

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE
DEI SERVIZI: PROGETTO N. 1 "MEDICINA MATERNO-INFANTILE E
DELL'ETÀ EVOLUTIVA E FISIOPATOLOGIA DELLA SVILUPPO SESSUALE"
Ciclo XXIV

Settore Scientifico Disciplinare: MED/38 Pediatria Generale e Specialistica

Settore Concorsuale di afferenza: 06/G1 Pediatria Generale, Specialistica e
Neuropsichiatria Infantile

***PREDITTORI PRECOCI DI OUTCOME NEUROLOGICO NEI
NEONATI AFFETTI DA ENCEFALOPATIA IPOSSICO-
ISCHEMICA SOTTOPOSTI A TRATTAMENTO IPOTERMICO.
STUDIO COMBINATO ELETTROENCEFALOGRAMMA AD
INTEGRAZIONE DI AMPIEZZA E SPETTROSCOPIA NEL
VICINO INFRAROSSO***

Presentata da:

Dott.ssa EUGENIA MARANELLA

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. LUIGI BOLONDI

Relatore

Chiar.mo Prof. GIACOMO FALDELLA

Esame finale anno 2012

<i>Abstract</i>	3
INTRODUZIONE	4
METODICHE DI MONITORAGGIO CEREBRALE	7
L'ELETTROENCEFALOGRAMMA AD INTEGRAZIONE DI AMPIEZZA (aEEG)	7
LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIRS)	10
PRINCIPI FISICI	10
APPLICAZIONI CLINICHE: STUDI SUL NEONATO	14
PAZIENTI E METODI	16
MONITORAGGIO CON aEEG	17
MONITORAGGIO NIRS	17
FOLLOW-UP NEUROLOGICO:	18
OBIETTIVI	19
ANALISI STATISTICA	19
DISCUSSIONE	24
CONCLUSIONI	28
BIBLIOGRAFIA	30

Abstract

Background: Brain cooling (BC) represents the elective treatment in asphyxiated newborns. Amplitude Integrated Electroencephalography (aEEG) and Near Infrared Spectroscopy (NIRS) monitoring may help to evaluate changes in cerebral electrical activity and cerebral hemodynamics during hypothermia.

Objectives: To evaluate the prognostic value of aEEG time course and NIRS data in asphyxiated cooled infants.

Methods: 12 term neonates admitted to our NICU with moderate-severe Hypoxic-Ischemic Encephalopathy (HIE) underwent selective BC. aEEG and NIRS monitoring were started as soon as possible and maintained during the whole hypothermic treatment. Follow-up was scheduled at regular intervals; adverse outcome was defined as death, cerebral palsy (CP) or global quotient < 88.7 at Griffiths' Scale.

Results: 2/12 infants died, 2 developed CP, 1 was normal at 6 months of age and then lost at follow-up and 7 showed a normal outcome at least at 1 year of age. The aEEG background pattern at 24 hours of life was abnormal in 10 newborns; only 4 of them developed an adverse outcome, whereas the 2 infants with a normal aEEG developed normally. In infants with adverse outcome NIRS showed a higher Tissue Oxygenation Index (TOI) than those with normal outcome ($80.0 \pm 10.5\%$ vs $66.9 \pm 7.0\%$, $p=0.057$; $79.7 \pm 9.4\%$ vs $67.1 \pm 7.9\%$, $p=0.034$; $80.2 \pm 8.8\%$ vs $71.6 \pm 5.9\%$, $p=0.069$ at 6, 12 and 24 hours of life, respectively).

Conclusions: The aEEG background pattern at 24 hours of life loses its positive predictive value after BC implementation; TOI could be useful to predict early on infants that may benefit from other innovative therapies.

INTRODUZIONE

L'encefalopatia ipossico-ischemica (EII) rimane a tutt'oggi una delle principali cause di danno neurologico acuto alla nascita con un'incidenza di circa 1-2/1000 nati a termine [1]. Nonostante il miglioramento dell'assistenza perinatale, il 15-28% delle paralisi cerebrali infantili è attribuibile all'EII. L'EII è l'espressione del danno cerebrale che consegue all'asfissia intrapartum, è un processo evolutivo caratterizzato da una fase primaria ed una fase secondaria di alterazione del metabolismo cerebrale (Fig 1). Ad una noxa ipossico-ischemica consegue un danno a carico delle cellule del sistema nervoso centrale che è funzione della durata e dell'intensità dell'ipossi-ischemia. In questa fase una rianimazione cardio-respiratoria efficace alla nascita gioca un ruolo determinante. Al primo stadio di morte cellulare segue una seconda fase di danno caratterizzata da apoptosi. Tale processo si innesca dopo circa 6-24 ore dall'insulto e si prolunga anche per giorni. E' una fase energeticamente attiva che si avvia dopo la riperfusione cerebrale e il cui motore trainante è il sistema mitocondriale. Il mitocondrio danneggiato dall'insulto ischemico rilascia nel citoplasma proteine, quali il citocromo C, che a loro volta attivano enzimi proteolitici (caspasi 3 e 9) responsabili della frammentazione nucleare [2-4]. Studi condotti su modello animale e confermati da studi in vivo su pazienti affetti da EII confermano che a seguito di un insulto ipossico, dopo un iniziale e transitorio recupero del metabolismo cerebrale, si avvia la fase secondaria di danno definita come *secondary energy failure* e caratterizzata dall'alterazione del metabolismo ossidativo e dalla comparsa di morte neuronale, entrambi fattori responsabili dell'insorgenza tardiva di convulsioni [5-7]. La gravità del danno instauratosi in questa seconda fase è stata strettamente correlata all'outcome neurologico dei soggetti affetti da EII [8]. L'insorgenza della seconda fase del danno, dopo circa 6 ore dall'evento ipossico, fa sì che esista una finestra terapeutica in cui poter intervenire con eventuali trattamenti in grado di riparare e/o limitare il danno già instaurato. L'ipotermia selettiva o sistemica è considerata attualmente il trattamento di scelta nella EII. In effetti tale approccio terapeutico, se iniziato entro le 6 ore dall'insulto ischemico (*fase latente*), prima dell'instaurarsi della *secondary energy failure*, è risultato in grado di ridurre le disabilità neurologiche

correlate all'encefalopatia neonatale [9,10]. L'ipotermia sembra avere un potente effetto neuroprotettivo, dose-dipendente. Essa infatti, oltre a provocare l'inibizione del rilascio di glutammato, il miglioramento della funzione della barriera emato-encefalica, la prevenzione della proteolisi, la riduzione del metabolismo cerebrale, dell'accumulo di acido lattico e della produzione di NO, previene l'edema cerebrale e la morte neuronale per apoptosi [11-16]. Una revisione sistematica Cochrane confrontando 8 trials clinici randomizzati controllati (RCT) ha valutato l'efficacia dell'ipotermia terapeutica, sia essa sistemica o selettiva, nel neonato a termine affetto da EII di grado moderato-severo con evidenza di asfissia intrapartum, dimostrando una riduzione statisticamente significativa, e clinicamente importante, dell'outcome combinato di mortalità o disabilità maggiore a 18 mesi di vita [RR 0.76 (95% CI 0.65, 0.89), RD -0.15 (95% CI -0.24, -0.07), NNT 7 (95% CI 4, 14)]. A fronte degli esiti positivi sopra citati, la presenza di effetti avversi è limitata ad un modesto incremento del fabbisogno di inotropi e ad un incremento significativo dell'incidenza di piastrinopenia [17].

A seguito dell'implementazione dell'ipotermia, attualmente uno degli obiettivi più importanti nell'approccio al paziente affetto da EII rimane la ricerca di un monitoraggio ottimale in grado di identificare dei validi indicatori prognostici di outcome neurologico in modo da selezionare precocemente i pazienti non responsivi da arruolare in ulteriori trials terapeutici neuroprotettivi e quindi di migliorarne l'outcome [9,18-19].

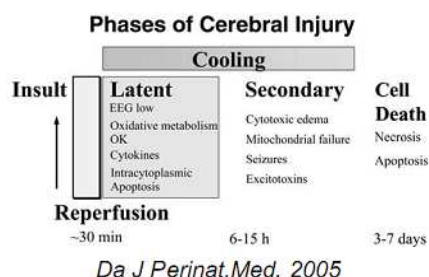
L'elettroencefalogramma ad integrazione di ampiezza (aEEG) viene attualmente utilizzato per monitorare in continuo a letto del paziente l'attività elettrica cerebrale. E' uno strumento utile nella pratica clinica in quanto di più semplice e rapida lettura rispetto all'EEG classico e permette di identificare precocemente, entro le prime 6 ore di vita, i soggetti con EII eleggibili al trattamento ipotermico. L'aEEG permette di registrare l'attività elettrica corticale nel suo insieme non riuscendo a localizzare le aree epilettogene specifiche, tuttavia consente di monitorare per lungo tempo l'attività bioelettrica di fondo, di studiarne la maturazione, di valutare i cambiamenti di pattern e di riconoscere l'attività convulsiva generalizzata. L'aEEG background pattern nelle prime 3 ore di vita presenta un alto valore predittivo positivo di outcome avverso [9]. L'associazione tra anomalie elettriche all'aEEG e segni precoci di alterazione

neurologica aumenta l'accuratezza prognostica rispetto a ciascun segno preso singolarmente [10,18-20]. Il monitoraggio continuo dell'attività elettrica cerebrale durante le prime ore dall'insulto ipossico riflette le variazioni dell'attività cerebrale. Infatti, una precoce normalizzazione del tracciato aEEG entro le prime 24 ore di vita in pazienti affetti da EII è considerata un buon indicatore prognostico di outcome neurologico normale [21-23].

Negli ultimi anni la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) è stata introdotta nella pratica clinica per monitorare in continuo l'emodinamica cerebrale. Essa permette di misurare le variazioni delle concentrazioni di emoglobina ossigenata e deossigenata dando un indicatore indiretto della perfusione ed ossigenazione tissutale [24]. I più recenti strumenti NIRS permettono inoltre di ottenere direttamente una stima dell'ossigenazione cerebrale mediante l'indice di ossigenazione tissutale (TOI) relativo alla saturazione di ossigeno del compartimento venoso (70-80%), capillare (5%) e arterioso (20-25%) [19,25-26]. Studi precedenti riportano che le variazioni di ossigenazione cerebrale nei neonati affetti da EII risultano strettamente correlate con la severità del danno cerebrale, registrando un aumento dell'ossigenazione cerebrale nei pazienti con outcome patologico. Infatti, durante la secondary energy failure la vasodilatazione massiva con conseguente iperemia e vasoparalisi e la contemporanea riduzione di utilizzo dell'ossigeno da parte delle cellule neuronali necrotiche determinano un incremento dell'ossigenazione cerebrale responsabile della fase di "luxury reperfusion" [19,27-29].

Non esistono a tutt'oggi studi sul monitoraggio simultaneo dell'attività elettrofisiologica e delle modifiche metaboliche cerebrali in pazienti con EII in corso di trattamento ipotermico.

Fig. 1. Rappresentazione schematica delle fasi di insulto cerebrale.



METODICHE DI MONITORAGGIO CEREBRALE

L'ELETTROENCEFALOGRAMMA AD INTEGRAZIONE DI AMPIEZZA (aEEG)

Il monitoraggio dell'attività elettrica cerebrale nell'EII è di fondamentale importanza per la valutazione dell'entità del danno instauratosi a seguito dell'insulto ipossico. I tracciati elettroencefalografici mostrano una correlazione con la stadiazione clinica dell'EII. Nel grado 1 della classificazione di Sarnat & Sarnat [30] l'EEG è normale sia in veglia che nel sonno attivo e calmo, il ciclo del sonno è presente mentre la durata degli stati è alterata. Nel grado 2 il tracciato è di basso voltaggio, caratterizzato da ritmi con frequenza variabile dalla banda delta alla beta, a volte è del tipo "basso voltaggio più grafoelementi patologici", il ciclo del sonno è presente ma spesso alterato, e frequenti sono le crisi elettrocliniche. Nel grado 3 il tracciato è prevalentemente inattivo o parossistico, il ciclo del sonno è assente e sono presenti crisi con dissociazione elettroclinica.

Per una più facile fruizione nella pratica clinica, è stata introdotta una forma semplificata di EEG che prende il nome di elettroencefalogramma ad integrazione di ampiezza (a-EEG), che può essere ottenuta in continuo con il Cerebral Function Monitor (CFM). Il CFM registra l'attività bioelettrica mediante due elettrodi posti sulle regioni parietali ed un terzo (massa) in posizione frontale utile per ridurre le interferenze di rete e da elettricità statica. L'interpretazione dei pattern di attività elettrica rilevati mediante CFM appare particolarmente semplice. Nonostante tale tecnica possa rilevare le alterazioni maggiori dell'attività elettrica cerebrale (tracciato piatto, di basso voltaggio, burst suppression, crisi convulsive), senza possibilità di studiare le varie zone cerebrali, offre l'incommensurabile vantaggio di poter essere eseguita nell'arco delle 24 ore e di rilevare quindi in tempo reale non solo eventuali cambiamenti dell'attività elettrica ma anche il controllo della terapia sulle crisi elettriche. Studi precedenti hanno osservato una buona correlazione tra il monitoraggio a-EEG continuo precoce e l'EEG convenzionale [31].

Il tracciato normale di un neonato a termine (CNV continuous normal voltage) appare come una banda di voltaggio compreso tra 10 e 25 μ V, caratterizzata da

continue variazioni di spessore in rapporto all'alternarsi delle fasi di sonno con quelle di veglia. I valori limite sono: margine superiore $> 10 \mu\text{V}$ e margine inferiore $> 5 \mu\text{V}$.

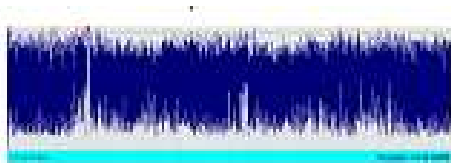
Fig. 2 Tracciato a-EEG normale



I tracciati patologici possono essere divisi in:

1. Moderatamente alterato, con margine superiore $> 10 \mu\text{V}$ e margine inferiore $< 5 \mu\text{V}$.

Fig. 3 Tracciato aEEG moderatamente anormale



2. Severamente alterato, con margine superiore $< 10 \mu\text{V}$ e margine inferiore $< 5 \mu\text{V}$ solitamente associato a burst suppression (BS). Quest'ultima alterazione è rappresentata da tracciato a pattern discontinuo caratterizzato da una rapida successione di riduzione dell'attività elettrica basale sino allo zero (suppression), seguita immediatamente da notevole risalita dell'attività elettrica massima (burst).

Fig. 4 Tracciato aEEG severamente anormale



Convulsioni (10-40 μ V+tracciato a dente di sega)

Fig. 5 Attività elettrica convulsiva



La presenza di un tracciato patologico con margine inferiore $< 5 \mu$ V della durata di almeno 20 min, associato ad almeno una condizione di diagnosi clinica di EII, permette di selezionare i pazienti da avviare al trattamento ipotermico.

È riportato che il pattern aEEG dopo asfissia è accuratamente predittivo dell'outcome nei pazienti con basso Apgar, con un valore predittivo positivo di outcome avverso approssimativamente dell'80% [31]. Uno studio recente ha dimostrato che il 61% dei pazienti con tracciati patologici a 6 ore di vita che recuperano nelle prime 24 h sopravvivono senza importanti esiti motori [21].

LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO (NIRS)

La NIRS è una metodica non invasiva in grado di monitorare i livelli di ossigenazione e perfusione tissutale. Essa si basa sulla differente trasparenza dei tessuti biologici alla luce nella regione degli infrarossi e sull'assorbimento di tali fasci di luce da parte di cromofori naturali. I principi di tale metodica sono stati introdotti ormai circa 30 anni fa da Jobsis [32]. La tecnica consiste nel colpire un tessuto con un fascio di luce appartenente alla lunghezza d'onda del vicino infrarosso ($\lambda=700-1000$ nm) e misurare, ad una distanza nota, la quota di luce assorbita da parte di una sostanza presente nel tessuto stesso (cromoforo) in quantità proporzionale alla sua concentrazione.

Fig. 6 Monitor e tracciato NIRS



PRINCIPI FISICI

Fig.7

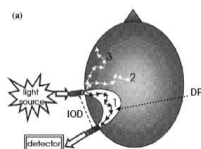
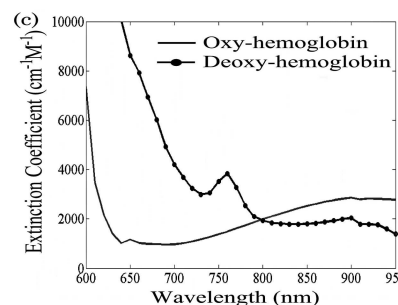


Figure 2.10 Trajectory of photons during a hypothetical NIRS test. Photon 1 is scattered and reaches the detector. Photon 2 is absorbed after a number of scattering events. Photon 3 leaves the head without being detected. DP indicates the differential path length (in practice the product of inter-optode space –IOD– and DPF).

La NIRS prevede l'applicazione di una sonda autoadesiva sulla regione frontale del paziente. Tale sonda è costituita da due parti collegate alla macchina tramite fibre ottiche: una sorgente di luce di lunghezza d'onda tra 775 e 850 nm

ad una frequenza di circa 2.7 KHz e una sonda ricevente posta a circa 4 cm di distanza costituita da un fotodiodo formato da 3 segmenti che captano ogni 0.5 secondi il fascio di luce trasmesso dai tessuti sottostanti. A differenza della luce visibile, fortemente attenuata nel passaggio attraverso i tessuti, le lunghezze d'onda nello spettro del vicino infrarosso presentano un assorbimento significativamente inferiore con la possibilità di penetrare nei tessuti fino ad uno spessore di circa 8 cm, di essere assorbite dai cromofori naturali e successivamente di essere rilevate dalla sonda ricevente (fig.7). La presenza di cromofori naturali quali l'emoglobina comporta, durante l'attraversamento di un tessuto, un parziale assorbimento della luce con un coefficiente differente a seconda del diverso stato di ossigenazione [emoglobina ossigenata (HbO₂) o ridotta (HHb)] e successivamente la trasmissione del fascio di luce residuo (Fig. 8).

Fig 8 Spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata (HbO₂) e ridotta (HHb)



La luce che attraversa un tessuto viene assorbita dal composto in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione del cromoforo interessato (c), alla distanza attraversata (d) e al coefficiente di assorbimento (α) dipendente dalla lunghezza d'onda del fascio, dalle caratteristiche ottiche del tessuto e dal tipo di cromoforo assorbente secondo la legge di Lambert Beer (Fig. 9):

$$\log(I_0/I) = c \cdot d \cdot \alpha$$

Fig 9 legge di Lambert Beer

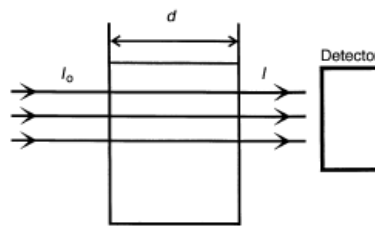


Fig 1 In a simple solution of a chromophore, light is absorbed; the detector measures the difference in intensity between incident (I_0) and emergent (I) light. If the distance (d) through which the light passes is constant, the absolute chromophore concentration (c) can be calculated from the Beer-Lambert equation.

L'assorbimento della luce determina un'attenuazione del fascio di luce trasmesso; la differenza tra l'intensità del fascio incidente (I_0) e quella del fascio trasmesso (I) rilevata da un sensore può fornire informazioni riguardo la concentrazione della sostanza presente in quel mezzo, considerando costante la distanza d attraversata.

La luce visibile (lunghezza d'onda 450-700 nm) non penetra i tessuti biologici di spessore superiore ad un centimetro perché viene attenuata dal forte potere di assorbimento e di scattering dei tessuti attraversati. L'acqua rappresenta uno dei maggiori componenti in grado di assorbire luce sia nello spettro del visibile sia a lunghezze d'onda superiori ai 900 nm. Esiste una lunghezza d'onda "finestra" definita come "vicino infrarosso" (lunghezza d'onda 650-900 nm) che permette ai fotoni di penetrare i tessuti a distanza e di venire in parte assorbita dai cromofori naturali. La NIRS utilizza una variante modificata della legge di Lambert Beer in quanto l'attenuazione della luce emessa è dipendente oltre che dall'assorbimento da parte dei cromofori, in maniera proporzionale alla loro concentrazione, anche da una quota sconosciuta di luce dispersa definita "*scattering*" e non rilevata dalla sonda ricevente. Assumendo la geometria del tessuto inalterata durante il periodo di registrazione, la quota di luce dispersa viene ritenuta costante. Quindi in NIRS convenzionale, effettuando un confronto tra valori successivi dello stesso paziente, è possibile calcolare la luce assorbita sulla base della quota riflessa e quindi ricavare le variazioni di concentrazione dell'emoglobina ossigenata e ridotta all'interno del tessuto (Δ Hb totale, Δ Hb ossigenata e Δ Hb ridotta).

$$\Delta C = \Delta (I/I_0) / \alpha d B$$

dove $\Delta (I/I_0)$ rappresenta l'attenuazione della luce espressa come variazione di densità ottica, α è il coefficiente di assorbimento, d è la distanza tra la sorgente di luce e il sensore ricevente e B è un coefficiente legato alla lunghezza d'onda utilizzata che tiene conto della quota di luce dispersa nel tessuto (Fig.10) [32]. Essendo le variazioni di emoglobina ossigenata e ridotta strettamente correlate allo stato emodinamico e alla funzione circolatoria del paziente, attraverso lo studio di tali composti è possibile fornire informazioni real-time del grado di perfusione, di ossigenazione e quindi della funzionalità emodinamica del tessuto.

Fig 10 legge di lambert-Beer modificata

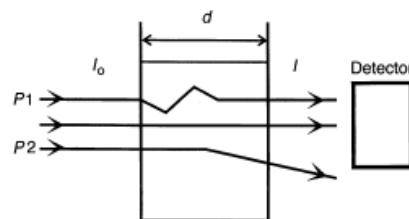


Fig 2 The light traversing the cuvette has been scattered by the solution. Photon P1 travels on a path which is longer than the linear distance (d) across the cuvette. Photon P2 passes through the solution but is lost from the detector. For this reason, the ratio of incident to emergent light is not a measure of absolute attenuation and cannot be used in the unmodified Beer-Lambert law to measure absolute concentration.

Gli strumenti di seconda generazione permettono di misurare l'indice di ossigenazione tissutale ($TOI = HbO_2 / Hbtot - \%$) mediante una tecnica di misurazione basata sulla variazione spaziale dell'intensità della luce riflessa in funzione della distanza tra sonda emittente e sonda ricevente (circa 4 cm) mediante la teoria della diffusione dei fotoni (spatially resolved spectroscopy SRS). Per ottenere una rapida misurazione della variazione spaziale dell'intensità della luce in funzione della distanza tra i due sensori, l'apparecchio NIRS presenta un fotometro costituito da un fotodiodo ricevente a fibre ottiche formato da tre segmenti in grado di misurare a più distanze l'attenuazione della luce proveniente dal diodo emittente con un periodo di circa 0.5 secondi [24]. A tutt'oggi non si conoscono parametri assoluti di valori di ossigenazione tissutale a causa di un'estrema variabilità tra i pazienti analizzati. Esistono in effetti vari fenomeni che influenzano tale parametro quali le variazioni di flusso ematico extracerebrale, la diversa penetrabilità della luce a causa di una differente composizione della

cute e delle strutture adiacenti, la diversa quantità di emoglobina circolante o la diversa sede di posizionamento della sonda o il riposizionamento della stessa durante il monitoraggio [33]. Studi precedenti hanno dimostrato come l'indice di ossigenazione cerebrale risulta significativamente correlato a parametri individuali quali la saturazione venosa centrale (il 70-75% della quota di TOI misurata è rappresentata dal compartimento venoso), la misurazione transcutanea della saturazione O₂, la presenza di shunt intracardiaco, i valori di pCO₂ e la pressione arteriosa [24-26]. Tali risultati confermano la stretta correlazione tra la circolazione cerebrale e lo stato emodinamico sistemico del paziente.

APPLICAZIONI CLINICHE: STUDI SUL NEONATO

L'utilizzo della spettroscopia in neonatologia in questi anni si è progressivamente ampliato. Una delle principali applicazioni attuali della NIRS in ambito neonatale è legata al monitoraggio non invasivo e in tempo reale dello stato emodinamico e delle condizioni di ossigenazione cerebrale del paziente in corso di procedure, interventi o trattamenti specifici. Le ridotte dimensioni del cranio, il minore spessore delle strutture extracerebrali e la riduzione fisiologica degli shunt nei primi giorni di vita sono stati alcuni dei fattori che hanno favorito l'applicazione di tale metodica in neonatologia. In effetti, nel neonato, a differenza del paziente adulto, le ridotte dimensioni del capo, in relazione alle dimensioni della sonda, permettono di ottenere informazioni relative ad un intero emisfero; il minore spessore del cuoio capelluto e del tessuto osseo riduce l'attenuazione rispetto al 70% circa riscontrato nel soggetto adulto e il passaggio dalla circolazione fetale a quella extrauterina con la conseguente riduzione degli shunt intra ed extracardiaci sono fattori che rendono ottimale tale studio in epoca neonatale [24-26]. Non pochi sono i limiti legati alla interpretazione dei dati NIRS. Un problema tutt'oggi non ancora risolto riguarda le influenze esterne legate al movimento del paziente durante la registrazione e che nei neonati, soggetti non complianti, possono creare non poche interferenze rendendo più difficoltosa l'interpretazione dei dati. Inoltre, la presenza di differenti coefficienti di assorbimento della luce per diversa composizione della cute, sede di posizionamento delle sonde e riposizionamento delle stesse durante la procedura

di monitoraggio, sono elementi da prendere in considerazione nell'interpretazione della variabilità tra i parametri registrati in diversi soggetti [25]. L'applicazione per periodi limitati, l'utilizzo di tale metodica in pazienti critici e sedati, il mantenimento di una posizione fissa della sonda durante l'intero periodo di monitoraggio riducono notevolmente tali interferenze rendendo più attendibili i risultati ottenuti.

A tutt'oggi la NIRS viene utilizzata a scopo di ricerca, ulteriori studi dovranno essere effettuati per valutarne l'efficacia e la possibilità di ampliare il suo utilizzo anche ad uso routinario clinico. In effetti, nonostante i limiti sopra descritti, essa sembra promettere un valido approccio al neonato ed al paziente in terapia intensiva grazie alla non invasività e alla possibilità di utilizzo al letto del paziente [26]. Inoltre studi condotti sugli effetti termici di tale monitoraggio hanno evidenziato come i livelli di temperatura raggiunti sono ridotti e ben al di sotto di valori dannosi per le cellule tissutali [34].

PAZIENTI E METODI

Abbiamo condotto uno studio prospettico in tutti i neonati nati a termine ricoverati presso la Terapia Intensiva Neonatale dell'Università di Bologna dal luglio 2007 al Novembre 2009 con una diagnosi di encefalopatia ipossico-ischemica di grado moderato-severo, secondo la classificazione di Sarnat and Sarnat [30] e trattati con ipotermia selettiva.

I pazienti candidati al trattamento ipotermico sono stati selezionati sulla base dei criteri del Cool Cap trial [9]:

Criteri di inclusione (A+B):

A- Ipossia intrapartum definita da almeno uno dei seguenti criteri

- Punteggio di Apgar ≤ 5 a 10 minuti di vita OPPURE
- Necessità di proseguire la rianimazione con TET o bag and mask a 10' di vita OPPURE
- Acidosi fetale o neonatale definita come:
 - pH < 7.0 OPPURE
 - BE > -16 mmol/l (EGA ottenuta da arteria ombelicale nei primi 60' di vita)

B-Encefalopatia ipossico-ischemica moderata o severa secondo la classificazione di Sarnat & Sarnat [30] valutata tra 30 e 60' di vita

Criteri di esclusione

- Neonati con più di 6 ore di vita
- Anomalie congenite gravi

Per tutti i pazienti arruolati è stato raccolto un consenso informato da parte dei genitori o dei rappresentanti legali. Tutti i neonati arruolati sono stati sottoposti a monitoraggio con elettroencefalogramma ad integrazione di ampiezza e, qualora se ne ravvedessero le condizioni, avviati al trattamento ipotermico. L'ipotermia selettiva prevedeva il mantenimento di una temperatura rettale tra 34-35°C per 72 ore consecutive seguite da un periodo di rewarming di circa 6 ore. Durante

l'intero periodo di raffreddamento e nella fase di rewarming i pazienti arruolati mantenevano un monitoraggio simultaneo aEEG e NIRS.

MONITORAGGIO CON aEEG

I pazienti arruolati sono stati studiati continuamente con aEEG (CFM 5330, Olympic Biomedical, Seattle, WA). L'aEEG è stato avviato ad un'età media di 91,4 (62,6) minuti di vita e mantenuto durante tutta la durata del trattamento. La classificazione dell'aEEG background pattern è stata fatta secondo i criteri di al Naqueb [31].

MONITORAGGIO NIRS

La Spettroscopia nel vicino infrarosso ha permesso un monitoraggio continuativo dell'emodinamica cerebrale mediante l'applicazione di una sonda bi frontale adesiva alla cute del paziente mediante un bendaggio stretto e mai spostata durante tutta la durata dell'ipotermia (NIRO 200® - Hamamatsu Photonics, Hamamatsu city, Japan). Il fattore di lunghezza d'onda utilizzato per il monitoraggio cerebrale è stato di 3,85.

Il monitoraggio NIRS è iniziato ad un tempo medio (DS) di 5,72 (4,17) ore di vita e proseguito durante tutto il periodo di trattamento. In 3 pazienti i dati NIRS nelle prime 6 ore di vita non sono disponibili a causa di problemi organizzativi. L'acquisizione dei dati NIRS è avvenuta ogni 0.5 sec durante il periodo di registrazione. I valori medi di TOI a 6, 12 e 24 ore di vita sono stati ottenuti facendo una media dei valori di TOI in un periodo di circa 60 minuti corrispondenti ai 30 minuti prima e 30 minuti dopo la 6°, 12° e 24° ora di vita, rispettivamente.

Tutti i neonati arruolati sono stati inoltre sottoposti durante l'intero periodo di trattamento a:

- Esecuzione di emogasanalisi arteriose seriate, ogni 8 ore o comunque sulla base dello stato clinico del paziente, per la valutazione dei valori di pCO₂;
- Monitoraggio non invasivo della pressione arteriosa ogni 4 ore;
- Monitoraggio mediante pulso-ossimetro con registrazione dei valori di saturazione di O₂, frequenza cardiaca e frequenza respiratoria;

FOLLOW-UP NEUROLOGICO:

La valutazione dell'outcome psicomotorio e neurosensoriale è stata effettuata secondo un protocollo di follow up interno alla nostra Unità Operativa con cadenza trimestrale per il primo anno di vita e successivamente semestrale fino al compimento del 24esimo mese di vita [23]. La valutazione dello sviluppo psicomotorio è stata effettuata mediante le scale di sviluppo mentale di Griffith [35]. La scala è stata somministrata dallo stesso psicologo, sottoposto a training specifico, in presenza dei genitori del paziente. La definizione di outcome patologico ha compreso la morte, le paralisi cerebrali infantili secondo i criteri di Hagberg [36] o la presenza di un ritardo globale definito come global quotient (GQ)<88.7 alla scala di Griffith.

OBIETTIVI

Scopo dello studio è stato quello di identificare degli indicatori prognostici precoci in un gruppo di neonati asfittici sottoposti a trattamento ipotermico mediante monitoraggio continuativo e simultaneo dell'attività elettrica cerebrale in aEEG e delle variazioni di ossigenazione cerebrale mediante NIRS.

ANALISI STATISTICA

Tutti i dati raccolti sono stati riportati in un database Excel dove sono state calcolate per ciascun paziente media e deviazione standard (DS) dei valori di TOI a 6, 12 e 24 ore di vita effettuando una media in un periodo di registrazione di 60 minuti corrispondente ai 30 minuti prima e dopo la 6°, 12° e 24° ora.

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma statistico SPSS 13.0 per Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Il test di normalità ha confermato che tutte le variabili in studio erano distribuite normalmente. L'analisi della varianza e il test del chi-quadro sono stati utilizzati per la comparazione delle variabili continue e categoriche, rispettivamente. E' stata considerata statisticamente significativa una $p < 0.05$.

RISULTATI

Nel periodo di studio di 2 anni sono stati arruolati 16 neonati asfittici sottoposti ad ipotermia selettiva: 14 nati presso il nostro centro e 2 provenienti da punti nascita periferici. Il monitoraggio simultaneo di aEEG a NIRS durante l'intero periodo di trattamento è disponibile per 12 pazienti, in 4 neonati problemi organizzativi hanno impedito la presenza simultanea di entrambe le registrazioni. L'ipotermia selettiva è stata iniziata ad un'età media (DS) di 191,2 (77,1) minuti di vita. I dati clinico-laboratoristici dei pazienti in studio sono riportati in tabella 1. Tutti i neonati arruolati hanno presentato crisi convulsive trattate con Fenobarbitale e/o infusione continua di Midazolam.

Tab. 1: dati clinico-laboratoristici dei pazienti arruolati

Pazienti	Tipo di parto	EG (sett)	PN (g)	Sarnat	pH	BE (mmol/l)	1 min Apgar Score	5 min Apgar Score	10 min Apgar Score
B.F.	PS	39	3760	2	6.90	-19.6	5	7	7
C.M.E.	PS	37	2765	3	7.05	-19.4	2	3	6
V.S.	TC	39	5100	3	7.15	-13.0	2	5	5
L.D.	PO	30	3540	2	7.02	-15.8	1	4	5
B.L.	PO	39	3130	2	6.86	-17.4	1	5	6
G.R.	PO	39	3336	2	6.86	-17.9	2	4	4
A.A.	PO	40	4000	2	6.75	-19.2	2	2	4
B.B.	PS	40	2590	2	6.75	-20.9	2	4	6
I.S.	PS	38	2638	2	7.13	-6.0	4	5	5
S.D.	PS	40	4034	2	7.28	-17.0	2	5	6
M.L.	PS	41	3104	3	6.80	-20.4	0	0	3
A.R.	PS	41	3800	3	6.75	-35.9	0	4	4

PS: parto spontaneo; PO: parto operativo; TC: taglio cesareo

2/12 pazienti sono deceduti a 10 giorni e 21 mesi di vita, rispettivamente. In un paziente il follow up è incompleto poiché dopo la valutazione dei 6 mesi di vita è perso al follow up, in quel momento presentava uno sviluppo psicomotorio adeguato per l'età. Per i restanti 9 neonati il tempo medio (DS) di follow up è di

17,3 (6,32) mesi di vita: 2 hanno sviluppato una paralisi cerebrale infantile mentre 7 presentano un outcome neurologico normale.

L'andamento dei tracciati dell'elettroencefalogramma ad integrazione d'ampiezza nelle prime 24 ore di vita è riportato in tabella 2. La tabella 3 mostra la valutazione dell'accuratezza prognostica dell'aEEG background pattern nei differenti momenti di valutazione.

Tab 2: aEEG background pattern nelle prime 24 ore di vita in relazione all'outcome

Pazienti	Tempo di avvio aEEG (Min di vita)	aEEG al reclutamento	aEEG 6 ore	aEEG 12 ore	aEEG 24 ore	Outcome
B.F.	25	SA	MA	MA	N	Normale
C.M.E.	50	SA	MA	SA	SA	Normale
V.S.	230	SA	SA	SA	SA	Morte
L.D.	60	SA	SA	SA	SA	Normale
B.L.	65	MA	N	MA	SA	Normale
G.R.	45	SA	MA	SA	SA	Normale
A.A.	18	SA	SA	N	N	Normale
B.B.	70	SA	SA	SA	SA	Normale*
I.S.	60	SA	SA	SA	SA	Normale
S.D.	195	SA	SA	MA	MA	Paralisi cerebrale
M.L.	150	SA	SA	SA	SA	Morte
A.R.	72	SA	SA	SA	SA	Paralisi cerebrale

*a 6 mesi di vita.

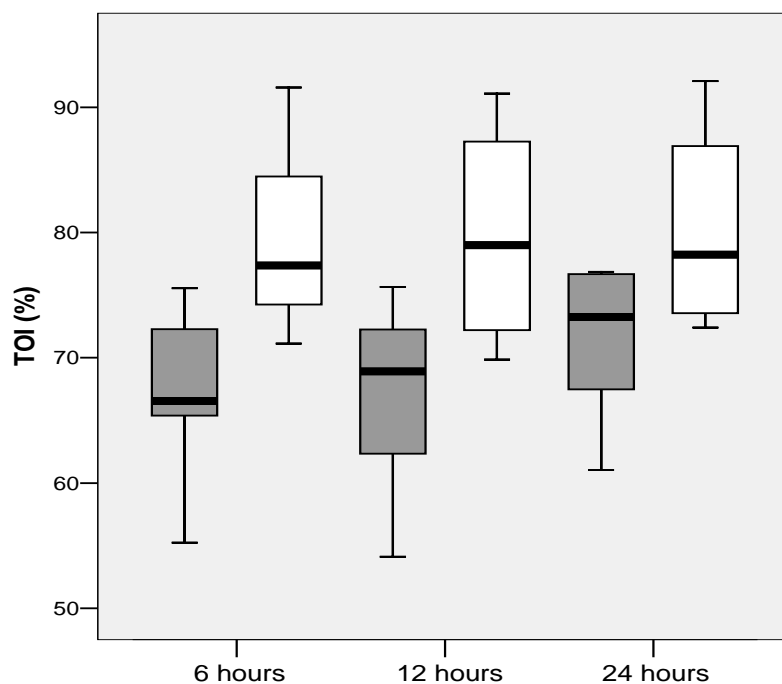
Tab 3: accuratezza prognostica dell'aEEG background pattern a 6, 12 e 24 ore di vita

	Sensibilità %	Specificità %	PPV % (C.I. 95%)	NPV % (C.I. 95%)	p value*
aEEG a 6 ore	100 (80.5-100)	12.5 (2.7-12.5)	36.4 (29.3-36.4)	100 (21.9-100)	1.0
aEEG a 12 ore	100 (80.5-100)	12.5 (2.7-12.5)	36.4 (29.3-36.4)	100 (21.9-100)	1.0
aEEG a 24 ore	100 (69.6-100)	25 (9.8-25)	40 (27.8-40)	100 (39.2-100)	0.515

* Fisher's exact test

Il monitoraggio della spettroscopia nel vicino infrarosso ha permesso di ottenere i valori dell'indice di ossigenazione tissutale (TOI) a 12 e 24 ore di vita in tutti i pazienti arruolati, mentre la registrazione del TOI a 6 ore di vita manca in 3 neonati di cui 2 con outcome patologico e 1 con outcome normale a causa di problemi organizzativi. Il valore di TOI a 12 ore di vita è risultato significativamente più alto nei pazienti con outcome patologico (4 pz) rispetto ai neonati con adeguato sviluppo psicomotorio (8 pz) ($79.7 \pm 9.4\%$ vs $67.1 \pm 7.9\%$, $p=0.034$); un trend in incremento è stato inoltre osservato anche nei valori di TOI a 6 e 24 ore di vita nei 2 gruppi di pazienti suddivisi per outcome (80.0 ± 10.5 vs $66.9 \pm 7.0\%$, $p=0.057$ and 80.2 ± 8.8 vs $71.6 \pm 5.9\%$, $p=0.069$, rispettivamente), come raffigurato in figura 11.

Fig 11: Tissue Oxygenation Index- TOI (%) nei neonati con outcome normale (barre grigie) e outcome patologico (barre bianche) a 6, 12 e 24 ore di vita ($p=0.057$, $p=0.034$ and $p=0.069$, rispettivamente).



Il monitoraggio della pressione arteriosa in corrispondenza dei 3 momenti di acquisizione dei dati NIRS (6,12 e 24 ore di vita) non ha evidenziato differenze significative nei due gruppi di neonati (55.3 ± 8.7 vs 45.4 ± 5.6 mmHg, $p=0.06$;

52.5 ± 16.3 vs 48.6 ± 6.2 mmHg, $p= 0.57$ and 52.3 ± 7.2 vs 46.1 ± 7.2 mmHg, $p= 0,23$ in corrispondenza del TOI_{6hrs} , TOI_{12hrs} e TOI_{24hrs} , rispettivamente). Anche i valori di pCO_2 registrati all'emogasanalisi nei 3 tempi non differiscono nei 2 gruppi (48.2 ± 4.9 vs 54.7 ± 14.4 mmHg, $p= 0.47$; 43.4 ± 3.4 vs 54.6 ± 8.4 mmHg, $p= 0.058$; 41.5 ± 7.9 vs 50.5 ± 6.5 mmHg, $p= 0.07$ in corrispondenza del TOI_{6hrs} , TOI_{12hrs} and TOI_{24hrs} , rispettivamente).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal presente studio dimostrano che la persistenza di un'anomalia al tracciato aEEG nei neonati con EII sottoposti a trattamento ipotermico non è predittiva di outcome patologico (PPV a 24 ore di vita 40%), mentre la normalizzazione dell'attività elettrica cerebrale entro le prime 24 ore si associa ad un normale sviluppo psicomotorio (NPV a 24 ore 100%). Il simultaneo monitoraggio NIRS evidenzia come l'indice di ossigenazione tissutale a 12 ore di vita risulta significativamente più alto nei neonati che sviluppano un outcome patologico rispetto a quelli con adeguato sviluppo psicomotorio.

La registrazione dell'aEEG durante le prime ore seguenti un insulto ipossico-ischemico è in grado di documentare la severità del danno cerebrale instaurato. In effetti, nei neonati asfittici non sottoposti a trattamento ipotermico il tracciato aEEG a 24 ore di vita presenta una stretta correlazione con l'outcome nei dati registrati presso il nostro centro e confermati da altri studi riportati in letteratura [21-23]. Durante l'ipotermia il valore prognostico positivo dell'aEEG si riduce. Nel nostro studio solo 4/10 pazienti (40%) con tracciato anomalo a 24 ore di vita (1 MA e 9 SA) sviluppano un outcome patologico. Tali risultati confermano i dati riportati in un precedente studio in cui si è valutata l'influenza dell'ipotermia sul tracciato elettroencefalografico dimostrando una riduzione del valore predittivo dell'aEEG a 3 e 6 ore di vita in un gruppo di neonati asfittici sottoposti ad ipotermia sistemica rispetto al gruppo non trattato (PPV 59% e 84%, rispettivamente) [37].

Molti meccanismi possono essere chiamati in causa per spiegare tali risultati. Innanzitutto, in corso di ipotermia la riduzione della temperatura corporea provoca una riduzione del metabolismo neuronale e del flusso ematico cerebrale con conseguente depressione dell'attività elettrica non necessariamente correlata all'entità del danno. Tale ipotesi non è però in accordo con i dati registrati in uno studio precedente condotto su neonati sottoposti ad ECMO e monitorati con aEEG. Gli autori affermano che una moderata ipotermia con T a 34°C per 48 ore non influenza il tracciato aEEG [38]. Nel nostro studio un ulteriore meccanismo da prendere in considerazione per spiegare la ridotta predittività dell'aEEG

background pattern in corso di trattamento ipotermico è rappresentato dall'utilizzo in tutti i neonati arruolati di farmaci anticonvulsivanti (Fenobarbitale e Midazolam) per il trattamento delle convulsioni. E' stato infatti già descritto l'effetto depressivo di tali molecole sul tracciato elettroencefalografico. L'infusione continua o a boli di farmaci antiepilettici è infatti risultata in grado di influenzare il tracciato aEEG inducendo un'alterazione del background pattern o una riduzione del voltaggio che può persistere anche per periodi prolungati [39]. Nei nostri pazienti, inoltre, la riduzione della funzionalità epatica e renale sia a causa del danno ipossico-ischemico che dell'ipotermia terapeutica induce un minore catabolismo di tali molecole prolungandone l'emivita e di conseguenza incrementandone i picchi plasmatici [36,39-41]. Un terzo possibile fattore causale è inoltre rappresentato dall'edema dello scalpo osservato nei neonati con EII sottoposti ad ipotermia selettiva o dalla presenza di un cefaloematoma fattori che potrebbero interferire con la trasmissione dell'attività elettrica quali reali barriere fisiche tra gli elettrodi di registrazione e il generatore corticale aumentando l'impedenza elettrica e riducendo quindi la trasmissione del segnale elettrico registrato [42].

Per studiare l'andamento dell'emodinamica e dell'ossigenazione cerebrale a seguito dell'insulto ipossico-ischemico abbiamo introdotto il monitoraggio continuo dell'indice TOI in NIRS durante l'intero periodo di trattamento ipotermico. L'introduzione routinaria dello studio NIRS per periodi prolungati nella pratica clinica è stata sin ora limitata dalla presenza di vari fattori confondenti l'interpretazione dei dati primo fra tutti la presenza di artefatti legati al movimento del paziente. Nel nostro studio l'assenza dei movimenti spontanei in pazienti critici e sedati sia a seguito del danno cerebrale da EII sia per le terapie in atto ha evitato tale bias. Inoltre, poiché è stato già riportato che i valori NIRS risultano influenzati da un eventuale cambiamento di sede della sonda con una variabilità che va dal -17% al +17% [33], per rendere più attendibili i nostri risultati, è stata mantenuta durante l'intero periodo di registrazione la stessa posizione del sensore senza mai interrompere la registrazione durante le manovre di cure, la somministrazione di farmaci o le ulteriori indagini effettuate sui nostri neonati. Nella popolazione in studio i valori di TOI a 12 ore sono risultati correlati in maniera significativa con l'outcome del paziente. In effetti i neonati che hanno sviluppato un outcome patologico hanno presentato valori più alti di

ossigenazione cerebrale rispetto ai pazienti con adeguato sviluppo psicomotorio. I diversi valori di indice di ossigenazione nei due gruppi di neonati non sono risultati peraltro associati a differenti valori di pCO₂ e di pressione arteriosa. Studi precedenti condotti su animali e su neonati affetti da EII confermano la correlazione tra alti livelli di ossigenazione cerebrale ed outcome patologico dimostrando come le variazioni di ossigenazione cerebrale risultano strettamente correlate con la severità del danno. In effetti, nei neonati asfittici la seconda fase del danno cerebrale si determina durante la fase di ri-perfusione cerebrale che segue un evento ipossico-ischemico. Tale processo definito come *luxury reperfusion* aggrava il danno neuronale già instauratosi durante la fase di asfissia determinando una iperemia massiva secondaria a vasodilatazione e vasoparalisi. La conseguente produzione di radicali liberi e l'avvio della cascata infiammatoria provoca il rilascio di sostanze citotossiche in grado di indurre morte cellulare per apoptosi [19,29]. Di conseguenza, nei pazienti con danno cerebrale più severo da un lato l'aumentato flusso ematico secondario alla *luxury reperfusion* e dall'altro il ridotto consumo di ossigeno da parte dei neuroni apoptotici determinano un incremento del valore di ossigenazione tissutale. Viceversa, nei soggetti in cui il danno è limitato e per i quali l'ipotermia svolge un adeguato ruolo neuroprotettivo, favorendo tra l'altro una riduzione della perfusione cerebrale, l'ossigenazione cerebrale risulta inferiore. Sulla base di tali risultati il TOI potrebbe perciò diventare un utile strumento per discriminare i pazienti responsivi al trattamento ipotermico dai non responder, così da selezionare il più precocemente possibile i neonati cui associare ulteriori terapie neuroprotettive. Uno dei più recenti approcci terapeutici proposti per il trattamento dell'EII è stato l'utilizzo dello Xenon, gas anestetico, per via inalatoria. Studi sperimentali in vitro e in vivo hanno dimostrato notevoli potenzialità neuroprotettive di tale gas peraltro privo di effetti collaterali e con rapida capacità di diffusione all'interno del tessuto cerebrale una volta inalato. Esistono evidenze che l'azione protettiva dello Xenon avvenga mediante meccanismi diretti riducendo il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori quali il glutammato e agendo come un antagonista dei recettori NMDA, e indirettamente inducendo una risposta cellulare che coinvolge la trascrizione di geni per la sintesi di proteine ad attività neuroprotettiva [43,44]. Tuttavia, al giorno d'oggi, nonostante si ritenga che l'associazione Xenon e trattamento ipotermico sia sinergica e di comprovata

efficacia, non sono ancora ben stabiliti il timing ottimale e la durata di tale terapia. Studi a tal proposito potrebbero nei prossimi anni chiarire il ruolo dello Xenon nel trattamento dell'EII permettendo, grazie al sinergismo con l'ipotermia, un ulteriore miglioramento dell'outcome dei neonati asfittici riducendone il rischio di sequele neurologiche a lungo termine.

A nostra conoscenza questo è il primo studio condotto su un gruppo di neonati asfittici con monitoraggio simultaneo aEEG e NIRS in corso di ipotermia selettiva. Dai dati a nostra disposizione, a seguito dell'implementazione dell'ipotermia, l'aEEG perde il valore prognostico ma rimane un prezioso strumento per registrare in maniera non invasiva al letto del paziente l'attività elettrica cerebrale e selezionare precocemente i neonati con EII eleggibili per l'ipotermia. D'altra parte i nostri risultati, pur se preliminari, suggeriscono che il TOI, in corso di trattamento, potrebbe essere utilizzato come precoce e reale indicatore prognostico di outcome neurologico. Ulteriori studi saranno necessari per confermare tali risultati in una popolazione più ampia di neonati asfittici.

CONCLUSIONI

La scelta di un ottimale monitoraggio e la ricerca degli indicatori prognostici precoci nei neonati affetti da EII rimane uno dei principali obiettivi per riuscire a selezionare i pazienti e ad individualizzare le cure ottimizzandone i risultati. L'aEEG rimane il principale strumento per selezionare i pazienti da avviare al trattamento ipotermico mentre il monitoraggio, mediante NIRS, dell'ossigenazione cerebrale nei neonati in corso di ipotermia potrebbe diventare un indicatore prognostico precoce in grado di selezionare pazienti non responsivi al trattamento ipotermico che potrebbero giovare di ulteriori approcci terapeutici innovativi.

ESAME OBIETTIVO NEUROLOGICO NEONATALE SECONDO SARNAT & SARNAT

(da effettuarsi tra 30 e 60' di vita, tra 6 e 24 ore, in 3° e 7° giornata)

Data ____/____/____ ora ____:____

Esame Neurologico di _____ nato/a il ____/____/____

(Stadio di Sarnat modificato secondo Shalak LF et al, Paediatrics 2003; 111:351-357)

Livello di coscienza

- Iperallerta
- Letargia
- Stupore o coma

Attività

- Normale
- Ridotta
- Assente

Postura

- Normale
- Completa estensione
- Decerebrata

Tono

- Normale
- Ipotonia
- Flaccidità

Riflessi primitivi

- Normale – esagerato
- Ridotti
- Assenti

Diametro delle pupille e reattività

- Miosi
- Midriasi
- Reattività assente

Frequenza cardiaca

- Bradicardia
- Variabilità

Respirazione

- Respiro periodico
- Apnea

Sarnat 1: Iperallerta, tono e motilità normali, Moro normale o esagerato, pupille normali e normoreagenti

Sarnat 2: Letargia, ridotta motilità, ipotonia, riflessi primitivi ridotti (es. prensione, suzione), miosi, bradicardia, respiro periodico

Sarnat 3: Stupor o coma, postura decerebrata, ipertono estensorio degli arti, motilità spontanea assente, flaccidità, riflessi assenti, midriasi o areattività pupillare, apnea

**Sono necessarie almeno 3 anomalie per classificare
un neonato in uno specifico stadio di Sarnat**

BIBLIOGRAFIA

1. Gunn AJ. Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:111-5.
2. Hu Br, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjo BK: Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxic-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1294-1300, 2000
3. Martin IJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309, 1998
4. Siesjo BK, Katsura K, Kristian T: The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthiosol* 7:47-52, 1995
5. Gunn AJ, Parer JT, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Cerebral histologic and electrocorticographic changes after asphyxia in fetal sheep. *Pediatr Res* 1992;31:486-91.
6. Williams CE, Gunn AJ, Gluckman PD. Time course of intracellular edema and epileptiform activity following prenatal cerebral ischemia in sheep. *Stroke* 1991;22:516-21.
7. Gunn AJ, Battin M, Gluckman PD, Gunn TR, Bennet L. Therapeutic hypothermia: from lab to NICU. *J Perinat Med* 2005;33:340-6.
8. Roth SC, Edwards AD, Cady EB, Delpy DT, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Relation between cerebral oxidative metabolism following birth asphyxia, and neurodevelopmental outcome and brain growth at one year. *Dev Med Child Neurol* 1992;34:285-95.
9. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomized trial. *Lancet* 2005;365:663-70.
10. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001;107:480-4.

11. Smith SL, Hall ED: Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 13:1-9, 1996
12. Akisu M, Huseyinov A, Yalaz M, Cetin H, Kultursay N: Selective head cooling with hypothermia suppresses the generation of platelet-activating factor in cerebrospinal fluid of newborn infants with perinatal asphyxia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:45-50, 2003
13. Qing M, Nimmesgern A, Heinrich PC, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, Hess J, von Bernuth G, Seghaye MC: Intrahepatic synthesis of tumor necrosis factor-alpha related to cardiac surgery is inhibited by interleukin-10 via the Janus kinase (Jak)/signal transducers and activator of transcription (STAT) pathway. *Crit Care Med* 31:2769-75, 2003
14. Edwards AD, Wyatt JS, Thorens M: Treatment of hypoxic-ischaemic brain damage by moderate hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 78: 85-91,1998
15. Laptook AR, Corbett RJT. Therapeutic hypothermia: a potential neuroprotective and resuscitative strategy for neonatal hypoxia-ischemia. *Prenat Neonat Med* 1: 199-212, 1996
16. Nakashima K, Todd MM: Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarisation. *Stroke* 27: 913-8,1996
17. Jacobs S , Hunt R, Tarnow-Mordi, W Inder T , Davis P: Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 2 - DOI:10.1002/14651858.CD003311.pub2*, 2008
18. Spitzmiller RE, Phillips T, Meinzen-Derr J, Hoath SB. Amplitude-integrated EEG is useful in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: a meta-analysis. *J Child Neurol* 2007;22:1069-78.
19. Toet MC, Lemmers PM, van Schelven LJ, van Bel F. Cerebral oxygenation and electrical activity after birth asphyxia: their relation to outcome. *Pediatrics* 2006;117:333-9.
20. Shalak LF, Laptook AR, Velaphi SC, Perlman JM. Amplitude-integrated electroencephalography coupled with an early neurologic examination enhances prediction of term infants at risk for persistent encephalopathy. *Pediatrics* 2003;111:351-7.

21. van Rooij LG, Toet MC, Osredkar D, van Huffelen AC, Groenendaal F, de Vries LS. Recovery of amplitude integrated electroencephalographic background patterns within 24 hours of perinatal asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:245-51.
22. Hellström-Westas L, Rosén I, Svenningsen NW. Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;72:34-8.
23. Ancora G, Soffritti S, Lodi R, Tonon C, Grandi S, Locatelli C et al. A combined a-EEG and MR spectroscopy study in term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2010;32:835-42.
24. Owen-Reece H, Smith M, Elwell CE, Goldstone JC. Near infrared spectroscopy. *Br Anaesth* 1999;82:418-26.
25. van Bel F, Lemmers P, Naulaers G. Monitoring neonatal regional cerebral oxygen saturation in clinical practice: value and pitfalls. *Neonatology* 2008; 94:237-44.
26. Toet MC, Lemmers PM. Brain monitoring in neonates. *Early Hum Dev* 2009;85:77-84.
27. Ioroi T, Peeters-Scholte C, Post I, Leusink C, Groenendaal F, van Bel F. Changes in cerebral haemodynamics, regional oxygen saturation and amplitude-integrated continuous EEG during hypoxia-ischaemia and reperfusion in newborn piglets. *Exp Brain Res* 2002;144:172-7.
28. Ancora G, Maranella E, Locatelli C, Pierantoni L, Faldella G. Changes in cerebral hemodynamics and amplitude integrated EEG in an asphyxiated newborn during and after cool cap treatment. *Brain Dev* 2009;31:442-4.
29. Meek JH, Elwell CE, McCormick DC, Edwards AD, Townsend JP, Stewart AL, et al. Abnormal cerebral haemodynamics in perinatally asphyxiated neonates related to outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:110-5.
30. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
31. al Naqeeb N, Edwards AD, Cowan FM, Azzopardi D. Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography. *Pediatrics* 1999;103:1263-71.
32. Jöbsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*. 1977 Dec 23;198(4323):1264-7.

33. Greisen G. Is near-infrared spectroscopy living up to its promises? *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11:498-502.
34. Ito Y, Kennan RP, Watanabe E, Koizumi H Assessment of heating effects in skin during continuous wave near infrared spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2000 Oct; 5(4):383-90
35. Griffiths R. *The Abilities of Babies.* London, United Kingdom: University of London Press; 1954.
36. Hagberg B, Hagberg G, Olow I, von Wendt L. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VII. Prevalence and origin in the birth year period 1987–90. *Acta Paediatr* 1996;85:954–60.
37. Thoresen M, Hellström-Westas L, Liu X, de Vries LS. Effect of hypothermia on amplitude-integrated electroencephalogram in infants with asphyxia. *Pediatrics* 2010, *Pediatrics.* 2010 Jul;126(1):e131-9. Epub 2010 Jun 21.
38. Horan M, Azzopardi D, Edwards AD, Firmin RK, Field D. Lack of influence of mild hypothermia on amplitude integrated-electroencephalography in neonates receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Early Hum Dev* 2007;83:69-75.
39. Shany E, Benzaquen O, Friger M, Richardson J, Golan A. Influence of antiepileptic drugs on amplitude-integrated electroencephalography. *Pediatr Neurol* 2008;39:387-91.
40. Hallberg B, Grossmann K, Bartocci M, Blennow M. The prognostic value of early aEEG in asphyxiated infants undergoing systemic hypothermia treatment. *Acta paediatr* 2010;99:531-6.
41. van Leuven K, Groenendaal F, Toet MC, Schobben AF, Bos SA, de Vries LS, et al. Midazolam and amplitude-integrated EEG in asphyxiated full-term neonates. *Acta Paediatr* 2004;93:1221-7.
42. El-Dib M, Chang T, Tsuchida TN, Clancy RR. Amplitude-integrated electroencephalography in neonates. *Pediatr Neurol.* 2009 Nov;41(5):315-26.
43. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, Thoresen M. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol.* 2010 Sep;68(3):330-41
44. Hobbs C, Thoresen M, Tucker A, Aquilina K, Chakkarapani E, Dingley J. Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and

histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. Stroke. 2008
Apr;39(4):1307-13.