



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΑΘΕΙΑΣ ΥΠΟΘΕΡΜΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΟΞΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΑΝΑΝΙΑΔΟΥ ΟΛΓΑ

Ειδικευόμενη Ιατρός Χειρουργικής Θώρακος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΑΘΕΙΑΣ ΥΠΟΘΕΡΜΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ: ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΟΞΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΑΝΑΝΙΑΔΟΥ ΟΛΓΑ

Ειδικευόμενη Ιατρός Χειρουργικής Θώρακος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
Ν. 5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2.**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321988



**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
N. 5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2.**



Ημερομηνία αίτησης της κ. Ανανιάδου Όλγας: 24-1-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 481^α/25-6-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αναγνωστόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Καρδιοχειρουργικής Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δρόσος Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Καρδιοχειρουργικής Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζόνσον Ελίζαμπεθ Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 1-11-2002

*«Η επίδραση της βαθιάς υποθερμίας στην προστασία του εγκεφάλου. Ιστολογική μελέτη
σε οξύ πειραματική μοντέλο σε χοίρους »*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 592^α/24-
10-2006, ύστερα από αντικατάσταση του κ. Αναγνωστόπουλου Κωνσταντίνου στη
θέση του επιβλέποντα από τον κ. Ματσάγκα Μιλτιάδη Επίκουρο Καθηγητή
Αγγειοχειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 648^α/18-11-2008

Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία –Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λάμπρος Μιχάλης	Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαλάμου –Μήτση Βασιλική	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδόπουλος Γεώργιος	Καθηγητής Αναισθησιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φατούρος Μιχαήλ	Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζόνσον Ελίζαμπεθ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας -Ιστολογίας - Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Ματσάγκας Μιλτιάδης

**Επίκουρος Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

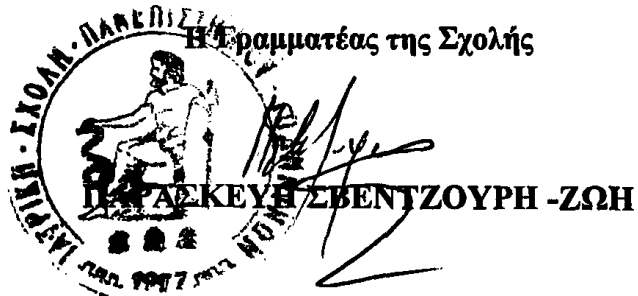
Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-2-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Γραμματέας της Σχολής



Στην μνήμη του πατέρα μου



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας ήταν ένας σημαντικός στόχος. Όχι μόνο γιατί ήταν αποτέλεσμα αρκετής δουλειάς, αλλά και γιατί στον σχεδιασμό και την διεκπεραίωσή της βοήθησαν εξαιρετικοί επιστήμονες. Η κεντρική φιλόδοξη ιδέα για το ‘στήσιμο’ μίας πειραματικής μελέτης, με θέμα την ολική κυκλοφορική παύση σε χοίρειο μοντέλο, ήταν του καθηγητή μου στην Καρδιοχειρουργική, κου Γεώργιου Δρόσου, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να την πραγματοποιήσω. Ο άψογος σχεδιασμός του πειράματος και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την βοήθεια και επίβλεψη της καθηγήτριάς μου στην Ανατομία, κας Elisabeth Johnson, η οποία αποτέλεσε για μένα πρότυπο και δασκάλα. Το οξύ τους πνεύμα ήταν το θεμέλιο πάνω στο οποίο βασίστηκε μία επιστημονική μελέτη. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία και εύχομαι στην σταδιοδρομία μου να έχω κοντά μου ανθρώπους σαν και αυτούς.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου και συνεργάτες, χειριστές μηχανής εξωσωματικής κυκλοφορίας, Μακρή Αντώνη και Ανδρούτσο Οδυσσέα, για την ανεκτίμητη βοήθεια και την άρτια τεχνική υποστήριξη στην διεκπεραίωση του χειρουργικού μέρους του πειράματος. Ευχαριστώ για την συνεργασία τον βοηθό αναισθησιολόγου, Αθανασούλα Δημήτρη, για την άρτια αναισθησιολογική κάλυψη των πειραμάτων. Ευχαριστώ θερμά επίσης, την φίλη μου Μηνά Αγάπη, για την ανιδιοτελή συμπαράσταση στην προσπάθειά μου, καθόλη την διάρκεια του χειρουργικού μέρους των πειραμάτων.

Τέλος, πολλά οφείλω στον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κο Ματσάγκα, ο οποίος με βοήθησε στην ολοκλήρωση της συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	9
1. Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση στην καρδιοχειρουργική	9
2. Η εγκεφαλική ροή κατά την εξωσωματική κυκλοφορία και την υποθερμία	13
3. Η επίδραση της υποθερμίας και της ολικής κυκλοφορικής παύσης στον εγκεφαλικό μεταβολισμό	15
4. Νευρολογικές επιπλοκές μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση	17
5. Λειτουργική νευροανατομία της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης μετά από ολική κυκλοφορική παύση	19
-Μηχανισμοί νευρωνικού θανάτου	21
-Εκλεκτική νευρωνική ευπάθεια	30
-Η μέθοδος TUNEL ως δείκτης απόπτωσης	32
6. Άλλες μέθοδοι εγκεφαλικής προστασίας στην καρδιοχειρουργική	33
7. Η χρήση των πειραματικών μοντέλων στην βιοιατρική έρευνα	36
8. Σκοπός	38
Υλικά - Μέθοδοι	40
1. Προεγχειρητική προετοιμασία και αναισθησιολογικό πρωτόκολλο	40
2. Διαχωρισμός ομάδων και χειρουργικό πρωτόκολλο στις ομάδες Α και Β	41
3. Ιστοπαθολογική προετοιμασία	43
4. Ιστολογική εκτίμηση- Σύστημα ταξινόμησης	45
5. Στατιστική επεξεργασία	47
Αποτελέσματα	49
1. Φυσιολογικές και μεταβολικές παράμετροι	49
2. Ιστολογική εκτίμηση με την χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης	51
3. Μέθοδος TUNELγια την κατάτμηση DNA -YOKΠ στους 18oC	51
-YOKΠ στους 10o C	54
-YOKΠ στους 18o C και 10o C	56
Συζήτηση	59
1. Γενικά σχόλια	59
2. Επιλογή πειραματικού μοντέλου	60
3. Νευρωνική βλάβη στην βαθειά υποθερμία στο οξύ πειραματικό μοντέλο	61
4. Διαφορά αποτελεσμάτων στην πολύ βαθειά υποθερμία	64
5. Περιορισμοί της μελέτης	66
6. Έρευνα στην νευροπροστασία	68
Ανακοινώσεις και δημοσιεύσεις	70
Περίληψη	72
Abstract	74
Βιβλιογραφικές Αναφορές	76
Συνοτομογραφίες	90
Πίνακες	91
Διαγράμματα	92
Εικόνες	93



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

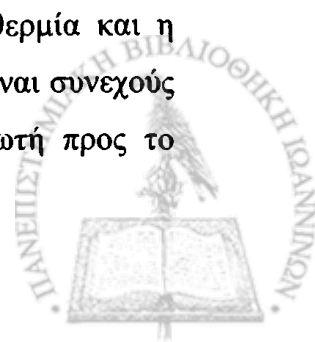
1. Η Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση στην Καρδιοχειρουργική

Η αντιμετώπιση των ανευρυσμάτων αορτικού τόξου στην καρδιοχειρουργική ενηλίκων και ορισμένων συγγενών καρδιοπαθειών στην παιδοκαρδιοχειρουργική περιλαμβάνει χειρισμούς στην αορτή και στα μεγάλα αγγειακά στελέχη του αορτικού τόξου. Μείζον πρόβλημα στις εγχειρήσεις αυτές αποτελεί η εγκεφαλική προστασία. Συνήθως εφαρμόζεται η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση (ΥΟΚΠ). Με την βοήθεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας εφαρμόζεται συστηματική υποθερμία (έως και 18° C), διακόπτεται η εξωσωματική κυκλοφορία και αντικαθίσταται το αορτικό τόξο ή διορθώνονται οι καρδιαγγειακές ανωμαλίες.

Εξωσωματική Κυκλοφορία

Η καθιέρωση της εξωσωματικής κυκλοφορίας (Ε/Κ) για την αντιμετώπιση των καρδιακών παθήσεων αποτέλεσε ιστορικό σταθμό για την καρδιοχειρουργική. Για πρώτη φορά το 1953 ο Gibbon στις ΗΠΑ χρησιμοποίησε επιτυχώς την εξωσωματική μηχανή για την σύγκλειση μεσοκοιλιακού ελλείμματος σε ασθενή. Δύο χρόνια αργότερα ο John Kirklin στην Mayo Clinic στις ΗΠΑ άρχισε συστηματικά τη χρησιμοποίηση της εξωσωματικής κυκλοφορίας για την αντιμετώπιση των καρδιοπαθειών. (Kirklin Barratt-Boyes 2003) Από την εποχή εκείνη μέχρι σήμερα έγιναν συνεχείς προσπάθειες για την βελτίωση της εξωσωματικής μηχανής, με κύριο στόχο την κατασκευή υλικών με υψηλό βαθμό βιοσυμβατότητας.

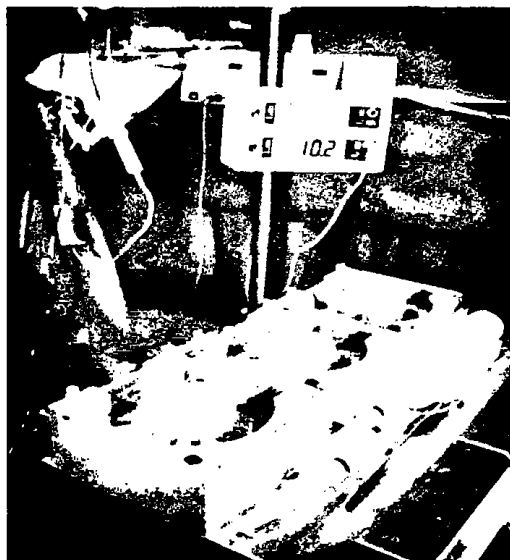
Με τον όρο ‘εξωσωματική κυκλοφορία’ ή ‘καρδιοπνευμονική παράκαμψη’ εννοούμε την παράκαμψη της λειτουργίας της καρδιάς και των πνευμόνων με την εφαρμογή ειδικής τεχνικής, με την οποία επιτυγχάνεται η οξυγόνωση του αίματος εκτός του σώματος. Το οξυγονωμένο αίμα στη συνέχεια επαναχορηγείται στο αρτηριακό σύστημα του ασθενούς. Για την εξωσωματική κυκλοφορία απαιτείται ειδική συσκευή, η εξωσωματική μηχανή, που αποτελείται από την αντλία παροχής του αρτηριακού αίματος, τον οξυγονωτή μεμβράνης, την αντλία αναρρόφησης του αίματος από το πεδίο και την επιστροφή του στον οξυγονωτή, την αντλία για την αποσυμπίεση της αριστερής κοιλίας και από ειδική συσκευή με την οποία επιτυγχάνεται η συστηματική υποθερμία και η επαναθέρμανση του ασθενούς. Η αντλία παροχής του αρτηριακού αίματος είναι συνεχούς ροής και προωθεί μέσω σωληνώσεων το οξυγονωμένο αίμα του οξυγονωτή προς το



αρτηριακό σύστημα του αρρώστου, συνήθως στην ανιούσα αορτή ή στην μηριαία αρτηρία. Η φλεβική επιστροφή προς τον οξυγονωτή γίνεται παθητικά με την βαρύτητα και το φλεβικό αίμα απάγεται από τον δεξιό κόλπο ή τις κοίλες φλέβες με μία ή δύο κάννουλες αντίστοιχα. Η πλήρωση του οξυγονωτή και του κυκλώματος των σωληνώσεων γίνεται συνήθως μόνο με κρυσταλλοειδή διαλύματα. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας αιμοαραίωση στον ασθενή, η οποία είναι επωφελής γιατί βελτιώνει ρεολογικά την κυκλοφορία του αίματος, ελαττώνει τον μηχανικό τραυματισμό των ερυθροκυττάρων, περιορίζει σημαντικά την συνολική χορήγηση αίματος, διατηρεί ικανό αριθμό αιμοπεταλίων, και ελαττώνει τη μεταβολική οξέωση, την περιφερική αγγειοσύσπαση και τις επιπλοκές από τους νεφρούς και τους πνεύμονες. (Εικόνα 1 και Εικόνα 2)

Διάφορες παράμετροι του ασθενή παρακολουθούνται, συνεχώς ή περιοδικά, κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Η συνεχής παρακολούθηση αφορά το ηλεκτροκαρδιογράφημα, την καρδιακή συχνότητα, την συστηματική αρτηριακή πίεση, την κεντρική φλεβική πίεση, την αρτηριακή παροχή της εξωσωματικής μηχανής, την θερμοκρασία του σώματος (ορθού και ρινοφάρυγγα), την θερμοκρασία του αίματος της αρτηριακής παροχής και της φλεβικής επιστροφής, καθώς και την θερμοκρασία του νερού της συσκευής ψύξης-επαναθέρμανσης. Η αεριομετρική κατάσταση, ο αιματοκρίτης, η συγκέντρωση του καλίου, τα επίπεδα γλυκόζης και γαλακτικού οξέος, ο ρυθμός αποβολής των ούρων και ο βαθμός ηπαρίνισμού του αίματος, παρακολουθούνται περιοδικά. (Σπανός και συν 1999)

Εικόνα 1. Η εξωσωματική μηχανή και το κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας



α.

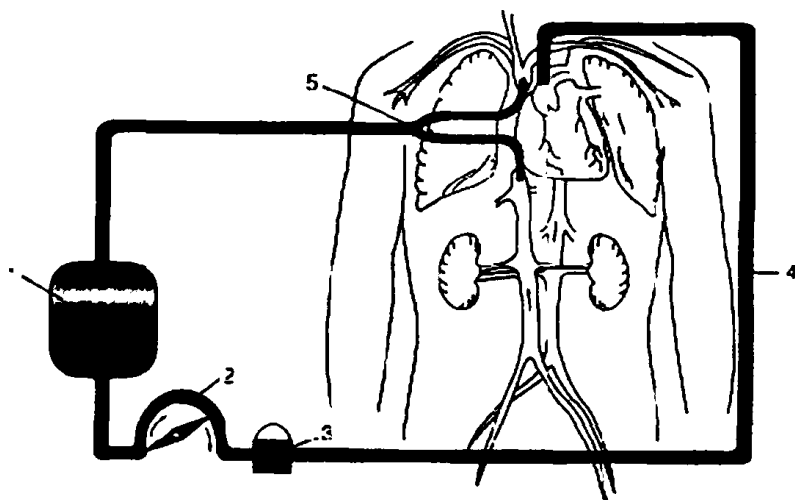


β.



Στην εικόνα α φαίνεται η μηχανή της εξωσωματικής κυκλοφορίας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, με τις τρεις φυγόκεντρες αντλίες και τις σωληνώσεις τους και το θερμόμετρο ενώ στην εικόνα β η συσκευή του οξυγονωτή με την συσκευή πλήρωσης με αρτηριακό αίμα που προωθείται στην συνέχεια στην σωλήνωση -αρτηριακή γραμμή.

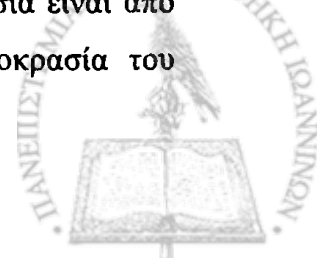
Εικόνα 2. Καρδιοπνευμονική παράκαμψη



Στην εικόνα φαίνεται η ροή του αίματος κατά την Ε/Κ. Το φλεβικό αίμα απάγεται από τις κοίλες φλέβες, οδηγείται στον οξυγονωτή και στην συνέχεια με την αρτηριακή γραμμή στην ανιούσα αορτή. 1.συσκευή πλήρωσης με αίμα και οξυγονωτής 2. αντλία 3. αρτηριακό φίλτρο 4.σωλήνωση- αρτηριακή γραμμή 5. σωλήνωση- φλεβική γραμμή (Σπανός και συν 1999)

Υποθερμία, Ολική Κυκλοφορική Παύση και Επαναθέρμανση

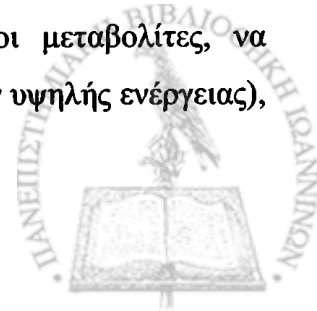
Η θερμοκρασία του οργανισμού δεν ορίζεται ούτε περιγράφεται εύκολα. Στην νορμοθερμία η διαφορά στην θερμοκρασία των διαφόρων μερών του ανθρώπινου σώματος είναι πολύ μικρή. Στην υποθερμία, όταν η ψύξη είναι επιφανειακή, το δέρμα και οι μύες είναι πιο ψυχροί από τα εσωτερικά όργανα και η θερμοκρασία του ορθού είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτήν του ρινοφάρυγγα. Στην ψύξη όμως, με την εξωσωματική κυκλοφορία, οι διαφορές αυτές μεταξύ ορθού και ρινοφάρυγγα αναστρέφονται και επιπλέον οι περιοχικές διαφορές θερμοκρασίας είναι σημαντικές αλλά μειώνονται όσο επιμηκύνεται ο χρόνος ψύξης. Για τον λόγο αυτό, ιδιαίτερα κατά την υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση, το σημείο μετρούμενης θερμοκρασίας και η παρακολούθηση των μεταβολών αυτής είναι πολύ σημαντικά. Συνήθως, η μετρούμενη θερμοκρασία είναι από τον οισοφάγο ή τον ρινοφάρυγγα, διότι είναι συγκρίσιμη με την θερμοκρασία του



εγκεφάλου, ενώ η κοντινότερη θερμοκρασία με αυτήν του εγκεφάλου είναι της τυμπανικής μεμβράνης.

Μετά την εγκατάσταση της εξωσωματικής κυκλοφορίας ξεκινά η εφαρμογή της συστηματικής υποθερμίας, συνήθως μέχρι την θερμοκρασία-στόχο των 18°C . Για την καλύτερη και πιο ομοιογενή ψύξη, ιδιαίτερα του εγκεφάλου, αποφεύγεται η ταχεία μείωση της θερμοκρασίας και διατηρείται πάντα μια διαφορά 4 με 6°C στις θερμοκρασίες μεταξύ του αίματος που προάγεται στον ασθενή μέσω του κυκλώματος των σωληνώσεων και του σώματος. Συνήθως αυτό επιτυγχάνεται μετά από διάστημα 30 περίπου λεπτών και με υψηλές ροές κυκλοφορίας, 2.2 με $2.4\text{ L/m}^2/\text{λεπτό}$. Επίσης καθοριστικός παράγοντας για την ασφαλή και ομοιογενή ψύξη του εγκεφάλου είναι και ο αιματοκρίτης, που πρέπει να διατηρείται γύρω στο 30% και να μην επιτρέπεται μεγάλη αιμοαραίωση. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας είναι η α -stat, κατά την οποία διατηρείται το αρτηριακό pH, μετρούμενο στους 37°C , κατά την διάρκεια της υποθερμίας, αδιόρθωτο σε σχέση με την θερμοκρασία του σώματος, χωρίς αλλαγές του CO_2 . Μόλις φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία, ο χειριστής της εξωσωματικής μηχανής διακόπτει την κυκλοφορία και όλο το αίμα συλλέγεται στο ρεζερβουάρ της μηχανής, για περιορισμένο χρονικό διάστημα, μέχρι να ολοκληρωθεί η διόρθωση των ανωμαλιών. Κατά την διάρκεια της παύσης εφαρμόζονται στο κρανίο εξωτερικά παγοσακούλες, που επιτρέπουν την διατήρηση της χαμηλής εγκεφαλικής θερμοκρασίας, ιδιαίτερα στον εγκεφαλικό φλοιό και υποφλοιό, μέσω του φαινομένου της αγωγής θερμότητας. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

Ο χρόνος της ισχαιμίας είναι περιορισμένος και με την ολοκλήρωση μέρους των διορθώσεων, μέσα σε 30 με 45 περίπου λεπτά, ακολουθεί η επανεγκατάσταση της κυκλοφορίας και η σταδιακή επανθέρμανση του ασθενούς στην νορμοθερμία. Η φάση της επανθέρμανσης είναι εξίσου κρίσιμη και κατά την διάρκειά της πρέπει να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιπλέον επιβάρυνση της εγκεφαλικής λειτουργίας. Θα πρέπει να ανακτηθεί στο διάστημα αυτό η ενεργειακή και βιοχημική ομοιοστασία για να μην προκληθούν δευτερογενείς βλάβες. Οι καλύτερες συνθήκες για την εγκεφαλική ανάνηψη, μετά από την περίοδο ενεργειακής στέρησης, όπως συμβαίνει στην ολική κυκλοφορική παύση με την διακοπή της κυκλοφορίας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, είναι η αιμοδυναμική σταθερότητα, η σταδιακή επαναιμάτωση μετά την παύση (αρχικά με κρύο αίμα και χαμηλές πιέσεις ώστε να ξεπλυθούν οι συσσωρευμένοι μεταβολίτες, να αντισταθμιστούν οι ελεύθερες ρίζες και να αρχίσει η παραγωγή μορίων υψηλής ενέργειας),



ο υψηλός αιματοκρίτης και η αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

2. Η Εγκεφαλική Ροή κατά την Εξωσωματική Κυκλοφορία και την Υποθερμία

Κατά την εξωσωματική κυκλοφορία, η ικανότητα του ανθρώπινου σώματος να διαμορφώνει την καρδιακή παροχή ώστε να ικανοποιηθούν οι ενεργειακές ανάγκες χάνεται προσωρινά. Η τεχνητή αντλία της εξωσωματικής μηχανής παρέχει ρυθμό ροής που καθορίζεται από τον χειριστή. Ενώ η φυσιολογική ροή είναι 3.0 με 3.2 L/m²/λεπτό, στην εξωσωματική κυκλοφορία ρυθμίζεται στο 2.2 με 2.4 L/m²/λεπτό. Αυτή η μέτρια ροή εξυπηρετεί στο να περιορίζεται ο τραυματισμός των αιμοσφαιρίων που παρατηρείται στις αυξημένες ροές. Η χρήση της μέτριας υποθερμίας οδήγησε τους ερευνητές στην περαιτέρω μείωση της ροής κυκλοφορίας. Οι ανάγκες ιστικής οξυγόνωσης μειώνονται σταδιακά με την μείωση της θερμοκρασίας. Η ολοσωματική κατανάλωση οξυγόνου μειώνεται από 120 ml/m²/λεπτό στην νορμοθερμία σε 33 ml/m²/min στους 20° C όταν η ροή διατηρείται στα 2.4 L/m². Μελέτες έδειξαν ότι ο ρυθμός ροής μπορεί να μειωθεί σε 1.6 L/m² στους 28° C και μέχρι 1.2 L/m² στους 20° C. (Fox et al 1982) Το κρίσιμο ερώτημα στην περίπτωση αυτή είναι αν η ροή αυτού του επιπέδου είναι αρκετή για την εγκεφαλική αιμάτωση και κατά πόσο μεταβάλλεται η εγκεφαλική ροή κατά την εξωσωματική κυκλοφορία.

Η εγκεφαλική ροή (Cerebral Blood Flow, CBF) είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζεται προσεκτικά κατά την εξωσωματική κυκλοφορία. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος ζυγίζει περίπου 1500 gr και στην νορμοθερμία η εγκεφαλική ροή στην ηρεμία είναι 45-60 ml/100 gr εγκεφαλικού ιστού/λεπτό με πίεση άνω των 70 mmHg. Η εγκεφαλική κατανάλωση οξυγόνου (Cerebral Metabolic Rate of Oxygen, CMRO₂) είναι αντίστοιχη των μεταβολικών αναγκών και αυξομειώνεται ανάλογα (εγκεφαλική αυτορρύθμιση). Στην μέτρια υποθερμική εξωσωματική κυκλοφορία η εγκεφαλική ροή κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα, από 20 έως 40 ml/100 gr εγκεφαλικού ιστού/λεπτό. Βέβαια, υπάρχει ένα ομοιοστατικό επίπεδο (plateau), όπου η εγκεφαλική ροή διατηρείται σταθερή με τις εναλλαγές πίεσης και μόνο σε ακραίες, ανώτερες και κατώτερες, τιμές επηρεάζεται η ροή από την πίεση. Έτσι, στους χρόνιους υπερτασικούς αρρώστους η πίεση στην εξωσωματική κυκλοφορία πρέπει να διατηρείται πάντα σε υψηλά επίπεδα, για να εξασφαλίζεται ικανοποιητική εγκεφαλική ροή.



Ο εγκέφαλος θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητος στην μειωμένη συστηματική αιμάτωση ενώ στην πραγματικότητα αποδεικνύεται ανθεκτικός σε πολύ χαμηλή εγκεφαλική ροή. Τα όρια εγκεφαλικής ροής για την ισχαιμία και τον κυτταρικό θάνατο στην νορμοθερμία είναι κάτω από 10 ml/100 gr εγκεφαλικού ιστού/λεπτό και επομένως είναι ακόμη χαμηλότερα στην υποθερμία. (Taylor et al 1998) Παρ'όλα αυτά όμως, η εγκεφαλική υποαιμάτωση και η ισχαιμική βλάβη συμβαίνουν συχνά και η πρώτη είναι αιτία της βλάβης.

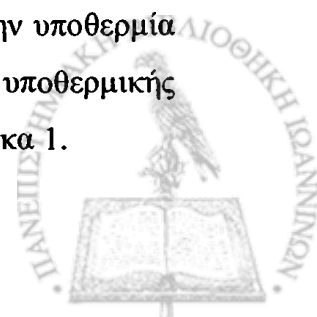
Φυσιολογικές μεταβλητές, όπως το pH και η θερμοκρασία ελέγχονται στην εξωσωματική κυκλοφορία και έχουν επίσης σημαντική επίδραση στην εγκεφαλική αιμάτωση. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ανταλλαγή αερίων και η στρατηγική ρύθμισης της οξεοβασικής ισορροπίας και συγκεκριμένα η διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων μερικών πιέσεων αρτηριακού οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα (PaO_2 και $PaCO_2$), στην υποθερμική εξωσωματική κυκλοφορία. Δύο στρατηγικές υπάρχουν για τους χειρισμούς της οξεοβασικής ισορροπίας, η alpha-stat και η pH-stat. Με την pH-stat διατηρείται το αρτηριακό pH στο 7.4 στην υποθερμία διορθωμένο για την θερμοκρασία του αίματος. Επειδή το pH αυξάνει σταδιακά με την μείωση της θερμοκρασίας, η σταθερότητα εξασφαλίζεται με την προσθήκη CO_2 στα εισερχόμενα αέρια του οξυγονωτή. Η alpha-stat στηρίζεται στο ότι δεν γίνονται αλλαγές CO_2 και το pH μετράται στους $37^\circ C$ αδιόρθωτο για την θερμοκρασία του ασθενούς. Πιο συγκεκριμένα, φυσιολογικά στην νορμοθερμία παρατηρείται οξυαιμία ενώ *in vivo* στην υποθερμία αλκαλαιμία και υποκαπνία. Με την pH-stat στην υποθερμία το pH διατηρεί τις φυσιολογικές *in vivo* τιμές, δηλαδή αλκαλαιμία και υποκαπνία και στην επαναθέρμανση επανέρχεται στην οξυαιμία και υπερκαπνία ενώ με την alpha-stat το pH μετράται αδιόρθωτο για την θερμοκρασία του αίματος. Η pH-stat συνήθως εφαρμόζεται στην παιδοκαρδιοχειρουργική κατά την ψύξη και την επαναθέρμανση παρέχοντας καλύτερα ψυχομετρικά μεσοπρόθεσμα αποτελέσματα σε βρέφη και νεογνά. (Jonas et al 1993) Η υπεροχή όμως αυτής της μεθόδου δεν έχει επιβεβαιωθεί και στους ενήλικες. Έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εγκεφαλικής βλάβης γιατί προκαλείται διαστολή των εγκεφαλικών αγγείων και απώλεια της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης. Η τεχνητή αύξηση του CO_2 στο αίμα που κυκλοφορεί προκαλεί την εξάρτηση της εγκεφαλικής ροής από την πίεση αιμάτωσης και την αύξηση του παρεχόμενου οξυγόνου στον εγκεφαλικό ιστό, μεγαλύτερη ροή και άρα περισσότερα μικροέμβολα και εγκεφαλικό οίδημα («luxury perfusion»). (Kirklin, Barratt-Boyes 2003) Η alpha-stat διατηρεί την αντιστοιχία εγκεφαλικής ροής και μεταβολισμού και διατηρεί την ικανότητα της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης, κάτι που είναι σημαντικό στους ενήλικες

με αγγειοπάθεια, όπως αθηρωμάτωση, υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη. (Murkin et al 1995)

3. Η Επίδραση της Υποθερμίας και της Ολικής Κυκλοφορικής Παύσης στον Εγκεφαλικό Μεταβολισμό

Η υποθερμία είναι το πιο ικανό μέσο πρόληψης ή μείωσης της ισχαιμικής βλάβης στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε κατάσταση μείωσης της εγκεφαλικής κυκλοφορίας. Η ψύξη χρησιμοποιείται για την προστασία των οργάνων γιατί μειώνει την μεταβολική δραστηριότητα και παρατείνει την περίοδο ανοχής της ισχαιμίας. Το κεντρικό νευρικό σύστημα έχει υψηλό μεταβολικό ρυθμό και περιορισμένες ενεργειακές αποθήκες, γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην εγκεφαλική ισχαιμία. Η υπόθεση που γίνεται στην χρήση της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης είναι ότι υπάρχει ένα ασφαλές χρονικό διάστημα παύσης, η διάρκεια του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την θερμοκρασία του σώματος σε αυτό το διάστημα. Το ασφαλές διάστημα ολικής κυκλοφορικής παύσης χαρακτηρίζεται από την απουσία ανιχνεύσιμων λειτουργικών και οργανικών δομικών ανωμαλιών στην άμεση ή όψιμη μετεγχειρητική περίοδο. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

Επειδή ο εγκέφαλος είναι απόλυτα εξαρτημένος από το οξυγόνο για την αερόβια γλυκόλυση, η μέτρηση του εγκεφαλικού μεταβολικού ρυθμού για το οξυγόνο ($CMRO_2$), δηλαδή η εγκεφαλική κατανάλωση οξυγόνου είναι δείκτης της εγκεφαλικής μεταβολικής ενεργότητας. Για κάθε μείωση της θερμοκρασίας κατά $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ η κατανάλωση του οξυγόνου μειώνεται σε βαθμό Q_{10} . (Kirklin, Barratt-Boyes 2003) Το Q_{10} είναι μια μεταβολική μεταβλητή που μετρά την εξαρτώμενη από την θερμοκρασία μείωση του εγκεφαλικού μεταβολισμού και ουσιαστικά αποτελεί το πηλίκων δυο τιμών $CMRO_2$ σε δυο θερμοκρασίες που διαφέρουν κατά $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Με τη χρήση του Q_{10} γίνεται ο υπολογισμός των απαιτήσεων οξυγόνου σε διάφορα στάδια υποθερμίας και αυτό διευκολύνει την διαπίστωση του επιπέδου μείωσης των μεταβολικών αναγκών σε τόσο χαμηλό επίπεδο ώστε να επιτραπεί ένα διάστημα χωρίς εγκεφαλική ροή. Έχει υπολογιστεί ότι το Q_{10} για τον ενήλικα ανθρώπινο εγκέφαλο είναι 2.3. (McCullough et al 1999) Με την χρήση του Q_{10} και την υπόθεση ότι η εγκεφαλική ροή μπορεί να διακοπεί με ασφάλεια για 5 λεπτά στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (και ότι ο μόνος μηχανισμός για εγκεφαλική προστασία κατά την υποθερμία είναι η καταστολή του μεταβολισμού) υπολογίζεται η ασφαλής διάρκεια της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης για κάθε θερμοκρασία, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.



Πίνακας 1. Υπολογιζόμενη ασφαλή διάρκεια ολικής κυκλοφορικής παύσης (McCullough et al 1999)

Θερμοκρασία (οC)	Εγκεφαλικός Μεταβολικός Ρυθμός (% του φυσιολογικού)	Ασφαλής Διάρκεια Ισχαιμίας (λεπτά)
37	100	5
30	56 (52-60)	9 (8-10)
25	37 (33-42)	14 (12-15)
20	24 (21-29)	21 (17-24)
15	16 (13-20)	31 (25-38)
10	11 (8-14)	45 (36-62)

Το θεωρητικό ασφαλές διάστημα εγκεφαλικής ισχαιμίας συμπίπτει με τα στοιχεία που προκύπτουν από τις κλινικές μελέτες, που σημαίνει ότι από τους κυριότερους μηχανισμούς για την εγκεφαλική προστασία κατά την υποθερμία είναι η καταστολή του εγκεφαλικού μεταβολισμού. (Ergin et al 1994 & 1994) Δεδομένου ότι στην νορμοθερμία υπάρχει η ιδανική σχέση ροής και μεταβολισμού, αυτή δεν διατηρείται κατά την ψύξη και την επαναθέρμανση από την βαθειά υποθερμία. Ένα αξιόλογο εύρημα της κλινικής μελέτης των McCullough και συνεργατών είναι ότι στους 20 °C ο εγκεφαλικός μεταβολισμός είναι ακόμη στο 24% της φυσιολογικής τιμής και στους 15 °C (συνήθης θερμοκρασία στην κλινική εφαρμογή κυκλοφορικής παύσης) φτάνει στο 16%. (McCullough et al 1999) Ενώ, όσο αφορά την κλινική νευρολογική ανάνηψη, πιστεύεται ότι η ανοχή κυκλοφορικής παύσης είναι ακόμα υψηλότερη, εξελιγμένες νευροψυχολογικές εξετάσεις μετεγχειρητικά αποδεικνύουν ότι μετρήσιμη αλλά πιθανόν παροδική νευρολογική βλάβη επισυμβαίνει μετά τα 30 λεπτά κυκλοφορικής παύσης. (Reich et al 1999, Oates et al 1995) Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, θερμοκρασίες 15 με 20 °C είναι ασφαλείς για διάρκεια παύσης μικρότερης των 30 λεπτών και αυτό σημαίνει για μεγαλύτερη διάρκεια παύσης είναι απαραίτητος ακόμα χαμηλότερος μεταβολικός ρυθμός, δηλαδή χαμηλότερη θερμοκρασία. (McCullough et al 1999, Sakamoto et al 2004)

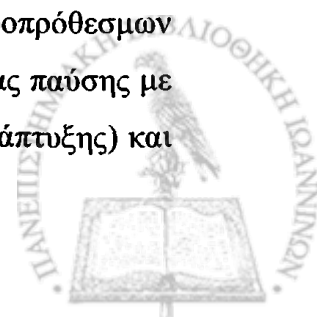
Εξίσου σημαντική παρατήρηση της ίδιας μελέτης είναι η καθυστέρηση στην επιστροφή του εγκεφαλικού μεταβολισμού και του εγκεφαλικού ιστικού PO₂ στα νορμοθερμικά επίπεδα κατά την επαναθέρμανση, σε αντίθεση με την ταχεία επιστροφή της εγκεφαλικής ροής. Το ίδιο φαινόμενο έχει διαπιστωθεί και κατά την επαναθέρμανση μετά

από μέτρια υποθερμική καρδιοπνευμονική παράκαμψη χωρίς κυκλοφορική παύση. (Cook et al 1995) Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μετά από την κυκλοφορική παύση ο εγκέφαλος παραμένει για ένα χρονικό διάστημα ευάλωτος και ότι η εγκεφαλική κατανάλωση οξυγόνου και το ιστικό PO_2 επιστρέφουν αργά και σταδιακά στις φυσιολογικές τους τιμές μετά από σοβαρό έλλειμμα οξυγόνου. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι, στην αρχή της επαναιμάτωσης η εγκεφαλική ροή είναι ακατάλληλα υψηλή για την δεδομένη εγκεφαλική θερμοκρασία ενώ η κατανάλωση οξυγόνου είναι ανάλογη με την θερμοκρασία. Στην αρχική φάση της επαναθέρμανσης, η εγκεφαλική θερμοκρασία είναι ακόμη χαμηλή, το ίδιο και ο εγκεφαλικός μεταβολισμός ενώ αντίθετα η ροή έχει ήδη αποκατασταθεί με την άρση της παύσης (luxury perfusion).

4. Νευρολογικές Επιπλοκές μετά από Ολική Κυκλοφορική Παύση

Η μελέτη των νευρολογικών επιπλοκών στον πληθυσμό των ασθενών που υποβάλλονται σε υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση είναι δύσκολη εξαιτίας των διαφορών στην συμπτωματολογία ανάλογα με την ηλικία του πληθυσμού και την αιτιολογία της βλάβης. Εγκεφαλική βλάβη λόγω εμβολικών φαινομένων ή εξαρτώμενη από την ροή αποτελεί γνωστή επιπλοκή της εξωσωματικής κυκλοφορίας και είναι διαφορετική από την εγκεφαλική βλάβη που παρατηρείται μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

Η έρευνα της επίπτωσης των δομικών και λειτουργικών διαταραχών μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση σε νεογνά και βρέφη, οδήγησε στην διαπίστωση χορειοαθέτωσης σε μεγάλο ποσοστό έως και 19% την δεκαετία του 60 και 70 που στην τελευταία δεκαετία αυτό μειώθηκε στο 1%, επισυμβαίνοντας τυπικά την 2^η με 6^η μετεγχειρητική μέρα. Η επίπτωση των παροδικών επιληπτικών κρίσεων ποικίλλει από 4% με 25%, ανάλογα με το ίδρυμα και την διεξοδική διάγνωση των κρίσεων και την διάρκεια της κυκλοφορικής παύσης. (Gaynor et al 2005) Πολλές μελέτες ερεύνησαν την επίπτωση στην γνωσιακή λειτουργία με αντικρουόμενα αποτελέσματα, λόγω μεθοδολογικών προβλημάτων που αφορούσαν διαφορές στην ηλικία, διάγνωση, προεγχειρητική κατάσταση και άλλους παράγοντες. Η Boston Circulatory Arrest Study είναι η μεγαλύτερη μελέτη που οργανώθηκε το 1987 για την μελέτη των βραχυ-, μεσο- και μακροπρόθεσμων επιπτώσεων. Η εκτίμηση τον πρώτο χρόνο κατέληξε στην συσχέτιση διάρκειας παύσης με τον δείκτη ανάπτυξης (μεγαλύτερη διάρκεια παύσης, χαμηλότερος δείκτης ανάπτυξης) και



την πιθανότητα ανεύρεσης νευρολογικών ανωμαλιών κατά την εξέταση. Το ποσοστό των κλινικών επιληπτικών κρίσεων ανέρχονταν στο 6% ενώ των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών κρίσεων στο 20%. Οι μετεγχειρητικές επιληπτικές κρίσεις συσχετίζονταν με επιδεινωμένη κινητική λειτουργία και νευρολογικές διαταραχές και ευρήματα στην μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου. (Newburger et al 1993, Wyrjij et al 2003, Hickey 1998) Στην αξιολόγηση μετά από τέσσερα χρόνια βρέθηκε ότι η επίπτωση της παύσης στην νοητική ανάπτυξη ήταν αμυδρότερη συγκριτικά με τον πρώτο χρόνο λόγω της πλαστικότητας του ανθρώπινου εγκεφάλου και της ικανότητας ορισμένων περιοχών να ανακτούν λειτουργίες άλλων περιοχών. Επίσης, σημαντική ήταν η επίπτωση στην γνωσιακή λειτουργία, στην επιδεξιότητα κινήσεων, στην κινητική λειτουργία και ιδίως στην αφασία λόγου. (Bellinger et al 1999, Hickey 1998) Παρόμοια ήταν τα μακροχρόνια αποτελέσματα μετά από οκτώ χρόνια, επιβεβαιώνοντας την επίπτωση της κυκλοφορικής παύσης στην ψυχοδιανοητική ανάπτυξη, στην λειτουργία της μνήμης, της ομιλίας, στην επιδεξιότητα κινήσεων και αλλού. (Bellinger et al 2003)

Στους ενήλικες, πειραματικές και κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η διάρκεια της ψύξης και η θερμοκρασία κατά την παύση παίζουν ρόλο στην καλή εγκεφαλική προστασία και στην ρύθμιση της διάρκειας της παύσης. (Reich 1999) Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση και η προχωρημένη ηλικία συσχετίζονται με την επιδείνωση στην λειτουργία της μνήμης και την ικανότητα εκτέλεσης επιδέξιων κινήσεων. Πιο συγκεκριμένα, μόνιμη νευρολογική σημειολογία παρατηρείται στο 7%, οφείλεται σε εμβολικά εγκεφαλικά επεισόδια και έχει ευρήματα στην αξονική τομογραφία εγκεφάλου και συγκεκριμένα εντοπισμένες βλάβες. Η επίπτωση συσχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία, την αθηρωμάτωση και το ιστορικό επέμβασης στην κατιούσα αορτή ενώ είναι ανεξάρτητη της διάρκειας της παύσης και της μεθόδου εγκεφαλικής προστασίας. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το 19% των ασθενών μετεγχειρητικά παρουσιάζει παροδικά νευρολογικά συμπτώματα, όπως σύγχυση, θυμός, παραλήρημα, παρατεταμένος αποπροσανατολισμός και παρκινσονισμός χωρίς όμως εστιακή νευρολογική σημειολογία και με ήπιες αλλά διάχυτες εγκεφαλικές βλάβες απεικονιστικά. Αυτή η συμπτωματολογία συσχετίζεται με την ηλικία των ασθενών και την διάρκεια της παύσης και πιστεύεται ότι αποτελεί κλινικό σύνδρομο που εκδηλώνεται λόγω ακατάλληλης εγκεφαλικής προστασίας. Παρά την σχετική αναστρεψιμότητα, όμως, των παροδικών νευρολογικών συμπτωμάτων, έχει πρόσφατα αποδειχτεί ότι η εκδήλωση διάχυτης εγκεφαλικής βλάβης σχετίζεται με μακροπρόθεσμα γνωσιακά ελλείμματα. (Ergin et al 1999, Reich et al 2003) Νευροψυχολογικές εκτιμήσεις δείχνουν ότι κυκλοφορική παύση διάρκειας μεγαλύτερης

των 25 λεπτών αποτελεί δείκτη για μακροπρόθεσμα νευρολογικά ελλείμματα. Αυτές οι μελέτες επιβεβαιώνουν τα ευρήματα των McCullough και συνεργατών ότι τα θεωρητικά ασφαλή διαστήματα παύσης που γνωρίζαμε έως τώρα είναι αρκετά αισιόδοξα και εκτός πραγματικότητας. Μετρώντας άμεσα την εγκεφαλική κατανάλωση οξυγόνου κατά την παύση απέδειξαν ότι η ανοξική κυτταρική βλάβη είναι αναπόφευκτη. (McCullough et al 1999)

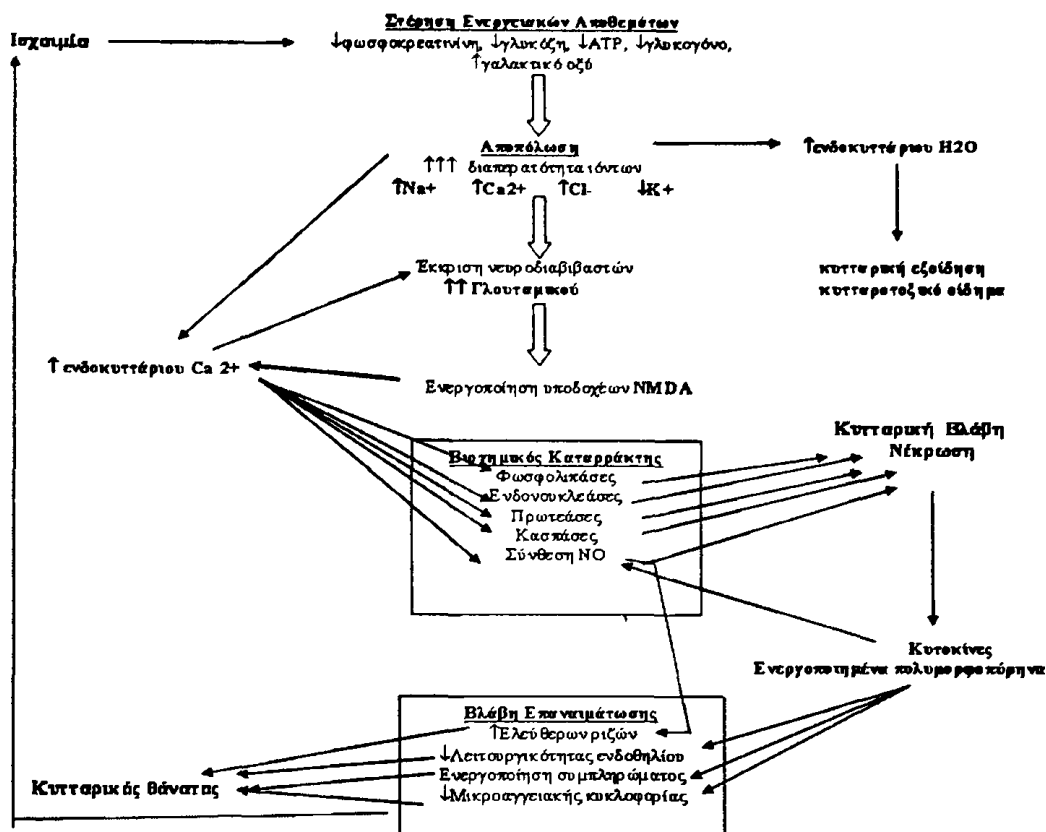
5. Λειτουργική Νευροανατομία της Ισχαιμικής Εγκεφαλικής Βλάβης μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

Η ισχαιμία και η υποξία συσχετίζονται με την υπερβολική νευρωνική ενεργοποίηση και δραστηριότητα, ενεργοποιώντας ένα καταρράκτη κυτταρικών γεγονότων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Η διακοπή της εγκεφαλικής ροής για λίγα λεπτά σχετίζεται με σοβαρή και συχνά μη αναστρέψιμη εγκεφαλική βλάβη. Η ισχαιμική νευρωνική βλάβη εξελίσσεται σε τρία στάδια: αποπόλωση, βιοχημικός καταρράκτης και βλάβη επαναιμάτωσης. (Εικόνα 3)

Κατά την πλήρη διακοπή της αιματικής ροής, ο εγκεφαλικός ιστός μετατρέπεται σε κλειστό σύστημα. Τα εγκεφαλικά ενεργειακά αποθέματα περιορίζονται στα προϋπάρχοντα επίπεδα των συστατικών υψηλής ενέργειας, όπως η φωσφοκρεατίνη (Phosphocreatinine, PCr), η τριφωσφορική αδενοσίνη (Triphosphate Adenosine, ATP) και η διφωσφορική αδενοσίνη (Diphosphate Adenosine, ADP) και στο παραγόμενο ATP από τον αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης και του γλυκογόνου σε γαλακτικό. Οι πηγές της κυτταρικής ενέργειας μεταβολίζονται με αυτήν τη σειρά: PCr, γλυκόζη, ATP και γλυκογόνο. Κατά την νορμοθερμία οι χρήσιμες πηγές ενέργειας χρησιμοποιούνται μέσα σε ένα με τρία λεπτά ισχαιμίας, ενώ η αποοξυγόνωση του εγκεφαλικού ιστού συμβαίνει μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Κατά την υποθερμία ο μεταβολικός ρυθμός είναι σημαντικά αργός και οι πηγές ενέργειας διαρκούν περισσότερο. Στην περίπτωση της υποθερμικής παύσης στους 18 °C τα επίπεδα PCr και ATP μηδενίζονται σε 18 ± 4 και σε 29 ± 5 λεπτά αντίστοιχα. Επίσης στην υποθερμία διαρκεί περισσότερο ο χρόνος αποοξυγόνωσης. Κατά την ισχαιμία γλυκόζη, πυρουβικό και γλυκογόνο μεταβολίζονται αναερόβια σε γαλακτικό και CO_2 , που σχετίζεται με μείωση του pH. (Ramsi et al 2002)



Εικόνα 3. Παθογένεια της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης



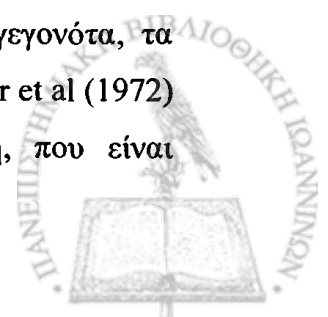
Η κυκλοφορική παύση προκαλεί διακοπή της νευρωνικής ηλεκτρικής δραστηριότητας μέσα σε 11 δευτερόλεπτα και αποπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών μέσα σε 70-100 δευτερόλεπτα. Με την μέτρια υποθερμία οι χρόνοι αυτοί καθυστερούν σε 18 και 194-310 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Με την ενεργειακή κρίση λόγω της παύσης, οι αντλίες Na^+/K^+ δεν λειτουργούν, με αποτέλεσμα την ταχεία απώλεια της ιοντικής ομοιοστασίας, την ενδοκυττάρια αύξηση ιόντων Na^+ , Ca^{+2} και Cl^- , την έξοδο K^+ από το κύτταρο και την κυτταρική εξοίδηση. Η ενδοκυττάρια είσοδος ιόντων Ca^{+2} γίνεται μέσω καναλιών που φυλάσσονται από υποδοχείς νευροδιαβιβαστών αμινοξέων όπως γλουταμικού όταν αποπολώνονται οι κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα την έκκριση γλουταμικού. Η ενεργοποίηση ορισμένων αμινοξέων και κυρίως του γλουταμικού είναι θεμελιώδης στον μηχανισμό του μεταισχαιμικού κυτταρικού θανάτου. Η επίδραση του γλουταμικού στις νευρικές συνάψεις και η μεμβρανική εκπόλωση οδηγούν στην 'πλημμύρα' ιόντων Na^+ και Ca^{+2} ενδοκυττάρια και στην ενεργοποίηση της νευρωνικής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου, (Nitric Oxide, NO) (neuronal Nitric Oxide Synthetase, nNOS) και υπερπαραγωγή του νευρορρυθμιστικού NO, που σε υψηλά επίπεδα επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο. Διάφορες πειραματικές εργασίες απέδειξαν την ευεργετική επίδραση της

συστηματικής υποθερμίας στην μειωμένη απελευθέρωση τέτοιων νευροδιαβιβαστικών αμινοξέων, τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στον νωτιαίο μυελό. (Baumgartner et al 1999, Tseng et al 1997, Brock et al 1996, Rokkas et al 1995) Η αυξημένη ενδοκυττάρια είσοδος ιόντων Ca ενεργοποιεί επίσης, ένα καταρράκτη διεργασιών που επιταχύνουν την ισχαιμική νευρωνική βλάβη, όπως φωσφολιπάσες, φωσφολιπάση A2, ενδονουκλεάσες, πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Μετά από 15 λεπτά νορμοθερμικής ισχαιμίας η ανάνηψη του εγκεφαλικού μεταβολισμού γίνεται σε 1 με 3 λεπτά, ενώ σε ήπια υποθερμία ακόμα γρηγορότερα. Η ανάνηψη όμως μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση είναι διαφορετική. Η εγκεφαλική ροή και η μεταβολική κατανάλωση οξυγόνου επιδεινώνονται κατά την επαναιμάτωση λόγω διαταραχών της ενδοκυττάριας οξυγόνωσης. Η παραγωγή ενεργειακών αποθεμάτων μετά από παύση είναι ιδιαίτερα αργή και το ίδιο και η αντιρρόπηση της οξέωσης, ενώ οι φυσιολογικές τιμές γλυκόζης, γαλακτικού και πυρουβικού οξέος επανέρχονται μετά τις 4 ώρες από την παύση. Το χαρακτηριστικό στην βλάβη επαναιμάτωσης είναι η φλεγμονώδης αντίδραση, με την συγκέντρωση των λευκοκυττάρων, προκαλούμενη όχι μόνο από την παύση αλλά και από την εξωσωματική κυκλοφορία. Η επαγόμενη παραγωγή κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (Tumor Necrosis Factor, TNFα) και η ιντερλευκίνη 1-β (Interleukin, IL 1-β), προάγει την έκφραση προσκολλητικών μορίων στην επιφάνεια των κυττάρων, που σύντομα οδηγούν, μέσω της μειωμένης λειτουργικότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων στο κυτταρικό οίδημα και τελικά στον κυτταρικό θάνατο. (Lipton 1999)

Μηχανισμοί Νευρωνικού Κυτταρικού Θανάτου

Πιστεύεται ότι η διακοπή της κυκλοφορίας αποτελεί την απαρχή μιας σειράς γεγονότων που τελικά οδηγούν σε νευρωνικό κυτταρικό θάνατο, μέσω ενός τυπικού αποπτωτικού μοντέλου αλλά και μέσω της νέκρωσης. (Maier et al 1998, Mehmet et al 1998) Ο νευρωνικός κυτταρικός θάνατος αποτελεί φυσιολογική διαδικασία κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος, αλλά παριστά παθολογικό γεγονός σε εκφυλιστικές και τραυματικές παθήσεις του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Οι διαθέσιμες γνώσεις υποδεικνύουν ότι η επιβίωση των νευρώνων και ο κυτταρικός τους θάνατος είναι αυστηρά ρυθμιζόμενα, άριστα ενορχηστρωμένα, δυναμικά γεγονότα, τα οποία εξαρτώνται από ποικίλους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Οι Kerr et al (1972) περιέγραψαν δύο τύπους κυτταρικού θανάτου: την κυτταρική νέκρωση, που είναι



απότοκος τραυματισμού και προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση και την απόπτωση, που φυσιολογικά παρατηρείται στα πλαίσια της ανάπτυξης και της ομοιοστασίας του νευρικού ιστού και σήμερα προσδιορίζεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Πρόσφατα αναγνωρίζεται και η αυτοφαγία σαν ξεχωριστός τύπος κυτταρικού θανάτου. (Repici 2007)

Η απόπτωση και η νέκρωση αποτελούν τρόπους κυτταρικού θανάτου. Σε γενικές γραμμές, θεωρούνται διακριτοί ως μηχανισμοί πρόκλησης κυτταρικού θανάτου, εντούτοις, επαρκείς ενδείξεις υποστηρίζουν τη συνοχή και επικάλυψη του αποπτωτικού και νεκρωτικού τύπου κυτταρικού θανάτου. (Martin et al 2001) Με βάση αυτή τη θεώρηση, ο νευρωνικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί από ποικίλη συμμετοχή τόσο αποπτωτικών όσο και νεκρωτικών μηχανισμών που ταυτόχρονα συνυπάρχουν, καθιστώντας έτσι δύσκολη τη σαφήνεια διάκρισης μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης. (Amir et al 2005) Σήμερα, πιστεύεται ότι η απόπτωση μπορεί να συνεισφέρει στη νευρωνική εκφύλιση σε περιπτώσεις νευρολογικής βλάβης, όπως εγκεφαλική ισχαιμία και κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου είναι συνεχής και ο εγκέφαλος αρχίζει να παρουσιάζει σημεία βλάβης 6 ώρες μετά το ερέθισμα και συνεχίζει για τουλάχιστον 72 ώρες. Είναι ακόμα άγνωστο το τι είναι αυτό που οδηγεί ένα νευρώνα σε μία μορφή κυτταρικού θανάτου αντί της άλλης σε απάντηση στο ίδιο ερέθισμα, δηλαδή στην υποξία-ισχαιμία. Πάντως έχει διαπιστωθεί πειραματικά ότι έντονα ερεθίσματα οδηγούν σε νέκρωση ενώ σε μια μικρότερου βαθμού βλάβη ανευρίσκονται περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα. (Tseng et al 1997, Hagl et al 2001)

Κυτταρική Ομοιόσταση και ο Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση χρησιμοποιώντας, εν μέρει, αλληλεξαρτώμενες ρυθμιστικές οδούς. Για παράδειγμα, το γονίδιο p53 συμμετέχει στην απόπτωση αλλά και στον κυτταρικό κύκλο. Μετά από βλάβη του DNA, η έκφραση της πρωτεΐνης p53 αυξάνεται και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να επιδιορθώσει τη βλάβη πριν το διπλασιασμό. Εάν η βλάβη είναι μη διορθώσιμη τότε το κύτταρο αποπίπτει (Prives and Hall 1999). Κατά συνέπεια, η τελική κατάληξη (επιβίωση/πολλαπλασιασμός ή απόπτωση) καθορίζεται από τη δυναμική σχέση προαποπτωτικών διαδικασιών κυτταρικής αύξησης και αντιαποπτωτικών μηνυμάτων κυτταρικής επιβίωσης (Lyndberg and Weinberg 1999; Evan and Littlewood 1998).

Τα μόρια κλειδιά των ρυθμιστικών μηχανισμών των φάσεων του κυτταρικού κύκλου είναι μια ομάδα ομόλογων σερίνο-θρεονινο-κινασών οι οποίες καλούνται κυκλινο-

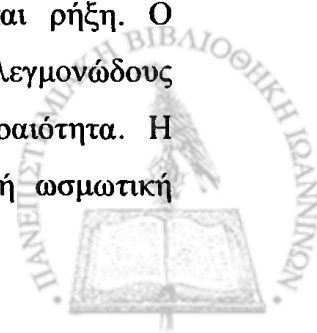


εξαρτώμενες κινάσες (cyclin dependent kinases, CDKs). Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί επτά CDKs και τέσσερις ομάδες κυκλινών (D, E, A, και B). Τα ενεργά αυτά συμπλέγματα δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου, κατά τις οποίες φωσφορυλιώνουν τα κατάλληλα υποστρώματα. Υπάρχουν δύο οικογένειες κυκλινών: 1) Η G1 οικογένεια που μεσολαβούν τη είσοδο του κυττάρου μέσω της G1-φάσης και την είσοδο στη S-φάση και 2) οι μιτωτικές κυκλίνες που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA στην S-φάση ή μεσολαβούν την μη αντιστρεπτή είσοδο στη μίτωση (Prives and Hall 1999, Lyndberg and Weinberg 1999).

Οι μηχανισμοί του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού αλλά δεν διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και της ισοκατανομής του. Επίσης, οι μηχανισμοί αυτοί ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό, αλλά δεν δίνουν την δυνατότητα μετά-μιτωτικής διαφοροποίησης στο κύτταρο. Έτσι, το κύτταρο έχει αναπτύξει αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου (checkpoints) του κύκλου που του επιτρέπουν, αφενός μεν, κάτω από ορισμένες συνθήκες να διαφοροποιηθεί, αφετέρου δε, να αμυνθεί στο stress που περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Αν, παρόλα αυτά, συμβούν τέτοιες διαταραχές, αυτές οδηγούν σε μεταλλάξεις και γενωμική αστάθεια, οι οποίες με την σειρά τους μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση. Μία ομάδα από τους εκφραστές της αρνητικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου καλείται Cip και περιλαμβάνει τους CDKIs, p21/WAF1, p27, p57Kip τα οποία αναστέλλουν κυρίως τις CDKs 1 και 2. Ειδικότερα η p21/WAF1 αναστέλλει τις CDKs 1,2,4,5 και 6, ενώ η p27 τις CDKs 2,4,5 και 6.

Νέκρωση του νευρικού κυττάρου

Η νέκρωση είναι απότοκος οξέος οξειδωτικού στρες από την παρατεταμένη ισχαιμική βλάβη, και χαρακτηρίζεται από παθητικό κυτταρικό οίδημα, ταχεία ενεργειακή απώλεια και μια γενικευμένη διαταραχή της ενδογενούς ομοιόστασης του κυττάρου, με λύση του πυρήνα, των ενδοπυρηνικών οργανυλίων και της κυτταρικής μεμβράνης, που συνεπάγεται απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών, τα οποία προκαλούν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί σε εξοίδηση και βλάβη γειτονικών κυττάρων. Μορφολογικά, ο κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από πυκνωτικό πυρήνα, εξοιδημένο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα, εξοίδηση των κυτταρικών οργανυλίων και ρήξη. Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φλεγμονώδους αντίδρασης και εκτεταμένης βλαπτικής επίδρασης στην κυτταρική ακεραιότητα. Η ενεργειακή απώλεια οδηγεί σε δυσλειτουργία της αντλίας Na^+/K^+ , μαζική ωσμωτική



μετακίνηση ιόντων Na^+ και Cl^- και νερού ενδοκυττάρια και κυτταρική εξοίδηση. Η υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση Na^+ οδηγεί σε εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, άνοιγμα των διαύλων Ca^{+2} και μαζική συγκέντρωση αυτού. Τα ιόντα Ca^{+2} ενεργοποιούν ενδοκυττάρια πρωτεάσες και λιπάσες, που καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη και τα οργανύλια. (Murdoch et al 1990)

Απόπτωση του νευρικού κυττάρου

Η απόπτωση παριστά μια διαδικασία κυτταρικής αυτοκτονίας, οι μηχανισμοί της οποίας είναι κωδικοποιημένοι στα χρωμοσώματα όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Μολονότι η ικανότητα διεκπεραίωσης της απόπτωσης φαίνεται να είναι έμφυτη σε όλα τα κύτταρα, η δεκτικότητα ανταπόκρισης στα αποπτωτικά ερεθίσματα ποικίλει αξιοσημείωτα και επηρεάζεται από διάφορους εξωγενείς και αυτόνομους-κυτταρικούς παράγοντες. Η απόπτωση ρυθμίζεται με πολύπλοκα συστήματα μοριακής κωδικοποίησης, καταλήγοντας σε μια μεθοδική, ενεργειακά εξαρτώμενη, ενζυματική διάσπαση, σε χαρακτηριστικά μοριακά θραύσματα, του DNA, των λιπιδίων και άλλων μακρομορίων. Σε αντίθεση με τις παρατηρούμενες στην κυτταρική νέκρωση, οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στον αποπτωτικό θάνατο εξελισσόμενων κυττάρων, περιλαμβάνουν κυτταρική συρρίκνωση, φυσαλιδοποίηση των μεμβρανών, συμπύκνωση της χρωματίνης και κατάτμηση του DNA. (Kerr et al 1972)

Στην αποπτωτική διαδικασία μεσολαβούν μία σειρά πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται διαδοχικά και έχουν ένα τελικό κοινό μονοπάτι που οδηγεί στην γένεση μίας οικογένειας πρωτεϊνών κυστεΐνης, των κασπάσων. Οι κυρίαρχες κασπάσες στην απόπτωση είναι η κασπάση 3 και 8. Η εξωγενής οδός ενεργοποίησης γίνεται από τους φλεγμονώδεις παράγοντες Fas και TNF- α που δεσμεύονται σε επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς και ενεργοποιούν την κασπάση 8, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση 3. Η ενδογενής ενεργοποίηση της κασπάσης 3 γίνεται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα δυσλειτουργούντα μιτοχόνδρια. (Thompson 1995, Thornberry et al 1998) Η ακριβής αλληλουχία γεγονότων, που έχει ως απαρχή την ανίχνευση του αποπτωτικού σήματος στην κυτταρική επιφάνεια και καταλήγει στα χαρακτηρίζοντα την απόπτωση ευρήματα από τον πυρήνα του κυττάρου, δεν είναι καλά κατανοητή, με πολλά αδιευκρίνιστα σημεία στις περισσότερες από τις προτεινόμενες οδούς. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί διάφορα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου και ενδοκυτταρικά, κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στο νευρικό σύστημα. Μετά την έκθεση στο κατάλληλο ερέθισμα, το πρώτο στάδιο ή «στάδιο της

απόφασης» της απόπτωσης αφορά στο γενετικό έλεγχο του κυτταρικού θανάτου. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο ή «στάδιο της εκτέλεσης», που ευθύνεται για τις παρατηρούμενες μορφολογικές αλλαγές των αποπτωτικών κυττάρων (Kam and Ferch, 2000). Το στάδιο της απόφασης ή γενετικού ελέγχου του κυτταρικού θανάτου φαίνεται να μεσολαβείται από δύο γονίδια, τη γονιδιακή οικογένεια του Bcl-2 και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53, ενώ το στάδιο της εκτέλεσης της αποπτωτικής διαδικασίας προκύπτει ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κασπασών. Είναι πλέον αποδεκτό ότι, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τη γονιδιακή οικογένεια του Bcl-2 παριστούν ένα καθοριστικό σημείο ελέγχου, στη διαδρομή μιας διακριτής οδού που καταλήγει στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

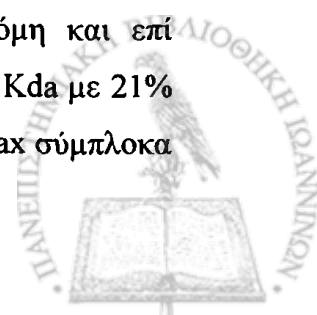
Σήματα Διέγερσης

Σημαντικό ρόλο παίζει η μεταβίβαση σήματος μέσω υποδοχέα. Η απόπτωση μπορεί να αρχίζει με τη διέγερση μιας σειράς υποδοχέων όπως CD95 (Fas/Apo 1) ή του υποδοχέα του TNF (tumor necrosis factor receptor, TNFR). Τα συνδετικά μόρια (ligands) που συνδέονται με τους υποδοχείς TNFR, ανήκουν στην υπεροικογένεια παραγόντων νέκρωσης όγκων TNF. Επιπρόσθετα, ο TNF φαίνεται να ενεργοποιεί τον άξονα του stress (δηλαδή τον επινεφριδιακό άξονα), κυρίως μέσω κεντρικής δράσης.

Έλεγχος και ρύθμιση

Για τη ρύθμιση της απόπτωσης σημαντική είναι η οικογένεια Bcl-2 η οποία χωρίζεται σε τρεις υπό-οικογένειες: 1) την Bcl-2, 2) την Bax και 3) την υπό-οικογένεια BH3. Η Bcl-2 υπο-οικογένεια συμπεριλαμβάνει τις Bcl-xL, mcl-1 κλπ και ευνοεί την κυτταρική επιβίωση, ενώ οι Bax και BH3 υπο-οικογένειες ευνοούν την απόπτωση. Η υπο-οικογένεια Bax περιλαμβάνει τις bak και bok, ενώ η υπό-οικογένεια BH3 τις Bik, Blk, Bad, Bid και άλλες πρωτεΐνες. Όλα τα μέλη των υποοικογενειών χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός από τα τέσσερα Bcl-2 ομόλογα domains.

Αναλυτικότερα, η Bcl-2 αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δρώντας ως αντιοξειδωτικός παράγοντας ή αναστέλλοντας τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η Bcl-x δίνει γένεση σε αντίγραφα, την Bcl-xL μακρύ, 230 αμινοξέων πρωτεΐνη που δείχνει μεγάλη ομολογία με το Bcl-2 και αναστέλλει την απόπτωση και την Bcl-xs βραχύ, 170 αμινοξέων πρωτεΐνη, που επάγει την απόπτωση ακόμη και επί παρουσίας της Bcl-2. Το Bax γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 21 Kda με 21% ομολογία με τη Bcl-2, αναστέλλει τη δράση της Bcl-2 σχηματίζοντας Bcl-2/Bax σύμπλοκα



ή ανταγωνιζόμενα άλλου στόχους της Bcl-2. Το Bak γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αυξάνει την απόπτωση, ενώ το mcl-1 γονίδιο φαίνεται ότι αναστέλλει την απόπτωση.

Γονιδιακή οικογένεια Bcl-2 – Στάδιο της απόφασης (γενετικός έλεγχος)

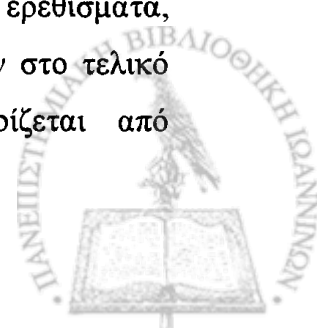
Η απόπτωση ελέγχεται γενετικά και πιστεύεται σήμερα ότι δύο γονίδια, το Bcl-2 και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη P53, διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο. Θεωρείται πλέον δεδομένος ο ρόλος των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τη γονιδιακή ομάδα του Bcl-2, ως σημαντικών ρυθμιστικών παραγόντων της αποπτωτικής διαδικασίας (Merry and Korsmeyer, 1997; Brown, 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές ανευρίσκονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και πιθανά ρυθμίζουν τη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου. Υπάρχει μια ομάδα πρωτεϊνών, παρόμοιες με τη Bcl-2, που επάγουν ή καταστέλλουν την απόπτωση (Yang et al, 1997). Πρωτεΐνες όπως οι Bcl-2 και Bcl-x_L αποτρέπουν την αποπτωτική διαδικασία (καταστολείς κυτταρικού θανάτου-death repressors), ενώ αντίθετα, οι Bcl-2 πρωτεΐνες όπως Bax, Bad, Bak και Bcl-x_C προάγουν την απόπτωση (επαγωγείς κυτταρικού θανάτου- death inducers) (Savitz et al, 1998). Η ταυτοποίηση διαφόρων Bcl-2 ομολόγων, πολλά από τα οποία σχηματίζουν όμο- και έτερο-διμερή, δίνει γένεση στην υπόθεση ότι τα μόρια αυτά ασκούν τη δράση τους, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Chao and Korsmeyer, 1998). Είναι γνωστό ότι η δεκτικότητα ενός μεμονωμένου κυττάρου σε Bcl-2 ερεθίσματα που διεγείρουν την απόπτωση καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το πρότυπο της γονιδιακής του έκφρασης, το μεταβολικό και εξελικτικό του στάδιο, καθώς επίσης και από τα σήματα διέγερσης και τις ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής μηνυμάτων απόπτωσης. Με βάση τα παραπάνω, η αναλογία μεταξύ των πρωτεϊνών που επάγουν και αυτών που καταστέλλουν την απόπτωση μπορεί να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο, με λειτουργία “ρεοστάτη”, που καθορίζει την κατάληξη ενός μεμονωμένου κυττάρου, δηλαδή αν τελικά θα επιζήσει ή θα πεθάνει (Oltvai, 1994). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την αναλογία Bcl-2:Bax ως καθοριστικό παράγοντα για τη δεκτικότητα ενός κυττάρου στην απόπτωση, όπως για παράδειγμα, σε περίπτωση υποξίας, η οποία συνεπάγεται αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bax και επακόλουθη αλλαγή της αναλογίας των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνών (Ashraf et al, 2002). Συγκεκριμένα, όταν το γονίδιο Bax υπερεκφραζόταν στα κύτταρα, ο αποπτωτικός θάνατος του κυττάρου, ως απάντηση σε ερεθίσματα επάγοντα τον κυτταρικό θάνατο, επιταχυνόταν, κατοχυρώνοντας έτσι το χαρακτηρισμό της ομώνυμης πρωτεΐνης ως αγωνιστή του κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, σε υπερέκφραση του γονιδίου Bcl-2, η αντίστοιχη

πρωτεΐνη βρέθηκε να σχηματίζει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Bax και η πρόοδος του κυτταρικού θανάτου καταστέλλοταν. Συνεπώς, η αναλογία των πρωτεϊνών Bcl-2:Bax είναι καθοριστική για την επιρρέπεια ενός κυττάρου στον αποπτωτικό θάνατο (Oltvai and Korsmeyer, 1994).

Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bax διαδραματίζουν αντίθετους ρόλους στη φυσιολογική αποπτωτική διαδικασία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου. Η πρωτεΐνη Bcl-2 ανευρίσκεται σε αφθονία στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο αρουραίων, και σε όψιμους εμβρυϊκούς εγκεφάλους ανιχνεύονται υψηλότερα επίπεδα Bcl-2 mRNA απ' ό,τι σε εγκεφάλους μετεμβρυϊκούς ή ενηλίκων αρουραίων (Reed, 1996). Αντίθετα, ανοσολογική αντίδραση της πρωτεΐνης Bax έχει διαπιστωθεί σε νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος ενήλικων ποντικών. Η πρωτεΐνη Bax θεωρείται ότι συμβάλλει στη δεκτικότητα των νευρωνικών κυττάρων στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Kitada et al, 1996). Με βάση πρόσφατες μελέτες, η πρωτεΐνη Bcl-2 μπορεί να δρα μέσω αντιοξειδωτικού μηχανισμού ενώ επιπρόσθετα φαίνεται να έχει και λειτουργία αναστολέα των πρωτεασών. Συγκεντρωτικά, οι μηχανισμοί της αντιαποπτωτικής λειτουργίας της Bcl-2 μπορεί να αφορούν στο σχηματισμό ετεροδιμερών με την πρωτεΐνη Bax, στην προφύλαξη από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ρύθμιση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, στην αντιοξειδωτική της δράση, που αποτρέπει την υπεροξείδωση της πυρηνικής μεμβράνης, καθώς και στη λειτουργία της ως αναστολέας πρωτεασών (Hockenbery et al, 1993). Η πρωτεΐνη Bax κάνει δυνατή την ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας με δράσεις όπως ενεργοποίηση των κασπασών, αλλαγή των ιδιοτήτων των διαύλων των κυτταρικών μεμβρανών, απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και σχηματισμός ετεροδιμερών με την πρωτεΐνη Bcl-2 (Goldstein, 1997).

Πρόσφατες παρατηρήσεις έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 ανευρίσκεται στον πυρηνικό φάκελο, σε τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου και στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων, χωρίς όμως να ανιχνεύεται σε διάφορα άλλα ενδοκυττάρια μεμβρανώδη διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένης και της κυτταρικής μεμβράνης (Hara et al, 1996; Krajewski et al, 1993). Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την εντόπιση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bax στην πυρηνική μεμβράνη (Wang et al, 1999).

Οι πρωτεΐνες αυτές, ενεργοποιούμενες από φυσιολογικά ή τραυματικά ερεθίσματα, φαίνεται να διευθύνουν την αλληλουχία των γεγονότων που θα καταλήξουν στο τελικό στάδιο εκτέλεσης της αποπτωτικής διαδικασίας, το οποίο χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των πρωτεασών της κυστεΐνης ή κασπασών (Reed, 1997).



P53

Στην παθογένεση της νευρωνικής απόπτωσης έχει επίσης εμπλακεί και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53. Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα, στοιχειοθετείται η υπόθεση ότι η P53, εφόσον λάβει τα κατάλληλα ερεθίσματα, μετακινείται εντός του κυτταρικού πυρήνα, όπου και διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην καθοδήγηση των νευρωνικών κυττάρων προς την κατεύθυνση της διαφοροποίησης ή της απόπτωσης (Eizenberg et al, 1996). Η πρωτεΐνη P53 είναι μια πυρηνική φωσφο-πρωτεΐνη 53 kDa, που προσκολλάται στο DNA για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA (Miyashita and Reed, 1995). Υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι η P53 μπορεί να επάγει και να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων Bax και Bcl-2 αντίστοιχα (Miyashita et al, 1994). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53, που χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά ευρεία κατανομή, παρουσιάζει εν δυνάμει ενεργότητα, που μπορεί να αποκαλυφθεί με χορήγηση γλυκοκορτικοειδών ή και έμμεσα, με ενεργοποίηση, ως απάντηση σε στρες, του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Maier et al, 1997; Almeida et al, 2000). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αλληλεξάρτηση κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης. Το γονίδιο p53 έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την έκφραση του bcl-2 γονιδίου και ενεργοποιεί την έκφραση του bax γονιδίου. Υψηλά επίπεδα της bcl-2 πρωτεΐνης ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, ενώ υψηλά επίπεδα της p53 πρωτεΐνης οδηγούν σε αύξηση της bax και ελάττωση της bcl-2, οδηγώντας της ισορροπία του κυττάρου προς την κατεύθυνση της απόπτωσης. (Lindberg and Weinberg 1999, Evan and Littlewood 1998).

Εκτέλεση

Οι κασπάσες λειτουργούν ως εκτελεστές της απόπτωσης και ως αποδέκτες προαποπτωτικών σημάτων. Ο τρόπος με τον οποίο οι κασπάσες επάγουν την απόπτωση έχει μερικώς κατανοηθεί και περιλαμβάνει: 1) απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν τα ζωντανά κύτταρα, 2) αποδόμηση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, 3) αποδόμηση των πυρηνικών μεμβρανών, και 4) απορρύθμιση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνών που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA, στην ωρίμανση του mRNA, και στην αντιγραφή του DNA. Η ρύθμιση της δράσης των κασπασών γίνεται με ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα που περιλαμβάνει παράγοντες, ρυθμιστικές πρωτεΐνες και παλίνδρομη ρύθμιση.

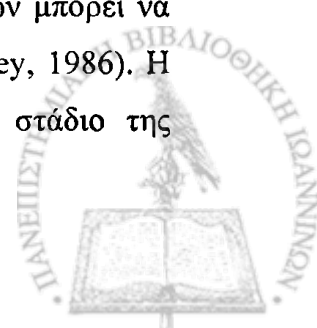


Κασπάσες

Τα κεντρικά γεγονότα στην απόπτωση είναι η πρωτεόλυση και η απενεργοποίηση των μιτοχονδρίων. Η κυτταρική αποσύνθεση επέρχεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μιας οικογένειας πρωτεασών της κυστεΐνης, που ονομάζονται κασπάσες (CASP) (Savitz et al, 1998). Η αφθονία των διαθέσιμων πληροφοριών συνηγορεί στο ότι μπορεί να υπάρχουν ποικίλες οδοί διεκπεραίωσης της απόπτωσης, που εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου και τον προκλητικό παράγοντα, και όλες αυτές οι οδοί πιθανά συγκλίνουν στο στάδιο της ενεργοποίησης των ICE/κασπασών. Το γονίδιο Ced-3, που κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση ομόλογη του μετατρεπτικού ενζύμου της ιντερλευκίνης-1β (Interleukin-1β Convertin Enzyme- ICE), είναι απαραίτητο για να συμβεί ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος (Ellis et al, 1991; Yuan et al, 1993). Τουλάχιστον έντεκα από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεασών CED/ICE έχουν αναγνωριστεί και βρεθεί να εμπλέκονται στην απόπτωση (Chinnaiyan and Dixit, 1996; Kuida et al, 1996). Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται κασπάσες, είναι πρωτεάσες της κυστεΐνης, οι οποίες προκαλούν σχάση ορισμένων πρωτεϊνών μετά από συγκεκριμένες θέσεις υπολειμμάτων ασπαρτικού οξέος, και ενεργοποιούνται μέσω αυτο-διάσχισης (Thornberry and Lazebnik, 1998), ενώ επιπλέον, μερικές από αυτές ενεργοποιούν άλλες, δίνοντας έτσι απαρχή σε ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη (Nagata, 1997) που σύντομα θα καταλήξει σε ανεπανόρθωτη βλάβη και θάνατο του κυττάρου.

Πρώιμα Εκφραζόμενα Γονίδια (Immediate Early Genes)

Υπάρχουν σήμερα αποδείξεις της ενεργοποίησης των πρώιμα εκφραζόμενων γονιδίων κατά τη διαδικασία της απόπτωσης στα νευρικά κύτταρα. Αυξημένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων c-Fos και c-Jun (Oo et al, 1999) καθώς και υψηλά επίπεδα του c-Jun mRNA (Miller and Johnsons, 1996) έχουν διαπιστωθεί σε νευρικά κύτταρα υπό απόπτωση. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι διεγερτικά-τοξικά ερεθίσματα, με τη μεσολάβηση των υποδοχέων του γλουταμινικού, πιθανά επισπεύδουν την έλευση νευρικής βλάβης (Bokesch et al, 1996). Μολονότι το γλουταμινικό και η ασπαρτάση αποτελούν μεγάλης σπουδαιότητας και διεγερτικά αμινοξέα στον εγκέφαλο, υπεύθυνα για πολλές φυσιολογικές νευρολογικές λειτουργίες, εντούτοις, κάτω από δυσμενείς συνθήκες (όπως ισχαιμία ή υποξία) η υπέρμετρη ενεργοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων μπορεί να συμβάλει στη νευρωνική βλάβη ή και κυτταρικό θάνατο (Rothman and Olney, 1986). Η παραπάνω τοξική διεγερσιμότητα φαίνεται να είναι συνηθισμένο τελικό στάδιο της

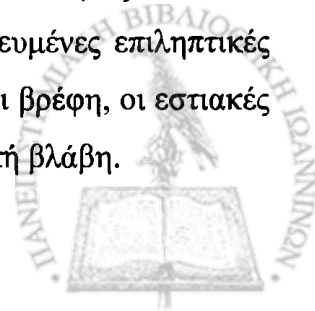


νευρικής κυτταρικής βλάβης και θανάτου, προερχόμενη από ποικίλες στρεσογόνες και παθολογικές καταστάσεις.

Εξωκυτταρική υπέρμετρη παρουσία γλουταμινικού αποτελεί το έναυσμα πρόκλησης όψιμου νευρωνικού κυτταρικού θανάτου, προάγοντας την εισροή ασβεστίου μέσα στα κύτταρα, μέσω της ενεργοποίησης των NMDA (N-methyl-D-aspartate) ή των μη-NMDA υποδοχέων του γλουταμινικού (Lipton and Rosenberg, 1994). Η δραστηριοποίηση των γλουταμινικών υποδοχέων, επακόλουθα, διεγείρει την έκφραση ταχέως επαγόμενων ενεργοποιητών της μεταγραφής, που είναι γνωστοί ως πρώιμα εκφραζόμενα γονίδια. Τα γονίδια αυτά δίνουν έναρξη σε ένα πολύπλοκο καταρράκτη γεγονότων, που μετατρέπουν προσλαμβανόμενα εξωκυτταρικά ερεθίσματα σε αλλαγές των κυτταρικών λειτουργιών, μέσω της ρυθμιστικής τους επίδρασης στην έκφραση των γονιδίων στόχων, που είναι τα όψιμα ανταποκρινόμενα γονίδια (late response genes) (Smeyne et al, 1993). Το πρώιμα εκφραζόμενο γονίδιο c-Fos παρουσιάζει ταχεία, πρόσκαιρη επαγωγή της έκφρασής του, στους νευρώνες του υποκαμινικού σχηματισμού του εγκεφάλου, μετά από επιληπτικές κρίσεις, υποξία και καθολική ισχαιμία, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μέσω του γλουταμινικού των NMDA και μη-NMDA υποδοχέων. Το πρωτεϊνικό παράγωγο του c-Fos mRNA, η πρωτεΐνη FOS, εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής ποικίλων όψιμα ανταποκρινόμενων γονιδίων, όπως της P53, της πρωτεΐνης του θερμικού shock, του Bcl-x, της υδροξυλάσης της τυροσίνης και των οπιοειδών πεπτιδίων (Sheng and Greenberg, 1990). Μερικά από τα όψιμα ανταποκρινόμενα γονίδια των οποίων επάγεται η έκφραση από το c-Fos σχετίζονται με την απόπτωση, ενώ άλλα εξασφαλίζουν την κυτταρική επιβίωση. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι τεκμηριωμένο κατά πόσο η έκφραση του c-Fos συσχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο, η παρουσία των σχετιζόμενων με το Fos πυρηνικών πρωτεϊνών παριστά ένα χρήσιμο δείκτη της ύπαρξης νευρωνικών κυττάρων υπό συνθήκες πίεσης.

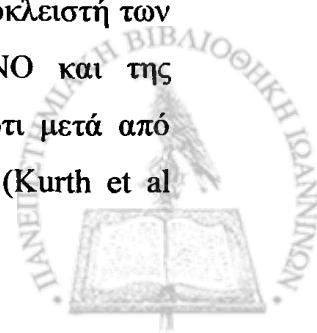
Εκλεκτική Νευρωνική Ευπάθεια

Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση προκαλεί καθολική και διάχυτη ισχαιμική βλάβη; παρόλα αυτά η καταστροφική επίδραση εντοπίζεται συνήθως σε συγκεκριμένες δομές και οδηγεί στην εμφάνιση συγκεκριμένης κλινικής συμπτωματολογίας. Κλινικά, στους ενήλικες, τα διανοητικά και κινητικά ελλείμματα και οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις τύπου Jackson (επιληψία κινητικού φλοιού) και στα νεογνά και βρέφη, οι εστιακές κρίσεις και η χορειοαθέτωση επισυμβαίνουν μετά από σοβαρή ισχαιμική βλάβη.



Μετά από παρατεταμένη κυκλοφορική παύση η κυτταρική βλάβη λόγω της ανοξίας είναι αναπόφευκτη. Οι εκδηλώσεις της βλάβης επισυμβαίνουν σε περιοχές του εγκεφάλου με υψηλό μεταβολικό ρυθμό, όπου η μεταβολική ενεργότητα συνεχίζει ακόμα και σε συνθήκες βαθειάς υποθερμίας. Σε περίπτωση καθολικής ισχαιμικής προσβολής, συγκεκριμένοι νευρωνικοί υποπληθυσμοί αναμένεται να προσβληθούν με διαδικασίες κυτταρικού θανάτου, ενώ άλλοι όχι. (Bottiger et al 1998, Laptook et al 1994) Το παραπάνω φαινόμενο που έχει χαρακτηριστεί ως εκλεκτική ευπάθεια, παρατηρείται σε εγκεφάλους τόσο ενηλίκων όσο και νεογνών. Οι νευρώνες του ιππόκαμπου, της παρεγκεφαλίδας, του ραβδωτού σώματος, της αμυγδαλής, του πλάγιου θαλαμικού πυρήνα και της τρίτης έως πέμπτης στιβάδας του νεοφλοιού είναι εκλεκτικά ευάλωτοι στην ισχαιμία του εγκεφάλου σε ενήλικες. Η απώλεια των νευρώνων στις προαναφερθείσες ανατομικές περιοχές έχει ενοχοποιηθεί για την παρατηρούμενη εξασθένηση της μνήμης, της ικανότητας μάθησης, της συναισθηματικής και κινητικής λειτουργίας, σε ενήλικες που υποβάλλονται σε υποθερμική κυκλοφορική παύση. Πιο συγκεκριμένα ο ιππόκαμπος είναι η θέση απόκτησης των νέων πληροφοριών και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην ανοξική κυτταρική βλάβη λόγω του υψηλού μεταβολικού ρυθμού. Πιθανολογείται λοιπόν ότι οι νευρολογικές εκδηλώσεις μετά από παρατεταμένη πάυση, που έχουν σχέση με την λειτουργία της μνήμης οφείλονται σε βλάβη στον ιππόκαμπο. Στα νεογνά και στα βρέφη από 6 έως 12 μηνών, η χορειοαθέτωση αποτελεί την κύρια εκδήλωση μετά από βλάβη στα βασικά γάγγλια και την παρεγκεφαλίδα.

Η τοπογραφία του εκλεκτικού νευρωνικού κυτταρικού θανάτου μετά από παρατεταμένη κυκλοφορική παύση αντιστοιχεί με την κατανομή των υποδοχέων των αμινοξέων στα πυραμιδικά κύτταρα της CA-1 περιοχής του ιππόκαμπου, την μοριακή στιβάδα του οδοντωτού πυρήνα, στον ενδορρινικό φλοιό και στην μοριακή στιβάδα της παρεγκεφαλίδας. Ο ρόλος των αμινοξέων και της pNOS στην παθογένεση της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση έχει μελετηθεί αρκετά. Έχει βρεθεί πειραματικά σε σκύλους ότι οι ευαίσθητες περιοχές του εγκεφάλου μετά από παρατεταμένη ισχαιμία χαρακτηρίζονται από υψηλή πυκνότητα υποδοχέων γλουταμικού. Με την χρήση της τεχνικής της ενδοεγκεφαλικής μικροδιάλυσης, οι Tseng και συν έδειξαν ότι η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση αυξάνει τα επίπεδα του εγκεφαλικού γλουταμικού και ασπαρτικού και της γλυκίνης. Η χρήση του αποκλειστή των υποδοχέων NMDA, MK-801, μείωσε σημαντικά την παραγωγή του NO και της απόπτωσης. (Tseng et al 1997) Επίσης και σε χοίρεια μοντέλα βρέθηκε ότι μετά από κυκλοφορική παύση επηρεάζονται κυρίως ο νεοφλοιός και ο ιππόκαμπος. (Kurth et al



1999) Μελέτες, με λειτουργική απεικόνιση σε νεογνά, αναδεικνύουν ότι η νορμοθερμική υποξική ισχαιμική βλάβη συνδέεται με λειτουργικά υπερμεταβολικές (υψηλοί μεταβολικοί ρυθμοί χρήσης της γλυκόζης) περιοχές του εγκεφάλου όπως βασικά γάγγλια, στέλεχος και αισθητικός φλοιός. (Chugani 1999)

Το μοτίβο του κυτταρικού θανάτου δεν είναι κοινό και ενιαίο και μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος, την ηλικία και το πειραματικό μοντέλο. Συγκεκριμένες περιοχές αναδεικνύουν καθυστερημένα τον νευρωνικό θάνατο μετά από ισχαιμία και ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το είδος και την βαρύτητα της ισχαιμίας. Η εκλεκτική ευαισθησία λοιπόν, ποικίλει ανάλογα με τον χρόνο μετά την ισχαιμία σε διαφορετικά μοντέλα, ακόμα και στο ίδιο μοντέλο. (Ye et al 1996) Επίσης, οι υποθερμικές συνθήκες και η ηλικία διαφοροποιούν την κατανομή της ευαισθησίας. Συγκεκριμένα, η υποθερμία δεν φαίνεται να παρέχει την ίδια προστασία σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου και μετά από υποθερμική ολική ισχαιμία ο θάλαμος και το στέλεχος προστατεύονται λιγότερο από τις υπόλοιπες περιοχές. Στον ενήλικα, στην νορμοθερμική ισχαιμία, οι ευαίσθητες περιοχές περιλαμβάνουν τον ιππόκαμπο, το ραβδωτό σώμα, την παρεγκεφαλίδα, τον θάλαμο, την αμυγδαλή και τον νεοφλοιό ενώ συγκριτικά στα νεογνά το ραβδωτό σώμα και τον νεοφλοιό σε μεγαλύτερο βαθμό. (Kurth et al 1999) Επίσης, οι κινητικές διαταραχές και οι διαταραχές μνήμης που εκδηλώνονται κυρίως στα μεγαλύτερης ηλικίας άτομα μπορεί να συσχετίζονται με την βραδύτερη ανάνηψη από την νευρωνική βλάβη λόγω μειωμένων ενεργειακών εγκεφαλικών αποθεμάτων.

Η Μέθοδος TUNEL ως Δείκτης Απόπτωσης

Οι τεχνικές εντόπισης των αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις, βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και στην ανίχνευση του κερματισμένου DNA in situ. Μελέτες υπέδειξαν ως έναν από τους βιοχημικούς δείκτες της απόπτωσης, τη διάσπαση του DNA σε θέσεις ενδονουκλεοσωματικής σύνδεσης, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό κλιμακωτού DNA από πολυμερή των 180-200bp, όπως διακρίνονται με την ηλεκτροφόρηση με gel αραγόζης. (Compton et al 1992) Η τεχνική TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling], που χρησιμοποιείται συχνότερα, στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην προσθήκη βιοτινυλιωμένου νουκλεοτιδίου στις θέσεις εντομής. (Gavrieli et al 1992) Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται σε τομές ψυκτικού μικροτόμου και παραφίνης. Για την επιτυχία της αντίδρασης πρέπει να αποφεύγονται οι παρατεταμένοι

χρόνοι μονιμοποίησης, δεδομένου ότι ελαττώνουν την ευαισθησία. Παράγοντες σχετικοί με την αυτόλυση των ιστών, τη μονιμοποίηση, τη σκλήνωση, το κόψιμο, την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με H_2O_2 , τις διάφορες προεργασίες και, κυρίως, η νέκρωση μπορούν να προκαλέσουν «μη αποπτωτικό» κερματισμό του DNA. Η προετοιμασία των ιστών πριν από την αντίδραση περιλαμβάνει επεξεργασία στο φούρνο μικροκυμάτων ή και πρωτεόλυση με πεψίνη ή πρωτεΐνάση K. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η χρήση μαρτύρων στους οποίους παραλείπεται το στάδιο της TdT αντίδρασης και η πολυπαραμετρική προσέγγιση, π.χ. TUNEL και ευρήματα μορφολογικά ή ανοσοϊστοχημικά, για την ανίχνευση των σχετικών με την απόπτωση πρωτεϊνών, ή *in situ* υβριδισμός.

Η χρήση της ανίχνευσης του κερματισμένου DNA στην διερεύνηση του ρόλου της απόπτωσης στον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο είναι πλέον ευρεία. Οι περισσότερες μελέτες που αναδεικνύουν ολιγονουκλεωσώμικο κερματισμένο DNA μετά από εγκεφαλική ισχαιμία δεν συνεχίζουν παραπέρα την ανάλυση και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, ο τρόπος αυτός κατάτμησης του DNA έχει επίσης παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις κυτταρικού θανάτου με νεκρωτικό μηχανισμό, υποδεικνύοντας ότι η κατάτμηση του DNA δεν μπορεί να αποτελεί το μοναδικό κριτήριο, αλλά απαιτείται ταυτόχρονη, συνολική, μορφολογική εκτίμηση του κυττάρου για την αναγνώριση της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, αποπτωτικό ορίζεται ένα κύτταρο που εκτός από την θετικότητα στην TUNEL, χαρακτηρίζεται από ειδικά ιστολογικά ευρήματα, όπως δύο ή περισσότερα από τα κλασσικά μορφολογικά σημεία της απόπτωσης: 1. πύκνωση χρωματίνης, 2. φυσαλιδοποίηση μεμβράνης, 3. ρίκνωση πυρήνα και 4. πύκνωση κυτταροπλάσματος. (Sasthy and Rao, 2000)

6. Άλλες Μέθοδοι Εγκεφαλικής Προστασίας στην Καρδιοχειρουργική

Η σχετικά υψηλή επίπτωση νευρολογικών επιπλοκών οδήγησε την έρευνα σε εναλλακτικές ή συμπληρωματικές μεθόδους εγκεφαλικής προστασίας σε παρατεταμένη ολική κυκλοφορική παύση. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν η ανάδρομη εγκεφαλική αιμάτωση, η εκλεκτική ορθόδρομη εγκεφαλική αιμάτωση και εναλλακτικές θέσεις «καννουλαρίσματος» της αορτής, και διάφοροι φαρμακολογικοί παράγοντες.



Ανάδρομη Εγκεφαλική Αιμάτωση (Retrograde Cerebral Perfusion, RCP)

Η ανάδρομη εγκεφαλική αιμάτωση μέσω της άνω κοίλης φλέβας χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην επείγουσα θεραπεία της αερώδους μαζικής εμβολής κατά την διάρκεια της Ε/Κ. (Mills et al 1980) Τα θεωρητικά πλεονεκτήματα είναι η διατήρηση της ενδοκρανιακής υποθερμίας, το «ξέπλυμα» των μικροεμβόλων, η μεταβολική υποστήριξη η απομάκρυνση τοξικών μεταβολιτών και παραγώγων ενώ μειονέκτημα είναι το προκαλούμενο εγκεφαλικό οίδημα και κατά συνέπεια η επιδείνωση της εγκεφαλικής ισχαιμίας. (Safi et al 1997, Wong et al 1999) Πειραματικές μελέτες ανέδειξαν καλύτερη θρεπτική υποστήριξη σε μερικά είδη όπως στα κουνέλια αλλά όχι σε κάποια άλλα όπως στους χοίρους ή στους σκύλους (Midulla et al 1994, Ye et al 1997, Boeckxstaens et al 1995) ενώ άλλες μελέτες παρουσίασαν καλύτερα ιστολογικά και νευροψυχολογικά αποτελέσματα. (Midulla et al 1994, Juvonen 1998) Στους ανθρώπους, υπάρχουν δείγματα καλύτερης αιμάτωσης και πρόσληψης οξυγόνου αλλά μόνο το 5% της συνολικής ανάδρομης ροής παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία στον εγκέφαλο. (Ye et al 1996 & 1997, Pagano et al 1996) Αρχικά, κάποιες κλινικές σειρές έδειξαν μείωση θνητότητας και νευρολογικών βλαβών με την χρήση της μεθόδου αυτής υποβοηθητικά με την ΥΟΚΠ. (Okita et al 2001, Coselli et al 1997, Bavaria et al 1997, Kitamura et al 1995, Safi et al 1997) Τα τελευταία χρόνια η χρήση της ανάδρομης αιμάτωσης σταδιακά εγκαταλείπεται από τους χειρουργούς καθότι αποδεικνύεται ότι όχι μόνο, είναι περιορισμένη η διατήρηση του εγκεφαλικού μεταβολισμού αλλά και όψιμη η εμφάνιση νευρολογικής σημειολογίας μετεγχειρητικά. (Ye et al 1997, Reich et al 2001)

Εκλεκτική Ορθόδρομη Εγκεφαλική Αιμάτωση (Selective Antegrade Cerebral Perfusion, SACP)

Η ορθόδρομη εγκεφαλική αιμάτωση μέσω καθετηριασμού της ανώνυμης (ή πιο περιφερικά της δεξιάς κοινής καρωτίδας) και της αριστερής κοινής καρωτίδας αρτηρίας, παρέχει την πιο φυσιολογική και ικανή εγκεφαλική αιμάτωση. Η θερμοκρασία του αίματος ρυθμίζεται από την μέτρια υποθερμία μέχρι και τους 18 °C και η ροή στα 10 με 20 ml/Kg/min ή προσαρμόζεται ώστε να διατηρείται πίεση 40 με 50 mmHg στην δεξιά κερκιδική αρτηρία. Τα κλινικά αποτελέσματα που αφορούν στην ταχεία εγκεφαλική ανάνηψη είναι εξαιρετικά. (Bachet et al 1999, Kazui et al 2000 & 2001, Okita et al 2001) Πειραματικές μελέτες ανέδειξαν σημαντική εγκεφαλική ροή και συνεχή αερόβιο μεταβολισμό κατά την ορθόδρομη αιμάτωση με λιγότερο υπεραιμική αντίδραση και μειωμένο διάστημα εγκεφαλικής ευαισθησίας. (Harrington et al 2007) Για την αποφυγή

χειρισμών σε αυτά τα σχετικά μικρά αγγεία και επομένως προβλημάτων όπως, διαχωρισμοί ή εμβολικά φαινόμενα από απόσπαση αθηρωματωδών πλακών, προτιμάται η μονόπλευρη εγκεφαλική αιμάτωση με απευθείας «καννουλάρισμα» της δεξιάς υποκλειδίου αρτηρίας και αποκλεισμό της αριστερής κοινής καρωτίδος και της υποκλειδίου αρτηρίας. Η αιμάτωση του δεξιού εγκεφαλικού ημισφαιρίου γίνεται ορθόδρομα ενώ του αριστερού γίνεται μέσω του αρτηριακού κύκλου του Willis. (Hagl et al 2001, Tasdemir 2002, Strauch 2003 & 2004)

Φαρμακολογικοί Παράγοντες

Η ευεργετική επίδραση που ασκείται στον εγκέφαλο κατά την περίοδο της ισχαιμίας από τους μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενους παράγοντες, γίνεται μέσω τριών μηχανισμών: την μείωση αναγκών εγκεφαλικής οξυγόνωσης, την αύξηση της κατανομής του εγκεφαλικού οξυγόνου και την αναστολή καταστρεπτικών ενδοκυττάρων διεργασιών. (Hall et al 1990) Παραδείγματα αποτελούν ουσίες όπως, τα βαρβιτουρικά, πτητικά αναισθητικά, οι βενζοδιαζεπίνες και οι αναστολείς των διαύλων ασβεστίου. Νεαροί χοίροι που υποβλήθηκαν σε ολική κυκλοφορική παύση και αναισθητοποιήθηκαν με την χρήση δεσφλουρανίου είχαν καλύτερα νευρολογικά αποτελέσματα και μικρότερη νευρωνική ιστική βλάβη από την χρήση μόνο φεντανύλης. (Kurth et al 2001) Επίσης, έλεγχος της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης με την χρήση μεθυλ πρεδνιζολόνης (Langley et al 2000, Shum-Tim et al 2003) και διήθησης λευκοκυττάρων (Rimpilainen et al 2000, Langley et al 2000) προάγει την νευροπροστασία. Πρόσφατα εισήχθη και μία νέα μέθοδος φαρμακευτικής προγύμνασης (preconditioning) με την χρήση της διαζοξιδης (Shake et al 2000) ενώ εξίσου καλά αποτελέσματα φαίνεται να προκύπτουν από την χρήση αναστολέων των υποδοχέων της θρομβοξανής A2 (Tsui et al 1997) και της απροτινίνης. (Aoki et al 1994) Πειραματικά στοιχεία όμως, που προκύπτουν από μελέτες στους ενήλικες φαίνεται να μην εφαρμόζονται και στα νεογνά, πχ ότι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης επηρεάζουν αρνητικά τα νευρολογικά αποτελέσματα σε ενήλικες σε αντίθεση με τα νεογνά. (de Ferranti et al 2004)



7. Η Χρήση των Πειραματικών Μοντέλων στην Βιοιατρική Έρευνα

Η σημαντικότητα και η εγκυρότητα σε συνάρτηση με την χρησιμότητα, όσο αφορά την εξαγωγή συμπερασμάτων από ένα ζωικό πειραματικό μοντέλο, εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου. Τα πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της βιοιατρικής έρευνας και τα τελευταία 50 χρόνια αξιόλογη πρόοδος έχει σημειωθεί σε διάφορα ερευνητικά πεδία, όπως στην δημιουργία εμβολίων, αντιβιοτικών και φαρμάκων για χρόνιες παθήσεις. Πρόοδος παρατηρείται, επίσης στην καταπολέμηση νόσων, όπως κακοήθειες, κυστική ίνωση, AIDS και νόσος Alzheimer.

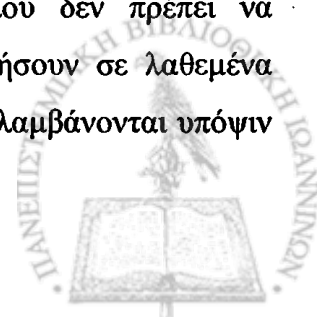
Κατάταξη Πειραματικών Μοντέλων

Τα μοντέλα μπορεί να είναι «διερευνητικά» (exploratory), «επεξηγηματικά» (explanatory) ή μοντέλα «πρόβλεψης» (predictive). Τα πρώτα έχουν στόχο την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών που συνδέονται για παράδειγμα, με μία μη φυσιολογική βιολογική λειτουργία, ενώ τα δεύτερα χρησιμοποιούνται για την κατανόηση πολύπλοκων βιολογικών προβλημάτων και βασίζονται περισσότερο στην χρήση φυσικομαθηματικών συστημάτων. Τέλος τα μοντέλα πρόβλεψης έχουν χρήση στην εξέταση των θεραπευτικών μέσων για την ίαση νοσημάτων ή την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών συστατικών. Σε κάθε περίπτωση αυτό που έχει σημασία είναι η ομοιότητα των βιολογικών δομών και λειτουργιών του μοντέλου με τις αντίστοιχες ανθρώπινες, δηλαδή η υψηλή πιστότητα.

Επίσης, τα μοντέλα διακρίνονται σε «ομόλογα», αν τα συμπτώματα και η πορεία της νόσου στο μοντέλο είναι όμοια με τα ανθρώπινα δεδομένα, «ισομορφικά» αν είναι παρόμοια αλλά διαφορετικής αιτιολογίας. Τις περισσότερες φορές, τα μοντέλα δεν ανήκουν σε καμία από τις δύο κατηγορίες και ονομάζονται «μερικά», όταν πρόκειται για μελέτη συγκεκριμένου μηχανισμού και θεραπείας.

Επιλογή Πειραματικού Μοντέλου

Από την στιγμή που θα αποφασιστεί ότι η έρευνα θα βασιστεί σε πειραματικό μοντέλο, θα πρέπει να επιλεγεί το κατάλληλο είδος μετά από διεξοδική έρευνα της βιβλιογραφίας ενώ σημαντικό ρόλο στην επιλογή παίζει ο στόχος του πρωτοκόλλου. Η διαθεσιμότητα, η οικειότητα ή το κόστος ενός ζωικού μοντέλου δεν πρέπει να αποτελέσουν την βάση της επιλογής γιατί μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε λαθεμένα συμπεράσματα. Κάποιοι γενικοί κανόνες επιλογής του μοντέλου που λαμβάνονται υπόψη



είναι: καταλληλότητα, ικανότητα μεταφοράς πληροφοριών, γνώση των βιολογικών ιδιοτήτων, ικανότητα γενίκευσης των αποτελεσμάτων, προσαρμογή και ευκολία χειρισμών, συνθήκες πειράματος, το μέγεθος, η ηλικία, το φύλο και ο αριθμός των πειραματοζώων, και τέλος ηθικοί και οικολογικοί προβληματισμοί. (Rand 2004)

Το Χοίρειο Πειραματικό Μοντέλο

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερη συχνότητα στην ιατρική έρευνα είναι οι αρουραίοι και τα ποντίκια, κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη νέων θεραπειών και στην τοξικότητα φαρμάκων. Στην χειρουργική έρευνα όμως, και ιδιαίτερα στην καρδιοχειρουργική, συνήθως χρησιμοποιούνται μεγαλύτερα ζώα όπως το πρόβατο, ο σκύλος και ο χοίρος, λόγω εύκολης εφαρμογής των χειρουργικών μεθόδων και μεγαλύτερης ομοιότητας των ανατομικών δομών και των μεταβολικών λειτουργιών. Η καλή γνώση της συγκριτικής ανατομίας και φυσιολογίας είναι απαραίτητη στην επιλογή ενός μοντέλου.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ο χοίρος, και συγκεκριμένα το γένος *Sus scrofa domestica*, έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική έρευνα, με πολύ καλά αποτελέσματα. Τα κυριότερα συστήματα που ερευνώνται με την χρήση χοίρειων πειραματικών μοντέλων, είναι το καρδιαγγειακό, το πεπτικό, το ουροποιητικό και τελευταία το νευρικό σύστημα. Οι πειραματικές έρευνες στην καρδιοχειρουργική εστιάζονται στο καρδιαγγειακό και το νευρικό σύστημα, η συγκριτική ανατομία των οποίων σχολιάζεται παρακάτω.

Καρδιαγγειακό Σύστημα

Η καρδιά του γουρουνιού είναι ανατομικά όμοια με την ανθρώπινη με μόνη διαφορά τη παρουσία της αριστερής αζύγου (ημιάζυγος) φλέβας, που αποχετεύει το μεσοπλεύριο σύστημα στον στεφανιαίο κόλπο. Το βάρος και το μέγεθος αυτής είναι περίπου ίδιο με το ανθρώπινο και αποτελεί το 0,5% του βάρους σώματος στα ώριμα ζώα. Το στεφανιαίο σύστημα είναι όμοιο με το 90% του ανθρώπινου πληθυσμού σε ανατομία και λειτουργία, χωρίς την προϋπαρξή παράπλευρου δικτύου στο μυοκάρδιο. Το σύστημα αγωγής των ερεθισμάτων είναι περισσότερο νευρομυογενές, με ταχύτερους ρυθμούς ενώ η αιματική παροχή του είναι από την οπίσθια διαφραγματική αρτηρία και η κυκλοφορία είναι επικρατούσα δεξιά. Τα αγγεία του χοίρου είναι πιο ευαίσθητα στον αγγειόσπασμο κατά τους χειρισμούς και πολλά από τα περιφερικά αγγεία εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βάθος στους ιστούς, συγκριτικά με άλλα ζώα. Επίσης έχει βρεθεί ότι σε αντίθεση με τον σκύλο, ο



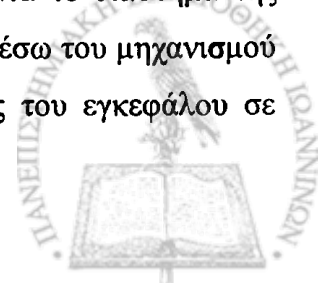
χοίρος χαρακτηρίζεται από έλλειψη βαλβίδων στις έσω σφαγίτιδες φλέβες, γεγονός που τον καθιστά καταλληλότερο για την πειραματική μελέτη της ανάδρομης εγκεφαλικής ροής. Οι χοίροι εμφανίζουν παρόμοιες συγγενείς καρδιοπάθειες, όπως πχ έλλειμμα μεσοκοιλιακού διαφράγματος, ανοικτός βοτάλειος πόρος κτλ. Επίσης έχει βρεθεί ότι ακόμα και ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών και η διαδικασία της αθηρογένεσης είναι ίδια με του ανθρώπου. Το ίδιο συμβαίνει και με το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τις αρρυθμίες κατά την επαναιμάτωση και την επούλωση του μυοκαρδίου.

Νευρικό Σύστημα

Ο εγκέφαλος του χοίρου είναι σχετικά ευμεγέθης και βρίσκεται στο κρανίο, τα οστά του οποίου είναι ιδιαίτερα ισχυρά. Η ανατομία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, όπως και η αιματική παροχή είναι σχεδόν ίδια με την ανθρώπινη. Οι εμβρυονικοί και οι εμβυικοί εγκέφαλοι όλων των θηλαστικών αναπτύσσονται με παρόμοιο τρόπο. Το νευρικό σύστημα εξελίσσεται από ένα επιμηκυμένο σωληνωτό κυτταρικό σχηματισμό. Το κεφαλικό άκρο (κρανιακό) του εμβρυονικού σωλήνα επεκτείνεται και διαφοροποιείται πιο έντονα από το νωτιαίο άκρο, σε κυτταρικές ομάδες που σχηματίζουν τον πρόσθιο εγκέφαλο (τελεγκέφαλο και διεγκέφαλο), τον μέσο (μεσεγκέφαλο) και τον οπίσθιο εγκέφαλο(μετεγκέφαλο και μυελεγκέφαλο). Επίσης, και τα μεγαλύτερα νευρωνικά κυκλώματα και δίκτυα είναι παρόμοια και παρέχουν στους χοίρους πολυάριθμες λειτουργικές ιδιότητες. (Swindle 1988, 2002)

8. Σκοπός

Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση (ΥΟΚΠ) αποτελεί μέθοδο στη χειρουργική προσπέλαση ποικίλων πολύπλοκων καρδιαγγειακών ανωμαλιών, συγγενών και επίκτητων, και ιδίως στην επιδιόρθωση του αορτικού τόξου. Είναι απαραίτητη η διακοπή της εγκεφαλικής αιματικής ροής, οπότε είναι αναγκαία η προστασία του εγκεφάλου κατά την διάρκεια αυτής της ευαίσθητης περιόδου. Η υποθερμία, με την πληρέστερη καταστολή του μεταβολισμού και της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας του εγκεφάλου, έχει βρεθεί ότι προστατεύει τον εγκέφαλο από την ισχαιμία. Παρ'όλα αυτά, οι κυριότερες επιπλοκές μετά από υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση παραμένουν οι νευρολογικές, λόγω της ισχαιμίας του εγκεφάλου κατά το διάστημα της παύσης. Η ΥΟΚΠ αποτελεί την απαρχή μιας σειράς γεγονότων, που μέσω του μηχανισμού της ισχαιμίας-υποξίας, τελικά οδηγούν εκλεκτικά ευπαθείς περιοχές του εγκεφάλου σε



νευρωνικό κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση και η νέκρωση αποτελούν δύο διακριτούς τρόπους κυτταρικού θανάτου, που μπορεί όμως να συνυπάρχουν στην εξέλιξη της νευρολογικής βλάβης. Κλινικά, έχει βρεθεί ότι η YOKΠ στους 18 °C για πάνω από 30 με 45 λεπτά σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικής βλάβης, που στους ενήλικες εκδηλώνεται ως ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο λόγω εμβολικών φαινομένων ή προσωρινή νευρολογική δυσλειτουργία (διαταραχές κινητικές, γνωσιακές, μαθησιακές, παραλήρημα κτλ) ενώ στα νεογνά και στα βρέφη ως επιληπτικές κρίσεις, χοραιοαθετωσικές κινήσεις και διαταραχές διανοητικής ανάπτυξης.

Οι ιδανικές συνθήκες για την μεγιστοποίηση της εγκεφαλικής προστασίας κατά την διάρκεια της YOKΠ δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως. Υπάρχει αντιπαράθεση απόψεων πάνω σε βασικά θέματα που αφορούν την YOKΠ, όπως στην καλύτερη θερμοκρασία κατά την οποία γίνεται η παύση της κυκλοφορίας. Στην ερευνητική μας μελέτη χρησιμοποιούμε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο παρατεταμένης YOKΠ σε χοίρους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 18 °C και 10 °C. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι πρώτιστα να αναδείξει την ενεργοποίηση του αποπτωτικού νευρωνικού κυτταρικού θανάτου άμεσα μεταϊσχαιμικά, με την χρήση της ευαίσθητης μεθόδου TUNEL, για τον βιοχημικό προσδιορισμό της απόπτωσης. Κατά δεύτερο λόγο, σκοπεύουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα, όσο αφορά την νευρωνική βλάβη, που προκύπτουν από την εισαγωγή της ολικής κυκλοφορικής παύσης στην βαθιά και πολύ βαθιά υποθερμία. Συγκεκριμένα, θα διερευνηθεί αν η χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών θα μπορούσε να επωφελείται μειωμένης απόπτωσης και/ή νέκρωσης στον εγκέφαλο μετά από YOKΠ. Τα αποτελέσματα αυτής της εκτίμησης θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της εγκεφαλικής βλάβης μετά από YOKΠ και πιθανά να επηρεάσουν τα πρωτόκολλα που αφορούν τη δυνατότητα νευροπροστατευτικών παρεμβάσεων στο μέλλον. (Είναι η θερμοκρασία των 10 °C καλύτερη από τη θερμοκρασία των 20 °C, από την άποψη του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου;) Επίσης, αντικείμενο της μελέτης μας είναι η διερεύνηση αν η υποθερμία στους 10 °C παρέχει ισοδύναμη προστασία σε όλους τους νευρωνικούς κυτταρικούς πληθυσμούς.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

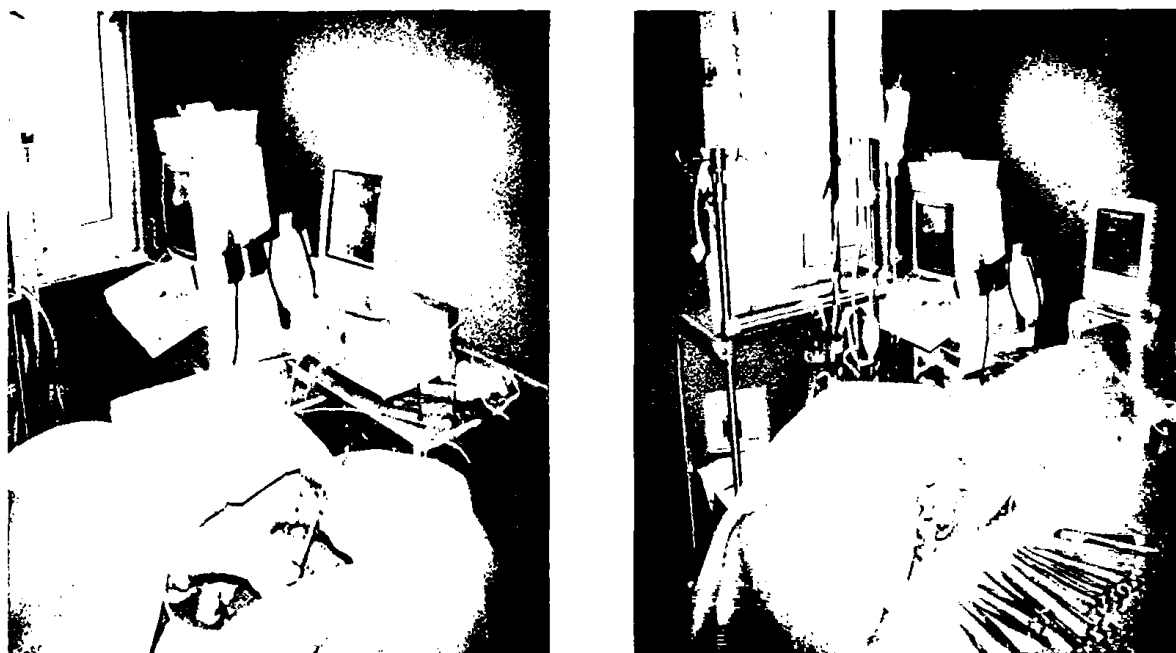
Το παρακάτω ερευνητικό πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε χοίρους στο Πειραματικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η αντιμετώπιση των πειραματοζώων τόσο κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού τους όσο και κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων αλλά και η διαδικασία θανάτωσής τους ήταν σύμφωνη με τις διεθνείς αρχές χρήσης ζώων για την πραγματοποίηση ιατρικών ερευνών όπως αυτές αποτυπώνονται στο 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' που εκδόθηκε από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας στις ΗΠΑ (National Institute of Health, publication 85-23, revised 1985).

1. Προεγχειρητική Προετοιμασία και Αναισθησιολογικό Πρωτόκολλο

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 16 άρρενες χοίροι βάρους 25-35 κιλών και ηλικίας 2-3 μηνών. Στα πειραματόζωα εφαρμόστηκε προαναισθητική στέρηση τροφής για 12 ώρες και νερού για 2 ώρες. Πριν την εισαγωγή στην αναισθησία, ως προνάρκωση χορηγήθηκαν 10 ml azaperone (Suicalm) ενδομυϊκά και τα πειραματόζωα αφέθηκαν ανενόχλητα για 10 λεπτά ώστε να αποφευχθεί πιθανή διέγερσή τους. Τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν στην αίθουσα χειρουργείου, τοποθετήθηκαν στην ύπτια θέση και εξασφαλίστηκαν δύο φλεβικές γραμμές διαδερμικά σε δύο φλέβες των πτερυγίων των ώτων με φλεβοκαθετήρες 16G για την χορήγηση παρεντερικών διαλυμάτων και γενικής αναισθησίας. Η εισαγωγή στην αναισθησία έγινε με την χορήγηση κεταμίνης, ατροπίνης και dormicum. Μετά από την ενδοτραχειακή διασωλήνωση με τραχειοσωλήνα Νο 5.5, οι χοίροι αερίζονταν μηχανικά με 100% οξυγόνο. Η αναισθησία διατηρήθηκε με φεντανύλη, dormicum και 1-2% ισοφλουράνιο και η παράλυση διατηρήθηκε με rocuronium. Ο ρυθμός στον αναπνευστήρα και ο αναπνευστικός όγκος προσαρμόστηκαν ώστε να διατηρήσουν την μερική τάση του CO₂ σε 40 mm Hg. Η ανάλυση αερίων έγινε με την χρήση της μεθόδου a-stat, όπου το pH κατά την ψύξη διατηρείται στο 7.4 και η μερική τάση του CO₂ σε 35-45 mm Hg αδιόρθωτο για την θερμοκρασία ενώ η μερική τάση του O₂ διατηρείται σε 100mmHg. Ο αιματοκρίτης κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας ήταν 15-23%. Τοποθετήθηκαν ηλεκτρόδια για την συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ και ειδικά θερμόμετρα στο ορθό και στην τυμπανική μεμβράνη για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Επίσης τοποθετήθηκε χειρουργικά αρτηριακή γραμμή στην αριστερή μηριαία αρτηρία για το

monitoring και την λήψη δειγμάτων αίματος. (Ananiadou et al 2005, Swindle 1998) (Εικόνα 4)

Εικόνα 4. Διασωλήνωση και προεγχειρητική προετοιμασία

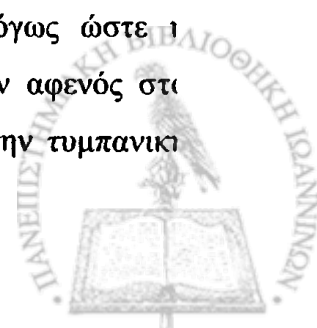


Στις φωτογραφίες από το πειραματικό χειρουργείο φαίνεται αριστερά μεν, ο διασωληνωμένος χοίρος, η φλεβική γραμμή στο αριστερό αυτί του και πιο πίσω το monitor παρακολούθησης ενώ στην δεξιά, το χειρουργικό πεδίο, τα εργαλεία και η τοποθετημένη αρτηριακή γραμμή στην αριστερή μηριαία αρτηρία.

2. Διαχωρισμός των Ομάδων και Εφαρμογή Χειρουργικού Πρωτόκολλου στις Ομάδες Α και Β

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην ομάδα Α ($n=6$) έγινε υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση (ΥΟΚΠ) στους 18°C για 75 λεπτά, στην ομάδα Β ($n=6$) έγινε ΥΟΚΠ στους 10°C για 75 λεπτά, ενώ η ομάδα Γ ($n=4$) αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου με τα φυσιολογικά ζώα χωρίς καμία χειρουργική παρέμβαση.

Ο θώρακας διανοίχτηκε με δεξιά θωρακοτομή στο τέταρτο μεσοπλεύριο διάστημα. Μετά από τον ηπαρινισμό, καννυλαρίστηκε η ανιούσα αορτή με αρτηριακή κάννουλα 16F και ο δεξιός κόλπος με φλεβική κάννουλα 26F. Ξεκίνησε η εξωσωματική κυκλοφορία με μι σφυγμική ροή και ρυθμό ροής 100ml/kg/min και προσαρμόστηκε αναλόγως ώστε η αρτηριακή πίεση να διατηρείται σε 50 mm Hg . Η θερμοκρασία μετριώταν αφενός στο φλεβικό αίμα αφετέρου με το θερμοηλεκτρικό ηλεκτρόδιο στο ορθό και στην τυμπανική



μεμβράνη του ζώου. Στο κύκλωμα της εξωσωματικής κυκλοφορίας εγχύθηκαν 1lt pH διάλυμα Ringers Lactate, 50 ml μαννιτόλη και 5000 IU ηπαρίνη και επίσης διττανθρακικά όσο χρειάστηκε για να διατηρηθεί το pH σε 7.4. Επίσης υπήρχε αναρρόφηση της εξωσωματικής μηχανής για την συλλογή του ηπαρινισμένου αίματος που τυχόν συγκεντρώνεται στον περικαρδιακό χώρο. (Εικόνα 5)

Εικόνα 5. Δεξιά θωρακοτομή και καννουλάρισμα αορτής και δεξιού κόλπου



Στην αριστερή φωτογραφία από το πειραματικό χειρουργεί, φαίνεται η δεξιά θωρακοτομή και η αποκάλυψη της καρδιάς μετά την διάνοιξη και την στήριξη του περικαρδίου. Στην δεξιά φωτογραφία διακρίνονται μετά το καννουλάρισμα της ανιούσας αορτής και του δεξιού κόλπου, οι δύο γραμμές, η αρτηριακή προς τα αριστερά και η φλεβική γραμμή προς τα δεξιά.

Μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας πέρασαν περίπου 90 λεπτά ώπου να φτάσει η θερμοκρασία του εγκεφάλου στους 18 ή 10°C αργά και σταθερά, ώστε να αποφευχθεί άνοδος της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της ολικής κυκλοφορικής παύσης (ΟΚΠ). Επίσης στην διατήρηση της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της ΟΚΠ συνέβαλλε και η τοποθέτηση παγοσακκούλων επιφανειακά γύρω από το κεφάλι κατά την διάρκειά της ενώ για την προστασία του μυοκαρδίου εγχύθηκε εξωτερικά παγωμένος φυσιολογικός ορός στο μυοκάρδιο. Μόλις η θερμοκρασία έφτασε τους 18 ή 10°C αντίστοιχα, η εξωσωματική κυκλοφορία έπαυσε και εισήχθη η ΟΚΠ για 75 λεπτά. Μετά το πέρας της ΟΚΠ, η εξωσωματική κυκλοφορία ξεκίνησε και πάλι με σταδιακή επαναθέρμανση έως τους 35-36°C θερμοκρασία οισοφάγου και συνεχίστηκε περίπου 30 λεπτά επαναιμάτωση. Κατά την διάρκεια της επαναιμάτωσης χρειάστηκαν συνήθως μικρές δόσεις ινотρόπων φαρμάκων και

έγχυση κρυσταλλοειδών διαλυμάτων ώστε να διατηρηθεί η συστηματική πίεση σε 60 mm Hg. Μετρήσεις των αιμοδυναμικών παραγόντων όπως καρδιακός ρυθμός, μέση αρτηριακή πίεση (ΜΑΠ), αερίων αίματος, αιματοκρίτη και γαλακτικού οξέος (ABL Medical Radiometer A/S DK-2700, Copenhagen, Denmark) καταγράφηκαν σε πέντε χρονικά σημεία κατά την διάρκεια του πειράματος. (Ananiadou et al 2007)

1. Πριν την εξωσωματική κυκλοφορία, στους 37°C
2. Κατά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας
3. Πριν την ΟΚΠ, στους 18 ή 10°C
4. Κατά την επαναθέρμανση, στους 30°C
5. Στο τέλος της εξωσωματικής κυκλοφορίας.

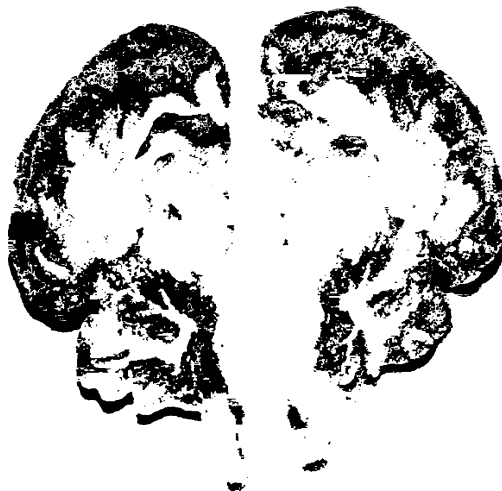
Εγκεφαλική Διήθηση και Μονιμοποίηση

Το κάθε πειραματόζωο της ομάδας Α και Β θανατώθηκε μετά την έξοδο από την εξωσωματική κυκλοφορία. Ένα λίτρο παγωμένος φυσιολογικός ορός 0,9% NaCl και στη συνέχεια 1 λίτρο διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% σε διάλυμα PBS (phosphate buffered solution- pH 7.4) εγχύθηκαν στην αορτική ρίζα μετά από αποκλεισμό της κατιούσης αορτής, ώστε να μονιμοποιηθεί ο εγκέφαλος *in situ*. Στην συνέχεια ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε *en bloc* από το κρανίο και τοποθετήθηκε σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% με PBS (pH 7.4) όπου φυλάχτηκε στους 4°C. Στην περίπτωση των πειραματόζωων της ομάδας Γ τα ζώα θανατώθηκαν, αφαιρέθηκαν οι εγκέφαλοι *en bloc* και τοποθετήθηκαν επίσης σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% με PBS και φυλάχτηκαν στους 4 °C.

3. Ιστοπαθολογική Προετοιμασία

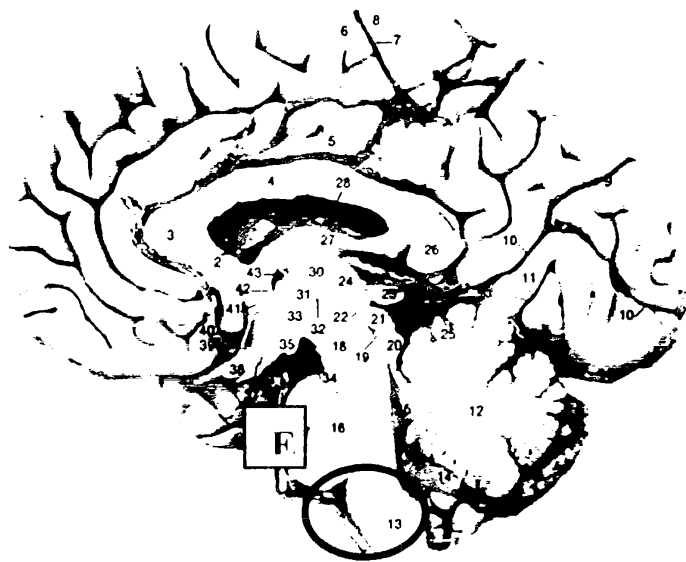
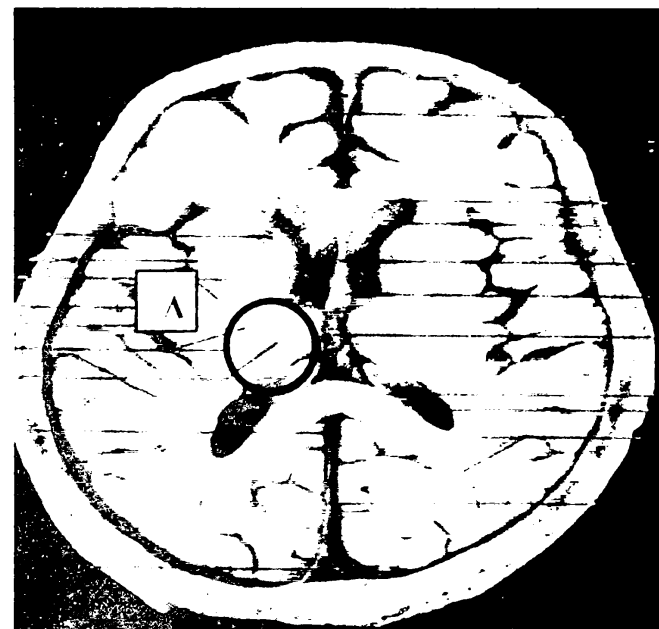
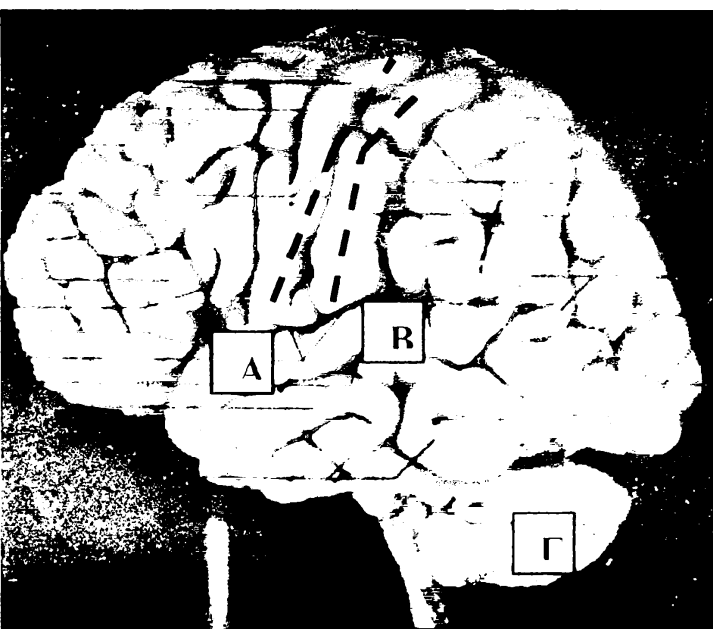
Ο εγκέφαλος κόπηκε στα δύο ημισφαίρια. (Εικόνα 6) Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε μόνο το αριστερό ημισφαίριο από το οποίο κόπηκαν 6 τεμάχια που περιελάμβαναν αντίστοιχα τις υπό μελέτη περιοχές: 1. ιππόκαμπος, 2. κινητικός φλοιός, 3. αισθητικός φλοιός, 4. θάλαμος, 5. παρεγκεφαλίδα, 6. πρόσθια κοιλιακή μοίρα του προμήκη. (Εικόνα 7) Τα ιστικά τεμάχια υπέστησαν ειδική διαδικασία μονιμοποίησης με διαδοχική αφυδάτωση σε αιθανόλες και ξυλόλες και βυθίστηκαν στην παραφίνη. Αργότερα ελήφθησαν 4 τομές των 8μm ανά ιστικό τεμάχιο. Η πρώτη και τρίτη τομή χρησιμοποιήθηκαν στην χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης για την εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου, και η δεύτερη και τέταρτη στην χρώση terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated biotin-dUTP nick end-labeling (TUNEL) για την εκτίμηση της απόπτωσης.





Η έσω επιφάνεια του χοίρειου εγκεφάλου μετά την εξαγωγή του από το κρανίο και την διατομή αυτού στην μεσολόβιο σχισμή.

Εικόνα 7. Υπό μελέτη ανατομικές περιοχές



Στην πάνω αριστερά εικόνα φαίνεται η έξω επιφάνεια του ημισφαιρίου. Η γραμμή δείχνει την κεντρική αύλακα που χωρίζει προς τα εμπρός (Α) τον κινητικό φλοιό (πρόσθια κεντρική έλικα) και προς τα πίσω (Β) τον αισθητικό φλοιό (οπίσθια κεντρική έλικα). Η παρεγκεφαλίδα (Γ) βρίσκεται πίσω από το εγκεφαλικό στέλεχος. Στην πάνω δεξιά εικόνα διακρίνεται ο θάλαμος (Δ) που βρίσκεται προς τα έξω της τρίτης κοιλίας. Κάτω αριστερά, η πρόσθια κοιλιακή μοίρα του προμήκη (Ε) και κάτω δεξιά, το πρόσθιο άκρο του ιππόκαμπου (ΣΤ) που βρίσκεται στο κροταφικό κέρασ της πλάγιας κοιλίας.

4. Ιστολογική Εκτίμηση- Σύστημα Ταξινόμησης

Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Οι τομές παρέμειναν σε ξηρό κλίβανο (57°C) για μία τουλάχιστον ώρα, έτσι ώστε να απομακρυνθεί μία ποσότητα παραφίνης. Στη συνέχεια ακολούθησε η εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη για αποπαραφίνωση και διαδοχικά σε αλκοόλες διαφόρων βαθμών, για 10 λεπτά σε 100, 96, 80 και 70 βαθμών αλκοόλη, ώστε να απομακρυνθεί η ξυλόλη και να ενυδατωθούν οι ιστοί. Ακολούθως εμβαπτίζονται σε νερό βρύσης για 3 λεπτά και γίνεται η χρώση με αιματοξυλίνη για 5 λεπτά, ξέπλυμα με χλιαρό νερό βρύσης και οξυνισμένο οινόπνευμα, εμβάπτιση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 5 λεπτά και μετά χρώση με ηωσίνη για 4 λεπτά.

Οι τομές εξετάστηκαν από έμπειρο νευροανατόμο που δεν γνώριζε την ομάδα στην οποία ανήκαν τα προς εξέταση δείγματα. Κατά την μικροσκόπηση τα νεκρωτικά κύτταρα αναγνωρίζονται από την ύπαρξη του πυκνωτικού πυρήνα ή την απουσία πυρήνα (νευρώνες φαντάσματα) μαζί με εξοιδημένο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα. Επίσης αξιολογείται και η ύπαρξη αιμορραγίας, φλεγμονής και εμβράκτων.

Η βλάβη βαθμονομήθηκε με ένα σύστημα από 0 έως 5, ανάλογα με τον αριθμό των κατεστραμμένων νευρώνων στο οπτικό πεδίο της τομής. (Ye et al 1996)

Βαθμός 0: καθόλου κατεστραμμένα κύτταρα

Βαθμός 1: λιγότερο από 10% κατεστραμμένα κύτταρα

Βαθμός 2: 10 έως 25% κατεστραμμένα κύτταρα

Βαθμός 3: 25 έως 50% κατεστραμμένα κύτταρα

Βαθμός 4: 50 έως 75% κατεστραμμένα κύτταρα

Βαθμός 5: πάνω από 75% κατεστραμμένα κύτταρα.



Ο ολικός βαθμός βλάβης σε κάθε εγκεφαλική περιοχή προέκυψε από τον μέσο όρο των επιμέρους βαθμών ανά τομή (δύο με τρεις τομές ανά περιοχή).

Μέθοδος TUNEL

Για τον προσδιορισμό της απόπτωσης με τη μέθοδο *in situ* σήμανσης TUNEL χρησιμοποιήθηκε το Apop Tag Plus *in situ* Apoptosis Detection Kit-Peroxidase (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), το οποίο είναι ελεγμένο. Η μέθοδος *in situ* σήμανσης TUNEL περιγράφεται ως εξής: Πρόκειται για ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξιγενίνη (Dig-dUTP) στο 3'-OH άκρο φραγμάτων DNA με την δράση του ενζύμου TdT. Μετά από αποπαραφίνωση και ενυδάτωση, οι τομές ξεπλένονται με διάλυμα phosphate buffered solution (PBS). Ακολουθεί πέψη του ιστού με επώαση με πρωτεϊνάση K (20μg/ml, Oncor) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την μερική πέψη των πρωτεϊνών του ιστού ώστε τα θραύσματα του DNA του πυρήνα να καταστούν προσιτά στο ένζυμο TdT και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό. Η αναστολή της ενεργότητας της υπεροξειδάσης γίνεται με επώαση των τομών σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε PBS για 5 λεπτά, ενώ μετά την εφαρμογή ενός διαλύματος εξισορρόπησης, οι τομές επωάζονται με διάλυμα working strength TdT που περιέχει το ένζυμο TdT και dUTP-διγοξιγενίνη, για 1 ώρα στους 37°C. Η αντίδραση τερματίζεται με προθερμασμένο στους 37°C ρυθμιστικό διάλυμα (working strength stop/wash buffer) και οι τομές ξεπλένονται σε PBS. Για τον εντοπισμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων προστίθεται αντίσωμα έναντι της διγοξιγενίνης, το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση. Σαν χρωμογόνο χρησιμοποιείται η 3,3'-τετραυδροχλωρική-διαμινοβενζιδίνη και ακολουθεί επίχρωση με αιματοξυλίνη (Harris' hematoxylin).

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές στις οποίες έχει παραληφθεί το στάδιο της TdT αντίδρασης (Bai et al 2001)

Τα κύτταρα που ορίζονται TUNEL(+) αναγνωρίζονται από τον καφεκόκκινο βαμμένο, συμπυκνωμένο πυρήνα μαζί με ίδιου χρώματος μικρά στρογγυλά αποπτωτικά σωματίδια και ελαττωμένο ή εξαφανισμένο κυτταρόπλασμα. Τα αποπτωτικά κύτταρα είναι τα κύτταρα που είναι όχι μόνο TUNEL(+) αλλά διακρίνονται και από την παρουσία ρικνού πυρήνα, πυκνής χρωματίνης, πύκνωση κυτταροπλάσματος και κυτταρική μεμβράνη χωρίς απώλεια συνέχειας. (Tseng et al 1997)

Η βλάβη βαθμονομήθηκε με ένα σύστημα από 0 έως 4, ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης TUNEL(+) κυττάρων στο οπτικό πεδίο της τομής. (Kurth et al 1999) Οι αντίστοιχοι βαθμοί για τις τομές με την χρώση TUNEL ήταν:



Βαθμός 0: καθόλου TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 1: σπάνια TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 2: αραιά TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 3: αρκετά TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 4: διάχυτα κατανεμημένα TUNEL(+) κύτταρα

Ο ολικός βαθμός βλάβης σε κάθε εγκεφαλική περιοχή προέκυψε από τον μέσο όρο των επιμέρους βαθμών ανά τομή (δύο με τρεις τομές ανά περιοχή).

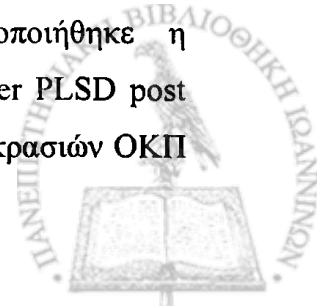
5. Στατιστική Επεξεργασία

Ο αριθμός των πειραματοζώων ανά ερευνητική ομάδα υπολογίστηκε με βάση στοιχεία προηγούμενων εργασιών νευρολογικής βλάβης σε χρόνια πειραματικά μοντέλα υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης.

Τα αποτελέσματα για τις μεταβλητές και τα σκορ στην μέθοδο TUNEL αναφέρονται ως μέση τιμή συν ή πλην την τυπική απόκλιση ή το σφάλμα (SD standard deviation ή SE standard error).

Για τις έξι φυσιολογικές μεταβλητές (μέση αρτηριακή πίεση, PH, PO₂, PCO₂, αιματοκρίτης και γαλακτικό οξύ) στις ομάδες Α και Β υπήρχαν δύο ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα ήταν να μετρηθεί η μεταβολή κάθε μετρούμενης μεταβλητής στις πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές σε κάθε ερευνητική ομάδα. Το δεύτερο ερώτημα ήταν η μελέτη της διαφοράς κάθε μεταβλητής μεταξύ της ομάδας Α και Β. Για κάθε μεταβλητή χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία ανάλυσης μεταβλητότητας (ANOVA, analysis of variance, with repeated measures) και εν συνεχεία η ανάλυση Fischer protected least significance Difference (PLSD) post hoc analysis, ώστε να αναλυθούν οι συνέπειες των δύο διαφορετικών θερμοκρασιών ΟΚΠ (18 και 10°C) και των διαφορετικών χρονικών στιγμών (πριν την Ε/Κ, στους 37°C, κατά την Ε/Κ, πριν την ΟΚΠ, κατά την επαναθέρμανση, στους 30°C και στο τέλος της Ε/Κ) στην μελετώμενη μεταβλητή.

Για τα σκορ TUNEL στις έξι διαφορετικές περιοχές στις ομάδες Α, Β και Γ υπήρχαν δύο ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα ήταν να μετρηθεί η μεταβολή του σκορ ανάμεσα στις έξι περιοχές σε κάθε ερευνητική ομάδα. Το δεύτερο ερώτημα ήταν η μελέτη της διαφοράς του σκορ ανά περιοχή ανάμεσα στις ομάδες Α και Β και Γ. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία ANOVA analysis of variance και εν συνεχεία η Fischer PLSD post hoc analysis, ώστε να αναλυθούν οι επιδράσεις των δύο διαφορετικών θερμοκρασιών ΟΚΠ



(18 και 10°C) και των διαφορετικών εγκεφαλικών περιοχών (ιππόκαμπος, κινητικός φλοιός, αισθητικός φλοιός, θάλαμος, παρεγκεφαλίδα και πρόσθια κοιλιακή μοίρα του προμήκη) στα σκορ TUNEL .

Για την σύγκριση τιμών μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία unpaired 2-tailed *t* test.

Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε στο επίπεδο του $p < 0.05$. Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS software (SPSS Inc, Chicago, IL).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Φυσιολογικές και Μεταβολικές Παράμετροι

Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν του χειρουργικού πρωτοκόλλου και της κυκλοφορικής παύσης και θανατώθηκαν μετά το στάδιο της επαναθέρμανσης και της αποσύνδεσης από την εξωσωματική κυκλοφορία, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Οι μέσες τιμές του προεγχειρητικού βάρους για τις ομάδες A (YOKΠ στους 18 °C) και B (YOKΠ στους 10 °C) ήταν 30.7 ± 3.7 και 34.2 ± 3.1 Kg, ενώ αντίστοιχα για την ομάδα ελέγχου ήταν 31.3 ± 3 kg. Οι αντίστοιχες μέσες τιμές ηλικίας των ζώων ανά ομάδα A, B και ελέγχου ήταν 70.5 ± 7.7 , 86.2 ± 5.6 και 74.8 ± 3.8 ημερών. (Πίνακας 2)

Πίνακας 2. Μέσες τιμές βάρους και ηλικίας των πειραματόζωων ανά ομάδα

	Ομάδα A (n=6)	Ομάδα B (n=6)	Ομάδα ελέγχου (n=4)
Βάρος (Kg)	30.7 ± 3.7	34.2 ± 3.1	31.3 ± 3
Ηλικία (ημέρες)	70.5 ± 7.7	86.2 ± 5.6	74.8 ± 3.8

Οι μέσες τιμές διάρκειας της ψύξης υπό E/K μέχρι την επιθυμητή θερμοκρασία των 18 °C για την ομάδα A ήταν 57.50 ± 17.25 λεπτά και μέχρι την επιθυμητή θερμοκρασία των 10 °C για την ομάδα B ήταν 105.8 ± 21.8 λεπτά (t-test; $p \leq 0.002$). Μετά την YOKΠ η διάρκεια επαναθέρμανσης ήταν 82.5 ± 10.4 λεπτά για την ομάδα A και 104.2 ± 19.8 λεπτά για την ομάδα B (t-test; $p \leq 0.05$). Οι τιμές των μετρηθέντων φυσιολογικών παραμέτρων στις ομάδες A και B στις πέντε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές, αναφέρονται παρακάτω στον πίνακα 3.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου (δειγματοληψία σε πέντε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές) και του βάθους της υποθερμίας (YOKΠ στους 18 °C και στους 10 °C) στις μετρούμενες φυσιολογικές παραμέτρους. Παρά το γεγονός ότι υπήρχαν κάποιες μικρές μεταβολές στις τιμές ορισμένων παραμέτρων, δεν βρέθηκε καμία κλινική συσχέτιση αυτών των διαφορών. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα YOKΠ στους 10 °C κατά την επαναθέρμανση, σε σύγκριση με την ομάδα της YOKΠ στους 18 °C. Επίσης, κατά την ψύξη στους 10 °C ήταν σημαντικά υψηλότερα τα επίπεδα PO_2 σε σχέση με τους 18 °C



($p \leq 0.05$ μεταξύ των ομάδων ΥΟΚΠ στους 18°C και 10°C unpaired, 2-tailed, t-test). Όσο αφορά τον αιματοκρίτη, βρέθηκε ότι υπήρχε διαφορά ανάμεσα στην αρχική τιμή και τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές και στις δύο πειραματικές ομάδες. Για την διακύμανση της τιμής του κατά την διάρκεια των πειραμάτων, βρέθηκε ότι μειώθηκε στον ίδιο βαθμό και στις δύο πειραματικές ομάδες ($p \leq 0.05$ μεταξύ της αρχικής τιμής και των τιμών σε όλες τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές ANOVA και Fisher PLSD).

Πίνακας 3. Φυσιολογικές Παράμετροι

Παράμετρος	Αρχική τιμή	Πριν Ε/Κ	Ψύξη	Επαναθ/ση	Μετά Ε/Κ
<u>Εγκεφαλική Θερμοκρασία ($^\circ\text{C}$)</u>					
18°C	36.5 ± 0.4	34.1 ± 1.8	18.0 ± 0.0	25.8 ± 3.2	36.5 ± 0.8
10°C	36.5 ± 0.4	33.2 ± 1.6	10.0 ± 0.0	28.2 ± 3.1	36.9 ± 0.2
<u>ΜΑΠ (mmHg)</u>					
18°C	114.0 ± 14.9	57.2 ± 16.3	55.2 ± 8.1	67.8 ± 15.7	68.3 ± 25.7
10°C	118.7 ± 13.0	59.7 ± 10.1	54.0 ± 3.4	69.4 ± 16.5	85.0 ± 8.9
<u>Αρτηριακό pH</u>					
18°C	7.40 ± 0.12	7.26 ± 0.19	7.26 ± 0.12	7.20 ± 0.07	7.35 ± 0.14
10°C	7.34 ± 0.13	7.32 ± 0.11	7.28 ± 0.11	7.32 ± 0.08	7.38 ± 0.13
<u>pO₂ (mmHg)</u>					
18°C	409.9 ± 67.8	751.4 ± 202.8	$787.1 \pm 319.1^*$	429.0 ± 126.9	424.6 ± 112.1
10°C	378.4 ± 118.3	689.5 ± 45.5	1066.0 ± 122.8	562.8 ± 123.4	459.4 ± 45.4
<u>pCO₂ (mmHg)</u>					
18°C	51.32 ± 19.0	73.7 ± 37.8	67.2 ± 31.3	69.3 ± 14.4	38.7 ± 18.7
10°C	58.1 ± 23.3	60.0 ± 17.7	58.2 ± 12.4	44.0 ± 12.9	31.7 ± 9.0
<u>Αιματοκρίτης (%)</u>					
18°C	$26.4 \pm 3.8^{**}$	16.4 ± 3.4	15.51 ± 3.3	16.6 ± 3.9	15.5 ± 3.1
10°C	$26.0 \pm 3.8^{**}$	18.5 ± 3.0	18.6 ± 3.7	19.2 ± 3.5	19.2 ± 3.0
<u>Γαλακτικό οξύ (mmol/L)</u>					
18°C	2.7 ± 1.8	4.5 ± 2.1	5.6 ± 2.5	$6.3 \pm 1.7^*$	11.0 ± 4.3
10°C	3.1 ± 1.03	4.4 ± 1.6	8.3 ± 3.0	11.6 ± 2.8	11.9 ± 3.5

Όλες οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή $\pm$ τοπική απόκλιση.



* $p \leq 0.05$ μεταξύ των ομάδων YOKΠ στους 18°C και 10°C (unpaired, 2-tailed, t-test).

** $p \leq 0.05$ μεταξύ της αρχικής τιμής και των τιμών σε όλες τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (ANOVA και Fisher PLSD).

2. Ιστολογική Εκτίμηση με την Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Σε καμία από τις πειραματικές ομάδες YOKΠ και στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρωνικής βλάβης με την χρήση της χρώσης Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης, σε αυτό το οξύ πειραματικό μοντέλο.

3. Μέθοδος TUNEL για την Κατάτμηση του DNA

YOKΠ στους 18°C

Σε αντίθεση με την χρώση Αιματοξυλίνης Ηωσίνης, όλοι οι εγκεφαλικοί ιστοί με την επεξεργασία με την μέθοδο TUNEL για τον έλεγχο της κατάτμησης του DNA, παρουσίασαν TUNEL (+) σκορ σε διαφορετικό βαθμό, όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Στην περίπτωση της ομάδας ελέγχου τα σκορ ήταν πολύ χαμηλά.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στην ομάδα YOKΠ στους 18°C και στην ομάδα ελέγχου

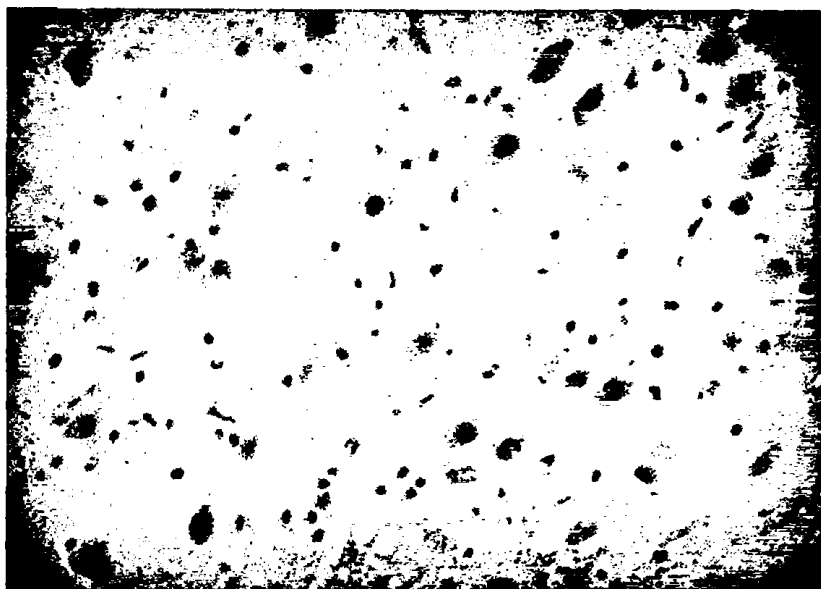
Εγκεφ. Περιοχή	18°C	Ομάδα Ελέγχου
Κινητ. φλοιός	$3.28 \pm 0.32^*$	0.50 ± 0.22
Αισθητ. φλοιός	$3.88 \pm 0.13^*$	0.14 ± 0.14
Ιππόκαμπος	$2.67 \pm 0.36^*$	0.17 ± 0.17
Παρεγκεφαλίδα	$2.13 \pm 0.48^{**}$	0.71 ± 0.18
Προμήκης	$2.00 \pm 0.41^{**}$	0.57 ± 0.20
Θάλαμος	$2.33 \pm 0.67^{**}$	0.00 ± 0.00

Όλες οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p \leq 0.001$ και ** $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (ANOVA και Fisher PLSD)



Η ΥΟΚΠ στους 18° C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένα TUNEL (+) σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές, όπως φαίνεται στην εικόνα 8.

Εικόνα 8. Φωτομικρογραφία TUNEL στην περιοχή του προμήκη

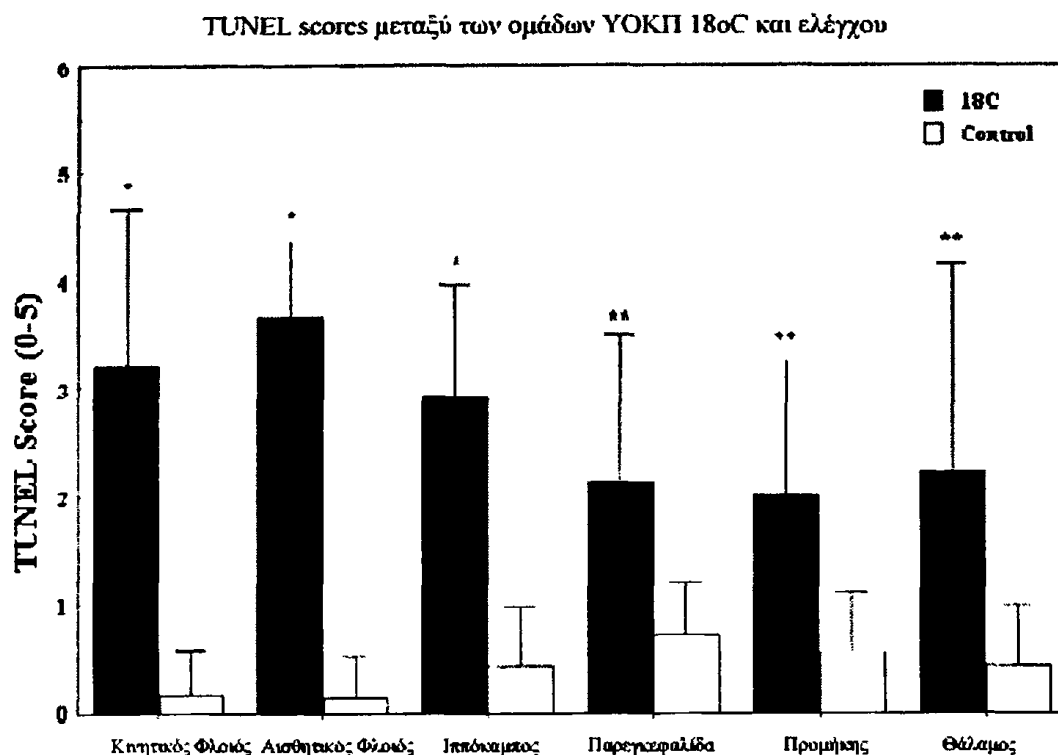


Φωτομικρογραφία που δείχνει την εγκεφαλική απόπτωση μετά από ΥΟΚΠ στην περιοχή της πρόσθιας κοιλιακής μοίρας του προμήκη. TUNEL (+) νευρώνες (με βαμμένους καφεκόκκινους πυρήνες) είναι διασκορπισμένοι ανάμεσα σε φυσιολογικούς (μεγέθυνση $\times 400$).

Ιδιαίτερα αυξημένα ήταν τα επίπεδα στον νεοφλοιό και στον ιππόκαμπο ($p \leq 0.001$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στην περίπτωση του κινητικού και αισθητικού νεοφλοιού (από την πρόσθια και οπίσθια κεντρική έλικα αντίστοιχα) τα TUNEL (+) κύτταρα εντοπίζονταν ως επί το πλείστον στις επιφανειακές στιβάδες της φαιάς ουσίας, ενώ στον ιππόκαμπο στις περιοχές CA1-3, CA4 και στην οδοντωτή έλικα. Στην παρεγκεφαλίδα τα TUNEL (+) κύτταρα εντοπίζονταν κυρίως στην εν τω βάθει κοκκιώδη στιβάδα της παρεγκεφαλιδικής φαιάς ουσίας. Στην περίπτωση του προμήκου, της παρεγκεφαλίδας και του θαλάμου υπήρχε επίσης σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου αλλά σε μικρότερο βαθμό ($p \leq 0.05$). Αυτό φαίνεται καλύτερα στο διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 18° C και ελέγχου



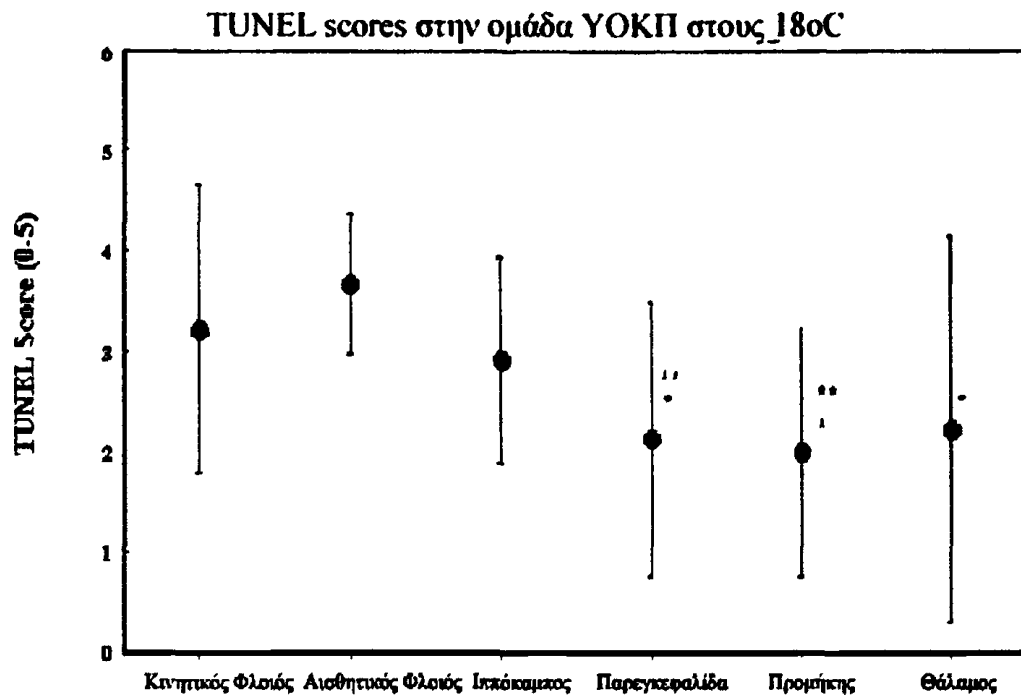
Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 18oC και ελέγχου στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές. Οι στήλες μαύρου χρώματος απεικονίζουν την μέση τιμή TUNEL score της ομάδας YOKΠ στους 18°C ενώ οι λευκές στήλες την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου. Η κάθετη γραμμή πάνω από την κάθε στήλη αναπαριστά την τυπική απόκλιση.

* $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (ANOVA και Fisher PLSD)

Οι διάφορες εγκεφαλικές περιοχές που μελετήθηκαν, ανέδειξαν και διαφορετική ευαισθησία όσο αφορά την επίδραση της ισχαιμίας (διάγραμμα 2). Στην ομάδα YOKΠ στους 18° C παρατηρήθηκε ότι συνολικά αυξημένη TUNEL (+) αντίδραση υπήρχε στον νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο σε σύγκριση με τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα και τον θάλαμο ($p \leq 0.05$). Το υψηλότερο TUNEL (+) σκορ παρατηρήθηκε στον αισθητικό φλοιό χωρίς αυτό να αγγίζει την στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με τον κινητικό νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο παρά μόνο με τον προμήκη και την παρεγκεφαλίδα ($p \leq 0.001$).



Διάγραμμα 2. Περιοχική κατανομή του νευρωνικού θανάτου στην ομάδα YOKΠ στους 18°C



Αποτελέσματα TUNEL και κατανομή ανά περιοχή μετά από YOKΠ στους 18°C. Η κάθε μαύρη κηλίδα αναπαριστά την μέση τιμή του TUNEL score ανά εγκεφαλική περιοχή ενώ η κάθετη γραμμή αναπαριστά την τυπική απόκλιση.

* $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με κινητικό και αισθητικό φλοιό και ιππόκαμπο; ** $p \leq 0.001$ σε σύγκριση με αισθητικό φλοιό (ANOVA και Fisher PLSD)

YOKΠ στους 10° C

Ομοίως, όπως φαίνεται στον πίνακα 5, η YOKΠ στους 10° C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένα TUNEL (+) σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές. Ιδιαίτερα αυξημένα ήταν στον κινητικό και αισθητικό νεοφλοιό και εντοπίζονταν και εδώ στις επιφανειακές στιβάδες της φαιάς ουσίας. Στον ιππόκαμπο παρατηρήθηκαν υψηλά TUNEL (+) σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p \leq 0.005$), στις περιοχές CA1-3, CA4 και στην οδοντωτή έλικα. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα 3, διακρίνονται οι μεγάλες διαφορές στον προμήκη, στον θάλαμο και στην παρεγκεφαλίδα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p \leq 0.002$, $p \leq 0.002$ και $p \leq 0.005$).

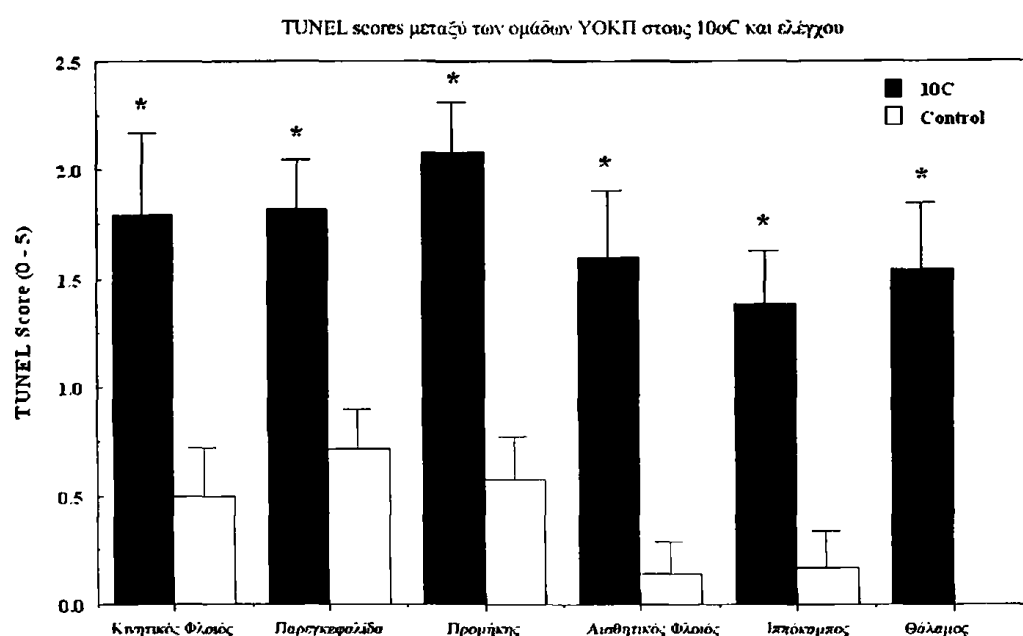


Πίνακας 5. Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στην ομάδα YOKΠ στους 10°C και στην ομάδα ελέγχου

Εγκεφ. Περιοχή	10°C	Ομάδα Ελέγχου
Κινητ. φλοιός	1.79±0.38+	0.50±0.22
Αισθητ. φλοιός	1.60±0.31+++	0.14±0.14
Ιππόκαμπος	1.39±0.24++	0.17±0.17
Παρεγκεφαλίδα	1.82±0.23++	0.71±0.18
Προμήκης	2.08±0.23+++	0.57±0.20
Θάλαμος	1.54±0.31+++	0.00±0.00

Όλες οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. + $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.005$; +++ $p \leq 0.002$ σε σύγκριση με τις τιμές της ομάδας ελέγχου (ANOVA και Fisher PLSD)

Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 10°C και ελέγχου



Αποτελέσματα TUNEL στις ομάδες YOKΠ στους 10°C και ελέγχου στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές. Οι στήλες μαύρου χρώματος απεικονίζουν την μέση τιμή TUNEL score της ομάδας YOKΠ στους 10°C ενώ οι λευκές στήλες την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου. Η κάθετη γραμμή πάνω από την κάθε στήλη αναπαριστά την τυπική απόκλιση.

* $p \leq 0.05$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (ANOVA και Fisher PLSD).



Σε αντίθεση με τα ευρήματά μας στην ομάδα της YOKΠ στους 18° C, οι εγκεφαλικοί ιστοί μετά από 75 λεπτά πολύ βαθιάς YOKΠ στους 10° C δεν παρουσίασαν, μεταξύ τους, στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατά περιοχές νευρωνική ευαισθησία ($p \geq 0.05$; ANOVA και Fischer PLSD).

YOKΠ στους 18° C και στους 10° C

Η YOKΠ στους 10° C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά χαμηλότερα TUNEL (+) σκορ σε σύγκριση με την ομάδα στους 18° C σε κάποιες εγκεφαλικές περιοχές, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στην ομάδα YOKΠ στους 18° C και στους 10° C

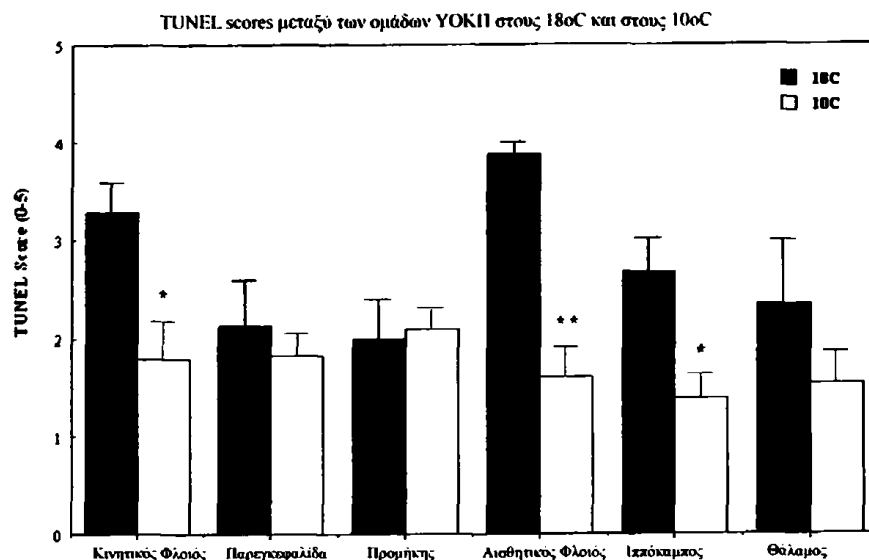
Εγκεφ. Περιοχή	18° C	10° C
Κινητ. φλοιός	3.28±0.32*	1.79±0.38
Αισθητ. φλοιός	3.88±0.13**	1.60±0.31
Ιππόκαμπος	2.67±0.36*	1.39±0.24
Παρεγκεφαλίδα	2.13±0.48	1.82±0.23
Προμήκης	2.00±0.41	2.08±0.23
Θάλαμος	2.33±0.67	1.54±0.31

Όλες οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p \leq 0.006$ και ** $p \leq 0.0001$ σε σύγκριση με τις τιμές από την ομάδα YOKΠ στους 10° C (ANOVA και Fischer PLSD).

Αρκετά ενδιαφέροντα ήταν τα ευρήματά μας, όσο αφορά την σύγκριση των δύο ομάδων YOKΠ μεταξύ τους. (διάγραμμα 4) Συγκεκριμένα, όπως αποδείχτηκε με την χρήση του t-test, ο νεοφλοιός, κινητικός και αισθητικός, και ο ιππόκαμπος παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα TUNEL (+) σκορ στην ομάδα της πολύ βαθιάς YOKΠ στους 10° C σε σύγκριση με την βαθειά YOKΠ στους 18° C ($p \leq 0.006$, $p \leq 0.0001$ και $p \leq 0.006$, αντίστοιχα).



Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 18° C και 10° C



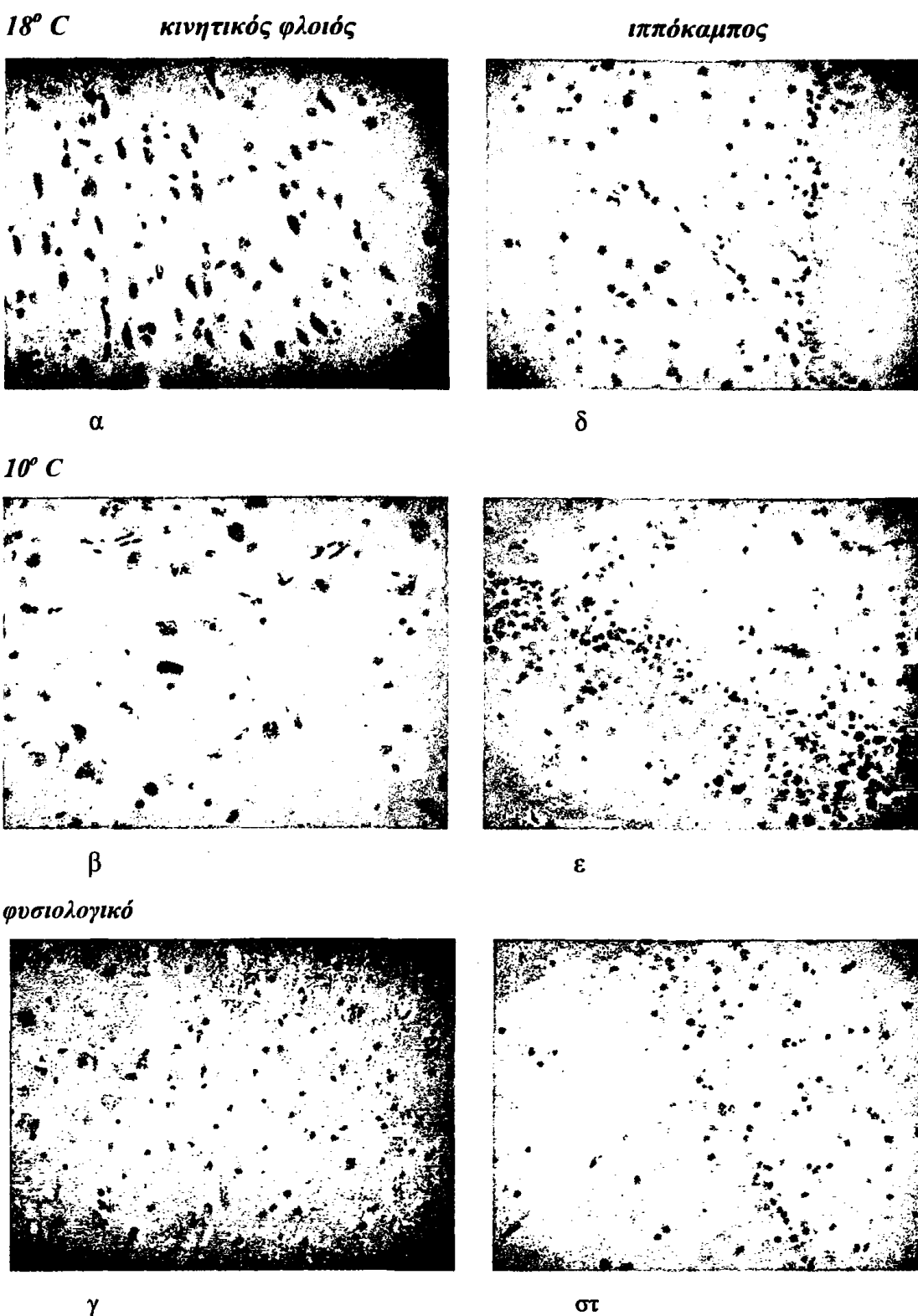
Διαφορές TUNEL scores μεταξύ των ομάδων YOKΠ στους 18°C και στους 10°C. Οι στήλες μαύρου χρώματος απεικονίζουν την μέση τιμή TUNEL score της ομάδας YOKΠ στους 18°C ενώ οι λευκές στήλες την αντίστοιχη της ομάδας YOKΠ στους 10°C. Η κάθετη γραμμή πάνω από την κάθε στήλη αναπαριστά την τυπική απόκλιση. * $p \leq 0.006$ και ** $p \leq 0.0001$ σε σύγκριση με την ομάδα στους 18°C (ANOVA και Fisher PLSD)

Παρατηρήθηκε ότι ο κινητικός και ιδιαίτερα ο αισθητικός φλοιός, όπως επίσης και ο ιππόκαμπος ήταν εκείνες οι εγκεφαλικές περιοχές που ανέδειξαν μεγαλύτερη νευροπροστασία από την πολύ βαθιά υποθερμία των 10° C, έχοντας σημαντικά χαμηλότερα αποπτωτικά σκορ.

Οι διαφορές αυτές αποτυπώνονται εντονότερα στις φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από τις εκλεκτικά ευπαθείς περιοχές του κινητικού φλοιού και του ιππόκαμπου. Στις φωτογραφίες, στην ομάδα της YOKΠ στους 18° C, είναι χαρακτηριστικά πολύ μεγάλη η πυκνότητα των καφεκόκκινων πυρήνων των TUNEL (+) νευρώνων σε αντίθεση με αυτές από την ομάδα της YOKΠ στους 10° C και κυρίως από την ομάδα ελέγχου με τα φυσιολογικά ζώα, όπου εκεί οι καφεκόκκινοι πυρήνες είναι σημαντικά λιγότεροι και αραιά κατανεμημένοι. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9. Φωτομικρογραφίες TUNEL σε κινητικό φλοιό και ιππόκαμπο στις τρεις ομάδες



Φωτομικρογραφίες εγκεφαλικών ιστικών τομών επεξεργασμένων με την TUNEL ιστοχημεία: (α,β,γ) κινητικός φλοιός, και (δ,ε,στ) ιππόκαμπος. Οι φωτομικρογραφίες α και δ είναι από ζώα της ομάδας YOKΠ στους 18° C; οι β και ε από ζώα της ομάδας YOKΠ στους 10° C; και οι γ και στ από ζώα της ομάδας ελέγχου (μεγέθυνση x400).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Γενικά Σχόλια

Η χρήση της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης αποτελεί, από την δεκαετία του 1950, την χειρουργική τεχνική εκλογής στην αντικατάσταση του αορτικού τόξου και στη διόρθωση συγγενών καρδιοπαθειών σε νεογνά. Τα αποτελέσματα τέτοιων επεμβάσεων βελτιώθηκαν σημαντικά τις δύο τελευταίες δεκαετίες και πλέον αυτές οι επεμβάσεις ενέχουν έναν αποδεκτό κίνδυνο για κάθε ασθενή. Παρόλα αυτά, οι βελτιώσεις αποτελούν μάλλον αποτέλεσμα αυξημένης εξειδίκευσης και κατάρτισης όσο αφορά την τεχνική, παρά επίδραση κάποιας συγκεκριμένης μεθόδου προστασίας των οργάνων. Η λογική της χρήσης της υποθερμικής κυκλοφορικής παύσης βασίζεται στην αρχή της μείωσης του μεταβολικού ρυθμού (McCullough et al 1999) προκειμένου να παραταθεί το διάστημα χωρίς αιμάτωση, που μπορεί να γίνει ανεκτό με ασφάλεια από τον εγκέφαλο. Ωστόσο, ενώ τα αποτελέσματα της χειρουργικής προσπέλασης με κυκλοφορική παύση έχουν γίνει, σε γενικές γραμμές, αποδεκτά, τα κλινικά δεδομένα αποκάλυψαν παρουσία νευρολογικής βλάβης σε πολλούς ενήλικες ασθενείς που υποβλήθηκαν σε παρατεταμένου χρόνου υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση και η τελευταία βρέθηκε να σχετίζεται άλλοτε με εμβολικά φαινόμενα στον εγκέφαλο και άλλοτε με παροδική νευρολογική δυσλειτουργία. (Ergin et al 1999) Μελέτες παιδιών που υποβλήθηκαν σε παρατεταμένη κυκλοφορική παύση κατά τη βρεφική ηλικία έδειξαν επίσης, παρατεταμένη εξασθένηση της γνωσιακής και μαθησιακής λειτουργίας. Η ολική παύση της κυκλοφορίας με μεγάλη υποθερμία σε νεογνά εγκυμονεί κινδύνους όπως επιληπτικούς παροξυσμούς, κινητική δυσλειτουργία, εγκεφαλική παράλυση, καθυστέρηση της διανοητικής ανάπτυξης και εξασθένηση της μαθησιακής ικανότητας, σε ποσοστό 5% έως 45% των επιζώντων (Bellinger et al 1995).

Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στα επακόλουθα νευρολογικά συμβάματα της κυκλοφορικής παύσης, με ιδιαίτερη έμφαση στη διερεύνηση των υπεύθυνων παθογενετικών μηχανισμών για αυτού του είδους τη βλάβη των νευρωνικών κυττάρων. Οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές τις καταστροφικές επιπλοκές του κεντρικού νευρικού συστήματος παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Σε ποικίλα, πειραματικά, ζωικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι η εγκεφαλική ισχαιμία προκαλεί νευρολογική βλάβη μέσω ενός αποπτωτικού μοντέλου κυτταρικού θανάτου, όπως επίσης και μέσω νέκρωσης (Maier et al 1998, Mehmet et al 1998). Από

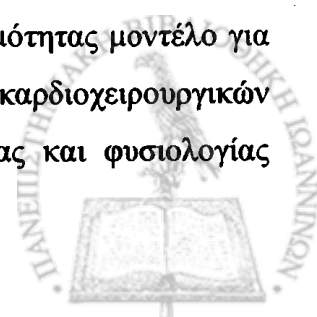


πρόσφατες εργασίες υποδεικνύεται ότι κάποιοι από τους ευπαθείς νευρώνες, σε ενήλικες και σε νεογνά, πεθαίνουν μετά από ισχαιμική προσβολή μέσω ενός μηχανισμού, που καλείται απόπτωση, και παριστά μια διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Bottinger et al 1998). Σε νεογέννητους χοίρους, υπάρχουν ενδείξεις ότι η βαρύτητα της εγκεφαλικής υποξίας-ισχαιμίας μπορεί να ασκήσει επιρροή στην ισορροπία μεταξύ νέκρωσης και απόπτωσης στον εγκέφαλο, με προκαλούμενες ηπιότερες βλάβες κύρια μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού κυτταρικού θανάτου. Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι έντονα ερεθίσματα οδηγούν σε νέκρωση ενώ σε μικρότερες βλάβες ανευρίσκονται περισσότερα αποπτωτικά κύτταρα. Σε νεογνά, πιθανά η απόπτωση, ως μηχανισμός πρόκλησης κυτταρικού θανάτου, να κυριαρχεί έναντι της νέκρωσης, μετά από έκθεση σε υποξία-ισχαιμία. (Tseng et al 1997)

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος είναι φυσιολογικό γεγονός στα πλαίσια της ανάπτυξης του εγκεφάλου και βοηθά στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής του, με απομάκρυνση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και πρώιμης μετεμβρυϊκής ζωής. Επίσης, η απόπτωση διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον νευρωνικό κυτταρικό θάνατο μετά από υποξία-ισχαιμία, κρανιοεγκεφαλική κάκωση καθώς και σε εκφυλιστικές παθήσεις του νευρικού συστήματος, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί η αναλογική της σχέση της με το νεκρωτικό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου. Στην απόπτωση, η πορεία του κυτταρικού θανάτου είναι καλά ενορχηστρωμένη, προκαλούμενη από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και ενζύμων, μέσω των οποίων τα κύτταρα απλά διεξάγουν «αυτοκτονία», διασπώμενα σε μικρότερα, περιβαλλόμενα από μεμβράνη, τμήματα, προκειμένου να απομακρυνθούν από τα μακροφάγα. Ο κυτταρικός θάνατος μέσω νέκρωσης, αντίθετα, είναι ανεξέλεγκτη διαδικασία, χαρακτηριζόμενη από κυτταρική ενεργειακή απώλεια, κατάλυση και ρήξη της πλασματικής μεμβράνης, με επακόλουθη εκροή των ενδοκυτταρικών συστατικών, που αποτελεί το έναυσμα φλεγμονώδους αντίδρασης και δευτεροπαθούς βλάβης σε παρακείμενα κύτταρα.

2. Επιλογή Πειραματικού Μοντέλου

Τα τελευταία χρόνια, ο χοίρος έχει αποδειχθεί μεγάλης χρησιμότητας μοντέλο για τη μελέτη της προστασίας του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων. Οι χοίροι είναι θηλαστικά με προσομοίωση ανατομίας και φυσιολογίας

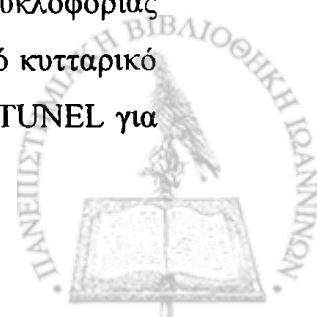


εγκεφάλου με τον άνθρωπο, με αποτέλεσμα να θεωρείται σχετικά αξιόπιστη η εξαγωγή συμπερασμάτων, όσο αφορά την νευροπροστασία και την διερεύνηση παθογενετικών μηχανισμών. Επίσης, λόγω του μεγέθους τους, καθίσταται εύκολη η εφαρμογή χειρουργικού πρωτοκόλλου και λόγω της αφθονίας του χρησιμοποιούμενου γένους, χαμηλού κόστους η διεξαγωγή πειραμάτων. Οι χοίροι της μελέτης μας ήταν του ιδίου φύλου (άρρενες) και νεαροί αλλά νευρολογικά ώριμοι ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα νευρωνικής απόπτωσης λόγω της ανάπτυξης. Ακόμη δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σωματικού βάρους και ηλικίας μεταξύ των πειραματοζώων των τριών ομάδων.

Το πειραματικό μοντέλο που επιλέχθηκε, όπως συνηθίζεται στις περισσότερες πειραματικές εργασίες πάνω στην υποθερμική κυκλοφορική παύση, ήταν μία αναπαραγωγή του χοίρειου πειραματικού μοντέλου που δημιουργήθηκε από τον ερευνητή Juvonen της Ιατρικής Σχολής του Mount Sinai στην Νέα Υόρκη. (Juvonen et al 1998) Το αναισθησιολογικό και το χειρουργικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην εργασία μας ήταν το ίδιο, με την διαφορά ότι επιλέχθηκε μικρότερο χρονικό διάστημα κυκλοφορικής παύσης (75 λεπτά αντί για 90 λεπτά) και η θανάτωση των ζώων έγινε αμέσως μετά την ισχαιμία-επαναιμάτωση (οξύ αντί χρόνιο πειραματικό μοντέλο). Το χρονικό διάστημα των 75 λεπτών κυκλοφορικής παύσης είναι μακράν των κλινικά χρησιμοποιούμενων, αρκετά παρατεταμένο και ακόμα και σε υποθερμία 18 °C, ικανό να προκαλέσει σοβαρή νευρολογική βλάβη. Αυτό ήταν επιθυμητό ώστε να διερευνηθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί της νευρωνικής βλάβης άμεσα μεταισχαιμικά και επιπλέον να αναδειχθεί η οποιαδήποτε επίδραση της βαθύτερης υποθερμίας.

3. Νευρωνική Βλάβη στην Βαθεία Υποθερμία στο Οξύ Πειραματικό Μοντέλο

Στην πειραματική μας μελέτη υποθέσαμε ότι άμεσα μεταισχαιμικά ενεργοποιείται ο νευρωνικός αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος και ότι σε εντονότερη υποθερμία (π.χ. 10 °C έναντι 18 °C) θα διαπιστωθούν λιγότερες ενδείξεις απόπτωσης στις ευπρόσβλητες περιοχές του εγκεφάλου. Χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης και καταγραφή της αναμενόμενης απόπτωσης και της νέκρωσης έγινε σε όλα τα δείγματα και τις περιοχές. Για να τεκμηριώσουμε την υπόθεση μας, ότι δηλαδή η υποθερμική διακοπή της κυκλοφορίας αποτελεί την απαρχή μιας σειράς γεγονότων που τελικά οδηγούν σε νευρωνικό κυτταρικό θάνατο, μέσω ενός τυπικού αποπτωτικού μοντέλου, εφαρμόστηκε η μέθοδος TUNEL για



την αποκάλυψη της κατάτμησης του DNA *in situ* σε μικρά ολιγονουκλεοσώματα. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι αρκετά ευαίσθητη μέθοδος ώστε να αποκαλύψει μικρές αλλαγές, η ιστολογία παραμένει η μέθοδος αναφοράς για την τεκμηρίωση των νευροπροστατευτικών μηχανισμών στον εγκέφαλο. Σε καμία από τις πειραματικές ομάδες και στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρωνικής βλάβης με την χρήση της χρώσης Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης, σε αυτό το οξύ πειραματικό μοντέλο. Αντίθετα βρέθηκε σημαντική TUNEL θετικότητα σε όλα τα δείγματα από όλες τις υπό μελέτη περιοχές στην ομάδα των 18 °C σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, οι νευρώνες του αισθητικού και του κινητικού φλοιού και του ιππόκαμπου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο ισχαιμικό ερέθισμα σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές. Παρά το γεγονός ότι οι νευρώνες του θαλάμου, της παρεγκεφαλίδας και της κοιλιακής μοίρας του προμήκη ήταν ευαίσθητοι στην ισχαιμία, το ποσοστό των ανευρεθέντων TUNEL θετικών κυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερο από το παρατηρούμενο στον νεοφλοιό και τον ιππόκαμπο.

Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με αυτά που αναφέρονται σε χρόνια πειραματικά μοντέλα, όσο αφορά την εκλεκτική ευαισθησία των διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών στην ισχαιμία. Πιο συγκεκριμένα, διάφορες πειραματικές μελέτες με πρωτόκολλο 90-120 λεπτών κυκλοφορικής παύσης στους 18 °C και θανάτωση των ζώων από 6 ώρες έως και 12 ημέρες μεταισχαιμικά συμφωνούν ότι ο νεοφλοιός και ο ιππόκαμπος χαρακτηρίζονται από την εκλεκτική νευρωνική ευαισθησία στο ισχαιμικό ερέθισμα, αφού εκεί ανευρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων. (Tseng et al 1997, Hagl et al 2001, Tatton et al 2001, Kurth et al 1999)

Το φαινόμενο της εκλεκτικής ευαισθησίας δεν είναι πλήρως κατανοητό. Πάντως ο περιοχικός μεταβολισμός, διάφοροι τροφικοί παράγοντες και η συναπτική συνδεσιμότητα των νευρωνικών κυττάρων ανά εγκεφαλική περιοχή, φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο. Η υποξία οδηγεί στην εκδήλωση αλλαγών στις ενδογενείς μεμβρανικές ιδιότητες και στις συναπτικές αλληλεπιδράσεις. Φυλογενετικά ο ιππόκαμπος και ο νεοφλοιός αντιδρούν παρόμοια και σε ότι αφορά την χρονική εκδήλωση και την έκφραση της αντίδρασης στα υποξικά ερεθίσματα και επιπλέον η αντίδρασή τους είναι ισχυρά εξαρτώμενη από την θερμοκρασία. Ομοίως, η ολική (και όχι περιοχική) ισχαιμία προκαλεί ένα διάχυτο μοτίβο νευρωνικής βλάβης ιδίως στον σωματοαισθητικό νεοφλοιό (ιδίως στις μεσαίες και χαμηλότερες στιβάδες) και στον ιππόκαμπο (με αυτήν την σειρά CA1> CA2> CA3> οδοντωτή έλικα). (Luhmann 1996) Η εκλεκτική ευπάθεια του ιππόκαμπου, της παρεγκεφαλίδας, του ραβδωτού σώματος, του πλάγιου θαλαμικού πυρήνα και της τρίτης

έως πέμπτης στιβάδας του νεοφλοιού έχει ενοχοποιηθεί για την εξασθένηση της μνήμης, της μάθησης και της κινητικής λειτουργίας μετά από ισχαιμία. Ο ιππόκαμπος, συγκεκριμένα, αποτελεί μία εγκεφαλική περιοχή υψηλού μεταβολικού δείκτη και αυξημένης ευαισθησίας σε ισχαιμία και ανοξία, ακόμα και σε συνθήκες υποθερμίας. Βλάβη της περιοχής αυτής εκδηλώνεται κυρίως με διαταραχές μνήμης και κινητική δυσλειτουργία.

Ο κυτταρικός θάνατος δεν είναι μια στιγμιαία διαδικασία αλλά ένα εξελισσόμενο γεγονός. Όσο αφορά την αναλογία αποπτωτικού και νεκρωτικού μηχανισμού διάφοροι ερευνητές καταλήγουν ότι πρόκειται για δύο διακριτές κυτταρικές διαδικασίες, που επισυμβαίνουν κατά ένα χρονικά εξαρτώμενο μοτίβο. Η απόπτωση εμφανίζει το μέγιστο στις 6 ώρες, είναι μειωμένη στις 24 ώρες και ουσιαστικά εξαφανίζεται στις 72 ώρες, ενώ η νέκρωση συμβαίνει σε όλες τις χρονικές στιγμές αλλά κυριαρχεί στις 72 ώρες και συνεχίζει στις επόμενες ημέρες. Βέβαια, η αναλογία εξαρτάται από την ένταση του ισχαιμικού ερεθίσματος, αφού έχει διαπιστωθεί ότι ήπια ερεθίσματα οδηγούν στην υπεροχή του αποπτωτικού μηχανισμού. (Tseng et al 1997) Τονίζεται ότι στα προαναφερθέντα χρόνια πειραματικά μοντέλα τα κύτταρα χαρακτηρίστηκαν σαν αποπτωτικά γιατί πέραν της θετικότητας TUNEL διακρίνονται και με βάση κάποιες συγκεκριμένες ιστολογικές πιστοποιήσεις με κλασικά μορφολογικά σημεία απόπτωσης, όπως εξοίδηση κυτταρικής μεμβράνης, πύκνωση χρωματίνης, συρρίκνωση κυτταρικού πυρήνα και πύκνωση του κυτταροπλάσματος. Σε αντίθεση, στο οξύ πειραματικό μοντέλο μας δεν ανευρέθηκαν μορφολογικές αποδείξεις απόπτωσης παρά μόνο θετικότητα TUNEL. Άλλωστε, πρόκειται για πρώιμο στάδιο της ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού. Σε ένα τέτοιο πρώτο στάδιο δεν είναι αναμενόμενη η ολοκλήρωση της απόπτωσης που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο με τα κλασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, αλλά περισσότερο η έναρξη του κυτταρικού αντιδραστικού καταρράκτη. Τα θετικά TUNEL κύτταρα σταδιακά τελικά θα εξελιχθούν σε μορφολογικά διακριτά αποπτωτικά κύτταρα αν το ζώο θανατώνονταν τις επόμενες ώρες. Οι διαφορετικές μορφολογίες των κυττάρων αντανακλούν διαφορετικά στάδια του ίδιου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου. (Conti 1998, de Leon et al 1998, Raghupathi 2004)



4. Διαφορά Αποτελεσμάτων στην Πολύ Βαθεία Υποθερμία

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σωματικού βάρους και ηλικίας μεταξύ των πειραματοζώων των τριών ομάδων. Οι μέσες τιμές διάρκειας της ψύξης υπό Ε/Κ μέχρι την επιθυμητή θερμοκρασία των 18 °C για την ομάδα Α ήταν 57.50 ± 17.25 λεπτά και μέχρι την επιθυμητή θερμοκρασία των 10 °C για την ομάδα Β ήταν 105.8 ± 21.8 λεπτά (t-test; $p \leq 0.002$). Μετά την παύση, η διάρκεια επαναθέρμανσης ήταν 82.5 ± 10.4 λεπτά για την ομάδα Α και 104.2 ± 19.8 λεπτά για την ομάδα Β (t-test; $p \leq 0.05$). Η παρατηρούμενη στατιστικά σημαντική αύξηση στους χρόνους ψύξης και επαναθέρμανσης στην ομάδα της πολύ βαθιάς υποθερμίας, οφείλεται στο γεγονός ότι για την καλύτερη και ομοιογενή συστηματική ψύξη αποφεύγεται η ταχεία μείωση της θερμοκρασίας και ομοίως προτιμάται και η σταδιακή επαναιμάτωση και επαναθέρμανση μετά την άρση του ισχαιμικού ερεθίσματος. Επίσης με την σταδιακή ψύξη του εγκεφάλου αποφεύγονται πιθανές αυξήσεις της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της παύσης και διατηρείται η υποθερμία.

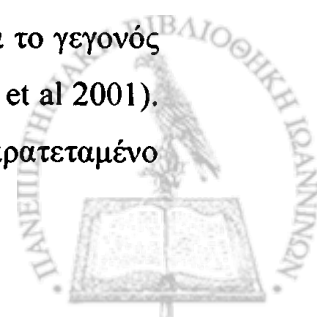
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου (στις πέντε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές) και του βάθους της υποθερμίας (YOKΠ στους 18 °C και στους 10 °C) στις μετρούμενες φυσιολογικές παραμέτρους. Παρά το γεγονός ότι υπήρχαν κάποιες μεταβολές στις τιμές ορισμένων παραμέτρων, όπως πχ. στα υψηλότερα επίπεδα PO_2 κατά την ψύξη στην ομάδα των 10 °C, δεν βρέθηκε καμία κλινική συσχέτιση αυτών των διαφορών. Όσο αφορά τον αιματοκρίτη, βρέθηκε ότι υπήρχε διαφορά ανάμεσα στην αρχική τιμή και τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές και στις δύο πειραματικές ομάδες και για την διακύμανση της τιμής του κατά την διάρκεια των πειραμάτων, βρέθηκε ότι μειώθηκε στον ίδιο βαθμό και στις δύο πειραματικές ομάδες. Αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού είναι γνωστό ότι κατά την εξωσωματική κυκλοφορία, λόγω της αιμοαραίωσης, ο αιματοκρίτης μειώνεται. Ακόμη, στην μελέτη δεν μετρήθηκαν επίπεδα γλυκόζης σε καμία χρονική στιγμή, ενώ αντίθετα παρατέθηκαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων του γαλακτικού οξέος. Άλλωστε τα επίπεδα γλυκόζης και γαλακτικών σχετίζονται άμεσα μέσω του μονοπατιού της αναερόβιας γλυκόλυσης. (Combs et al 1990) Είναι γνωστό, ότι οι διαταραχές των επιπέδων της γλυκόζης έχουν συσχέτιση με τα νευρολογικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις νευρωνικής βλάβης και ότι ένας από τους παράγοντες που σχετίζονται με ανεπιθύμητα εγκεφαλικά αποτελέσματα είναι η υπεργλυκαιμία κατά την διάρκεια της παύσης είτε κατά την επαναιμάτωση. (Mullner et al 1997) Βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού κατά την ψύξη και στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα κατά την



επαναθέρμανση στην ομάδα των 10 °C. Η μείωση της εγκεφαλικής ροής και μεταβολισμού στην πολύ βαθειά υποθερμία, πιθανά οδήγησε στον περιορισμό των διαθέσιμων ενεργειακών υποστρωμάτων για γλυκόλυση και τελικά στην μέγιστη συγκέντρωση γαλακτικών.

Όπως προαναφέρθηκε σε καμία από τις πειραματικές ομάδες και στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρωνικής βλάβης με την χρήση της χρώσης Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης, σε αυτό το οξύ πειραματικό μοντέλο. Αντίθετα βρέθηκε σημαντική TUNEL θετικότητα σε όλα τα δείγματα από όλες τις υπό μελέτη περιοχές στην ομάδα των 10 °C σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μολονότι τα σκορ ήταν γενικά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά στους 18° C. Βέβαια, σε αντίθεση με τα ευρήματά μας στην ομάδα των 18° C, οι εγκεφαλικοί ιστοί μετά από 75 λεπτά πολύ βαθιάς υποθερμικής διακοπής της κυκλοφορίας στους 10° C δεν παρουσίασαν, μεταξύ τους, στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατά περιοχές νευρωνική ευαισθησία ($p \geq 0.05$; ANOVA και Fischer PLSD). Αρκετά ενδιαφέροντα ήταν τα ευρήματά μας, όσο αφορά την σύγκριση των δύο ομάδων 18° C και 10 °C μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, ο νεοφλοιός, κινητικός και αισθητικός, και ο ιππόκαμπος παρουσίασαν στατιστικά πολύ σημαντικά χαμηλότερα TUNEL (+) σκορ στην ομάδα των 10° C σε σύγκριση με αυτήν των 18° C ($p \leq 0.006$, $p \leq 0.0001$ και $p \leq 0.006$, αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι ο κινητικός και ιδιαίτερα ο αισθητικός φλοιός, όπως επίσης και ο ιππόκαμπος ήταν εκείνες οι εγκεφαλικές περιοχές που ανέδειξαν μεγαλύτερη νευροπροστασία από την πολύ βαθειά υποθερμία των 10° C, έχοντας σημαντικά χαμηλότερα αποπτωτικά σκορ.

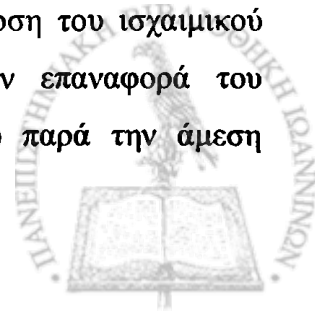
Η άποψη ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια παρατεταμένης υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης είναι περισσότερο νευροπροστατευτική προκύπτει από πειραματικές μελέτες που δείχνουν: πληρέστερη καταστολή του μεταβολισμού και της ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας σε μεγαλύτερα επίπεδα υποθερμίας, λειτουργικά καλύτερη ανάνηψη σε μοντέλα επιβίωσης και λιγότερες τυπικές ιστολογικές βλάβες στον εγκέφαλο. (Hagl et al 2001, Tatton et al 2001, Erlich et al 2002) Κλινικές μελέτες, επίσης, υποστηρίζουν τη χρήση θερμοκρασιών χαμηλότερων των 15-18 °C. Σε μια πιλοτική μελέτη (με χρήση 3 μόνο χοίρων) εφαρμόστηκε κυκλοφορική παύση στους 10 °C αντί για τους 20 °C. Με ιστολογική ανάλυση, 72 ώρες μετεγχειρητικά, διαπιστώθηκε σημαντικά χαμηλότερος αριθμός εκφυλισμένων κυττάρων, παρά το γεγονός ότι η ολική πυκνότητα των αποπτωτικών κυττάρων δε διαφοροποιήθηκε (Hagl et al 2001). Το τελευταίο θα μπορούσε, κατά ένα μέρος, να εξηγηθεί από το παρατεταμένο



μεταισχαιμικό διάστημα, κατά τη διάρκεια του οποίου η αιχμή των γεγονότων της αποπτωτικής διαδικασίας πιθανά διέφυγε της απαιτούμενης προσοχής. Εντούτοις, οι παραπάνω μελέτες οριοθετούν προκαταρκτικά την άποψη ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία, στους 10 °C είναι ευνοϊκότερη απ' ότι στους 20 °C, από τη σκοπιά του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου. (Strauch et al 2005) Όσο αφορά την εκλεκτική νευρωνική ευαισθησία, πρέπει να διευκρινιστεί ότι το μοτίβο της βλάβης ποικίλλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες όπως, η διάρκεια της ισχαιμίας και το χρονικό διάστημα μεταισχαιμικά, που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ηλικία του είδους και η υποθερμία. Όλα τα πειραματόζωα είχαν την ίδια ηλικία και ήταν επιλεγμένα ώστε να είναι νευρολογικά ώριμα γιατί η απόπτωση χαρακτηρίζει τον ανώριμο εγκέφαλο σαν φυσιολογική διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα πλαίσια της ανάπτυξης. (Johnston et al 2001) Η υποθερμία όμως, αλλάζει το πρότυπο της ευαισθησίας και δεν προσφέρει προστασία εξίσου σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές. Μετά από υποθερμική ισχαιμική βλάβη, έχει βρεθεί ότι το στέλεχος και ο θάλαμος είναι λιγότερο προστατευμένες από τις άλλες περιοχές. (Kurth et al 1999, Laptook 1994) Στην πειραματική μας μελέτη αποδείξαμε ότι η πολύ βαθιά υποθερμία προσφέρει μεγαλύτερη προστασία στις εκλεκτικά ευαίσθητες περιοχές στο ερέθισμα της υποξίας και της ισχαιμίας, με αδιευκρίνιστο μηχανισμό. Συγκεκριμένα, ο νεοφλοιός, κινητικός και ιδιαίτερα αισθητικός, και ο ιππόκαμπος που υπόκεινται στο ερέθισμα της ισχαιμίας και της ανοξίας, ωφελούνται περισσότερο από την επίδραση της πολύ βαθιάς υποθερμίας, όσο αφορά τον μηχανισμό του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου και μάλιστα την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού.

5. Περιορισμοί της Μελέτης

Παρά το γεγονός ότι είναι γνωστή η ευεργετική επίδραση της βαθιάς υποθερμίας στην προστασία των οργάνων με τον μηχανισμό της καταστολής του μεταβολισμού, ώστε να γίνει ανεκτή μία συγκεκριμένη περίοδος υποξίας – ισχαιμίας, μία σειρά προβληματισμών δεν επιτρέπουν την ευρεία εφαρμογή της. Πιο συγκεκριμένα και στο επίπεδο του εγκεφάλου, βαθύτερη υποθερμία χαμηλότερα των 18 °C σχετίζεται με πιθανότητα απώλειας της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης. Μετά την άρση του ισχαιμικού ερεθίσματος και την επαναθέρμανση υπάρχει καθυστέρηση στην επαναφορά του κατεσταλμένου εγκεφαλικού μεταβολισμού (λόγω της υποθερμίας) παρά την άμεση



επαναφορά της εγκεφαλικής ροής, με αποτέλεσμα η ροή να είναι ακατάλληλα υπερεπαρκής για τις μεταβολικές ανάγκες στην πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης (luxury perfusion). Το φαινόμενο αυτό αποτελεί αυξημένο κίνδυνο για επικείμενα εμβολικά φαινόμενα στα εγκεφαλικά αγγεία. (Erlich et al 2002) Επιπλέον, η πολύ βαθιά υποθερμία οδηγεί σε κατανάλωση παραγόντων πήξης και επιδείνωση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα διαταραχές αιμόστασης. Η παρατεταμένη διάρκεια εξωσωματικής κυκλοφορίας, αφού είναι μεγαλύτεροι οι χρόνοι ψύξης και επαναθέρμανσης προκαλεί εκσήμευση των επιποκών αυτής όπως φλεγμονώδη αντίδραση, διαταραχές αιμόστασης, νεφρολογικές, νευρολογικές κτλ.

Η πειραματική μας μελέτη είναι ένα οξύ πειραματικό μοντέλο που σε αντίθεση με τα χρόνια δεν είναι εφικτή η μετεγχειρητική ανάνηψη και επιβίωση των ζώων. Στην μελέτη αυτή δεν είναι εφικτή η συσχέτιση των ιστολογικών σκορ με αποτελέσματα από νευρολογικά τεστ, όπως παρατίθενται από τα χρόνια, όπου τα ζώα επιβιώνουν και ελέγχονται νευρολογικά σε διάφορες χρονικές περιόδους μετεγχειρητικά, από ώρες έως μέρες. Αναφέρεται ότι έχουμε ευρήματα πρώιμης νευρολογικής βλάβης και δε μπορούμε να εκτιμήσουμε την εγκεφαλική επαναφορά μετά από πολύ βαθιά υποθερμία. Σε χρόνιο μοντέλο οι ιστολογικές βλάβες θα ήταν διαφορετικές λόγω ωρίμανσης των ιστολογικών αλλαγών και του εξελισσόμενου καθυστερημένου νευρωνικού θανάτου. Επίσης, δεν μπορούμε παρά μόνο να πιθανολογήσουμε για τα βελτιωμένα νευρολογικά ευρήματα στην πολύ βαθιά υποθερμία, χωρίς όμως να αποκλείουμε τον κίνδυνο από την απώλεια της εγκεφαλικής απορρύθμισης.

Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε έναν σημαντικό περιορισμό της μελέτης που αφορά την μεθοδολογία της. Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος TUNEL για την εκτίμηση της απόπτωσης, ανιχνεύει μεν κερματισμένο DNA, το οποίο όμως μπορεί να υπάρχει όχι μόνο στα αποπτωτικά κύτταρα αλλά και στα νεκρωτικά. Εκεί βέβαια η χρώση είναι πιο διάχυτη, λείπουν τα χαρακτηριστικά αποπτωτικά σωμάτια και συμβαίνει λιγότερο συχνά. (Lo et al 1995, Sastry 2000, Banasiak et al 2000) Έτσι λοιπόν δεν θεωρείται απόλυτα ειδική και ευαίσθητη μέθοδος. Επίσης δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο η μέθοδος TUNEL μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, όπου μόλις έχει ξεκινήσει η πυκνωση της χρωματίνης και τα τμήματα του DNA είναι ακόμα λίγα.



6. Έρευνα στην Νευροπροστασία

Η εξέλιξη στην επιστήμη της καρδιοχειρουργικής οδήγησε την τελευταία δεκαετία στην εφαρμογή της ήπιας υποθερμίας σε συνδυασμό με διακοπτόμενη εγκεφαλική αιμάτωση μέσω των εγκεφαλικών αγγείων, σε αντικατάσταση της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης. Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση συνεχίζει αναμφίβολα να πλεονεκτεί βέβαια, λόγω του ότι παρέχει αναίμακτο χειρουργικό πεδίο, αποφυγή χειρισμών στα ευαίσθητα εγκεφαλικά αγγεία και μικρότερους χειρουργικούς χρόνους. Η βαθιά υποθερμία παραμένει το πιο αποτελεσματικό μέτρο πρόληψης και μείωσης της ισχαιμικής βλάβης στο κεντρικό νευρικό σύστημα όταν μειωθεί ή διακοπεί η κυκλοφορία του αίματος. Τα ευρήματα της μελέτης μας δείχνουν τα πρώτα στάδια της ενεργοποίησης της απόπτωσης μετά το ερέθισμα της ισχαιμίας και αναδεικνύουν την επίδραση της υποθερμίας. Διάφορες οικογένειες πρωτεϊνών και ειδικές βιοχημικές οδοί μεταγωγής μηνυμάτων εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Η κωδικοποίηση του κυτταρικού θανάτου μπορεί να εμπεριέχει υποδοχείς κυτταρικού θανάτου της πλασματικής μεμβράνης, μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κυτταρικού θανάτου, πρωτεάσες, κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες. Μεταξύ των επικρατέστερων παραγόντων που καθορίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο περιλαμβάνονται: ο υποδοχέας Fas, τα γονίδια Bcl-2 και Bax (και τα ομόλογά τους γονίδια), το κυτόχρωμα C, οι κασπάσες, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και εξωκυτταρικές πρωτεϊνικές κινάσες. Όμως, η ακριβής αλληλουχία γεγονότων, που έχει ως απαρχή την ανίχνευση του αποπτωτικού σήματος στην κυτταρική επιφάνεια και καταλήγει στα χαρακτηρίζοντά την απόπτωση ευρήματα από τον πυρήνα του κυττάρου, δεν είναι καλά κατανοητή, με πολλά αδιευκρίνιστα σημεία στις περισσότερες από τις προτεινόμενες οδούς. Ωστόσο, έχουν καταγραφεί διάφορα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου και ενδοκυτταρικά, κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στο νευρικό σύστημα. Μετά την έκθεση στο κατάλληλο ερέθισμα, το πρώτο στάδιο ή «στάδιο της απόφασης» της απόπτωσης αφορά στο γενετικό έλεγχο του κυτταρικού θανάτου. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο ή «στάδιο της εκτέλεσης», που ευθύνεται για τις παρατηρούμενες μορφολογικές αλλαγές των αποπτωτικών κυττάρων (Kam, Ferch 2000). Το στάδιο της απόφασης ή γενετικού ελέγχου του κυτταρικού θανάτου φαίνεται να μεσολαβείται από δύο γονίδια, τη γονιδιακή οικογένεια του Bcl-2 και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, ενώ το στάδιο της εκτέλεσης της αποπτωτικής διαδικασίας προκύπτει ως αποτέλεσμα

της ενεργοποίησης των κασπασών. Είναι πλέον αποδεκτό ότι, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τη γονιδιακή οικογένεια του Bcl-2 παριστούν ένα καθοριστικό σημείο ελέγχου, στη διαδρομή μιας διακριτής οδού που καταλήγει στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η πειραματική μας μελέτη σε δεύτερο χρόνο θα συνεχιστεί με την διερεύνηση της ενεργοποίησης του Bcl-2 και των κασπασών.

Η έρευνα λοιπόν πρέπει να στραφεί στην διερεύνηση των γενεσιουργών μοριακών μηχανισμών της απόπτωσης στον εγκέφαλο, ώστε να εξελιχθούν οι μέθοδοι νευροπροστασίας για την καλύτερη αντιμετώπιση των ασθενών που υποβάλλονται σε βαθειά υποθερμία και ολική κυκλοφορική παύση. Άλλωστε η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, που υπόκεινται του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου, σε περίπτωση βλάβης του νευρικού συστήματος, θα μπορούσε να υποδείξει νέες παρεμβάσεις για την πρόληψη και θεραπεία νευροεκφυλιστικών βλαβών και νευρολογικών δυσλειτουργιών, επεκτείνοντας ταυτόχρονα το πεδίο γνώσεων στην βιολογία του κυτταρικού θανάτου.



ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

(1) Ποια είναι η επίδραση της βαθιάς υποθερμίας στην εγκεφαλική προστασία: μια ιστοπαθολογική μελέτη της ολικής κυκλοφορικής παύσης σε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο σε χοίρους

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιοθωρακικής Αναισθησίας,
Αθήνα, 13-15 Ιανουαρίου 2005

(2) Η επίδραση της βαθιάς υποθερμίας και της ολικής κυκλοφορικής παύσης στην εγκεφαλική προστασία : μελέτη σε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο σε χοίρους.

7^ο Βορειοελλαδικό Καρδιολογικό Συνέδριο
Θεσσαλονίκη, 22-24 Μαΐου 2008

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

(1) Acute regional neuronal injury following hypothermic circulatory arrest in a porcine model.

54th International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery (ESCVS)
19-22 May, 2005, Athens, Greece

(2) Cerebral protection of select motor regions by cooling to profound hypothermia (10° C) during hypothermic circulatory arrest in an acute porcine model.

4th Joint Meeting of the European Association of Cardiothoracic Surgeons and the European Society of Thoracic Surgeons (EACTS-ESTS)
25-28 September, 2005, Barcelona, Spain

(3) Profound hypothermia to 10°C reduces neurologic injury during prolonged hypothermic circulatory arrest (HCA) in an acute porcine model.

42nd Annual Meeting of the Society of Thoracic Surgeons (STS)
30 Jan-1 Feb, 2006, Chicago, Illinois



(4) Increased Bcl-2 immunoreactivity at 10°C indicates additional protection of neocortex and hippocampus during prolonged hypothermic circulatory arrest.

86th Annual Meeting of the American Association for Thoracic Surgery (AATS)

29 April-3 May, 2006, Philadelphia, PA

(5) Neuroprotection with profound hypothermia to 10°C during hypothermic circulatory arrest in an acute porcine model: measures of apoptosis in the primary cortex.

14th World Congress on Heart Disease, The International Academy of Cardiology

26-29 July, 2008, Toronto, Canada

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά

(1) Olga G Ananiadou, George E Drossos, Aikaterini N Bibou, George M Palatianos, Elisabeth O Johnson. Acute regional neuronal injury following hypothermic circulatory arrest in a porcine model.

Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 2005;4:597-601

(2) Olga G Ananiadou, Katherine Bibou, George E Drossos, Antonia Charchanti, Mary Bai, Saleem Haj-Yahia, Constantine E Anagnostopoulos, Elisabeth O Johnson. Effect of profound hypothermia during circulatory arrest on neurological injury and apoptotic repressor protein Bcl-2 expression in an acute porcine model.

Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2007;133:919-26

(3) Elizabeth O Johnson, Olga Ananiadou. Reply to the editor.

Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2007;134:1382-83

(4) Olga G Ananiadou, Katherine Bibou, George E Drossos, Mary Bai, Saleem Haj-Yahia, Elisabeth O Johnson. Hypothermia at 10°C reduces neurologic injury after hypothermic circulatory arrest in the pig.

Journal of Cardiac Surgery 2008;23(1):31-38



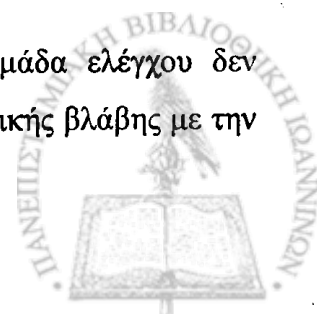
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επίδραση της βαθιάς υποθερμίας στην εγκεφαλική προστασία: ιστολογική μελέτη σε οξύ πειραματικό μοντέλο σε χοίρους.

Παρά το γεγονός ότι η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση (ΥΟΚΠ) είναι μία γνωστή μέθοδος που χρησιμοποιείται σε μία πλειάδα καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων και κυρίως στις επεμβάσεις στο αορτικό τόξο και διορθώσεων συγγενών καρδιαγγειακών ανωμαλιών, η εγκεφαλική βλάβη σαν συνέπεια της ΥΟΚΠ παραμένει συχνή και δύσκολα αντιμετωπίσιμη. Οι ιδανικές συνθήκες για την μεγιστοποίηση της εγκεφαλικής προστασίας κατά την διάρκεια της ΥΟΚΠ δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως. Υπάρχει αντιπαράθεση απόψεων πάνω σε βασικά θέματα που αφορούν την ΥΟΚΠ, όπως στην καλύτερη θερμοκρασία κατά την οποία γίνεται η παύση της κυκλοφορίας. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να συγκρίνει τα αποτελέσματα, όσο αφορά την εγκεφαλική βλάβη, που προκύπτουν από την εισαγωγή της ΟΚΠ σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (βαθεία υποθερμία και πολύ βαθιά υποθερμία).

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε δεκαέξι άρρενες χοίρους βάρους 25-30 κιλών ηλικίας 3 μηνών, οι οποίοι ήταν νευρολογικά ώριμοι. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην ομάδα Α (n=6) έγινε ΥΟΚΠ στους 18 °C για 75 λεπτά, στην ομάδα Β (n=6) έγινε ΥΟΚΠ στους 10 °C για 75 λεπτά και η ομάδα Γ (n=4) ήταν η ομάδα ελέγχου με τα φυσιολογικά ζώα. Μετά από την εφαρμογή της διαδικασίας (εξωσωματική κυκλοφορία, υποθερμία στους 10 °C ή 18 °C ανάλογα, ολική κυκλοφορική παύση για 75 min και επαναθέρμανση για 80 περίπου λεπτά) το ζώο θανατωνόταν και μονιμοποιούνταν και λαμβάνονταν ο εγκέφαλος. Οι υπό μελέτη περιοχές ήταν: 1. κινητικός φλοιός, 2. αισθητικός φλοιός, 3. θάλαμος, 4. παρεγκεφαλίδα 5. προμήκης και 6.ιππόκαμπος. Τομές από τις παραπάνω περιοχές υποβάλλονταν σε χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης για την μορφολογική εκτίμηση της βλάβης και στην μέθοδο TUNEL(από τα αρχικά των λέξεων *TdT-mediated dUTP nick end-labelling assay*, που είναι μία μέθοδος με την οποία εκτιμάται ο *in situ* κερματισμός του DNA που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της απόπτωσης) για την εκτίμηση της απόπτωσης.

Σε καμία από τις πειραματικές ομάδες ΥΟΚΠ και στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρωνικής βλάβης με την



χρήση της χρώσης Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης. Όλοι οι εγκεφαλικοί ιστοί με την επεξεργασία με την μέθοδο TUNEL για τον έλεγχο της κατάτμησης του DNA, παρουσίασαν TUNEL (+) σκορ σε διαφορετικό βαθμό, ενώ στην περίπτωση της ομάδας ελέγχου τα σκορ ήταν πολύ χαμηλά. Η YOKΠ στους 18° C και στους 10° C είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένα TUNEL (+) σκορ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές. Στην ομάδα YOKΠ στους 18° C παρατηρήθηκε ότι συνολικά αυξημένη TUNEL (+) αντίδραση υπήρχε στον νεοφλοιό και τον υπόκαμπο σε σύγκριση με τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα και τον θάλαμο ($p \leq 0.05$; ANOVA και Fischer PLSD), ενώ στους 10° C δεν παρουσίασαν, μεταξύ τους, στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατά περιοχές νευρωνική ευαισθησία. Αντίθετα, αρκετά ενδιαφέροντα ήταν τα ευρήματά μας, όσο αφορά την σύγκριση των δύο ομάδων YOKΠ μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, όπως αποδείχτηκε με την χρήση του t-test, ο νεοφλοιός, κινητικός και αισθητικός, και ο υπόκαμπος παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα TUNEL (+) σκορ στην ομάδα της πολύ βαθειάς YOKΠ στους 10° C σε σύγκριση με την βαθειά YOKΠ στους 18° C ($p \leq 0.006$, $p \leq 0.0001$ και $p \leq 0.006$, αντίστοιχα).

Φαίνεται λοιπόν, ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια παρατεταμένης υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης είναι περισσότερο νευροπροστατευτική γιατί διαπιστώθηκαν λιγότερες ενδείξεις απόπτωσης στις ευπρόσβλητες περιοχές του εγκεφάλου. Αυτή η ευεργετική επίδραση της βαθειάς υποθερμίας παρατηρείται σε αυτό το οξύ πειραματικό μοντέλο, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού γίνεται από το αρχικό κτύπημα στάδιο και προλαμβάνεται από την περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας.



ABSTRACT

The Effect of Truly Profound Hypothermia on Cerebral Protection: an histopathologic study of Hypothermic Circulatory Arrest in an Acute Porcine Model

Although profound hypothermic circulatory arrest (HCA) is a well-established method for use in surgery for a variety of cardiovascular abnormalities and mainly aortic arch surgery, brain damage as a consequence of HCA remains a frequent if often subtle complication. The optimal conditions for maximizing cerebral protection during HCA are not well established. There is still controversy about basic aspects of implementing HCA such as the best temperature at which to arrest circulation. Experimental studies have demonstrated that prolonged HCA can lead to neuronal cell injury or death, probably as a consequence of a number of different pathways triggered by ischemia. Several studies have shown that either focal or global cerebral ischemia can lead to neuronal injury by apoptosis, as well as by necrosis. The original purpose of this study is to compare the results using truly profound hypothermia with those obtained with profound hypothermic conditions and to assess whether cooling to 10°C can reduce neurological injury during 75 minutes of HCA in an acute porcine model compared to less profoundly cooled (18°C) animals.

Sixteen pigs were divided into three groups. Group A ($n=6$) received hypothermic circulatory arrest at 18°C for 75 min, Group B ($n=6$) hypothermic circulatory arrest at 10°C for 75 min and Group C ($n=4$) served as normal controls. After gradual rewarming and 80 minutes of reperfusion, treatment animals were sacrificed and brains were perfusion-fixed and cryopreserved. Brain regions evaluated included the precentral gyrus (motor neocortex), the postcentral gyrus (sensory neocortex), hippocampus, cerebellum, thalamus and anterior ventral medulla. Regional patterns of neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest was characterized by in situ DNA fragmentation using TUNEL histochemistry. Hematoxylin and eosin histology was used to characterize cell damage morphologically. TUNEL-positive cells were scored on a scale of 0 to 5. Grade 0: no TUNEL-positive cells; Grade 1: <10%; Grade 2: 10-25%, Grade 3: 25-50%, Grade 4: 50-75%; and Grade 5: >75%.



None of the treatment animals undergoing HCA or controls in this acute protocol demonstrated histologic evidence of neuronal injury in any of the brain regions assessed using hematoxylin and eosin staining. Hypothermic circulatory arrest for 75 minutes at 18°C resulted in significantly higher TUNEL positive scores compared to normal controls in all brain regions examined. Significantly higher concentration of TUNEL (+) cells were observed in the sensory cortex, motor cortex and hippocampus, compared to the cerebellum, thalamus and medulla ($p \leq 0.05$; ANOVA followed by Fischer PLSD). HCA for 75 minutes at 10°C also resulted in significantly higher TUNEL (+) scores compared to normal controls in all brain regions assessed, although scores were generally lower than those observed at 18°C HCA. In contrast with our findings at 18°C, animals treated with 75 min of HCA at 10°C showed no differences in tissue specific vulnerabilities among the neural regions assessed. The mean number of TUNEL (+) cells in serial sections from the sensory cortex, motor cortex and hippocampus showed a significant reduction when cooled to 10°C as compared to 18°C (t-test $p \leq 0.0001$, $p \leq 0.006$, and $p \leq 0.006$, respectively)

This data support that cerebral protection may be better at very cold temperatures compared to 18°C hypothermia. Regions selectively vulnerable to neuronal injury, as the neocortex and hippocampus, are offered more neural protection by profound hypothermia. These affects are observed in the acute state, suggesting activation of the apoptotic mechanisms at early stages can be inhibited by profound hypothermia.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Σπανός Π, Μπουγιούκας Γ, Ασημακόπουλος Π, Αναγνωστόπουλος Κ, Παναγόπουλος Φ, Σπύρου Π. Στοιχεία Καρδιοχειρουργικής. University Studio Press 1^η έκδοση 1999; Κεφάλαιο 4: Η εξωσωματική Κυκλοφορία

Almeida OFX, Conde GL, Crochemore C, et al. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. FASEB journal 14:779-790, 2000

Amir G, Ramamoorthy C, Riemer K, Reddy M, Hanley F. Neonatal brain protection and deep hypothermic circulatory arrest: pathophysiology of ischemic neuronal injury and protective strategies. Ann Thorac Surg 2005;80:1955-64

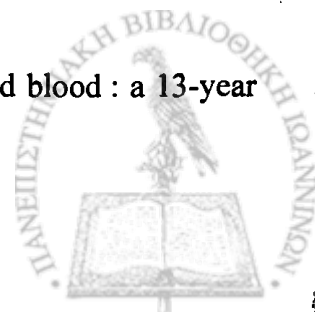
Ananiadou GO, Bibou K, Drossos EG, Charchanti Antonia, Bai M, Saleem Haj-Yahia, Anagnostopoulos EC, Johnson OE. Effect of profound hypothermia during circulatory arrest in neurologic injury and apoptotic repressor protein Bcl-2 expression in an acute porcine model. J Thorac Cardiovasc Surg 2007;133:919-26

Ananiadou GO, Drossos EG, Bibou NK, Palatianos MG, Johnson OE. Acute regional neuronal injury following hypothermic circulatory arrest in a porcine model. Interact CardioVasc Thorac Surg 2005;4:597-601

Aoki M, Jonas RA, Nomura F, et al. Effects of aprotinin on acute recovery of cerebral metabolism in piglets after hypothermic circulatory arrest. Ann Thorac Surg 1994;58: 146-53

Ashraf QM, Zubrow AB, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Nitration of Bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortex of newborn piglets and the effect of nitric oxide synthase inhibition Biol Neonate 81:65-72, 2002

Bachet J, Guilmet D, Goudot B. Antegrade cerebral perfusion with cold blood : a 13-year experience. Ann Thorac Surg 1999;67:1874



Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis NJ, et al. Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 2001;14:1105-13

Banasiak KJ, Ying Xiab, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000;62:215-249

Baumgartner WA, Walinsky PL, salazar JD. Assessing the impact of cerebral injury after cardiac surgery: will determining the mechanism reduce this injury? *Aann Thorac Surg* 1999; 67:1871-4

Bavaria JE, Pochettino A: Retrograde cerebral perfusion (RCP) in aortic arch surgery: efficacy and possible mechanisms of brain protection. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 9:222

Bellinger CD, Wypij D, DuPlessis JA, Rappaport AL, Jonas AR, Wernovsky G, Newburger WJ. Neurodevelopmental status at eight years in children with dextro-transposition of the great arteries: The Boston Circulatory Arrest Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1385-96

Bellinger CD, Wypij D, Kuban K, Rappaport AL, Hickey RP, Wernovsky G, Jonas AR, Newburger WJ. Developmental and neurological status of children at four years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1999;100:526-32

Boeckxstaens CJ, Flameng WJ: Retrograde cerebral perfusion does not perfuse the brain in nonhuman primates. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:319

Bokesch PM, Marchand J, Seirafi PA, et al. Immediate early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and ypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology* 85: 1439-46, 1996



Bottiger BW, Schmitz B, Wiessner C, Vogel P, Hossman KA. Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats. *J Cereb Blood Flow* 1998;18:1077-87

Brock MV, Blue ME, Lowenstein CJ. Induction of neuronal nitric oxide following hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1313-20

Brown R. The Bcl-2 family of proteins. *British Medical Bulletin* 1996;53:466-77

Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16:395-419, 1998.

Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell death machine. *Curr Biol* 6:555-562, 1996

Chinnaiyan, AM O'Rourke K, Lane Br, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 with CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*. 275:1122-1126, 1997

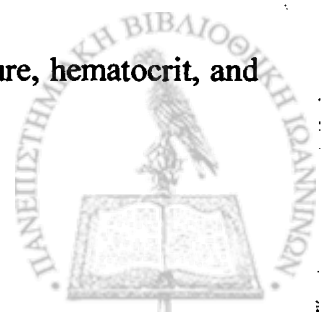
Chugani HT. Metabolic imaging: a window at brain development and plasticity. *Neuroscientist* 1999;5:29-40

Combs DJ, Dempsey RJ, Maley M, Donaldson D, Smith C. Relationship between blood glucose, brain lactate and intracellular pH during cerebral ischemia in gebrils. *Stroke* 1990;21:936-42

Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11:105-119, 1992

Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998;18:5663-72

Cook DJ, Oliver WC, Orszulak TA. Cardiopulmonary bypass temperature, hematocrit, and cerebral oxygen delivery in humans. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1671-7



Coselli JS, LeMaire SA: Experience with retrograde cerebral perfusion during proximal aortic surgery in 290 patients. *J Card Surg* 1997; 12 S2:322

Eizenberg O, Faber-Elman A, Gottlieb E, et al. p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol* 16: 5178-5185, 1996

Ellis RE, Jacobson D, Horvitz M. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129:79-94, 1991

Elrich MP, McCullough JN, Zhang N, Weisz DJ, Juvonen T, Bodian C, Griep RB. Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig. *Ann Thorac Surg* 2002;73:191-7

Ergin AM, Griep BE, Lansmann LS, Galla DJ, Levy M, Griep BR. Hypothermic circulatory arrest and other methods of cerebral protection during operations on the thoracic aorta. *J Card Surg* 1994; 9:525-7

Ergin AM, Lansmann LS, Galla DJ, Levy M, Griep BR. Hypothermic circulatory arrest in operations on the thoracic aorta. Determinations of operative mortality and neurologic outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:788-89

Ergin AM, Uysal S, Reich LD, Apaydin A, Lansman LS, McCullough NJ, Griep BR. Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1887-90

Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-22

de Ferranti S, Gauvreau K, Hickey PR, et al. Intraoperative hyperglycemia during infant cardiac surgery is not associated with adverse neurodevelopmental outcomes at 1, 4, and 8 years. *Anesthesiology* 2004;100:1345-52



Fox LS, Blackstone EH, Kirklin JW, Stewart RW, Samuelson PN. Relationship of whole-body oxygen consumption to perfusion flow rate during hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;83:239-48.

Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel AB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501

Gaynor JW, Nicolson CS, Jarvik PG, Wernovsky G, Montenegro ML, Hartman DM, Louie A, Spray LT, Clancy RR. Increasing duration of deep hypothermic circulatory arrest is associated with an increased incidence of postoperative electroencephalographic seizures. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1278-86

Goldstein P. Controlling cell death. *Science* 275: 1081-1082,1997

Hagl C, Ergin AM, Galla DJ, Lansman LS, McCullough NJ, Spielvogel D, Sfeir P, Bodian C, Griep RB. Neurologic outcome after ascending aorta-aortic arch operations: effect of brain protection technique in high-risk patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:1107-21

Hagl C, Tatton NA, Khaladj N, Zhang N, Nandor S, Insolia S, Weisz DJ, Spielvogel D, Griep RB. Involvement of apoptosis in neurological injury after hypothermic circulatory arrest: a new target for therapeutic interventions? *Ann Thorac Surg* 2001;72:1457-64

Hagl C, Tatton NA, Weisz DJ, Zhang N, Spielvogel D, Shiang HH, Bodian CA, Griep RB. Cyclosporine A as a potential neuroprotective agent: a study of prolonged hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:756-64

Hall R, Murdoch J. Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part II: The pharmacology of brain protection. *Can J Anesth* 1990;37:762-77

Hara A, Hirose Y, Wang A, et al. Localization of Bax and Bcl-2 proteins, regulators of programmed cell death, in the human central nervous system. *Virchows Arch* 429:249-253, 1996



Harrington DK, Fragomeni F, Bonser RS. Cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg* 2007;83:S799-804

Hickey RP. Neurologic sequelae associated with deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:S65-70

Hockenbery DM, Oltvai Zn, Yin Xm, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251, 1993

Jian Ye, Luoia Yang, Del Bigio MR, Filgueiras CL, Ede M, Summers R, Salerno TA, Deslauriers R. Neuronal damage after hypothermic circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion in the pig. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1316-22

Jian Ye, Yang L, Del Bigio MR. Retrograde cerebral perfusion provides limited distribution of blood to the brain: a study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:660

Jonas RA, Bellinger DC, Rappaport LA. Relation of pH strategy and developmental outcome after hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:362

Johnston MV, Trescher WH, Ishida Akira, Wako Nakajima. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;49:735-741

Juvonen T, Zhang N, Wolfe D. Retrograde cerebral perfusion enhances cerebral protection during prolonged hypothermic circulatory arrest: a study in a chronic porcine model. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:38

Kam PC, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000;55:1081-1093

Kazui T, Washiyama N, Muhammad AB. Total arch replacement using aortic branched grafts with the aid of antegrade selective cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg* 2000;70:3

Kazui T, Washiyama N, Muhammad AB, Terada H, Yamashita K, Takinami M. Improved results of atherosclerotic arch aneurysms with a refined technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:491-9



Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics *Br J Cancer* 26:239-257, 1972

Kirklin JW, Barratt-Boyes BG. Cardiac Surgery. Churchill Livingstone 3rd ed 2003; Vol 1 Chapter 2: Hypothermia, circulatory arrest, and cardiopulmonary bypass.

Kitada S, Krajewski S, Miyashita T, Krajewski M, Reed JC. Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene* 12:187-192, 1996.

Kitamura M, Hashimoto A, Aomi S, et al: Medium-term results after surgery for aortic arch aneurysm with hypothermic cerebral perfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995; 9:697

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, et al. Investigations of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial protein membrans. *Cancer Res* 53:4701-4714, 1993

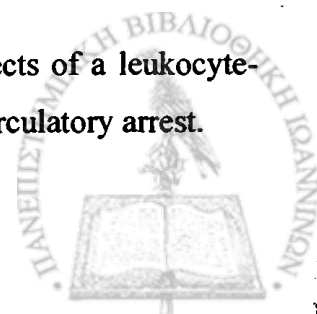
Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368-372, 1996

Kurth CD, Priestly M, Golden J, McCann J, Raghupathi R. Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1068-1077

Kurth CD, Priestly M, Watzman HM, McCann J, Golden J. Desflurane confers neurologic protection for deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *Anesthesiology* 2001;95:959-64

Langley SM, Chai PJ, Jagers JJ, Ungerleider RM. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:279-86

Langley SM, Chai PJ, Tsui SS, Jagers JJ, Ungerleider RM. The effects of a leukocyte-depleting filter on cerebral and renal recovery after deep hypothermic circulatory arrest.



J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:1262-9

Laptook AR, Corbett R, Sterett R, Burns DK, Tollefsbol G, Garcia D. Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatr Res* 1994;35:436-42

de Leon SY, Roughneen PTT, King N, Lehne R, De Leon AM, Walenga J, Pifarré R. Experimental evidence of cerebral injury from profound hypothermia during cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol* 1998;19:398-403

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999;79:1431-1568

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-22, 1994

Lo AC, Houenou LJ, Oppenheim RW. Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch Histol Cytol* 1995; 58:139-49

Luhmann HJ. Ischemia and lesion-induced imbalances in cortical function. *Prog Neurobiol* 1996;48(2):131-66

Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:1886-94

Maier AC, Phu PT, Huang AJ, Firestone GL. Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/Glucocorticoid-inducible protein kinase gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. *Mol Endocrinol* 11:312-329, 1997

Maier CM, Ahern K, Cheng ML, et al. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis and inflammation. *Stroke* 29:2171-80, 1998



Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. *Int J Mol Med* 7(5):455-78,2001

Miller TM, Johnson EM. Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16:7487-7495

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-1805, 1994

Miyashita T, Reed JC. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-9, 1995

Mullner M, Sterz F, Binder M, Schreiber W, Deimel A, Laggner A. Blood glucose concentration after cardiopulmonary resuscitation influences functional neurological recovery in human cardiac arrest survivors. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:430-36

Murdoch J, Hall R. Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. *Can J Anaesth* 1990;37:663-71

McCullough JN, Zhang N, Reich DL, Juvonen T, Klein J, Spielvogel D, Ergin AM, Griep RB. Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1895-99

Mehmet H, Yue X, Pnerice J, et al. Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Cell Death Differ* 1998; 5:321-9

Merry De, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat. Genet* 1997;16:358-363



Midulla PS, Gandsas A, Sadeghi AM, et al: Comparison of retrograde cerebral perfusion to antegrade cerebral perfusion and hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. J Card Surg 1994; 9:560

Mills N, Oschner J. Massive air embolism during cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 1980;80:708-17

Murkin JM, Martzke JM, Buchan AM. A randomized study of the influence of perfusion technique and pH management strategy in 316 patients undergoing coronary artery bypass surgery. II: Neurologic and cognitive outcomes. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110: 349

Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 88:355-365, 1997

Newburger WJ, Jonas AR, Wernovsky G, Wypij D, Hickey RP, Hanley LF, Mayer EJ, Castaneda RA, Ware HJ. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic arrest versus low flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. N Engl J Med 1993;329:1057-64

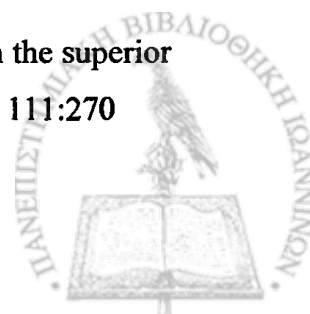
Oates RK, Simpson JM, Turnbull JAB, Cartmill TB. The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:786-92

Okita Y, Minatoya K, Tagusari O, et al: Prospective comparative study of brain protection in total aortic arch replacement: deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion or selective antegrade cerebral perfusion. Ann Thorac Surg 2001; 72:72

Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. Cell 79: 189-192, 1994.

Oo TF, Henchcliffe C, James D, Burke RE. Expression of c-fos, c-jun, and c-jun N-terminal kinase (JNK) in a developmental model of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra. J Neurochem 72:557-564, 1999

Pagano D, Boivin CM, Faroqui MH, Bonser RS: Retrograde perfusion through the superior vena cava perfuses the brain in human beings. J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 111:270



Prives C, Hall P. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187:112-126

Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 2004;14:215-222

Ramsi P, Heikkinen J, Biancari F, Pokela M, Rimpilainen J, Vainiopaa V, Hirvonen J, Jantti V, Kiviluoma K, Anttila V, Juvenen T. Prolonged mild hypothermia after experimental hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:724-34

Rand M.S. Selection of animal models (Lecture, Fall 2004, Department of Biotechnology Support Service, University of Arizona)

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387::773-776, 1997

Reed JC. Mechanism of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 97:72-100, 1996.

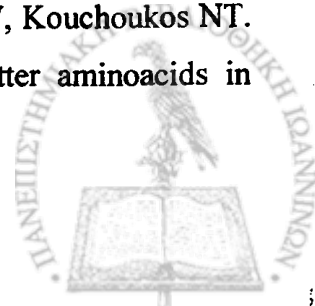
Reich LD, Uysal S, Ergin MA, et al: Retrograde cerebral perfusion during thoracic aortic surgery and late neuropsychological dysfunction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19:594

Reich LD, Uysal S, Sliwinski M, Ergin MA, Kahn AR, Konstadt NS, McCullough J, Hibbard RM, Gordon AW, Griep BR. Neuropsychologic outcome after deep hypothermic arrest in adults. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:156-63

Repici M, Mariani J, Borsillo T. Neuronal death and neuroprotection. A review. *Methods in Molecular Biology* 2007;399:1-14

Rimpilainen J, Pokela M, Kiviluoma K, et al. Leukocyte filtration improves brain protection after a prolonged period of hypothermic circulatory arrest: a study in chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1131– 41

Rokkas CK, Cronin CS, Nitta T, Helfrich LR, Jr., Lobner DC, Choi DW, Kouchoukos NT. Profound systemic hypothermia inhibits the release of neurotransmitter aminoacids in spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:27-35



Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-11

Safi HJ, Letsou GV, Iliopoulos DC, et al: Impact of retrograde cerebral perfusion on ascending aortic and arch aneurysm repair. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:1601

Sakamoto T, Hatsuoka S, Stock AU, Duebener FL, Lidov WH, Holmes LG, Sperling SJ, Munakata M, Laussen CP, Jonas AR. Prediction of safe duration of hypothermic circulatory arrest by near-infrared spectroscopy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:339-50

Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000;74 :1-20

Savitz SI, Daniel BA, Rosenbaum MD. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery* 42:555-72, 1998

Shake JG, Peck EA, Marban E, et al. Pharmacologically induced preconditioning with diazoxide: a novel approach to brain protection. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1849 –54

Sheng M, Green berg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system *Neuron* 4:477-85, 1990

Shum-Tim D, Tchervenkov CI, Laliberte E, et al. Timing of steroid treatment is important for cerebral protection during cardiopulmonary bypass and circulatory arrest: minimal protection of pump prime methylprednisolone. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:125–32

Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GC, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JJ. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363:166-9, 1993

Strauch JT, Spielvogel D, Haldenwang LP, Zhang N, Weisz D, Bodian C, Griep BR. Axillary artery cannulation: routine use in ascending aorta and aortic arch replacement. *Ann Thorac Surg* 2004;78:103-8



Strauch JT, Spielvogel D, Haldenwang LP, Lauten A, Zhang N, Weisz D, Bodian C, Griep BR. Cerebral physiology and outcome after hypothermic circulatory arrest followed by selective cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1972-81

Strauch JT, Spielvogel D, Haldenwang LP, Zhang Ning, Weisz D, Bodian C, Tatton NA, Griep BR. Cooling to 10°C and treatment with cyclosporine A improve cerebral recovery following prolonged hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:74-80

Swindle M.M. Comparative Anatomy of the Pig (Lecture, Fall 2002, Department of Comparative Medicine, University of South Carolina)

Swindle M.M. Surgery, Anesthesia and experimental techniques in swine. Ames IA: Iowa State University Press, 1998

Swindle M.M., Smith A.C., Hepburn B.J.S Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1988; 1: 65-79

Taşdemir O, Saritaş A, Kücük Ş, Ali Özatik M, Şener E. Aortic arch repair with right brachial artery perfusion. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1837-42

Tatton NA, Hagl C, Nandor S, Insolia S, Spielvogel D, Griep RB. Apoptotic cell death in the hippocampus due to prolonged hypothermic circulatory arrest: comparison of cyclosporine A and cycloheximide on neuron survival. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:746-55

Taylor MK. Brain damage during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998;65: S20-6

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6



Tseng EE., Brock MV, Lange SM, Blue EM, Troncoso CJ, Kwon CC, Lowenstein JC, Johnston VM, Baumgartner AW. Neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1639-47

Tsui SS, Kirshbom PM, Davies MJ, et al. Thromboxane A₂-receptor blockade improves cerebral protection for deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;12:228–35

Wang Zh, Ding MX, Chew-Cheng SB, et al, Bcl-2 and Bax proteins are nuclear matrix associated proteins. *Anticancer Res* 19:5445-5449, 1999.

Wong C, Bonser R. Retrograde cerebral perfusion: clinical and experimental aspects. *Perfusion* 1999;14:247-56

Wypij D, Newburger WJ, Rappaport AL, DuPlessis JA, Wernovsky G, Ming Lin, Bellinger CD. The effect of duration of deep hypothermic arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: The Boston Circulatory Arrest Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1397-403

Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2 release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-32, 1997

Yuan J, Shaham S., Ledoyx S, et al The C elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mamalian interleukin 1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652, 1993



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Σελ. 9 Ε/Κ Εξωσωματική Κυκλοφορία
- Σελ. 9 ΥΟΚΠ Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση
- Σελ. 13 CBF Cerebral Blood Flow
- Σελ. 13 CMRO₂ Cerebral Metabolic Rate of Oxygen
- Σελ. 14 PaO₂ arterial PO₂
- Σελ. 14 PaCO₂ arterial PCO₂
- Σελ. 19 PCr Phosphocreatinine
- Σελ. 19 ATP Triphosphate Adenosine
- Σελ. 19 ADP Diphosphate Adenosine
- Σελ. 20 NO Nitric Oxide
- Σελ. 20 nNOS neuronal Nitric Oxide Synthetase
- Σελ. 21 IL 1-β Interleukine
- Σελ. 21 TNFα Tumor Necrosis Factor
- Σελ. 23 CDK Cyclin Dependent Kinase
- Σελ. 29 ICE Interleukin Converting Enzyme
- Σελ. 32 TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling
- Σελ. 34 RCP Retrograde cerebral perfusion
- Σελ. 34 SACP Selective Antegrade Cerebral Perfusion
- Σελ. 47 SD standard deviation
- Σελ. 47 SE standard error
- Σελ. 47 ANOVA Analysis of Variance
- Σελ. 47 PLSD Protected Least Significance Difference



ΠΙΝΑΚΕΣ

Σελ. 16 **Πίνακας 1.** Υπολογιζόμενη ασφαλής διάρκεια ολικής κυκλοφορικής παύσης

Σελ. 49 **Πίνακας 2.** Μέσες τιμές βάρους και ηλικίας των πειραματόζώων ανά ομάδα

Σελ. 50 **Πίνακας 3.** Φυσιολογικές Παράμετροι

Σελ. 51 **Πίνακας 4.** Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στις ομάδες ΥΟΚΠ στους 18°C και στην ομάδα ελέγχου

Σελ. 55 **Πίνακας 5.** Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στις ομάδες ΥΟΚΠ στους 10°C και στην ομάδα ελέγχου

Σελ. 56 **Πίνακας 6.** Αποτελέσματα TUNEL στις εγκεφαλικές περιοχές στις ομάδες ΥΟΚΠ στους 18°C και 10°C



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Σελ. 53 *Διάγραμμα 1. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 18° C και ελέγχου*

Σελ. 54 *Διάγραμμα 2. Περιοχική κατανομή του νευρωνικού θανάτου στην ομάδα YOKΠ στους 18° C*

Σελ. 55 *Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 10° C και ελέγχου*

Σελ. 57 *Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα TUNEL μεταξύ των ομάδων YOKΠ 18° C και 10° C*



ΕΙΚΟΝΕΣ

Σελ. 10 *Εικόνα 1. Η εξωσωματική μηχανή και το κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας*

Σελ. 11 *Εικόνα 2. Καρδιοπνευμονική παράκαμψη*

Σελ. 20 *Εικόνα 3. Παθογένεια της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης*

Σελ. 41 *Εικόνα 4. Διασωλήνωση και προεγχειρητική προετοιμασία*

Σελ. 42 *Εικόνα 5. Δεξιά θωρακοτομή και καννουλάρισμα αορτής και δεξιού κόλπου*

Σελ. 44 *Εικόνα 6. Τα δύο ημισφαίρια του χοίρειου εγκεφάλου*

Σελ. 44 *Εικόνα 7. Υπό μελέτη ανατομικές περιοχές*

Σελ. 52 *Εικόνα 8. Φωτομικρογραφία TUNEL στην περιοχή του προμήκη*

Σελ. 58 *Εικόνα 9. Φωτομικρογραφίες TUNEL σε κινητικό φλοιό και ιππόκαμπο στις τρεις ομάδες*



