

## Strategie terapeutiche attuali nel danno neurologico del neonato asfittico

Mario MARCONI

*Unità Operativa Assistenza Neonatale, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma*

**Riassunto.** - L'encefalopatia ipossico-ischemica conseguente all'asfissia perinatale, rappresenta una delle principali cause di mortalità e di sequele neurologiche tra i neonati a termine. Gli interventi terapeutici che agiscono sui meccanismi, ora meglio conosciuti, che producono il danno cerebrale, hanno effetti neuroprotettivi. Vengono discussi l'uso dell'ossigeno nella rianimazione alla nascita, i farmaci in uso terapeutico sperimentale e la neuroprotezione ipotermica. Studi prospettici futuri dovranno approfondire la valutazione dell'efficacia dei singoli approcci terapeutici nella prospettiva di considerarne un utilizzo combinato.

*Parole chiave:* asfissia, danno cerebrale, rianimazione neonatale, stress ossidativo, neuroprotezione farmacologica, ipotermia.

**Summary** (*Recent therapeutic strategies of brain damage in the asphyctic newborn*). - Perinatal hypoxia-ischaemia is a major cause of mortality and neurological sequelae in term newborn. Modulation of mechanisms leading to brain cell death, in the so-called therapeutic window, may reduce apoptosis and necrosis. Oxidative stress and newborn resuscitation, early postnatal pharmacological treatment and hypothermic neuroprotection are described. Additional controlled prospective trials are warranted on newborns. A combination of neuroprotective agents with synergistic effects could represent a potential treatment strategy.

*Key words:* asphyxia, brain injury, newborn resuscitation, oxidative stress, pharmacological neuroprotection, hypothermia.

### Introduzione

L'asfissia perinatale costituisce una causa importante di danno cerebrale perinatale acquisito nei neonati a termine. L'incidenza di morte o di limitazioni neurologiche gravi consecutive ad asfissia perinatale è di 0,5-1,0 per 1000 nati vivi nei paesi industrializzati [1-3], mentre nei paesi in via di sviluppo l'asfissia perinatale risulta avere un'incidenza maggiore [5-8]. È stato calcolato che, su 130 milioni di nascite annue nel mondo, 4 milioni di neonati soffrono di asfissia perinatale, e di questi circa 1 milione muore mentre un numero equivalente riporta sequele di rilievo [9], con prevalenza maggiore nei paesi in via di sviluppo, e con un numero approssimativo di neonati colpiti che va da 8000 a 25000 nella sola area europea.

Non è stata tuttora raggiunta una definizione univoca di asfissia perinatale e la definizione rimane clinica. L'asfissia perinatale è caratterizzata da un periodo variabile di ipossia-ischemia globale, seguito da riperfusione e riossigenazione. Durante l'insulto ipossico-ischemico viene causato un danno neuronale primario con necrosi cellulare [10]. La rianimazione neonatale e la rinnovata disponibilità di ossigeno e di flusso ematico, sebbene necessaria per limitare il danno cellulare ischemico, determina una fase di ossigenazione

e riperfusione che produce un danno ritardato, secondario, neuronale. Il meccanismo ritenuto responsabile di questa fase secondaria della lesione neuronale è la produzione di radicali liberi dell'ossigeno [11], l'ingresso del calcio intracellulare [12] e la successiva morte cellulare per apoptosi [13]. Inoltre la presenza di convulsioni è un dato comune della encefalopatia ipossico/ischemica [14], e rappresenta una causa aggiuntiva di danno, producendo aumento della richiesta metabolica del sistema nervoso centrale (SNC) [15], rilascio di neurotrasmettitori eccitatori [16], fluttuazioni nella pressione arteriosa sistemica [17], ipossia ed ipercapnea.

Diverse terapie hanno dimostrato di essere neuroprotettive nei modelli animali di ipossia-ischemia, ma soltanto pochi interventi terapeutici sono stati utilizzati in studi clinici su neonati a termine. Al presente non esistono quindi strategie terapeutiche consolidate che possano essere applicate in modo certo. Il *management* clinico attuale del neonato a rischio di danno post-asfittico si limita, nella maggior parte dei centri, a misure di supporto.

In questa rassegna vengono presentate alcune possibili strategie terapeutiche, ancora in fase sperimentale. La scelta della terapia da adottare dovrà tenere in considerazione i fattori che seguono:

- molti concetti scientifici della encefalopatia ipossico/ischemica derivano da studi sugli adulti, che spesso hanno esiti unilaterali o focali e non sono perciò direttamente applicabili alla fisiopatologia perinatale;

- le fasi dello sviluppo delle funzioni cerebrali fetoneonatali e la vulnerabilità dello sviluppo vascolare e cellulare creano una condizione di maggiore fragilità. Peraltro molti processi coinvolti nel danno cellulare avvengono normalmente nel corso dello sviluppo normale del SNC, quali l'apoptosi e la morte cellulare programmata. D'altro canto la plasticità del cervello in formazione contribuisce all'abilità di superare alcuni deficit;

- la dimensione tempo dell'insulto ipossico-ischemico assume una specifica importanza in relazione al parto. Danni prenatali si manifestano diversamente da lesioni postnatali. Valutazioni a lungo termine di danni procurati alla stessa età gestazionale ad un neonato prematuro e ad un feto possono essere significativamente differenti. La sensibilità tissutale tra prematuri e neonati a termine per danni vascolari simili è molto diversa e in assoluto la definizione temporale dell'inizio del danno è un importante problema diagnostico nell'uomo;

- i parametri metabolici dell'asfissia e i segni clinici del *distress* fetale non permettono di essere associati direttamente tra loro e, quindi, una diagnosi conclusiva in tempo reale di asfissia cerebrale non è al momento possibile;

- vanno tenuti in considerazione i tempi lunghi dello sviluppo dell'uomo per la verifica delle manifestazioni cliniche consecutive a deficit cerebrali in comparazione agli animali sperimentali;

- l'associazione tra valutazione di sviluppo neurologico, valutazioni istopatologiche del danno, diagnostica elettrofisiologia, *imaging* non invasivo e tecniche neurochimiche non risultano facilmente associabili come negli studi sperimentali.

Gli interventi proponibili fino ad oggi sono basati su tre aree principali:

- impiego dell'ossigeno nella rianimazione del neonato asfittico,
- l'utilizzo di farmaci in sperimentazione,
- la neuroprotezione con il freddo.

### **Uso dell'ossigeno nella rianimazione del neonato asfittico**

La transizione da feto a neonato è normalmente caratterizzata da una serie complessa di eventi fisiologici che comunque richiedono, fino al 10% dei casi, qualche tipo di rianimazione attiva alla nascita [18].

La maggior parte dei testi di rianimazione in neonatologia e in medicina neonatale raccomanda l'uso dell'ossigeno al 100% [19-21]. *The American Heart Association* (AHA) e l'*American Academy of Pediatrics*

(AAP) raccomandano l'uso di O<sub>2</sub> puro nei neonati in fase di stabilizzazione in caso di bradicardia o cianosi alla nascita [19]. Recentemente, le linee guida proposte da un *consensus* internazionale di esperti (*International guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care*) indicano l'uso dell'ossigeno al 100% nella rianimazione del neonato asfittico al fine di ottenere i valori normali di saturazione. L'*International Liaison Committee on Resuscitation*, qualora l'ossigeno non risultasse disponibile, indica la ventilazione con aria ambiente, che viene considerata un'alternativa terapeuticamente efficace [22].

Negli ultimi anni, tali indicazioni sono state messe in discussione da una quantità di ricerche sviluppatesi a partire da dati sia clinici che sperimentali. Va tenuto presente che già in epoche immediatamente precedenti, l'uso di ossigeno iperbarico era ritenuto il presidio fondamentale per la rianimazione neonatale [23], ciò fino ad alcuni *trials* randomizzati che mettevano a confronto O<sub>2</sub> iperbarico ed intubazione endotracheale con pressione positiva intermittente, in cui i risultati apparivano identici [24]. Solo venti anni più tardi si sono avviati studi per verificare l'ipotesi che l'aria fosse altrettanto efficiente che l'O<sub>2</sub> puro nella rianimazione dei neonati.

Il principio di base faceva perno sull'ipotesi che i radicali liberi generati dalla ipoxantina-xantina ossidasi vengano prodotti in eccesso nel periodo di riossigenazione post ipossica, sulla base di studi *in vitro*, che indicavano una relazione proporzionale tra concentrazione di O<sub>2</sub> e produzione di radicali ossigeno [25].

Gli studi iniziali in questo senso [26], hanno dimostrato in neonati di maiale ipossici una PO<sub>2</sub> di 380 mmHg, dopo 5 minuti di rianimazione con ossigeno puro, laddove la rianimazione con aria, in tempi analoghi, portava la PO<sub>2</sub> da 38 mmHg a 87 mmHg. Uno studio analogo condotto su neonati a termine, esposti in sala parto ad O<sub>2</sub> al 75%, ha dimostrato come essi raggiungessero, in un minuto, valori di PaO<sub>2</sub> intorno ai 400 mmHg [27].

Altri autori hanno valutato in modelli animali pressione arteriosa media, frequenza cardiaca, pH ed ipoxantina plasmatica con tempi di normalizzazione analoghi nei due gruppi e valutazione istomorfologica cerebrale senza differenze significative [28]. A seguire studi più recenti hanno misurato la quantità di ipoxantina su microdialisi di corteccia cerebrale dimostrando una normalizzazione significativamente più lenta nel gruppo rianimato in O<sub>2</sub> [29].

Sulla base dell'insieme di questi dati si sono sviluppati studi pilota su neonati: inizialmente su 84 casi [30], in cui non si registravano differenze significative nella frequenza cardiaca, gas ematici ed equilibrio acido-base, mentre alla nascita si osservava un punteggio Apgar più elevato nel gruppo in aria. La sopravvivenza dei neonati e le valutazioni neurologiche a distanza erano sovrapponibili.

### *Effetti negativi della rianimazione con ossigeno puro*

Lo studio Resair 2 [31] ha dimostrato che i neonati possono essere rianimati con successo con aria ambiente e i risultati indicano che ci sono alcuni effetti negativi collegati alla rianimazione con ossigeno al 100%. Questi dati sono stati, fino ad oggi, pressoché trascurati ma, assieme agli elementi sperimentali raccolti da gruppi di studio negli anni passati, rendono oggi possibile giungere ad un'identificazione di tali effetti.

*Effetti della iperossia sulla ventilazione.* - Il Resair 2 ha dimostrato che il tempo della comparsa del primo respiro e del pianto sono allungati in neonati rianimati con ossigeno puro in confronto con quelli rianimati in aria ambiente. Questo potrebbe indicare che si verifica un effetto immediato sulla ventilazione, che successivamente determina l'abbassamento del punteggio di Apgar nel corso del primo minuto di vita. Hutchinson [32] ha dimostrato come, oltre i 45 secondi di rianimazione, i valori di ventilazione minuto risultano del 50% più elevati con aria piuttosto che con ossigeno. Tali valori perdurano fino a 105 secondi e la PaCO<sub>2</sub> risulta significativamente più alta nel gruppo rianimato con O<sub>2</sub>. La rianimazione in ossigeno puro ritarda, in confronto all'aria, i tempi del recupero, a causa della depressione della ventilazione [33].

*Effetti della iperossiemia sul consumo di ossigeno.* - Studi su volontari hanno dimostrato che miscele del 100% di ossigeno incrementano la PaO<sub>2</sub> media da 95 fino a 475 mmHg (12,7-63,3 kPa) e diminuiscono frequenza, gittata, lavoro cardiaco e resistenze polmonari, indicando un fattore sfavorevole della rianimazione con ossigeno al 100% che potrebbe essere causato da un decremento del consumo di ossigeno durante l'esposizione iperossica. Studi analoghi con pazienti critici esposti per periodi limitati fino a 90 minuti al 100% di ossigeno dimostrano iperossiemie fino a 400 mm HG di PaO<sub>2</sub> con scarsa distribuzione del flusso ematico e assorbimento dell'ossigeno diminuito del 10%. Valori in epoca neonatale studiati da Mortola [33] descrivono come neonati dopo esposizione di alcuni minuti ad ossigeno al 100% presentino un incremento medio del 45% del lavoro respiratorio e del consumo metabolico. A livello cerebrale, oltre che a livello retinico, il cui effetto di costrizione arteriolare dovuto all'esposizione è noto, la riduzione di flusso ematico neonatale appare notevole e sembra decrescere con la maturità [34]. Gli studi sul flusso ematico cerebrale, che hanno paragonato aria e O<sub>2</sub> all'80% durante la iniziale stabilizzazione alla nascita [35], presentavano una riduzione media del 23% a 2 ore di vita nel gruppo arricchito con ossigeno. Tale riduzione del flusso cerebrale risultava ulteriormente prolungata nella popolazione dei pretermine, sebbene esposti per periodi brevi ad iperossia.

*Effetti dell'iperossia sui radicali liberi e sull'infiammazione.* - Durante l'ipossia si accumula ipoxantina, metabolita della purina, che durante la riossigenazione genera radicali ossigeno. Tale meccanismo, dedotto inizialmente nel 1980 [36], è stato successivamente confermato ed integrato da studi che dimostrano come i radicali liberi possano essere prodotti nei mitocondri da più fonti. L'acido arachidonico ed altre sostanze come le catecolamine possono essere ossidate e generare radicali liberi, producendo una perossidazione lipidica delle membrane cellulari o ossidare proteine o DNA, ed indurre apoptosi [37]. La produzione di radicali liberi aumenta all'aumentare della concentrazione di ossigeno. E' stato dimostrato in diversi studi su animali [38] che essi vengono prodotti in quantità notevole durante la riperfusione dopo ischemia e che la riossigenazione di cavie neonate con il 100% di ossigeno produceva una quantità significativamente più alta di radicali ossigeno a livello della corteccia cerebrale a confronto con la rianimazione con aria [39]. Peraltro è ben noto che i radicali O<sub>2</sub> sono dei potenti vasoregolatori ed agiscono come vasocostrittori al livello del polmone o dilatatori in organi come il dotto arterioso ed il cervello [40] e con relazioni più complesse tra radicali ossigeno e circolazione con il variare della loro concentrazione [41].

I danni da riperfusione sono associati con l'attivazione dei leucociti e delle cellule endoteliali [42]. E' dimostrato come la riperfusione dopo ischemia nella corteccia cerebrale dei ratti produca un accumulo di mieloperossidasi che riflette l'infiltrazione neutrofila, con un'adesione di molecole sulle cellule endoteliali che attivate dalle citochine e da altri mediatori producono radicali O<sub>2</sub>, in fase di ipossia e riossigenazione [43, 44]. Sperimentazioni recenti hanno confermato una produzione aumentata di radicali liberi nel tessuto polmonare delle cavie neonate rianimate in ossigeno puro [45].

Anche Vento [46], su un numero elevato di neonati rianimati alla nascita, ha confermato come l'utilizzo dell'aria normalizzi i *pattern* respiratori prima di quanto faccia l'ossigeno al 100%. In aggiunta, i valori di PaO<sub>2</sub> rilevati anche fino a 10 minuti dopo la cessazione della ventilazione con pressione positiva in ossigeno, risultavano di molto superiori ai valori fisiologici. Quindi per i neonati aver ricevuto un ammontare significativamente maggiore di ossigeno per kg di peso corporeo costituisce uno stimolo ossidativo che viene correlato positivamente con alte concentrazioni di glutazione ossidato. Ciò si verifica nonostante l'attivazione della glutazione reductasi e degli enzimi antiossidanti come superossido dismutasi (SOD) e catalasi, suggerendo che il sistema di difese antiossidanti del neonato, di cui il glutazione è il rappresentante intracellulare più importante, può essere sopraffatto da un accumulo di radicali liberi generati in fase di riperfusione in

un'atmosfera iperossica. L'alterazione del rapporto glutazione ossidato/glutazione ridotto (GSH/GSSG) si sbilancia con un incremento evidente di quest'ultimo. In questa condizione secondo Vento [46] i neonati rianimati in aria risultavano capaci di ristabilire un rapporto adeguato tra GSH/GSSG, mentre i neonati rianimati con ossigeno mantenevano un'alterazione, perdurante fino a quattro settimane del rapporto GSH/GSSG. Il perdurare di questo stress ossidativo può produrre effetti variabili sull'attività di proliferazione cellulare, dall'incremento della proliferazione all'apoptosi, lasciando intravedere oltre ai danni tissutali immediati una serie di conseguenze a lungo termine.

*Effetti dell'iperossia sul metabolismo cerebrale.* - In modelli animali neonatali con asfissia indotta si osservava un ritorno ai livelli di base di sodio, potassio, e ATPasi a livello del corpo striato entro circa due ore se esposti ad aria in contrasto con quelli trattati con il 100% di ossigeno, che presentavano inibizione persistente o ridotta di sodio, potassio e riduzione drastica della ATPasi [47]. Altri autori hanno registrato un livello extra cellulare di dopamina incrementato nel cervello dopo ipossia e riossigenazione che può esacerbare il danno cerebrale in presenza di rianimazione con ossigeno al 100% in confronto a quella con aria.

La misurazione di ossido nitrico effettuata direttamente sulla corteccia di cavie neonate ha mostrato un incremento notevole in corso di rianimazione con O<sub>2</sub> al 100% comparata con l'aria. Questi dati indicano che la riossigenazione in ossigeno puro risulta in una produzione aumentata di composti tossici a livello cerebrale.

*Effetti positivi della rianimazione con ossigeno puro o con basse concentrazioni di ossigeno*

Lo studio Resair 2 non ha escluso completamente che alcuni sottogruppi di neonati possano beneficiare dall'iniziare la rianimazione con ossigeno supplementato. Peraltro anche nei gruppi con sindrome da aspirazione meconiale, bradicardia intensa ed Apgar basso, analizzati separatamente, non si è dedotto alcun effetto negativo dall'uso dell'aria, ma il numero di casi esaminati non appare ancora sufficiente.

Se l'iperossia durante la riossigenazione è dannosa, si potrebbe ipotizzare che una concentrazione di ossigeno inferiore al 21% possa essere benefica. Esistono studi che hanno utilizzato concentrazioni di circa 40-45 mmHg (5,3-6,0 kPa) comparati con normossia, che hanno dimostrato migliore ripresa post-ischemica spinale nei conigli [48], miglioramento dell'inibizione della sintesi di proteine cerebrali [49] e, con una reintroduzione graduale di ossigeno, minori danni da riperfusione a livello dello stomaco [50]. Gli studi che paragonavano ossigeno al 21%, 12%, 8,5% nella rianimazione di cani

dopo arresto cardiaco non mostravano grandi vantaggi se comparati con l'impiego di aria. Il gruppo esposto al 8,5% presentava a distanza performances neurologiche peggiori. Questi ed altri autori concludono che né iperossia né ipossia sono livelli da raggiungere durante la rianimazione per minimizzare i danni neurologici e migliorare la prognosi.

*Rianimazione dei pretermine.* - Il pretermine presenta una necessità di rianimazione maggiore del neonato a termine, ma non vengono indicate linee guida specifiche e la World Health Organization stabilisce principi analoghi da applicare tanto al prematuro quanto al neonato a termine [1]. Lo stesso vale per la *International Liaison Committee on Resuscitation* [22], ma in via teorica il neonato pretermine potrebbe risultare più vulnerabile ad alte concentrazioni di ossigeno e quindi probabilmente l'esposizione a concentrazioni elevate di questo gas dovrebbe essere attentamente considerata.

La rianimazione neonatale è un'evenienza molto frequente, praticata su un numero di neonati che va da 4 a 7 milioni ogni anno ed ogni gradino di tale rianimazione dovrebbe essere fondato sulla "medicina basata sull'evidenza", cosa che attualmente non avviene. L'uso di alte concentrazioni di ossigeno, mai testato in precedenza, sembra produrre un certo numero di effetti negativi. Nuove linee guida per la rianimazione neonatale, basate sui dati attualmente accumulati, sembrano suggerire che essa debba avvenire né in iperossia né in ipossia e comunque l'esecuzione di una rianimazione ottimale dovrebbe essere eseguita con un monitoraggio continuo della saturazione di ossigeno.

### Utilizzo di farmaci in sperimentazione

Non è stato a tutt'oggi definito alcun protocollo di trattamento farmacologico di provata efficacia per combattere le sequele dell'asfissia neonatale. Tuttavia interventi terapeutici che riescano ad interferire con ciascuno dei gradini del processo di cascata dei mediatori patologici possono potenzialmente prevenire la morte cellulare o ridurre il grado di lesione, il tutto in un equilibrio tra effetti ossidanti e difese antiossidanti.

*Chelanti del ferro non legato a proteine, inibitori della xantina-ossidasi e scavengers dei radicali liberi*

La perossidazione lipidica delle membrane cellulari neuronali costituisce un effetto della compromissione della funzione mitocondriale, con perdita di radicali liberi dai mitocondri nel citoplasma [51]. L'abbassamento del pH intracellulare durante l'ipossia-ischemia dà l'avvio al rilascio di ioni metallici dalle loro proteine leganti, con la formazione di radicale idrossilico. Con la riperfusione e la riossigenazione, si genera una produzione indotta dal calcio di ulteriori quantità di

radicali liberi e fosfolipasi con effetti sulla membrana cellulare e rilascio di acido arachidonico, che stimola la ciclossigenasi con formazione di una prostaglandina che produce radicale superossido. Peraltro la conversione di ipoxantina dovuta alla riossigenazione, aumenta ulteriormente la quantità di superossido. L'eliminazione dei metalli non legati tramite chelanti del ferro, come la *desferrosamina*, previene la formazione dei radicali liberi e, in studi su animali neonati, è stata utilizzata con prevenzione del decremento della attività  $Na^+/K^+$ /ATPasi delle cellule corticali, con un mantenimento dell'attività elettrica e metabolica cerebrale [52]. Questo farmaco, utilizzato con babbuini neonati in corso di malattia da membrane ialine, ha però prodotto effetti vascolari tossici [53].

Il danno da radicali liberi può essere, in teoria, limitato potenziando la disponibilità degli *scavengers* (per es. catalasi e SOD), inibendo la perossidazione lipidica (per es. con alfa tocoferolo o lazaroidi) o inattivando i meccanismi che amplificano la loro tossicità (per es. chelanti del ferro). L'*acido ascorbico* plasmatico costituisce la prima linea di difesa contro i radicali liberi e la perossidazione lipidica si osserva soltanto dopo consumo dell'acido ascorbico *in situ*. Nel feto l'acido ascorbico è uno dei principali sistemi antiossidanti, mentre i sistemi antiossidanti enzimatici non si sviluppano fino alla fine del terzo trimestre [54]. Tuttavia i livelli plasmatici di acido ascorbico declinano rapidamente dopo il parto e tale reazione improvvisa può risultare in un incremento del rischio di danno ossidativo. Si ritiene che l'acido ascorbico agisca come un neuro-modulatore che facilita il rilascio di neurotrasmettitori e inibisce gli NMDA recettori. Nelle sperimentazioni animali, su modelli di coniglio pretermine la somministrazione di acido ascorbico (150 mg/kg in bolo + infusione continua di 60 mg/kg/h) determina l'incremento della sopravvivenza cellulare a livello corticale e dell'ippocampo. Se l'acido ascorbico viene associato con un analogo della vitamina E ne risulta un miglioramento ulteriore della vitalità cellulare e della valutazione istologica nelle 24 ore post-afissia [55]. Gli aspetti problematici dell'uso dell'acido ascorbico sono legati al dosaggio ottimale efficace per la neuroprotezione. Il sovradosaggio può risultare dannoso, in concentrazioni millimolari, su colture di neuroni corticali producendo un'inibizione della sintesi proteica con successiva morte neuronale. La somministrazione di acido ascorbico nei prematuri ad alto rischio [56] a dosi di 100 mg/kg/die per la prima settimana di vita sembra non produrre un incremento dell'emolisi, disfunzioni renali, infezioni, displasia broncopolmonare o emorragia intraventricolare. L'accumulo dell'acido ascorbico nel cervello può richiedere una fase di ossidazione nel plasma. La forma ossidata, acido deidrascorbico, attraversa rapidamente la barriera ematoencefalica mediante le cellule endoteliali, mentre

la forma ridotta non è in grado di farlo. Tale differenza non appare dannosa dal momento che l'effetto antiossidante protettivo dell'acido ascorbico si mantiene attivo preservando l'azione di altri antiossidanti nel cervello. Nelle valutazioni sperimentali, nei gruppi trattati i livelli di acido ascorbico nel cervello fetale alla fine della fase di ischemia-riperfusionazione risultavano paragonabili con i gruppi non trattati, indicando comunque una capacità totale antiossidante che suggeriva come questo farmaco fosse in grado di riciclare altri antiossidanti. Quindi, l'acido ascorbico sembra essere utile se somministrato in dose corretta e il suo effetto appare facilitato se utilizzato contemporaneamente con altri antiossidanti come per esempio l'*alfa-tocoferolo*. Quest'ultimo, somministrato in via supplementare ai pretermine, di cui è noto il deficit di vitamina E, non ha mostrato da solo effetti positivi, indicando invece un rischio incrementante di sepsi o enterocolite necrotizzante. In aggiunta, la sua potenziale utilizzazione come agente neuroprotettivo appare limitata da una lenta assunzione cerebrale.

L'*indometacina*, nella sua funzione di inibitore delle ciclossigenasi produce effetti analoghi sul metabolismo cerebrale [57], con in più, insieme all'*ibuprofene*, una capacità di ridurre i neutrofilici circolanti e quindi la produzione di citochine, con miglioramento della microcircolazione cerebrale [58, 59].

Farmaci con applicazioni promettenti sono i *lazaroidi*, non glucocorticoidi 21-aminosteroidi, che agiscono probabilmente sul comparto microvascolare, dal momento che non penetrano la barriera emato-encefalica. Essi stabilizzano la membrana cellulare in modo simile alla vitamina E, con un effetto di prevenzione sulla perossidazione lipidica. Una sperimentazione su ratti neonati è apparsa promettente con una notevole riduzione dell'edema cerebrale post-ischemico, mentre gli adulti, entro sei ore dall'ischemia cerebrale, non hanno mostrato alcun miglioramento significativo della prognosi a distanza [60, 61].

L'*allopurinolo*, che possiede anch'esso effetti chelanti [62, 63], può servire come paradigma delle problematiche affrontate per studiare un intervento farmacologico in questa situazione. Strutturalmente analogo ad una ipoxantina, inibisce competitivamente la xantina-ossidasi che, in ipossia-riossigenazione e ischemia-riperfusionazione, produce ossidanti come il superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e il radicale idrossido [64]. Organi come fegato e intestino che contengono il maggiore quantitativo di xantina-ossidasi risultano danneggiati dall'ischemia-riperfusionazione. Tale danno conduce xantina-ossidasi nella circolazione, e quest'ultima colpisce organi non ischemizzati, che posseggono piccole quantità di xantina-ossidasi endogena, come il cuore ed il cervello.

Nei modelli animali l'allopurinolo ha un effetto protettivo sull'ischemia cerebrale. In epoca neonatale [65] e, se somministrato quindici minuti dopo l'insulto ipossico-ischemico, riduce l'edema cerebrale, l'atrofia

cerebrale, e le lesioni infartuali [66, 67]. Negli studi effettuati non appare ancora definita la dose ottimale che permetta a questo farmaco di essere presente in quantità sufficiente a livello cerebrale. Sembra necessaria una dose elevata di allopurinolo per ottenere effetti neuroprotettivi, ciò in relazione, oltre che alla attività di semplice inibizione della xantina-ossidasi, anche ad un ipotizzato effetto diretto sui radicali e come chelante dei metalli. Se la dose viene ridotta da 150 mg/kg a 100 mg/kg/die in ratti adulti con ischemia focale, la riduzione del volume dell'infarto cerebrale passa dal 24% all'8% [68]. Esiste uno studio su un numero elevato di neonati pretermine [69], ai quali è stato somministrato allopurinolo per prevenire la leucomalacia periventricolare, che non ne ha dimostrato variazioni significative ed in più ha fatto temere effetti preoccupanti, seppur ipotizzati, sulla mortalità, la poroencefalia, e la NEC nel gruppo trattato.

Viene ipotizzato un effetto differente dell'allopurinolo tra neonati a termine e pretermine anche in base al dosaggio. In particolare, in un gruppo di 22 neonati asfissati a termine trattati con 40 mg/kg endovena, entro quattro ore dopo la nascita, l'allopurinolo produceva minori variazioni del flusso ematico cerebrale alla spettroscopia ad infrarossi ed una precoce stabilizzazione dell'attività elettrocorticale cerebrale [70]. In conclusione l'allopurinolo sembrerebbe utile se utilizzato in dosaggio corretto e con una somministrazione immediatamente successiva all'ipossia ed infine rappresenta un farmaco relativamente ben studiato e quindi applicabile anche in epoca neonatale [71].

#### *Inibitori dell'ossido nitrico*

L'ossido nitrico è un radicale libero che viene generato nelle cellule cerebrali endoteliali, gli astrociti, e nelle cellule neuronali in formazione, espletando attività fisiologiche come vasodilatazione, promozione della sinaptogenesi e modulazione di neurotrasmissione. L'ipossia-ischemia, soprattutto in fase secondaria produce in eccesso ossido nitrico sintetasi con aumento della produzione di ossido nitrico attraverso diversi meccanismi correlati che producono effetti persistenti a carico dei neutrofili, dei macrofagi e della microglia [72, 73]. Il tentativo terapeutico consiste nell'inibizione in fase precoce del periodo post-ischemico attraverso inibitori non selettivi della sintetasi [74, 75]. Studi successivi hanno utilizzato un'inibizione selettiva con risultati neuroprotettivi [76, 77].

#### *Inibitori dei canali del calcio e dei recettori NMDA*

Il livello intracellulare del calcio, che si mantiene in concentrazioni molto basse in condizioni fisiologiche, subisce importanti variazioni in condizioni di ipossia. In questo caso la caduta di ATP consente un ingresso anomalo di calcio con formazione di aminoacidi

eccitatori come il glutamato e con attivazione dei recettori N-metil-D-aspartato che producono un ulteriore ingresso di calcio e innescano una iperproduzione di radicali liberi. Calcio inibitori come *flunarizina* e *nimodipina* sono stati sperimentati per ridurre l'entità degli infarti cerebrali. In campo neonatale l'uso di questi farmaci, con la *nicardipina*, ha dimostrato gravi effetti collaterali con ipotensione sistemica [78].

Il *magnesio solfato*, utilizzato per anni nella preeclampsia, sembrava presentare risultati interessanti se somministrato prima del parto per ridurre i rischi di lesioni emorragiche cerebrali. In realtà un esame seriato ecografico non ha fornito dati totalmente convincenti. Somministrato nel neonato, con la funzione di bloccare i canali NMDA, non ha mostrato risultati convincenti sugli animali [79] ed in un trial multicentrico, nel trattamento della ipossia-ischemia neonatale, ha presentato effetti collaterali, probabilmente connessi con il dosaggio, che hanno obbligato all'interruzione della sperimentazione [80].

#### *Antinfiammatori*

In fase di riperfusione, vengono liberati mediatori dell'infiammazione come istamina, trombina e si realizza un'alterazione dell'endotelio vasale, stimolata dai mediatori attivati dall'ossigeno. Il verificarsi di danni microvascolari e di microinfiltrazioni nel tessuto cerebrale coinvolto è collegato alla presenza di fattori citotossici secreti dai leucociti, che, con adesione ad elevata affinità sono attratti dai fattori piastrino-attivati (PAF) e dalla interleuchina 8 (IL-8) consecutivamente alla attivazione dell'interleuchina 1 e del TNF (*tumor necrosis factor*) [81, 82], come è confermato dall'incremento di IL-1 $\beta$  e di TNF-mRNA nelle regioni colpite da lesione celebrale [83].

L'utilizzo di antagonisti dell'IL-1 e del TNF appare avere effetti neuroprotettivi, confermando come il blocco di questi fattori costituisca un elemento importante per impedire lo svilupparsi di lesioni postipossico-ischemiche [84]. Un ruolo simile è stato ipotizzato per gli antagonisti dei PAF, che aumentano la risposta infiammatoria inducendo i neutrofili a rilasciare radicali liberi e facilitare la loro adesione vasale [85]. In modo analogo agirebbe il *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), una citochina che incrementa la sopravvivenza neuronale su tessuti esposti alla neurotossicità del glutammato su colture corticali di ratto [86]. Esso è in grado di ridurre le lesioni ischemiche cerebrali in un modello animale [87]. Altri componenti del gruppo TGF- $\beta$  possiedono effetto neurotrofico di protezione postischemica [88].

#### *Agenti antiapoptotici*

La correlazione tra apoptosi e infiammazione costituisce un meccanismo di rilievo nel determinare la lesione cellulare post ipossico-ischemica. Questi processi

risultano mediati dalle caspasi delle cisteino-aspartato proteasi, la cui inibizione appare neuroprotettiva su modelli animali [89].

#### *Fattori di crescita*

Una modulazione del danno cerebrale può essere prospettabile, in corso di sviluppo cerebrale, a seconda della produzione e disponibilità post ipossico-ischemica dei fattori neurotrofici e favorenti lo sviluppo dei neuriti [90]. Sono stati isolati numerosi fattori con effetto favorente la crescita. Il fattore di crescita insulinosimile (IGF-1) appare possedere un ruolo di modulazione del danno cerebrale. Prodotto in grosse quantità sotto forma di IGF-1 mRNA dopo ipossia-ischemia o somministrato centralmente nei ratti riduce la quantità di neuroni danneggiati.

HIF-1, responsabile dell'attivazione post-ischemica di precursori dell'eritropoietina, e VEGF, fattore di crescita vascolare endoteliale, risultano avere un ruolo di angiogenesi e neuroprotezione dopo ischemia globale cerebrale nel ratto [91]. Ruolo analogo viene svolto dal fattore neurotrofico di crescita epidermica. La somministrazione intraventricolocerebrale di fattori neurotrofici encefaloderivati mostrava una netta riduzione del danno neuronale nei ratti con un meccanismo età dipendente [92].

#### *Eritropoietina*

Notevole interesse scientifico e clinico è stato suscitato dalla scoperta di effetti non ematopoietici dell'*eritropoietina* [93]. Esistono dati preliminari e pubblicazioni sul ruolo biologico dell'eritropoietina (Epo) nel sistema nervoso centrale umano tanto in fase di sviluppo che in età adulta, basati sull'espressione del suo specifico recettore (Epo-R).

Il recettore (Epo-R) e la sua espressione genica sottostanno a cambiamenti durante lo sviluppo e presentano una regolazione encefalo-specifica. L'espressione di Epo-R è abbondante a livello encefalico in fase embrionale, fetale e adulta, ed accertata in diverse linee di sviluppo neuronale: NT2 (cellula precursore con capacità post-mitotiche), PC12 (linea cellulare del feocromocitoma del ratto) e SK-N-MC (linea cellulare del neuroblastoma umano) [94].

E' stato possibile investigare in dettaglio l'espressione genica dell'Epo nel sistema nervoso centrale umano in sviluppo. Dieci settimane dopo il concepimento, Epo viene rinvenuta in quantità marcata nelle zone ventricolari e periventricolari [95], a venti settimane si rinvia a livello del talamo, dell'ippocampo, dei corpi genicolati laterali, della corteccia, e del midollo spinale.

La scoperta che l'Epo viene espressa nel SNC in quantità comparabile con quella del fegato e del rene, sedi ove si rileva la quantità più cospicua di Epo

circolante in questa fase dello sviluppo, può suggerire il rilievo di questa proteina nella neurogenesi del cervello. Peraltro Epo si rileva nel liquido cerebrospinale (LCS) tanto di neonati, sia a termine che pretermine, che di adulti umani. La ricerca simultanea di Epo nel LCS e nel plasma in neonati ha fornito dati interessanti. Neonati trattati con Eporicombinante (rEpo), (1200-1400 U/kg/sett) per motivi ematologici, non presentavano livelli più alti nel LCS, rispetto ai controlli [96]. Al contrario valori elevati di Epo venivano riscontrati tanto nel plasma che a livello del LCS in neonati con asfissia.

Studi sperimentali *in vivo* hanno mostrato effetti protettivi della somministrazione intraventricolare o sistemica di rEpo sia in caso di lesioni ischemiche che infiammatorie [97], e numerosi studi indicano effetti *in vitro* di tipo neuroprotettivo su linee cellulari o tessuti cerebrali esposti ad agenti danneggianti, tanto con somministrazioni preventive che immediatamente successive al danno.

Non si hanno dati clinici ad oggi sugli effetti neuroprotettivi e neurotrofici dell'eritropoietina dal momento che, sebbene questa risulti largamente impiegata con neonati pretermine, nella profilassi o terapia dell'anemia, questi vengono normalmente esclusi dagli studi a causa del rischio connesso con la loro patologia di partenza. Relativamente all'impiego in età adulta in proposte sperimentali recenti, si ritengono proponibili *trials* ove l'eritropoietina, in forma di rEpo, venga impiegata in pazienti colpiti da ostruzioni vascolari cerebrali, per migliorare l'ossigenazione cerebrale.

La somministrazione per via sistemica, con funzione neuroprotettiva, appare avere una limitazione quantitativa dovuta ad un effetto di saturazione a livello della barriera ematoencefalica. Un'alternativa potrebbe essere rappresentata dagli EMP, peptidi che imitano gli effetti eritropoietici dell'eritropoietina, *in vivo* e *in vitro*, che possono modulare le proprie caratteristiche biologiche ed incrementare la propria affinità per gli eporecettori. Se confrontati con rEpo (purché somministrati in via preventiva per almeno 8 ore) appaiono altrettanto protettivi su colture di neurocellule in proliferazione, sottoposte tanto ad ipossia che ad irradiazione ultravioletta [98].

In conclusione tali dati suggeriscono un ruolo interessante dell'eritropoietina nello sviluppo fisiologico cerebrale e nelle funzioni di neuroprotezione e di riparazione tissutale neuronale consecutive a danno cerebrale.

#### **Neuroprotezione da freddo**

L'ipotesi che l'ipotermia potesse svolgere un ruolo neuroprotettivo nell'encefalopatia ipossico-ischemica è basata su osservazioni sperimentali su animali, che sembrano rispondere all'asfissia perinatale tentando

attivamente di ridurre la propria temperatura corporea, attivando una serie di meccanismi fisiologici (protezione cerebrale endogena).

Dopo le prime applicazioni in campo cardiocirurgico, sono stati effettuati alcuni studi, tanto su animali asfissati alla nascita che su neonati umani senza respirazione spontanea a 5 minuti di vita, che venivano immersi in acqua fredda fino alla comparsa dell'attività respiratoria. Tali valutazioni non facevano parte di studi controllati e avevano un follow up limitato [99]. Tale indirizzo terapeutico-rianimatorio venne totalmente abbandonato quando si ritenne fosse di rilevanza assoluta per la prognosi a distanza proteggere il neonato dal freddo.

Studi randomizzati su animali, sottoposti ad un insulto asfittico programmato alla nascita, hanno invece mostrato risultati positivi sulla sopravvivenza a breve e lungo termine [100]. Gli studi di risonanza magnetica in spettroscopia hanno dimostrato che l'ipotermia agisce sulla fase secondaria della caduta energetica cerebrale, che ha luogo a 12-24 ore dall'insulto lesionale, ed il cui andamento è predittivo della prognosi neurologica successiva. Animali sperimentali sottoposti a trattamento ischemizzante e successivamente a 12 ore di ipotermia non marcata, presentavano nel filtrato extracellulare raccolto mediante microdialisi cerebrale, un rilascio degli aminoacidi eccitatori e la produzione di ossido nitrico in quantità nettamente inferiori al gruppo non trattato, con una riduzione generale dei meccanismi di apoptosi e necrosi cellulare [101].

Numerosi esperimenti sono stati condotti su animali adulti, con la dimostrazione che una riduzione di 2-3 °C della temperatura cerebrale inraischemica produceva effetti protettivi sulle lesioni neurologiche in maniera indipendente dalla tecnica con cui veniva prodotto il raffreddamento encefalico [102].

#### *Tempo zero e durata della protezione ipotermica*

Alla nascita non siamo in grado di definire con precisione il momento d'inizio, la durata dell'asfissia, nonché l'esistenza di eventuali episodi pregressi. A questi vanno aggiunti i tempi necessari per la rianimazione e per approntare gli interventi necessari per il trattamento ipotermico. In tal senso gli esperimenti effettuati [103] ottengono risultati significativi iniziando la neuroprotezione con il freddo circa 1-1,5 ore dopo un insulto cerebrale significativo della durata di 30 minuti, con ipotermia perdurante per almeno 72 ore. Altri autori ritengono la finestra terapeutica molto più breve, riferendo risultati positivi solo con intervalli di pochi minuti. Negli studi consecutivi a traumi ischemici nell'adulto, ritardi del raffreddamento intorno a 5-6 ore, con raggiungimento della temperatura target dopo oltre 10 ore, dimostravano un effetto protettivo più che dimezzato [104].

Non è chiaro se i benefici del freddo, tanto in studi in epoca neonatale che nell'adulto, consistano in un ampliamento della finestra terapeutica, senza costituire una protezione duratura e quindi con una morte cellulare solo ritardata, oppure, al contrario possono offrire una protezione permanente. Tali differenze appaiono in relazione con diversi aspetti di questa metodica.

Sembra essere importante la durata dell'ipotermia, in relazione con la severità dell'asfissia. Ad esempio lo stesso tipo di insulto ipossico contrastato con un raffreddamento più prolungato (da 6 a 72 ore) produce una protezione più evidente [105]. Nei modelli animali dove il momento d'inizio dell'ipossia è noto ed il raffreddamento può essere attivato immediatamente, si è prodotta una protezione del 60% sulla sopravvivenza e sulle prestazioni a distanza con un abbassamento di temperature di 6 °C per 3 ore, in confronto ad un 35% di protezione in uno studio con insulto lesionale più grave. Il tentativo di mantenere per tempi prolungati un raffreddamento moderato produceva risultati interessanti [106].

Elementi interessanti vengono forniti da uno studio recente di Nedelcu [107], in cui l'effetto di 24 ore di trattamento ipotermico marcato (30 °C vs 37 °C) veniva studiato quotidianamente usando esami in risonanza magnetica e valutazione istopatologica, su animali sottoposti ad occlusione della carotide comune ed a 90 minuti di esposizione ad ossigeno all'8%. L'edema citotossico prodotto e la caduta del metabolismo cerebrale risultavano migliorati dall'abbassamento della temperatura, rispetto al gruppo di controllo; ma i casi con lesioni iniziali gravi sviluppavano comunque, nonostante l'ipotermia, vaste aree infartuali cerebrali ma con tempi di progressione del danno molto più lenti, lasciando quindi l'opportunità per un eventuale intervento terapeutico addizionale.

#### *Temperatura cerebrale neuroprotettiva ottimale*

Studi sperimentali animali condotti nella pecora e nel cane hanno indicato effetti protettivi per l'encefalo con temperature sistemiche appena al di sotto dei 34 °C, con risultati migliori rispetto ad abbassamenti moderati (28-32 °C) o marcati (15-25 °C), probabilmente a causa degli effetti negativi dell'ipotermia [108].

Nell'uomo adulto il raffreddamento corporeo totale a 33,5 °C per 24 ore migliora la prognosi nei soggetti con insulto di grado intermedio [104].

Forniscono dati interessanti le valutazioni istologiche ottenute in studi su ratti trattati con temperature variabili, dopo 20 minuti di ischemia cerebrale. I neuroni dell'area CA1, neuroni dei fasci piramidali altamente vulnerabili, apparivano totalmente indenni ed appariva nettamente ridotto il danno a carico delle cellule dei nuclei della base, in proporzione variabile all'ipotermia: del 75% con temperature di 33 °C del 100% con 30 °C.



Una sensibilità regionale cerebrale all'ipotermia indica le zone corticali e del talamo come le meno protette, in confronto al nucleo caudato, a parti del corpo striato e dell'ippocampo [106].

#### *Raffreddamento selettivo*

Un approccio selettivo ha tentato di ottenere il raffreddamento cerebrale minimizzando gli effetti negativi dell'ipotermia sistemica. Già Kotchev, nel 1970, aveva applicato una tecnica che utilizzava cuffie a bassa temperatura. Gunn ed altri applicano la stessa metodica a feti di pecora con ipossia, dimostrando che il raffreddamento della temperatura extradurale, tra 30 °C e 33 °C per 72 ore, riduceva gli esiti cerebrali sebbene l'abbassamento iniziasse fino a 5,5 ore dopo la riperfusione. In questo caso, la temperatura interna, misurata a livello esofageo, si riduceva di 1,5 °C in risposta al raffreddamento selettivo del capo e il calo di temperatura corporea veniva prevenuto con una perfusione placentare di sangue caldo. Uno studio analogo su neonati a termine con asfissia perinatale e sintomatologia neurologica precoce, otteneva temperature rettali di 35,7 °C, utilizzando cuffie raffreddate sul capo dei neonati con risultati ritenuti efficaci nel ridurre in modo rapido la temperatura cerebrale, senza effetti collaterali di rilievo [109].

In realtà esistono ben pochi dati disponibili sulla distribuzione della temperatura all'interno dell'encefalo neonatale umano, o sull'effetto del raffreddamento tanto locale che sistemico. Tali dati sono difficili da acquisire dal momento che una misurazione invasiva accurata della temperatura cerebrale neonatale non può essere facilmente giustificata ed i modelli animali possono essere confondenti a causa delle differenze nel metabolismo cerebrale, il flusso ematico, o la geometria anatomica.

Un'applicazione clinica del raffreddamento cerebrale richiederebbe che, come in altre terapie importanti, la distribuzione e la dose siano accuratamente note. Ciò è particolarmente importante dal momento che studi che utilizzano la risonanza magnetica hanno dimostrato che nel neonato umano le strutture encefaliche della base sono significativamente più calde di altri tessuti cerebrali più superficiali e che il danno alle strutture cerebrali profonde è predittivo di problematiche neurologiche più gravi mentre lesioni corticali risultano relativamente benigne [110].

Van Leeuwen e altri hanno studiato i metodi di raffreddamento cerebrale attraverso un modello numerico delle distribuzioni di temperatura all'interno della testa del neonato, con l'ipotesi di verificare "l'approccio selettivo", basato sull'applicazione di un casco raffreddante alla temperatura costante di 10 °C. Essi hanno ottenuto risultati che confermano come non sia la resistenza termica del cranio, ma piuttosto l'effetto dovuto alla perfusione cerebrale a prevenire un raffreddamento efficace [111].

L'unico tipo di simulazione che produceva una riduzione significativa della temperatura cerebrale profonda era quella in cui veniva abbassata a 34 °C la temperatura corporea interna, implicando la necessità di ridurre la temperatura totale corporea per ottenere un raffreddamento cerebrale profondo. In conclusione questi autori giudicano falsa l'ipotesi che il raffreddamento della superficie del cranio mediante l'applicazione di un casco raffreddante riduca significativamente la temperatura cerebrale profonda e produca un differenziale di temperatura tra le zone profonde dell'encefalo e la temperatura corporea interna nel neonato umano. Soltanto con l'abbassamento della temperatura interna si ottiene una riduzione significativa delle zone profonde dell'encefalo. Questi dati, sebbene successivamente contrastati da valutazioni successive con la prima misurazione diretta del gradiente T rettale/T cerebrale profonda [112], comportano in ogni caso la necessità di nuove ricerche per l'applicazione di metodiche coerenti della neuroprotezione da freddo.

#### *Effetti sistemici negativi dell'ipotermia*

Non si sono registrate differenze tra adulti con lesione encefalica che hanno subito un raffreddamento fino a 33,5 °C, in relazione a ipotensione, aritmie, infezioni, disturbi coagulativi, o necessità di supporto ventilatorio [104]. Al contrario nei neonati si sono osservati disturbi coagulativi con temperature al di sotto di 33 °C. L'ipotermia incrementa la viscosità ematica con un aumento del 2% per 1 °C, producendo così un rischio di difetto di perfusione se l'ematokrito è già di per sé alto. Ciò particolarmente in relazione ai rischi di lesioni intestinali, connesse con una riduzione del flusso ematico post-ipossico e rischio di enterocolite necrotizzante [113].

Studi recenti hanno analizzato e documentato in modo sistematico i rischi più frequenti di variazioni cardiovascolari [114] che appaiono:

1) caduta indesiderata della temperatura interna, su valori inferiori al *range* desiderato, dovuta ad una marcata variabilità individuale, influenzata dalla somministrazione di farmaci anticonvulsivanti o sedativi con un effetto di cattiva regolazione della vaso-costrizione, e necessità di riscaldamento immediato. Ciò comporta un certo grado d'incertezza nel progettare in quanto tempo e per quale durata si otterrà la caduta della temperatura interna, dal momento che esiste una spiccata differenza individuale in ciascun neonato nel difendersi dall'ipotermia;

2) abbassamenti improvvisi della pressione sanguigna di grado moderato, ma con effetti più marcati nei neonati in condizioni critiche, visto che il mantenimento della pressione sistemica dipende dalla capacità del neonato in condizioni già critiche di operare una vaso-costrizione periferica efficace, che viene contrastata dalla presenza dei pannelli radianti sul tronco e gli arti. La somministrazione di benzodiazepine, il cui metabolismo epatico

è ridotto dall'ipotermia, facilita ulteriormente la vasodilatazione periferica, riduce la gittata cardiaca ed accentua quindi l'ipotensione in fase di riaumento della temperatura;

3) un incremento improvviso del fabbisogno di ossigeno in corso di ipotermia è stato attribuito, con una certa probabilità, alla comparsa di ipertensione polmonare: con fabbisogno di ossigeno già elevato il raffreddamento può costituire un rischio aggiuntivo. Peraltro il riaumento della temperatura che si rende improvvisamente necessario deve essere strettamente monitorizzato per il rischio di ipotensione sistemica e di *shunt* destro-sinistro e va quindi realizzato lentamente (non più di 0,5 °C/h);

4) bradicardia sinusale, senza effetti negativi evidenti, senza aritmie, con valori, segnalati da più autori tra 75 e 90/minuto.

### *Ipertermia*

La comparsa di ipertermia di grado intermedio viene segnalata come un evento non rilevato ma comune nell'iperemia della fase postischemica cerebrale dopo la rianimazione. Una sua influenza negativa appare dimostrata, poiché produce: un'accelerazione nell'evoluzione del danno neuronale ischemico nelle regioni vulnerabili, un'estensione del danno a regioni non ordinariamente vulnerabili all'ischemia; un rilascio facilitato degli aminoacidi eccitatori, e infine una riduzione della funzione della barriera ematoencefalica [115].

Valutazioni tese ad approfondire i tempi e gli effetti della termoregolazione sul cervello immaturo hanno studiato l'esposizione a ipo o ipertermia. La comparsa di iperpiressia, spontanea o connessa con un difficoltoso controllo della bassa temperatura, anche di breve durata, (per 3 ore, 24 ore dopo l'insulto), peggiorava nettamente la prognosi, ove l'induzione di ipotermia lieve e di breve durata, associata ad antipiretici per una settimana, produceva effetti neuroprotettivi [116].

Altrettanto vale per una eventuale esposizione all'ipertermia prima, come in caso di febbre materna in corso di travaglio di parto, durante o dopo l'ipossia-ischemia con deterioramento neurologico più marcato, ed accelerazione dell'apoptosi [106].

Una componente importante degli interventi di rianimazione consiste quindi nel porre come un obiettivo principale la prevenzione dell'ipertermia.

### *Risultati a lungo termine*

Una valutazione a lungo termine degli esiti neurologici ha generato marcate controversie cliniche e sperimentali. Studi prospettici di lunga durata esistevano soltanto su popolazioni infantili, con età media di 30

giorni, sottoposti a trapianto cardiaco con arresto circolatorio in ipotermia profonda (temperatura rettale di 18+/-0,5 °C, tempo di ipotermia di circa 14 minuti). La valutazione psicomotoria a distanza, fino a 2,5 anni appariva normale e non sembrava influenzata in modo negativo dall'arresto cardiocircolatorio prolungato, né dall'ipotermia profonda. Tali studi, sebbene la tecnica di raffreddamento prevedesse una protezione del capo con applicazione di ghiaccio, presentavano notevoli differenze cliniche e sperimentali [117].

Studi recenti [118] si sono occupati di definire la prognosi neuroevolutiva a lungo termine. Quaranta neonati (con EG  $\geq$  a 37 sett.), arruolati entro 2-5 ore dalla nascita, con caratteristiche non significativamente differenti per gestazione, nascita, peso, punteggio di Apgar (< di 6 a 5 minuti) e pH iniziale (< di 7,09) venivano collocati in gruppi, la cui temperatura rettale prevista era: con raffreddamento minimo 36,5 °C- 36 °C, medio 35,9-35,5 °C oppure a 34,5 °C e tale temperatura veniva mantenuta fino a 72 ore. Il controllo clinico dei pazienti prevedeva esami ecografici, TAC, EEG, esami ematici e colturali, oltre a dati demografici e clinici rilevanti (tipo di rianimazione, farmaci anticonvulsivanti od altri, ecc.). I neonati venivano seguiti fino 18 mesi di vita e valutati periodicamente con esami neurologici seriati e somministrazione a 18 mesi della *Bayley scales of infant development*.

All'esame dei risultati viene sottolineata la difficoltà di raccogliere in uno studio adeguato un numero sufficiente di casi, sebbene la casistica descritta dall'autore lascerebbe intendere un sensibile effetto protettivo sugli esiti a distanza nel gruppo di neonati raffreddati a 35-34,5 +/-0,5 °C, nonché, in generale, una sostanziale sicurezza dell'impiego dell'ipotermia. Gli stessi autori, assumendo come indicativo che l'abbassamento della temperatura rettale fosse raggiunta prima di 6 ore di vita e fosse associata con una riduzione del 30% dei decessi o di disabilità, ritengono comunque necessari 175 neonati in ciascun gruppo per completare un follow up valido. In ogni caso alcuni aspetti dello studio in questione appaiono di rilievo per progettare ricerche successive. Ciò perché nonostante i criteri d'ingresso risultino definiti, un numero significativo di casi con pH alterato e Apgar basso presentano poi un andamento sostanzialmente normale, suggerendo di utilizzare una combinazione di fattori clinici alla nascita per aumentare la specificità dei neonati da selezionare per il trattamento. Al contrario l'identificazione precoce, mediante EEG ad integrazione d'ampiezza, di un reperto anormale nelle prime sei ore, può indicare una prognosi comunque negativa tra l'80 e il 90% dei casi [119, 120].

Sulla base dell'insieme dei risultati sperimentali globalmente incoraggianti sono stati avviati due *trials* multicentrici di trattamento ipotermico precoce per neonati con encefalopatia ipossico-ischemica alla nascita ed un terzo è in corso di progettazione. Queste speri-

mentazioni hanno pianificato il raggiungimento di una temperatura inferiore a quella utilizzata negli studi di Gunn, ed un reclutamento di neonati con criteri ancora più stretti [121].

### Conclusioni

La limitazione dello stress ossidativo, l'utilizzo di farmaci, il trattamento ipotermico sembrano punti emergenti nel campo delle strategie future per la neuroprotezione nell'ipossia-ischemia perinatale. Un loro studio settoriale più approfondito potrebbe far ipotizzare un trattamento combinato.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 22 ottobre 2001.

### BIBLIOGRAFIA

- Finer NN, Robertson CM, Richards RT, Pinnell LE, Peters KL. Hypoxic-ischemic encephalopathy in term neonates: perinatal factors and outcome. *J Pediatr* 1981;98:112-7.
- Levene MI, Kornenberg J, Williams THC. The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Human Devel* 1985;11:21-6.
- Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995;84:972-32.
- Al-Afry A, Carroll JE, Devarajan LV, Moussa MA. Term infant asphyxia in Kuwait. *Ann Trop Paediatr* 1990;10:355-61.
- Airede AI. Birth asphyxia and hypoxic-ischemic encephalopathy: incidence and severity. *Ann Trop Paediatr* 1991;11:331-5.
- Boo NY, Lye MS. Factors associated with clinically significant perinatal asphyxia in the Malaysian neonates: a case control study. *J Tropical Pediatr* 1991;38:284-9.
- Kinoti SN. Asphyxia of the newborn in east, central and southern Africa. *East African Med J* 1993;70:422-33.
- Singh M, Deorari AK, Khajuria RC, Paul VK. A four year study on neonatal morbidity in a New Delhi hospital. *Ind J Med Res* 1991;94:186-92.
- Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (Ed.). *Neurology of the newborn*, ed. 3. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994.
- Hossman KA. Neuronal survival and revival during and after cerebral ischemia. *Am J Emerg Med* 1983;1:191-7.
- Mc Cord JM. Oxygene-derived free radicals in postischemic tissue injury. *Eng J Med* 1985;312:159-63.
- Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: mechanism of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992;77:337-54.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10.
- Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. *Arch Neurol* 1976;33:696-05.
- Youkin DP, Delivoria-Papadopoulos M, Maris J, Donlon E, Clancy R, Chancee B. Cerebral metabolic effects of neonatal seizures measured with *in vivo* 31P NMR spectroscopy. *Ann Neurol* 1986;20:513-9.
- Mc Donald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 1990; 15:41-70.
- Clozel M, Daval JL, Monin P, Debruc C, Morselli PL, Vert P. Regional cerebral blood flow during bicuculline-induced seizures in the newborn piglet: effect of phenobarbital. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:189-99.
- Saugstad OD. Practical aspects of resuscitating asphyxiated newborn infants. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl):S11-5.
- Emergency cardiac care committee and subcommittee, American Heart Association: guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiac care: VII neonatal resuscitation. *JAMA* 1992;268:2276.
- Fisher DE, Paton JB. Resuscitation of the newborn infant. In: Klaus HK, Fanaroff AA (Ed.). *Care of the high - risk neonate*. Philadelphia: WB Saunders; 1993:38.
- Robertson NCR. Resuscitation of the new born. In: Robertson NCR (Ed.). *Textbook of neonatology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1992:173.
- Niermeyer S, Kattwinkel J, Van Reempts P, Nadkarni V, Phillips B, Zideman D *et al*. International guidelines for neonatal resuscitation: an excerpt from guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science. *Pediatrics* 2000;106: e29.
- Hutchison JH, Kerr MM, Williams KG *et al*. Hyperbaric oxygen in the resuscitation of the newborn. *Lancet* 1963;2:1019.
- Hutchison JH, Kerr MM, Inall J, Sharks RA. Controlled trials of hyperbaric oxygen and tracheal intubation in asphyxia neonatorum. *Lancet* 1966;1:935.
- Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970;244:3855.
- Saugstad OD. Resuscitation of newborn infants - do we need new guidelines? *Prenatal Neonatal Med* 1996;1:26.
- Huch A, Huch R, Rooth G. Monitoring the intravascular pO<sub>2</sub> in newborn infants. *J Perinatal Med* 1973;3:317-21.
- Rootwelt T, Odden J-P, Hall C, Saugstad OD. Regional blood flow during hypoxemia and resuscitation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs. *J Perinatal Med* 1996;24:227.
- Feet BA, Yu X, Rootwelt T, Oyasaeter S, Saugstad OD. Effects of hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% O<sub>2</sub> in newborn piglets. Extracellular hypoxanthine in cerebral cortex and femoral muscle. *Crit Care Med* 1997;25:1384-96.
- Ramji S, Ahuja S, Thirupuram S, Rootwelt T, Saugstad OD, Rooth G. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or 100% oxygen. *Pediatr Res* 1993;34:809-12.

31. Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study. *Pediatrics* 1998; 102:e1.
32. Hutchison AA. Recovery from hypopnea in preterm lambs: effects of breathing air or oxygen. *Pediatr Pulmonol* 1987;3:317-27.
33. Mortola JP, Frappell PB, Frappell DE, Villena-Cabrera N, Villena-Cabrera M, Pena F. Ventilatory and metabolic responses to acute hyperoxia in newborn. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:11.
34. Leahy FAN, Cates D, Mac Callum M, Rigatto H. Effect of CO<sub>2</sub> and 100% O<sub>2</sub> on cerebral blood flow in preterm infants. *J Appl Physiol* 1989;67:1551.
35. Lundstrom K, Pryds O, Greisen G. Oxygen at birth and prolonged cerebral vasoconstriction in preterm infants. *Arch Dis Child* 1995;73:F81.
36. Saugstad OD, Aasen AO. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs. A prognostic aid in hypoxia. *Eur Surg Res* 1993;81:22.
37. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996;21:83-9.
38. Bagenholm R, Nilsson UA, Gotborg CW, Kjellmer I. Free radicals are formed in the brain of the fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. *Pediatr Res* 1998;43:271-7.
39. Andersen CB, Hoffman DJ, Du C *et al*. Effect of reoxygenation with 21% or 100% oxygen on free radical formation following hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Pediatr Res* 1997;41:30A.
40. Sanderud J, Norstein J, Saugstad OD. Reactive oxygen metabolites produce pulmonary vasoconstriction in young pigs. *Pediatr Res* 1991;29:543-63.
41. Archer SL, Peterson D, Nelson DP, DeMaster EG, Kelly B, Eaton JW *et al*. Oxygen radicals and antioxidant enzymes alter pulmonary vascular reactivity in the rat lung. *J Appl Physiol* 1989; 66:102-11.
42. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T *et al*. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. *Stroke* 1994;25:1469-71.
43. Etzioni A. Adhesion molecules-their role in health and disease. *Pediatr Res* 1996;39:1991-9.
44. Mc Rae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Brain Res Dev Res* 1995;84:245-56.
45. Nakai A, Asakura H, Taniuchi Y, Koshino T, Araki T, Siesjo BK. Effect of alpha-phenil-N-tert-butyl nitron (PBN) on fetal cerebral energy metabolism during intrauterine ischemia and reperfusion in rats. *Pediatr Res* 2000;47:451-6.
46. Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Vina J. Six years of experience with the use of room air for the resuscitation of asphyxiated newly born term infants. *Biol Neonate* 2001;79:261-7.
47. Huang CC, Yonetani M, Lajevardi N, Delivoria-Papadopoulos M, Wilson DF, Pastuszko A. Comparison of postasphyxial resuscitation with 100% and 21% oxygen on cortical oxygen pressure and strial dopamine metabolism in newborn piglets. *J Neurochem* 1995;64:292-9.
48. Danielisova V, Marsala M, Chavko M, Marsala J. Posts ischemic hypoxia improves metabolic and functional recovery of the spinal cord. *Neurology* 1990;40:1125-9.
49. Burda J, Marsala M, Radonak J, Marsala J. Graded posts ischemic reoxygenation ameliorates inhibition of cerebral cortical protein synthesis in dogs. *J Cereb Blood Flow Metb* 1991;11:1001-11.
50. Perry MA, Wadhawa SS. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988; 254:G366.
51. Phillis JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994;42:441-8.
52. Groenendaal F, Shadid M, Mc Gowan JE, Mishra OP, Van Bel F. Effects of deferoxamine, a chelator of free iron, on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of cortical brain cell membrane during early reperfusion after hypoxia-ischemia in newborn lambs. *Pediatr Res* 2000;48:560-4.
53. Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJNL, Van Zoren-Grobben D, Van de Bor M, Bel F. Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics* 1996;98:883-9.
54. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Anti-oxidant enzymes in fetal guinea pig brain during development and effect of maternal hypoxia. *Dev Brain Res* 1988;42:173-9.
55. Tan S, Zhou F, Wang Z-W *et al*. Administration of antioxidants to the mother after onset of fetal bradycardia ameliorates fetal brain injury in rabbits. *Pediatr Res* 1997;41:182A.
56. Bass WT, Malati N, Castel MC, White LE. Evidence for the safety of ascorbic acid administration to the premature infant. *Am J Perinatol* 1998;15:133-40.
57. Shadid M, Moison RMW, Steendijk P, Hiltermann L, Berger HM, Van Bel F. The effect of antioxidative combination therapy on post-ischemic perfusion, metabolism and electrical activity of the newborn brain. *Pediatr Res* 1994;44:119-24.
58. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989;256:H589-3.
59. Rosenberg AA, Murdaugh E, Withe CW. The role of oxygen free radicals in post asphyxia cerebrum hypoperfusion in newborn lambs. *Pediatr Res* 1989;26:215-20.
60. A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). The RANTTAS investigators. *Stroke* 1996; 27:453-8.
61. Fleishaker JC, Peters GR. Pharmacokinetics of tirilazad and U-89678 in ischemic stroke patients receiving a loading regimen and maintenance regimen of 10mg/kg/day of tirilazad. *J Clin Pharmacol* 1996;36:809-13.
62. Ko KM, Godin DV. Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. *Biochem Pharmacol* 1990;40:803-9.
63. Van Bel F, Shadid M, Moison RMW, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L *et al*. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics and electrical brain activity. *Pediatrics* 1998;101:185-93.
64. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245:G285-9.

65. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990;27:332-6.
66. Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B *et al.* Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and Netherlands. *Acta Neurol Scand* 1996;93:56-60.
67. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1997;41:607-16.
68. Lindsay S, Liu TH, Xu JA, Marshall PA, Thompson JK, Parks DA *et al.* Role of xanthine dehydrogenase and oxidase in focal cerebral ischemic injury to rat. *Am J Physiol* 1991;259:H2051-7.
69. Russel GA, Cooke RW. Randomised controlled trial of allopurinol prophylaxis in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1995;73:F27-31.
70. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
71. Mc Gaurn SP, Davis LE, Krawczeniuk MM, Murphy JD, Jacobs ML, Norwood WI *et al.* The pharmacokinetics of injectable allopurinol in newborns with the hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics* 1994;94:820-3.
72. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999;9:119-31.
73. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995;268:R286-92.
74. Dorrepaal CA, Van Bel F, Moison RMW, Shadid M, Van de Bor M, Steendijk P *et al.* Oxidative stress during post hypoxic-ischemic reperfusion in newborn lamb: the effect of nitric oxide synthesis inhibition. *Pediatr Res* 1997;41:321-6.
75. Dorrepaal CA, Shadid M, Steendijk P, Van der Velde ET, Van de Bor M, Baan J *et al.* Effect of post hypoxic-ischemic inhibition of nitric oxide synthesis on cerebral blood flow, metabolism and electrocortical brain activity in newborn lambs. *Biol Neonate* 1997;72:216-26.
76. Higuchi Y, Hattori H, Kume T, Tsuji M, Akaike A, Furusho K. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1998;342:47-9.
77. Tsuij M, Higuchi Y, Shiraishi K, Kume T, Akaike A, Hattori H. Protective effect of aminoguanidine on hypoxic-ischemic brain damage and temporal profile of brain nitric oxide in neonatal rats. *Pediatr Res* 2000;47:79-83.
78. Levene MI, Gibson NA, Fenton AC, Papatoma E, Barnett D. The use of a calcium-channel blocker, nifedipine, for severely asphyxiated newborn infants. *Dev Med Child Neurol* 1990;32:567-74.
79. Greenwood K, Cox P, Mehmet H, Penrice J, Amess PN, Cady EB *et al.* Magnesium sulfate treatment after transient hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage. *Pediatr Res* 2000;48:346-50.
80. Levene MI, Blennow M, Whitelaw A, Hanko E, Fellman V, Hartly R. Acute effects of two different doses of magnesium sulphate in infants with birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F174,F177.
81. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1997;41:607-16.
82. Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low W. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery* 1998;43:1382-97.
83. Silverstei FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997;30:375-83.
84. Kadoya C, Domino EF, Yang GY, Stren JD, Betz AL. Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1995;26:1035-8.
85. Matsuo Y, Kihara T, Ikeda M, Ninomiya M, Onodera H, Kogure K. Role of platelet-activating factor and thromboxane A2 in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain. *Brain Res* 1996;709:296-302.
86. Prehn JHM, Backhauss C, Kriegelstein J. Transforming growth factor- $\beta$ 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:521-5.
87. Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA, Little SP. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor-KappaB in rats. *Stroke* 1998;29:677-82.
88. Yagi T, Jikihara I, Fukumura M, Watabe K, Ohashi T, Eto Y *et al.* Rescue of ischemic brain injury by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor after transient global ischemia in gerbils. *Brain Res* 2000;11:R1-4.
89. Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, Clementi E, Manfredi AA, Beltramo N. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-Chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2000;20:4398-404.
90. Klempt ND, Klempt M, Gunn AJ, Singh K, Gluckman PD. Expression of insulin-like growth factor binding protein 2 (IGF-BP2) following transient hypoxia-ischemia in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;15:55-61.
91. Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 alpha by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 2000;99:577-85.
92. Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, Shah AR, Holtzman DM. Marked age-dependent neuroprotection by brain derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1997;41:5521-9.
93. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-93.

94. Juul SE, Andreson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-9.
95. Juul SE, Yachnis AT, Roijani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1992;2:148-58.
96. Juul SE, Harcum J, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. *J Pediatr* 1997;130:428-30.
97. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C *et al.* Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10526-31.
98. Wrighton NC, Farrel FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS *et al.* Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996;273:458-64.
99. Westin B, Miller JA, Nyberg R, Wedenberg E. Neonatal asphyxia pallida treated with hypothermia alone or with hypothermia and transfusion of oxygenated blood. *Surgery* 1959;45:868-79.
100. Bona E, Loberg EM, Bagenholm R, Hagberg H, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after hypoxia-ischemia in a neonatal rat model: short and long term outcome. *Pediatr Res* 1998;43:738-45.
101. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Wyatt J, Cady EB, Wylezinska M *et al.* Mild hypothermia following severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed ("secondary") cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1995;5:667-70.
102. Laptook AR, Corbett RJ, Sterret R, Burns DK, Tolefsbol G, Garcia D. Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatr Res* 1994;35:436-42.
103. Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, Gunnong M, Edwards AD, Gluckman PD *et al.* The effect of prolonged modification of cerebral temperature on the outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatr Res* 1996;39:591-7.
104. Marion Dwea. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med* 1997;336:540-6.
105. Simbruner G, Haberl C, Harrison V, Linley L, Willeitner AE. Induced brain hypothermia in asphyxiated human newborn infants: a retrospective chart analysis of physiological and adverse effects. *Intensive Care Med* 1999;25:1111-7.
106. Towfighi J, Ousmann C, Heitian DF, Vannucci RC, Jager JY. The effect of focal cerebral cooling of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Neurophatol* 1994;87(6):598-604.
107. Nedelcu J, Klein MA, Aguzzi A, Martin E. Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol* 2000;10(1):61-71.
108. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest* 1997;99:248-56.
109. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics* 1998;102:885-92.
110. Kady EB, D'Souza PC, Penrice J, Lorek A. The estimation of local brain temperature by *in vivo* 1H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1995;33:862-7.
111. Van Leeuwen GMJ, Hand JW, Yan JW, Lagedijk JJW, Azzopardi DV, Edwards AD. Numerical modeling of temperature distributions within the neonatal head. *Pediatr Res* 2000;48:351-6.
112. Thoresen M, Simmonds M, Satas S, Tooley J, Silver JA. Effective selective head cooling during post-hypoxic hypothermia in newborn piglet. *Pediatr Res* 2001;49(4):594-9.
113. Haaland K, Loberg EM, Steen PA, Satas S, Thoresen M. Post hypoxic hypothermia in newborn piglets. *Prenat Neonat Med* 1997;2:329-37.
114. Thoresen M, Whitelaw A. Cardiovascular changes during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2000;106:92-9.
115. Rumna CS, Gopinath SP, Uzura M, Valadka AB, Robertson CS. Brain temperature exceeds systemic temperature in head-injured patients. *Crit Care Med* 1998;26:562-7.
116. Reith J, Jorgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL *et al.* Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality and outcome. *Lancet* 1996;347:422-5.
117. Eke C, Gundry RS, Baum MF, Chinnock RE, Razzouk AJ, Bailey LL. Neurologic sequelae of deep hypothermic circulatory arrest in cardiac transplant infants. *Ann Thorac Surg* 1996;61:783-8.
118. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001;107(3):480-4.
119. Al Naqeeb N, Edwards AD, Cowan FM, Azzopardi D. Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography. *Pediatrics* 1999;103:1263-71.
120. Toet MC, Hellstrom-Westas L, Groenendaal F, Eken P, De Vries LS. Amplitude integrated EEG 3 and 6 hours after birth in full term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F19-F23.
121. Thoresen M, Whitelaw A. Cardiovascular change during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2000;106:92-9.