



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ –
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΟΞΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΙΔΗΣ ΧΑΡΙΛΑΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Ειδικευμένος Ιατρός Χειρουργικής Θώρακος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ –
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΟΞΥ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΕ ΧΟΙΡΟΥΣ**

ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΙΔΗΣ ΧΑΡΙΛΑΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Ειδικευμένος Ιατρός Χειρουργικής Θώρακος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

**Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
Ν. 5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)**

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κουτσογιαννίδη Χαρίλαου -Παναγιώτη: 29-2-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 653^α/3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Δαλαβάρκα Παναγιώτα –Άνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –
Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Τζόνσον Ελίζαμπεθ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας του
Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χαρχαντή Αντωνία Λέκτορας Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας με έμφαση στην
Ηλεκτρονική Μικροσκοπία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-2-2009

«Επίδραση της ερυθρομυκίνης στην εγκεφαλική προστασία: Μελέτη σε οξύ πειραματικό
μοντέλο σε χοίρους»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 773^α/16-12-2014

Επιβλέπουσα

Χαρχαντή Αντωνία Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας με έμφαση
στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Δαλαβάρκα Παναγιώτα –Άνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –
Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζόνσον Ελίζαμπεθ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας του
Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 775^α/17-3-2015

Αποστολάκης Ευστράτιος	Καθηγητής Καρδιοχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία – Εμβρυολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντή Μαρία	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δαλαβάρκα Παναγιώτα-Άνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζόνσον Ελίζαμπεθ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Χαρχαντή Αντωνία

Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας – Ιστολογίας- Εμβρυολογίας με
έμφαση στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία του Τμήματος Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνω

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 8-5-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



Μ. Καπτοπούλου
ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής ήταν ένα ταξίδι γνώσεων, εμπειριών, σκληρής εργασίας και πολύτιμης συνεργασίας με σπουδαίους ανθρώπους. Η ολοκλήρωσή της αποτέλεσε ένα σημαντικό στόχο, όχι μόνο γιατί ήταν αποτέλεσμα συνεχούς δουλειάς, αλλά και γιατί στον σχεδιασμό και τη διεκπεραίωσή της έλαβαν μέρος εξαιρετοι επιστήμονες. Ο διευθυντής μου στην Καρδιοχειρουργική, αλλά και δάσκαλός μου, *κος Γεώργιος Δρόσος*, ήταν ο άνθρωπος που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω μια φιλόδοξη ιδέα πειραματικής μελέτης, με θέμα την εγκεφαλική προστασία κατά τη διάρκεια υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης σε χοίρειο μοντέλο. Η συμβολή του στην εκπαίδευσή μου και την ανάπτυξη των χειρουργικών δεξιοτήτων μου ήταν περισσότερο από σημαντική για την πραγματοποίηση των πειραματικών μοντέλων. Η επιμονή του για την ολοκλήρωση αυτού του δύσκολου έργου αλλά και η παρέμβασή του σε σημαντικά θέματα οργάνωσης ενός νέου πειραματικού χώρου ήταν αποφασιστικές. Τον άψογο σχεδιασμό του πειράματος τον οφείλω στις Καθηγήτριες Ανατομίας, *κα Elisabeth Johnson* και την *κα Αντωνία Χαρχαντή*, επιβλέπουσα της διαδακτορικής διατριβής. Η επίβλεψή τους σε κάθε βήμα του πειράματος ήταν άκρως σημαντική. Η βοήθειά τους από την έναρξη μέχρι την ολοκλήρωση της πειραματικής μελέτης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ήταν απαραίτητη και αξιοσημείωτη. Στη βοήθεια, τη σωστή καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη τους στο πρόσωπο μου οφείλεται η επιστημονική μου εξέλιξη. Ο θεμελιώδης τρόπος σκέψης τους με καθοδήγησε σωστά για να πραγματοποιήσω μια αξιόλογη επιστημονική έρευνα, η οποία αποκόμισε πολλές διακρίσεις στον ελληνικό και διεθνή χώρο. Τους ευχαριστώ για τη βοήθειά τους, την εμπιστοσύνη τους και την άψογη συνεργασία μας. Επίσης, ευχαριστώ πολύ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας *κα Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα* για την στήριξή της σε αυτό το δύσκολο έργο και τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ευχαριστώ όλους τους φίλους και συνεργάτες μου για τη διάθεση και το ζήλο που επέδειξαν για να πραγματοποιηθούν σωστά όλα τα πειράματα. Ευχαριστώ την *κ. Όλγα Ανανιάδου* και την *κ. Φωτεινή Αμπατζίδου* για την εργατικότητα, συνέπεια και αποτελεσματικότητά τους. Ευχαριστώ τον χειριστή της μηχανής της εξωσωματικής κυκλοφορίας, *κ. Αθανάσιο Μάλαμα* για την ανεκτίμητη βοήθεια και την άρτια τεχνική υποστήριξη. Ευχαριστώ τον *κ. Ελευθέριο Χαλβατζούλη* και τον *κ. Κωνσταντίνο*

Διπλάρη για τη συμβολή τους στη διεκπεραίωση του χειρουργικού μέρους του πειράματος. Ευχαριστώ, επίσης, για την συνεργασία τους τον κ. Ιωάννη Σάββα και την κ. Αναστασία Παπαστεφάνου για την άρτια αναισθησιολογική κάλυψη των πειραμάτων. Ευχαριστώ, επίσης, θερμά όλους τους συνεργάτες μας από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά τους και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή, ανοχή και τις θυσίες της οικογένειάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1. Η Φυσιολογία του Εγκεφάλου	5
2. Εξωσωματική Κυκλοφορία και Εγκέφαλος.....	6
3. Η Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση στην Καρδιοχειρουργική	11
4. Η Εγκεφαλική Ροή κατά την Εξωσωματική Κυκλοφορία και την Υποθερμία	13
5. Η Επίδραση της Υποθερμίας και της Ολικής Κυκλοφορικής Παύσης στον Εγκεφαλικό Μεταβολισμό	15
6. Νευρολογικές Επιπλοκές μετά από Ολική Κυκλοφορική Παύση.....	18
7. Λειτουργική Νευροανατομία της Ισχαιμικής Εγκεφαλικής Βλάβης μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση	23
8. Μέθοδοι Εγκεφαλικής Προστασίας στην Καρδιοχειρουργική.....	39
9. Η Ερυθρομυκίνη ως Νευροπροστατευτικός Παράγοντας	50
10. Η Χρήση των Πειραματικών Μοντέλων στην Βιοϊατρική Έρευνα	53
11. Σκοπός.....	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	58
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
1. Διαχωρισμός των Ομάδων	58
2. Προεγχειρητική Προετοιμασία και Αναισθησιολογικό Πρωτόκολλο.....	59
3. Χειρουργικό Πρωτόκολλο στις Ομάδες Ery και Veh.....	60
4. Εγκεφαλική διήθηση και μονιμοποίηση	62
5. Πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων και χρόνου αιμοληψιών	63
6. Ιστοπαθολογική Προετοιμασία.....	66
7. Ιστολογική Εκτίμηση - Σύστημα Ταξινόμησης Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E)	67
8. Ιστολογική Εκτίμηση - Σύστημα Ταξινόμησης Μέθοδος TUNEL για την κατάτμηση του DNA	67
9. Στατιστική Επεξεργασία	69
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
1. Φυσιολογικές και μεταβολικές παράμετροι.....	70

2. Ιστολογική αξιολόγηση με τη χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης - Neuronal Injury Score.....	71
3. Χρώση TUNEL για την κατάτμηση του DNA: TUNEL (+) Score.....	73
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
1. Γενικά Σχόλια	76
2. Νευρωνική Βλάβη μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση	77
3. Επιλογή Πειραματικού Μοντέλου	79
4. Διαφορές της Νευρωνικής Βλάβης λόγω ΥΟΚΠ μετά τη χορήγηση Ερυθρομυκίνης....	81
5. Διαφορά Λοιπών Αποτελεσμάτων μεταξύ των ομάδων Ery και Veh	82
6. Περιορισμοί της Μελέτης.....	83
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	85
ΤΙΜΗΤΙΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ, ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ	88
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	90
ABSTRACT.....	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	94
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	125
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	127
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	128
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	129

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η Φυσιολογία του Εγκεφάλου

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) δέχεται περίπου το 15% της καρδιακής παροχής και καταναλώνει το 20% του οξυγόνου που χρειάζεται όλος ο οργανισμός. Η κατανάλωση του οξυγόνου έχει υπολογιστεί σε 3.5ml/100gr εγκεφαλικού ιστού/min, συνιστώντας ένα υψηλό μεταβολικό ρυθμό. Το 40% της καταναλωμένης ενέργειας χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, ενώ το υπόλοιπο 60% για τη μεταφορά των νευρικών ώσεων. Ως εκ τούτου, η εγκεφαλική ροή αίματος είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διατήρηση της εγκεφαλικής φυσιολογίας. (Cottrel et al 2001, Michenfelder et al 1973) Η διαδικασία της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης επιτρέπει τη σταθεροποίηση της εγκεφαλικής ροής με ρυθμό περίπου 45-60ml/100gr εγκεφαλικού ιστού/min. Η αυτορρύθμιση διατηρείται όταν η μέση πίεση άρδευσης του εγκεφάλου κυμαίνεται από 50 έως 150 mmHg, ενώ επέρχεται η απώλειά της όταν η πίεση βρίσκεται εκτός αυτού του πλαισίου τιμών. Η μεταβολική ζήτηση του εγκεφάλου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας της εγκεφαλικής αιματικής ροής. Καθώς ο εγκέφαλος δεν διαθέτει αποθηκευτική ικανότητα για το οξυγόνο, ο ρυθμός εγκεφαλικού μεταβολισμού του οξυγόνου (cerebral metabolic rate of oxygen - CMRO₂) είναι ένας αληθινός δείκτης εγκεφαλικής μεταβολικής δραστηριότητας και δίνει χρήσιμες πληροφορίες για τη μεταβολική κατάσταση του εγκεφάλου. Στη νορμοθερμία το 50% του καταναλισκόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας (“basal”, βασικό CMRO₂) και το άλλο 50% για τη διατήρηση της ηλεκτρικής δραστηριότητας (“functional”, λειτουργικό CMRO₂). (Nemoto et al 1996) Για κάθε 1° C μείωσης της θερμοκρασίας σώματος, ο CMRO₂ μειώνεται κατά 7%. Η υποθερμία παρουσιάζει μεγαλύτερη επίδραση στο “βασικό” από ό,τι στο “λειτουργικό” CMRO₂. (Nemoto et al 1994) Ο συντελεστής μεταβολισμού/θερμοκρασίας Q₁₀ περιγράφει αυτή τη σχέση. Ο Q₁₀ είναι μια μεταβολική μεταβλητή που μετρά την εξαρτώμενη από την θερμοκρασία μείωση του εγκεφαλικού μεταβολισμού και ουσιαστικά αποτελεί το πηλίκο δυο τιμών CMRO₂ σε δυο θερμοκρασίες που διαφέρουν κατά 10 °C. Άρα, ο Q₁₀ είναι ο λόγος του CMRO₂ σε μια δεδομένη θερμοκρασία T, διαιρούμενος από το CMRO₂ σε θερμοκρασία 10° C μικρότερη (T-10). Ο εγκεφαλικός Q₁₀ κυμαίνεται μεταξύ 2 και 3 όταν η θερμοκρασία μειώνεται από 37 στους 27° C. Ο Q₁₀ αυξάνεται σε 4.5 σε θερμοκρασίες κάτω των

27° C. (Michenfelder et al 1991) Με τη χρήση της εξωσωματικής κυκλοφορίας, η εγκεφαλική αιματική ροή μειώνεται μέχρι 55% στους 26° C, η οποία συσχετίζεται με 56% μείωση του CMRO₂. (Govier et al 1984) Ο CMRO₂ προσεγγίζει το 24% της αρχικής του τιμής (baseline) στους 20° C και το 16% της αρχικής του τιμής στους 15° C. (McCullough et al 1999) Σε πειραματικό χοίρειο μοντέλο, η μείωση του CMRO₂ κυμαίνεται στο 50%, 19%, και 11% της αρχικής του τιμής στους 28° C, 18° C, και 8° C, αντίστοιχα. (Mezrow et al 1994) Κατά τη διάρκεια της ψύξης η πτώση του CMRO₂ είναι εκθετική και χαρακτηρίζεται από απότομη κάθοδο, η οποία ακολουθείται από μια σταθερή πορεία (πεπλατυσμένη ουρά) καθώς ο εγκεφαλικός μεταβολισμός συνεχίζεται για τη διατήρηση της κυτταρικής και της ιοντικής ακεραιότητας. Αντίθετα, η πτώση της εγκεφαλικής ροής είναι πιο γραμμική και ομαλή. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι περαιτέρω ψύξη οδηγεί σε έλλειψη σύζευξης της ροής και του μεταβολισμού και απώλεια της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης με ανάπτυξη της «πολυτελούς» ή «πλούσιας» αιμάτωσης (“luxury” perfusion). Αυτή η μη σύζευξη της εγκεφαλικής αιματικής ροής και του εγκεφαλικού μεταβολισμού συμβαίνει περίπου στους 22°C. Το “luxury” perfusion είναι δυνατό να είναι ωφέλιμο ενισχύοντας το ρυθμό και την ομοιόμορφη κατανομή της εγκεφαλικής ψύξης, αλλά πιθανώς και καταστροφικό επειδή ο εγκέφαλος εκτίθεται σε αυξημένο εμβολικό φορτίο. Τέλος, ο λόγος εγκεφαλική αιματική ροή/μεταβολισμός αυξάνεται από 20:1 στη νορμοθερμία σε 75:1 στη βαθειά υποθερμία. (Harrington et al 2007)

2. Εξωσωματική Κυκλοφορία και Εγκέφαλος

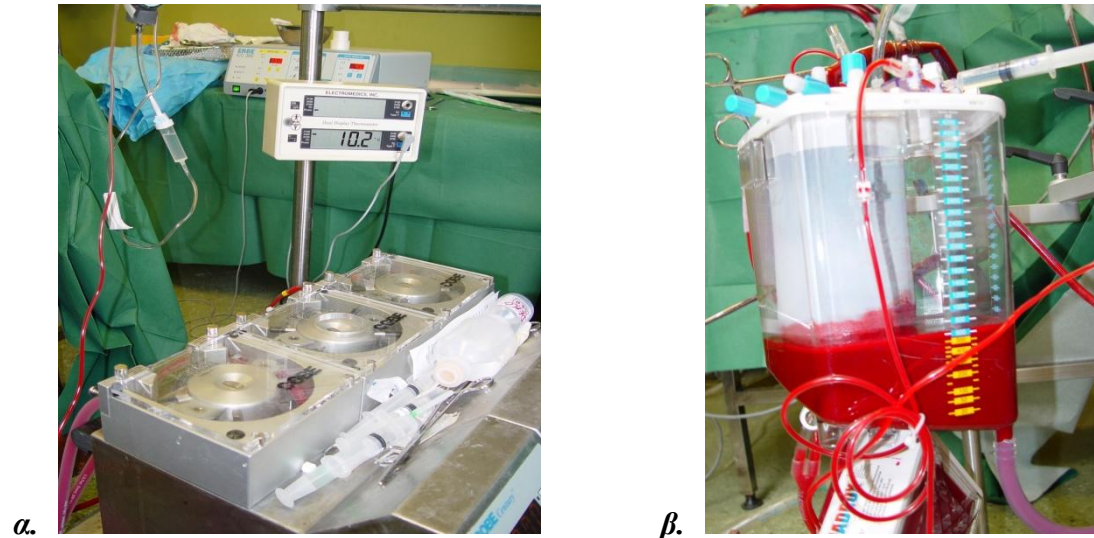
Η καθιέρωση της εξωσωματικής κυκλοφορίας (E/K) για την αντιμετώπιση των καρδιακών παθήσεων αποτέλεσε ιστορικό σταθμό για την καρδιοχειρουργική. Για πρώτη φορά το 1953 ο John Gibbons στις ΗΠΑ χρησιμοποίησε επιτυχώς μία λειτουργική μηχανή καρδιάς-πνευμόνων (την εξωσωματική μηχανή) για την σύγκλιση μεσοκοιλιακού ελλείμματος σε ασθενή. Δύο χρόνια αργότερα ο John Kirklin στη Mayo Clinic των 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, τη φλεβική δεξαμενή (venous reservoir), την αντλία αναρρόφησης του αίματος από το πεδίο και την επιστροφή του στον οξυγονωτή, την αντλία για την αποσυμπίεση της αριστερής κοιλίας και μία ειδική συσκευή (heater-cooler unit) 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 υποκλείδιο, ανώνυμο, 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 κάνουλες αντίστοιχα. Η πλήρωση του οξυγονωτή και του κυκλώματος των σωληνώσεων γίνεται συνήθως με κρυσταλλοειδή ή κολλοειδή διαλύματα. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται αιμοαραιώση στον ασθενή κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας, 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 φυσιολογίας παρακολουθούνται, συνεχώς ή περιοδικά, στους ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβάσεις με τη χρήση της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Η συνεχής παρακολούθηση αφορά το ηλεκτροκαρδιογράφημα, την καρδιακή συχνότητα, την συστηματική αρτηριακή πίεση, την κεντρική φλεβική πίεση, την πνευμονική αρτηριακή πίεση, τον καρδιακό δείκτη και παροχή, την αρτηριακή παροχή της εξωσωματικής μηχανής, τη θερμοκρασία του σώματος (ουροδόχου κύστεως 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

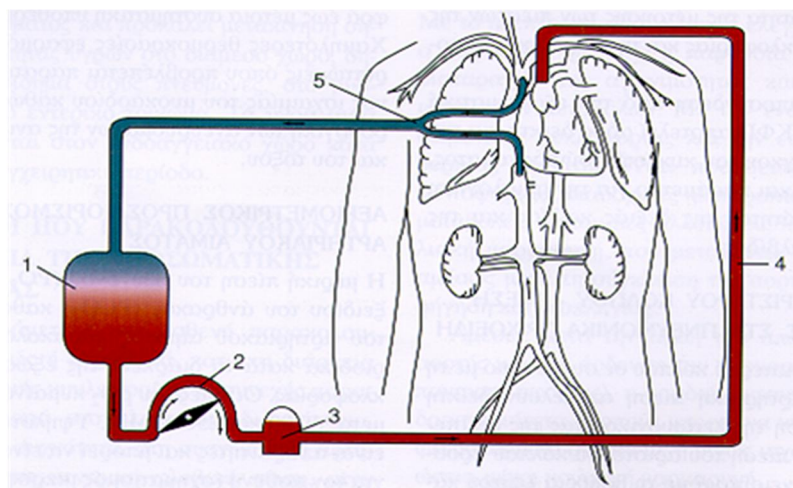
οξέος, ο ρυθμός αποβολής των ούρων και ο βαθμός ηπαρινισμού του αίματος, παρακολουθούνται περιοδικά. (Σπανός και συν 1999)

Εικόνα 1. Η εξωσωματική μηχανή και το κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας



Στην εικόνα **α** φαίνεται η μηχανή της εξωσωματικής κυκλοφορίας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, με τις τρεις φνυγόκεντρες αντλίες και τις σωληνώσεις τους και το θερμομότρο ενώ στην εικόνα **β** η συσκευή του οξυγονωτή με την συσκευή πλήρωσης με αρτηριακό αίμα που προωθείται στην συνέχεια στη 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)

Στις αρχές της δεκαετίας του 1960 αναφέρθηκαν οι πρώτες επιπλοκές της εξωσωματικής κυκλοφορίας από το ΚΝΣ. Αυτές κυμαίνονται από γνωσιακές δυσλειτουργίες μέχρι εγκεφαλικό επεισόδιο, κώμα, θάνατος. Κυρίως οφείλονται στους εξής παράγοντες: 1. Εμβολή του εγκεφάλου (μακρο- και μικροεμβολή), 2. Υποάρδευση, λόγω εμβολής, υπότασης, καταστάσεων χαμηλής αιματικής ροής, και 3. Φλεγμονώδης αντίδραση, λόγω των κυτταροκινών και της ενεργοποίησης των συστημάτων καλρικρεΐνης-κινίνης και του συμπληρώματος. (Bonser et al 2011) Επίσης, υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τις επεμβάσεις καρδιάς με εξωσωματική κυκλοφορία με φλεγμονή του εγκεφάλου, βλάβη νευρογλοιακών κυττάρων και δυσλειτουργία του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού. (Reinsfelt et al 2012) Υπάρχει γενικότερη παραδοχή ότι σημαντικές και καταστροφικές επιπλοκές από το ΚΝΣ (εγκεφαλικό επεισόδιο, κώμα) εμφανίζονται σε ποσοστό 1-3% των ασθενών μετά από επεμβάσεις καρδιάς, ενώ πιο διάχυτες νευρολογικές διαταραχές (παραλήρημα, εγκεφαλοπάθεια) συμβαίνουν σε 5-10%. (Roach et al 1996, Bucorius et al 2004, McKhann et al 2002)

Το 1999 οι οδηγίες της “The American College of Cardiology/American Heart Association” για χειρουργείο αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, κατηγοριοποίησε τη μετεγχειρητική νευρολογική βλάβη σε: τύπου 1 νευρολογικές διαταραχές οι οποίες περιλαμβάνουν μεγάλα εστιακά συμβάματα, εγκεφαλικό επεισόδιο, παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, λήθαργο και κώμα, και τύπου 2 διαταραχές, οι οποίες είναι διάχυτες και όχι καλά καθορισμένες, και αναφέρονται σε παραλήρημα, σύγχυση, επιδείνωση της νοητικής λειτουργίας και μετεγχειρητική γνωσιακή δυσλειτουργία (διαταραχές μνήμης, συγκέντρωσης και ψυχοκινητικής ταχύτητας). (Eagle et al 1999)

Επίσης, το 1996, ο Roach και συν. διαίρεσε αυτές τις διαταραχές σε 3 κατηγορίες: τύπου I ή εστιακή εγκεφαλική βλάβη, η οποία συνήθως προκαλείται από εγκεφαλική υποξία λόγω διεγχειρητικής υποάρδευσης ή εμβόλων και καθορίζεται από νευρολογική δυσλειτουργία στην κλινική εξέταση και επαληθεύεται με ακτινολογικό έλεγχο, τύπου II ή διάχυτη εγκεφαλική βλάβη, η οποία είναι πολυπαραγοντική (υποξία, διάρκεια εξωσωματικής κυκλοφορίας, ηλικία, τύπος επέμβασης, φλεγμονώδης αντίδραση, εγκεφαλικά μικροέμβολα) και καθορίζεται με την κλινική εκτίμηση και τύπου III βλάβες, οι οποίες περιλαμβάνουν νευροψυχολογικές διαταραχές και εκτιμώνται με νευρο-ψυχομετρικές δοκιμασίες. (Roach et al 1996, van Harten et al 2012)

Ο McKhann διαχώρισε τη μετεγχειρητική νευρολογική έκβαση σε: εγκεφαλικό επεισόδιο, εγκεφαλοπάθεια, βραχυ- και μακροπρόθεσμες γνωσιακές διαταραχές. (Bonser et al 2011)

Η εξωσωματική κυκλοφορία συσχετίζεται με σημαντικά αυξανόμενο αριθμό εγκεφαλικών μικροεμβόλων. (Liu et al 2009) Έχουν αναγνωριστεί αρκετές πηγές εμβόλων, όπως οι θρόμβοι, αθηρωματικές πλάκες της αορτής, φυσαλίδες αέρα, λίπος, κεριά, τμήματα οστού ή ραμμάτων. (Barbut et al 1998, Gilman et al 1965) Ο Moody και συν. παρατήρησαν πολλές εστιακές διατάσεις ή πολύ μικρά ανευρύσματα στα τελικά αρτηρίδια του εγκεφάλου μετά από εξωσωματική κυκλοφορία. Αυτές οι διατάσεις απεικονίζονται «κενές», υποδηλώνοντας ότι είναι περιοχές εγκεφαλικών μικροεμβόλων (φυσαλίδες αέρα ή λίπος). Είναι γνωστές με τον όρο μικρές τριχοειδικές και αρτηριδιακές διατάσεις (small capillary and arteriolar dilatations - SCADs) και περιγράφηκαν στο φλοιό και στις δομές της βαθιάς φαιάς ουσίας. (Moody et al 1990) Οι νευροσυμπεριφορικές διαταραχές μετά από αορτοστεφανιαία παράκαμψη είναι συχνές και συσχετίζονται με μικροεμβολές του εγκεφάλου. (Hammon et al 1997) Αρκετές έρευνες επισημαίνουν επίσης τη συσχέτιση αυτών των μικροεμβολών κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας με γνωσιακές διαταραχές. (Clark et al 1995, Borger et al 2001, Zanatta et al 2013) Κλινικές μελέτες αναφέρουν στενή σχέση του αριθμού των εμβόλων με νευρολογική βλάβη. (Stump et al 1996) Ο Groom και συν. έχουν αναφέρει ότι τα μικρέμβολα του κυκλώματος της εξωσωματικής κυκλοφορίας συσχετίζονται με αυξημένα μετεγχειρητικά επίπεδα της πρωτεΐνης S100beta. (Groom et al 2010)

Ο Murkin περιέγραψε το σημαντικό ρόλο της εξωσωματικής κυκλοφορίας στη νευροσυμπεριφορική έκβαση μετά από χειρουργείο καρδιάς. (Murkin 1995) Ο Newman παρατήρησε τη μεγάλη διάρκεια των γνωσιακών διαταραχών μετά από αορτοστεφανιαία παράκαμψη, οι οποίες ακολουθούνται από βελτίωση τον έκτο μήνα μετά την επέμβαση. (Newman et al 2001) Ο Fearn επίσης ανέφερε ότι οι γνωσιακές διαταραχές είναι συχνές, με την αγγειακή εγκεφαλική νόσο να προδιαθέτει σε δυσκολία στην προσοχή, ενώ τα έμβολα ενοχοποιούνται για διαταραχές της μνήμης. (Fearn et al 2001)

Η υποθερμία παρέχει, έως κάποιου βαθμού, εγκεφαλική προστασία κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Οι χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνουν την ανοχή του εγκεφάλου σε καταστάσεις ανεπαρκούς προσφοράς οξυγόνου σε αυτόν.

Επίσης, η μείωση της θερμοκρασίας (ακόμη και 34–35° C) εξασθενεί την απελευθέρωση του γλουταμινικού και άλλων διεγερτικών αμινοξέων από τα ισχαιμικά νευρικά κύτταρα. Πιστεύεται ότι αυτό το φαινόμενο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υποθερμική εγκεφαλική προστασία. (Shaaban et al 2005) Σε αντίθεση, οι Warm Heart Investigators ανέφεραν ότι δεν υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου μεταξύ νορμοθερμικής και συμβατικής υποθερμικής εξωσωματικής κυκλοφορίας σε 1732 ασθενείς μετά από μεμονωμένη αορτοστεφανιαία παράκαμψη. (The Warm Heart Investigators 1994) Επιπλέον, ο Wong και συν. δημοσίευσαν ότι η νευρολογική λειτουργία μετά από νορμοθερμική εξωσωματική κυκλοφορία (34.7° C) δεν παρουσίασε διαφορές σε σύγκριση με την υποθερμική εξωσωματική κυκλοφορία (27.8° C). (Wong et al 1992) Δεν είναι σαφές ότι υπάρχει σταθερό πλεονέκτημα της υποθερμικής έναντι της νορμοθερμικής εξωσωματικής κυκλοφορίας.

3. Η Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση στην Καρδιοχειρουργική

Η τεχνική της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης (YOKΠ) περιγράφηκε από τον Drew το 1959. (Drew et al 1959) Οι πρώτες επιτυχημένες σειρές αντικατάστασης του αορτικού τόξου με YOKΠ στους 18°C δημοσιεύτηκαν το 1975. (Griep RB et al 1975) Η YOKΠ χρησιμοποιείται διακόπτοντας τη φυσιολογική άρδευση του εγκεφάλου και αποτρέποντας ακόλουθη εγκεφαλική ισχαιμική βλάβη κατά τη διάρκεια διαφόρων χειρουργικών χειρισμών. Στην καρδιοχειρουργική εφαρμόζεται σε επεμβάσεις στο αορτικό τόξο (οξύς διαχωρισμός, ανεύρυσμα), όταν είναι αδύνατος ο αποκλεισμός της ανιούσης αορτής με λαβίδα αποκλεισμού - aortic cross clamp (πορσελανοειδής αορτή, ανεύρυσμα του περιφερικού τμήματος της ανιούσης αορτής), όταν είναι αναγκαίο το αναίμακτο χειρουργικό πεδίο (θωρακο-κοιλιακά ανευρύσματα, θρομβοενδαρτηρεκτομή της πνευμονικής αρτηρίας, διόρθωση μαζικής αιμορραγίας) και σε χειρουργική διόρθωση πολύπλοκων συγγενών καρδιοπαθειών. (Moorjani et al 2010) Αυτή η τεχνική παρέχει προστασία του εγκεφάλου επιτρέποντας τη διενέργεια ανοιχτής περιφερικής αναστόμωσης (open distal anastomosis) και καλύτερης ορατότητας του ενδοθηλίου του αορτικού τόξου σε ένα σχετικά αναίμακτο χειρουργικό πεδίο. Ο ακριβής μηχανισμός της εγκεφαλικής προστασίας που προσφέρει η βαθιά υποθερμία δεν

είναι πλήρως κατανοητός, αλλά η κύρια ευεργετική δράση της είναι η καταστολή του εγκεφαλικού μεταβολισμού. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η νευρολογικές επιπλοκές, οι διαταραχές πήκτικότητας, η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων, η νεφρική βλάβη και ο αυξημένος χρόνος εξωσωματικής κυκλοφορίας. (Fleck et al 2003) Επιπροσθέτως, το κυριότερο μειονέκτημα της ΥΟΚΠ είναι ο περιορισμός του χρόνου. Παρά την ευρεία χρήση της ΥΟΚΠ, υπάρχουν αρκετές αναφορές για τις πιθανές επιπτώσεις της στον εγκέφαλο. Η μέγιστη διάρκεια της ΥΟΚΠ, το βάθος της υποθερμίας και οι μέθοδοι εγκεφαλικής προστασίας αποτελούν τις μεγαλύτερες ανησυχίες και θέματα προς συζήτηση σε ό,τι αφορά τη βιωσιμότητα του εγκεφάλου.

Υποθερμία, Ολική Κυκλοφορική Παύση και Επαναθέρμανση

Η θερμοκρασία του οργανισμού δεν ορίζεται ούτε περιγράφεται εύκολα. Στην νορμοθερμία η διαφορά θερμοκρασίας των διαφόρων τμημάτων 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 με την εξωσωματική κυκλοφορία όμως, 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 αυτή του βολβού της έσω σφαγίτιδας φλέβας και 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 L/m²/min. 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 alpha-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 αύξηση της μερικής πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα (PaCO₂). Μόλις φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία, ο χειριστής της εξωσωματικής μηχανής διακόπτει την κυκλοφορία για περιορισμένο χρονικό διάστημα, μέχρι να ολοκληρωθούν οι χειρουργικές διορθώσεις. 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 χειρουργικών διορθώσεων, μέσα σε 30 με 45 περίπου λεπτά, ακολουθεί η επανεγκατάσταση της κυκλοφορίας και η σταδιακή επαναθέρμανση του ασθενούς στην νορμοθερμία. Η φάση της επαναθέρμανσης 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 ικανοποιητικός αιματοκρίτης και η αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

4. 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/min, στην εξωσωματική κυκλοφορία ρυθμίζεται στο 2.2 με 2.4 L/m²/min. 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/min 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 αιματική 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/min με πίεση άνω των 70 mmHg. Ο CMRO₂ είναι αντίστοιχος 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/100gr εγκεφαλικού ιστού/min. 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 ασθενείς 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/100gr εγκεφαλικού ιστού/min και επομένως είναι ακόμη χαμηλότερα στην υποθερμία. (Taylor et al 1998) Παρόλα αυτά όμως, η εγκεφαλική υποάρδευση 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 των επιπέδων μερικών πιέσεων αρτηριακού οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα (PaO_2 και PaCO_2) στην υποθερμική εξωσωματική κυκλοφορία. Κατά τη διάρκεια της υποθερμίας αυξάνεται η διαλυτότητα του CO_2 στο αρτηριακό αίμα. Ακολούθως το PaCO_2 μειώνεται με συνοδό αύξηση του pH του αρτηριακού αίματος, το οποίο συνεπώς γίνεται πιο αλκαλικό. Δύο στρατηγικές υπάρχουν για τους χειρισμούς της οξεοβασικής ισορροπίας στην υποθερμία, 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. Αυτή 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 μετριέται στους 37°C αδιόρθωτο για την θερμοκρασία του ασθενούς (αλκαλικό). 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, μεγαλύτερη εγκεφαλική ροή (συγκριτικά με τον μειωμένο εγκεφαλικό μεταβολισμό) και απώλεια της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης και εγκεφαλικό οίδημα (“luxury perfusion”). Η διαστολή των εγκεφαλικών αγγείων λόγω της τεχνητής αύξησης του CO_2 στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα και περισσότερα μικροέμβολα στον εγκέφαλο. (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)

5. 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 ΚΝΣ σε κατάσταση μείωσης της εγκεφαλικής κυκλοφορίας. Η ψύξη χρησιμοποιείται για την προστασία των οργάνων γιατί μειώνει την μεταβολική

δραστηριότητα και παρατείνει την περίοδο ανοχής στην ισχαιμία. Το ΚΝΣ έχει υψηλό μεταβολικό ρυθμό και περιορισμένες ενεργειακές αποθήκες, γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην εγκεφαλική ισχαιμία. Η υπόθεση που γίνεται στη 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 $CMRO_2$ είναι δείκτης της εγκεφαλικής μεταβολικής ενεργότητας. Όπως αναφέρθηκε για κάθε μείωση της θερμοκρασίας κατά $10\text{ }^\circ\text{C}$ η κατανάλωση του οξυγόνου μειώνεται σε βαθμό Q_{10} . (Kirklin, Barratt-Boyes 2003) 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 τη βοήθεια 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. (Πίνακας 1)

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

Θερμοκρασία ($^\circ\text{C}$)	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 συν. είναι ότι στους 20 °C ο εγκεφαλικός μεταβολισμός είναι ακόμη στο 24% της φυσιολογικής τιμής και στους 15 °C 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 PO₂ 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 παραμένει 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”).

6. 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. (Πίνακας 2) (Kirklin, Barratt-Boyes 2003)

Αρχικά, υπήρχε η εντύπωση ότι οι νευρολογικές και συμπεριφορικές διαταραχές μετά από 90 λεπτά YOKΠ στους 18° C ήταν σοβαρές αλλά αναστρέψιμες. (Mezrow et al 1995) Παρόλα αυτά οι πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα και η κλινική εμπειρία έδειξαν ότι το ασφαλές χρονικό διάστημα υποθερμικής κυκλοφορικής παύσης είναι πιο περιορισμένο. Το ασφαλές διάστημα θεωρείται ότι δεν είναι περισσότερο από 30-40 λεπτά στους 18 °C θερμοκρασία εγκεφάλου. Βασισμένο σε μελέτες σε ανθρώπους αλλά και σε πειράματα, η περίοδος 25-30 λεπτών αντιπροσωπεύει τα ανώτερα όρια ασφαλούς χρονικού διαστήματος υποθερμικής κυκλοφορικής παύσης σε θερμοκρασία οροφάρυγγα 12-15 °C. (Mezrow et al 1995, Ergin et al 1994, Ergin et al 1999, Hagl et al 2001) Περίοδος YOKΠ 40 και περισσότερων λεπτών οδηγεί σε εγκεφαλικό επεισόδιο στους ενήλικες και σε σπασμούς και χορειοαθέτωση στα παιδιά, ενώ όταν η περίοδος αυτή υπερβαίνει τα 60 λεπτά τότε σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα. (Svensson et al 1993, Hickey 1998) Η ψύξη σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 18-20 °C παρέχουν καλύτερη εγκεφαλική προστασία. (Griep RB et al 1997, Ananiadou et al 2007, Gillinov et al 1993) Η μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα για ψύξη σε αυτές τις θερμοκρασίες χαρακτηρίζεται από αργή περίοδο πτώσης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας, η οποία επιτρέπει την ομοιόμορφη ψύξη όλων των περιοχών του εγκεφάλου. (Harrington et al 2007) Η τοποθέτηση παγοσακούλων στο κεφάλι όσο διαρκεί η YOKΠ αποτρέπει μη επιθυμητή επαναθέρμανση του εγκεφάλου. Ο Griep και συν. παρατήρησαν ότι η YOKΠ με ψύξη της κεφαλής υποβοηθούμενη από τοποθέτηση παγοσακούλων συσχετίζεται με σημαντικά καλύτερα μετεγχειρητικά σκορ συμπεριφοράς σε σύγκριση με την YOKΠ με την κεφαλή εκτεθειμένη σε θερμοκρασία δωματίου. (Griep RB et al 1997)

Πίνακας 2. Νευρολογικές βλάβες μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

<i>Νευρολογικές βλάβες σε ενήλικες</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>	<i>Νευρολογικές βλάβες στην παιδική ηλικία</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>
Μόνιμο εγκεφαλικό επεισόδιο (7%)	Svensson et al 1993	Σπασμοί και χορειοαθέτωση, παροδικές επιληπτικές κρίσεις (4% με 25%)	Svensson et al 1993, Hickey 1998, Gaynor et al 2005
Σύγχυση, θυμός, παραλήρημα, αποπροσανατολισμός (19%) και μακροπρόθεσμα γνωσιακά ελλείμματα	Ergin et al 1999, Reich et al 1999	Μεγαλύτερη διάρκεια παύσης συσχετίζεται με χαμηλότερο δείκτη ανάπτυξης	Boston Circulatory Arrest Study Bellinger et. al 1995
Εγκεφαλικό επεισόδιο 5-7%, παροδική νευρολογική διαταραχή μέχρι 20% και κίνδυνο εμφάνισης νευροψυχολογικών διαταραχών στην πλειοψηφία των ασθενών	Hagl et al 2001, Reich et al 1993, Harrington et al 2003, Immer et al 2002, Czerny et al 2003, Ehrlich et al 2000	Κλινικές επιληπτικές κρίσεις (6%), ηλεκτροεγκεφαλογραφικές κρίσεις (20%)	Newburger et al 1993, Wypij et al 2003, Hickey 1998
Αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση λόγω του εγκεφαλικού οιδήματος	Hagl et al 2002	Μετά από τέσσερα χρόνια σημαντική επίπτωση την γνωσιακή λειτουργία, την επιδεξιότητα κινήσεων, την κινητική λειτουργία και την αφασία λόγου	Bellinger et al 1999, Hickey 1998
Μείωση της εγκεφαλικής ροής μετά την ΥΟΚΠ σε εγκέφαλο ο οποίος έχει επαναθερμανθεί οδηγώντας σε περαιτέρω ισχαιμική βλάβη	Shum-Tim et al 1998	Μετά από οκτώ χρόνια σημαντική επίπτωση στην ψυχοδιανοητική ανάπτυξη, την λειτουργία της μνήμης, της ομιλίας και την επιδεξιότητα κινήσεων	Bellinger et al 2003

Παρά τις προσπάθειες αρκετών μελετών, ο λεπτομερής μηχανισμός εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΥΟΚΠ είναι ακόμη ασαφής. Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι μέρος της βλάβης συμβαίνει κατά τη διάρκεια της επαναθέρμανσης, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες της βλάβης, αλλάζοντας τη στρατηγική της επαναθέρμανσης. (Tseng et al 1999) Πληροφορίες από πειραματικά μοντέλα αναφέρουν η περίοδος μετά την ΥΟΚΠ χαρακτηρίζεται από αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση λόγω του εγκεφαλικού οιδήματος το οποίο επιδρά αρνητικά στη νευροφυσιολογική ανάρρωση του ασθενούς. (Hagl et al 2002) Επίσης, μία από τις παρατηρήσεις των μελετών αναφέρει ότι η εγκεφαλική ροή συχνά μειώνεται μετά την ΥΟΚΠ. (Astudillo et al 1993, Jonassen et al 1995, Rodriguez et al 1995, Mezrow et al 1994, Greeley et 1989, Hillier et 1991, van der Linden 1995, Ekroth et al 1993, O'Hare et al 1995) Η μειωμένη άρδευση σε έναν εγκέφαλο ο οποίος έχει επαναθερμανθεί μπορεί να προκαλέσει ανισορροπία μεταξύ της προσφοράς οξυγόνου και της μεταβολικής ζήτησης, οδηγώντας σε περαιτέρω ισχαιμική βλάβη στην κρίσιμη περίοδο ανάρρωσης από την ΥΟΚΠ. (Shum-Tim et al 1998) Η μείωση της εγκεφαλικής ροής δεν συνοδεύεται πάντα από ανάλογη μείωση του εγκεφαλικού μεταβολισμού. Αυτό το φαινόμενο ενέχει κινδύνους πιθανής πτώσης της προσφοράς οξυγόνου στον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια της ευπαθούς περιόδου της επαναθέρμανσης μετά από την ΥΟΚΠ. (Mezrow et al 1993, van der Linden et al 1989, Pesonen et al 1999) Οι συνεχείς μετρήσεις ροής και μεταβολισμού στη μετεγχειρητική περίοδο έδειξαν ότι στην πλειοψηφία των ασθενών, η εγκεφαλική ροή, μεταβολισμός και αυτορρύθμιση επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα 24 ώρες μετά το χειρουργείο. (Greeley et 1993) Η αντιδραστική υπεραϊμία, η οποία συχνά παρατηρείται άμεσα στην επαναθέρμανση μετά από ΥΟΚΠ, αποτελεί αιτία εμφάνισης των κινδύνων που συσχετίζονται με το «luxury perfusion» (αυξημένη έκθεση σε μακρο- και μικροέμβολα). Η εφαρμογή της ψυχρής επαναιμάτωσης αποτελεί μία λογική μέθοδο σύζευξης της εγκεφαλικής ροής και μεταβολισμού. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι σύντομες περιόδους ψυχρής επαναιμάτωσης μειώνουν σημαντικά την αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης, το εγκεφαλικό οίδημα και βελτιώνουν την έκβαση μετά από 90 λεπτά κυκλοφορικής παύσης στους 20° C. (Ehrlich et al 2001) Τέλος, έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι η αργή επαναθέρμανση με διαφορά θερμοκρασίας μικρότερη των 10° C μεταξύ του αίματος και του οροφάρυγγα, εμφανίζεται να είναι κλινικά σημαντική.

Η εγκεφαλική βλάβη μετά από επεμβάσεις που χρειάζονται κυκλοφορική παύση εμφανίζεται κλινικά ως μετεγχειρητική παροδική ή μόνιμη βλάβη. Η μόνιμη νευρολογική δυσλειτουργία παρουσιάζεται ως εστιακή νευρολογική διαταραχή ή εγκεφαλικό επεισόδιο. Η παροδική νευρολογική δυσλειτουργία ορίζεται ως μετεγχειρητική σύγχυση, παραλήρημα, θόλωση συνείδησης ή παροδικές εστιακές διαταραχές (λύση μέσα σε 24 ώρες). Σε μια σειρά 656 ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επέμβαση στο αορτικό τόξο μόνο με YOKΠ, ο Svensson και συν. δημοσίευσαν 10% θνητότητα, και 7% παροδικό ή μόνιμο εγκεφαλικό επεισόδιο. Στην πολυπαραγοντική μελέτη, οι συγγραφείς παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου μετά από περίοδο YOKΠ > 40 λεπτά, και αύξηση της θνητότητας μετά από περίοδο YOKΠ > 65 λεπτά. (Svensson et al 1993) Σε 443 ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αντικατάσταση ημιτόξου, η διάρκεια YOKΠ > 30 λεπτά εμφανίστηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για παροδική νευρολογική διαταραχή. (Ehrlich et al 2003) Με τη χρήση νευροψυχολογικών τεστ, παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος YOKΠ > 25 λεπτά αποτελεί παράγοντα κινδύνου μακροπρόθεσμων διαταραχών της νευρογνωσιακής λειτουργίας. (Reich et 1999) Ο Griep ανέφερε ότι οι παράγοντες κινδύνου που συσχετίζονται με μη επιθυμητά εγκεφαλικά αποτελέσματα μετά από YOKΠ είναι: η παρατεταμένη διάρκεια YOKΠ (συνήθως μεγαλύτερη των 60 λεπτών), η προχωρημένη ηλικία, η γρήγορη ψύξη (μικρότερη των 20 λεπτών), η υπεργλυκαιμία είτε πριν την YOKΠ ή στην επαναθέρμανση, η έλλειψη επαρκούς αιμοαραίωσης, οι ενδείξεις αυξημένης πρόσληψης οξυγόνου πριν την YOKΠ ή στην επαναθέρμανση και η καθυστέρηση στην επανεμφάνιση του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος ή σημαντικές ανωμαλίες σε αυτό. (Griep EB et al 1992) Τέλος, η YOKΠ σε επέμβαση αορτικού τόξου, έχει κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου 5-7%, παροδικής νευρολογικής διαταραχής μέχρι 20% και κίνδυνο εμφάνισης νευροψυχολογικών διαταραχών στην πλειοψηφία των ασθενών. (Hagl et al 2001, Reich et al 1993, Harrington et al 2003, Immer et al 2002, Czerny et al 2003, Ehrlich et al 2000)

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, Wyryj 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, τη λειτουργία της μνήμης και 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 θωρακική 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 τη διάρκεια της παύσης και πιστεύεται ότι αποτελεί κλινικό σύνδρομο που εκδηλώνεται λόγω ακατάλληλης εγκεφαλικής προστασίας. Παρά την σχετική αναστρεψιμότητα 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 1999) 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)

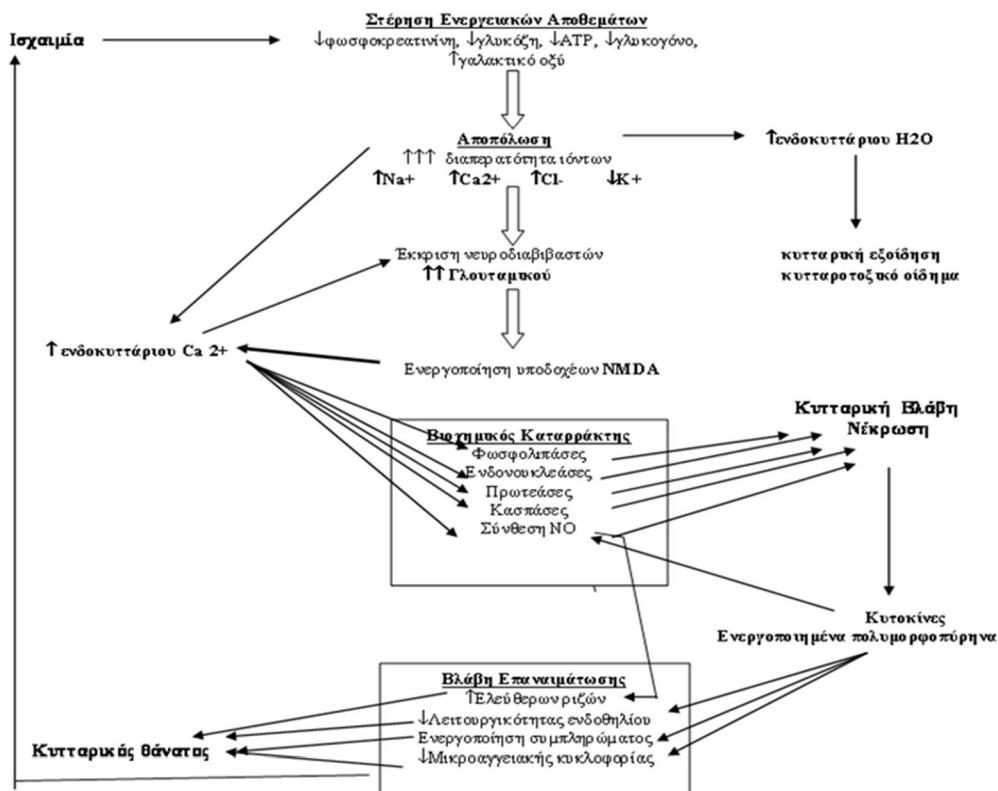
7. Λειτουργική Νευροανατομία της Ισχαιμικής Εγκεφαλικής Βλάβης μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

Η αντίληψη της μοριακής βάσης της νευρικής βλάβης μετά από ΥΟΚΠ είναι πολύ σημαντική. Η μεταθανάτια ιστολογική εκτίμηση μετά από ΥΟΚΠ δείχνει ότι συμβαίνει εκλεκτικός νευρικός θάνατος. Οι περιοχές που προσβάλλονται πιο πολύ είναι τα βασικά γάγγλια, η παρεγκεφαλίδα, και ο ιππόκαμπος. (Redmond et al 1994)

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 τέσσερα στάδια: Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης παρατηρείται στέρηση ενεργειακών αποθεμάτων και αποπόλωση. Στη δεύτερη φάση πραγματοποιείται απελευθέρωση και έκκριση νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμινικό αμινοξύ και οδηγεί σε βιοχημικό καταρράκτη ενδοκυττάρων συμβαμάτων. Η τρίτη φάση χαρακτηρίζεται από τη βλάβη επαναιμάτωσης και την αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Τέλος, αυτή η διαδικασία

οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση. (Todd et al 1992, Warner 2000)
(Εικόνα 3)

Εικόνα 3. Παθογένεια της ισχαιμικής εγκεφαλικής βλάβης



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, η

γλυκόζη, το πυρουβικό και το γλυκογόνο μεταβολίζονται αναερόβια σε γαλακτικό και CO₂, που σχετίζεται με μείωση του pH. (Ramsi et al 2002)

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 νευδιαβιβαστών 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 μεθισχαιμικού κυτταρικού θανάτου. Η επίδραση του γλουταμικού στις νευρικές συνάψεις και η μεμβρανική εκπόλωση οδηγούν στην ‘πλημμύρα’ ιόντων Na⁺ και Ca⁺² ενδοκυττάρια, το βιοχημικό καταρράκτη ενδοκυττάρια συμβαμάτων και την ενεργοποίηση της νευρωνικής συνθέσεως 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, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται «διεγερτοτοξικότητα γλουταμινικού» (glutamate Excitotoxicity). (Olney 1978, Brock et al 1996, Montoliu et al 2001, Tseng et al 1999, Endres et al 1997) Υψηλά επίπεδα ιόντων Ca⁺² προκαλούν απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποιώντας τις κασπάσες, οι οποίες λειτουργούν ως «τελεστές» (effectors) της απόπτωσης. (Zhang et al 2006) 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 συγκέντρωση αμινοξέων εμφανίζουν την τοξικότητά τους δια μέσω των καναλιών των υποδοχέων γλουταμινικού, ειδικότερα των N-μεθυλο-D-ασπαρτικών (N-methyl-D-aspartate - NMDA) υποδοχέων διαύλων ιόντων. (Bonser et al 2011) Η αυξημένη ενδοκυττάρια είσοδος ιόντων Ca, η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση των NMDA, ενεργοποιεί επίσης μία σειρά ενζύμων, όπως κινάσες, φωσφατάσες, φωσφολιπάσες,

φωσφολιπάση A2, ενδονουκλεάσες, πρωτεάσες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, δηλαδή έναν καταρράκτη διεργασιών που επιταχύνει την ισχαιμική νευρωνική βλάβη. (Rothman et al 1986, Won et al 2002)

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, TNF α) και η ιντερλευκίνη 1- β (Interleukin 1- β , 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 μηχανισμού 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^+/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 κασπασών. 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 συνδεδετικά μόρια (ligands) που συνδέονται με τους υποδοχείς TNFR, ανήκουν στην υπερικογένεια 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 κτλ. 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 υπο-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 ομόλογων, 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 and Korsmeyer 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 καταστέλλεται. 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’ ότι σε εγκεφάλους μετεμβρυϊκών ή ενηλίκων αρουραίων. (Reed 1996) Αντίθετα, ανοσολογική αντίδραση της πρωτεΐνης Bax έχει διαπιστωθεί σε νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος ενηλίκων 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 υπεροξειδωση 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 την 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 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). (Smey et al 1993) Το πρώιμο εκφραζόμενο γονίδιο c-Fos παρουσιάζει ταχεία, πρόσκαιρη επαγωγή της έκφρασής του, στους νευρώνες του ιπποκαμπικού 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 παύση, που έχουν σχέση με την λειτουργία της μνήμης οφείλονται σε βλάβη στον ιππόκαμπο. Στα νεογνά και στα βρέφη από 6 έως 12 μηνών, η χορειαθέτωση 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 nNOS 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 ολιγονουκλεοσωμικό 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. πυκνωση χρωματίνης, 2. φυσαλιδοποίηση μεμβράνης, 3. ρίκνωση πυρήνα και 4. πυκνωση κυτταροπλάσματος. (Sastry and Rao, 2000)

8. Μέθοδοι Εγκεφαλικής Προστασίας στην Καρδιοχειρουργική

Πολλαπλές κλινικές μελέτες και πειραματικά μοντέλα έχουν πραγματοποιηθεί επικεντρώνοντας στην προστασία του εγκεφάλου στις καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Η εγκεφαλική βλάβη δεν συσχετίζεται μόνο με αυξημένη θνητότητα, αλλά με σωματική και ψυχική ανικανότητα και οικονομικές επιπτώσεις. Υπολογίζεται ότι το κόστος από ένα αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο κυμαίνεται μεταξύ \$90.000 και \$228.000 στη ζωή ενός ασθενούς. (Eagle et al 1999)

Υπάρχουν 4 μεγάλες κατηγορίες στρατηγικών διαχείρισης που αποσκοπούν στην προστασία του εγκεφάλου.

- *Υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση*
- *Εκλεκτική εγκεφαλική άρδευση*
- *Άλλες μη φαρμακολογικές πτυχές της εγκεφαλικής προστασίας*
- *Φαρμακολογική νευροπροστασία*

- *Υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση*

Στο παρόν σύγγραμμα έχει πραγματοποιηθεί εκτενής αναφορά στην εφαρμογή της ΥΟΚΠ στην καρδιοχειρουργική, την επίδρασή της στον εγκεφαλικό μεταβολισμό και τις επιπλοκές της. Επίσης, αναφερθήκαμε με λεπτομέρειες στη λειτουργική νευροανατομία και τους μηχανισμούς του νευρωνικού θανάτου από την ΥΟΚΠ.

- *Εκλεκτική εγκεφαλική άρδευση*

Συνεχείς προσπάθειες βελτίωσης της εγκεφαλικής προστασίας στην αντικατάσταση του αορτικού τόξου οδήγησαν στην ανάπτυξη της εκλεκτικής ορθόδρομης και παλίνδρομης εγκεφαλικής άρδευσης (selective antegrade cerebral perfusion and retrograde cerebral perfusion). Και οι δύο τεχνικές παρέχουν συνεχή αιματική ροή στον εγκέφαλο και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την υποθερμική κυκλοφορική παύση. Οι DeBakey και Cooley ήταν οι πρώτοι που επιτυχώς περιέγραψαν την ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση τοποθετώντας κάνουλες στη δεξιά μηριαία αρτηρία και τις καρωτίδες άμφω με ξεχωριστή αντλία. (DeBakey et al 1957) Παρά την αρχική επιτυχία, η μέθοδος θεωρήθηκε πολύπλοκη και εγκαταλείφθηκε. Η εκλεκτική ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση επανεμφανίστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν διάφορες τεχνικές cannulation των κλάδων του αορτικού τόξου που αρδεύουν τον εγκέφαλο (ετερόπλευρη κοινή καρωτίδα αρτηρία, αμφοτερόπλευρη ή και των 3 κλάδων). Για την αποφυγή χειρισμών σε αυτά τα σχετικά μικρά αγγεία και επομένως προβλημάτων όπως, διαχωρισμοί ή εμβολικά φαινόμενα από απόσπαση αθηρωματικών πλακών, προτιμάται η μονόπλευρη εγκεφαλική αιμάτωση με απευθείας «κανουλάρισμα» 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)

Η κυκλοφορική παύση, όπως αρχικά περιγράφηκε, αναφέρεται στην ολική παύση της κυκλοφορίας και την απουσία άρδευσης όλων των οργάνων (εκτός της καρδιάς, οποία αιματώνεται με την καρδιοπληγία). Η προσθήκη της ορθόδρομης εγκεφαλικής άρδευσης διαφοροποιεί αυτή την έννοια από κυκλοφορική παύση όλου του σώματος σε παύση μόνο του κατώτερου σώματος αφού ο εγκέφαλος, τα άνω άκρα και ο νωτιαίος μυελός (με παράπλευρη κυκλοφορία) αιματώνονται. Έτσι, στην πραγματικότητα, τα κάτω άκρα και τα όργανα της κοιλιάς ισχαιμούν κατά τη διάρκεια της κυκλοφορικής παύσης με ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση. (Bradley et al 2012) Επιπροσθέτως, η ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση επιτρέπει την απομάκρυνση από χαμηλές συστηματικές θερμοκρασίες σε υψηλότερες. Οι λόγοι εφαρμογής αυτής της στρατηγικής περιλαμβάνουν τη μείωση μεταβολικών και κυτταρικών ομοιοστατικών διαταραχών, διατήρηση της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης, και αποφυγή βαθιάς υποθερμίας, παρατεταμένης εξωσωματικής κυκλοφορίας και διαταραχές του πηκτικού μηχανισμού.

Η υπόθεση ότι η ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση είναι πιο φυσιολογική από καταστάσεις χωρίς αιματική ροή (YOKΠ) ή την παλίνδρομη εγκεφαλική άρδευση την ανάγει σε ανώτερη μέθοδο εγκεφαλικής προστασίας. Ο Bachet ανέφερε 2.1% μόνιμης και 4.3% παροδικής νευρολογικής διαταραχής σε μια σειρά 54 ασθενών στους οποίους εφαρμόστηκε η ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση με «ψυχρή εγκεφαλοπληγία» δια μέσω cannulation άμφω των κοινών καρωτίδων αρτηριών. (Bachet et 1991) Ο Kazui δημοσίευσε εξαιρετική νευρολογική έκβαση με ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση με cannulation της ανωνύμου και αριστερής έσω καρωτίδας αρτηρίας με εγκεφαλική ροή 10ml/kg/min κατά τη διάρκεια YOKΠ.

Ο Hagl και συν. έδειξαν σε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο σε χοίρους ότι η στρατηγική της YOKΠ και ορθόδρομης εγκεφαλικής άρδευσης σε σύγκριση μόνο με YOKΠ συσχετίζεται με βελτίωση της νευροψυχολογικής λειτουργίας, μειωμένη ενδοκρανιακή πίεση, μικρότερο εγκεφαλικό οίδημα και λιγότερη ιστική οξέωση μετά την περίοδο της κυκλοφορικής παύσης. (Hagl et al 2004) Επίσης σε χοίρειο πειραματικό μοντέλο, οι Filgueiras και συν. παρατήρησαν ότι σχεδόν φυσιολογικός μεταβολισμός διατηρείται με YOKΠ και ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση. Σε αντίθεση, οι χοίροι που υποβλήθηκαν σε YOKΠ και παλίνδρομη εγκεφαλική άρδευση ή μόνο YOKΠ παρουσίασαν σημαντική πτώση του εγκεφαλικού pH κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. (Filgueiras et al 1995) Οι ίδιοι ερευνητές ανέδειξαν τη διατήρηση της κυτταρικής δομής στην ιστοπαθολογική ανάλυση μετά από YOKΠ με

ορθόδρομη σε σύγκριση με την παλίνδρομη εγκεφαλική άρδευση. (Filgueiras et al 1996) Οι Neri και συν. δημοσίευσαν ότι η εγκεφαλική αυτορρύθμιση διατηρείται στην άμεση μετεγχειρητική περίοδο στους ασθενείς με ΥΟΚΠ και ορθόδρομη εγκεφαλική άρδευση, ενώ διαταράχθηκε όταν εφαρμόστηκε μόνο ΥΟΚΠ ή ΥΟΚΠ και παλίνδρομη. (Neri et al 2004)

Η παλίνδρομη εγκεφαλική άρδευση χρησιμοποιήθηκε ως πιθανή μέθοδος εγκεφαλικής προστασίας μέσω της άνω κοίλης φλέβας. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην επείγουσα θεραπεία της αερώδους μαζικής εμβολής κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας. (Mills et al 1980) Τα θεωρητικά πλεονεκτήματα είναι η διατήρηση της ενδοκράνιας 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 παλίνδρομης 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 παλίνδρομης αιμάτωσης σταδιακά εγκαταλείπεται από τους χειρουργούς καθότι αποδεικνύεται ότι όχι μόνο είναι περιορισμένη η διατήρηση του εγκεφαλικού μεταβολισμού αλλά και η όψιμη εμφάνιση νευρολογικής σημειολογίας μετεγχειρητικά. (Ye et al 1997, Reich et al 2001) Τέλος, συσχετίζεται και με μεγαλύτερα ποσοστά εγκεφαλικού επεισοδίου, νευρογνωσιακών διαταραχών και κατάθλιψης. (Juvonen et al 1998, Svensson 2002)

- *Άλλες μη φαρμακολογικές πτυχές της εγκεφαλικής προστασίας*

Καθώς η γνώση της καρδιοαναπνευστικής φυσιολογίας βελτιώθηκε, κατέστη σαφές ότι τα περισσότερα εγκεφαλικά επεισόδια μετά από χειρουργείο καρδιάς συσχετίζονται με έμβολα από αθηρωματικά ή επασβεστωμένα συντρίμματα. Σε αυτές

τις περιπτώσεις η αποφυγή χειρισμών της αορτής είναι υψίστης σημασίας. Επίσης συστήνεται ένας και μόνο αποκλεισμός της αορτής (“single cross-clamp” technique) κι όχι μερική ή πολλαπλές εφαρμογές του (class IIa, level A evidence). (Grogan et al 2008) Η τεχνική αυτή μειώνει τις μετεγχειρητικές νευρολογικές και νευρογνωσιακές διαταραχές. (Hammon et al 1997) Η μη εφαρμογή αορτικού αποκλεισμού με τη χρήση ινιδισμού ή η αποφυγή της εξωσωματικής κυκλοφορίας αποτελούν εναλλακτικές στρατηγικές αορτής με σοβαρή αθηροσκληρυνση (πορσελανοειδής αορτή).

Αναφορικά με το κύκλωμα της εξωσωματικής κυκλοφορίας, έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες οι οποίες συσχετίζονται με την εγκεφαλική προστασία. Η εισαγωγή του οξυγονωτή μεμβράνης (membrane oxygenator) μείωσε τον αριθμό εμβόλων προς το ΚΝΣ, καθώς και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και των φλεγμονωδών δεικτών σε σύγκριση με τον οξυγονωτή φυσαλίδων (bubble oxygenators). (Cavarocchi et al 1986, Videm et al 1989) Η χρήση των φίλτρων της αρτηριακής γραμμής ελαχιστοποίησε την εγκεφαλική βλάβη. Μελέτες ανέδειξαν ότι τα φίλτρα αρτηριακής γραμμής (τουλάχιστον 25μm) οδήγησαν σε μείωση των εγκεφαλικών εμβόλων. (Loop et al 1976, Padayachee et al 1988) Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί φίλτρα απομάκρυνσης των λευκοκυττάρων μειώνοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η χρήση αυτών των φίλτρων βελτίωσαν την εγκεφαλική προστασία μετά από παρατεταμένη περίοδο ΥΟΚΠ σε χρόνιο πειραματικό μοντέλο σε χοίρους (Rimpiläinen et al 2000), και τη μετεγχειρητική νευροψυχολογική έκβαση σε κλινική μελέτη. (Whitaker et al 2004) Σε αναδρομική μελέτη με 4.000 ασθενείς, οι φυγοκεντρικές αντλίες συσχετίζονται με μικρότερη συχνότητα εγκεφαλικού επεισοδίου σε σύγκριση με τις περισταλτικές αντλίες. (Parolari et al 2000) Επιπρόσθετα, η χρήση των “κλειστών” φλεβικών δεξαμενών (“closed” venous reservoirs) μείωσαν τη συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση και την παραγωγή μικροεμβόλων από φυσαλίδες. Η εφαρμογή της αναρρόφησης καρδιοτομής (cardiotomy suction) συσχετίζεται με εγκεφαλική βλάβη και 15πλάσια αύξηση του αριθμού των SCADs. (Brooker et al 1998) Η αντικατάστασή της με αναρρόφηση με σύστημα αυτομετάγγισης (σύστημα cell saver) οδήγησε σε μείωση των μικροεμβόλων προς τον εγκέφαλο και ελάττωση κατά 50% των SCADs. (Kincaid et al 2000)

Ποικίλες τεχνικές διεγχειρητικής παρακολούθησης του εγκεφάλου συνεισφέρουν στην προστασία του κατά τη διάρκεια του χειρουργείου καρδιάς. Το

ηλεκτροεγκεφαλογράφημα αξιολογεί την ομοιόμορφη ψύξη του εγκεφάλου και την εξασθένιση των ηλεκτρικών σημάτων του εγκεφάλου που πραγματοποιείται στην ψύξη. Παρόλα αυτά, το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα δεν καταγράφει τη μεταβολική κατάσταση των βασικών δομών. Κατά τη διάρκεια της ψύξης γίνεται ισοηλεκτρικό σε θερμοκρασία μεταξύ 20 και 18 °C και χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει την ηλεκτρική σιγή του εγκεφάλου (electrical silence) πριν την YOKΠ. Υπάρχουν δύο μελέτες που αναφέρουν βελτίωση της νευρολογικής έκβασης των ασθενών με την εφαρμογή του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος σε χειρουργεία καρδιάς. (Arom et al 1989, Edmonds et al 1992) Ο Διφασματικός δείκτης (bispectral index, BIS), ο οποίος έχει σχεδιαστεί για την εκτίμηση του βάθους της αναισθησίας (και προέρχεται από την ανάλυση των κυμάτων του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος), έδειξε μειωμένη ανάγκη από αναισθητικά φάρμακα μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας σε σύγκριση με πριν. (Lundell et al 2001) Η παρακολούθηση των ασθενών που υποβάλλονται σε YOKΠ με το δείκτη patient state index (PSI, μία μέθοδο που εκφράζει το επίπεδο της ύπνωσης), ανέδειξε ότι μετά την επαναθέρμανση και το τέλος της εξωσωματικής κυκλοφορίας, το επίπεδο της νάρκωσης διαρκεί αρκετές ώρες χωρίς επιπρόσθετη χορήγηση αναισθητικών φαρμάκων. (Sabet et al 1999) Η φασματοσκοπία εγγύς υπερόθρου (near-infrared spectroscopy) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του κορεσμού του οξυγόνου του εγκεφαλικού φλοιού. Χαμηλά επίπεδα περιοχικής εγκεφαλικής οξυμετρίας συσχετίζονται με αυξημένη διεγχειρητική θνητότητα στις διορθώσεις συγγενών καρδιοπαθειών. (Fenton et al 2005) Η παρακολούθηση της περιοχικής εγκεφαλικής οξυμετρίας συμβάλλει στην αποφυγή του εγκεφαλικού αποκορεσμού κατά τη διάρκεια αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. (Murkin et al 2007) Το διακρανιακό υπερηχογράφημα (Transcranial Doppler) παρέχει μετρήσεις της ταχύτητας της εγκεφαλικής αιματικής ροής και δίνει πληροφορίες για ανίχνευση εμβόλων. Ο κορεσμός σε οξυγόνο του αίματος στον σφαγιτιδικό βολβό (jugular venous oxygen saturation - SjVO₂) χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας σε οξυγόνο του εγκεφαλικού φλεβικού αίματος. Μείωση του SjVO₂ συσχετίζεται με απώλεια της ισορροπίας μεταξύ της εγκεφαλικής αιματικής ροής και του CMRO₂, η οποία εκφράζεται είτε με μείωση της εγκεφαλικής ροής ή αύξηση του CMRO₂. Ο SjVO₂ επιτρέπει μετρήσεις της καθολικής οξυγόνωσης του εγκεφάλου χωρίς να παρέχει πληροφορίες για συγκεκριμένες περιοχές του με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύει εστιακά εγκεφαλικά επεισόδια. Κατά τη διάρκεια της εγκεφαλικής ψύξης μειώνεται ο ρυθμός του εγκεφαλικού μεταβολισμού και

αυξάνεται ο $SjVO_2$. Συστήνεται η ψύξη προ της YOKΠ να συνεχίζεται μέχρι η τιμή του $SjVO_2$ να φτάσει τουλάχιστον 95%. (Griep RB et al 1997)

Η διαχείριση της θερμοκρασίας διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην καρδιοχειρουργική παρέχοντας προστασία πρωτίστως στο μυοκάρδιο και στο εγκέφαλο. Όπως αναφέρθηκε, πολλές μελέτες έχουν επισημάνει το ρόλο της στην εξωσωματική κυκλοφορία και την YOKΠ. Επίσης, επιθυμητός θεωρείται ο ρυθμός της ψύξης. Η γρήγορη ψύξη αφήνει περιοχές του εγκεφάλου πιο θερμές και πιο ευπαθείς στην ισχαιμία. (Harrington et al 2007) Η γρήγορη και υπερβολική επαναθέρμανση άνω των 37 °C θα πρέπει επίσης να αποφεύγεται (class I, level B evidence). (Shum-Tim et al 1998, Grogan et al 2008, Dietrich et al 1990, Cook 2001) Σε ό,τι αφορά την επαναθέρμανση στην εξωσωματική κυκλοφορία, ο Coselli συστήνει ρυθμό επαναθέρμανσης μικρότερο του 0.5 °C, ρυθμίζοντας τη συσκευή ψύξης-θέρμανσης του ασθενούς (heat exchanger) κάτω των 38 °C, διατηρώντας διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ εκχύματος και ασθενούς κάτω των 10 °C, και σταματώντας την επαναθέρμανση όταν η θερμοκρασία του ασθενούς φτάσει τους 36.5 °C. (Coselli et al 2002)

Το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αντιδραστικότητας των εγκεφαλικών αγγείων. Η υπερκαπνία οδηγεί σε αγγειοδιαστολή ενώ η υποκαπνία σε αγγειοσύσπαση. Η διαχείριση του διοξειδίου του άνθρακα στην εξωσωματική κυκλοφορία αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Κατά τη διάρκεια της υποθερμίας αυξάνεται η διαλυτότητα του CO_2 στο αρτηριακό αίμα. Ακολούθως το $PaCO_2$ μειώνεται με συνοδό αύξηση του pH του αρτηριακού αίματος, το οποίο συνεπώς γίνεται πιο αλκαλικό. Δύο στρατηγικές υπάρχουν για τους χειρισμούς της οξεοβασικής ισορροπίας στην υποθερμία, 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. Αυτή η σταθερότητα εξασφαλίζεται με την προσθήκη CO_2 στα εισερχόμενα αέρια του οξυγονωτή. 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, μεγαλύτερη εγκεφαλική ροή (συγκριτικά με τον μειωμένο εγκεφαλικό μεταβολισμό) και απώλεια της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης και εγκεφαλικό οίδημα (“luxury perfusion”). Η διαστολή των εγκεφαλικών αγγείων λόγω

της τεχνητής αύξησης του CO₂ στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα και περισσότερα μικροέμβολα στον εγκέφαλο. (Kirklin, Barratt-Boyes 2003) Η alpha-stat στηρίζεται στο ότι δεν γίνονται αλλαγές CO₂ και το pH μετريέται στους 37° C αδιόρθωτο για την θερμοκρασία του ασθενούς (αλκαλικό). Η alpha-stat διατηρεί την αντιστοιχία εγκεφαλικής ροής και μεταβολισμού και διατηρεί την ικανότητα της εγκεφαλικής αυτορρύθμισης (μέχρι τη θερμοκρασία των 22° C), κάτι που είναι σημαντικό στους ενήλικες με αγγειοπάθεια, όπως αθηρωμάτωση, υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη. (Murkin et al 1995) Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι η μέθοδος αυτή οδηγεί σε καλύτερη νευρολογική έκβαση στους ενήλικες (Patel et al 1996, Stephan et al 1992) και συστήνεται ως Class IIa, Level A of Evidence. (Grogan et al 2008)

Η αποφυγή της υπεργλυκαιμίας είναι επίσης σημαντική. Η παρακολούθηση των τιμών του σακχάρου και η διατήρησή του σε φυσιολογικά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας θεωρούνται απαραίτητες στη βρεφική και παιδική ηλικία. Στα χειρουργεία καρδιάς το σάκχαρο αυξάνεται λόγω της αύξησης των stress ορμονών όπως η κορτιζόλη, οι κατεχολαμίνες και η αυξητική ορμόνη. (Anand et al 1990) Η υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλική βλάβη λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στα βρέφη και τα παιδιά. (Lanier 1991, LeBlanc et al 1994, Michaud et al et 1991) Συστήνεται τα επίπεδα του σακχάρου να διατηρούνται < 140 mg/dL με έγχυση ινσουλίνης (class IIb, level C). (Grogan et al 2008)

- *Φαρμακολογική νευροπροστασία*

Οι μηχανισμοί τόσο του νεκρωτικού όσο και του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της ισχαιμικής και τραυματικής εγκεφαλικής βλάβης. Ο εγκέφαλος είναι ευπαθής στο οξειδωτικό stress λόγω του υψηλού ρυθμού της μεταβολικής δραστηριότητάς του. Το οξειδωτικό stress οδηγεί σε συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου, και αποτελεί σημαντικό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου σε ισχαιμικά και τραυματικά εγκεφαλικά επεισόδια. Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την νευροπροστασία. Η διεγερσιμοτοξικότητα, ο ρόλος του ασβεστίου, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η μιτοχονδριακή βλάβη, η φλεγμονή και η απόπτωση αποτελούν τους πιθανούς στόχους των θεραπευτικών παρεμβάσεων. Γενικότερα, 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) Παρόλα αυτά, οι μελέτες που συσχετίζονται με την εμφάνιση νέων φαρμακευτικών ουσιών νευροπροστασίας, δεν χαρακτηρίζονται από μεγάλες επιτυχίες. (Bramlett et al 2004)

Μια σειρά από φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο πειραματικά όσο και κλινικά ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες σε μια προσπάθεια να μειωθεί η επίπτωση της βλάβης του εγκεφάλου μετά από χειρουργείο καρδιάς. Ένας αριθμός αναστολέων των υποδοχέων γλουταμικού (NMDA και μη-NMDA υποτύπων υποδοχέων) έχουν ερευνηθεί για το λόγο αυτό. Σε πειράματα YOKΠ σε σκύλους, τα ζώα που έλαβαν θεραπεία με Dizocilpine ή MK 801 (επιλεκτικός αποκλειστής των NMDA υποδοχέων γλουταμικού) έδειξαν καλύτερη νευρολογική λειτουργία στις βαθμολογίες της συμπεριφοράς και μικρότερη νευρωνική βλάβη στην ιστολογική εξέταση. (Redmond et al 1994, Baumgartner et 1997) Οι κλινικές μελέτες με MK801 εγκαταλείφθηκαν αργότερα όταν βρέθηκε ότι οι υψηλές δόσεις προκαλούν νέκρωση σε καλλιεργημένους νευρώνες αρουραίων. (Muir et 1995) Άλλοι αποκλειστές των NMDA υποδοχέων γλουταμικού, όπως οι Dextrorphan και Dextromethorphan, μείωσαν τη νευρολογική βλάβη σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας του νωτιαίου μυελού, αλλά εμφάνισαν παρενέργειες όπως ναυτία, έμετο, αταξία, νυσταγμό και παραισθήσεις. (Terada et al 2001, George et al 1988) Πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε 6-nitro-7-sulfamoyl(f)quinoxaline-2,3-dione (NBQX), πέντε ώρες μετά την YOKΠ, παρουσίασαν καλύτερη βαθμολογία συμπεριφοράς και μικρότερη νευρολογική βλάβη σε σύγκριση με αυτά που δεν έλαβαν τη φαρμακευτική ουσία. (Redmond et al 1995)

Το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide - NO) έχει επίσης ενοχοποιηθεί στη διεγερτοτοξικότητα του γλουταμινικού οξέος και το νευρωνικό κυτταρικό θάνατο. Το NO διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευρική απόπτωση και νέκρωση μετά από YOKΠ. Πειραματικές μελέτες έχουν ερευνησει τη νευροπροστατευτική δράση συγκεκριμένων αναστολέων της συνθάσης του νευρωνικού μονοξειδίου του αζώτου (nNOS αναστολείς). Σε πειραματικό μοντέλο με YOKΠ, τα πειραματόζωα που έλαβαν τον nNOS αναστολέα 7-nitroindazole, παρουσίασαν αναστολή της πρόωρης νευρωνικής απόπτωσης στην ιστολογική μελέτη. (Tseng et 1997) Σε άλλο μοντέλο με YOKΠ, ο αναστολέας nNOS 17477AR μείωσε τη νευρωνική νέκρωση στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε, τα οποία επίσης εμφάνισαν καλύτερη νευρολογική

συμπεριφορά, επίπεδο συνείδησης, κινητική και αισθητική λειτουργία. (Tseng et al 1999)

Τα βαρβιτουρικά είναι τα πιο συχνά χορηγούμενα φάρμακα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως νευροπροστατευτικοί παράγοντες στην ΥΟΚΠ. (Dewhurst et al 2002) Ο κεντρικός μηχανισμός της δράσης τους πιστεύεται ότι αποτελεί η ενίσχυση της καταστολής του εγκεφαλικού μεταβολισμού αλλά και η δράση τους ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών. (Shapiro 1985, Hall et al 1990) Αν και η χρήση τους παραμένει ευρέως διαδεδομένη, έχουν σημαντικές παρενέργειες. Αρχικά, η θειοπεντάλη χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση της ισοηλεκτρικής γραμμής στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα πριν από το αορτικό cannulation και μέχρι το τέλος της εξωσωματικής κυκλοφορίας σε 182 ασθενείς. Οι ασθενείς οι οποίοι έλαβαν τη θειοπεντάλη παρουσίασαν μικρότερη μετεγχειρητική νευροψυχιατρική δυσλειτουργία τη δέκατη μετεγχειρητική μέρα. Εμφάνισαν όμως μεγαλύτερη ανάγκη ινóτροπης υποστήριξης, παρατεταμένο χρόνο αφύπνισης και μεγαλύτερη περίοδο αποσωλήνωσης. (Nussmeier et al 1986) Αντιφατικά αποτελέσματα βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες. Μια προοπτική τυχαιοποιημένη έρευνα χρησιμοποίησε θειοπεντόνη ως νευροπροστατευτικό παράγοντα σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Η μελέτη δεν εντόπισε καμία διαφορά στο ποσοστό εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θειοπεντόνη ή όχι. Πάλι, οι ίδιες παρενέργειες παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που χορηγήθηκε το βαρβιτουρικό. (Zaidan et al 1981) Σε μελέτη ΥΟΚΠ σε πρόβατα, η νατριούχος θειοπεντάλη χορηγήθηκε κατά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας μέχρι την ΥΟΚΠ. Η αναλογία τριφωσφορικής φωσφοκρεατίνης/αδενosίνης κατά τη διάρκεια της ψύξης, ΥΟΚΠ και επαναθέρμανσης, ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα πειραματόζωα που έλαβαν θειοπεντάλη, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα βαρβιτουρικά μπορεί να είναι επιζήμια για την εγκεφαλική λειτουργία. (Siegman et al 1992) Αναφορικά με τα πτητικά αναισθητικά, το desflurane παρουσίασε βελτιωμένη νευρολογική έκβαση σε μοντέλο χοίρου με εξωσωματική κυκλοφορία χαμηλής ροής σε σύγκριση με αναισθητικά φάρμακα που βασίζονται στη φαιντανύλη.

Τα στεροειδή έχουν χρησιμοποιηθεί σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις για τη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης στην εξωσωματική κυκλοφορία. Πολλές πειραματικές μελέτες έχουν αναδείξει την ευεργετική επίδραση των στεροειδών πριν την ΥΟΚΠ, ιδιαίτερα σε υψηλές δόσεις. Ωστόσο, η βέλτιστη χρονική στιγμή και η δοσολογία χορήγησης χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Σε μια τυχαιοποιημένη

μελέτη χοιριδίων, υψηλές δόσεις μεθυλπρεδνιζολόνης πριν την εισαγωγή στην αναισθησία έδειξαν εξασθένηση της φυσιολογικής εγκεφαλικής αντίδρασης στην ισχαιμία μετά από YOKΠ. (Langley et al 2000) Σε περαιτέρω πειραματικές μελέτες, η χορήγηση υψηλής δόσης μεθυλπρεδνιζολόνης προεγχειρητικά παρουσίασε λιγότερο συνολικό οίδημα του σώματος, βελτίωση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών της νευροπροστασίας και μειωμένη φλεγμονώδη αντίδραση σε σύγκριση με τη χορήγηση στεροειδών ως μέρος του αρχικού διαλύματος (prime solution) της εξωσωματικής κυκλοφορίας. (Shum-Tim et al 2001, Shum-Tim et al 2003, Lodge et al 1999) Μείωση των φλεγμονωδών δεικτών έχει επίσης παρατηρηθεί σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε εξωσωματική κυκλοφορία. Ωστόσο, σε πλαίσια μη καρδιοχειρουργικής επέμβασης, η μελέτη χορήγησης κορτικοστεροειδών μετά από σημαντικό τραυματισμό στο κεφάλι (the Corticosteroids After Significant Head Injury-CRASH trial), με περισσότερους από 10.000 ασθενείς με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, σταμάτησε όταν διαπιστώθηκε ότι η ομάδα θεραπείας με κορτικοστεροειδή είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. (Edwards et al 2005)

Μία ποικιλία φαρμακολογικών παραγόντων έχουν επίσης δοκιμαστεί ως νευροπροστατευτικοί. Δεσμευτές ελεύθερων ριζών, όπως η αλλοπουρινόλη και αλφα-φαινυλο-τριπ-βουτυλ-νιτρόνη, έχουν δείξει ότι παρέχουν προστασία στον εγκέφαλο τόσο σε πειραματικές όσο και κλινικές μελέτες. (Palmer et al 1990, Clancy et al 2001, Langley et al 2000) Οι αναστολείς των υποδοχέων θρομβοξάνης A₂ έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά για να μετριαστεί η ισχαιμική βλάβη μετά από περίοδο YOKΠ. (Tsui et al 1997) Δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες κλινικές ή πειραματικές έρευνες σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, οι οποίες χρησιμοποιούν μαννιτόλη. Ωστόσο, έχει χρησιμοποιηθεί περιεγχειρητικά για την πρόληψη της ανάπτυξης ισχαιμικού εγκεφαλικού οιδήματος. (Dewhurst et al 2002, Hirotsani et al 2000) Σε δύο αναλύσεις τυχαίοποιημένων μελετών σε επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης διαπιστώθηκε ότι η απροτινίνη έχει συσχετιστεί με χαμηλότερο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου. (Sedrakyan et al 2004, Royston et al 2006) Ωστόσο, μια πολυκεντρική, τυχαίοποιημένη, τυφλή μελέτη, η Blood Conservation Using Antifibrinolytics in a Randomized Trial (BART), τερματίστηκε πρόωρα εξαιτίας του υπερβολικού κινδύνου θανάτου στην ομάδα απροτινίνης σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, οι οποίες έλαβαν είτε ε-αμινοκαπροϊκό οξύ ή τρανεξαμικό οξύ. Επί τη βάση αυτής της έρευνας, η απροτινίνη έχει πλέον αποσυρθεί. (Fergusson et al 2008) Υπάρχουν

αυξανόμενες ενδείξεις ότι η ερυθροποιητίνη παρέχει νευροπροστατευτική δράση σε διάφορες συνθήκες νευρωνικής βλάβης, όπως η υποξία και η εγκεφαλική ισχαιμία. Σε μοντέλο ΥΟΚΠ με χοίρους, η ερυθροποιητίνη φαίνεται να έχει κάποιες ευεργετικές νευροπροστατευτικές επιδράσεις. (Givvehchian et al 2010) Η λαμοτριγίνη και βαλπροϊκό έχουν παρουσιάσει επίσης βελτιωμένα νευρολογικά και ιστολογικά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα με ΥΟΚΠ. Η κυκλοσπορίνη Α έχει χρησιμοποιηθεί από την ομάδα του Mount Sinai ως νευροπροστατευτικός παράγοντας πριν από ΥΟΚΠ. (Hagl et al 2001, Strauch et al 2005)

Ο κυτταρικός θάνατος μετά από ισχαιμία μπορεί να μειωθεί από προϊσχαιμικές καταστάσεις που επάγουν την ισχαιμική ανοχή. Πολυάριθμα προϊσχαιμικά ερεθίσματα έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά, μεταξύ των οποίων σύντομα επεισόδια ισχαιμίας, υποξίας ή υπερθερμίας και χαμηλές δόσεις της ενδοτοξίνης λιποπολυσακχαρίτη ή της μιτοχονδριακής τοξίνης 3-νιτροπροπιονικό οξύ. Δυστυχώς, κανένα από αυτά τα σχήματα είναι κατάλληλα για κλινική χρήση, λόγω των σοβαρών παρενεργειών τους. (Brambrink et al 2006) Έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση διαζοξειδης μπορεί να βελτιώσει τόσο τη νευρολογική έκβαση όσο και την ιστολογία του εγκεφάλου σε μελέτες σε πειραματόζωα. (Caparrelli et al 2002, Grilli et al 1996) Το γνωστό αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη της ομάδας των μακρολίδων χρησιμοποιήθηκε ως φαρμακευτική προετοιμασία-προγύμναση (pharmacological preconditioning) για την πρόκληση ανοχής ενάντια στην παροδική και καθολική εγκεφαλική ισχαιμία. Η προετοιμασία με αυτό το φάρμακο προκάλεσε ανοχή έναντι της υποξίας *in vitro*. (Huber et al 1999) Η προετοιμασία με ερυθρομυκίνη βελτίωσε επίσης τη νευρολογική λειτουργία και τη νευρωνική επιβίωση μετά από ισχαιμία *in vivo* και συσχετίστηκε παροδικά με αυξημένη εγκεφαλική έκφραση του γονιδίου *bcl-2* σε αρουραίους. (Brambrink et al 2006) Επίσης, άλλαξε και την προδιάθεση του εγκεφάλου να εκφράσει επιζήμια γονίδια ως απάντηση στην ισχαιμία. (Koerner et al 2007)

9. Η Ερυθρομυκίνη ως Νευροπροστατευτικός Παράγοντας

Παρά τις προφανείς επιβλαβείς επιπτώσεις της παρατεταμένης έκθεσης στην εξωσωματική κυκλοφορία στη λειτουργία και τη δομή του εγκεφάλου, οι νευροπροστατευτικές στρατηγικές εξακολουθούν να αποτελούν θέμα συζήτησης. Υπάρχει, επίσης, αντιπαράθεση απόψεων σχετικά με την προστασία του εγκεφάλου

πάνω σε βασικά θέματα που αφορούν και την YOKΠ. (McCullough et al 1999, Ehlich et al 2002, Strauch et al 2005, Ananiadou et al 2007, Ananiadou et al 2008, Brambrink et al 2006) Η προ-ισχαιμική προετοιμασία (pre-ischemic conditioning) έχει από καιρό αναγνωριστεί ως ισχυρό μέσο για την επαγωγή ανοχής έναντι της εγκεφαλικής ισχαιμίας και τη μείωση του νευρωνικού θανάτου και των λειτουργικών βλαβών μετά από ισχαιμική βλάβη. Όπως αναφέρθηκε, ορισμένα παραδοσιακά σχήματα ισχαιμικής προετοιμασίας μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων συντόμων επεισοδίων ισχαιμίας ή υπερθερμίας, η υποξία, μικρές δοσολογίες της ενδοτοξίνης lipopolysaccharide ή της μιτοχονδριακής τοξίνης 3-nitropropionic acid δεν αποδείχτηκαν κατάλληλα στην κλινική χρήση λόγω των σοβαρών παρενεργειών τους. Στην ερευνητική μας μελέτη χρησιμοποιούμε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο παρατεταμένης YOKΠ σε χοίρους σε θερμοκρασία 18 °C χρησιμοποιώντας ένα γνωστό αντιβιοτικό, την ερυθρομυκίνη, ως φαρμακευτική προετοιμασία-προγύμναση (pharmacological preconditioning).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μια εφάπαξ δόση αυτού του μακρολιδίου αντιβιοτικού μπορεί να επάγει ανοχή έναντι της εγκεφαλικής ισχαιμίας *in vivo* μέσω φαρμακολογικής προετοιμασίας. (Koerner et al 2007) Επιπλέον, αρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι μία και μόνο κλινικά αποδεκτή δόση ερυθρομυκίνης 6-24 ώρες πριν από την εγκεφαλική ισχαιμία μείωσε το νευρωνικό θάνατο στον ιππόκαμπο και τον βρεγματικό νεοφλοιό. (Brambrink et al 2006)

Επομένως, η ερυθρομυκίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο και υποψήφιο για κλινική εφαρμογή, φάρμακο για την επαγωγή της ανοχής σε συνθήκες με υψηλό κίνδυνο για εγκεφαλική ισχαιμία, όπως κατά τη διάρκεια καρδιοχειρουργικής επέμβασης. Αρχικά, αυτό αποδίδεται στα πρώτα στοιχεία που δείχνουν ότι η ερυθρομυκίνη έχει σημαντική ικανότητα να επηρεάζει την εγκεφαλική ισχαιμική ανοχή. Επιπλέον, η ερυθρομυκίνη είναι ένα φάρμακο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην κλινική πράξη με λίγες παρενέργειες. Επομένως, αμφότερες οι ανωτέρω παρατηρήσεις το τοποθετούν ως ένα εξαιρετικό υποψήφιο για επαγωγή της ισχαιμικής ανοχής. Δεν έχουν όμως προσδιοριστεί ακόμη οι μοριακοί μηχανισμοί που βρίσκονται πίσω από αυτή τη φαρμακολογική δράση. Ορισμένα σχήματα προετοιμασίας με ερυθρομυκίνη έχουν συσχετιστεί με *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση μέσω προσαρμοσμένης μεταγραφής του γονιδίου, υποδηλώνοντας ότι η ερυθρομυκίνη μπορεί να δρα στο μεταγραφικό επίπεδο. (Brambrink et al 2006, Koerner et al 2007)

Η ερυθρομυκίνη αποτελεί ένα μη-τοξικό και ασφαλές φάρμακο με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα. Ο μηχανισμός δράσης της είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης των βακτηρίων. Δεσμεύεται στην 50S υπομονάδα των ριβοσωμάτων και εμποδίζει τη μεταφορά ή και τη μετάθεση των πεπτιδίων. Αναστέλλει τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση και μειώνει την κυτταρική αναπνοή με τη μείωση της παραγωγής των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη βέλτιστη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας. Διαταραχή της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μετά την εφαρμογή μιας και μόνο δόσης ερυθρομυκίνης προκαλεί ήπια «έκρηξη» των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα νευρωνικά κύτταρα, γεγονός το οποίο στη συνέχεια μπορεί να επάγει την έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων (π.χ. bcl-2). Επιπλέον, η θεωρία ότι η ερυθρομυκίνη μπορεί να επηρεάσει διάφορους φλεγμονώδεις μηχανισμούς απαιτεί περαιτέρω ερευνητική μελέτη. (Brambrink et al 2006) Η διαπερατότητά της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι 1-12% για τις φυσιολογικές μήνιγγες και μέχρι 25% στις φλεγμαίνουσες. (Imshenetskaia 1976) Μικρές συγκεντρώσεις της ερυθρομυκίνης διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης αύξηση της διαπερατότητας και διάρρηξής του κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας και του YOKΠ. (Bokesch 1999, Cavaglia et al 2004) Τα μέγιστα επίπεδά της στον ορό είναι 5 ώρες ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό 8 ώρες μετά τη χορήγησή της.

Όπως αναφέρθηκε, πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι η φαρμακολογική προετοιμασίας με μία, κλινικά αποδεκτή δόση (25 mg/kg) ερυθρομυκίνης (12 ώρες προ της ισχαιμίας), προκαλεί ανοχή μετά από παροδική καθολική εγκεφαλική ισχαιμία σε αρουραίους. (Koerner et al 2007) Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο καταλληλότερος τρόπος χορήγησης της ερυθρομυκίνης είναι ενδοφλεβίως, μία και μόνο δόση 25mg/kg είναι αρκετή, 12 ώρες πριν την καθολική ισχαιμία. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η φαρμακοκινητική στους χοίρους είναι παρόμοια με τους αρουραίους, επιλέξαμε να χορηγήσουμε την ερυθρομυκίνη ενδοφλεβίως, πιστεύοντας ότι θα οδηγήσει σε υψηλότερα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα και επιπλέον είναι πιο κοντά στην κλινική πρακτική. (Burrows et al 1989, Kinoshita et al 1995, Duthu 1985) Τα ανωτέρω δεδομένα χορήγησης της ερυθρομυκίνης στο πειραματικό μας μοντέλο επιβεβαιώθηκαν μετά από προσωπική επικοινωνία με την Καθηγήτρια Koerner (κύρια συγγραφέας των άρθρων που εισήγαγαν την ερυθρομυκίνη ως μέσο νευροπροστασίας). Η κυρία Koerner μας βοήθησε στην οργάνωση του πρωτοκόλλου προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες και βιβλιογραφία σχετικά με την

ερυθρομυκίνη και ενθαρρύνοντάς μας να συνεχίσουμε τη μελέτη. Ως εκ τούτου, για την παρούσα μελέτη επελέγη μία και μόνο δοσολογία των 25 mg/kg, η οποία αποτελεί και μια αποδεκτά κλινική δόση. Επίσης, με βάση προηγούμενες μελέτες, ο εγκέφαλος φαίνεται να λαμβάνει τη μέγιστη προστασία από την ερυθρομυκίνη, 12 ώρες πριν την ισχαιμία. (Brambrink et al 2006)

10. Η Χρήση των Πειραματικών Μοντέλων στην Βιοϊατρική 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 βιοϊατρικής 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 υπόψιν 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 πειραματόζωων, 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 τρεις δεκαετίες, ο χοίρος, και συγκεκριμένα το γένος *Sus scrofa domestic*, 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

μεσοπλευρίο 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 προϋπαρξη 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 αγγειοσπασμό 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 επιμηκυσμένο 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)

11. Σκοπός

Η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση αποτελεί μέθοδο στη χειρουργική προσπέλαση ποικίλων πολύπλοκων καρδιαγγειακών ανωμαλιών, συγγενών και

επίκτητων, και ιδίως στη χειρουργική 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. Παρόλα 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 αρχή 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 ΥΟΚΠ 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, χορειαθετωσικές κινήσεις και διαταραχές διανοητικής ανάπτυξης.

Οι ιδανικές συνθήκες για τη 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 η φαρμακευτική προστασία του εγκεφάλου. Στην ερευνητική μας μελέτη χρησιμοποιούμε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο παρατεταμένης ΥΟΚΠ σε χοίρους σε θερμοκρασία 18 °C χρησιμοποιώντας ένα γνωστό αντιβιοτικό, την ερυθρομυκίνη, ως φαρμακευτική προετοιμασία-προγύμναση (pharmacological preconditioning). Είναι ένα από τα πιο ατοξικά και ασφαλή φάρμακα με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα. Ο μηχανισμός δράσης της είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης των βακτηρίων. Ενώνεται με την 50S υπομονάδα των ριβοσωμάτων και εμποδίζει τη μεταφορά ή και τη μετάθεση των πεπτιδίων. Η διαπερατότητά της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι 1-12% για τις φυσιολογικές μήνιγγες και μέχρι 25% στις φλεγμαίνουσες. Μικρές συγκεντρώσεις της ερυθρομυκίνης διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης αύξηση της διαπερατότητας και διάρρηξής του κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας και του ΥΟΚΠ. Τα μέγιστα επίπεδά της στον ορό είναι 5 ώρες ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό 8 ώρες μετά τη χορήγησή της. Σύμφωνα με την

βιβλιογραφία ο καταλληλότερος τρόπος χορήγησης της ερυθρομυκίνης είναι ενδοφλεβίως, μία και μόνο δόση 25mg/kg είναι αρκετή, 12 ώρες πριν την καθολική ισχαιμία. (Burrows et al 1989, Kinoshita et al 1995, Duthu 1985) Μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση της ερυθρομυκίνης ως pharmacological preconditioning προκαλεί ανοχή στην εγκεφαλική ισχαιμία επιδρώντας κυρίως στα γονίδια συγκεκριμένων πρωτεϊνών (stress response and inflammatory genes) και αλλάζει ουσιαστικά το γονιδιακό υλικό μειώνοντας την παραγωγή τους σε ισχαιμία. (Brambrink et al 2006, Koerner et al 2007) Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι πρωτίστως να αναδείξει την ενεργοποίηση του αποπτωτικού νευρωνικού κυτταρικού θανάτου άμεσα μετά την ισχαιμία, 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 - προστασία, που προκύπτουν από τη χορήγηση της ερυθρομυκίνης. Συγκεκριμένα, θα διερευνηθεί αν η χρήση της ερυθρομυκίνης συσχετίζεται με μειωμένη απόπτωση στον εγκέφαλο μετά από ΥΟΚΠ. Τα αποτελέσματα αυτής της εκτίμησης θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ΥΟΚΠ και πιθανώς να επηρεάσουν τα πρωτόκολλα που αφορούν τη δυνατότητα νευροπροστατευτικών παρεμβάσεων στο μέλλον.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Το παρακάτω ερευνητικό πρωτόκολλο εφαρμόζεται σε χοίρους στο Πειραματικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Παπαγεωργίου». Η αντιμετώπιση των πειραματόζωων τόσο κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού τους όσο και κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων αλλά και η διαδικασία θανάτωσής τους είναι σύμφωνες 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, revised 1996) και είναι επίσης σύμφωνη με την Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία (Αριθμός Πρωτοκόλλου 13/138, 11/01/2010, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Θεσσαλονίκης, Διεύθυνση Κτηνιατρικής).

1. Διαχωρισμός των Ομάδων

Τα πειραματόζωα χωρίζονται σε τρεις ομάδες:

Ομάδα ERY (n=8). Μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας επιτυγχάνεται βαθιά υποθερμία στους 18 °C (43.3 λεπτά). Στη συνέχεια πραγματοποιείται υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση στους 18 °C για 75 λεπτά. Ακολουθεί επαναθέρμανση στους 36 °C και θανάτωση του πειραματόζωου (62.8 λεπτά). 12 ώρες πριν την κύρια ισχαιμία (YOKΠ) χορηγείται Erythromycin lactobionate, 25mg/kg i.v., μία και μόνο δόση (εφάπαξ).

Ομάδα VEH (n=6). Μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας επιτυγχάνεται βαθιά υποθερμία στους 18 °C (44.2 λεπτά). Στη συνέχεια πραγματοποιείται υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση στους 18 °C για 75 λεπτά. Ακολουθεί επαναθέρμανση στους 36 °C και θανάτωση του πειραματόζωου (55.3 λεπτά). 12 ώρες πριν την κύρια ισχαιμία (YOKΠ) χορηγείται vehicle Normal Saline 0.9% i.v.

Ομάδα ελέγχου με τα φυσιολογικά ζώα – NORMAL CONTROL (CTL) (n=3). Δεν εκτελείται καμία χειρουργική παρέμβαση. Πραγματοποιείται εισαγωγή στην αναισθησία, διασωλήνωση για 215 λεπτά περίπου (3 ώρες και 35 λεπτά) και στη συνέχεια θανάτωση του πειραματόζωου.

2. Προεγχειρητική Προετοιμασία και Αναισθησιολογικό Πρωτόκολλο

Στη μελέτη μας χρησιμοποιούμε δεκαεπτά (17) χοίρους βάρους 30-45 κιλών και ηλικίας 3-4 μηνών, οι οποίοι είναι νευρολογικά ώριμοι. Στα πειραματόζωα εφαρμόζεται προαναισθητική στέρηση τροφής για 12 ώρες και νερού για 2 ώρες. Πριν την εισαγωγή στην αναισθησία, ως προαναισθητική αγωγή χορηγούνται δεξ-μεδετομιδίνη (10 µg/kg), μιδαζολάμη (0,1 mg/kg) και βουτορφανόλη (0,1 mg/kg) ενδομυϊκώς.

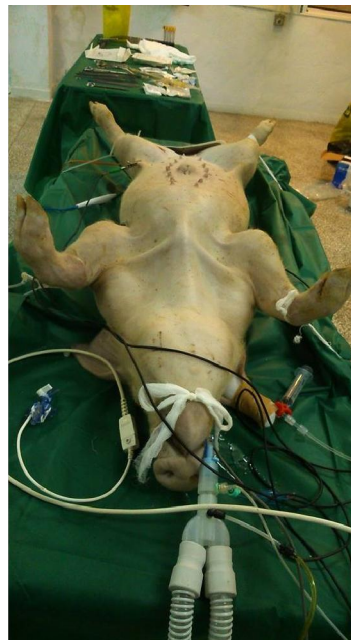
Ύστερα από 20 λεπτά τα πειραματόζωα μεταφέρονται στην αίθουσα χειρουργείου και τοποθετούνται σε ύπτια θέση. Παρακολουθούνται η καρδιακή συχνότητα και ο ρυθμός με συνεχή καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος καθώς και ο κορεσμός του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα με οξύμετρο. Εξασφαλίζονται δύο φλεβικές γραμμές διαδερμικά σε δύο φλέβες των πτερυγίων των ώτων με φλεβοκαθετήρες 20-22 Gauge για τη χορήγηση παρεντερικών διαλυμάτων και γενικής αναισθησίας. (Εικόνα 4)

Η εισαγωγή στην αναισθησία πραγματοποιείται με τη χορήγηση προποφόλης (2-6 mg/kg), ενδοφλεβίως. Μετά από την ενδοτραχειακή διασωλήνωση με σωλήνα μεγέθους 5-6mm με cuff, οι χοίροι αερίζονται μηχανικά με 100% οξυγόνο. (Εικόνα 5) Η αναισθησία διατηρείται με σεβοφλουράνιο 3-4%. Μετά από χειρουργική αποκάλυψη τοποθετείται καθετήρας αρτηριακής γραμμής στην αριστερή μηριαία αρτηρία για τη μέτρηση συνεχούς αιματικής αρτηριακής πίεσης και τη λήψη δειγμάτων για την εκτίμηση των αερίων αίματος. Τοποθετείται ειδικό θερμόμετρο στο φάρυγγα για τον έλεγχο της θερμοκρασίας σώματος. Γίνεται παρακολούθηση της διούρησης διαρκώς με την τοποθέτηση ουροκαθετήρα.

Εικόνα 4. Εξασφάλιση φλεβικής πρόσβασης



Εικόνα 5. Διασωλήνωση και μηχανικός αερισμός



Ο ρυθμός στον αναπνευστήρα (12-15/min) και ο αναπνευστικός όγκος (300-400 ml) προσαρμόζονται ώστε να διατηρήσουν την μερική τάση του CO₂ (PaCO₂) σε 40 mmHg. Μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας η διαχείριση των αρτηριακών αερίων αίματος (Cobas b 221 blood gas system, Roche Diagnostics, Ltd, Hellas AE) γίνεται με την χρήση της μεθόδου alpha-stat, όπου η μερική τάση του CO₂ παραμένει αδιόρθωτη κατά τη διάρκεια της υποθερμίας και το pH εμφανίζεται αυξημένο (αλκαλικό), ενώ η μερική τάση του O₂ (PaO₂) διατηρείται >100mmHg. Ο αιματοκρίτης κατά την διάρκεια της εξωσωματικής κυκλοφορίας είναι 15-24%.

3. Χειρουργικό Πρωτόκολλο στις Ομάδες ERY και VEH

Για τις ομάδες ERY και VEH ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο. Μετά από διατομή του δέρματος και του υποδορίου ιστού πραγματοποιείται μέση στερνοτομή με τη χρήση ισχυρού ψαλιδιού και ηλεκτροδιαθερμίας. Στη συνέχεια χορηγείται κλασική ηπαρίνη σε δοσολογία 300UI/kg έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης ηπαρινισμός. Τοποθετείται διαστολέας διάνοιξης του στέρνου. Διανοίγεται ο περικαρδιακός σάκος και τοποθετούνται ράμματα ανάρτησης του περικαρδίου (4/0 μετάξι, SILK) αριστερά και δεξιά του χειρουργικού πεδίου. Παρασκευάζεται ο περιαορτικός ιστός της πρόσθιας επιφάνειας της ανιούσης αορτής μέχρι το ύψος του αορτικού τόξου. Τοποθετούνται ράμματα πολυπροπυλενίου PROLENE 4/0 τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως περιπάρσεις (δύο ομόκεντρες περιπάρσεις στο περιφερικό τμήμα της ανιούσης αορτής, μία στο μέσο τριτημόριό της, μία στο ωτίο του δεξιού κόλπου και μία περίπαρση στην κορυφή της αριστερής κοιλίας). Λαμβάνεται δείγμα αίματος για τη μέτρηση του χρόνου ενεργής πήξης (activated clotting time – ACT). Τιμή ACT > 480 δευτερόλεπτα επιτρέπει το cannulation και την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Το κύκλωμα της εξωσωματικής κυκλοφορίας έχει προετοιμαστεί μετά από έγχυση 1lt διαλύματος Ringers, 50 ml μαννιτόλης και 5000 IU ηπαρίνης. Έπειτα εκτελείται το cannulation της ανιούσης αορτής με αρτηριακή κάνουλα με μεταλλικό άκρο 16 Fr (Sarns). Το cannulation του δεξιού κόλπου πραγματοποιείται με φλεβική κάνουλα διπλού επιπέδου 32X40 Fr (Baxter Healthcare Corporation, Baxter Research Medical Inc. RMI). Στη συνέχεια τοποθετείται καθετήρας στην ανιούσα αορτή 9 Fr με βελόνα εισαγωγής 24 Gauge (Edwards Lifesciences) δια μέσω του οποίου διοχετεύεται καρδιοπληγία στο μυοκάρδιο και αναρροφάται αίμα και αέρα βοηθώντας στην αποσυμπίεση της αριστερής κοιλίας. Ο

χρόνος από τη διασωλήνωση του χοίρου μέχρι την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας υπολογίζεται σε 45 λεπτά.

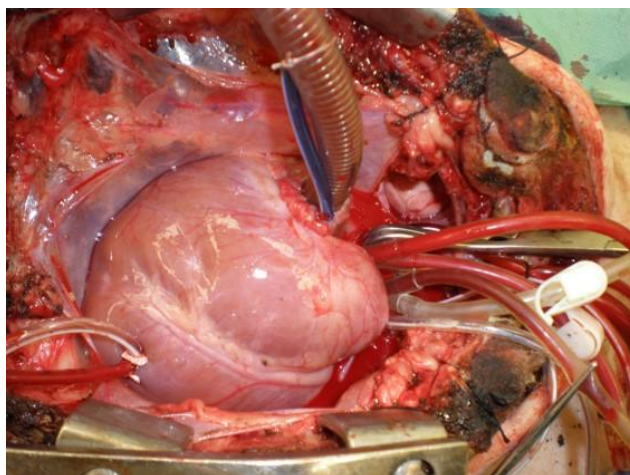
Ακολουθεί η έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας με μη σφυγμική ροή και ρυθμό ροής 100ml/kg/min (2.5 - 3 Lt/min/m²), ο οποίος προσαρμόζεται αναλόγως ώστε η μέση αρτηριακή πίεση να

διατηρείται σε επίπεδα 60-70 mmHg. Για να αποφευχθεί η διάταση της αριστερής κοιλίας κατά την εξωσωματική κυκλοφορία εισάγεται καθετήρας αποσυμπίεσης 9 Fr μέσω της κορυφής της αριστερής κοιλίας. Η θερμοκρασία σώματος μετρείται με θερμοηλεκτρικό ηλεκτρόδιο στο φάρυγγα. Επίσης υπάρχει αναρρόφηση της εξωσωματικής μηχανής για την συλλογή του ηπαρινισμένου αίματος που τυχόν συγκεντρώνεται στον περικαρδιακό και υπεζωκοτικό χώρο. (Εικόνα 6)

Μετά την έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας και τον αποκλεισμό της ανιούσης αορτής με λαβίδα αποκλεισμού (aortic cross clamp) ακολουθεί η ψύξη του χοίρου μέχρι η ρινοφαρυγγική θερμοκρασία φτάσει τους 18 °C. Η ψύξη διαρκεί περίπου 43 - 44 λεπτά και πραγματοποιείται αργά και σταθερά, ώστε να αποφευχθεί άνοδος της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης. Η προστασία του μυοκαρδίου επιτυγχάνεται με τη χορήγηση καρδιοπληγίας δια μέσω του καθετήρα στην ανιούσα αορτή και με την εξωτερική έγχυση παγωμένου φυσιολογικού ορού (4 °C) τοπικά στο μυοκάρδιο.

Όταν η θερμοκρασία φτάνει τους 18 °C, η εξωσωματική κυκλοφορία παύει και εισάγεται η YOKΠ για 75 λεπτά. Στη σταθερή

Εικόνα 6. Cannulation αορτής/δεξιού κόλπου



Εικόνα 7. Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση



διατήρηση της θερμοκρασίας του εγκεφάλου κατά την διάρκεια της YOKΠ συμβάλλει η τοποθέτηση παγοσακούλων επιφανειακά γύρω από την κεφαλή. (Εικόνα 7)

Μετά το πέρας της YOKΠ, η εξωσωματική κυκλοφορία ξεκινά εκ νέου με σταδιακή επαναθέρμανση έως τους 36 °C (θερμοκρασία ρινοφάρυγγα) και συνεχίζεται για περίπου 55 - 63 λεπτά (Σύνολο πειράματος 215 λεπτά). Κατά την διάρκεια της επαναθέρμανσης χρειάζονται συνήθως μικρές δόσεις ινοτρόπων φαρμάκων και έγχυσης κρυσταλλοειδών διαλυμάτων ώστε να διατηρείται η μέση αρτηριακή πίεση σε επίπεδα 60-70 mmHg. Στη συγκεκριμένη χρονική περίοδο και δια μέσω της αριστερής υπεζωκοτικής κοιλότητας παρασκευάζεται το κεντρικότερο σημείο της κατιούσης θωρακικής αορτής σε όλη την περίμετρό της και περιβρογχίζεται με φακαρόλα.

Στην ομάδα NORMAL CONTROL δεν εκτελείται καμία χειρουργική παρέμβαση. Πραγματοποιείται εισαγωγή στην αναισθησία, διασωλήνωση για 215 λεπτά περίπου (3 ώρες και 35 λεπτά) και στη συνέχεια θανάτωση του πειραματόζωου.

4. Εγκεφαλική διήθηση και μονιμοποίηση

Το κάθε πειραματόζωο της ομάδας ERY και VEH θανατώνεται μετά από την επαναθέρμανση και την έξοδο από την εξωσωματική κυκλοφορία. Ένα lt παγωμένου διαλύματος PBS (phosphate buffered solution, pH 7.4) και στη συνέχεια 1lt διαλύματος παραφορμαλδεύδης 4% με PBS (pH 7.4) εγχέονται στην ανιούσα αορτή (δια μέσω της αορτικής cannula) μετά από αποκλεισμό της κατιούσης αορτής με λαβίδα αποκλεισμού, ώστε να μονιμοποιηθεί ο εγκέφαλος in situ. Στην συνέχεια με τη βοήθεια αρχικά οστεοτόμου και έπειτα ανατομικής λαβίδας, dissector και ψαλιδιού διατομής ιστών, ο εγκέφαλος αφαιρείται en bloc από το κρανίο και αφού πρώτα βυθίζεται επανειλημμένα σε ένα πρώτο δοχείο με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% με PBS (pH 7.4), στη συνέχεια τοποθετείται σε δεύτερο δοχείο με το ίδιο διάλυμα, το οποίο φυλάσσεται στους 4 °C. (Εικόνα 8) Η χρονική περίοδος αφαίρεσης του εγκεφάλου

Εικόνα 8. En bloc αφαίρεση του εγκεφάλου



υπολογίζεται σε 20 περίπου λεπτά. Στην περίπτωση των πειραματόζωων της ομάδας C τα ζώα θανατώνονται αμέσως μετά την έλευση των 215 λεπτών, αφαιρείται ο εγκέφαλος en bloc και με παρόμοια μέθοδο τοποθετείται επίσης σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% με PBS, το οποίο φυλάσσεται στους 4 °C.

5. Πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων και χρόνου αιμοληψιών

Για τις ομάδες ERY και VEH, οι μετρήσεις της θερμοκρασίας, των αιμοδυναμικών παραμέτρων (καρδιακή συχνότητα και μέση αρτηριακή πίεση), η διούρηση και η λήψη αερίων αίματος (από τα οποία προσδιορίζονται pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, K⁺, Na⁺, αιματοκρίτης, γαλακτικό οξύ, σάκχαρο) πραγματοποιούνται σε πέντε χρονικά σημεία κατά την διάρκεια του πειράματος:

1. Baseline – πριν τη διασωλήνωση.
2. Έναρξη της εξωσωματικής κυκλοφορίας (στους 37 °C).
3. Έναρξη της YOKΠ (στους 18 °C).
4. Τέλος της YOKΠ (στους 18 °C).
5. Επαναθέρμανση στους 36 °C και τέλος του πειράματος.

Για την ομάδα NORMAL CONTROL, οι μετρήσεις της θερμοκρασίας, των αιμοδυναμικών παραμέτρων (καρδιακή συχνότητα και μέση αρτηριακή πίεση), η διούρηση και η λήψη αερίων αίματος (από τα οποία προσδιορίζονται pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, K⁺, Na⁺, αιματοκρίτης, γαλακτικό οξύ, σάκχαρο) πραγματοποιούνται σε τρία χρονικά σημεία κατά την διάρκεια του πειράματος:

1. Baseline – πριν τη διασωλήνωση.
2. Μετά την εισαγωγή στην αναισθησία και τη διασωλήνωση.
3. Αμέσως πριν την αποσωλήνωση – τέλος πειράματος.

Επιπλέον, συλλέγεται ορός αίματος σε φιαλίδιο βιοχημικού ελέγχου για μελλοντικό προσδιορισμό βιοδεικτών εγκεφαλικής βλάβης (brain injury biomarkers). Για τις ομάδες ERY και VEH ο ορός αίματος συλλέγεται σε δύο χρονικά σημεία:

- S₁. Baseline – πριν τη διασωλήνωση (0 min).
- S₂. Επαναθέρμανση στους 35-36 °C – τέλος πειράματος (215 min).

Για την ομάδα NORMAL CONTROL ο ορός αίματος συλλέγεται:

- S₁. Baseline – πριν τη διασωλήνωση (0 min).
- S₂. Αμέσως πριν την αποσωλήνωση – τέλος πειράματος. (215 min).

Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται και φυλάσσονται σε φιαλίδια erpendorfs σε βαθιά ψύξη στους -70°C .

Πίνακας 3. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΧΟΙΡΟΥ: ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:

ΒΑΡΟΣ: ΗΛΙΚΙΑ: ΓΕΝΟΣ:

	1. Baseline	2. Init. CPB 37 °C	3. Init. Circ. Arrest 18 °C	4. End Circ. Arrest 18 °C	5. End CPB 35-36 °C
Mean Arterial Pressure					
Heart Rate					
Glu					
pH					
PO ₂					
PCO ₂					
HCO ₃ ⁻					
Htc					
K ⁺					
Na ⁺					
Lac					
Pump Flow					
FiO ₂					
Urine Output					

ΣΧΟΛΙΑ

1. ΑΝΑΓΚΗ ΙΝΟΤΡΟΠΗΣ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗΣ:

2. ΕΓΧΥΣΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΙΑΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ:

3. ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΚΡΑΝΙΟ:

6. Ιστοπαθολογική Προετοιμασία

Ο εγκέφαλος κόπηκε στα δύο ημισφαίρια. (Εικόνα 9) Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε μόνο το αριστερό ημισφαίριο και συγκεκριμένα το νεοφλοιό ως υπό μελέτη περιοχή. Η επιλογή της συγκεκριμένης εγκεφαλικής περιοχής βασίστηκε σε παλαιότερα στοιχεία μας. Υπό το φως των προηγούμενων αποτελεσμάτων μας (Ananiadou et al 2007), αναδεικνύεται μία επιλεκτική ευπάθεια του νεοφλοιού στην ήπια εγκεφαλική ισχαιμία, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στο πειραματικό μοντέλο μας. Ως εκ τούτου, υποθέσαμε ότι η χορήγηση μίας συγκεκριμένης δόσης ερυθρομυκίνης δώδεκα ώρες πριν από την έναρξη της ΥΟΚΠ θα μειώσει την παρουσία αποπτωτικών νευρώνων στο νεοφλοιό. 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 (H&E) 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.

Εικόνα 9. Τα δύο ημισφαίρια του χοίρειου εγκέφαλου



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

7. Ιστολογική Εκτίμηση - Σύστημα Ταξινόμησης

Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E)

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 η νευρωνική βλάβη καταγράφηκε με την ύπαρξη ηωσινοφιλικού κυτταροπλάσματος, κενотоπίων, ρίκνωσης του κυττάρου και πυκνωτικού πυρήνα ή την απουσία πυρήνα (νευρώνες φαντάσματα). Επίσης αξιολογήθηκε και η ύπαρξη αιμορραγίας, φλεγμονής και εμφράκτων.

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).

8. Ιστολογική Εκτίμηση - Σύστημα Ταξινόμησης

Μέθοδος TUNEL για την κατάτμηση του DNA

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 πρωτεΐνάση 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 σωμάτια 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 5, 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: λιγότερο από 10% TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 2: 10 έως 25% TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 3: 25 έως 50% TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 4: 50 έως 75% TUNEL(+) κύτταρα

Βαθμός 5: πάνω από 75% 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).

9. 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 (SD - standard deviation).

Για τις δέκα φυσιολογικές μεταβλητές (μέση αρτηριακή πίεση, αρτηριακό pH, PO₂, PCO₂, HCO₃⁻, K⁺, Na⁺, αιματοκρίτης, γαλακτικό οξύ και γλυκόζη ορού) στις ομάδες ERY και VEH υπήρχαν δύο ερωτήματα. Το πρώτο ερώτημα ήταν να υπολογιστεί 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 ERY και VEH. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων αξιολογήθηκαν από τα ανεξάρτητα δείγματα *t* test ή το Mann-Whitney U test. Ένα γενικό γραμμικό μοντέλο για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με έναν (μεταξύ των μεταβλητών) παράγοντα (ομάδα) και έναν (εντός των μεταβλητών) παράγοντα (χρόνος), χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση τυχόν διαφορών στις επαναλαμβανόμενες μετρούμενες μεταβλητές.

Οι διαφορές στα σκορ της χρώσης Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης και της μεθόδου TUNEL μεταξύ των δύο ομάδων συγκρίθηκαν με την στατιστική δοκιμασία ανάλυσης μεταβλητότητας (ANOVA) ακολουθούμενη από την Fisher Protected Least Significance Difference (PLSD) post hoc analysis. Η τιμή του $p \leq 0,05$ θεωρήθηκε σημαντική.

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

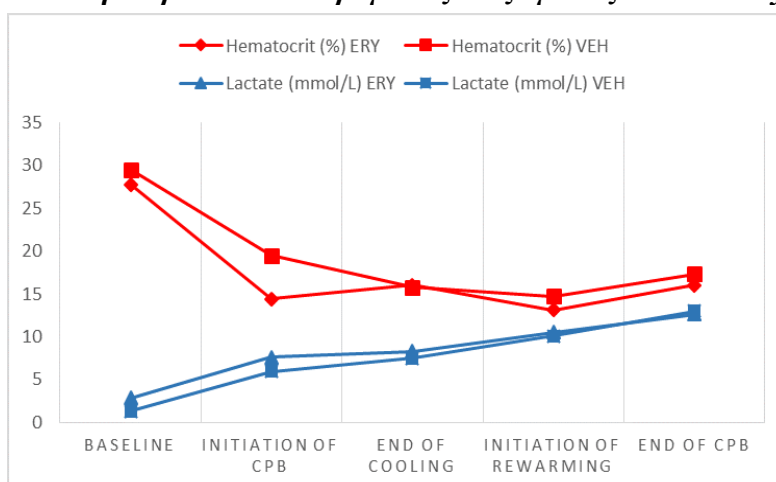
1. Φυσιολογικές και μεταβολικές παράμετροι

Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν του χειρουργικού πρωτοκόλλου, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το προεγχειρητικό βάρος σώματος και η ηλικία δεν διέφερε μεταξύ των πειραματικών ομάδων (Ery, Veh και CTL - Βάρος Σώματος: 34.4 ± 8.2 , 33.3 ± 5.2 και 32.5 ± 6.5 kg, αντίστοιχα και ηλικία: 112.5 ± 26.6 , 120 ± 22.8 και 107.5 ± 15 ημέρες, αντίστοιχα). Η μέση διάρκεια (\pm SD) της ψύξης μέχρι τους 18° C για τα ζώα στις ομάδες Ery και Veh ήταν 43.3 ± 7.3 και 44.2 ± 5.3 λεπτά, αντίστοιχα (t test, $P = 0.57$). Επίσης, δεν υπήρχε διαφορά στη μέση διάρκεια της επαναθέρμανσης για τα ζώα στις δύο αυτές ομάδες, οι οποίες ήταν 62.6 ± 9.4 και 55.3 ± 6.1 λεπτά, αντίστοιχα. Η εξωσωματική κυκλοφορία πραγματοποιήθηκε με ρυθμό ροής 2.2 ± 0.2 lt/min/m² στην ομάδα Ery και 2.6 ± 0.4 lt/min/m² στην ομάδα Veh.

Οι περιεγχειρητικές φυσιολογικές μεταβλητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Αν και υπήρχαν κάποιες μικρές φυσιολογικές παραλλαγές στις μεταβλητές μεταξύ των ομάδων Ery και Veh, δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς και κλινικά σχετικές αιμοδυναμικές διαφορές. Ειδικότερα, τα επίπεδα pCO₂ (χαμηλότερο pH) και τα επίπεδα του αιματοκρίτη ήταν υψηλότερα στην ομάδα Veh σε σύγκριση με την ομάδα Ery κατά την έναρξη της Ε/Κ. Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος ήταν υψηλότερα κατά την έναρξη και του νατρίου ήταν σημαντικά υψηλότερα στο τέλος της Ε/Κ στην ομάδα Ery σε σύγκριση με την ομάδα Veh.

Υπήρχαν κάποιες αξιοσημείωτες διαφορές των τιμών των φυσιολογικών μεταβλητών μεταξύ των πέντε **Διάγραμμα 1. Επίπεδα αιματοκρίτη και γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες Veh και Ery**

χρονικών σημείων σε κάθε μία από τις ομάδες. Ειδικότερα, τα επίπεδα του αιματοκρίτη μειώθηκαν και τα αυτά του γαλακτικού οξέος αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της όλης



πειραματικής διαδικασίας, γεγονός αναμενόμενο και σε παρόμοιο βαθμό στις δύο πειραματικές ομάδες. (Διάγραμμα 1)

Πίνακας 4. Περιεγχειρητικές φυσιολογικές μεταβλητές

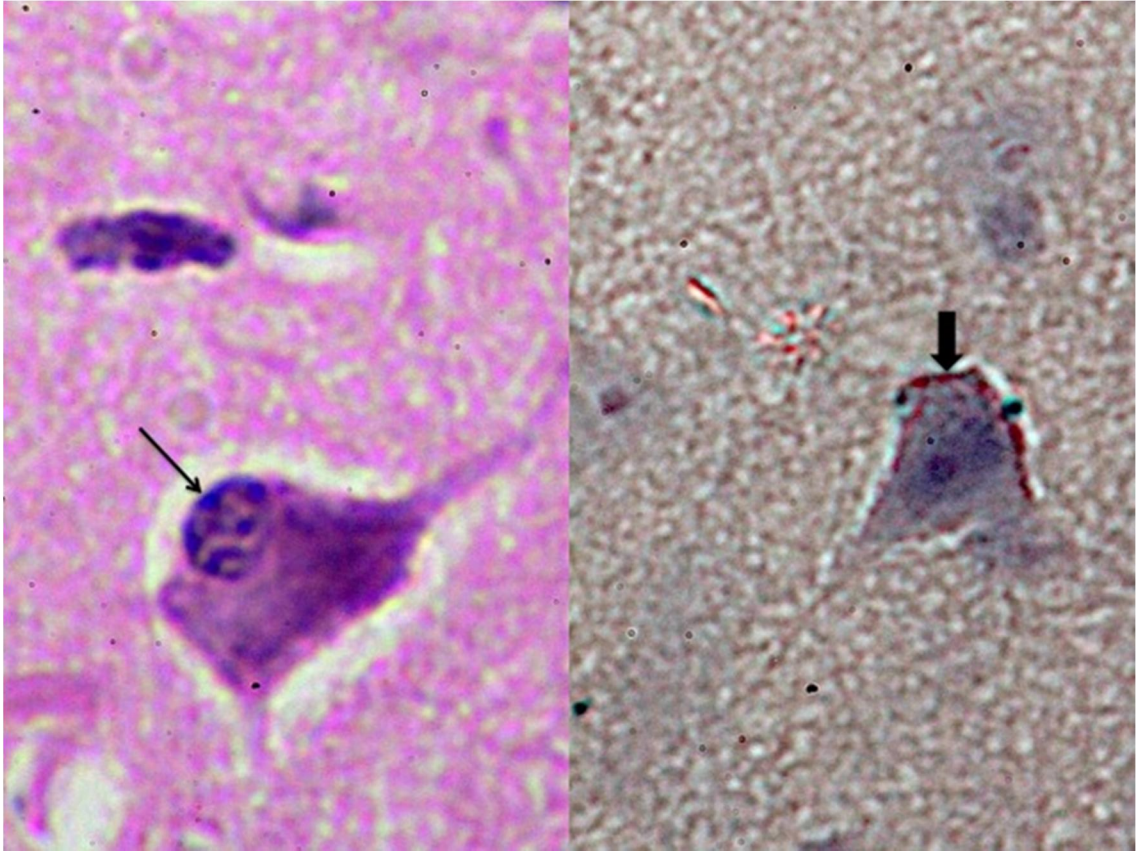
Μεταβλητή	Ομάδα	Baseline	Έναρξη E/K	Τέλος ψύξης	Έναρξη επαναθέρμανσης	Τέλος E/K
Μέση αρτηριακή πίεση (mmHg)	ERY	77.4 ± 10	66.4 ± 11.3	--	--	74.3 ± 26.5
	VEH	80.2 ± 18	60.3 ± 12.7	--	--	57 ± 8.1
Αρτηριακό pH	ERY	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1 *	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.2	7.6 ± 0.1
	VEH	7.3 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.4 ± 0.0	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1
PO ₂ (mmHg)	ERY	407.9 ± 119	445.5 ± 113.8	606.2 ± 83.3	426.4 ± 79.7	302.4 ± 91.2
	VEH	342.5 ± 131.2	460.3 ± 174.9	576.2 ± 76.3	447.7 ± 84.2	300.5 ± 45.6
PCO ₂ (mmHg)	ERY	45 ± 21.3 *	39.6 ± 12.6 *	37.3 ± 10.8	52.4 ± 17.2	25.3 ± 6.9
	VEH	67.9 ± 13.6	58.6 ± 15.1	43.9 ± 6.4	43.5 ± 12	23 ± 3
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	ERY	28.3 ± 5.1	30.5 ± 6.2	26.9 ± 6.4	34.4 ± 15.8	23.4 ± 5.5
	VEH	32.3 ± 3.3	28.5 ± 3.5	28 ± 4.6	31.1 ± 9.2	20.1 ± 2.6
K ⁺ (mmol/L)	ERY	3.4 ± 0.4	4.8 ± 1.7	4.2 ± 0.9	7 ± 1.2	4.7 ± 0.8
	VEH	3.6 ± 0.2	4.4 ± 0.9	4.7 ± 0.7	6.9 ± 1.1	5.1 ± 0.4
Na ⁺ (mmol/L)	ERY	141 ± 2.9	136.6 ± 4.7	136 ± 3.7	138.1 ± 8.4	137 ± 3.4 *
	VEH	137.7 ± 2.4	133 ± 5.3	133.8 ± 3.9	127.1 ± 6.5	133.2 ± 2.2
Αιματοκρίτης (%)	ERY	27.8 ± 3.1	14.4 ± 2 *	16 ± 4	13.1 ± 3.5	16 ± 4.8
	VEH	29.5 ± 1.1	19.5 ± 4.8	15.8 ± 4.9	14.7 ± 4.5	17.3 ± 5.3
Γαλακτικό οξύ (mmol/L)	ERY	2.8 ± 1.6 *	7.6 ± 1.5	8.3 ± 2.5	10.5 ± 2.1	12.6 ± 2.6
	VEH	1.3 ± 0.5	5.9 ± 2.9	7.5 ± 2.1	10.1 ± 2.2	13 ± 3.4
Γλυκόζη (mg/dL)	ERY	119.8 ± 40	102.4 ± 61.2	108.6 ± 53	133.2 ± 66	109.4 ± 56.1
	VEH	141.3 ± 102.4	95.3 ± 28.5	90 ± 39.8	129.2 ± 59.2	84.2 ± 53.4

Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. * $p < 0.05$

2. Ιστολογική αξιολόγηση με τη χρώση Αιματοξυλίνης και Ηωσίνης - Neuronal Injury Score

Στο νεοφλοιό των χοίρων της ομάδας Veh παρατηρήθηκε διάχυτο οίδημα μετά από YOKΠ με τη χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Ένα μεγάλο ποσοστό των πυραμιδικών νευρώνων έδειξαν μορφολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένων τη διάχυτη απώλεια της ουσίας Nissl, συρρίκνωση του κυτταρικού σώματος (perikaryon), διόγκωση και πύκνωση του πυρήνα. (Εικόνα

- 10). **Εικόνα 10. Φωτομικρογραφία H&E και TUNEL στην περιοχή του νεοφλοιού της ομάδας Veh**



Φωτομικρογραφίες που δείχνουν μορφολογικά χαρακτηριστικά αποπτωτικών κυττάρων μετά από YOKΠ στην ομάδα Veh. Η αριστερή φώτο (Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη, (X 400 μεγέθυνση)) δείχνει πυραμιδικούς νευρώνες με τυπικά αποπτωτικά χαρακτηριστικά, όπως έντονη συρρίκνωση και ισχυρή συμπύκνωση της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα (βέλος). Η δεξιά φώτο (TUNEL, (X400 μεγέθυνση)) δείχνει TUNEL (+) πυραμιδικούς νευρώνες με έντονο καφε-κόκκινη χρώση στην κυτταρική επιφάνεια (βέλος) και σε μικρότερο βαθμό, στον πυρήνα.

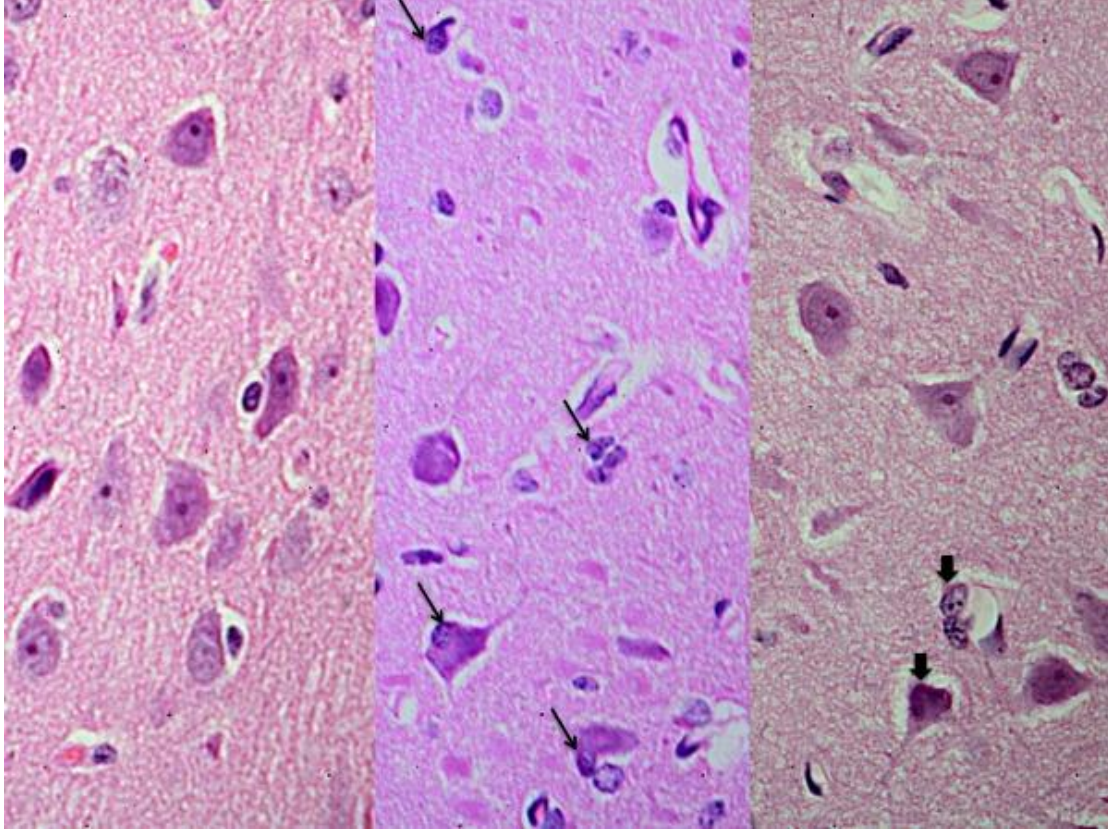
Στην ομάδα με τα φυσιολογικά πειραματόζωα (CTL) παρατηρήθηκε ελάχιστη νευρωνική βλάβη στο νεοφλοιό (0.42 ± 0.51). Στα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε YOKΠ (Ery και Veh) εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερες βαθμολογίες

Πίνακας 5. Αποτελέσματα νευρικής βλάβης στις ομάδες Ery, Veh και CTL

	NEURAL INJURY SCORE (H&E)	TUNEL (+) SCORE
CTL	0.42 ± 0.51	0.5 ± 0.52
VEH	3.74 ± 1.47 *	2.55 ± 1.17 #
ERY	2.53 ± 1.22 **	1.76 ± 0.91 ##
	* $p \leq 0.001$ vs CTL	# $p \leq 0.001$ vs CTL
	** $p \leq 0.01$ vs VEH	## $p \leq 0.001$ vs VEH

νευρωνικής βλάβης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (CTL) ($P \leq 0.001$). (Πίνακας 5) (Εικόνα 11).

Εικόνα 11. Φωτομικρογραφία H&E στην περιοχή του νεοφλοιού στις τρεις πειραματικές ομάδες



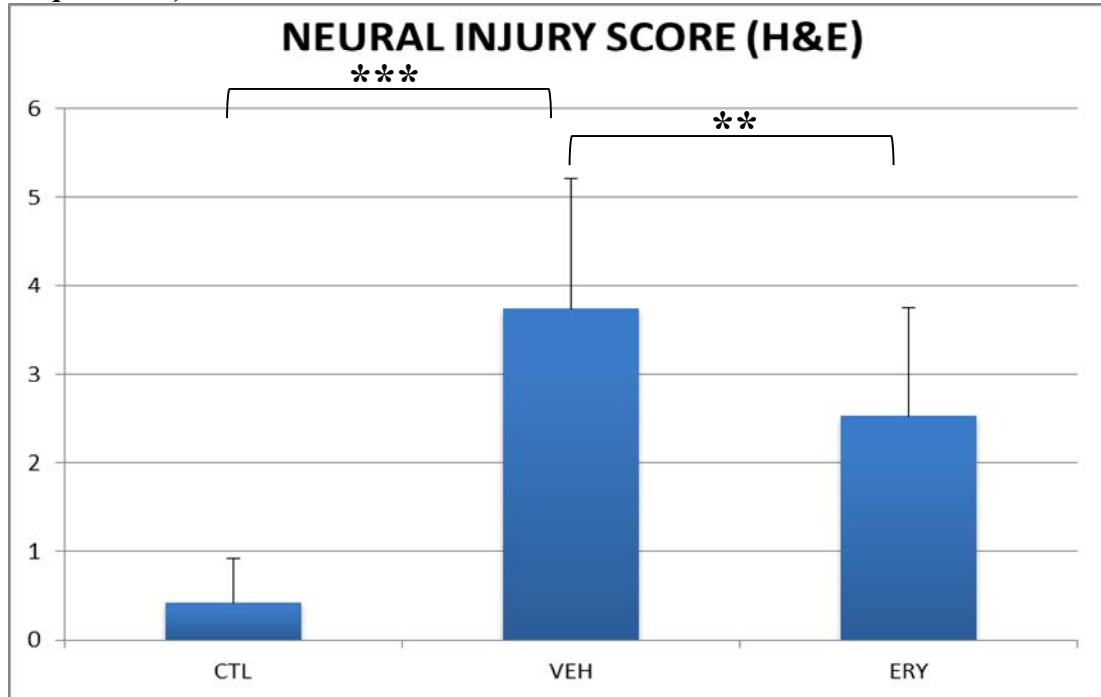
Φωτομικρογραφίες που δείχνουν μορφολογικά χαρακτηριστικά των νευρώνων και στις τρεις πειραματικές ομάδες (Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη, μεγέθυνση X 200) (αριστερή φώτο: φυσιολογικά πειραματόζωα - CTL, μεσαία φώτο: ομάδα Veh, δεξιά φώτο: ομάδα Ery). Οι πυραμιδικοί νευρώνες στη CTL ομάδα παρουσιάζουν κανονική μορφολογία με μεγάλους, καλώς καθορισμένους πυρήνες και διακριτό πυρηνίσκο. Το κυτταρόπλασμα είναι καλά καθορισμένο με διακριτή ουσία Nissl. Οι αποπτωτικοί πυραμιδικοί νευρώνες (βέλη) είναι ευρέως κατανομημένοι στην ομάδα Veh, ενώ στην ομάδα Ery, μόνο μερικοί αποπτωτικοί νευρώνες (βέλη) αναγνωρίζονται μεταξύ διαφόρων φυσιολογικών πυραμιδικών κυττάρων.

Η νευρωνική βλάβη στο νεοφλοιό ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε Ερυθρομυκίνη (ομάδα Ery) σε σύγκριση με τους χοίρους της ομάδας Veh (2.53 ± 1.22 έναντι 3.74 ± 1.47 , αντίστοιχα, $P \leq 0.01$). (Διάγραμμα 2).

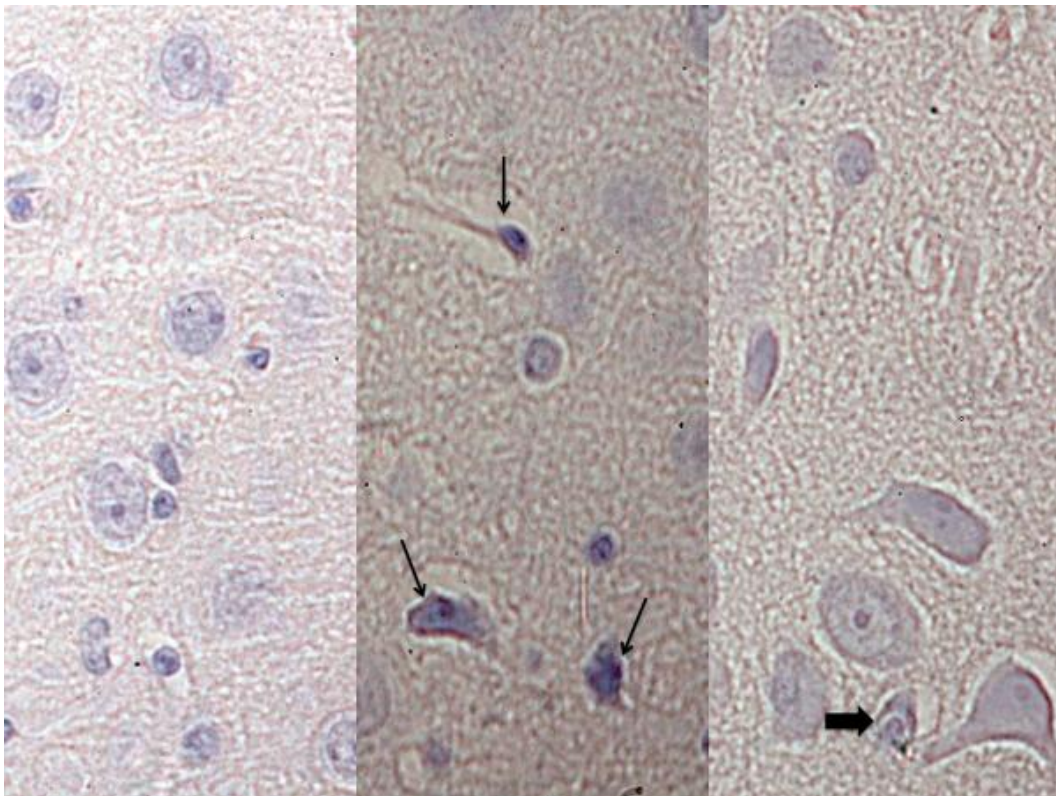
3. Χρώση TUNEL για την κατάτμηση του DNA: TUNEL (+) Score

Όλοι οι χοίροι που υποβλήθηκαν σε YOKΠ (τόσο στην Ery όσο και στη Veh ομάδες) εμφανίζουν σημαντικά περισσότερα TUNEL (+) κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα - CTL ($P \leq 0.001$). (Πίνακας 5) (Εικόνα 12).

Διάγραμμα 2. Αποτελέσματα νευρικής βλάβης του νεοφλοιού (H&E) στις ομάδες CTL, Veh και Ery. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο \pm SD. (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)



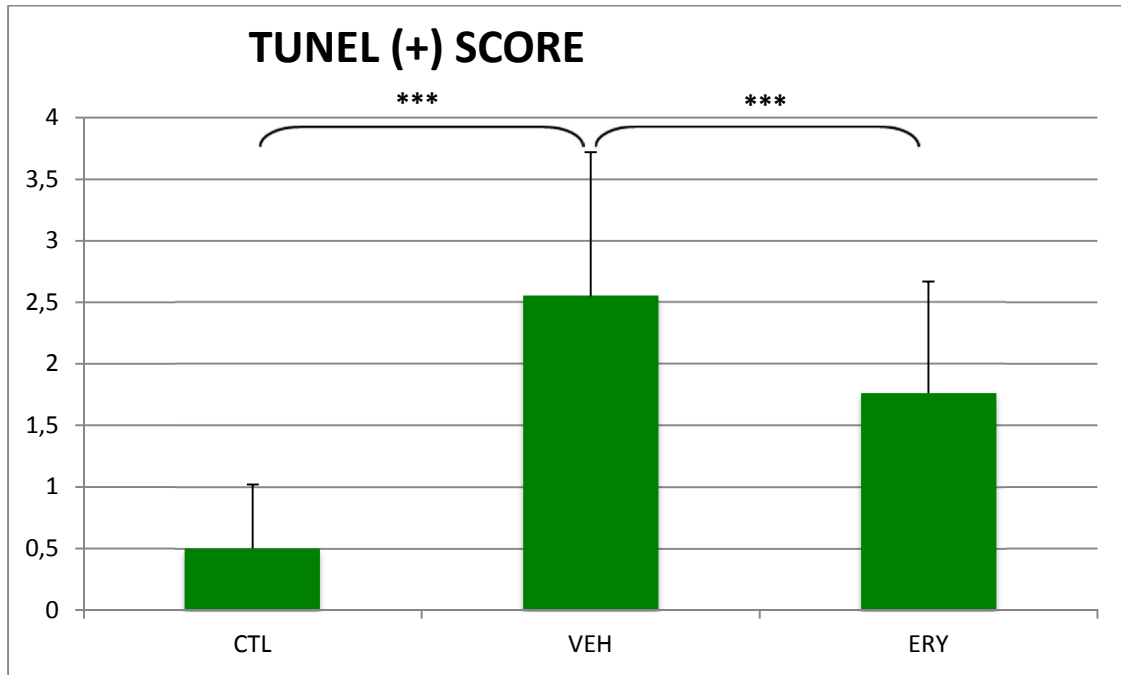
Εικόνα 12. Φωτομικρογραφία TUNEL στην περιοχή του νεοφλοιού στις τρεις πειραματικές ομάδες



Φωτομικρογραφίες νεοφλοιού που χρησιμοποιούν την TUNEL ιστοχημεία (μεγέθυνση X 200) και στις τρεις πειραματικές ομάδες (αριστερή φώτο: φυσιολογικά πειραματόζωα - CTL, μεσαία φώτο: ομάδα Veh, δεξιά φώτο: ομάδα Ery). TUNEL (+) πυραμιδικά κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν στην ομάδα ελέγχου (CTL). Σημειώστε τους αυξημένους TUNEL (+) πυραμιδικούς νευρώνες (βέλη) στην ομάδα Veh, σε σύγκριση με την ομάδα Ery, όπου προσδιορίζονται μόνο μερικοί αποπτωτικοί νευρώνες (βέλη).

Το φαρμακολογικό preconditioning με μία μόνο δόση ερυθρομυκίνης 12 ώρες πριν την YOKΠ στους χοίρους της ομάδας Ery συσχετίστηκε με σημαντικά λιγότερα TUNEL (+) κύτταρα σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας Veh (1.76 ± 0.91 έναντι 2.55 ± 1.17 , $P \leq 0.001$) (Διάγραμμα 3).

Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα TUNEL χρώσης του νεοφλοιού των χοίρων των ομάδων CTL, Veh και Ery.



*TUNEL (+) score στο νεοφλοιό του εγκεφάλου χοίρων της ομάδας με τα φυσιολογικά πειραματόζωα - CTL σε σύγκριση με αυτά που υποβλήθηκαν σε YOKΠ (είτε της ομάδας Veh ή Ery). Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο \pm SD. (***) $p \leq 0.001$*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Γενικά Σχόλια

Η χρήση της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης αποτελεί, από την δεκαετία του 1950, χειρουργική τεχνική στην αντικατάσταση του αορτικού τόξου (αορτικό ανεύρυσμα ή διαχωρισμός). Επίσης, εφαρμόζεται όταν είναι αδύνατον να εφαρμοστεί διεγχειρητικά το cross-clamping της ανιούσης αορτής (“πορσελανοειδής” αορτή, ανεύρυσμα του περιφερικού τμήματος της ανιούσης αορτής), στη διόρθωση συγγενών καρδιοπαθειών σε νεογνά αλλά και όταν είναι αναγκαίο το αναίμακτο χειρουργικό πεδίο (θωρακοκοιλιακό ανεύρυσμα, θρομβο-ενδαρτηρεκτομή της πνευμονικής αρτηρίας, χειρουργική αντιμετώπιση μαζικής αιμορραγίας). Τα αποτελέσματα τέτοιων επεμβάσεων βελτιώθηκαν σημαντικά τις 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 όσον 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 συμβλήματα 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.

2. Νευρωνική Βλάβη μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

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 (Bottiger 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, πιθανώς 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.

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 εμφανίζεται 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 σε χρόνια πειραματικά μοντέλα τα κύτταρα χαρακτηρίστηκαν σαν αποπτωτικά γιατί πέραν της θετικότητας TUNEL διακρίνονται και με βάση κάποιες συγκεκριμένες ιστολογικές πιστοποιήσεις. Στο οξύ πειραματικό μοντέλο μας δεν ανευρέθησαν μόνο θετικότητα TUNEL αλλά και μορφολογικές ενδείξεις απόπτωσης. Πρόκειται, βεβαίως, 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 et al 1998, de Leon et al 1998, Raghupathi et al 2004)

3. 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, όσον 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 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 πειραματόζωων 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 Junonen της Ιατρικής Σχολής του Mount Sinai στην Νέα Υόρκη. (Junonen 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 μεθισχαιμικά και επιπλέον να αναδειχθεί η οποιαδήποτε επίδραση της ερυθρομυκίνης.

Παρά τις προφανείς επιβλαβείς επιπτώσεις της παρατεταμένης έκθεσης στην εξωσωματική κυκλοφορία στη λειτουργία και τη δομή του εγκεφάλου, οι νευροπροστατευτικές στρατηγικές εξακολουθούν να αποτελούν θέμα συζήτησης. Υπάρχει, επίσης, αντιπαράθεση απόψεων σχετικά με την προστασία του εγκεφάλου πάνω σε βασικά θέματα που αφορούν και την YOKΠ. (McCullough et al 1999, Ehlich et al 2002, Strauch et al 2005, Ananiadou et al 2007, Ananiadou et al 2008,

Brambrink et al 2006) Η προ-ισχαιμική προετοιμασία (pre-ischemic conditioning) έχει αναγνωριστεί ως ισχυρό μέσο για την επαγωγή ανοχής έναντι της εγκεφαλικής ισχαιμίας και τη μείωση του νευρωνικού θανάτου και των λειτουργικών βλαβών μετά από ισχαιμική βλάβη. Ορισμένα παραδοσιακά σχήματα ισχαιμικής προετοιμασίας μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων συντόμων επεισοδίων ισχαιμίας ή υπερθερμίας, η υποξία, μικρές δοσολογίες της ενδοτοξίνης lipopolysaccharide ή της μιτοχονδριακής τοξίνης 3-nitropropionic acid δεν αποδείχθηκαν κατάλληλα στην κλινική χρήση λόγω των σοβαρών παρενεργειών τους. Στην ερευνητική μας μελέτη χρησιμοποιούμε την ερυθρομυκίνη (ως φαρμακευτική προετοιμασία-προγύμναση - pharmacological preconditioning), η οποία είναι κατάλληλη για κλινική εφαρμογή και γνωστή για τις ελάχιστες παρενέργειές της. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μια εφάπαξ δόση αυτού του μακρολιδίου αντιβιοτικού μπορεί να επάγει ανοχή έναντι της εγκεφαλικής ισχαιμίας in vivo μέσω φαρμακολογικής προετοιμασίας. (Koerner et al 2007) Επιπλέον, αρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι μία και μόνο κλινικά αποδεκτή δόση ερυθρομυκίνης 6-24 ώρες πριν από την εγκεφαλική ισχαιμία μείωσε το νευρωνικό θάνατο στον ιππόκαμπο και τον βρεγματικό νεοφλοιό. (Brambrink et al 2006) Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες (ούτε και επιμήκυνση του διαστήματος QT στο ηλεκτροκαρδιογράφημα) σε κανένα από τους χοίρους.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να αξιολογηθεί η νευροπροστατευτική αποτελεσματικότητα της ερυθρομυκίνης σε οξύ πειραματικό μοντέλο παρατεταμένης YOKΠ σε χοίρους σε θερμοκρασία 18 °C. Στην έρευνά μας επιλέχθηκε το αριστερό ημισφαίριο του εγκεφάλου και συγκεκριμένα ο νεοφλοιός ως η υπό μελέτη περιοχή. Η επιλογή της συγκεκριμένης εγκεφαλικής περιοχής βασίστηκε σε παλαιότερά μας στοιχεία επιλεκτικής ευπάθειας του νεοφλοιού στην ήπια εγκεφαλική ισχαιμία. (Ananiadou et al 2007) Υπό το πρίσμα αυτών των προηγούμενων στοιχείων μας, υποθέσαμε ότι η χρήση μιας κλινικά αποδεκτής δόσης ερυθρομυκίνης δώδεκα ώρες πριν από την εισαγωγή της YOKΠ θα μειώσει την παρουσία αποπτωτικών νευρώνων στο νεοφλοιό.

Εν τούτοις, το φαινόμενο της εκλεκτικής ευαισθησίας δεν είναι πλήρως κατανοητό. 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. Τέλος, 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 (αλλά 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)

4. Διαφορές της Νευρωνικής Βλάβης λόγω YOKΠ μετά τη χορήγηση Ερυθρομυκίνης

Στην πειραματική μας μελέτη υποθέσαμε ότι άμεσα μεθισχαιμικά ενεργοποιείται ο νευρωνικός αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος και ότι μετά τη χρήση της ερυθρομυκίνης ως pharmacological preconditioning, θα διαπιστωθούν λιγότερες ενδείξεις απόπτωσης σε ευπρόσβλητες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο νεοφλοιός. Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης και καταγραφή της αναμενόμενης απόπτωσης και της νέκρωσης. 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. Μετά από 75 λεπτά YOKΠ στους 18 °C και στις δύο κύριες ομάδες του πειραματικού μοντέλου (Ery και Veh) παρατηρήθηκαν ιστολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρωνικής βλάβης με την χρήση της χρώσης Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης. Στην ομάδα με τα φυσιολογικά πειραματόζωα (CTL) παρατηρήθηκε ελάχιστη νευρωνική βλάβη στο νεοφλοιό (0.42 ± 0.51). Στα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε YOKΠ (Ery και Veh) εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερες βαθμολογίες νευρωνικής βλάβης σε σύγκριση με τα φυσιολογικά (CTL) ($P \leq 0.001$). (Πίνακας 5) (Εικόνα 11). Η νευρωνική βλάβη στο νεοφλοιό ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε Ερυθρομυκίνη (ομάδα Ery) σε σύγκριση με τους χοίρους της ομάδας Veh (2.53 ± 1.22 έναντι 3.74 ± 1.47 , αντίστοιχα, $P \leq 0.01$). (Διάγραμμα 2).

Επίσης, βρέθηκε σημαντική TUNEL θετικότητα σε όλα τα δείγματα του νεοφλοιού στις ίδιες ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, όλοι οι χοίροι που υποβλήθηκαν σε YOKΠ (τόσο στην Ery όσο και στη Veh ομάδες) εμφανίζουν σημαντικά περισσότερα TUNEL (+) κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα - CTL ($P \leq 0.001$). (Πίνακας 5) (Εικόνα 12). Το φαρμακολογικό preconditioning με μία μόνο δόση Ερυθρομυκίνης 12 ώρες πριν την YOKΠ στους χοίρους της ομάδας Ery συσχετίστηκε με σημαντικά λιγότερα TUNEL (+) κύτταρα σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας Veh (1.76 ± 0.91 έναντι 2.55 ± 1.17 , $P \leq 0.001$) (Διάγραμμα 3).

5. Διαφορά Λοιπών Αποτελεσμάτων μεταξύ των ομάδων Ery και Veh

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σωματικού βάρους και ηλικίας μεταξύ των πειραματόζωων των τριών ομάδων. Οι μέσες τιμές διάρκειας της ψύξης και της επαναθέρμανσης επίσης δεν διέφεραν. Παρά το γεγονός ότι υπήρχαν κάποιες μεταβολές στις τιμές ορισμένων παραμέτρων, όπως πχ. στα υψηλότερα επίπεδα pCO_2 και χαμηλότερου αρτηριακού pH από την αρχή του πειράματος μέχρι την έναρξη της E/K στην ομάδα VEH, 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. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, γεγονός επίσης αναμενόμενο και σε παρόμοιο βαθμό στις δύο κύριες πειραματικές ομάδες.

6. Περιορισμοί της Μελέτης

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. Σε χρόνια μοντέλο οι ιστολογικές βλάβες θα ήταν διαφορετικές λόγω ωρίμανσης των ιστολογικών αλλαγών και του εξελισσόμενου καθυστερημένου νευρωνικού θανάτου.

Επίσης, 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 σώματα 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.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει για πρώτη φορά ότι μια απλή δόση ερυθρομυκίνης, δώδεκα ώρες πριν την ΥΟΚΠ στους 18 °C, είναι αποτελεσματική στη σημαντική μείωση της απόπτωσης στο νεοφλοιό του εγκεφάλου χοίρων σε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φαρμακολογική προγύμναση-προετοιμασία με αυτό το φάρμακο μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα αποτελεσματικό μέσο για την πρόληψη νευρολογικής βλάβης σε επιλεκτικά ευαίσθητες εγκεφαλικές περιοχές. Καθώς οι νευροπροστατευτικές στρατηγικές κατά τη διάρκεια της ΥΟΚΠ παραμένουν θέμα συζήτησης και αντιπαραθέσεων, τα πρώτα στοιχεία δείχνουν ότι η ερυθρομυκίνη έχει σημαντική ικανότητα να επηρεάζει την εγκεφαλική ισχαιμική ανοχή. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην κλινική πράξη με λίγες παρενέργειες. Επομένως, η ερυθρομυκίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο και εξαιρετικά υποψήφιο φάρμακο για κλινική εφαρμογή με σκοπό την επαγωγή της ανοχής σε συνθήκες υψηλού κινδύνου για εγκεφαλική ισχαιμία, όπως οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

1. Μειωμένη κατάτμηση του DNA σε χοίρειο νεοφλοιό κατά την υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση μετά από preconditioning με Ερυθρομυκίνη: Ενδείξεις για νευροπροστασία.

10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργών Θώρακος – Καρδίας - Αγγείων, Αθήνα 20 - 22 Νοεμβρίου 2014.

Ανακοίνωση στο Special PanHellenic and Diaspora Session.

2. Preconditioning του εγκεφάλου με ερυθρομυκίνη στην ολική κυκλοφορική παύση. Έλεγχος νευρωνικής βιωσιμότητας-πρώιμα αποτελέσματα.

12^ο Βορειοελλαδικό Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 30 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2013.

Απονομή του 2ου Βραβείου προφορικών ανακοινώσεων του συνεδρίου.

Προφορικές Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1. Decreased DNA Disruption in the Porcine Neocortex with Erythromycin Preconditioning during Prolonged Hypothermic Circulatory Arrest: Evidence for Neuroprotection.

28th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, October 11 - 15, 2014, Milan, Italy.

Η περίληψη της παρουσίασης δημοσιεύτηκε στο "EACTS Daily News" newspaper.

2. Erythromycin induced neuroprotection during prolonged deep hypothermic circulatory arrest in an acute porcine model.

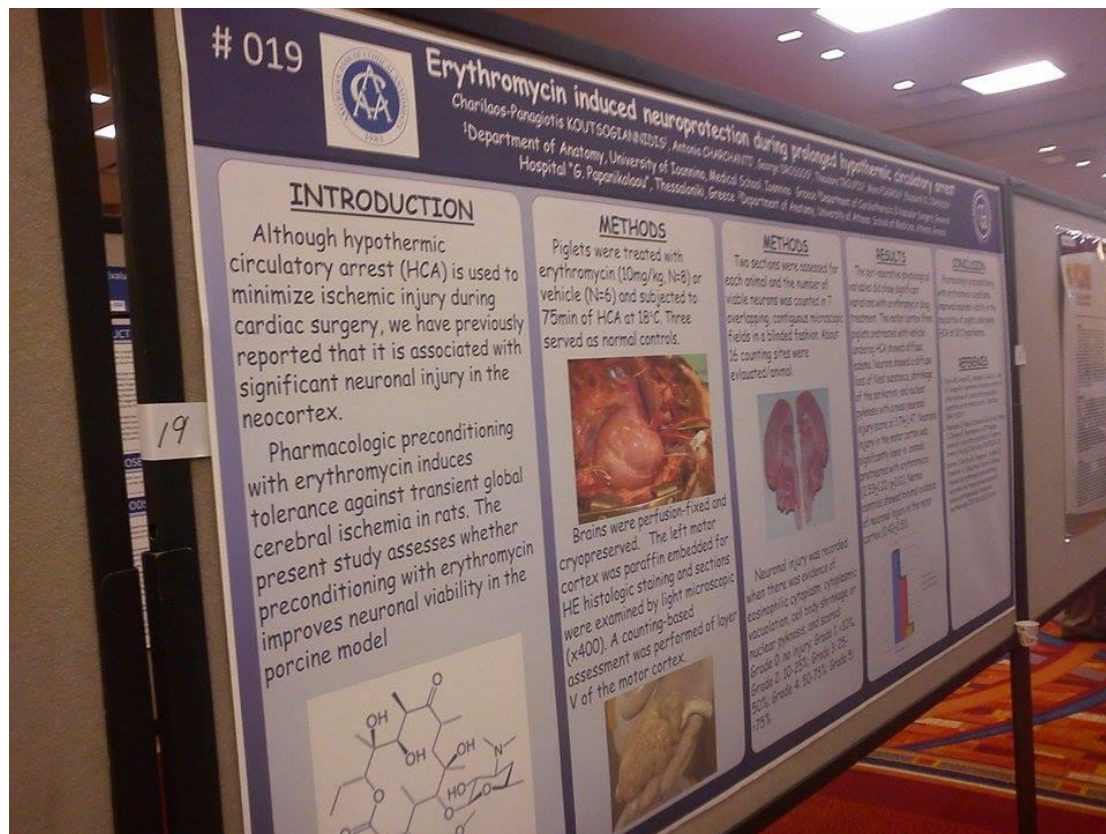
23rd World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 12 - 15, 2013, Split, Croatia.

Απονομή του 7ου Βραβείου προφορικών ανακοινώσεων του συνεδρίου.

Αναρτημένη Ανακοίνωση σε Διεθνές Συνέδριο

1. Erythromycin induced neuroprotection during prolonged hypothermic circulatory arrest.

30th Annual Meeting of the American Association of Clinical Anatomists, July 9 - 13, 2013, Denver, Colorado, USA.



Εικόνα 13. Αναρτημένη ανακοίνωση στο 30th Annual Meeting of the American Association of Clinical Anatomists, July 9 - 13, 2013, Denver, Colorado, USA

Δημοσίευση άρθρου σε Διεθνές Περιοδικό

1. Decreased DNA Disruption in the Porcine Neocortex with Erythromycin Preconditioning during Prolonged Hypothermic Circulatory Arrest: Evidence for Neuroprotection.

Journal of Cardiac Surgery

J Card Surg. 2015 Apr 9. doi: 10.1111/jocs.12544. [Epub ahead of print]

Δημοσιεύσεις περιλήψεων σε Διεθνή Περιοδικά

1. Decreased DNA Disruption in the Porcine Neocortex with Erythromycin Preconditioning during Prolonged Hypothermic Circulatory Arrest: Evidence for Neuroprotection.

Interact CardioVasc Thorac Surg (2014) 19 (suppl 1): S3.

2. Erythromycin induced neuroprotection during prolonged deep hypothermic circulatory arrest in an acute porcine model.

Journal of Cardiothoracic Surgery 2013, 8 (Suppl 1): O24.

ΤΙΜΗΤΙΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ, ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1. Η περίληψη της παρουσίασης “Decreased DNA Disruption in the Porcine Neocortex with Erythromycin Preconditioning during Prolonged Hypothermic Circulatory Arrest: Evidence for Neuroprotection”

δημοσιεύτηκε ως highlight στο “EACTS Daily News” newspaper στο συνέδριο 28th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, October 11 - 15, 2014, Milan, Italy.

Cardiac – Abstract session

Evidence for neuroprotection

Decreased DNA disruption in the porcine neocortex with erythromycin preconditioning during prolonged hypothermic circulatory arrest

Charilaos-Panagiotis Koutsogiannidis (right), G E Drossos (middle) and E O Johnson (far right)
Cardiothoracic Surgery Department, General Hospital, Thessaloniki, Greece

(25mg/kg, iv), Erythromycin pretreatment group (Ery) (n = 8), or vehicle (Normal Saline 0.9%) (Veh) (n = 6), applied 12 hours before arrest. Three served as normal controls. Normal control group (Ctl). After gradual rewarming to a temperature of 36°C, treatment animals were sacrificed and brains were perfusion-fixed and cryopreserved. Neuronal apoptosis after HCA was observed morphologically with hematoxylin and eosin staining (H&E), and characterized by in situ DNA fragmentation using terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated biotin-dUTP nick end-labeling (TUNEL) histochemistry.

The mean duration (±SD) of CPB cooling for animals in groups Ery and Veh was 43.3 ± 7.3 and 44.2 ± 5.3 minutes, respectively (t test, p = 0.57). There was also no difference in the mean duration of CPB rewarming (62.6 ± 9.4 and 55.3 ± 6.1 minutes, respectively). Pre-ischemic conditioning with a single dose of the antibiotic erythromycin reduced neuronal apoptosis in the neocortex of the porcine brain, previously recognized for its selective vulnerability. The neocortex from piglets pretreated with vehicle (Veh) showed diffuse edema after deep HCA with hematoxylin and eosin staining. A large percentage of the pyramidal neurons showed morphological features associated with apoptosis, including, a diffuse loss of Nesi substance, shrinkage of the perikaryon, blebbing and nuclear pyknosis. (Figure 1). Neuronal injury in the neocortex was significantly lower in animals pretreated with erythromycin (Ery group) compared to piglets pretreated with vehicle (Veh group) (H&E score: 2.53 ± 1.22 vs. 3.74 ± 1.47, respectively, p ≤ 0.01). (Figure 2). Pre-ischemic conditioning with a single dose of the antibiotic erythromycin 12 hours before deep HCA was also associated with significantly fewer TUNEL (+) cells compared to animals pretreated with vehicle (TUNEL score: 1.76 ± 0.91 vs. 2.55 ± 1.17; p ≤ 0.001) (Figure 3). How to best protect the brain during the sensitive time of interruption of normal cerebral blood flow remains controversial. The results of the present study support our hypothesis that cerebral protection during HCA may be significantly achieved with erythromycin pharmacological preconditioning in the porcine model. Since erythromycin has been effectively used long-term in clinical practice with few side effects, these findings suggest that it is a highly promising candidate for clinical application for preemptive neuroprotection during HCA.

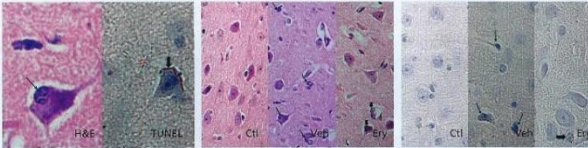


Figure 1. Photomicrographs showing morphological features of apoptotic cells following HCA after pretreatment with vehicle.

Figure 2. Photomicrographs showing morphologic features with H&E staining of neurons in all three experimental groups.

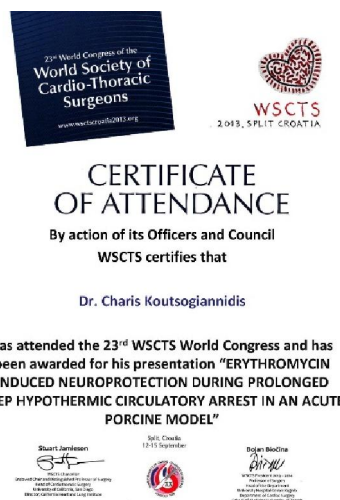
Figure 3. Photomicrographs of neocortex using TUNEL histochemistry in all three experimental groups.

Εικόνα 14. Highlight στο “EACTS Daily News” newspaper στο συνέδριο 28th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, October 11 - 15, 2014, Milan, Italy

2. Η παρουσίαση “Μειωμένη κατάτμηση του DNA σε χοίρειο νεοφλοιό κατά την υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση μετά από preconditioning με Ερυθρομυκίνη: Ενδείξεις για νευροπροστασία”

επιλέχθηκε ως ελεύθερη ανακοίνωση στο Special PanHellenic and Diaspora Session του 10^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργών Θώρακος – Καρδιάς - Αγγείων, Αθήνα 20 - 22 Νοεμβρίου 2014.

3. Η προφορική ανακοίνωση “Erythromycin induced neuroprotection during prolonged deep hypothermic circulatory arrest in an acute porcine model”
 τιμήθηκε με την απονομή του 7^{ου} βραβείου προφορικών ανακοινώσεων στο 23rd World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 12 - 15, 2013, Split, Croatia.



Εικόνα 15. Βραβείο προφορικών ανακοινώσεων στο 23rd World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 12 - 15, 2013, Split, Croatia

4. Η προφορική ανακοίνωση “Preconditioning του εγκεφάλου με ερυθρομυκίνη στην ολική κυκλοφορική παύση. Έλεγχος νευρωνικής βιωσιμότητας - πρώιμα αποτελέσματα”
 τιμήθηκε με την απονομή του 2^{ου} βραβείου προφορικών ανακοινώσεων στο 12^ο Βορειοελλαδικό Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 30 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2013.



Εικόνα 16. Βραβείο προφορικών ανακοινώσεων στο 12^ο Βορειοελλαδικό Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 30 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μειωμένη κατάτμηση του DNA σε χοίρειο νεοφλοιό κατά την υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση μετά από preconditioning με Ερυθρομυκίνη: Ενδείξεις για νευροπροστασία

Παρά το γεγονός ότι η υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση είναι μία γνωστή μέθοδος που χρησιμοποιείται σε μία πλειάδα καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων, η εγκεφαλική βλάβη παραμένει συχνή και δύσκολα αντιμετωπίσιμη. Οι ιδανικές συνθήκες για την μεγιστοποίηση της εγκεφαλικής προστασίας κατά την διάρκεια της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως. Υπάρχει αντιπαράθεση απόψεων πάνω σε βασικά θέματα που την αφορούν, όπως η φαρμακευτική προετοιμασία - προγύμναση (pharmacological preconditioning) του εγκεφάλου έναντι της ισχαιμίας. Σκοπός αυτής της πειραματικής μελέτης είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της ερυθρομυκίνης, ως pharmacological preconditioning, στην νευρωνική προστασία κατά την διάρκεια υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης σε χοίρους.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε δεκαεπτά χοίρους βάρους 33.6 κιλών και ηλικίας 114 ημερών, οι οποίοι ήταν νευρολογικά ώριμοι. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Στην ομάδα Ery (n=8), όπου χορηγήθηκε 12 ώρες προ της έναρξης της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης, ερυθρομυκίνη (25mg/kg i.v.) και ακολούθησε παύση στους 18 °C για 75 λεπτά, την ομάδα Veh (n=6), όπου χορηγήθηκε 12 ώρες προ της έναρξης της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης, vehicle (Normal Saline 0.9%) και ακολούθησε παύση στους 18 °C για 75 λεπτά και την ομάδα CTL (Normal Control) που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου με 3 φυσιολογικά πειραματόζωα. Η υπό μελέτη περιοχή ήταν ο κινητικός φλοιός. Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, καταμέτρηση των βιώσιμων νευρώνων με το οπτικό μικροσκόπιο και βαθμονόμηση της βλάβης σε κλίμακα από 0 έως 5. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated biotin-dUTP nick end-labeling (TUNEL) ιστοχημεία, για να χαρακτηριστεί η νευρωνική απόπτωση. Τα TUNEL θετικά κύτταρα βαθμονομήθηκαν σε κλίμακα από 0 έως 5.

Κατά τη χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, η νευρωνική βλάβη στον κινητικό φλοιό

στην ομάδα Veh χαρακτηρίζονταν από διάχυτο οίδημα και βαθμονομήθηκε με 3.74 ± 1.47 ενώ στην ομάδα της ερυθρομυκίνης ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη (2.53 ± 1.22 , $p < 0.01$). Στην ομάδα CTL η νευρωνική βλάβη ήταν ελάχιστη (0.42 ± 0.51).

Τα TUNEL θετικά κύτταρα, τα οποία υποδεικνύουν κατάτμηση του DNA και νευρωνική βλάβη, ήταν σημαντικά περισσότερα στο νεοφλοιό της ομάδας Veh (2.55 ± 1.17) σε σύγκριση με την ομάδα Ery (1.76 ± 0.91 , $p \leq 0.001$).

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει για πρώτη φορά ότι μια απλή δόση ερυθρομυκίνης, δώδεκα ώρες πριν την υποθερμική ολική κυκλοφορική παύση στους 18 °C, είναι αποτελεσματική στη σημαντική μείωση της απόπτωσης στο νεοφλοιό του εγκεφάλου χοίρων σε ένα οξύ πειραματικό μοντέλο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φαρμακολογική προγύμναση - προετοιμασία με αυτό το φάρμακο μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα αποτελεσματικό μέσο για την πρόληψη νευρολογικής βλάβης σε επιλεκτικά ευαίσθητες εγκεφαλικές περιοχές. Καθώς οι νευροπροστατευτικές στρατηγικές κατά τη διάρκεια της υποθερμικής ολικής κυκλοφορικής παύσης παραμένουν θέμα συζήτησης και αντιπαραθέσεων, τα πρώτα στοιχεία δείχνουν ότι η ερυθρομυκίνη έχει σημαντική ικανότητα να επηρεάζει την εγκεφαλική ισχαιμική ανοχή. Τέλος, λαμβάνοντας επιπλέον υπ' όψιν ότι έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην κλινική πράξη με λίγες παρενέργειες, η ερυθρομυκίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερα υποσχόμενο και εξαιρετικά υποψηφίο φάρμακο για κλινική εφαρμογή με σκοπό την επαγωγή της ανοχής σε συνθήκες υψηλού κινδύνου για εγκεφαλική ισχαιμία, όπως οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις.

ABSTRACT

Decreased DNA Disruption in the Porcine Neocortex with Erythromycin Preconditioning during Prolonged Hypothermic Circulatory Arrest: Evidence for Neuroprotection

Charilaos-Panagiotis Koutsogiannidis

Although deep hypothermic circulatory arrest is a known method used in cardiac surgery, brain damage remains a frequent and devastating complication. Ideal conditions maximizing cerebral protection during deep hypothermic circulatory arrest have not been fully investigated. Despite the fact that cardiothoracic surgeons are aware of the deleterious effects of prolonged exposure to cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest on brain function and structure, how to best protect the brain during the sensitive time of interruption of normal cerebral blood flow, remains controversial. Pre-ischemic conditioning has long been recognized as a powerful means to induce tolerance against cerebral ischemia and to reduce neuronal death and functional damage after an ischemic injury. In our experimental study erythromycin was used as pharmacologic preconditioning against cerebral ischemia after hypothermic circulatory arrest at 18 °C. In regards to recent evidence showing that pharmacologic preconditioning with a single, clinically acceptable dose of erythromycin induces tolerance against transient global cerebral ischemia in rats, we hypothesized that erythromycin would reduce neurological injury in an acute porcine model of hypothermic circulatory arrest at 18 °C.

Fourteen piglets underwent 75 minutes of hypothermic circulatory arrest at 18 °C following pretreatment with erythromycin (25mg/kg, iv) (n=8) or vehicle (Normal Saline 0.9%) (n=6), applied 12 hours before arrest. Three served as normal controls. After gradual rewarming to a temperature of 36 °C, treatment animals were sacrificed and brains were perfusion-fixed and cryopreserved. Motor cortex was dissected from the left hemisphere and paraffin embedded for histologic staining with hematoxylin and eosin (HE). To assess neuronal damage, HE-stained paraffin sections (10µm) were examined by light microscopic examination at x400 magnification. Layer V of the motor cortex was counted. Neuronal injury was recorded when there was evidence

of eosinophilic cytoplasm, cytoplasmic vacuolation, cell body shrinkage or nuclear pyknosis. Neuronal injury was scored on a scale of 0-5. Neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest was characterized by in situ DNA fragmentation using terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated biotin-dUTP nick end-labeling (TUNEL) histochemistry. The number of immunopositive cells in 8 fields were counted by an investigator blinded to the treatment groups. TUNEL positive cells were scored on a scale of 0 to 5. Comparison between the two treatment groups is made with the use of t-test.

The motor cortex from piglets pretreated with vehicle undergoing deep hypothermic circulatory arrest showed diffuse edema. Neurons showed a diffuse loss of Nissl substance, shrinkage of the perikaryon, and nuclear pyknosis with a mean neuronal injury score of 3.74 ± 1.47 . Neuronal injury in the motor cortex was significantly lower in animals pretreated with erythromycin (2.53 ± 1.22 ; $p \leq 0.01$). Normal controls showed minimal neuronal injury (0.42 ± 0.51).

Pre-ischemic conditioning with a single dose of the antibiotic erythromycin reduced neuronal apoptosis in the neocortex of the porcine brain. TUNEL positive cells indicating DNA fragmentation and neuronal injury were significantly greater in the neocortex of animals treated with 18 °C hypothermic circulatory arrest (2.55 ± 1.17) compared to animals undergoing hypothermic circulatory arrest after erythromycin preconditioning (1.76 ± 0.91) ($P \leq 0.001$).

The presented data show that a single dose of erythromycin, applied 12 hours before deep hypothermic circulatory arrest reduces apoptosis and improves postischemic outcome in an acute porcine model.

These preliminary findings support that cerebral protection during HCA may be significantly achieved with erythromycin pharmacological preconditioning in the porcine model. These results suggest that it may be a highly promising candidate for clinical application for neuroprotection during HCA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Σπανός Π, Μπουγιούκας Γ, Ασημακόπουλος Π et al. 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 et al. Neonatal brain protection and deep hypothermic circulatory arrest: pathophysiology of ischemic neuronal injury and protective strategies. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1955-64

Anand KJ, Hansen DD, Hickey PR. Hormonal-metabolic stress responses in neonates undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology*. 1990 Oct;73(4):661-70.

Ananiadou OG, Bibou K, Drossos GE et al. Hypothermia at 10C reduces neurologic injury after hypothermic circulatory arrest in the pig. *J Cardiac Surg*. 2008;23:31-8.

Ananiadou OG, Bibou K, Drossos GE et al. Effect of profound hypothermia during circulatory arrest on neurologic injury and apoptotic repressor protein Bcl-2 expression in an acute porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Apr;133(4):919-26.

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

Arom KV, Cohen DE, Strobl FT. Effect of intraoperative intervention on neurological outcome based on electroencephalographic monitoring during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1989 Oct;48(4):476-83.

Ashraf QM, Zubrow AB, Mishra OP et al. 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

Astudillo R, van der Linden J, Ekroth R et al. Absent diastolic cerebral blood flow velocity after circulatory arrest but not after low flow in infants. *Ann Thorac Surg.* 1993 Sep;56(3):515-9.

Bachet J, Guilmet D, Goudot B et al. Cold cerebroplegia. A new technique of cerebral protection during operations on the transverse aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Jul;102(1):85-93; discussion 93-4.

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

Barbut D, Grassineau D, Lis E et al. Posterior distribution of infarcts in strokes related to cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 1998 Jun;65(6):1656-9.

Baumgartner WA, Redmond M, Brock M et al. Pathophysiology of cerebral injury and future management. *J Card Surg.* 1997 Mar-Apr;12(2 Suppl):300-10; discussion 310-1.

Baumgartner WA, Walinsky PL, Salazar JD. Assessing the impact of cerebral injury after cardiac surgery: will determining the mechanism reduce this injury? *Ann 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 et al. 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 et al. 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. Breaking down the blood-brain barrier. *Ann Thorac Surg*. 1999 Dec;68(6):2013-4.

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

Bonser RS, Pagano D, Haverich A. *Brain Protection in Cardiac Surgery*. Springer; 2011 edition; chapter 1: pg 2.

Bonser RS, Pagano D, Haverich A. *Brain Protection in Cardiac Surgery*. Springer; 2011 edition; chapter 2: pg 11.

Borger MA, Peniston CM, Weisel RD et al. Neuropsychologic impairment after coronary bypass surgery: effect of gaseous microemboli during perfusionist interventions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Apr;121(4):743-9.

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

Bradley G. Leshnower and Edward P. Chen (2012). *Cerebral Protection Strategies for, Front Lines of Thoracic Surgery*, Dr. Stefano Nazari (Ed.), ISBN: 978-953-307-915-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/front-lines-of-thoracic-surgery/surgical-therapy-for-diseases-of-the-aorticarch>

Brambrink AM, Koerner IP, Diehl K et al. The antibiotic erythromycin induces tolerance against transient global cerebral ischemia in rats (pharmacologic preconditioning). *Anesthesiology*. 2006 Jun;104(6):1208-15.

Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences *J Cereb Blood Flow Metabolism*. 2004;24:133–150.

Brock MV, Blue ME, Lowenstein CJ et al. Induction of neuronal nitric oxide after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1996 Nov;62(5):1313-20.

Brooker RF, Brown WR, Moody DM et al. Cardiectomy suction: a major source of brain lipid emboli during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1998 Jun;65(6):1651-5.

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

Bucerius J, Gummert JF, Borger MA et al. Predictors of delirium after cardiac surgery delirium: effect of beating-heart (off-pump) surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Jan;127(1):57-64.

Burrows GE, Gentry M, Ewing P. Serum and tissue concentrations of erythromycin in calves with induced pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res*. 1989 Jul;50(7):1166-9.

Caparrelli DJ, Cattaneo SM 2nd, Bethea BT et al. Pharmacological preconditioning ameliorates neurological injury in a model of spinal cord ischemia. *Ann Thorac Surg.* 2002 Sep;74(3):838-44; discussion 844-5.

Cavaglia M, Seshadri SG, Marchand JE et al. Increased transcription factor expression and permeability of the blood brain barrier associated with cardiopulmonary bypass in lambs. *Ann Thorac Surg.* 2004 Oct;78(4):1418-25.

Cavarocchi NC, Pluth JR, Schaff HV et al. Complement activation during cardiopulmonary bypass. Comparison of bubble and membrane oxygenators. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986 Feb;91(2):252-8.

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 et al. 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

Clancy RR, McGaurn SA, Goin JE et al. Allopurinol neurocardiac protection trial in infants undergoing heart surgery using deep hypothermic circulatory arrest. *Pediatrics.* 2001 Jul;108(1):61-70.

Clark RE, Brillman J, Davis DA et al. Microemboli during coronary artery bypass grafting. Genesis and effect on outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Feb;109(2):249-57; discussion 257-8.

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 et al. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998;18:5663-72

Cook DJ. Cerebral hyperthermia and cardiac surgery: consequences and prevention. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Apr;13(2):176-83. Review.

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

Coselli JS, LeMaire SA. Temperature management after hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Apr;123(4):621-3.

Cottrel JE, Smith DS. *Anesthesia and Neurosurgery*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2001.

Czerny M, Fleck T, Zimpfer D et al. Risk factors of mortality and permanent neurologic injury in patients undergoing ascending aortic and arch repair. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Nov;126(5):1296-301.

DeBakey ME, Crawford ES, Cooley DA et al. Successful resection of fusiform aneurysm of aortic arch with replacement by homograft. *Surg Gynecol Obstet*. 1957 Dec;105(6):657-64.

Dewhurst AT, Moore SJ, Liban JB. Pharmacological agents as cerebral protectants during deep hypothermic circulatory arrest in adult thoracic aortic surgery. A survey of current practice. *Anaesthesia*. 2002 Oct;57(10):1016-21.

Dietrich WD, Busto R, Valdes I et al. Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 1990 Sep;21(9):1318-25.

Drew CE, Keen G, Benazon DB. Profound hypothermia. *Lancet*. 1959 Apr 11;1(7076):745-7.

Duthu GS. Interspecies correlation of the pharmacokinetics of erythromycin, oleandomycin, and tylosin. *J Pharm Sci*. 1985 Sep;74(9):943-6.

Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R et al. ACC/AHA Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1991 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). American College of Cardiology/American Heart Association. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Oct;34(4):1262-347.

Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R et al. ACC/AHA guidelines for coronary artery bypass graft surgery: executive summary and recommendations: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1991 guidelines for coronary artery bypass graft surgery). *Circulation*. 1999 Sep 28;100(13):1464-80.

Edmonds HL Jr, Griffiths LK, van der Laken J et al. Quantitative electroencephalographic monitoring during myocardial revascularization predicts postoperative disorientation and improves outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992 Mar;103(3):555-63.

Edwards P, Arango M, Balica L et al. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury—outcomes at 6 months. *Lancet*. 2005 Jun 4-10;365(9475):1957-9.

Ehrlich MP, Ergin MA, McCullough JN et al. Predictors of adverse outcome and transient neurological dysfunction after ascending aorta/hemiarch replacement. *Ann Thorac Surg*. 2000 Jun;69(6):1755-63.

Ehrlich MP, McCullough J, Wolfe D et al. Cerebral effects of cold reperfusion after hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 May;121(5):923-31.

Ehrlich MP, McCullough JN, Zhang N et al. Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig. *Ann Thorac Surg* 2002;73:191-7

Ehrlich MP, Schillinger M, Grabenwöger M et al. Predictors of adverse outcome and transient neurological dysfunction following surgical treatment of acute type A dissections. *Circulation*. 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II318-23.

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

Ekroth R, van der Linden J, Lincoln C et al. Cerebral perfusion and metabolism after profound hypothermia—comparison between procedures involving no flow and low flow. *Cardiol Young* 1993;3:378-82.

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

Endres M, Wang ZQ, Namura S et al. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997 Nov;17(11):1143-51.

Ergin MA, Galla JD, Lansman LS et al. Hypothermic circulatory arrest in operations on the thoracic aorta. Determinants of operative mortality and neurologic outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994 Mar;107(3):788-97; discussion 797-9.

Ergin AM, Griep BE, Lansmann LS et al. 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 et al. 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 MA, Uysal S, Reich DL et al. Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jun;67(6):1887-90; discussion 1891-4.

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

Fearn SJ, Pole R, Wesnes K et al. Cerebral injury during cardiopulmonary bypass: emboli impair memory. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Jun;121(6):1150-60.

Fenton KN, Freeman K, Glogowski K et al. The significance of baseline cerebral oxygen saturation in children undergoing congenital heart surgery. *Am J Surg*. 2005 Aug;190(2):260-3.

Fergusson DA, Hébert PC, Mazer CD et al. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2008 May 29;358(22):2319-31.

Filgueiras CL, Ryner L, Ye J et al. Cerebral protection during moderate hypothermic circulatory arrest: histopathology and magnetic resonance spectroscopy of brain energetics and intracellular pH in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Oct;112(4):1073-80.

Filgueiras CL, Winsborrow B, Ye J et al. A 31p-magnetic resonance study of antegrade and retrograde cerebral perfusion during aortic arch surgery in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jul;110(1):55-62.

Fleck TM, Czerny M, Hutschala D et al. The incidence of transient neurologic dysfunction after ascending aortic replacement with circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2003 Oct;76(4):1198-202.

Fox LS, Blackstone EH, Kirklin JW et al. 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 et al. 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

George CP, Goldberg MP, Choi DW et al. Dextromethorphan reduces neocortical ischemic neuronal damage in vivo. *Brain Res.* 1988 Feb 9;440(2):375-9.

Gillinov AM, Redmond JM, Zehr KJ et al. Superior cerebral protection with profound hypothermia during circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1993 Jun;55(6):1432-9.

Gilman S. Cerebral disorders after open-heart operations. *N Engl J Med.* 1965 Mar 11;272:489-98.

Givehchian M, Beschorner R, Ehmann C et al. Neuroprotective effects of erythropoietin during deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Mar;37(3):662-8.

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

Govier AV, Reves JG, McKay RD et al. Factors and their influence on regional cerebral blood flow during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1984 Dec;38(6):592-600.

Greeley WJ, Kern FH, Meliones JN et al. Effect of deep hypothermia and circulatory arrest on cerebral blood flow and metabolism. *Ann Thorac Surg.* 1993 Dec;56(6):1464-6. Review.

Greeley WJ, Ungerleider RM, Smith LR et al. The effects of deep hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral blood flow in infants and children. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989 May;97(5):737-45.

Griep RB, Griep RB. Cerebral consequences of hypothermic circulatory arrest in adults. *J Card Surg.* 1992 Jun;7(2):134-55. Review.

Griep RB, Ergin MA, McCullough JN et al. Use of hypothermic circulatory arrest for cerebral protection during aortic surgery. *J Card Surg.* 1997 Mar-Apr;12(2 Suppl):312-21. Review.

Griep RB, Stinson EB, Hollingsworth JF et al. Prosthetic replacement of the aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1975 Dec;70(6):1051-63.

Grilli M, Pizzi M, Memo M et al. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1383-5.

Grogan K, Stearns J, Hogue CW. Brain protection in cardiac surgery. *Anesthesiol Clin.* 2008 Sep;26(3):521-38.

Groom RC, Quinn RD, Lennon P et al. Microemboli from cardiopulmonary bypass are associated with a serum marker of brain injury. *J Extra Corpor Technol.* 2010 Mar;42(1):40-4.

Hagl C, Ergin MA, Galla JD et al. Neurologic outcome after ascending aorta-aortic arch operations: effect of brain protection technique in high-risk patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Jun;121(6):1107-21.

Hagl C, Khaladj N, Peterss S et al. Hypothermic circulatory arrest with and without cold selective antegrade cerebral perfusion: impact on neurological recovery and tissue metabolism in an acute porcine model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Jul;26(1):73-80.

Hagl C, Khaladj N, Weisz DJ et al. Impact of high intracranial pressure on neurophysiological recovery and behavior in a chronic porcine model of hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Oct;22(4):510-6.

Hall R, Murdoch J. Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part II: The pharmacology of brain protection. *Can J Anaesth.* 1990 Oct;37(7):762-77. Review.

Hagl C, Tatton NA, Khaladj N et al. 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 et al. 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

Hammon JW Jr, Stump DA, Kon ND et al. Risk factors and solutions for the development of neurobehavioral changes after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 1997 Jun;63(6):1613-8.

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, Bonser M, Moss A et al. Neuropsychometric outcome following aortic arch surgery: a prospective randomized trial of retrograde cerebral perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Sep;126(3):638-44.

Harrington DK, Fragomeni F, Bonser RS. Cerebral Perfusion. *Ann Thorac Surg.* 2007 Feb;83(2):S799-804; discussion S824-31.

van Harten AE, Scheeren TW, Absalom AR. A review of postoperative cognitive dysfunction and neuroinflammation associated with cardiac surgery and anaesthesia. *Anaesthesia.* 2012 Mar;67(3):280-93.

Hickey PR. Neurologic sequelae associated with deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1998;65:S65–S70.

Hillier SC, Burrows FA, Bissonnette B et al. Cerebral hemodynamics in neonates and infants undergoing cardiopulmonary bypass and profound hypothermic circulatory arrest: assessment by transcranial Doppler sonography. *Anesth Analg.* 1991 Jun;72(6):723-8.

Hirotsu T, Kameda T, Kumamoto T et al. Aortic arch repair using hypothermic circulatory arrest technique associated with pharmacological brain protection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000 Nov;18(5):545-9.

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

Huber R, Kasischke K, Ludolph AC et al. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics. *Neuroreport.* 1999 May 14;10(7):1543-6.

Imshenetskaia VF. [Erythromycin penetration into the cerebrospinal fluid of patients]. *Antibiotiki.* 1976 Nov;21(11):1002-4.

Immer FF, Barmettler H, Berdat PA et al. Effects of deep hypothermic circulatory arrest on outcome after resection of ascending aortic aneurysm. *Ann Thorac Surg*. 2002 Aug;74(2):422-5.

Jian Ye, Luojia Yang, Del Bigio MR et al. 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

Jonassen AE, Quaegebeur JM, Young WL. Cerebral blood flow velocity in pediatric patients is reduced after cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Oct;110(4 Pt 1):934-43.

Juvonen T, Weisz DJ, Wolfe D et al. Can retrograde perfusion mitigate cerebral injury after particulate embolization? A study in a chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 May;115(5):1142-59.

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

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

Kincaid EH, Jones TJ, Stump DA et al. Processing scavenged blood with a cell saver reduces cerebral lipid microembolization. *Ann Thorac Surg.* 2000 Oct;70(4):1296-300.

Kinoshita T, Son DS, Shimoda M et al. Impact of age-related alteration of plasma alpha 1-acid glycoprotein concentration on erythromycin pharmacokinetics in pigs. *Am J Vet Res.* 1995 Mar;56(3):362-5.

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 et al. 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

Koerner IP, Gattling M, Noppens R et al. Induction of cerebral ischemic tolerance by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to ischemia and suppresses inflammation. *Anesthesiology.* 2007 Mar;106(3):538-47.

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 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 et al. Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1068-1077

Langley SM, Chai PJ, Jagers JJ et al. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000 Mar;17(3):279-86.

Langley SM, Chai PJ, Jagers JJ et al. The free radical spin trap alpha-phenyl-tert-butyl nitron attenuates the cerebral response to deep hypothermic ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Feb;119(2):305-13.

Lanier WL. Glucose management during cardiopulmonary bypass: cardiovascular and neurologic implications. *Anesth Analg*. 1991 Apr;72(4):423-7.

Laptook AR, Corbett R, Sterett R et al. Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatr Res* 1994;35:436-42

LeBlanc MH, Huang M, Patel D et al. Glucose given after hypoxic ischemia does not affect brain injury in piglets. *Stroke*. 1994 Jul;25(7):1443-7; discussion 1448.

de Leon SY, Roughneen PTT, King N et al. Experimental evidence of cerebral injury from profound hypothermia during cardiopulmonary bypass. *Pediatr Cardiol* 1998;19:398-403

van der Linden J. Cerebral hemodynamics after low-flow versus no-flow procedures. *Ann Thorac Surg*. 1995 May;59(5):1321-5. Review.

van der Linden J, Ekroth R, Lincoln C et al. Is cerebral blood flow/metabolic mismatch during rewarming a risk factor after profound hypothermic procedures in small children? *Eur J Cardiothorac Surg.* 1989;3(3):209-15.

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

Liu YH, Wang DX, Li LH et al. The effects of cardiopulmonary bypass on the number of cerebral microemboli and the incidence of cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. *Anesth Analg.* 2009 Oct;109(4):1013-22.

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

Lodge AJ, Chai PJ, Daggett CW et al. Methylprednisolone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in neonatal piglets: timing of dose is important. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Mar;117(3):515-22.

Loop FD, Szabo J, Rowlinson RD et al. Events related to microembolism during extracorporeal perfusion in man: effectiveness of in-line filtration recorded by ultrasound. *Ann Thorac Surg.* 1976 May;21(5):412-20.

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

Lundell JC, Scuderi PE, Butterworth JF 4th. Less isoflurane is required after than before cardiopulmonary bypass to maintain a constant bispectral index value. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2001 Oct;15(5):551-4.

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

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

Maier AC, Phu PT, Huang AJ et al. 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

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

McCullough JN, Zhang N, Reich DL et al. Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg.* 1999 Jun;67(6):1895-9; discussion 1919-21.

McKhann GM, Grega MA, Borowicz LM Jr et al. Encephalopathy and stroke after coronary artery bypass grafting: incidence, consequences, and prediction. *Arch Neurol.* 2002 Sep;59(9):1422-8.

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

Mezrow CK, Gandsas A, Sadeghi AM et al. Metabolic correlates of neurologic and behavioral injury after prolonged hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 May;109(5):959-75.

Mezrow CK, Midulla PS, Sadeghi AM et al. Evaluation of cerebral metabolism and quantitative electroencephalography after hypothermic circulatory arrest and low-flow cardiopulmonary bypass at different temperatures. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Apr;107(4):1006-19.

Mezrow CK, Sadeghi AM, Gandsas A et al. A vulnerable interval for cerebral injury: comparison of hypothermic circulatory arrest and low-flow cardiopulmonary bypass. *Cardiol Young* 1993;3:287-98.

Mezrow CK, Sadeghi AM, Gandsas A et al. Cerebral effects of low-flow cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1994 Mar;57(3):532-9; discussion 539.

Michaud LJ, Rivara FP, Longstreth WT Jr et al. Elevated initial blood glucose levels and poor outcome following severe brain injuries in children. *J Trauma.* 1991 Oct;31(10):1356-62.

Michenfelder JD, Milde JH. The relationship among canine brain temperature, metabolism, and function during hypothermia. *Anesthesiology.* 1991 Jul;75(1):130-6.

Michenfelder JD, Theye RA. Cerebral protection by thiopental during hypoxia. *Anesthesiology* 1973;39:510-7.

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

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

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

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

Montoliu C, Llansola M, Monfort P et al. Role of nitric oxide and cyclic GMP in glutamate-induced neuronal death. *Neurotox Res.* 2001 Apr;3(2):179-88.

Moody DM, Bell MA, Challa VR et al. Brain microemboli during cardiac surgery or aortography. *Ann Neurol.* 1990 Oct;28(4):477-86.

Moorjani N, Viola N, Ohri SK. Key Questions in cardiac surgery. Gutenberg Press Ltd. 1st edition; 2010, pg 229.

Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke.* 1995 Mar;26(3):503-13. Review.

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

Murkin JM. The role of CPB management in neurobehavioral outcomes after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 1995 May;59(5):1308-11. Review.

Murkin JM, Adams SJ, Novick RJ et al. Monitoring brain oxygen saturation during coronary bypass surgery: a randomized, prospective study. *Anesth Analg*. 2007 Jan;104(1):51-8.

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

Nemoto EM, Klementavicius R, Melick JA et al. Effect of mild hypothermia on active and basal cerebral oxygen metabolism and blood flow. *Adv Exp Med Biol*. 1994;361:469-73.

Nemoto EM, Klementavicius R, Melick JA et al. Suppression of cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO₂) by mild hypothermia compared with thiopental. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1996 Jan;8(1):52-9.

Neri E, Sassi C, Barabesi L et al. Cerebral autoregulation after hypothermic circulatory arrest in operations on the aortic arch. *Ann Thorac Surg*. 2004 Jan;77(1):72-9; discussion 79-80.

Newburger WJ, Jonas AR, Wernovsky G et al. 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

Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B et al. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. 2001 Feb 8;344(6):395-402. Erratum in: *N Engl J Med* 2001 Jun 14;344(24):1876.

Nussmeier NA, Arlund C, Slogoff S. Neuropsychiatric complications after cardiopulmonary bypass: cerebral protection by a barbiturate. *Anesthesiology*. 1986 Feb;64(2):165-70.

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

O'Hare B, Bissonnette B, Bohn D et al. Persistent low cerebral blood flow velocity following profound hypothermic circulatory arrest in infants. *Can J Anaesth*. 1995 Nov;42(11):964-71.

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

Olney J. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer EGOJ, McGeer PL, eds. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. New York: Raven; 1978:95.

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

Oo TF, Henchcliffe C, James D et al. 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

Padayachee TS, Parsons S, Theobald R et al. The effect of arterial filtration on reduction of gaseous microemboli in the middle cerebral artery during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1988 Jun;45(6):647-9.

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

Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res*. 1990 Apr;27(4 Pt 1):332-6.

Parolari A, Alamanni F, Naliato M et al. Adult cardiac surgery outcomes: role of the pump type. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000 Nov;18(5):575-82.

Pesonen EJ, Peltola KI, Korpela RE et al. Delayed impairment of cerebral oxygenation after deep hypothermic circulatory arrest in children. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jun;67(6):1765-70.

Patel RL, Turtle MR, Chambers DJ et al. Alpha-stat acid-base regulation during cardiopulmonary bypass improves neuropsychologic outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Jun;111(6):1267-79.

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 et al. 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)

Redmond JM, Gillinov AM, Zehr KJ et al. Glutamate excitotoxicity: a mechanism of neurologic injury associated with hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Mar;107(3):776-86; discussion 786-7.

Redmond JM, Zehr KJ, Blue ME et al. AMPA glutamate receptor antagonism reduces neurologic injury after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1995 Mar;59(3):579-84.

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 Mit* 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 DL, Uysal S, Sliwinski M et al. Neuropsychologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest in adults. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Jan;117(1):156-63

Reinsfelt B, Ricksten SE, Zetterberg H et al. Cerebrospinal fluid markers of brain injury, inflammation, and blood-brain barrier dysfunction in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2012 Aug;94(2):549-55.

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

Rimpiläinen J, Pokela M, Kiviluoma K et al. Leukocyte filtration improves brain protection after a prolonged period of hypothermic circulatory arrest: A study in a chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Dec;120(6):1131-41.

Roach GW, Kanchuger M, Mangano CM et al. Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators. *N Engl J Med*. 1996 Dec 19;335(25):1857-63.

Rodriguez RA, Austin EH 3rd, Audenaert SM. Postbypass effects of delayed rewarming on cerebral blood flow velocities in infants after total circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Dec;110(6):1686-90; discussion 1690-1.

Rokkas CK, Cronin CS, Nitta T et al. 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*. 1986 Feb;19(2):105-11. Review.

Royston D, Levy JH, Fitch J et al. Full-dose aprotinin use in coronary artery bypass graft surgery: an analysis of perioperative pharmacotherapy and patient outcomes. *Anesth Analg*. 2006 Nov;103(5):1082-8.

Sabet HY, Edwards WD, Tazelaar HD et al. Congenitally bicuspid aortic valves: a surgical pathology study of 542 cases (1991 through 1996) and a literature review of 2,715 additional cases. *Mayo Clin Proc*. 1999 Jan;74(1):14-26.

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 et al. 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

Sedrakyan A, Treasure T, Elefteriades JA. Effect of aprotinin on clinical outcomes in coronary artery bypass graft surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Sep;128(3):442-8. Review.

Shaaban Ali M, Harmer M, Kirkham F. Cardiopulmonary bypass temperature and brain function. *Anaesthesia.* 2005 Apr;60(4):365-72.

Shapiro HM. Barbiturates in brain ischaemia. *Br J Anaesth.* 1985 Jan;57(1):82-95. Review.

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, Nagashima M, Shinoka T et al. Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Nov;116(5):780-92.

Shum-Tim D, Tchervenkov CI, Jamal AM et al. Systemic steroid pretreatment improves cerebral protection after circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2001 Nov;72(5):1465-71; discussion 1471-2.

Shum-Tim D, Tchervenkov CI, Laliberté 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 Jul;24(1):125-32.

Siegmán MG, Anderson RV, Balaban RS et al. Barbiturates impair cerebral metabolism during hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1992 Dec;54(6):1131-6.

Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M et al. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363:166-9, 1993

Stephan H, Weyland A, Kazmaier S et al. Acid-base management during hypothermic cardiopulmonary bypass does not affect cerebral metabolism but does affect blood flow and neurological outcome. *Br J Anaesth.* 1992 Jul;69(1):51-7.

Strauch JT, Spielvogel D, Haldenwang LP et al. 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 et al. 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 PL et al. Cooling to 10 degrees C and treatment with Cyclosporine A improve cerebral recovery following prolonged hypothermic circulatory arrest in a chronic porcine model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Jan;27(1):74-80.

Stump DA, Rogers AT, Hammon JW et al. Cerebral emboli and cognitive outcome after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1996 Jan;10(1):113-8; quiz 118-9. Review.

Svensson LG. Antegrade perfusion during suspended animation? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;124(6):1068-70.

Svensson LG, Crawford ES, Hess KR et al. Deep hypothermia with circulatory arrest. Determinants of stroke and early mortality in 656 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jul;106(1):19-28; discussion 28-31.

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 et al. Aortic arch repair with right brachial artery perfusion. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1837-42

Tatton NA, Hagl C, Nandor S et al. 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

Terada H, Kazui T, Takinami M et al. Reduction of ischemic spinal cord injury by dextrorphan: comparison of several methods of administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Nov;122(5):979-85.

The Warm Heart Investigators. Randomised trial of normothermic versus hypothermic coronary bypass surgery. *Lancet.* 1994 Mar 5;343(8897):559-63.

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

Todd MM, Warner DS. A comfortable hypothesis reevaluated. Cerebral metabolic depression and brain protection during ischemia. *Anesthesiology*. 1992 Feb;76(2):161-4.

Tseng EE, Brock MV, Kwon CC et al. Increased intracerebral excitatory amino acids and nitric oxide after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1999 Feb;67(2):371-6.

Tseng EE, Brock MV, Lange MS. Neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1639–1647.

Tseng EE, Brock MV, Lange MS et al. Nitric oxide mediates neurologic injury after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jan;67(1):65-71.

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 Aug;12(2):228-35.

Videm V, Fosse E, Mollnes TE et al. Different oxygenators for cardiopulmonary bypass lead to varying degrees of human complement activation in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 May;97(5):764-70.

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.

Warner DS. Isoflurane neuroprotection: a passing fantasy, again? *Anesthesiology*. 2000 May;92(5):1226-8. Review.

Whitaker DC, Newman SP, Stygall J et al. The effect of leucocyte-depleting arterial line filters on cerebral microemboli and neuropsychological outcome following coronary artery bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Feb;25(2):267-74.

Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol*. 2002 Jan 31;35(1):67-86. Review.

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

Wong BI, McLean RF, Naylor CD et al. Central-nervous-system dysfunction after warm or hypothermic cardiopulmonary bypass. *Lancet*. 1992 Jun 6;339(8806):1383-4.

Wypij D, Newburger WJ, Rappaport AL et al. 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 mammalian interleukin 1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652, 1993

Zaidan JR, Klochany A, Martin WM et al. Effect of thiopental on neurologic outcome following coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 1991 Mar;74(3):406-11.

Zanatta P, Forti A, Minniti G et al. Brain emboli distribution and differentiation during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013 Oct;27(5):865-75.

Zhang Y, Bhavnani BR. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci.* 2006 Jun 15;7:49.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Σελ. 1 ΚΝΣ - Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- Σελ. 1 CMRO₂ - Cerebral Metabolic Rate of Oxygen
- Σελ. 2 Ε/Κ - Εξωσωματική Κυκλοφορία
- Σελ. 6 SCADs - small capillary and arteriolar dilatations
- Σελ. 7 ΥΟΚΠ - Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση
- Σελ. 9 PaCO₂ ή pCO₂ - μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα στο αρτηριακό αίμα
- Σελ. 10 CBF - εγκεφαλική αιματική ροή
- Σελ. 11 PaO₂ ή pO₂ - μερική πίεση του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα
- Σελ. 11 CO₂ - διοξείδιο του άνθρακα
- Σελ. 20 PCr - φωσφοκρεατίνη
- Σελ. 20 ATP - τριφωσφορική αδενοσίνη
- Σελ. 20 ADP - διφωσφορική αδενοσίνη
- Σελ. 21 NO - μονοξείδιο του αζώτου
- Σελ. 21 nNOS - νευρωνική συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
- Σελ. 21 NMDA - N-μεθυλο-D-ασπαρτικός
- Σελ. 22 TNFα - παράγοντας νέκρωσης όγκων-άλφα
- Σελ. 22 IL 1-β - ιντερλευκίνη 1-β
- Σελ. 24 CDKs - κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες
- Σελ. 24 DNA - δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
- Σελ. 26 TNFR - υποδοχέας του παράγοντας νέκρωσης όγκων
- Σελ. 30 CASP - κασπάσες
- Σελ. 31 ICE - Interleukin Convertin Enzyme
- Σελ. 34 TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling
- Σελ. 35 H₂O₂ - υπεροξείδιο του υδρογόνου
- Σελ. 40 BIS - bispectral index
- Σελ. 40 PSI - patient state index
- Σελ. 40 SjVO₂ - κορεσμός σε οξυγόνο του αίματος στον σφαγιτιδικό βολβό
- Σελ. 43 NBQX - 6-nitro-7sulfamoyl(f)quinoxaline-2,3-dione
- Σελ. 57 ACT - activated clotting time

Σελ. 59 PBS - phosphate buffered solution

Σελ. 62 H&E - Αιματοξυλίνη - Ηωσίνη

Σελ. 66 SD - standard deviation

Σελ. 66 ANOVA - Analysis of Variance

Σελ. 66 PLSD - Protected Least Significance Difference

ΠΙΝΑΚΕΣ

Σελ. 12 **Πίνακας 1.** Υπολογιζόμενη ασφαλής διάρκεια ολικής κυκλοφορικής παύσης

Σελ. 15 **Πίνακας 2.** Νευρολογικές βλάβες μετά από Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

Σελ. 62 **Πίνακας 3.** Πίνακας συλλογής δεδομένων

Σελ. 68 **Πίνακας 4.** Περιεγχειρητικές φυσιολογικές μεταβλητές

Σελ. 69 **Πίνακας 5.** Αποτελέσματα νευρικής βλάβης στις ομάδες Ery, Veh και CTL

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Σελ. 67 *Διάγραμμα 1.* Επίπεδα αιματοκρίτη και γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες Veh και Ery

Σελ. 71 *Διάγραμμα 2.* Αποτελέσματα νευρικής βλάβης του νεοφλοιού (H&E) στις ομάδες CTL, Veh και Ery

Σελ. 72 *Διάγραμμα 3.* Αποτελέσματα TUNEL χρώσης του νεοφλοιού των χοίρων των ομάδων CTL, Veh και Ery

ΕΙΚΟΝΕΣ

Σελ. 4 **Εικόνα 1.** Η εξωσωματική μηχανή και το κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας

Σελ. 4 **Εικόνα 2.** Καρδιοπνευμονική παράκαμψη

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

Σελ. 56 **Εικόνα 4.** Εξασφάλιση φλεβικής πρόσβασης

Σελ. 56 **Εικόνα 5.** Διασωλήνωση και μηχανικός αερισμός

Σελ. 58 **Εικόνα 6.** Cannulation αορτής/δεξιού κόλπου

Σελ. 58 **Εικόνα 7.** Υποθερμική Ολική Κυκλοφορική Παύση

Σελ. 59 **Εικόνα 8.** En block αφαίρεση του εγκεφάλου

Σελ. 63 **Εικόνα 9.** Τα δύο ημισφαίρια του χοίρειου εγκέφαλου

Σελ. 69 **Εικόνα 10.** Φωτομικρογραφία H&E και TUNEL στην περιοχή του νεοφλοιού της ομάδας Veh

Σελ. 70 **Εικόνα 11.** Φωτομικρογραφία H&E στην περιοχή του νεοφλοιού στις τρεις πειραματικές ομάδες

Σελ. 71 **Εικόνα 12.** Φωτομικρογραφία TUNEL στην περιοχή του νεοφλοιού στις τρεις πειραματικές ομάδες

Σελ. 83 **Εικόνα 13.** Αναρτημένη ανακοίνωση στο 30th Annual Meeting of the American Association of Clinical Anatomists, July 9 - 13, 2013, Denver, Colorado, USA

Σελ. 85 **Εικόνα 14.** Highlight στο "EACTS Daily News" newspaper στο συνέδριο 28th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, October 11 - 15, 2014, Milan, Italy

Σελ. 86 **Εικόνα 15.** Βραβείο προφορικών ανακοινώσεων στο 23rd World Congress of the World Society of Cardio-Thoracic Surgeons, September 12 - 15, 2013, Split, Croatia

Σελ. 86 **Εικόνα 16.** Βραβείο προφορικών ανακοινώσεων στο 12^ο Βορειοελλαδικό Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 30 Μαΐου - 1 Ιουνίου 2013