

태아 백서에서 임신 백서의 자궁 내 대동맥 결찰로 유발한 뇌실주위 백질연화증

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과청소년과, 삼성생명과학연구소*

장윤실 · 성동경* · 강 샘* · 박수경 · 정유진 · 서현주 · 최서희 · 박원순

= Abstract =

Periventricular leukomalacia induced by *in utero* clamping of pregnant rat aorta in fetal rats

Yun Sil Chang, M.D., Dong Kyung Sung*, Saem Kang*, Soo Kyung Park, M.D.
Yu Jin Jung, M.D., Hyun Joo Seo, M.D., Seo Heui Choi, M.D. and Won Soon Park, M.D.

Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine
Samsung Biomedical Research Institute*, Seoul, Korea

Purpose : This study was undertaken to develop an animal model of periventricular leukomalacia (PVL) induced by in utero clamping of pregnant rat aorta in fetal rats.

Methods : A timed pregnant Sprague-Dawley rat on embryonic day 21 just prior to delivery was sedated and anesthetized, and a Harvard ventilator for small animals was applied. Following laparotomy, the maternal aorta was clamped reversibly for 40 minutes using a surgical clip. The fetal rats were then delivered by Cesarean section, resuscitated if necessary, and reared by a surrogate mother rat until postnatal day 21 to obtain the brain specimen. After systemic perfusion and fixation, 10 μ m thick serial brain sections were obtained and stained for pathologic examination and assessment of ventriculomegaly. Ventriculomegaly was assessed by the measured ventricle to total brain volume ratio.

Results : Eight out of eleven fetal rats (73%) survived in the ischemia group after induction of in utero ischemia by clamping maternal rat aorta, and all ten survived in the control group. Body and brain weights measured at postnatal day 21 were significantly lower in the ischemia group compared to the control group. In pathologic findings, significant ventriculomegaly ($3.67 \pm 1.21\%$ vs. $0.23 \pm 0.06\%$) was observed in the ischemia group compared to the control group; although cystic lesion was not observed, mild (n=6) and moderate (n=2) rarefaction of the brain tissue was observed.

Conclusion : A fetal rat model of PVL induced by in utero clamping of pregnant rat aorta was developed. (Korean J Pediatr 2008;51:874-878)

Key Words : Leukomalacia, Periventricular, Infant, Premature, Brain Ischemia, Newborn animal

서 론

뇌실주위 백질연화증(periventricular leukomalacia, PVL)은 미숙아에서 가장 흔하게 발생하는 뇌손상으로 이후 뇌성마비 발생의 중요한 원인질환이다¹⁻³⁾. 최근 신생아 집중치료술의 발달로 PVL의 고위험군인 초극소 저출생 체중아의 생존율이 급격히 향

상되고 있으므로 이들 생존 환아들에서 뇌성마비 발생을 감소시키고 장기적인 예후를 향상시키기 위해서는 PVL에 대한 새로운 치료법 개발이 절실하게 필요한 상황이다. PVL의 병리학적 소견은 대뇌 부위의 손상은 별로 없이 뇌실주위 백질 부위에 선택적인 손상으로 낭종(cyst) 형성 혹은 뇌실 확장 등의 특징적인 소견을 나타내며^{2, 4)} 발병기전은 주로 뇌의 관류(perfusion) 감소로 인한 허혈(ischemia)을 만들어서 발생되는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁹⁾.

향후 PVL의 발병기전을 규명하고 이를 통하여 궁극적으로 이 질환에 대한 새로운 치료법을 개발하기 위해서는 PVL과 유사한 임상적 경과를 보이는 동물실험 모델의 개발이 매우 중요한데, 현재 여러 동물에서 뇌의 저관류(hypoperfusion)에 의한 PVL 발생의 동물실험 모델 확립은 신생 개⁵⁾와 생후 5일 이내의 신생 백서^{6, 7)} 등에서 양측 경동맥 결찰로 드물게 시도된 적은 있으나 뇌 허혈의 발생이 가장 흔한 주산기에 특히 태아백서에서는 아직

Received : 14 May 2008, Revised : 16 July 2008, Accepted : 21 July 2008

Address for correspondence: Won Soon Park M.D.

Department of Pediatrics, Samsung Medicine Center Sungkyunkwan University School of Medicine, 50 Irwon-dong, Kangnam-Ku, Seoul, 135-710, Korea
Tel : +82.2-3410-3523, 3539, Fax : +82.2-3410-0043

E-mail: wonspark@skku.edu

This work was supported by the Korea research foundation grant funded by the Korean government (MOEHRD, basic research promotion fund) (KRF-2006-521-E00062).

시도된 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 출생 직전 임신 백서의 대동맥 결찰로 임상에서 흔히 관찰되는 주산기 가사와 유사한 뇌 손상에 의한 허혈성 뇌손상을 유발하여 태아백서에서 PVL 유발 동물실험 모델을 확립하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 동물실험

본 동물실험 프로토콜은 삼성생명과학 연구소의 기관내 동물 관리와 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)에 의해 검토되고 승인 받았다. 본 연구는 timed pregnant Sprague-Dawley rat을 사용하여 허혈증으로 PVL을 유발시키고자 하였다. 임신일령 21일 분만 직전 상태의 임신 백서를 ether로 진정시킨 후 sodium pentobarbital (5 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg)을 복강 내 투여하여 마취시킨 후 소동물용 인공호흡기(Harvard Apparatus Ltd., Holliston, MA, USA)를 사용하여 인공호흡을 시행하였고 이후 개복술을 실시하여 수술 겸자로 대동맥을 40분 동안 가역적으로 결찰 하였고, 이후 제왕절개술로 태아백서를 분만하고 인공호흡 등의 심폐소생술을 시행하여 안정화된 후 대리모에서 자라도록 하여 생후 21일에 뇌조직의 검체를 얻었다. 대조군은 대동맥 결찰을 제외하고는 동일한 방법으로 시행하여 마찬가지로 생후(postnatal day, P) 21일(P21)에 뇌 조직 검체를 얻었다.

2. 병리학적 검사

뇌조직의 병리학적 검사를 위하여 백서를 10 mg/kg 케타민(Yuhan Corp., Gunpo-si, Gyeonggi-do, Korea)으로 마취하고 4% 포르말린 용액으로 관류하여 안락사 시킨 후 뇌를 곧바로 제거하여 무게를 잰 후 냉동 보호한 후 optimal cutting temperature (OCT) 용액(Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 넣어 재빨리 얼렸다. 10 μ m의 연속 절편을 cryostat(Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA)으로 잘라 80 μ m의 절편 간격으로 슬라이드에 마운트 하였다. 마운트 된 절편들은

공기에 말려 hematoxylin & eosin 염색(H&E) 또는 ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Temecula, CA, USA)으로 TUNEL 염색 후 methyl green으로 핵 대조 염색을 실시하여 Citrosolv (Fischer scientific, Pittsburg, PA, USA) 용액에 씻은 후 Permount (Fisher scientific, Pittsburg, PA, USA)로 커버 슬립하였다. 모든 뇌조직의 정량화는 Olympus BX40 현미경(Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 장착된 Olympus CCD 카메라로 찍었다. 무작위 샘플 방법을 이용하여 한 마리의 뇌에서 약 5-6장의 뇌 절편을 분석하여 피질 하 백질 부위(subcortical white matter)의 병리학적 소견과 뇌실확장 여부를 관찰하였다. 뇌실확장의 정도는 각 연속 절편에서 Optimas 6.51 Image Analysis System (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA)을 사용하여 측정된 전체 뇌 용량에 대한 뇌실용량의 비율로 판단하였다. 뇌 및 뇌실 용량의 측정은 Cavalieri 원칙¹⁰⁾에 따라 계산하였다.

3. 통계적 분석

본 연구의 모든 측정값은 평균±표준편차로 표시하였고 통계학적 분석은 비 모수 방법인 Kruskal-Wallis test를 사용하여 대조군과 실험군 간의 차이를 분석하였다. 통계적 분석은 SAS Enterprise Guide, version 3.0.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)로 하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 체중 및 뇌 중량

임신 백서에서 대동맥 결찰로 자궁 내 허혈증 유발 후 11마리의 태아 백서 중 8마리의 태아백서(73%)가 심폐소생술 시행 후 생존 하였고 대조군은 10마리 모두 생존하였다. 이들에게서 P21에 측정된 체중과 뇌의 중량은 모두 허혈군(ischemia group)에서 정상 대조군 보다 더 유의하게 감소되었다(*P*<0.05, Fig. 1).

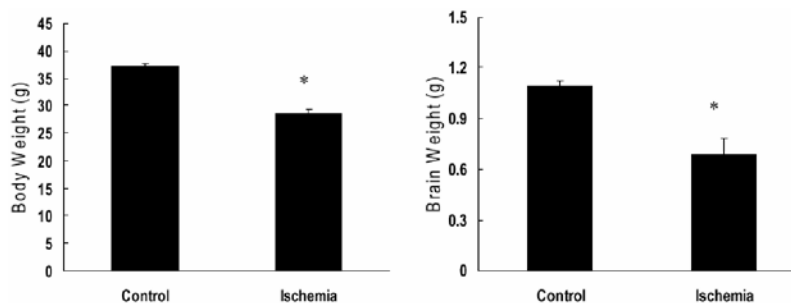


Fig. 1. Body and brain weight at postnatal day 21 in control and ischemia groups. Note significantly reduced body (A) and brain (B) weight in the ischemia group compared to the control group. All values express mean±standard deviation. **P*<0.05 compared to the control group.

2. 뇌실 확장

P21에 얻은 뇌조직의 H&E 염색 무작위 연속 절편에서 측정 한 뇌 용적에 대한 뇌실용적의 비율은 허혈군에서 정상 대조군보다 유의하게 증가하여($3.67 \pm 1.21\%$ vs. $0.23 \pm 0.06\%$) 뇌실 확장이 의미 있게 관찰되었다($P < 0.05$, Fig. 2).

3. 병리학적 소견

뇌조직의 병리학적 소견관찰에서 대조군(Fig. 3A)과 비교하여 허혈군에서 조직학적 양성 병변은 관찰되지 않았으나 세포사를 반증하는 TUNEL 양성 pyknotic 세포들이 증가하고 정상세포 밀도가 줄어든 희박화(rarefaction)가 피질 하 백질 부위에서 6례에서

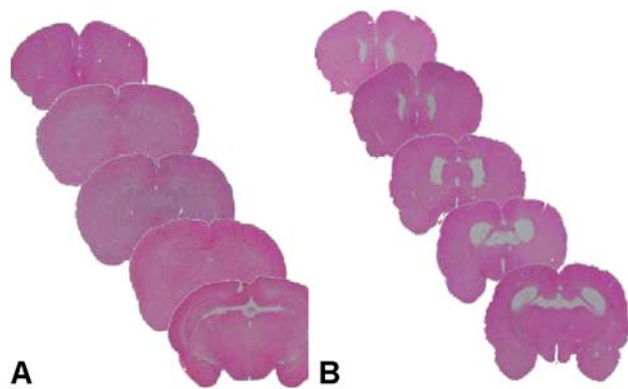


Fig. 2. Representative photomicrographs of serially sectioned brain tissue with hematoxylin-eosin staining in the control (A) and ischemia (B) groups. Note ventriculomegaly observed in the ischemia group.

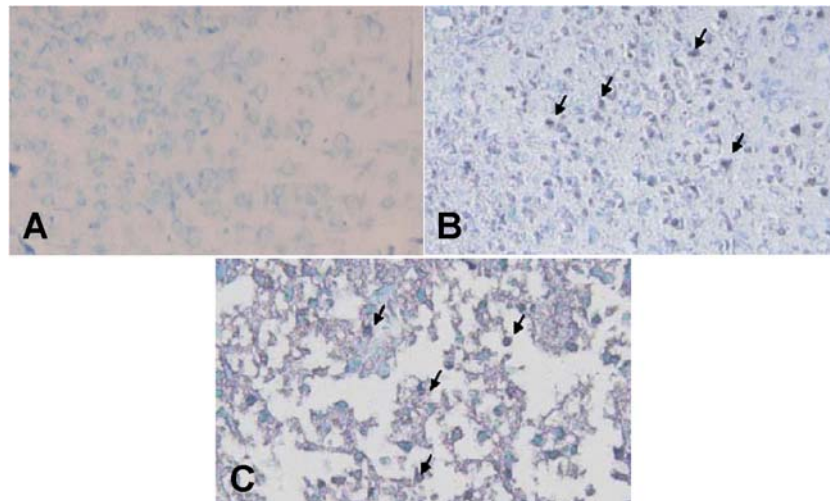


Fig. 3. TUNEL staining of apoptotic cells in paraffin-embedded sections of the cerebral subcortical white matter of normal control (A) and ischemia groups showing mild (B) and moderate (C) rarefaction. Note increased pyknotic apoptotic cells with brown peroxidase TUNEL staining (arrows) in ischemia group compared to normal control group in which most of the cells showed healthy blue methyl green nuclear counterstain. Original magnification $\times 200$.

는 정도(Fig. 3B)로, 2례에서는 중등도(Fig. 3C)로 관찰되었다.

고 찰

PVL은 뇌성마비와 같은 미숙아에서 발생하는 만성 신경학적 장애의 가장 흔한 원인질환이다¹⁻³. 저산소증과 허혈증 때문에 발생하는 뇌 백질 혹은 회백질 부위의 손상은 뇌조직의 발달 상태와 혈관의 성숙 정도에 따라서 서로 다르게 나타나며^{8, 11} 사람에서는 재태기간 23-32주 사이의 미숙아에서는 주로 뇌 백질 부위 손상의 위험이 가장 높고 만삭의 신생아 혹은 성인에서는 이러한 백질 부위만의 뇌손상은 잘 관찰되지 않는다¹². 동물실험 모델에서도 저산소성 허혈성 뇌손상 연구에 가장 많이 사용되는 신생백서의 경우에도 사람 뇌 발달 단계의 재태 기간 36-42주에 해당되는 생후 7-9일에 관찰되는 뇌 백질 부위 손상은 단독으로 나타나기 보다는 주로 뇌 회백질 부위 손상에 이차적으로 관찰된다^{13, 14}. 현재 생후 5일 이내의 신생백서에서 양측 경동맥 결찰을 통한 허혈로 PVL 유발 동물실험 모델을 확립하고자 하는 시도가 있으나^{6, 7} 10 g 미만의 작은 몸무게로 인한 경동맥 결찰 시행의 기술적 어려움과 실험과정 동안 높은 사망률 등의 단점이 있고 경동맥의 항구적인 결찰로 사람에서 심폐소생술 이후의 재관류와 재산소화기(reperfusion and reoxygenation period) 동안의 뇌손상을 재현할 수 없다는 단점이 있다^{3, 15, 16}. 출생 시 신생백서 뇌의 발달 단계는 사람의 재태 기간 22-24주 뇌조직과 유사하다고 생각되며 또한 주산기 가사로 인하여 저산소성 허혈성 뇌손상이 가장 흔한 시기이므로¹² 본 연구에서 사용한 출산직전 임신백서에서 대동맥 결찰로 허혈증을 유발하여 태아백서에 PVL 유발 동물실험 모델은 뇌의 발달 단계와 실험 수행의 용이

성 등을 고려할 때 PVL의 임상경과를 잘 재현할 수 있는 데에 적합한 동물실험 모델로 생각된다.

Olivier 등¹⁶⁾은 임신 17일째에 허혈증으로 자궁 내 태아백서에 뇌 백질 손상을 유발할 경우 이후 발육지연이 생후 60일까지 회복되지 않았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 허혈군에서 생후 21일까지 체중과 뇌 중량의 지속적인 감소를 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 임신백서의 자궁동맥 기시부위만을 선택적으로 결찰하기가 기술적으로 매우 어려워서 대동맥 부위를 결찰 하였고, 또한 이후 분만과정의 회복기에 정상 산소포화도를 갖는 주산기가사 환아에서 임상적으로 관찰되는 재 관류와 재산소화가 동안의 뇌 손상을 재현하기 위하여 수술 겸자를 사용하여 대동맥을 가역적으로 결찰 하였다^{3, 15, 16)}. 본 연구에서는 40분간의 대동맥 결찰로 11마리의 태아백서 중 3마리(27%)가 사망하였는데, 향후 뇌 손상은 극대화하고 사망률은 최소화할 수 있는 PVL 유발 동물실험 모델의 개발을 위하여 허혈증 유발의 최적 시간¹⁷⁾과 지속적 혹은 간헐 반복적과 같은 허혈증 유발 방법¹⁸⁾에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

PVL 발생의 고위험 시기가 존재하는 이유는 뇌의 발달 단계와 연관되어 있다고 알려져 있다^{3, 8, 11)}. PVL은 뾰지교세포(oligodendrocyte)의 손상으로 말기집 형성(myelination) 장애를 유발하여 발생하는데^{12, 17)}, 이 뾰지교세포는 뇌의 발달 단계에 따라서 초기 원조 뾰지교세포(early oligodendrocyte progenitor), 후기 원조 뾰지교세포(late oligodendrocyte progenitor), 미성숙 뾰지교세포(immature oligodendrocyte)와 성숙 뾰지교세포(mature oligodendrocyte)의 순으로 성숙되고¹⁹⁾ 이중 특히 말기 원조 뾰지교세포가 저산소증과 허혈증에 의해 유발되는 고사(apoptosis)에 가장 민감하지만, 초기 원조 뾰지교세포와 성숙 뾰지교세포는 이러한 손상에 대해 저항성이 매우 강하다¹²⁾. 사람에서는 PVL의 호발시기인 제태 기간 23-32주 뇌 백질의 뾰지교세포 발달 단계가 후기 원조 뾰지교세포기에 해당하며²⁰⁾ 신생백서에서는 생후 1-5일이 이 시기에 해당 한다²¹⁾. 본 연구에서 주산기 태아백서에서도 사람 PVL 환아에서 흔히 관찰되는 뇌실 확장과 뇌 백질의 희박화가^{2, 4)} 관찰되었으므로 신생백서에서 PVL 발병의 고위험 시기가 주산기 까지 연장될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

PVL 발생의 가장 흔한 원인은 허혈증으로 혈관의 성숙 정도에 따라서 발생의 위험성이 다른데 미숙아에서는 혈관 생성이 완전하지 않고 부수적 순환(collateral circulation)이 적어서 뇌 허혈 시에 혈관의 말단 백질 부위와 각 동맥혈관의 경계 부위에 주로 뇌손상이 발생한다^{8, 11)}. 특히 뇌 백질 부위로의 혈액 공급이 회백질 부위보다 더 적으므로 뇌 혈류량이 중등도로 감소될 경우에는 선택적인 백질 부위 손상만이 관찰될 수 있다⁹⁾. 임상적으로는 미숙아에서 뇌 허혈 혹은 혈류량 감소를 유발할 수 있는 저혈압과 저 탄산혈증 등을 피하는 것이 PVL 예방에서 매우 중요하다고 생각된다^{9, 22)}.

PVL에서 뇌 허혈로 인한 뾰지교세포 손상의 세포병리학적 기전은 아직 확실하게 밝혀지지는 않았으나, 특히 excitotoxicity²³⁾,

oxidative stress²⁵⁾, 염증반응^{26, 27)}과 고사 경향²⁸⁾ 등이 관계한다고 알려져 있다. 향후 본 연구에서 개발된 PVL 유발 동물실험 모델을 활용하여 세포손상의 기전을 규명하고 이를 통하여 궁극적으로 PVL에 대한 새로운 치료법 개발이 가능할 수 있을 것으로 기대한다.

요 약

목적: 본연구의 목적은 자궁 내 태아 백서에서 임신 백서의 대동맥 결찰로 허혈증을 유발하여 뇌실주위(PV) 유발 동물실험 모델을 개발하고자 하는 데 있다.

방법: 임신일령 21일 분만 직전 상태의 Sprague-Dawley rat를 진정 및 마취시킨 후 소동물용 하바드 인공호흡기를 사용하여 인공호흡을 시행하였고 이후 개복술을 실시하여 수술 겸자로 대동맥을 40분 동안 가역적으로 결찰 하였고, 이후 제왕절개술로 태아백서를 분만하고 인공호흡 등의 심폐소생술을 시행하여 안정화된 후 대리모에서 자라도록 하여 생후 21일에 뇌조직의 검체를 얻었다. 뇌조직의 검체는 관류한 후 고정하여 10 μm 두께의 연속 절편을 만들어서 병리학적 소견과 뇌실확장(ventriculomegaly) 여부를 관찰하였다. 뇌실확장의 정도는 각 연속 절편에서 측정된 전체 뇌 용량에 대한 뇌실용량의 비율로 판단하였다.

결과: 임신 백서에서 대동맥 결찰로 자궁 내 허혈증 유발 후 11마리의 태아 백서 중 8마리(73%)의 태아백서가 심폐소생술 시행 후 생존 하였고 정상 대조군은 10마리 모두 생존하였으며 생후 21일에 측정된 체중과 뇌의 중량 모두 허혈군에서 정상 대조군 보다 더 유의하게 감소되었다. 병리학적 소견 상 뇌조직의 연속 절편에서 측정된 뇌실용량의 비율은 허혈군에서 대조군보다 유의하게 증가하여(3.67±1.21% vs 0.23±0.06%) 뇌실 확장이 관찰되었으며 뇌조직의 낭성 병변은 관찰되지 않았으나 뇌조직의 희박화(rarefaction)는 6례에서는 경도로, 2례에서는 중등도로 관찰되었다.

결론: 자궁 내 태아백서에서 임신백서의 대동맥 결찰로 허혈증을 유발하여 PVL 유발 동물실험 모델을 개발할 수 있었다.

References

- 1) Kuban KC, Leviton A. Cerebral palsy. N Engl J Med 1994; 330:188-95.
- 2) KragelohMann I, Toft P, Lunding J, Andersen J, Pryds O, Lou HC. Brain lesions in preterm: origin, consequences and compensation. Acta Paediatr 1999;88:897-908.
- 3) Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. Pediatr Res 2001;50:553-62.
- 4) Leviton A, Gilles F. Ventriculomegaly, delayed maturation, white matter hypoplasia, and "periventricular" leukomalacia: how are they related? Pediatr Neurol 1996;15:127-36.
- 5) Yoshioka H, Goma H, Nioka S, Ochi M, Miyake H, Zaman

- A, *et al.* Bilateral carotid artery occlusion causes periventricular leukomalacia in neonatal dogs. *Brain Res Dev Brain Res* 1994;78:273-8.
- 6) Uehara H, Yoshioka H, Kawase S, Nagai H, Ohmae T, Hasegawa T, *et al.* A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res* 1999;837:213-20.
 - 7) Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rhodes PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 2001;898:126-35.
 - 8) Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2001:307-330.
 - 9) Greisen G, Borch K. White matter injury in the preterm neonate: The role of perfusion. *Dev Neurosci* 2001;23:209-12.
 - 10) Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003;75:469-86.
 - 11) Kenney HC, Armstrong DD. Perinatal neuropathology. In: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfield's Neuropathology*. London: Arnold Publishers 1997:537-600.
 - 12) Back SA, Han BH, Luo NL, Chrifton CA, Xanthoudakis S, Tam J *et al.*: Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *N Neurosci* 2002;22:455-83.
 - 13) Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974;53:2-6.
 - 14) Whitelaw A, Thorensen M. Antenatal steroids and the developing brain. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83:F154-7.
 - 15) Wigglesworth JS. Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Pathol Bacteriol* 1964;88:1-13.
 - 16) Olivier P, Baud O, Evrard P, Gressens P, Verney C. Prenatal ischemia and white matter damage in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:998-1006.
 - 17) Liu Y, Silverstein S, Skoff R, Barks JDE. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res* 2002;51:25-33.
 - 18) Marumo G, Kozuma S, Ohyu J, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, *et al.* Generation of periventricular leukomalacia by repeated umbilical cord occlusion in near-term fetal sheep and its possible pathogenetical mechanisms. *Biol Neonate* 2001;79:39-45.
 - 19) Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *trends Cell Biol* 1993;3:191-7.
 - 20) Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001;21:1302-12.
 - 21) Gard AL, Pfeiffer SE. Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development* 1989;106:119-32.
 - 22) Gorem G, Vannucci RC. Is periventricular leukomalacia a result of hypoxic-ischemic injury? *Biol Neonate* 2001;79:194-200.
 - 23) Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci* 1993;13:1441-53.
 - 24) Follet PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* 2000;20:9235-41.
 - 25) Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 1998;18:6241-53.
 - 26) Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 2000;47:64-72.
 - 27) Dommergues MA, Pqt kai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P. Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallidum. *Ann Neurol* 2000;47:54-63.
 - 28) Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, *et al.* BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* 2000;7:38-53.