a new era? *BMC Neurol.* 18 (1), 8.
- Bohmbach K. et al. (2018) The structural and functional evidence for vesicular release from astrocytes in situ. *Brain Res. Bull.* 136, 65–75.
- Boyko M. et al. (2011) Pyruvate's Blood Glutamate Scavenging Activity Contributes to the Spectrum of its Neuroprotective Mechanisms in a Rat Model of Stroke. *Eur. J. Neurosci.* 34 (9), 1432–1441.
- Boyko M. et al. (2012a) The Effect of Blood Glutamate Scavengers Oxaloacetate and Pyruvate on Neurological Outcome in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Neurotherapeutics* 9 (3), 649–657.
- Boyko M. et al. (2012b) Pharmacokinetics of Glutamate-Oxaloacetate Transaminase and Glutamate-Pyruvate Transaminase and Their Blood Glutamate-Lowering Activity in Naïve Rats. *Neurochem. Res.* 37 (10), 2198–2205.
- Bresink I. et al. (1996) Effects of memantine on recombinant rat NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *Br. J. Pharmacol.* 119, 195–204.
- Bridges R. et al. (2012) Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacol. Rev.* 64, 780–802.
- Broughton B. R. et al. (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331–e339.
- Bruno V. et al. (1999) Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu1a metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)-2-methyl-4 carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity for mGlu1a and mGlu5 receptors. *Neuropharmacology* 38, 199–207.
- Buchan A.M. et al. (1993) AMPA antagonists: do they hold more promise for clinical stroke trials than NMDA antagonists? *Stroke* 24(12 Suppl), I148-52.
- Busch HJ. et al. (2010) Safety and feasibility of nasopharyngeal evaporative cooling in the emergency department setting in survivors of cardiac arrest. *Resuscitation* 81, 943–9.
- Butenko O. et al. (2012) The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia. *PLoS One* 7, e39959.
- Bylicky M. A. et al. (2018) Mechanisms of endogenous neuroprotective effects of astrocytes in brain injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 6501031.

- Calderone A. et al. (2003) Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J. Neurosci.* 23, 2112–2121.
- Campos F. et al. (2011a) Blood Levels of Glutamate Oxaloacetate Transaminase Are More Strongly Associated with Good Outcome in Acute Ischaemic Stroke Than Glutamate Pyruvate Transaminase Levels. *Clin. Sci. (Lond)* 121 (1), 11–17.
- Campos F. et al. (2011b) Neuroprotection by Glutamate Oxaloacetate Transaminase in Ischemic Stroke: an Experimental Study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (6), 1378–1386.
- Campos F. et al. (2011c) High Blood Glutamate Oxaloacetate Transaminase Levels Are Associated with Good Functional Outcome in Acute Ischemic Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (6), 1387–1393.
- Campos F. et al. (2012) Oxaloacetate: a Novel Neuroprotective for Acute Ischemic Stroke. *Int. J. Biochem. Cel Biol* 44 (2), 262–265.
- Cao Z. et al. (2014) Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306, R149–56.
- Carroll R. C. et al. (2001) Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 315–324.
- Castillo J. et al. (2016) A Novel Mechanism of Neuroprotection: Blood Glutamate Grabber. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36 (2), 292–301.
- Castrén M. et al. (2010) Intra-arrest transnasal evaporative cooling: a randomized, prehospital, multicenter study (PRINCE: PreROSC IntraNasal Cooling Effectiveness). *Circulation* 122, 729–36.
- Cattaneo G. et al. (2016) Endovascular cooling catheter for selective brain hypothermia: an animal feasibility study of cooling performance. *Am J Neuroradiol* 37, 885–91.
- Cattaneo G., Meckel S. (2019) Review of selective brain hypothermia in acute ischemic stroke therapy using an intracarotid, closed-loop cooling catheter. *Brain Circ* 5, 211–7.
- Ceprian M., Fulton D. (2019) Glial cell AMPA receptors in nervous system health, injury and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E2450.
- Ceulemans A.G. et al. (2010) The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J. Neuroinflammation* 7, 74.
- Chałupnik P., Szymańska E. (2023) Kainate Receptor Antagonists: Recent Advances and Therapeutic Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 24(3), 1908.
- Chaturvedi M., Kaczmarek L. (2014) MMP-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol. Neurobiol.* 49, 563–573.
- Chaudhry F. A. et al. (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711–720.

- Chava R. et al. (2017) Rapid induction of therapeutic hypothermia using transnasal high flow dry air. *Ther Hypothermia Temp Manag* 7, 50–6.
- Chavis P. et al. (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 14, 7067–7076.
- Chen B. et al. (2017) Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke. *Exp. Cell Res.* 351, 163–172.
- Chen B. S., Roche K. W. (2009) Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron* 62, 471–478.
- Chen H. et al. (2015) PUMA is involved in ischemia/reperfusion-induced apoptosis of mouse cerebral astrocytes. *Neuroscience* 284, 824–832.
- Chen H.S.V. et al. (1992) Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine - therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 4427–4436.
- Chen J. C. et al. (2005) Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group III metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacology* 49, 703–714.
- Chen J. et al. (2016) Endovascular hypothermia in acute ischemic stroke: pilot study of selective intra-arterial cold saline infusion. *Stroke* 47, 1933–5.
- Chen J. et al. (2022) Molecular mechanisms of neuronal death in brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 1025708.
- Chen M. et al. (2008) Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* 39, 3042–3048.
- Chen T. et al. (2017) The AMPAR antagonist perampanel attenuates traumatic brain injury through anti-oxidative and anti-inflammatory activity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 43–52.
- Chen X. et al. (2017). TRPC3/6/7 knockdown protects the brain from cerebral ischemia injury via astrocyte apoptosis inhibition and effects on NF- κ B translocation. *Mol. Neurobiol.* 54, 7555–7566.
- Chip S. et al. (2011) The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol. Dis.* 43, 388e396.
- Chisholm N. C., Sohrabji F. (2016) Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. *Neurobiol. Dis.* 85, 245–253.
- Choi DW (2020) Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front. Neurosci.* 14, 579953.

- Choi J.S. et al. (2011) Mild hypothermia attenuates intercellular adhesion Molecule-1 induction via activation of extracellular signal-regulated Kinase-1/2 in a focal cerebral ischemia model. *Stroke Res. Treat.* 2011, 846716.
- Choi JH. et al. (2010) Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study. *Am J Neuroradiol* 31, 928–34.
- Choi MH. et al. (2021) Prognostic effects of vasomotor reactivity during targeted temperature management in post-cardiac arrest patients: a retrospective observational study. *J Clin Med* 10, 3386.
- Choi MH. et al. (2021) The clinical usefulness of targeted temperature management in acute ischemic stroke with malignant trait after endovascular thrombectomy. *Neurocrit Care* 34, 990–9.
- Choo A. M. et al. (2012) NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochem. Int.* 60, 506–516.
- Chung C. et al. (2016) Neuroprotection mediated through GluN2C-containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following ischemia. *Sci. Rep.* 6, 3.
- Cobb C.A., Cole M.P. (2015) Oxidative and nutritive stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 84, 4-21.
- Colbourne F. et al. (2003) Hypothermia rescues hippocampal CA1 neurons and attenuates down-regulation of the AMPA receptor GluR2 subunit after forebrain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2906e2910.
- Corti C. et al. (2007) The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J. Neurosci.* 27, 8297–8308.
- Cotten CM., Shankaran S. (2010) Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Expert Rev Obstet Gynecol* 5, 227–39.
- Cozzi A. et al. (2002) Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonists enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity? *Neuropharmacology* 43, 119–130.
- Crompton EM. et al. (2017) Meta-analysis of therapeutic hypothermia for traumatic brain injury in adult and pediatric patients. *Crit Care Med* 45, 575–83.
- Cuartero M. I. et al. (2016) The kynurenine pathway in the acute and chronic phases of cerebral ischemia. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1060–1073.
- Cuellar-Santoyo A.O. et al. (2023) Revealing the contribution of astrocytes to glutamatergic neuronal transmission. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 1037641.
- Davidson J. O. et al. (2013) A key role for connexin hemichannels in spreading ischemic brain injury. *Curr. Drug Targets* 14, 36–46.
- Davis S.M. et al. (2000) Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 31, 347–354.

- De Vry J. et al. (2001) Neuroprotective and behavioral effects of the selective metabotropic glutamate mGlu1 receptor antagonist BAY 36–7620. *Eur. J. Pharmacol.* 428, 203–214.
- Dehnes Y. et al. (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* 18, 3606–3619.
- Deng H. et al. (2003) Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke* 34, 2495e2501.
- Deng W. et al. (2004) Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 7751–7756.
- Desilva T. M. et al. (2007) The glutamate transporter EAAT2 is transiently expressed in developing human cerebral white matter. *J. Comp. Neurol.* 501, 879–890.
- Diaz-Ruiz A. et al. (2016) Enzyme activities involved in the glutamate-glutamine cycle are altered to reduce glutamate after spinal cord injury in rats. *Neuroreport* 27, 1317–1322.
- Diering G. H., Huganir, R. L. (2018) The AMPA receptor code of synaptic plasticity. *Neuron* 100, 314–329.
- Domin H. et al. (2014) Group III mGlu receptor agonist, ACPT-I, exerts potential neuroprotective effects in vitro and in vivo. *Neurotox. Res.* 26, 99–113.
- Domin H. et al. (2015) Neuroprotective effects of the allosteric agonist of metabotropic glutamate receptor 7 AMN082 on oxygen glucose deprivation-and kainate-induced neuronal cell death. *Neurochem. Int.* 88, 110–123.
- Domin H. et al. (2016) Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I in animal models of ischemic stroke: In vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology* 102, 276-94.
- Domin H. et al. (2018) Neuroprotective effect of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I after ischemic stroke in rats with essential hypertension. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 84, 93–101.
- Domin H. (2022) Group III metabotropic glutamate receptors as promising targets for neuroprotective therapy: Particular emphasis on the role of mGlu4 and mGlu7 receptors. *Pharmacy. Biochem. behave.* 219:173452.
- Dong X. et al. (2020) Nanomedicine for Ischemic Stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (20), 7600.
- Donnino MW. et al. (2015) Temperature management after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the international liaison committee on resuscitation and the American heart association emergency cardiovascular care committee and the council on cardiopulmonary, critical care, perioperative and resuscitation. *Circulation* 132, 2448– 56.
- Dos-Anjos S. et al. (2009a) Early modifications in N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in an oxygen and glucose deprivation model using rat hippocampal brain slices. *Neuroscience* 164, 1119–1126.

- Dos-Anjos S. et al. (2009b) Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied. *Neurochem. Int.* 54, 180–185.
- Doyle K. P. et al. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55, 310–318.
- Doyle S. et al. (2018) Vesicular glutamate release from central axons contributes to myelin damage. *Nat. Commun.* 9, 1032.
- Drejer J. et al. (1982) Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. *Exp. Brain Res.* 47, 259–269.
- Du Y. et al. (2018) Dissipation of transmembrane potassium gradient is the main cause of cerebral ischemia-induced depolarization in astrocytes and neurons. *Exp. Neurol.* 303, 1–11.
- Duan S. et al. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 1320–1328.
- Elger B. et al. (2006) Extended therapeutic time window after focal cerebral ischemia by non-competitive inhibition of AMPA receptors. *Brain Res.* 1085, 189–194.
- Erdo S.L., Schafer M. (1991) Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell-death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur. J. Pharmacol.* 198, 215–217.
- Erecinska M., Silver I. A. (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.* 128, 263–276.
- Esposito E. et al. (2014) In cold blood: intraarterial cold infusions for selective brain cooling in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 743–52.
- Fairman W. A. (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599–603.
- Fan W. et al. (2015) Propofol: an anesthetic possessing neuroprotective effects. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1520–152.
- Faridar A. et al. (2011) Therapeutic hypothermia in stroke and traumatic brain injury. *Front Neurol* 2, 80.
- Fazel Bakhsheshi M. et al. (2018) A novel selective cooling system for the brain: feasibility study in rabbits vs. piglets. *Intensive Care Med Exp* 6, 45.
- Fedinec AL. et al. (2021) The cold receptor TRPM8 activation leads to attenuation of endothelium-dependent cerebral vascular functions during head cooling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 41, 2897–906.
- Fern R., Moller T. (2000) Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J. Neurosci.* 20, 34–42.
- Fernandes J. et al. (2014) In vitro ischemia triggers a transcriptional response to down-regulate synaptic proteins in hippocampal neurons. *PLoS One* 9, e99958.

- Ferraguti F. et al. (1997) Evidence against a permissive role of the metabotropic glutamate receptor 1 in acute excitotoxicity. *Neuroscience* 79, 1–5.
- Ferreira RES. et al. (2021) Efficacy and safety of a nasopharyngeal catheter for selective brain cooling in patients with traumatic brain injury: a prospective, non-randomized pilot study. *Neurocrit Care* 34, 581–92.
- Feustel P. J. et al. (2004) Volume-regulated anion channels are the predominant contributors to release of excitatory amino acids in the ischemic cortical penumbra. *Stroke* 35, 1164–1168.
- Fiacco T. A., McCarthy K. D. (2018) Multiple lines of evidence indicate that gliotransmission does not occur under physiological conditions. *J. Neurosci.* 38, 3–13.
- French H. M. et al. (2009) Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *J. Neurosci. Res.* 87, 3076–3087.
- Fricker M. et al. (2018) Neuronal cell death. *Physiol. Rev.* 98, 813–880.
- Fujimoto S. et al. (2004) Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci. Res.* 50, 179–187.
- Fukamachi S. et al. (2001) Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Dev. Brain Res.* 132, 131–139.
- Furness D. N. et al. (2008) A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157, 80–94.
- Furuta A. et al. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17, 8363–8375.
- Gardoni F., Di Luca M. (2021) Protein-protein interactions at the NMDA receptor complex: From synaptic retention to synaptonuclear protein messengers. *Neuropharmacology* 190, 108551.
- Garrido-Mesa N. et al. (2013) Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* 169, 337–352.
- Gee C.E., Lacaille J.C. (2004) Group I metabotropic glutamate receptor actions in oriens/alveus interneurons of rat hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 1000, 92–101.
- Giffard R.G. et al. (1990) Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res.* 506, 339–342.
- Ginsberg M. D. (2003) Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34, 214–223.
- Gluckman PD. et al. (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365, 663–70.
- Goenaga J. et al. (2023) Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Front. Synaptic Neurosci.* 15, 1138577.

- Goldstein J. N. et al. (2010) Management of Thrombolysis-Associated Symptomatic Intracerebral Hemorrhage. *Arch. Neurol.* 67 (8), 965–969.
- Gorter J. A. et al. (1997) Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J. Neurosci.* 17, 6179–6188.
- Gottlieb M. et al. (2003) Blood-mediated Scavenging of Cerebrospinal Fluid Glutamate. *J. Neurochem.* 87 (1), 119–126.
- Gottlieb M., Matute C. (1997) Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 290–300.
- Green D.R., Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309e1312.
- Greger I. H. et al. (2002) RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 34, 759–772.
- Gruenbaum B.F. et al. (2022) Glutamate efflux across the blood-brain barrier: new perspectives on the relationship between depression and the glutamatergic systems. *Metabolites* 12(5), 459.
- Gülke E. et al. (2018) Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 11, 1756286418774254.
- Gundersen V. et al. (2015) Neuroglial transmission. *Physiol. Rev.* 95, 695–726.
- Guo C., Ma Y.Y. (2021) Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front. Neural Circuits* 15, 711564.
- Guo C. Y. et al. (2019) The temporal and spatial changes of actin cytoskeleton in the hippocampal CA1 neurons following transient global ischemia. *Brain Res.* 1720, 146297.
- Gupta S. (2003) Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.* 22, 15–20.
- Hacke W. et al. (2008) Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 359 (13), 1317–1329.
- Hamilton N. B., Attwell, D. (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 227–238.
- Han X. J. et al. (2016) Changes in synaptic plasticity and expression of glutamate receptor subunits in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience* 327, 64–78.
- Hans P. V. et al. (1994) Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 6, 249.
- Hansen A. J., Nedergaard M. (1988) Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem. Pathol.* 9, 195–209.

- Hansen K.B. et al. (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 150(8), 1081-1105.
- Hansen K.B. et al. (2021) Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 73, 1469-58.
- Harrigan T. J. et al. (2008) Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. *J. Neurochem.* 106, 2449–2462.
- Hartings J. A. et al. (2017) The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: examining Leao’s legacy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1571–1594.
- Harukuni I., Bhardwaj A. (2006) Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol. Clin.* 24, 1–21.
- Harvey B.K. et al. (2011) Targeted over-expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) reduces ischemic brain injury in a rat model of stroke. *PLoS One* 6, e22135.
- Hawkins R.A. et al. (2006) Pyroglutamate stimulates Na⁺-dependent glutamate transport across the blood–brain barrier. *FEBS Lett.* 580, 4382–86.
- Hayakawa K. et al. (2016) Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535, 551–555.
- Heiss W. D. (2004) Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. *Stroke* 35, 2671–2674.
- Henrich-Noack P. et al. (2000) Distinct influence of the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine [(R,S)-PPG] on different forms of neuronal damage. *Neuropharmacology* 39, 911–917.
- Heuss C. et al (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2, 1070–1077.
- Hinzman J. M. et al. (2015) Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp. Neurol.* 267, 243–253.
- Holmes A. et al. (2018) A deficiency of the GluN2C subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is neuroprotective in a mouse model of ischemic stroke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 136–144.
- Holzer M. et al. (2006) Efficacy and safety of endovascular cooling after cardiac arrest: cohort study and Bayesian approach. *Stroke* 37, 1792–7.
- Hong, J.M. et al. (2014) Therapeutic hypothermia after recanalization in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 45, 134e140.
- Hong JM. (2019) Targeted temperature management for ischemic stroke. *J Neurocrit Care.* 12, 67–73.

- Hong JM. et al. (2022) Selective Brain Cooling: A New Horizon of Neuroprotection. *Front. Neurol.* 13, 873165.
- Honore PM. et al. (2020) Endovascular cooling is superior to surface cooling in terms of effectiveness by improving the neurological prognosis, but what about the safety? *Crit Care* 24, 277.
- Honsa P. et al. (2012) Polydendrocytes display large lineage plasticity following focal cerebral ischemia. *PLoS One* 7, e36816.
- Hossmann K. A. (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8, 195–208.
- Hsu J. C. et al. (1998) Decreased expression and functionality of NMDA receptor complexes persist in the CA1, but not in the dentate gyrus after transient cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 768–775.
- Hu X. et al. (2018) Lanthanum chloride impairs memory in rats by disturbing the glutamate-glutamine cycle and over-activating NMDA receptors. *Food Chem. Toxicol.* 113, 1–13.
- Husain J., Juurlink B. H. J. (1995) Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain Res.* 698, 86–94.
- Ito U. et al. (2011) Temporary [corrected] cerebral ischemia results in swollen astrocytic end-feet that compress microvessels and lead to delayed [corrected] focal cortical infarction. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 31, 328e338.
- Itoh T. et al. (2002) AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 81, 390–402.
- Jabaudon D. et al. (2000) Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 5610–5615.
- Jovin T. G. et al. (2015) Thrombectomy within 8 hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 372 (24), 2296–2306.
- Jung S. et al. (2017) Relevance of the cerebral collateral circulation in ischaemic stroke: time is brain, but collaterals set the pace. *Swiss Med. Wkly.* 147: w14538.
- Jurcau A., Simion A. (2022) Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 23(1), 14.
- Juurlink B. H. et al. (1998) Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* 22, 371–378.
- Kadotani H. et al. (1998) Attenuation of focal cerebral infarct in mice lacking NMDA receptor subunit NR2C. *Neuroreport* 9, 471–475.
- Kahles T. et al. (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38, 3000–3006.
- Kalogeris T. et al. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species: a double-edged sword in ischemia/reperfusion vs. preconditioning. *Redox Biol.* 2, 702–714.

- Kamme F. et al. (1995) Biphasic expression of the fos and jun families of transcription factors following transient forebrain ischaemia in the rat. Effect of hypothermia. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2007e2016.
- Kanai Y., Hediger M. A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469–479.
- Kaplan-Arabaci O. et al. (2022) Glutamate Scavenging as a Neuroreparative Strategy in Ischemic Stroke. *Front. Pharmacol.* 13, 866738.
- Káradóttir R. et al. (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438, 1162–1166.
- Káradóttir R., Attwell D. (2007) Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience* 145, 1426–1438.
- Katayama Y. et al. (1991) Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain Res.* 558, 136–140.
- Katz A. et al. (2022) Pharmacologic neuroprotection in ischemic brain injury after cardiac arrest. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1507, 49-59.
- Kernie S.G., Parent J.M. (2010) Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 37, 267e274.
- Ketheeswaranathan P. et al. (2011) Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. *Brain Res.* 1418, 93–103.
- Kim J. B. et al. (2005) Anti-inflammatory Mechanism Is Involved in Ethyl Pyruvate-Mediated Efficacious Neuroprotection in the Postischemic Brain. *Brain Res.* 1060 (1-2), 188–192.
- Kirdajova B.D. et al. (2020) Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity from the Perspective of Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 51.
- Kirino T., Sano K. (1984) Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.* 62, 201–208.
- Klin Y. et al. (2010) Distribution of radiolabeled l-glutamate and d-aspartate from blood into peripheral tissues in naive rats: Significance for brain neuroprotection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 694–98.
- Knapp L. et al. (2015) Neuroprotective Effect of Oxaloacetate in a Focal Brain Ischemic Model in the Rat. *Cell Mol Neurobiol* 35 (1), 17–22.
- Koehn J. et al. (2020) Neck cooling induces blood pressure increase and peripheral vasoconstriction in healthy persons. *Neurol Sci* 41, 2521– 9.
- Kohara A. et al. (2008) Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models. *Brain Res.* 1191, 168–179.

- Kohler E. et al. (2013) Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis. *Stroke* 44, 2493–2499.
- Koistinaho M. et al. (2005) Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 460–467.
- Koszegi Z. (2017) Endocytosis and lysosomal degradation of GluA2/3 AMPARs in response to oxygen/glucose deprivation in hippocampal but not cortical neurons. *Sci. Rep.* 7, 12318.
- Kotani Y. et al. (2008) The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. *CNS Neurosci. Ther.* 14, 95–106.
- Krebs C. et al. (2003) Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro. *J. Neurosci.* 23, 3364–3372.
- Kroemer G. et al. (2009) Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3-11.
- Kubota H. et al. (2014) mGluR1-Mediated Excitation of Cerebellar GABAergic Interneurons Requires Both G Protein-Dependent and Src-ERK1/2-Dependent Signaling Pathways. *PLoS ONE* 9(9), e106316.
- Kudin A. P. et al. (2012) The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1901–1906.
- Kugler P., Schleyer V. (2004) Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 14, 975–985.
- Kurisu K. et al. (2016a) Transarterial regional hypothermia provides robust neuroprotection in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion with transient collateral hypoperfusion. *Brain Res.* 1651, 95e103.
- Kurisu K. et al. (2016b) Transarterial regional brain hypothermia inhibits acute Aquaporin-4 surge and sequential microvascular events in ischemia/reperfusion injury. *Neurosurgery* 79, 125e134.
- Kurisu K., Yenari M.A. (2018) Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology* 134, 302e309.
- Kwak S., Weiss J. H. (2006) Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 281–287.
- Kwiatkowski T. G. et al. (1999) Effects of Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke at One Year. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Recombinant Tissue Plasminogen Activator Stroke Study Group. *N. Engl. J. Med.* 340 (23), 1781–1787.
- Lai T. W. et al. (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188.
- Lampl Y. et al. (2007) Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology* 69, 1404–1410.

- Lasarzik I. et al. (2009) Mild hypothermia has no long-term impact on postischemic neurogenesis in rats. *Anesth. Analg.* 109, 1632e1639.
- Lau A., Tymianski M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*.
- Lazarou M. et al. (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314.
- Lee J. H. et al. (2015) A neuroprotective role of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in ischemic stroke of the adult mouse. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C570–C577.
- Lee J.E. et al. (2005) Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J. Neurosurg.* 103, 289e297.
- Lee J.Y. et al. (2001) Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J. Neurosci.* 21, RC171–RC171.
- Lee S. Y., Kim J. H. (2015) Mechanisms underlying presynaptic Ca²⁺ transient and vesicular glutamate release at a CNS nerve terminal during in vitro ischaemia. *J. Physiol.* 593, 2793–2806.
- Lee S.M. et al. (2009) The protective effect of early hypothermia on PTEN phosphorylation correlates with free radical inhibition in rat stroke. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 29, 1589e1600.
- Lee S-J. et al. (2019) Primary neurocritical care involving therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke patients with malignant infarct cores. *J Neurocrit Care* 12, 30– 6.
- Lehre K. P., Danbolt N. C. (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 8751–8757.
- Leung LY. et al. (2018) Selective brain cooling reduces motor deficits induced by combined traumatic brain injury, hypoxemia and hemorrhagic shock. *Front Neurol* 9, 612.
- Lewis D. K. et al. (2012) Age related severity of focal ischemia in female rats is associated with impaired astrocyte function. *Neurobiol. Aging* 33, 1123.e1–1123.e16.
- Li C. et al. (2013) BNIP3 mediates pre-myelinating oligodendrocyte cell death in hypoxia and ischemia. *J. Neurochem.* 127, 426–433.
- Li H. et al. (2013) Inhibition of the group I mGluRs reduces acute brain damage and improves long-term histological outcomes after photothrombosis-induced ischaemia. *ASN Neuro* 5, 195–207.
- Li H. et al. (2019) The effects of pharmacological hypothermia induced by neurotensin receptor agonist ABS 201 on outcomes of CPR. *Shock* 51, 667–73.
- Li S., Stys P. K. (2000) Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.* 20, 1190–1198.

- Li Y. et al. (2022) Treatment of Cerebral Ischemia Through NMDA Receptors: Metabotropic Signaling and Future Directions. *Front. Pharmacol.* 13, 831181.
- Li Y., Zhang J. (2021) Animal models of stroke. *Animal Model Exp. Med.* 4(3), 204-19.
- Liao S. et al. (2020) The possible roles of necroptosis during cerebral ischemia and ischemia / reperfusion injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 30, 695.
- Liddle LJ. et al. (2020) A systematic review and meta-analysis of animal studies testing intra-arterial chilled infusates after ischemic stroke. *Front Neurol* 11, 588479.
- Lijnen H. R., Collen D. (1988) Mechanisms of Plasminogen Activation by Mammalian Plasminogen Activators. *Enzyme* 40 (2-3), 90–96.
- Lin Y. H. et al. (2017) Opening a new time window for treatment of stroke by targeting HDAC2. *J. Neurosci.* 37, 6712–6728.
- Lindsay PJ. et al. (2018) The efficacy and safety of pre-hospital cooling after out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 22, 66.
- Linying Z. et al. (2014) Neuroprotective effects of neuregulin-1 β on oligodendrocyte type 2 astrocyte progenitors following oxygen and glucose deprivation. *Pediatr. Neurol.* 50, 357–362.
- Lippert K. et al. (1994) Over-additive protective effect of dizocilpine and NBQX against neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.* 253, 207–213.
- Lipton S. A. (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 1, 101–110.
- Lipton S.A. (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Rev. Drug Discov.* 5, 160–170.
- Liu A. (2010) Effects of hypothermia and cerebral ischemia on cold-inducible RNA-binding protein mRNA expression in rat brain. *Brain Res.* 1347, 104e110.
- Liu B. et al. (2006) Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J. Neurosci.* 26, 5309–5319.
- Liu K. et al. (2016) Pharmacological hypothermia: a potential for future stroke therapy? *Neurol Res.* 38, 478– 90.
- Liu L. et al. (2008) FasL shedding is reduced by hypothermia in experimental stroke. *J. Neurochem.* 106, 541e550.
- Liu L., Yenari M.A. (2007) Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front. Biosci.* 12, 816e825.
- Liu S. et al. (2004) Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* 43, 43–55.

- Liu Y. et al. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 27, 2846–2857.
- Liu Z. et al. (2010) Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1361, 133–139.
- Lowry E. R. et al. (2013) The GluK4 kainate receptor subunit regulates memory, mood and excitotoxic neurodegeneration. *Neuroscience* 235, 215–225.
- Lv Q. et al. (2012) Neuroprotection of GluK1 kainate receptor agonist ATPA against ischemic neuronal injury through inhibiting GluK2 kainate receptor-JNK3 pathway via GABAA receptors. *Brain Res.* 1456, 1–13.
- Lyons S. A., Kettenmann H. (1998) Oligodendrocytes and microglia are selectively vulnerable to combined hypoxia and hypoglycemia injury in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 521–530.
- Ma D. et al. (2018) Astrocytic gap junction inhibition by carbenoxolone enhances the protective effects of ischemic preconditioning following cerebral ischemia. *J. Neuroinflammation* 15, 198.
- MacLaren R. et al. (2014) Assessment of adverse events and predictors of neurological recovery after therapeutic hypothermia. *Ann Pharmacother* 48, 17–25.
- Macrez R. et al. (2011) Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 42, 2315–2322.
- Makarewicz D. et al. (2015) Effects of mGluR5 positive and negative allosteric modulators on brain damage evoked by hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Folia Neuropathol.* 53, 301–308.
- Malik A.R., Willnow T.E. (2019) Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 20(22), 5671.
- Man H. Y. (2011) GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors-inducers of plasticity? *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 291–298.
- Mao R. et al. (2022) Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci. Bull.* 38(10), 1229-47.
- Marini C. et al. (1999) Long-term prognosis of cerebral ischemia in young adults. National Research Council Study Group on Stroke in the Young. *Stroke* 30, 2320–2325.
- Mark L. P. et al. (2001). Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 22, 1813–1824.
- Marmiroli P., Cavaletti G. (2012) The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. *Curr. Med. Chem.* 19, 1269–1276.
- Marosi M. et al. (2009) Oxaloacetate Restores the Long-Term Potentiation Impaired in Rat hippocampus CA1 Region by 2-vessel Occlusion. *Eur. J. Pharmacol.* 604 (1- 3), 51–57.

- Massie A. et al. (2008) High-affinity Na⁺/K⁺-dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain. *J. Comp. Neurol.* 511, 155–172.
- Mastroiacovo F. et al. (2017) Genetic deletion of mGlu2 metabotropic glutamate receptors improves the short-term outcome of cerebral transient focal ischemia. *Mol. Brain* 10, 39.
- Matsumoto M. et al. (1990) Cerebral blood flow and neuronal damage during progressive cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21, 1470–1477.
- Matthias K. et al. (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 1750–1758.
- Matucz E. et al. (2006) Therapeutic time window of neuroprotection by non-competitive AMPA antagonists in transient and permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1123, 60–67.
- Matute C. et al. (2006) Glutamate mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 53, 212–224.
- Matute C. (2011) Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J. Anat.* 219, 53–64.
- Maze R. et al. (2014) Endovascular cooling catheter related thrombosis in patients undergoing therapeutic hypothermia for out of hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 85, 1354–8.
- Mazzocchetti P. et al. (2020) Low doses of Perampanel protect striatal and hippocampal neurons against in vitro ischemia by reversing the ischemia-induced alteration of AMPA receptor subunit composition. *Neurobiol. Dis.* 140, 104848.
- McDonald J. W. et al. (1998) Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.* 4, 291–297.
- McManigle J. E. et al. (1994) Potentiation of MK-801-induced breathing impairment by 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline. *Eur. J. Pharmacol.* 252, 11–17.
- Meli E. et al. (2002) Activation of mGlu1 but not mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes to postischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 439–446.
- Micu I. et al. (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 439, 988–992.
- Mifsud G. et al. (2014) Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 603–612.
- Min K. J. et al. (2006) Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J. Neurosci.* 26, 1880–1887
- Mölders A. et al. (2018) Heterogeneity of the astrocytic AMPA-receptor transcriptome. *Glia* 66, 2604–2616.

- Montana V. et al. (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 24, 2633–2642.
- Montero M. et al. (2007) Neuroprotective effects of the AMPA antagonist PNQX in oxygenglucose deprivation in mouse hippocampal slice cultures and global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res.* 1177, 124–135.
- Moore EM. et al. (2011) Therapeutic hypothermia: benefits, mechanisms, and potential clinical applications in neurological, cardiac and kidney injury. *Injury* 42, 843–54.
- Morikawa E. et al. (1998) Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18, 9727–9732.
- Moroni F. et al. (2002) The novel and systemically active metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonist 3-MATIDA reduces post-ischemic neuronal death. *Neuropharmacology* 42, 741–751.
- Morris G.F. et al. (1999) Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two-phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *J. Neurosurg.* 91, 737–743.
- Mosinger J. L. et al. (1991) Blockade of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vivo adult mammalian retina. *Exp. Neurol.* 113, 10–17.
- Motolese M. et al. (2015) Targeting type-2 metabotropic glutamate receptors to protect vulnerable hippocampal neurons against ischemic damage. *Mol. Brain* 8, 66.
- Moyanova S. G. et al. (2011). Protective role for type 4 metabotropic glutamate receptors against ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1107–1118.
- Murotomi K. et al. (2008) mGluR1 antagonist decreases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor and attenuates infarct size after transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 105, 1625–1634.
- Murugan M. et al. (2011) Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia* 59, 521–539.
- Nadarajan V. et al. (2014) Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Pract. Neurol.* 14, 23–31.
- Naderi Y. et al. (2019) Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review. *Neural Regen. Res.* 15, 773–782.
- Nagy D. et al. (2009) Oxaloacetate Decreases the Infarct Size and Attenuates the Reduction in Evoked Responses after Photothrombotic Focal Ischemia in the Rat Cortex. *Cel Mol Neurobiol* 29 (6-7), 827–835.
- Nakajima H. et al. (2012) The relation of urinary 8-OHdG, a marker of oxidative stress to DNA, and clinical outcomes for ischemic stroke. *Open Neurol. J.* 6, 51–57.

- Nakajima M. et al. (2018) AMPA receptor antagonist perampanel ameliorates post-stroke functional and cognitive impairments. *Neuroscience* 386, 256–264.
- Nakanishi N. et al. (2009). Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 29, 5260–5265.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 333 (24), 1581–1587.
- Neag M.A. et al. (2022) miRNA Involvement in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Front. Neurosci.* 16, 901360.
- Nedergaard M. et al. (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 748–755.
- Ni Y., Parpura V. (2009) Dual regulation of Ca²⁺-dependent glutamate release from astrocytes: vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. *Glia* 57, 1296–1305.
- Niizuma K. et al. (2010) Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 92–99.
- Niswender C.M., Conn P.J. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacology. Toxicol.* 50, 295-322.
- Noda M. et al. (2000) AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.* 20, 251–258.
- Noh K. M. et al. (2005) Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 12230–12235.
- Nolan J.P. et al. (2015) European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine guide- lines for post-resuscitation care 2015: section 5 of the European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2015. *Resuscitation* 95, 202-22.
- Nordberg P. et al. (2019) Effect of trans-nasal evaporative intra-arrest cooling on functional neurologic outcome in out-of-hospital cardiac arrest: the princess randomized clinical trial. *JAMA* 321, 1677–85.
- Olai H. et al. (2020) Metaanalysis of targeted temperature management in animal models of cardiac arrest. *Intensive Care Med Exp* 8, 3.
- Oliveira-Ferreira A. I. et al. (2019) Spreading depolarizations in the rat endothelin-1 model of focal cerebellar ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
- Olivero G. et al. (2020) Presynaptic Release-regulating Metabotropic Glutamate Receptors: An Update. *Curr. Neuropharmacol.* 18(7), 655-72.
- Olloquequi J. et al. (2018) Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *J. Psychopharmacol.* 32(3), 265-75.

- Onténiente B. et al. (2003) The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspase therapy. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1643–1649.
- Ouyang Y. B. et al. (2013) Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia* 61, 1784–1794.
- Padma Srivastava M. V. et al. (2012) Efficacy of minocycline in acute ischemic stroke: a single-blinded, placebo-controlled trial. *Neurol. India* 60, 23–28.
- Pajarillo E. et al. (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 161, 107559.
- Palygin O. et al. (2011) Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1755–1766.
- Panchal A.R. et al. (2020) Part 3: Adult Basic and Advanced Life Support: 2020 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 142 (16, suppl. 2), S366-S468.
- Pei D. S. et al. (2005) Neuroprotective effects of GluR6 antisense oligodeoxynucleotides on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 region. *J. Neurosci. Res.* 82, 642–649.
- Pei D. S. et al. (2006) Neuroprotection against ischaemic brain injury by a GluR6–9c peptide containing the TAT protein transduction sequence. *Brain* 129, 465–479.
- Pellegrini-Giampietro D. E. et al. (1992) Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 10499–10503.
- Pellegrini-Giampietro D. E. et al. (1999a) 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)- 2-(3'-carboxybicyclo [1.1.1] pentyl)-glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in in vitro and in vivo models of cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3637–3647.
- Pellegrini-Giampietro D. E. et al. (1999b) Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacology* 38, 1607–1619.
- Peng P. L. et al. (2006) ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49, 719–733.
- Per Nordberg FST, et al. (2013) Design of the PRINCESS trial-pre-hospital resuscitation intra-nasal cooling effectiveness survival study (PRINCESS). *BMC Emerg Med* 13, 21.
- Perrone S. et al. (2010) Whole body hypothermia and oxidative stress in babies with hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Neurol.* 43, 236e240.
- Persson M., Rönnbäck L. (2012) Microglial self-defence mediated through GLT-1 and glutathione. *Amino Acids* 42, 207–219.

- Pick J. E., Ziff E. B. (2018). Regulation of AMPA receptor trafficking and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Neurosci.* 91, 3–9.
- Pilipovic K. et al. (2023) Modeling Central Nervous System Injury In Vitro: Current Status and Promising Future Strategies. *Biomedicines* 11(1), 94.
- Pinky N. F. et al. (2018) Region and activity-dependent regulation of extracellular glutamate. *J. Neurosci.* 38, 5351–5366.
- Plotegher N. et al. (2021) Excitotoxicity Revisited: Mitochondria on the Verge of a Nervous Breakdown. *Trends Neurosci.* 44(5), 342–51.
- Pocock J. M., Kettenmann H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 30, 527–535.
- Polderman KH. (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 37, S186–202.
- Polderman KH. (2016) How to stay cool in the intensive care unit? Endovascular vs. surface cooling. *Circulation* 132, 152–7.
- Polderman KH., Girbes AJ. (2002) Central venous catheter use. Part 1: mechanical complications *Intensive Care Med* 28, 1–17.
- Poli S. et al. (2013) Induction of cooling with a passive head and neck cooling device: effects on brain temperature after stroke. *Stroke* 44, 708–13.
- Poli S. et al. (2014) Safety evaluation of nasopharyngeal cooling (RhinoChill(R)) in stroke patients: an observational study. *Neurocrit Care* 20, 98–105.
- Powell W.C. et al. (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* 9, 1441e1447.
- Powers W.J. et al. (2019) Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50(12), e344–e418.
- Quintana P. et al. (2015) Acid-sensing ion channel 1a drives AMPA receptor plasticity following ischaemia and acidosis in hippocampal CA1 neurons. *J. Physiol.* 593, 4373–4386.
- Radak D. et al. (2017) Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 15, 115–122.
- Rakers C., Petzold G. C. (2017) Astrocytic calcium release mediates peri-infarct depolarizations in a rodent stroke model. *J. Clin. Invest.* 127, 511–516.
- Rama R., García J. C. (2016) “Excitotoxicity and oxidative stress in acute stroke,” in *Ischemic Stroke Updates*, ed. B. Schaller (London: InTech), 17–42.
- Ransom B. R., Baltan S. B. (2009) Axons get excited to death. *Ann. Neurol.* 65, 120–121.

- Rao V. L. et al. (2001) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem. Res.* 26, 497–502.
- Ribeiro F.M. et al. (2017) Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* 115, 179-91.
- Riek-Burchardt M. et al. (2007) No improvement of functional and histological outcome after application of the metabotropic glutamate receptor 5 agonist CHPG in a model of endothelin-1-induced focal ischemia in rats. *Neurosci. Res.* 57, 499–503.
- Rink C. et al. (2010) Oxygen-sensitive Outcomes and Gene Expression in Acute Ischemic Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 (7), 1275–1287.
- Rink C. et al. (2011) Oxygen-inducible Glutamate Oxaloacetate Transaminase as Protective Switch Transforming Neurotoxic Glutamate to Metabolic Fuel during Acute Ischemic Stroke. *Antioxid. Redox Signal.* 14 (10), 1777–1785.
- Rossi D. J. et al. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.
- Rossi D. J. et al. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.* 10, 1377–1386.
- Rothman S. (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 4, 1884–1891.
- Rowley N. M. et al. (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport, and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem. Int.* 61, 546–558.
- Ryoo K., Park J. Y. (2016) Two-pore domain potassium channels in astrocytes. *Exp. Neurobiol.* 25, 222–232.
- Sakoh M. et al. (2000) Relationship between residual cerebral blood flow and oxygen metabolism as predictive of ischemic tissue viability: sequential multitracer positron emission tomography scanning of middle cerebral artery occlusion during the critical first 6 hours after stroke in pigs. *J. Neurosurg.* 93, 647–657.
- Salter M. G., Fern R. (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 438, 1167–1171.
- Sánchez-Gómez M. V. et al. (2011) Bax and calpain mediate excitotoxic oligodendrocyte death induced by activation of both AMPA and kainate receptors. *J. Neurosci.* 31, 2996–3006.
- Savtchouk I., Volterra A. (2018) Gliotransmission: beyond black-and-white. *J. Neurosci.* 38, 14–25.
- Schenone AL. et al. (2016) Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: a systematic review/meta-analysis exploring the impact of expanded criteria and targeted temperature. *Resuscitation.* 108, 102–110.

- Schoenherr C. J., Anderson D. J. (1995). Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 566–571.
- Seshadri S. et al. (2006) The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. *Stroke* 37, 345–350.
- Seyedsaadat SM. et al. (2020) Selective brain hypothermia: feasibility and safety study of a novel method in five patients. *Perfusion* 35, 96–103.
- Shashidharan P. et al. (1997). Immunohistochemical localization of the neuron specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res.* 773, 139–148.
- Shaw GJ. et al. (2007) Arrhenius temperature dependence of in vitro tissue plasminogen activator thrombolysis. *Phys Med Biol* 52, 2953–67.
- Sheldon A. L., Robinson M. B. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333–355.
- Sheline C. T. et al. (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁺ and inhibition of glycolysis. *J. Neurosci.* 20, 3139–3146.
- Shi S. et al. (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105, 331–343.
- Shibata M. et al. (2000). Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 106, 643–653.
- Shibata T. et al. (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 17, 9212–9219.
- Shih A. Y. et al. (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* 23, 3394–3406.
- Shimohata T. et al. (2007) Epsilon PKC may contribute to the protective effect of hypothermia in a rat focal cerebral ischemia model. *Stroke* 38, 375e380.
- Sivakumar V. et al. (2010) Role of glutamate and its receptors and insulin-like growth factors in hypoxia induced periventricular white matter injury. *Glia* 58, 507–523.
- Smith W. S. et al. (2008) Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: Results of the Multi MERCI Trial. *Stroke* 39 (4), 1205–1212.
- Socodato R. et al. (2018) Redox tuning of Ca²⁺ signaling in microglia drives glutamate release during hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 118, 137–149.
- Somjen G. G. (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol. Rev.* 81, 1065–1096.

- Soria F. N. et al. (2014) Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J. Clin. Invest.* 124, 3645–3655.
- Stanika R. I. et al. (2009) Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 9854–9859.
- Stanko R. et al. (1994) Pyruvate supplementation of a low-cholesterol, low-fat diet: effects on plasma lipid concentrations and body composition in hyperlipidemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 423–427.
- Suda S., Kimura K. (2019) Therapeutic potential of AMPA receptor antagonist perampanel against cerebral ischemia: beyond epileptic disorder. *Neural Regen. Res.* 14, 1525–1526.
- Sugawara T. et al. (2002) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* 22, 209–217.
- Sul J.W. et al. (2016) A novel mechanism for the pyruvate protection against zinc-induced cytotoxicity: mediation by the chelating effect of citrate and isocitrate. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1151–1159.
- Sun Y. et al. (2019) Phased Treatment Strategies for Cerebral Ischemia Based on Glutamate Receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 168.
- Sun YJ. et al. (2019) Neuroprotection by therapeutic hypothermia. *Front Neurosci* 13, 586.
- Szydlowska K. et al. (2007) Neuroprotective activity of selective mGlu1 and mGlu5 antagonists in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 554, 18–29.
- Takagi N. et al. (2012) Effects of metabotropic glutamate mGlu5 receptor antagonist on tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits and cell death in the hippocampus after brain ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 530, 91–96.
- Takeuchi H. et al. (2006) Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* 281, 21362–21368.
- Tanabe Y. et al. (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* 13, 1372–1378.
- Tang XN. et al. (2013) Mild hypothermia reduces tissue plasminogen activator-related hemorrhage and blood brain barrier disruption after experimental stroke. *Ther Hypothermia Temp Manag* 3, 74–83.
- Teichberg V. I. et al. (2009) Homeostasis of Glutamate in Brain Fluids: an Accelerated Brain-To-Blood Efflux of Excess Glutamate Is Produced by Blood Glutamate Scavenging and Offers protection from Neuropathologies. *Neuroscience* 158 (1), 301–308.
- Terao Y. et al. (2009a) Hypothermia enhances heat-shock protein 70 production in ischemic brains. *Neuroreport* 20, 745e749.

- Thompson B. J., Ronaldson, P. T. (2014) Drug delivery to the ischemic brain. *Adv. Pharmacol.* 71, 165–202.
- Todoran R. et al. (2023) microRNA as a therapeutic for ischemic stroke. *Neurochem.*
- Topjian AA. et al. (2019) Pediatric post-cardiac arrest care: a scientific statement from the American heart association. *Circulation* 140, e194– 233.
- Topolnik L. et al. (2006) mGluR1/5 subtype-specific calcium signaling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J. Physiol.* 575, 115–31.
- Torp R. et al. (1997) Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in-situ hybridization analysis. *Anat. Embryol.* 195, 317–326.
- Trendelenburg G. et al. (2002) Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 22, 5879–5888.
- Tretter L., Adam-Vizi V. (2002) Glutamate release by an Na⁺ load and oxidative stress in nerve terminals: relevance to ischemia/reperfusion. *J. Neurochem.* 83, 855–862.
- Truettner J.S. (2011) Therapeutic hypothermia alters microRNA responses to traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 31, 1897e1907.
- Tutor-Crespo M. J. et al. (2004) Activation of Serum Aminotransferases by Pyridoxal-5' -phosphate in Epileptic Patients Treated with Anticonvulsant Drugs. *Clin. Biochem.* 37 (8), 714–717.
- Umebayashi D. et al. (2014) Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J. Neurotrauma* 31, 1967–1974.
- Uzdensky A. B. (2019) Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis* 24, 687–702.
- Vaity C. et al. (2015) Cooling techniques for targeted temperature management post-cardiac arrest. *Crit Care* 19, 103.
- Valbuena S., Lerma J. (2016) Non-canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* 92, 316-29.
- VanGilder R. L. et al. (2012) The transcriptome of cerebral ischemia. *Brain Res. Bull.* 88, 313–319.
- Virgili M. et al. (1995) Simultaneous blockade of non-NMDA ionotropic receptors and NMDA receptor-associated ionophore partially protects hippocampal slices from protein synthesis impairment due to simulated ischemia. *Hippocampus* 5, 91–97.
- Volterra A. et al. (1994). Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 46, 986–992.
- von Engelhardt J. et al. (2007) Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 53, 10–17.

- Wadiche J. I. et al. (1995) Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15, 721–728.
- Waller R. et al. (2018) Metallothionein-I/II expression associates with the astrocyte DNA damage response and not Alzheimer-type pathology in the aging brain. *Glia* 66, 2316–2323.
- Wang F. et al. (2022) Excitatory Synaptic Transmission in Ischemic Stroke: A New Outlet for Classical Neuroprotective Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 23(16), 9381.
- Wang H. et al. (2004) Rapid and selective cerebral hypothermia achieved using a cooling helmet. *J Neurosurg* 100, 272–7.
- Wang H. et al. (2010) Intraarrest selective brain cooling improves success of resuscitation in a porcine model of prolonged cardiac arrest. *Resuscitation* 81, 617– 21.
- Wang H. et al. (2013) The GluN3A subunit exerts a neuroprotective effect in brain ischemia and the hypoxia process. *ASN Neuro* 5, 231–242.
- Wang J. et al. (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* 6, 1039–1047.
- Wang M. et al. (2012) Direct interaction between GluR2 and GAPDH regulates AMPAR-mediated excitotoxicity. *Mol. Brain* 5, 13.
- Wang Q. et al. (2007) The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 184, 53e68.
- Wang Q. et al. (2009) Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. *Neurobiol. Dis.* 36, 223–231.
- Wang Y. C. (2017) Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling and contralesional brain plasticity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 980–993.
- Wang Y. et al. (2021) A system for continuous pre- to post-reperfusion intra-carotid cold infusion for selective brain hypothermia in rodent stroke models. *Transl Stroke Res* 12, 676– 87.
- Westerhuis, L. W., and Hafkenschied, J. C. (1983). Apoenzyme Content of Serum Aminotransferases in Relation to Plasma Pyridoxal-5'-Phosphate Concentration. *Clin. Chem.* 29 (5), 789–792.
- Wetterling F. et al. (2016) Investigating potentially salvageable penumbra tissue in an in vivo model of transient ischemic stroke using sodium, diffusion, and perfusion magnetic resonance imaging. *BMC Neurosci.* 17, 82.
- Woo D. H. et al. (2012) TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell* 151, 25–40.
- Wu C. et al. (2018) Safety, feasibility, and potential efficacy of intraarterial selective cooling infusion for stroke patients treated with mechanical thrombectomy. *J Cereb Blood Flow Metab* 38, 2251–60.

- Wu D. et al. (2020) Reperfusion plus Selective Intra-Arterial Cooling (SI-AC) improve recovery in a nonhuman primate model of stroke. *Neurotherapeutics* 17, 1931–9.
- Wu D. et al. (2022) Selective therapeutic cooling: to maximize benefits and minimize side effects related to hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 42, 213–5.
- Xia P. et al. (2010) Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J. Neurosci.* 30, 11246–11250.
- Xiong M. et al. (2011) post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. *Neurochem. Int.* 58, 625e633.
- Xu J. et al. (2008) Neuroprotection of GluR5-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by Src kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 29355–29366.
- Yan WT. et al. (2022) Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral ischemia? Evidence from cell and rodent studies. *Neural Regen. Res.* 17(8), 1761-68.
- Yang J. et al. (2019) Glutamate-releasing SWELL1 channel in astrocytes modulates synaptic transmission and promotes brain damage in stroke. *Neuron* 102, 813.e6–827.e6.
- Yao G. Y. et al. (2018) Ischemic postconditioning confers cerebroprotection by stabilizing VDACs after brain ischemia. *Cell Death Dis.* 9, 1033.
- Ye S. et al. (2012) Comparison of the durations of mild therapeutic hypothermia on outcome after cardiopulmonary resuscitation in the rat. *Circulation* 125, 123–9
- Ye X. et al. (2017) Activated mGluR5 protects BV2 cells against OGD/R induced cytotoxicity by modulating BDNF-TrkB pathway. *Neurosci. Lett.* 654, 70–79.
- Yenari M. et al. (2008) Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke* 39, 291.
- Yenari M.A. et al. (2005) Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 74e83.
- Yenari M.A., Han H.S. (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 267e278.
- Yi J.S. et al. (2007) Systemic pyruvate administration markedly reduces infarcts and motor deficits in rat models of transient and permanent focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* 26, 94–104.
- Yin L. et al. (2019) Inducing therapeutic hypothermia via selective brain cooling: a finite element modeling analysis. *Med Biol Eng Comput* 57, 1313–22.
- Young Y. et al. (1997) Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury. *Eur. J. Anaesthesiol.* 14, 320–326.

- Zaghmi A. et al. (2020) Sustained Blood Glutamate Scavenging Enhances protection in Ischemic Stroke. *Commun. Biol.* 3 (1), 729.
- Zagrean A. M. et al. (2014) The single versus combinatorial effects of MK-801, CNQX, Nifedipine and AP-3 on primary cultures of cerebellar granule cells in an oxygen-glucose deprivation model. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 55, 811–816.
- Zhai D. et al. (2013) Disruption of the GluR2/GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage. *Neurobiol. Dis.* 54, 392–403.
- Zhang L. et al. (1997) Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality. *J. Neurochem.* 69, 1983–1994.
- Zhang L. et al. (2012) miR-21 represses FasL in microglia and protects against microglia-mediated neuronal cell death following hypoxia/ischemia. *Glia* 60, 1888–1895.
- Zhang L. N. et al. (2019). Are glutamate transporters neuroprotective or neurodegenerative during cerebral ischemia? *J. Mol. Med.* 97, 281–289.
- Zhang Q. et al. (2022) Cell Death Mechanisms in Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury. *Neurochem. Res.* 47, 3525-42.
- Zhang XW. et al. (2015) The effect of mild induced hypothermia on outcomes of patients after cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Crit Care* 19, 417.
- Zhao H. et al. (2007) General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 27, 1879e1894.
- Zhao J. et al. (2019) Transient selective brain cooling confers neurovascular and functional protection from acute to chronic stages of ischemia/reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 1215–31.
- Zhao S. C. et al. (2017) Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 445–458.
- Zhao W. et al. (1997) Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: II. Neurological deficits and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1281–1290.
- Zheng M. et al. (2012) Regulation of nuclear TDP-43 by NR2A-containing NMDA receptors and PTEN. *J. Cell Sci.* 125, 1556–1567.
- Zhou H. H. et al. (2015) Delayed administration of tat-HA-NR2B9c promotes recovery after stroke in rats. *Stroke* 46, 1352–1358.
- Zhou X. et al. (2013) Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* 288, 24151–24159.

Zhu L. (2000) Theoretical evaluation of contributions of heat conduction. *Ann Biomed Eng.* 28, 269–77.

Ziai WC. et al. (2019) Feasibility and safety of transnasal high flow air to reduce core body temperature in febrile neurocritical care patients: a pilot study. *Neurocrit Care* 31, 280–7.

Zlotnik A. et al. (2007) Brain Neuroprotection by Scavenging Blood Glutamate. *Exp. Neurol.* 203 (1), 213–220.

Zlotnik A. et al. (2009) The Neuroprotective Effects of Oxaloacetate in Closed Head Injury in Rats Is Mediated by its Blood Glutamate Scavenging Activity: Evidence from the Use of Maleate. *J. Neurosurg. Anesthesiol* 21 (3), 235–241.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutta la mia famiglia, i miei genitori e i miei fratelli, per avermi supportato e sopportato in questo percorso universitario. Li ringrazio per avermi dato l'opportunità di ottenere questo titolo di studio e per tutti i sacrifici che hanno dovuto fare per rendere possibile ciò.

Ringrazio le mie amiche Alessia, Letizia, Nicole etc. per avermi spronato a non mollare, per esserci state nel momento del bisogno e avere creduto in me.

Ringrazio i miei colleghi Aurora, Sep e Ceci, con cui sono cresciuta in questi cinque anni e con i quali ho condiviso gioie e pianti. Grazie a loro mi porterò dei ricordi bellissimi di questo percorso.

Un ringraziamento speciale va a mia sorella Margherita, che con le sue doti da formattatrice di PowerPoint, ha contribuito alla realizzazione della presentazione della tesi. La ringrazio per essere la sorella migliore del mondo che resterà per sempre al mio fianco.

Ringrazio il mio ragazzo Simone, che più di tutti ha dovuto affrontare i miei momenti di difficoltà, ma nonostante questo è rimasto accanto a me. Grazie per avermi fatto credere di più in me stessa.

Infine, i miei ringraziamenti vanno al mio relatore Prof. Ernesto Fedele nell'avermi accompagnato in questo ultimo step finale.