



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΖΩΟΓΟΝΗΣΗ
ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΥΠΟΞΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ
ΧΟΙΡΙΔΙΑ**

ΙΩΑΝΝΑ ΑΡΓΥΡΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Β' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική

Αρεταίειο Νοσοκομείο

ΑΘΗΝΑ 2015

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὅμνῶ Ἀπόλλωνα ἱητρὸν καὶ Ἀσκληπιὸν καὶ Ὑγίαν καὶ Πανά-
κειαν καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα
ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὅρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν
τήνδε· ἡγήσεσθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γε-
νέτησιν ἐμοῖσι καὶ βίου κοινώσεσθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδο-
σιν ποιήσεσθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν
ἄρρεσι καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μαθάνειν,
ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς
λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσεσθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι καὶ
τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ
ὥρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ ἄλλῳ δὲ οὐδενί. διαιτήμασί τε χρήσο-
μαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δη-
λήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εὔξειν. οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ
αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως
δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. ἄγνῳ δὲ καὶ ὁσίως διατη-
ρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν
λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. ἐς
οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν εἰώω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων,
ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης τῆς τε ἄλλης καὶ
ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρείων ἐλευ-
θέρων τε καὶ δούλων ἃ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ
ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτέ ἐκλαλέεσθαι
ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. ὅρκον μὲν
οὖν μὲν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιεόντι καὶ μὴ συγχέοντι εἴη ἐπαύρα-
σθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς
τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκέοντι τάναντία τουτέων.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΟΡΙΣΜΟ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 09/01/2009

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
10/04/2009

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: «Μελέτη νεφρικής βλάβης από
διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου κατά την αναζωογόνηση σε
πειραματικό μοντέλο υποξαιμίας σε νεογνά χοιρίδια.»

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Γεώργιος Κρεατσάς

*Καθηγητής Β' Μαιευτικής - Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Αθηνών*

Ισμήνη Δοντά (επιβλέπον μέλος)

*Καθηγήτρια Πειραματικής Χειρουργικής Έρευνας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών*

Νικολέττα Ιακωβίδου

*Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών*

1^η ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 31/03/2010

2^η ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 06/04/2011

3^η ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 23/04/2012

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΟΡΙΣΜΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 23/03/2015

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 29/04/2015

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- Καθηγητής, κ. Γεώργιος Κρεατσάς
- Καθηγήτρια, κα Ισμήνη Δοντά
- Επίκουρη Καθηγήτρια, κα Νικολέττα Ιακωβίδου
- Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, κα Αναστασία Γαρούφη
- Επίκουρη Καθηγήτρια, κα Σουλτάνα Σιαχανίδου
- Επίκουρος Καθηγητής, κ. Θεόδωρος Καρατζάς
- Επίκουρη Καθηγήτρια, κα Αθανασία Τσαρουχά

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 01/07/2015

ΒΑΘΜΟΣ: ΑΡΙΣΤΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΡΓΥΡΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

Ημ/νία γέννησης: 07/05/1984

Διεύθυνση: Ταξιαρχών 9, Παλαιό Φάληρο, τκ: 17563

Τηλέφωνο: 6975101711/210-9844946

e-mail: ioarg@yahoo.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ:

- Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής (09/2002 – 07/2008, βαθμός πτυχίου: 8,09 λίαν καλώς)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ:

- Υποψήφια διδάκτωρ Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Ιατρικής με τίτλο διατριβής: «Μελέτη νεφρικής βλάβης από διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου κατά την αναζωογόνηση σε πειραματικό μοντέλο υποξαιμίας σε νεογνά χοιρίδια.»

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

- Τιμητική διάκριση για την επίδοση κατά το ακαδ. έτος 2007 - 2008 (στους 5 πρωτεύσαντες πτυχιούχους - 5^η στη σειρά) στην ετήσια τελετή υποδοχής των πρωτοετών φοιτητών του τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών.
- Υποτροφία Ι.Κ.Υ. για την επίδοση (5^η στο σύνολο φοιτητών του ακαδ. έτους 2003 - 2004) στο β' έτος σπουδών.
- Υποτροφία Ι.Κ.Υ. για την επίδοση (3^η στο σύνολο φοιτητών του ακαδ. έτους 2002 - 2003) στο α' έτος σπουδών.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά: Πολύ καλή γνώση - First Certificate in English
(Cambridge,1999 - Grade C)

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- Ειδικευόμενη παιδίατρος στη Β' Παιδιατρική Κλινική – Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Νοσοκομείο Παίδων « Π. και Α. Κυριακού») από 21/08/2014 έως σήμερα
- Ειδικευόμενη παιδίατρος στην Παιδιατρική Κλινική του Γ.Ν. Μεσσηνίας (10/09/2012 – 09/06/2014)
- Υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι. Πλάτσας – Κ.Υ. Αγ. Νικολάου Μεσσηνίας (11/12/2009 – 07/08/2011) και τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στο Γ.Ν. Μεσσηνίας (02/09/2009 – 10/12/2009)

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

- **Advanced Pediatric Life Support** (APLS course) (University of South Florida, Αντιμετώπιση παιδικού τραύματος) - Έχει εγκριθεί και πιστοποιηθεί από την ΕΕΚΑΑΝ και το ΚΕΣΥ (12 – 14/06/2009)
- 8^η Ημερίδα: «**Η Ανάνηψη στα παιδιά**» (Νοσοκομείο Παίδων « Π. και Α. Κυριακού» - Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παίδων) (16/05/2009)
- Σεμινάριο Ανανηπτών στην Ανάνηψη Νεογνού - **Newborn Life Support** (NLS course) (Ελληνική Εταιρεία Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης, European Resuscitation Council) (26/04/2009)
- Σεμινάριο **Βασικής Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Αυτόματης Εξωτερικής Απινίδωσης** (BLS/AED course) (Πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο των Εκπαιδευτικών Ημερίδων Πρωτοβάθμιας Υγείας «Γ. Παπαδάκης») (19/02/2009)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

A. ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Gerosa C, Iacovidou N, Argyri I, Fanni D, Papalois A, Aroni F, Faa G, Xanthos T, Fanos V. **Histopathology of renal asphyxia in newborn piglets: Individual susceptibility to tubular changes.** World J Nephrol 2015;4 (2):313-318, DOI: 10.5527/wjn.v4.i2.313.
2. Marianna Varsami, Theodoros Xanthos, Filippia Aroni, Ioanna Argyri, Pavlos Lelovas, Ismene Dontas, Apostolos Papalois, Vassilios Fanos, Nicoletta Iacovidou. **Inflammation and oxidative stress biomarkers in neonatal brain hypoxia and prediction of adverse neurological outcome: a review.** Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine 2013;2(2):e020203, DOI: 10.7363/020203.
3. Argyri I, Xanthos T, Varsami M, Aroni F, Papalois A, Dontas I, Fanos V, Iacovidou N. **The Role of Novel Biomarkers in Early Diagnosis and Prognosis of Acute Kidney Injury in Newborns.** Am J Perinatol 2013;30(5):347-352, DOI: 10.1055/s-0032-1326985.
4. Filippia Aroni, Theodoros Xanthos, Marianna Varsami, Ioanna Argyri, Avgoustina Alexaki, Konstantinos Stroumpoulis, Pavlos Lelovas, Apostolos Papalois, Gavino Faa, Vassilios Fanos, Nicoletta Iacovidou. **An Experimental Model Of Neonatal Normocapnic Hypoxia And Resuscitation In Landrace/Large White Piglets.** J Matern Fetal Neonatal Med 2012;25(9):1750-1754, DOI 10.3109/14767058.2012.663823.

B. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

1. F. Aroni, T. Xanthos, A. Papalois, M. Varsami, A. Avgoustaki, I. Argyri, GJ. Kaparos, E. Kouskouni, N. Iacovidou. **Survival, Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Levels in a Newborn Swine Protocol of Hypoxaemia - Reoxygenation with Different Oxygen**

Concentrations. Journal of Neonatal - Perinatal Medicine 2011;24(1):167.

2. N. Iacovidou, M. Varsami, F. Aroni, I. Argyri, A. Alexaki, P. Lelovas, I. Dontas, A. Papalois, T. Xanthos. **Haemodynamic Response In An Experimental Model Of Normocapnic Hypoxia And Resuscitation With Different Concentrations Of O₂ In Newborn Piglets.** Journal of Neonatal - Perinatal Medicine 2010;3(3):251.
3. Aroni F, Iacovidou N, Xanthos T, Alexaki A, Varsami M, Argyri I, Lelovas P, Papalois A. **Normocapnic hypoxia and resuscitation with 21% O₂ in newborn piglets: An experimental model.** Journal of Neonatal - Perinatal Medicine 2009;2(3):209.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. T. Syriopoulou, E. Karachanidi, I. Argyri, A. Kourti, D. Konstantelos, E. Furlani, A. Koukouletsos, E. Micha, M. Martinou, V.Katsaros. **Febrile urinary tract infections in children: epidimeological study.** 31st Annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Milano, Italy 28/05 - 01/06/2013.
2. T. Syriopoulou, E. Karachanidi, A. Kourti, I. Argyri, A. Koukouletsos, S. Zisimopoulos, E. Grammatikos, A. Togias, P. Giannakopoulou, V.Katsaros. **Vaccination coverage of adolescents.** 31st Annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Milano, Italy 28/05 - 01/06/2013.
3. F. Aroni, T. Xanthos, A. Papalois, M. Varsami, A. Avgoustaki, I. Argyri, GJ. Kaparos, E. Kouskouni, N. Iacovidou. **Survival, Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Levels in a Newborn Swine Protocol of Hypoxaemia - Reoxygenation with Different Oxygen**

Concentrations. XVII Congress of the Italian Society of Neonatology, Sorrento, Italy 11 – 14/10/2011.

4. N.Iacovidou, M.Varsami, F.Aroni, I.Argyri, A.Alexaki, P.Lelovas, I.Dontas, A.Papalois, T.Xanthos. **Haemodynamic response in an experimental model of normocapnic hypoxia and resuscitation with different concentrations of O₂ in newborn piglets.** 18th European Workshop on Neonatology, Bonn, Germany 09-12/09/2010.
5. F Aroni, N Iacovidou, T Xanthos T, A Alexaki, **M Varsami** , I Argyri, P Lelovas, A Papalois. **Normocapnic hypoxia and resuscitation with 21%O₂ in newborn piglets: an experimental model.** 17th European workshop on Neonatology, Porto 23-26/09/2009.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. Αργύρη Ι, Κούρτη Α, Γιαννακοπούλου Π, Συριοπούλου Θ, Μίχα Ε, Γραμματικός Ε, Ζησιμόπουλος Σ, Μαρτίνου Μ, Κατσάρος Β. **Συχνότητα γαστρεντερίτιδας από ροταϊό.** 51^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη 21 - 23/06/2013.
2. Κατσάρος Β, Κούρτη Α, Αργύρη Ι, Μίχα Ε, Γραμματικός Ε, Ζησιμόπουλος Σ, Μαρτίνου Μ, Γιαννακοπούλου Π, Συριοπούλου Θ. **Γονοτυπικό προφίλ ροταϊού στη Μεσσηνία.** 51^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη 21 - 23/06/2013.
3. Μ. Βαρσαμή, Θ. Ξάνθος, Φ. Αρώνη, Α. Αλεξάκη, Ι. Αργύρη, Π. Λελόβας, Α. Παπαλόης, Ν. Ιακωβίδου. **Μελέτη αιμοδυναμικών διακυμάνσεων σε πειραματικό μοντέλο νορμοκαπνικής υποξίας και ανάνηψης με διαφορετικές συγκεντρώσεις O₂ σε νεογνά χοιρίδια.** 36^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 04 - 08/05/2010.

4. Αρώνη Φ., Ιακωβίδου Ν., Ξάνθος Θ., Αλεξάκη Α., Βαρσαμή Μ., Αργύρη Ι., Λελόβας Π., Παπαλόης Α. **Περιγραφή πειραματικού μοντέλου νορμοκαπνικής υποξίας και ανάνηψης με 21% O₂ σε νεογνά χοιρίδια.** 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Θεσσαλονίκη 18 - 20/09/2009.

ΒΡΑΒΕΙΑ:

1. **Βραβείο Προφορικής Ανακοίνωσης:**

F. Aroni, T. Xanthos, A. Papalois, M. Varsami, A. Avgoustaki, I. Argyri, GJ. Kaparos, E. Kouskouni, N. Iacovidou. **Survival, Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Levels in a Newborn Swine Protocol of Hypoxaemia - Reoxygenation with Different Oxygen Concentrations.** XVII Congress of the Italian Society of Neonatology, Sorrento, Italy 11 – 14/10/2011.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το κεφάλαιο, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκλεκτούς και έμπειρους καθηγητές, συνεργάτες και φίλους που χωρίς τη βοήθεια και τις γνώσεις τους η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν εφικτή.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή, Διευθυντή της Β' Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Κρεατσά Γεώργιο για την εμπιστοσύνη που έδειξε κατά την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ξεχωριστές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Πειραματικής Χειρουργικής Έρευνας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών κα Δοντά Ισμήνη, η οποία ως επιβλέπον μέλος της τριμελούς επιτροπής μου έδειξε εμπιστοσύνη και υποστήριξη με τον ευγενικό της χαρακτήρα κατά την εκπόνηση της διατριβής. Οι παρατηρήσεις της ήταν πάντα εύστοχες και αποτελεσματικές και η καθοδήγησή της ήταν καθοριστική σε όλη την πορεία διεξαγωγής της διατριβής.

Η κα Ιακωβίδου Νικολέττα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, μου ανέθεσε το θέμα της διατριβής. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Πολύτιμη ήταν η βοήθειά της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, στη δημιουργία επιστημονικής δημοσίευσης, στη συγγραφή της διατριβής και σε άλλα προσωπικά θέματα. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Καθηγητή Παιδιατρικής - Νεογνολογίας Πανεπιστημίου Πατρών κ. Δημητρίου Γαβριήλ, ο οποίος μου μετέδωσε τις γνώσεις του στην παιδιατρική και νεογνολογία κατά τα φοιτητικά μου χρόνια και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω την κα Ιακωβίδου.

Πολύτιμη ήταν και η βοήθεια του κ. Ξάνθου Θεόδωρου, Προέδρου της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης, όσον αφορά στο σχεδιασμό της μελέτης και συγγραφή επιστημονικών δημοσιεύσεων. Η μετάδοση των γνώσεων και ιδεών του βοήθησαν στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης επιστημονικής μελέτης.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον κ. Παπαλόη Απόστολο, Διευθυντή του Ερευνητικού και Πειραματικού Κέντρου της ελληνικής φαρμακοβιομηχανίας ELPEN, για την παροχή των εγκαταστάσεων και την οικονομική υποστήριξη για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειραματικού πρωτοκόλλου. Ευγένεια, καλοσύνη και συνέπεια χαρακτήριζαν όλο το προσωπικό του εν λόγω εργαστηρίου με απόρροια την άψογη συνεργασία.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον Καθηγητή Παιδιατρικής - Νεογνολογίας του Πανεπιστημίου Cagliari Ιταλίας κ. Fanos Vassilios για την ευγενική επιστημονική καθοδήγηση και εποικοδομητική συνεργασία. Η ιστοπαθολογική εξέταση των δειγμάτων και ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Cagliari Ιταλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογοανατομίας και Διευθυντή του εν λόγω εργαστηρίου κ. Faa Gavino για τη συμβολή στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους Φιλιππία Αρώνη, Μαριάννα Βαρσαμή και Αυγουστίνα Αλεξάκη για την άριστη συνεργασία και συμπαράσταση κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα Μαριάννα Βαρσαμή για την καθοδήγηση και βοήθεια κατά τη συγγραφή της διατριβής. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κτηνίατρο κ. Λελόβα Παύλο για την πολύτιμη βοήθειά του όσον αφορά στους χειρουργικούς χειρισμούς κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αγάλλου Σωτήριο για τη τεχνική βοήθεια και αμέριστη υποστήριξη κατά τη συγγραφή της διατριβής καθώς και την οικογένειά μου για την αγάπη της και τη συμπαράστασή της στην πραγματοποίηση των ονείρων μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Ελληνική Περίληψη	1
B. Αγγλική Περίληψη (Abstract).....	3

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΣΤΑ ΝΕΟΓΝΑ

1.1	Εισαγωγή.....	5
1.2	Ορισμός	5
1.3	Ταξινόμηση - διαγνωστικά κριτήρια.....	6
1.4	Επιδημιολογία.....	9
1.5	Νεογνά υψηλού κινδύνου.....	10
1.6	Αίτια.....	11
1.7	Παθοφυσιολογία.....	14
1.8	Κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα	20
1.9	Θεραπεία	24
1.10	Πρόγνωση	28
1.11	Βιολογικοί δείκτες.....	29
1.11.1	Προβληματισμοί περί έγκαιρης διάγνωσης	29
1.11.2	Νέοι βιολογικοί δείκτες	30
1.11.3	Μεταβολομική (Metabolomics)	39
1.11.3.1	Ορισμός	39
1.11.3.2	Ιστορική αναδρομή.....	41

1.11.3.3 Πλεονεκτήματα	43
1.11.3.4 Πηγές μεταβολιτών: αίμα ή ούρα;.....	44
1.11.3.5 Ρόλος των metabolomics στην οξεία νεφρική βλάβη.....	46
1.11.3.6 Εφαρμογές στη νεογνολογία	47
2.11.7 Περιορισμοί	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΝΑΝΗΨΗ ΝΕΟΓΝΟΥ

2.1 Εισαγωγή.....	50
2.2 Ιστορική αναδρομή	50
2.3 Φυσιολογία νεογνικής υποξίας.....	59
2.3.1 Συμβολή της αρχαιότητας στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος	59
2.3.2 Σύγχρονη ερμηνεία της νεογνικής υποξίας.....	61
2.4 Σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες.....	65
2.5 Οξυγόνο και ανάνηψη.....	71
2.5.1 Τοξικότητα οξυγόνου.....	71
2.5.2 Αέρας ή 100% οξυγόνο	73
2.5.3 Προβληματισμοί και ελλείψεις γνώσεων.....	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

3.1. Γιατί χρησιμοποιούνται πειραματικά μοντέλα;	83
3.2 Περιορισμοί και επικρίσεις.....	85
3.3. Πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής υποξίας.....	86
3.4 Πειραματικά μοντέλα οξείας νεφρικής βλάβης.....	89

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

4.1	Εισαγωγή.....	93
4.2	Υλικό και μέθοδοι	94
4.3	Αποτελέσματα	104
4.4	Συζήτηση	114
4.5	Συμπεράσματα	118

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	120
---------------------------	------------

A. Ελληνική Περίληψη

Σκοπός: Η μελέτη των ιστολογικών αλλοιώσεων των νεφρών και της εφαρμογής της μεταβολομικής σε πειραματικό μοντέλο υποξίας - επανοξυγόνωσης σε νεογνά χοιρίδια.

Υλικό - Μέθοδος: Στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο προκλήθηκε νορμοκαπνική υποξαιμία σε 40 αρσενικά νεογνά χοιρίδια Landrace/Large-White. Με την έλευση βραδυκαρδίας (καρδιακή συχνότητα < 60/λεπτό) ή σοβαρής υπότασης (μέση αρτηριακή πίεση < 15 mmHg), γινόταν έναρξη επανοξυγόνωσης. Τα χοιρίδια τυχαιοποιούνταν σε 4 ομάδες των 10 χοιριδίων που επανοξυγονώνονταν με διαφορετικές συγκεντρώσεις O₂ (ομάδα 1 με 18%, 2 με 21%, 3 με 40% και 4 με 100% O₂). Επίσης, μελετήθηκαν 4 χοιρίδια τα οποία δεν υπέστησαν υποξία και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Κατά την ιστολογική εξέταση των νεφρών, έγινε χρώση με αιματοξυλίνη - ηωσίνη και PAS και παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Ακολούθησε μεταβολομική ανάλυση των ούρων με NMR φασματοσκοπία.

Αποτελέσματα: Στους νεφρούς της ομάδας ελέγχου παρατηρήθηκαν σωληναριο – σπειραματικά οζίδια ως ένδειξη ενεργούς σπειραματογένεσης. Οι νεφροί που υπέστησαν υποξία παρουσίασαν κυλίνδρους (95%), διάταση των σωληναρίων (87.5%), κενотоπίωση (70%), ηωσινοφιλία (52.5%), καταστροφή της ψηκτροειδούς παρυφής (50%), αποκόλληση από βασική μεμβράνη (50%), οίδημα (32.5%) και απόπτωση (15%). Κατά τη μεταβολομική ανάλυση των ούρων παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μεταβολομικό προφίλ ανάμεσα στα ζώα με και χωρίς ασυστολία καθώς και σε αυτά που απεβίωσαν και εκείνα που δεν παρουσίασαν ασυστολία και ανένηψαν γρήγορα. Επιπλέον, σημαντικές αλλαγές σημειώθηκαν στο μεταβολομικό προφίλ των ούρων των χοιριδίων που επανοξυγονώθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Συμπεράσματα: Η υποξία φαίνεται να προκαλεί από νωρίς ιστολογικές αλλοιώσεις στους νεφρούς με κύριο στόχο τα νεφρικά σωληνάκια. Η κενотоπίωση των εγγύς και άπω εσπειραμένων σωληναρίων και η διάταση των άπω εσπειραμένων σωληναρίων αποτέλεσαν τις κυριότερες ιστολογικές αλλοιώσεις μετά την υποξία – επανοξυγόνωση. Αντίθετα, οι σωληναριακοί κύλινδροι φαίνεται να μην αποτελούν ειδικό εύρημα νεφρικής βλάβης. Επίσης,

η έκβαση της ανάνηψης ήταν ανάλογη με το αρχικό μεταβολικό προφίλ των χοιριδίων. Επομένως, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών οξείας νεφρικής βλάβης και η μελέτη του μεταβολικού προφίλ προ της υποξίας θα μας οδηγούσαν στην έγκαιρη και εξατομικευμένη διάγνωση και παρέμβαση με απόρροια την καλύτερη πρόγνωση.

B. Αγγλική Περίληψη (Abstract)

Objective: The study of histological changes of the kidneys and the application of metabolomics in an experimental model of neonatal normocapnic hypoxia and reoxygenation in newborn piglets.

Materials and Methods: In this experimental model, normocapnic hypoxemia was induced in 40 male, newborn Landrace/Large-White piglets. When bradycardia (HR < 60) or severe hypotension (MAP < 15 mmHg) occurred, reoxygenation was initiated. Animals were allocated in 4 groups according to the oxygen concentration they were resuscitated with: group 1, 2, 3, 4 received 18%, 21%, 40%, 100% O₂, respectively. In addition, 4 piglets who did not suffer hypoxia were studied and served as control group. Upon histological examination, hematoxylin, eosin and PAS - stained renal sections were observed at the optical microscope. Moreover, metabolomic analysis of urine by NMR spectroscopy occurred.

Results: In the kidneys of the control group were observed tubule - glomerular nodules as evidence of active glomerulogenesis. Kidneys suffered hypoxia showed tubular casts (95%), tubular dilatation (87.5%), tubular vacuolization (70%), eosinophilia (52.5%), fragmentation of the brush border (50%), sloughing (50%), edema (32.5%) and apoptosis (15%). In metabolomics urinalysis were significant differences in metabolomic profiles between animals with and without asystole as well as those who died and those who did not have asystole and recovered quickly. Furthermore, significant changes occurred in metabolomic urinary profile of piglets who resuscitated with different oxygen concentrations.

Conclusions: Hypoxia appears to cause early histological changes in the kidneys, especially in renal tubules. The vacuolation of proximal and distal tubules and dilatation of distal tubules were the main histological changes after hypoxia - reoxygenation. Instead, tubular casts seem not to be a specific finding of kidney damage. Also, the outcome of resuscitation depended on the initial metabolic profile of piglets. Therefore, the discovery of new biomarkers of acute kidney injury and the study of the metabolic profile before hypoxia lead to timely and individualized diagnosis and intervention and as a result better prognosis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΣΤΑ ΝΕΟΓΝΑ

1.1 Εισαγωγή

Η οξεία νεφρική βλάβη (ONB) αφορά στην απότομη έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Παρά τις προόδους της ιατρικής έρευνας και της τεχνολογίας παραμένει σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνησιμότητας σε όλες τις ηλικίες. Υπάρχουν αντιγνώμιες στην επιστημονική κοινότητα ως προς τη διάγνωση της ONB και ιδιαίτερα στα νεογνά, που οι νεφροί τους έχουν ιδιαίτερη φυσιολογία. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την εύρεση νέων βιοδεικτών που θα βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση της ONB.

1.2 Ορισμός

Η ONB ορίζεται ως εξής:

«Μια απότομη και εμμένουσα έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας που οδηγεί σε κατακράτηση κυρίως αζωτούχων ουσιών και συνοδεύεται από μεταβολικές διαταραχές, αλλαγές στο ισοζύγιο υγρών και ηλεκτρολυτών και επιπτώσεις σε πολλά όργανα και συστήματα» [1].

Παράλληλα παρατηρείται σημαντική ελάττωση της διούρησης μέχρι και πλήρης ανουρία. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις το ποσό των αποβαλλόμενων ούρων μπορεί να είναι φυσιολογικό ή αυξημένο.

Ο όρος οξεία νεφρική βλάβη (ONB) έχει πλέον αντικαταστήσει τον όρο οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA), γεγονός που αντανάκλα την αναγνώριση ότι μικρότερες αλλαγές στη λειτουργία των νεφρών, που δεν οδηγούν σε έκδηλη ανεπάρκεια αυτών, έχουν μεγάλη κλινική σημασία και συνδέονται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Σήμερα, ο όρος ONA χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη σοβαρή ONB που συνήθως συνεπάγεται την ανάγκη για θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης.

1.3 Ταξινόμηση - διαγνωστικά κριτήρια

Το 2004 η ομάδα Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) πρότεινε κριτήρια ταξινόμησης της ONB, κυρίως για τους ενήλικες. Αναγνωρίστηκαν συνολικά πέντε στάδια: τρία στάδια νεφρικής δυσλειτουργίας αυξανόμενης κλινικής βαρύτητας τα οποία είναι ο κίνδυνος για εμφάνιση νεφρικής δυσλειτουργίας (**Risk**), η νεφρική βλάβη (**Injury**) και η νεφρική ανεπάρκεια (**Failure**), καθώς επίσης και δύο κατηγορίες κλινικής έκβασης της ONB που είναι η παρατεινόμενη οξεία νεφρική ανεπάρκεια, που αναφέρεται ως απώλεια της νεφρικής λειτουργίας (**Loss**) και το τελικό στάδιο νεφρικής νόσου (**End - stage**). τα αρχικά όλων των προηγούμενων διαμορφώνουν το ακρωνύμιο **RIFLE** [2].

Το 2007 τα κριτήρια RIFLE προσαρμόστηκαν στα παιδιά με το ακρωνύμιο **pRIFLE** (pediatric - modified RIFLE) [3]. Επίσης, το Acute Kidney Injury Network (**AKIN**) πρότεινε ορισμένες τροποποιήσεις στα κριτήρια RIFLE, όπως φαίνονται στον Πίνακα 1.3.1. Η πρώτη αφορά στην επιλογή του όρου ONB για το σύνολο των περιπτώσεων της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας ανεξαρτήτως βαρύτητας. Η επιλογή αυτή αντανάκλα την πεποίθηση ότι η ONB αναφέρεται σε ένα ενιαίο φάσμα αιφνίδιας απώλειας της νεφρικής λειτουργίας, που εκτείνεται από μικρές - κλινικά σιωπηλές αυξήσεις της κρεατινίνης ορού έως τις κλινικά επείγουσες καταστάσεις που απαιτούν υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας. Η δεύτερη τροποποίηση αφορά στο γεγονός ότι το ηπιότερο στάδιο αυτής της ταξινόμησης (στάδιο 1), που αντικαθιστά την κατηγορία Risk της σταδιοποίησης RIFLE, διευρύνεται και περιλαμβάνει περιπτώσεις με ιδιαίτερα μικρές μεταβολές της κρεατινίνης ορού σε σχέση με τις τιμές αναφοράς. Επιπλέον, η κατηγορία Failure κατά RIFLE, που αναφέρεται πλέον ως στάδιο 3 ONB, διευρύνεται ώστε να περιλαμβάνει κάθε περίπτωση που αντιμετωπίζεται με οξεία υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας ανεξάρτητα της μεταβολής της κρεατινίνης ορού ή της διούρησης. Τα AKIN κριτήρια προτείνουν μόνο τη μέτρηση της κρεατινίνης για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου, αναγνωρίζοντας πως η eCCI (estimated Creatinine Clearance) δεν είναι απαραίτητη. Αυτό είναι σημαντικό, διότι κατέστησε δυνατή τη διάγνωση ONB σε αναδρομικές μελέτες, στις οποίες οι ερευνητές συχνά δεν έχουν πρόσβαση στο ύψος των υπό μελέτη

παιδιών, που είναι απαραίτητο για τον υπολογισμό της eCCI. Οι κατηγορίες Loss και End-stage της σταδιοποίησης RIFLE αφαιρέθηκαν από το σύστημα σταδιοποίησης AKIN και παραμένουν απλά ως κλινικές εκβάσεις. Τέλος, τονίζεται ότι η εφαρμογή των κριτηρίων AKIN για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της οξείας νεφρικής βλάβης προϋποθέτει την αποκατάσταση του εξωκυττάριου όγκου υγρών [4]. Σε μελέτη που αφορούσε σε παιδιά δεν φάνηκε κάποια διαφορά μεταξύ των AKIN και pRIFLE κριτηρίων [5].

Τα pRIFLE κριτήρια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε νεογνά, κυρίως σε πρόωρα, γιατί έχουν κάποιες ιδιαιτερότητες (ανώριμα σωληνάκια, περισσότερο συνολικό νερό του σώματος, επίδραση της μητέρας στις τιμές της κρεατινίνης). Μια πρόσφατη μελέτη προτείνει την αξιολόγηση της ποσότητας των ούρων και τη σχέση της με την έκβαση σε πάσχοντα νεογνά [6]. Αποβολή ούρων μικρότερη από 1,5 ml/Kg/h για 24h σχετίστηκε με υψηλότερη θνησιμότητα, διάρκεια μηχανικού αερισμού και διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο. Αυτά τα κριτήρια παραγωγής ούρων ενσωματώθηκαν στα pRIFLE κριτήρια και φέρουν το ακρωνύμιο **nRIFLE** (neonatal RIFLE). Στον Πίνακα 1.3.2 παρουσιάζονται τα κριτήρια RIFLE για όλες τις ηλικιακές ομάδες.

Πίνακας 1.3.1: Σταδιοποίηση AKIN [4].

Στάδιο	Κριτήρια κρεατινίνης	Κριτήρια αποβολής ούρων
1	Αύξηση κρεατινίνης $\times 1.5 - 2$ ή κρεατινίνη ≥ 0.3 mg/dl	< 0.5 ml/kg/h $\times 6$ ώρες
2	Αύξηση κρεατινίνης $\times 2 - 3$	< 0.5 ml/kg/h $\times 12$ ώρες
3	Αύξηση κρεατινίνης $> \times 3$ ή κρεατινίνη ≥ 4.0 mg/dl (οξεία αύξηση)	< 0.3 ml/kg/h $\times 24$ ώρες ή ανουρία $\times 12$ ώρες

Πίνακας 1.3.2: Σύγκριση συστημάτων ταξινόμησης RIFLE ενηλίκων, παιδιών και νεογνών [6].

Κριτήρια κρεατινίνης				Κριτήρια αποβολής ούρων		
	RIFLE	pRIFLE	nRIFLE	RIFLE	pRIFLE	nRIFLE
Risk	Αύξηση κρεατινίνης $\times 1.5$ ή μείωση GFR>25%	μείωση eCCI>25%	?	AO ≤ 0.5 ml/kg/h $\times 6$ ώρες	AO <0.5 ml/kg/h $\times 8$ ώρες	AO <1.5 ml/kg/h $\times 24$ ώρες
Injury	Αύξηση κρεατινίνης $\times 2$ ή μείωση GFR>50%	μείωση eCCI >50%	?	AO ≤ 0.5 ml/kg/h $\times 12$ ώρες	AO <0.5 ml/kg/h $\times 16$ ώρες	AO <1.0 ml/kg/h $\times 24$ ώρες
Failure	Αύξηση κρεατινίνης $\times 3$ ή μείωση GFR>75% ή κρεατινίνη >4 mg/dl (οξεία αύξηση)	μείωση eCCI >75% ή eCCI <35 ml/min/1.73 m ²	?	AO ≤ 0.3 ml/kg/h $\times 24$ ώρες ή ανουρία $\times 12$ ώρες	AO <0.3 ml/kg/h $\times 24$ ώρες ή ανουρία $\times 12$ ώρες	AO <0.7 ml/kg/h $\times 24$ ώρες ή ανουρία $\times 12$ ώρες
Loss	παρατεταμένη ανεπάρκεια > 4 εβδομάδες					
End-stage	νεφρική βλάβη τελικού σταδίου (παρατεταμένη ανεπάρκεια > 3 μήνες)					

RIFLE: Risk – Injury – Failure – Loss – End stage, pRIFLE: pediatric RIFLE, nRIFLE: neonatal RIFLE, GFR: Glomerular Filtration Rate = ρυθμός σπειραματικής διήθησης (κρεατινίνη ούρων $\times$ ροή ούρων / κρεατινίνη πλάσματος), eCCI: estimated Creatinine

Clearance = εκτιμώμενη κάθαρση κρεατινίνης ($\text{kg} \times \text{ύψος} / \text{κρεατινίνη πλάσματος}$), ΑΟ:

Αποβολή Ούρων

1.4 Επιδημιολογία

Η ONB αποτελεί σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας σε όλες τις ηλικίες. Έχει μελετηθεί κυρίως σε ενήλικες και παιδιά και λιγότερο σε νεογνά. Υπολογίζεται πως περισσότερο από το 7% όλων των νοσηλευόμενων ασθενών θα παρουσιάσουν ONB [7]. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σε νεογνά έχουν γίνει σε ειδικούς πληθυσμούς: σε νεογνά με ασφυξία [8], νεογνά μετά από επέμβαση καρδιάς [9] και νεογνά με χαμηλό βάρος γέννησης [10]. Παρά ταύτα, σε παλιότερες μελέτες φαίνεται ότι το 0.4% ζώντων νεογνών και το 8% - 24% των νεογνών που αντιμετωπίζονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας θα αναπτύξουν ONB [11], ενώ πρόσφατες μελέτες αναφέρουν 20% [12] και 18% [13] συχνότητα της ONB σε νεογνά που χρήζουν φροντίδας σε μονάδα εντατικής θεραπείας και σε νεογνά πολύ χαμηλού βάρους γέννησης, αντίστοιχα.

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες, τόσο στη μαιευτική παρακολούθηση όσο και στη νεογνολογία, η περιγεννητική υποξία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια νοσηρότητας και θνησιμότητας κατά τη νεογνική ηλικία. Σήμερα είναι γνωστό ότι 15 - 20% των πασχόντων νεογνών θα καταλήξουν σε θάνατο, ενώ ένα υπόλοιπο 25% θα αναπτύξει σοβαρές και πολύ συχνά μόνιμες επιπλοκές [14]. Μία άμεση επιπλοκή της περιγεννητικής ασφυξίας είναι η ONB λόγω ισχαιμίας της οποίας η συχνότητα μπορεί να φτάσει έως και 56% [15]. Χρησιμοποιώντας τα pRIFLE κριτήρια, η συχνότητα της ONB σε νεογνά με χειρουργηθείσα συγγενή καρδιοπάθεια ήταν στο 64%, όπου το 55% ήταν στο στάδιο Risk, 20% στο στάδιο Injury και 25% στο στάδιο Failure [16].

Η ασάφεια που επικρατεί για τα διαγνωστικά κριτήρια της ONB στα νεογνά γίνεται φανερή από μια νέα μελέτη που προσδιορίζει τη συχνότητα της ONB μόλις στο 6,3% [17]. Περισσότερες μελέτες και κοινά αποδεκτά διαγνωστικά κριτήρια είναι απαραίτητα για να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα της επιδημιολογίας στα νεογνά.

1.5 Νεογνά υψηλού κινδύνου

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ONB στα νεογνά, οι οποίοι συνοψίζονται παρακάτω [18]:

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ONB

- 1. χορήγηση φαρμάκων στην έγκυο (ΜΣΑΦ, αντιβιοτικά)**
- 2. πολύ χαμηλό βάρος γέννησης – VLBW (Very Low Birth Weight) (<1500 γρ)**
- 3. χαμηλό 5' - Apgar score**
- 4. διασωλήνωση**
- 5. σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας**
- 6. χορήγηση φαρμάκων στο νεογνό (ΜΣΑΦ, αντιβιοτικά, διουρητικά)**
- 7. φωτοθεραπεία**
- 8. συγγενής καρδιοπάθεια**

1.6 Αίτια

Τα αίτια οξείας νεφρικής ανεπάρκειας στα νεογνά διακρίνονται σε προνεφρικά, νεφρικά και μετανεφρικά (Εικόνα 1.6.1), όπως και στις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες. Το 70-80% των περιπτώσεων οφείλεται σε προνεφρικά αίτια [19].

A. Προνεφρικά:

Στα προνεφρικά αίτια ανήκει η υπογκαιμία λόγω αιμορραγίας, νεκρωτικής εντεροκολίτιδας ή αφυδάτωσης καθώς και η μείωση της νεφρικής αιμάτωσης λόγω περιγεννητικής ασφυξίας, καρδιακής ανεπάρκειας, σήψης, συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας ή φαρμάκων. Ειδικότερα τα αίτια *περιγεννητικής ασφυξίας* είναι τα παρακάτω:

Κατά την κύηση	Κατά το τοκετό
σακχαρώδης διαβήτης	πρώρος τοκετός
Υπέρταση	καισαρική τομή
λοιμώξεις μητέρας	ανώμαλη προβολή
υδράμνιο/ολιγάμνιο	εμβρυουλκία
ιστορικό Rhesus ευαισθητοποίησης	κεγχρωσμένο αμνιακό υγρό
παράταση κύησης	οξύς τοκετός/παρατεταμένος τοκετός > 24 ώρες
πολύδυμη κύηση	ρήξη εμβρυικών υμενών >24 ώρες προ του τοκετού
καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης	τετανική σύσπαση μήτρας
χρήση ναρκωτικών	πρόπτωση ομφαλίδας/αποκόλληση πλακούντα/προδρομικός πλακούντας
θεραπεία με φάρμακα όπως λίθιο, μαγνήσιο, ρεζερπίνη	χορήγηση ναρκωτικών 4 ώρες προ του τοκετού

B. Νεφρικά:

Το 6% έως 8% των περιπτώσεων οφείλεται σε αμιγώς νεφρικά αίτια με συχνότερο την οξεία σωληναριακή νέκρωση λόγω συγγενών ανωμαλιών, λοιμώξεων, νεφροτοξικών ουσιών ή θρόμβωσης νεφρικών αγγείων. Συγκεκριμένα, ο καθετηριασμός των ομφαλικών αγγείων μπορεί να προκαλέσει είτε θρόμβωση της νεφρικής φλέβας, είτε στένωση της νεφρικής αρτηρίας [19].

Γ. Μετανεφρικά:

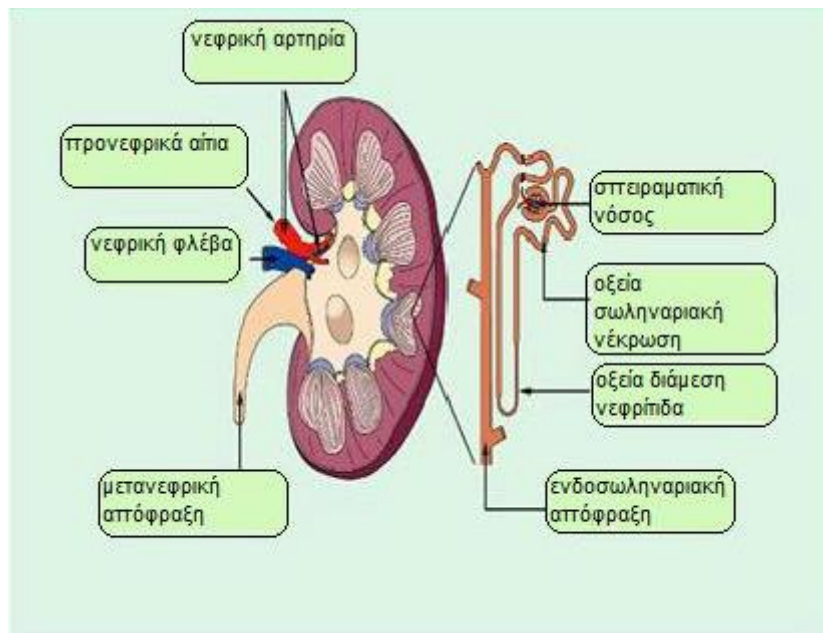
Αμφοτερόπλευρη απόφραξη των ουρητήρων ή του στομίου της ουροδόχου κύστης (από λίθους, πύλματα αίματος, νεόπλασμα) και συγγενής αποφρακτική ουροπάθεια.

Στον Πίνακα 1.6.1 συνοψίζονται τα αίτια της ONB στα νεογνά και στην Εικόνα 1.6.1 φαίνεται η τοπογραφική θέση κάθε αιτίας.

Πίνακας 1.6.1: Αίτια της ONB στα νεογνά (μεταφρασμένος από Avery's Disease of the Newborn 9^η Έκδοση, Κεφάλαιο XVII, σελίδα 1208)

Προνεφρικά	Αμιγώς νεφρικά	Μετανεφρικά-αποφρακτικά
Υπογκαιμία - Απόλυτη απώλεια αίματος (αιμορραγία, αφυδάτωση) - Σχετική απώλεια αίματος (σήψη, ΝΕΚ, ΣΑΔ, ECMO, υποαλβουμιναιμία)	ΟΣΝ (σοβαρή νεφρική ισχαιμία, νεφροτοξικές ουσίες)	Συγγενείς δυσπλασίες (φίμωση, στένωση ουρήθρας, βαλβίδες οπίσθιας ουρήθρας, ουρητηροκήλη, μεγαουρητήρας, απόφραξη ουρητηροπυελικής συμβολής)
	Λοιμώξεις (συγγενείς, πτελονεφρίτιδα, λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα)	
Νεφρική υποαιμάτωση (ΣΚΑ)	Νεφραγγειακά (θρόμβωση νεφρικής αρτηρίας, θρόμβωση νεφρικής φλέβας, ΔΕΠ)	Εξωγενής απόφραξη (τεράτωμα, αιματοκόλπος)
Φάρμακα (ινδομεθακίνη, αναστολείς ΜΕΑ)	Νεφροτοξικά (αμινογλυκοσίδες, ινδομεθακίνη, αμφοτερικίνη Β, σκιαγραφικά, ακυκλοβίρη)	Ενδογενής απόφραξη (νεφρικοί λίθοι)
	Συγγενείς ανωμαλίες (πολυκυστικοί νεφροί, αμφοτερόπλευρη νεφρική αγενεσία, νεφρική δυσπλασία)	Νευρογενής κύστη
	Ενδονεφρική απόφραξη (ουροπάθεια ουρικού οξέος, μυοσφαιρινουρία, αιμοσφαιρινουρία)	

ΝΕΚ: Νεκρωτική ΕντεροΚολίτιδα, ΣΑΔ: Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, ECMO: ExtraCorporeal Membrane Oxygenation = εξωσωματική οξυγόνωση μεμβράνης, ΣΚΑ: Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια, ΜΕΑ: Μετατρεπτικό Ένζυμο Αγγειοτασίνης, ΟΣΝ: Οξεία Σωληναρική Νέκρωση, ΔΕΠ: Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη



Εικόνα 1.6.1: Σχηματική απεικόνιση των αιτιών ONB (τροποποιημένη από την ιστοσελίδα του Ινστιτούτου Μελέτης Ουρολογικών Παθήσεων, www.imop.gr).

1.7 Παθοφυσιολογία

Παρά τις εκτεταμένες μελέτες, τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο, δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πρόκληση της νεφρικής βλάβης οποιασδήποτε αιτιολογίας. Ειδικά για την παθοφυσιολογία της ONB στα νεογνά (πρώωρα και τελειόμηνια) οι γνώσεις είναι περιορισμένες.

Γενικά, είναι γνωστό ότι η μειωμένη αποβολή ούρων, που παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις ONB, οφείλεται σε διαταραχή τριών διαδικασιών που καθορίζουν τη σύνθεση και τον όγκο των ούρων: της σπειραματικής διήθησης, της επαναρρόφησης και της έκκρισης από τα νεφρικά σωληνάρια.

Η οξεία σωληναριακή νέκρωση είναι η συχνότερη αιτία αμιγώς νεφρικής βλάβης στα νεογνά, όπως αναφέρεται πιο πάνω. Αποτελεί κλινικοπαθολογική οντότητα, που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των σωληναρίων και, όσον αφορά στην κλινική εικόνα,

από οξεία καταστολή της νεφρικής λειτουργίας. Μπορεί να είναι είτε ισχαιμική όπως στην περιγεννητική ασφυξία, είτε νεφροτοξική. Τα κρίσιμα γεγονότα και στις δύο μορφές, φαίνονται να είναι οι επίμονες διαταραχές της αιμάτωσης και η σωληναριακή βλάβη, όπως φαίνονται στο σχήμα της Εικόνας 1.7.1.

- Διαταραχές αιμάτωσης

Η ισχαιμική νεφρική βλάβη χαρακτηρίζεται από αιμοδυναμικές αλλοιώσεις, οι οποίες προκαλούν ελάττωση της σπειραματικής διήθησης. Η πλέον σημαντική από αυτές είναι η ενδονεφρική αγγειοσυστολή, η οποία καταλήγει τόσο σε ελάττωση της ροής πλάσματος όσο και σε περιορισμό της παροχής οξυγόνου προς τα λειτουργικά σημαντικά σωληνάρια στην έξω μοίρα της μυελώδους ουσίας. Κύριοι μηχανισμοί αυτής της αγγειοσυστολής είναι το σύστημα ρενίνης - αγγειοτασίνης, η δράση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ) και η βλάβη του ενδοθηλίου. Η υποξία οδηγεί στην ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και στην αύξηση του Na^+ στην περιοχή της πυκνής κηλίδας. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η έκκριση ρενίνης από τα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής και ενεργοποίηση του συστήματος αγγειοτασίνης - αλδοστερόνης που προκαλεί αγγειοσύσπαση και συνοδή μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Επιπλέον, η ρενίνη μπορεί να ενεργοποιηθεί από την καλλικρεΐνη και την καθεψίνη. Αγγειοσυσπαστική δράση έχει και το ΣΝΣ. Τόσο η δράση της ρενίνης όσο και του ΣΝΣ οδηγούν στην παραγωγή προσταγλανδινών (PGs) οι οποίες μειώνουν την αγγειοσυσπαστική δράση αυτών. Επίσης, η υποξία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής αδενοσίνης, η οποία προκαλεί αγγειοδιαστολή. Η βλάβη του ενδοθηλίου προκαλεί απελευθέρωση της αγγειοσυσπαστικής ενδοθηλίνης (ET). Με αυτές τις διαδικασίες σημειώνεται περαιτέρω μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, επιδείνωση της υποξίας και νέκρωση των κυττάρων αφού η αγγειοσύσπαση ενεργοποιεί την οξειδάση NADPH (NOX) και τη P450 μονοξυγενάση που οδηγούν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen Species, ROS) [20].

- Σωληναριακή βλάβη

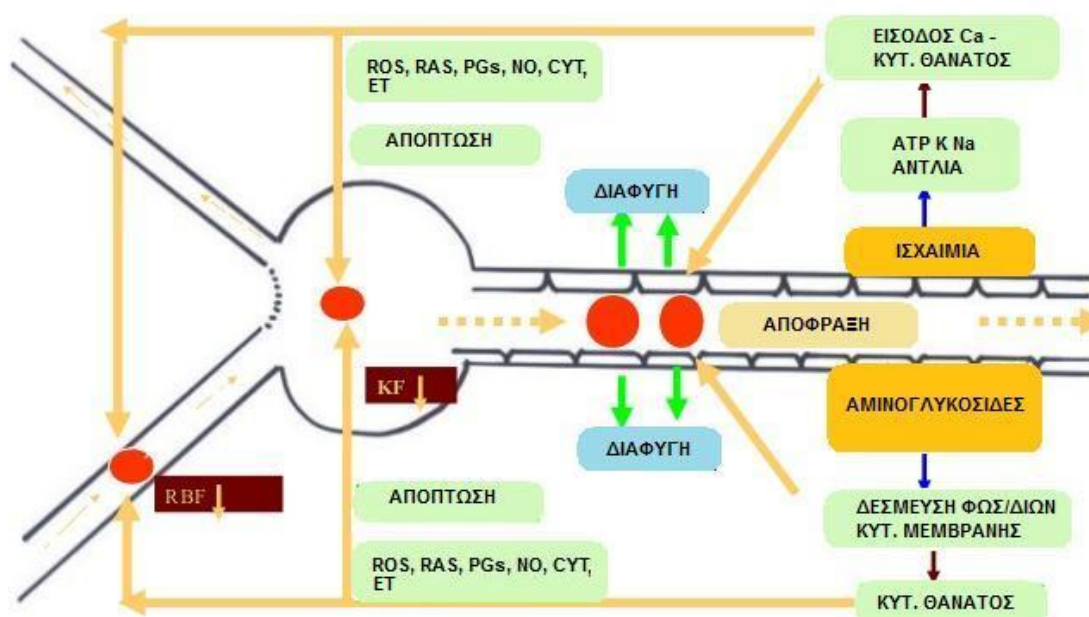
Τα κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην ανοξία και σε τοξίνες. Διάφοροι παράγοντες προδιαθέτουν τα ουροφόρα σωληνάρια προς τοξική βλάβη, συμπεριλαμβανομένων της μεγάλης επιφάνειας με ηλεκτρικό φορτίο (για την επαναρρόφηση ουσιών), των συστημάτων ενεργητικής μεταφοράς ιόντων και οργανικών οξέων, καθώς και της ικανότητας για αποτελεσματική συμπύκνωση των ούρων. Η ισχαιμία προκαλεί διάφορες δομικές μεταβολές στα επιθήλια, όπως απώλεια της πολικότητας των κυττάρων που φαίνεται ότι αποτελεί πρώιμο γεγονός με σημαντική λειτουργική σημασία. Η διαταραχή της νεφρικής αιματικής ροής οδηγεί στη μη οξυγόνωση των νεφρικών κυττάρων και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση της αναερόβιας γλυκόλυσης. Ο αναερόβιος μεταβολισμός με τη σειρά του οδηγεί σε γρήγορη κατανάλωση των ενεργειακών αποθεμάτων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), σε συσσώρευση γαλακτικού οξέος και σε δυσλειτουργία της διαμεμβρανικής αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, η οποία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση της ATP είναι ανάλογη της υποξίας και ο ρυθμός μείωσης της είναι υψηλότερος στους νεφρούς (80% μείωση) από τον εγκέφαλο (22%) και την καρδιά (5%). Στο μηχανισμό της νεφρικής βλάβης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca^{++}). Το ασβέστιο παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές ενζυματικές διαδικασίες και η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του σε φυσιολογικές συνθήκες είναι πολύ χαμηλή. Η απότομη αύξησή του ενδοκυτταρικά ενεργοποιεί πολλά ένζυμα όπως φωσφολιπάσες, οι οποίες ενεργοποιούν την υδρόλυση φωσφολιπιδίων με συνεπακόλουθη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, ενεργοποιεί συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου, το οποίο είναι μία ελεύθερη ρίζα τοξική για το κύτταρο. Η αυξημένη εισροή Ca^{++} στα κύτταρα πιθανώς ενεργοποιείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA (N – methyl – D – aspartate) και την ενεργοποίηση του μονοπατιού της γλουταμίνης. Η βλάβη των σωληναρίων και τα προκύπτοντα υπολείμματα μπορούν να αποφράξουν την εκροή των ούρων και τελικά να αυξήσουν την ενδοσωληναριακή πίεση, με απόρροια να μειώνεται η σπειραματική διήθηση. Επιπλέον, υγρό από τα υφιστάμενα βλάβη ουροφόρα σωληνάρια μπορεί να διαρρέει προς τη διάμεση ουσία, με

αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης σε αυτό το χώρο και τη συμπίεση των σωληναρίων [20].

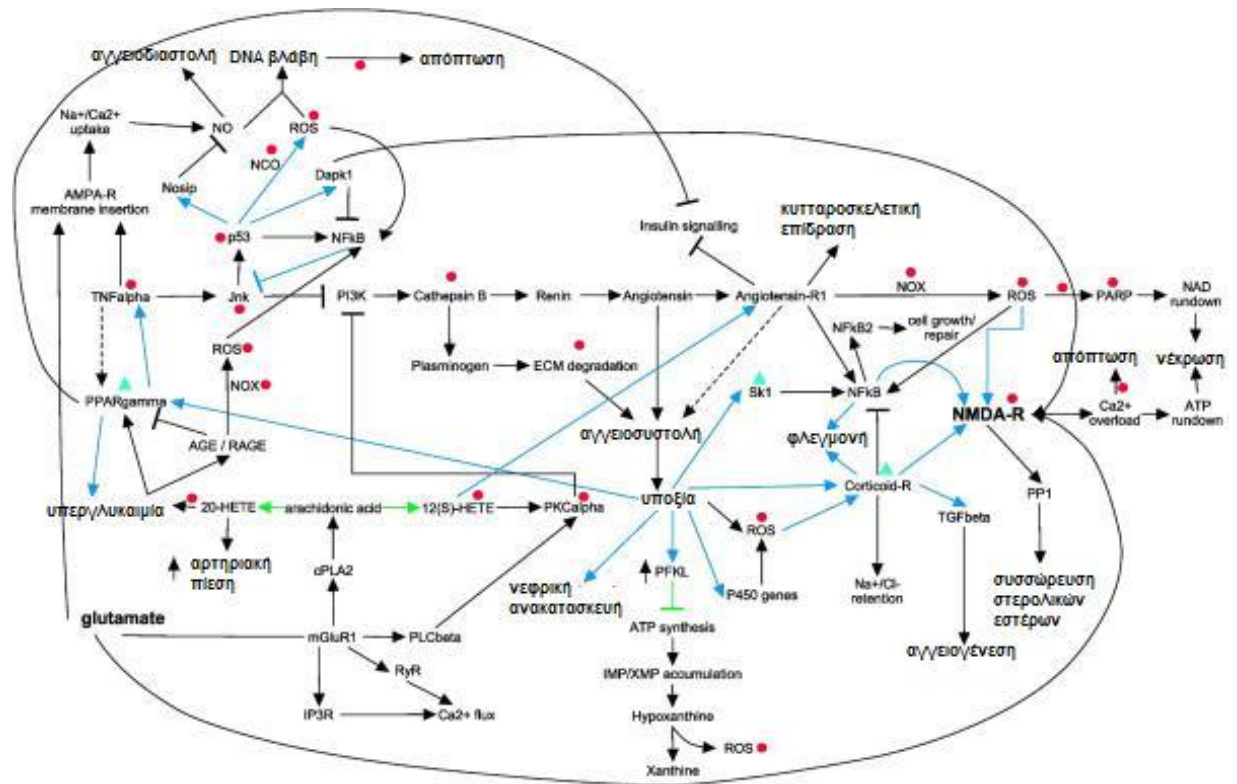
Νεφρική βλάβη συμβαίνει όχι μόνο κατά τη διάρκεια υποξίας αλλά και κατά την επαναιμάτωση - επανοξυγόνωση. Η υπεροξία που ακολουθεί ένα υποξικό επεισόδιο οδηγεί στον αερόβιο μεταβολισμό που οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen Species, ROS) στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, οι οποίες ευθύνονται για οξειδωτικές βλάβες του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου καταστρέφονται από ενδογενείς αντι - οξειδωτικούς παράγοντες του κυττάρου όπως υπεροξειδική δισμουτάση, ενδοϋπεροξειδάση, καταλάση, χοληστερόλη, ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη κ.α. Το γεγονός ότι οι νεφροί των νεογνών, ιδιαίτερα των πρόωρων, είναι ευαίσθητοι στην υποξία – επανοξυγόνωση μπορεί να οφείλεται κατά ένα μέρος στα μικρά αποθέματα σε αυτούς τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Κατά τη διάρκεια και μετά από υποξία - ισχαιμία, η παραγωγή των τοξικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου αυξάνεται σε τέτοιο βαθμό που οι ενδογενείς μηχανισμοί δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν, με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευσή τους και τις καταστροφικές, για το κύτταρο, συνέπειες. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι τοξικές για το κύτταρο μέσω των ακόλουθων μηχανισμών: 1) προκαλούν αλλαγές στην κυτταρική δομή μέσω υπεροξειδωτικής μεμβρανικών λιπιδίων και μέσω δυσλειτουργίας διαμεμβρανικών αντλιών, 2) καταστρέφουν ισχυρούς ενδοθηλιακούς δεσμούς, 3) ενεργοποιούν ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία παράγουν μόρια προσκόλλησης και κυτταροκίνες που καθορίζουν την ενδοαγγειακή συσσώρευση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την διαταραχή της νεφρικής αιματικής ροής και τη συνεπακόλουθη ισχαιμία και 4) ενεργοποιούν μηχανισμούς απόπτωσης που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο [20,21].

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ρυθμίζεται από τις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες Bcl-2 και από την ενεργοποίηση διάφορων άλλων μορίων. Η Bcl-2 πρωτεΐνη αποτρέπει την απόπτωση, ενώ αντίθετη δράση έχουν οι πρωτεάσες και η πρωτεΐνη Bax. Η ενεργός μορφή της Bcl-2 δημιουργεί ένα ετερο - διμερές με την Bax. Η αναλογία των δύο πρωτεϊνών καθορίζει το πόσο ευάλωτο είναι το κύτταρο στα αποπτωτικά ερεθίσματα, όπως στην υποξία. Άλλα μόρια που ενεργοποιούνται στην απόπτωση είναι η

οξειδάση NADPH (NOX), η P450 μονοξυγενάση, η συνθάση του νιτρικού οξέος (Nos 1), οι καλπαΐνες 3 και 11 (Carpn 3, Carpn 11), η κασπάση 8 (Casp 8), οι πολυ – [ADP – ριβόζη] – πολυμεράσες 3, 6 και 12 (Parp 3, Parp 6, Parp 12) και η σερίνη – πρωτεϊνική κινάση ATM. Τέλος, σημαντικό ρόλο στη νεφρική βλάβη φαίνεται να έχουν και οι κυτοκίνες, όπως IL - 18, IL - 6, IL - 1β . Σε πειραματική μελέτη βρέθηκε ότι η απουσία της IL - 18 έχει προστατευτικό ρόλο όσον αφορά στην ανάπτυξη ONB. Όλα τα παραπάνω μονοπάτια που οδηγούν στην ONB συνοψίζονται στην Εικόνα 1.7.2 [21].



Εικόνα 1.7.1: Σχηματική απεικόνιση της παθογένειας της οξείας σωληναριακής νέκρωσης (ATN). ROS: Reactive Oxygen Species – ενεργές ρίζες οξυγόνου, RAS: πρωτεΐνες RAS, PGs: προσταγλανδίνες, NO: μονοξείδιο του αζώτου, CYT: κυτοκίνες, ET: ενδοθηλίνη, RBF: Renal Blood Flow – νεφρική ροή αίματος, GFR: ρυθμός σπειραματικής διήθησης, Ca: ασβέστιο (τροποποιημένη από www.slideshare.net).



Εικόνα 1.7.2: Όλοι οι πιθανοί «καταρράκτες» αντιδράσεων που συμμετέχουν στην οξεία νεφρική ανεπάρκεια (τροποποιημένη από [21]).

μπλε βέλος: ενεργοποίηση γονιδίου, μαύρο βέλος ή T: σηματοδότηση γεγονότος, πράσινο βέλος ή T: μεταβολικό μονοπάτι, βέλος: θετικό γεγονός, T: ανασταλτικό γεγονός, έντονοι χαρακτήρες: τελική έκβαση γεγονότων, κόκκινη κουκίδα: σημείο φαρμακολογικών ερευνών για αποκλεισμό μονοπατιού, πράσινο τρίγωνο: σημείο φαρμακολογικών ερευνών για ενεργοποίηση μονοπατιού

1.8 Κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα

Η *κλινική εικόνα* των νεογνών με ONB είναι πολυσύνθετη, καθώς αντικατοπτρίζει όχι μόνο την πολυπλοκότητα της λειτουργίας του νεφρού αλλά και την επίδραση της ONB σε διάφορα όργανα ιστούς. Χαρακτηριστικά αναφέρονται κάποια κύρια κλινικά σημεία:

νεφροί: σημεία αφυδάτωσης ή υπερενυδάτωσης, φυσιολογική ή μειωμένη διούρηση, ανουρία

κεντρικό νευρικό σύστημα: σύγχυση, σπασμοί

καρδιαγγειακό σύστημα: υπερφόρτωση κυκλοφορίας, οιδήματα, αρτηριακή υπέρταση, καρδιακές αρρυθμίες, περικαρδίτιδα

αναπνευστικό: επιδείνωση αναπνευστικής λειτουργίας λόγω οξέωσης

γαστρεντερικό: ανορεξία, έμετοι

αιμοποιητικό: αναιμία, αιμορραγική διάθεση

ανοσοποιητικό: σημεία λοίμωξης

Τα εργαστηριακά ευρήματα εξαρτώνται από το αίτιο που προκάλεσε τη βλάβη και από το στάδιο της νόσου. Τα κυριότερα *εργαστηριακά ευρήματα* είναι:

Γενική αίματος: ορθόχρωμη – ορθοκυτταρική αναιμία, θρομβοπενία, λευκοκυττάρωση

βιοχημικά αίματος: αύξηση της κρεατινίνης, υπερκαλιαιμία, υπασβεσταιναιμία, αύξηση φωσφόρου, υπονατρίαιμία

αέρια αίματος: μεταβολική οξέωση

γενική ούρων (μπορεί να χαρακτηριστεί ως «υγρή ιστική βιοψία», αφού μας δίνει πολλές πληροφορίες): πρωτεϊνουρία (βλάβη σπειράματος), αιματοουρία

(βλάβη κατά μήκος του ουροποιητικού), δύσμορφα ερυθρά (βλάβη σπειράματος), πυουρία (λοίμωξη/οξεία διάμεση νεφρίτιδα), ερυθροκυτταρικοί κύλινδροι (σπειραματική αιματουρία), λευκοκυτταρικοί κύλινδροι (πυελονεφρίτιδα/οξεία διάμεση νεφρίτιδα), κοκκώδεις κύλινδροι (οξεία σωληναριακή νέκρωση), κρυσταλλικοί κύλινδροι (οξεία ουρική νεφροπάθεια), επιθηλιακά κύτταρα (οξεία σωληναριακή νέκρωση), pH > 8 (ουρολοίμωξη από Proteus/νεφρολιθίαση από στρουβίτη)

μικροσκοπική εξέταση ούρων: - επιθήλια νεφρικών σωληναρίων ή τμήματα αυτών, κύλινδροι επιθηλίων νεφρικών σωληναρίων, ευρείς κηρώδεις κύλινδροι και άφθονοι καφέ κοκκώδεις κύλινδροι (οξεία σωληναριακή νέκρωση), - αιμοσφαιρινικοί κύλινδροι (αιμοσφαιρινουρία), - μυοσφαιρινικοί κύλινδροι (ραβδομύλυση), - λευκοκύτταρα, ηωσινόφιλα, λευκοκυτταρικοί και ηωσινοφιλικό κύλινδροι, ερυθροκύτταρα και σπάνια ερυθροκυτταρικοί κύλινδροι (οξεία διάμεση νεφρίτιδα), - επιθήλια νεφρικών σωληναρίων, μεγάλος αριθμός κρυστάλλων ουρικού οξέος, κρυσταλλικοί κύλινδροι ουρικού οξέος (οξεία ουρική νεφροπάθεια)

καλλιέργεια ούρων: απομόνωση μικροοργανισμού

βιοχημικό ούρων: (μεταβάλλονται ανάλογα με το αίτιο της βλάβης όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.8.1): νάτριο ούρων, κρεατινίνη ούρων, οσμωτικότητα ούρων

άλλα: παρατεταμένος χρόνος ημιζωής σε φάρμακα που μεταβολίζονται στους νεφρούς (π.χ. αμινογλυκοσίδες, βανκομυκίνη)

Η διάκριση της προνεφρικής από την αμιγώς νεφρική βλάβη είναι σημαντική για την περαιτέρω θεραπευτική αντιμετώπιση και την πρόληψη περαιτέρω βλάβης. Εργαστηριακές μετρήσεις που συμβάλλουν σε αυτή τη διάκριση φαίνονται στον Πίνακα 1.8.1.

Πίνακας 1.8.1: Εργαστηριακή και κλινική διάκριση προνεφρικής και διάμεσης ONB (μεταφρασμένος από Avery's Disease of the Newborn 9^η Έκδοση, Κεφάλαιο XVII, σελίδα 1210)

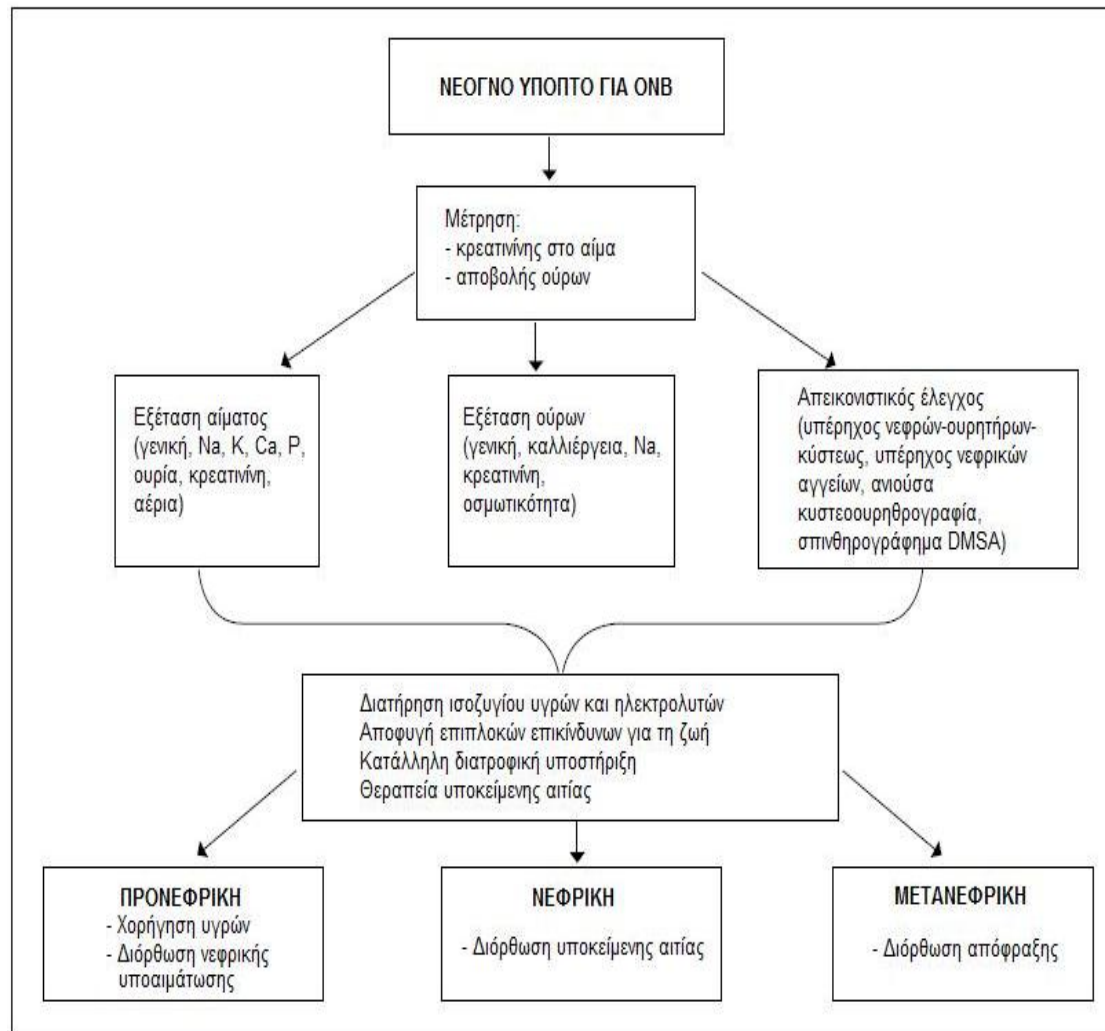
	Προνεφρική ONB	Διάμεση ONB
Ρυθμός ροής ούρων (mL/kg/h)	μεταβλητός	μεταβλητός
Ωσμωτικότητα ούρων (mOsm/L)	> 400	≤ 400
Ωσμωτικότητα ούρων προς ωσμωτικότητα πλάσματος	> 1.3	≤ 1.0
Κρεατινίνη ούρων προς κρεατινίνη πλάσματος	29.2 ± 1.6	9.7 ± 3.6
Na⁺ ούρων (mEq/L)	10 - 50	30 - 90
FENa (%)	< 0.3 (0.9 ± 0.6)	> 3.0 (4.3 ± 2 .2)
RFI	< 3.0 (1.3 ± 0.8)	> 3.0 (11.6 ± 9.5)
Αποτέλεσμα χορήγησης υγρών	βελτίωση ταχυκαρδίας, αύξηση αποβολής ούρων	καμία επίδραση στην ταχυκαρδία ή στην αποβολή ούρων

FENa: Fractional Excretion of Na (κλασματική απέκκριση νατρίου) = (Na⁺ ούρων / Na⁺ πλάσματος) x (κρεατινίνη πλάσματος / κρεατινίνη ούρων) x 100

RFI: Renal Failure Index (δείκτης νεφρικής ανεπάρκειας) = Na⁺ ούρων x κρεατινίνη ούρων / κρεατινίνη πλάσματος

(Τα στοιχεία του πίνακα έχουν κάποιους περιορισμούς όσον αφορά στη χρήση τους σε πρόωρα νεογνά, λόγω της ανωριμότητας των νεφρικών σωληναρίων. Η κανονική κλασματική απέκκριση νατρίου σε νεογνά με ηλικία κύησης < 32 εβδομάδων είναι μεγαλύτερη από 3%. Επίσης, για την εκτίμηση της ικανότητας επαναρρόφησης των νεφρικών σωληναρίων είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται ο λόγος κρεατινίνη ούρων / κρεατινίνη αίματος παρά ο λόγος οσμωτικότητα ούρων / οσμωτικότητα αίματος [22].)

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η προσέγγιση του νεογνού με υποψία ONB (τροποποιημένο από [23]):



1.9 Θεραπεία

- Αιτιολογική

Έως σήμερα δεν υπάρχουν ειδικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για την ONB. Συνήθως η θεραπεία γίνεται με βάση το αίτιό της. Ειδικότερα, στην προνεφρική ONB χορηγούνται υγρά για την αποκατάσταση του χαμένου όγκου υγρών ενώ στη μετανεφρική γίνεται προσπάθεια για την άρση της απόφραξης και προγραμματίζεται χειρουργική διόρθωση αυτής. Πολυουρία και ηλεκτρολυτικές διαταραχές μπορούν να εμφανιστούν μετά από την αποκατάσταση της απόφραξης, οι οποίες απαιτούν άμεση διόρθωση.

- Αντιμετώπιση επιπλοκών

Η ντοπαμίνη μπορεί να αυξήσει την παροχή αίματος στους νεφρούς νεογνών με προνεφρική ONB λόγω υποξαιμίας, οξέωσης ή χορήγησης ινδομεθακίνης. Παρά ταύτα, μελέτες σε ενήλικες με ONB δεν έδειξαν καλύτερη έκβαση σε αυτούς που έλαβαν ντοπαμίνη σε σχέση με εκείνους που έλαβαν placebo [24,25,26]. Αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε παιδιά και νεογνά.

Τα διουρητικά χρησιμοποιούνται για να επαναφέρουν τη διούρηση. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες σε ενήλικες, παιδιά και νεογνά που να δείχνουν ότι η χορήγηση διουρητικών αποτρέπει την ανάπτυξη της ONB ή βελτιώνει την πρόγνωση σε ήδη εγκατεστημένη βλάβη. Προτείνεται η συνεχής χορήγηση φουροσεμίδης (διουρητικό της αγκύλης) παρά η διαλείπουσα χορήγηση μεγάλων δόσεων αυτής καθώς φαίνεται να έχει λιγότερες τοξικές επιδράσεις [27]. Βέβαια, δεν θα πρέπει να ξεχνάμε τις παρενέργειες αυτού του φαρμάκου (υπόταση, διάμεση νεφρίτιδα, ωτοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, νεφρασβέστωση, οστεοπενία, παραμονή ανοιχτού βοτάλειου πόρου) κυρίως όταν χρησιμοποιείται σε πρόωρα νεογνά [28].

Η υπέρταση είναι συχνή στα νεογνά με ONB. Προκαλείται είτε από την αύξηση έκφρασης της ρενίνης, είτε από την αύξηση του ενδαγγειακού όγκου υγρών. Η θεραπεία στην πρώτη περίπτωση είναι η χορήγηση αποκλειστών

διαύλου ασβεστίου, β - αποκλειστών ή αναστολέων - MEA. Οι τελευταίοι πρέπει να αποφεύγονται σε ισχαιμική ONB γιατί μπορούν να επιδεινώσουν την κατάσταση [23].

Είναι γνωστό ότι η ONB συνοδεύεται με καταβολισμό και η επιβίωση των ασθενών με ONB είναι καλύτερη όταν έχουν θετικό ισοζύγιο θερμίδων. Όμως, για την ικανοποιητική θερμιδική πρόσληψη δίνεται μια ποσότητα υγρών που συσσωρεύεται εφόσον δεν αποβάλλεται με τα ούρα. Για αυτό το λόγο, η διαχείριση της χορήγησης υγρών στα νεογνά με ONB είναι δύσκολη. Γενικά, πρέπει να αποφεύγεται η υπερφόρτωση με υγρά περιορίζοντας τη χορήγηση κρυσταλλοειδών διαλυμάτων και χρησιμοποιώντας διαλύματα διατροφής με υψηλή συγκέντρωση σε διάφορα συστατικά [23].

Σημαντικό ρόλο έχει η αντιμετώπιση των ηλεκτρολυτικών διαταραχών. Η υπερκαλιαιμία μπορεί να αντιμετωπιστεί με διάφορες μεθόδους, όπως φαίνονται στον Πίνακα 1.9.1 [29]. Η υπονατρίαίμία συνήθως είναι το αποτέλεσμα της υπερφόρτωσης με υγρά. Εάν η τιμή του νατρίου είναι 120 - 130 mEq/L περιορίζουμε την πρόσληψη νερού, ενώ εάν είναι < 120 mEq/L ή υπάρχουν ανάλογα συμπτώματα χορηγούμε υπέρτονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου 3%. Σε περίπτωση αυξημένου φωσφόρου στο αίμα προτείνεται η σίτιση με μητρικό γάλα καθώς έχει χαμηλότερη συγκέντρωση φωσφόρου σε σχέση με τα τεχνητά γάλατα του εμπορίου. Σε ανθεκτικές περιπτώσεις συστήνεται η χορήγηση ανθρακικού ασβεστίου που δεσμεύει το φώσφορο ή εξωνεφρική κάθαρση. Τα αυξημένα επίπεδα φωσφόρου στα νεογνά αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης αποπιτανώσεων στην καρδιά, τα αγγεία και τους νεφρούς [30]. Η υπασβεστιαίμία είναι σπάνια σε νεογνά με ONB και ειδικά σε αυτά με σοβαρή και παρατεταμένη ONB. Σε περίπτωση χαμηλού ολικού ασβεστίου μαζί με υποαλβουμιναιμία απαιτείται μέτρηση του ιοντισμένου ασβεστίου. Εάν είναι χαμηλό και το νεογνό συμπτωματικό, τότε χορηγείται ενδοφλέβια γλυκονικό ασβέστιο 100 - 200 mg/kg κάθε 4-8 ώρες, ανάλογα με τις ανάγκες. Σε σοβαρή υπασβεστιαίμία χορηγείται καλσιτριόλη από το στόμα ή ενδοφλεβίως ώστε να αυξήσει την εντερική επαναρρόφηση του ασβεστίου [23].

Η μεταβολική οξέωση, που οφείλεται στην αδυναμία των νεφρών να επαναρροφήσουν τα διαπτανθρακικά, αντιμετωπίζεται με χορήγηση διπτανθρακικών. Όμως πρέπει να αποφεύγονται σε βαριά αναπνευστική

ανεπάρκεια. Μεταβολική οξέωση σε νεογνά με πνευμονική υπέρταση πρέπει να αντιμετωπίζεται επιθετικά [23].

- Εξωνεφρική κάθαρση

Η εξωνεφρική κάθαρση χρησιμοποιείται ως θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης μόνο όταν αποτύχουν οι προαναφερθείσες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Σκοπός αυτού του είδους θεραπείας είναι η υπερδιήθηση (απομάκρυνση του νερού) και η διάλυση (απομάκρυνση διαλυμένων ουσιών). Ενδείξεις για την έναρξη αυτής της θεραπείας αποτελούν η υπερκαλιαιμία, η υπονατρία με συμπτώματα υπερφόρτωσης με υγρά (συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονικό οίδημα), η οξέωση, η υπασβεστιαιμία, η αύξηση του φωσφόρου στο αίμα, τα σοβαρά ουραιμικά συμπτώματα και η αδυναμία παροχής επαρκούς διατροφής [23].

Η περιτοναϊκή διάλυση είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνότερα στα νεογνά, αφού είναι εύκολη τεχνικά και δεν απαιτεί πρόσβαση σε αγγείο ή αντιπηκτική αγωγή. Σχετικές αντενδείξεις αποτελούν η πρόσφατη επέμβαση στην κοιλιακή χώρα, η νεκρωτική εντεροκολίτιδα, η κοιλιοπεριτοναϊκή επικοινωνία και η κοιλιακή κήλη. Πιθανές επιπλοκές αποτελούν η διάτρηση οργάνου, η διαρροή περιτοναϊκού υγρού, η απόφραξη του περιτοναϊκού καθετήρα, η υπεργλυκαιμία, η υποκαλιαιμία, η αύξηση του γαλακτικού οξέος και η περιτονίτιδα [23].

Η συνεχής θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης (Continuous Renal Replacement Therapy - CRRT) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε νεογνά που είναι ασταθή [31]. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ικανότητά της να παρέχει πλήρη έλεγχο της μετακίνησης υγρών. Μειονεκτήματα αποτελούν η απαραίτητη κεντρική φλεβική γραμμή και η συνεχής αντιπηκτική αγωγή [23].

Η διαλείπουσα αιμοκάθαρση δεν χρησιμοποιείται συχνά στα νεογνά. Αποτελεί τη θεραπεία εκλογής στην υπεραμμονιαίμία αφού μπορεί γρήγορα να απομακρύνει υγρά και διαλυτές ουσίες από το σώμα [32]. Κύρια μειονεκτήματα είναι η απαίτηση για κεντρική φλεβική γραμμή και η

αιμοδυναμική αστάθεια που μπορεί να προκαλέσει λόγω της γρήγορης απομάκρυνσης υγρών και μεταβολιτών.

Πίνακας 1.9.1: Φαρμακευτική αντιμετώπιση υπερκαλιαιμίας στα νεογνά (τροποποιημένος από [29]).

Φάρμακο	Δόση	Έναρξη χορήγησης	Διάρκεια χορήγησης
Γλυκονικό ασβέστιο (10%)	0.5 - 1 ml/kg (IV)	1 - 5 λεπτά	15 - 60 λεπτά
Διττανθρακικά (3.75%)	1 - 2 mEq/kg (IV)	5 - 10 λεπτά	2 - 6 ώρες
Ινσουλίνη	1 IU/5g γλυκόζης (IV εφάπαξ ή σε συνεχή έγχυση)	15 - 30 λεπτά	4 - 6 ώρες
Γλυκόζη	≤ 14 mg/kg/min (IV ή σε συνεχή έγχυση)	15 - 30 λεπτά	4 - 6 ώρες
Φουροσεμίδη	1 mg/kg (IV)	5 - 10 λεπτά	2 - 3 ώρες
Kayexalate	1 g/kg κάθε 6 ώρες (p.os/ορθό)	1 - 2 ώρες	4 - 6 ώρες

Kayexalate: sodium polystyrene sulphonate (σουλφωνικό πολυστυρένιο νατρίου)

1.10 Πρόγνωση

Η πρόγνωση της ONB είναι πάντοτε επιφυλακτική και εξαρτάται από τον αιτιολογικό παράγοντα, τη σωστή και έγκαιρη θεραπευτική αντιμετώπιση και τους ιδιοσυγκρασικούς παράγοντες κάθε ασθενούς. Ειδικότερα, η πρόγνωση των νεογνών με ONB εξαρτάται από το αίτιο και την ηλικία κύησης [13]. Η θνησιμότητα των νεογνών με ONB ανέρχεται περίπου στο 14% έως 73% [11]. Σε νεογνά με ECMO (εξωσωματική οξυγόνωση μεμβράνης) η θνησιμότητα ήταν 3.2 φορές μεγαλύτερη [33] και σε πολύ χαμηλού βάρους νεογνά ο αερισμός με υψηλές πιέσεις και η χορήγηση κεφοταξίμης σχετιζόταν με ONB [34]. Η πρόγνωση των νεογνών με ONB μετά από ασφυξία είναι δυσοίωνη και ιδιαίτερα σε αυτά με ολιγουρικό τύπο [35]. Η παραμονή στο νοσοκομείο και ο μηχανικός αερισμός διήρκησαν περισσότερο στα νεογνά με ONB [16]. Σε πρόσφατη μελέτη που αφορούσε σε ασφυκτικά νεογνά που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική υποθερμία βρέθηκε σημαντική σχέση αναμέσα στην ONB και στα ευρήματα της MRI εγκεφάλου [36]. Γενικά, νεογνά με προνεφρική ONB έχουν καλή πρόγνωση εάν λάβουν έγκαιρα την κατάλληλη θεραπεία. Η πρόγνωση νεογνών με μετανεφρική ONB λόγω συγγενούς απόφραξης του ουροποιητικού εξαρτάται από το συνοδό βαθμό νεφρικής δυσπλασίας. Όμως, νεογνά με αμιγώς νεφρική ONB φαίνεται να έχουν υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Στα επιζήσαντα νεογνά μπορεί να παρατηρηθούν απώτερες επιπλοκές όπως χρόνια υπέρταση, νεφρασβέστωση, σωληναριακή οξέωση, αδυναμία συμπίκνωσης των ούρων και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, χωρίς όμως να υπάρχουν επαρκείς μελέτες σε αυτή την ηλικιακή ομάδα. Μια μελέτη αναφέρει τη μείωση του ύψους σε επανέλεγχο που έγινε δύο χρόνια μετά την ONB [16]. Επανέλεγχος σε βρέφη που έλαβαν περιτοναϊκή κάθαρση πριν από ένα χρόνο, έδειξε πως το 30% ήταν σε αιμοκάθαρση, το 9% είχε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και το 26% είχε αναρρώσει πλήρως (το 35% είχε πεθάνει κατά τη νεογνική περίοδο) [37]. Στην ίδια μελέτη υπήρχε σημαντική διαφορά της έκβασης ανάλογα με την υποκείμενη αιτία της ONB. Νεογνά με νεφρικές

ανωμαλίες είχαν 17% θνησιμότητα ενώ εκείνα με οξεία σωληναριακή νέκρωση 55%. Παράγοντες κινδύνου για την προοδευτική επιδείνωση της νεφρικής

νόσου αποτέλεσαν η πρωτεϊνουρία, η τιμή της κρεατινίνης στο πλάσμα > 0.6 mg/dl σε ηλικία 1 έτους και ο δείκτης μάζας σώματος $> 85^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση.

Περισσότερες μελέτες θα μας έδιναν καλύτερη εικόνα της πρόγνωσης της ONB στα νεογνά. Παρά ταύτα, τα ποσοστά θνησιμότητας που δίνουν οι ήδη υπάρχουσες μελέτες οδηγούν στην ανάγκη για την εύρεση νέων βιοδεικτών για έγκαιρη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση ώστε να βελτιωθεί η οξεία έκβαση της νόσου και να περιοριστούν στο ελάχιστο οι απώτερες επιπλοκές.

1.11 Βιολογικοί δείκτες

1.11.1 Προβληματισμοί περί έγκαιρης διάγνωσης

Σήμερα, η διάγνωση της ONB στα νεογνά παραμένει ασαφής. Συνήθως, στηρίζεται στη μείωση της διούρησης, στην αύξηση της κρεατινίνης στο αίμα και στις αλλαγές του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR), όπως και στις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διάγνωση της ONB στα νεογνά συχνά καθυστερεί έως και πέντε ημέρες λόγω περιορισμών που υπάρχουν στη χρήση των παραπάνω δεικτών νεφρικής βλάβης. Συγκεκριμένα, η κρεατινίνη ορού στο νεογνό έχει ανάλογες τιμές με αυτές της μητέρας τις πρώτες ημέρες ζωής, γεγονός που παραπλανεί την πραγματική εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας [38, 39]. Επίσης, η τιμή της κρεατινίνης μπορεί να επηρεαστεί από την ανωριμότητα των νεφρικών σωληναρίων που χαρακτηρίζει τα νεογνά και κυρίως τα πρόωρα, καθώς και από αλλαγές στη χολερυθρίνη τις πρώτες μέρες ζωής [40]. Έχει βρεθεί ότι η κρεατινίνη αυξάνεται στον ορό όταν έχει χαθεί το 50% της νεφρικής λειτουργίας [41]. Δηλαδή, δεν έχει την ικανότητα να ανιχνεύει πρώιμες, σιωπηλές νεφρικές βλάβες. Επιπλέον, η κρεατινίνη επηρεάζεται από πολλούς εξωνεφρικούς παράγοντες: φλεγμονή, λοίμωξη, χορήγηση φαρμάκων, διατροφή πλούσια σε

πρωτεΐνες και απώλεια μυϊκής μάζας μπορούν να αλλάξουν τα επίπεδά της στο αίμα [41]. Σε αυτό συμβάλουν και κάποια χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως το φύλο, η φυλή και η ηλικία. Η αποβολή ούρων έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο σε ενήλικες και παιδιά και πρόσφατα σε νεογνά με τα nRIFLE κριτήρια. Όμως, μελέτες έχουν δείξει πως στο 50% των περιπτώσεων η ONB μπορεί να είναι μη ολιγουρική [40].

Συγκριτικά με τους ενήλικες και τα μεγαλύτερα παιδιά, οι νεφροί των νεογνών έχουν κάποιες ιδιαιτερότητες που τους κάνουν πιο επιρρεπείς στη νεφρική βλάβη τις πρώτες ημέρες ζωής. Είναι πιο ευαίσθητοι στην υποξία, έχουν χαμηλότερο ρυθμό σπειραματικής διήθησης, υψηλή αντίσταση στα νεφρικά αγγεία, αυξημένη δραστηριότητα της ρενίνης, μειωμένη αιμάτωση του φλοιού και μειωμένη ικανότητα επαναρρόφησης του νατρίου στα εγγύς σωληνάκια. Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με τους υπάρχοντες δείκτες που στερούνται ευαισθησίας και ειδικότητας για την έγκαιρη διάγνωση της ONB θέτουν την ανάγκη για νέους ποιοτικούς βιοδείκτες ONB σε πάσχοντα νεογνά.

1.11.2 Νέοι βιολογικοί δείκτες

Ο όρος «βιοδείκτης» είναι μια σύντμηση του όρου «βιολογικός δείκτης». Το 1998 το National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group ορίζει το βιοδείκτη ως εξής: *“A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention”* [42]. Δηλαδή, ο βιοδείκτης είναι οτιδήποτε μπορεί να μετρηθεί και να δώσει πληροφορίες για μια βιολογική κατάσταση ή διαδικασία. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιολογικού δείκτη συνοψίζονται στον Πίνακα 1.11.2.1.

Πίνακας 1.11.2.1: Χαρακτηριστικά ιδανικού βιοδείκτη [42, 43].

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΔΑΝΙΚΟΥ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ

1. μη επεμβατικός τρόπος ανίχνευσης, εύκολα μετρήσιμος, σταθερότητα σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, φθηνή μέτρηση, γρήγορη παραγωγή αποτελεσμάτων
2. ανίχνευση σε εύκολα διαθέσιμες πηγές (π.χ. ούρα, αίμα)
3. υψηλή ευαισθησία
4. υψηλή ειδικότητα
5. έγκαιρη διάγνωση νόσου, έγκαιρη μεταβολή μετά από θεραπευτική παρέμβαση
6. προγνωστική αξία, ταξινόμηση της σοβαρότητας της νόσου
7. παροχή πληροφοριών για τον υποκείμενο μηχανισμό της νόσου, το αίτιο και την εντόπιση της βλάβης

Οι παραδοσιακοί δείκτες ONB υστερούν σε ευαισθησία και ειδικότητα για την έγκαιρη διάγνωση στη νεογνική περίοδο. Ο χρόνος που απαιτείται για την ανίχνευση αυτών των δεικτών μπορεί να είναι κρίσιμος για την αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση και καλή πρόγνωση. Τα τελευταία χρόνια διάφοροι βιοδείκτες μελετώνται για το ρόλο τους στην έγκαιρη διάγνωση της ONB [44]. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε ενήλικες και παιδιά και ελάχιστες σε νεογνά. Παρακάτω αναφέρονται οι περισσότεροι μελετημένοι δείκτες στα νεογνά.

Cystatin C (CysC)

Η Cystatin C ανακαλύφθηκε στα ούρα το 1961 και είκοσι χρόνια αργότερα οι Grubb και Lofberg, στο πανεπιστήμιο Lund της Σουηδίας, την απομόνωσαν και την ανέλυσαν. Πρόκειται για μια χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη (13kDa) που είναι αναστολέας της πρωτεάσης της κυστεΐνης. Παράγεται από εμπύρηννα κύτταρα σε σταθερό ρυθμό και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Λόγω του μικρού της μεγέθους διηθείται στο

νεφρικό σπείραμα και επαναρροφάται σχεδόν πλήρως από τα εγγύς νεφρικά σωληνάρια [45]. Η μοριακή της δομή φαίνεται στην Εικόνα 1.11.2.1.



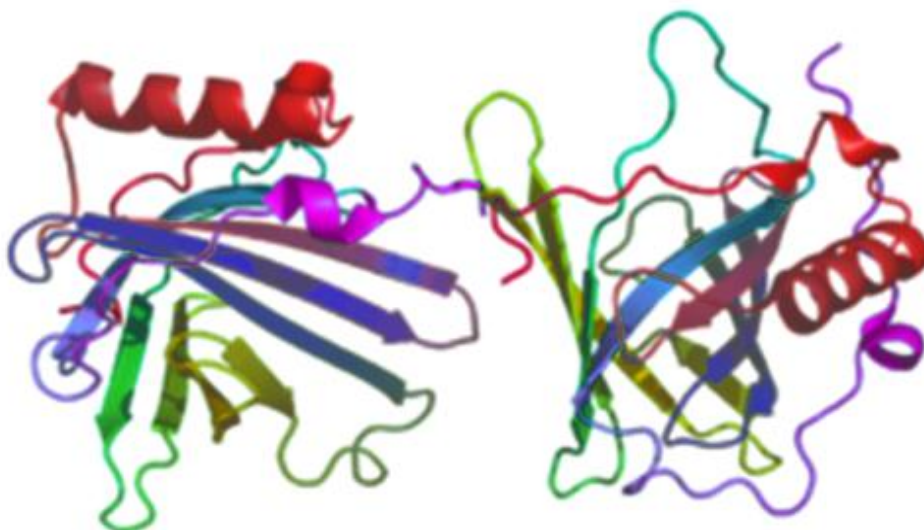
Εικόνα 1.11.2.1: Απεικόνιση της μοριακής δομής της Cystatin C (τροποποιημένη από The University of Sheffield – Department of Molecular Biology and Biotechnology, www.shef.ac.uk).

Σε αντίθεση με την κρεατινίνη, τα επίπεδα της CysC στο αίμα των νεογνών δεν αντικατοπτρίζουν τα μητρικά επίπεδα αφού η CysC δεν διαπερνά τον πλακούντα. Μετρήσεις της CysC στο αίμα υγιών εγκύων και τελειόμηνων νεογνών τους έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών και μείωση των νεογνικών επιπέδων τις πρώτες πέντε ημέρες ζωής [46, 47]. Η συγκέντρωση της CysC στο αίμα χρησιμοποιήθηκε ως προγνωστικός δείκτης της ONB σε πρόωρα νεογνά, χαμηλού βάρους γέννησης που έλαβαν ινδομεθακίνη και φουροσεμίδα [48]. Επίσης, μετρήθηκε σε 62 πρόωρα νεογνά με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (RDS) και σε 34 νεογνά χωρίς RDS και κατάφερε να προβλέψει την ONB, που παρατηρήθηκε μόνο στην πρώτη ομάδα, νωρίτερα από την κρεατινίνη [49]. Η CysC στα ούρα μη σηπτικών νεογνών προέβλεψε την ONB [50]. Επιπλέον, η CysC στο αίμα έχει βρεθεί

αυξημένη σε νεογνά με συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος [51]. Αντίθετα, σε νεογνά με σήψη η CysC στο αίμα δεν σχετιζόταν με τη σοβαρότητα της κατάστασης [52]. Παρά ταύτα, η CysC φαίνεται να είναι καλός δείκτης του GFR στα νεογνά, με ή χωρίς υπεροχή έναντι της κρεατινίνης παρά ευαίσθητος δείκτης ONB [53]. Αν και υπάρχουν περισσότερες μελέτες που εκτιμούν τη CysC στην παιδική ηλικία, είναι δύσκολο να επεκτείνουμε τα αποτελέσματά τους στο νεογνικό πληθυσμό αφού οι φυσιολογικές τιμές της CysC στα ούρα μειώνονται καθώς ωριμάζουν οι νεφροί.

Neutrophil Gelatinase - Associated Lipocalin (NGAL)

Η NGAL είναι μια λιποκαλίνη με μοριακό βάρος 25kDa [54], που εκφράζεται στα νεφρικά σωληνάρια μετά από ισχαιμική [55], τοξική βλάβη [56] ή μετά από μεταμόσχευση νεφρού [57]. Από νωρίς στην ONB υπάρχει γρήγορη αύξηση της έκφρασης του NGAL mRNA στην αγκύλη του Henle και τα εγγύς νεφρικά σωληνάρια με απόρροια την έκκριση της NGAL στα ούρα. Στο αίμα η NGAL μπορεί να προέρχεται από άλλους ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη, όπως οι πνεύμονες και το ήπαρ. Εξαιτίας του μικρού της μεγέθους, διηθείται στο σπείραμα και απορροφάται από τα εγγύς σωληνάρια [54]. Η μοριακή της δομή φαίνεται στην Εικόνα 1.11.2.2.



Εικόνα 1.11.2.2: Απεικόνιση της μοριακής δομής της NGAL (τροποποιημένη από RCSB Protein Data Bank, www.rcsb.org).

Η συμβολή της NGAL στη διάγνωση της τοξικής ONB έχει μελετηθεί τόσο σε ζώα [56], όσο και σε ανθρώπους [58]. Φαίνεται πως η NGAL στα ούρα εξαρτάται από την ηλικία κύησης και το βάρος γέννησης καθώς έχει υψηλότερες τιμές στα πρόωρα νεογνά [59]. Σε νεογνά και παιδιά που υπέστησαν επέμβαση καρδιοπνευμονικής παράκαμψης η NGAL στα ούρα και στο αίμα προέβλεψε την ONB [60]. Αντίθετα, σε μελέτη νεογνών που υπέστησαν καρδιοχειρουργική επέμβαση λόγω κάποιας συγγενούς καρδιοπάθειας η μέτρηση της NGAL στο αίμα αμέσως μετά την επέμβαση δεν προέβλεψε την αύξηση της κρεατινίνης [61]. Η NGAL στο αίμα και στα ούρα καθώς και η CysC στα ούρα φαίνεται πως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση της νεφρικής βλάβης μετά από ισχαιμία λόγω ασφυξίας σε νεογνά [62]. Επίσης, η NGAL στα ούρα βρέθηκε να είναι ένας έγκαιρος βιοδείκτης σε πολύ χαμηλού βάρους νεογνά [63] και προέβλεψε τη νεφρική λειτουργία κατά τον πρώτο μήνα ζωής αυτών των νεογνών [64]. Πρόσφατη μελέτη δείχνει πως η NGAL στα ούρα πρόωρων νεογνών την πρώτη μέρα ζωής, προσαρμοσμένη σε διάφορους παράγοντες, παρέμεινε ένας σημαντικός δείκτης ONB [65].

Kidney Injury Molecule - 1 (KIM - 1)

Το KIM - 1 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που δεν ανιχνεύεται στα ούρα υπό φυσιολογικές συνθήκες [66]. Τα επίπεδά της στα ούρα αυξάνονται μετά από ισχαιμική ή τοξική βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς νεφρικών σωληναρίων από τα οποία αποβάλλεται και εκκρίνεται στα ούρα. Επιτρέπει στα επιθηλιακά κύτταρα να φαγοκυτταρώσουν νεκρά κύτταρα και να τα μετατρέψουν σε φαγοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους καταστρέφουν αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα. Παραμένει εκεί έως την πλήρη επαναφορά του επιθηλίου [66].

Σε ζώα που εκτέθηκαν σε νεφροτοξικούς παράγοντες όπως σισπλατίνη [67], γενταμικίνη [68] και φολικό οξύ [69], το KIM - 1 στα ούρα ήταν πιο ευαίσθητος και ειδικός βιοδείκτης για την ανίχνευση της ONB από την κρεατινίνη. Επίσης, το KIM - 1 εντοπίστηκε στα ούρα ποντικών που υπέστησαν νεφρική βλάβη λόγω ισχαιμίας - επαναιμάτωσης [67].

Σε μελέτη των Askenazi *et al* [70] φάνηκε ότι η NGAL στα ούρα προέβλεψε την ONB και το KIM - 1 στα ούρα είχε σχέση με τη θνησιμότητα σε

πολύ χαμηλού βάρους νεογνά, ανεξάρτητα από την ηλικία κύησης και το βάρος γέννησης. Σε άλλη μελέτη το KIM - 1 στα ούρα πρόωρων νεογνών στα οποία χορηγήθηκε αμινογλυκοσίδη προέβλεψε τη τοξική ONB, ενώ η κρεατινίνη στο αίμα μειώθηκε [71].

IL - 18

Η IL - 18 είναι μια προ - φλεγμονώδης κυτοκίνη που απελευθερώνεται από τα μακροφάγα και από άλλα κύτταρα. Παράγεται σε μία ανενεργό μορφή και με την επίδραση μιας ενδοκυττάριας κυστεϊνικής πρωτεάσης γίνεται ενεργή. Προκαλεί τη σύνθεση φλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. TNFα, IL - 1, χυμοκίνες) και τη συσσώρευση μακροφάγων και ουδετεροφίλων και βοηθά στην ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων και Natural Killers (NK) [72]. Η μοριακή της δομή φαίνεται στην Εικόνα 1.11.2.3.



Εικόνα 1.11.2.3: Απεικόνιση της μοριακής δομής της IL - 18 (τροποποιημένη από PLOS Pathogens, www.plospathogens.org).

Πειραματική μελέτη που έγινε σε ποντίκια έδειξε πως αυτά που είχαν έλλειψη της IL - 18 προστατεύτηκαν από την ανάπτυξη ONB μετά από ισχαιμία - επαναιμάτωση [73]. Αντίθετα, η εξουδετέρωση της IL - 18 σε νεογνά ποντίκια με σήψη από στρεπτόκοκκο Β οδήγησε σε αυξημένη θνησιμότητα [74].

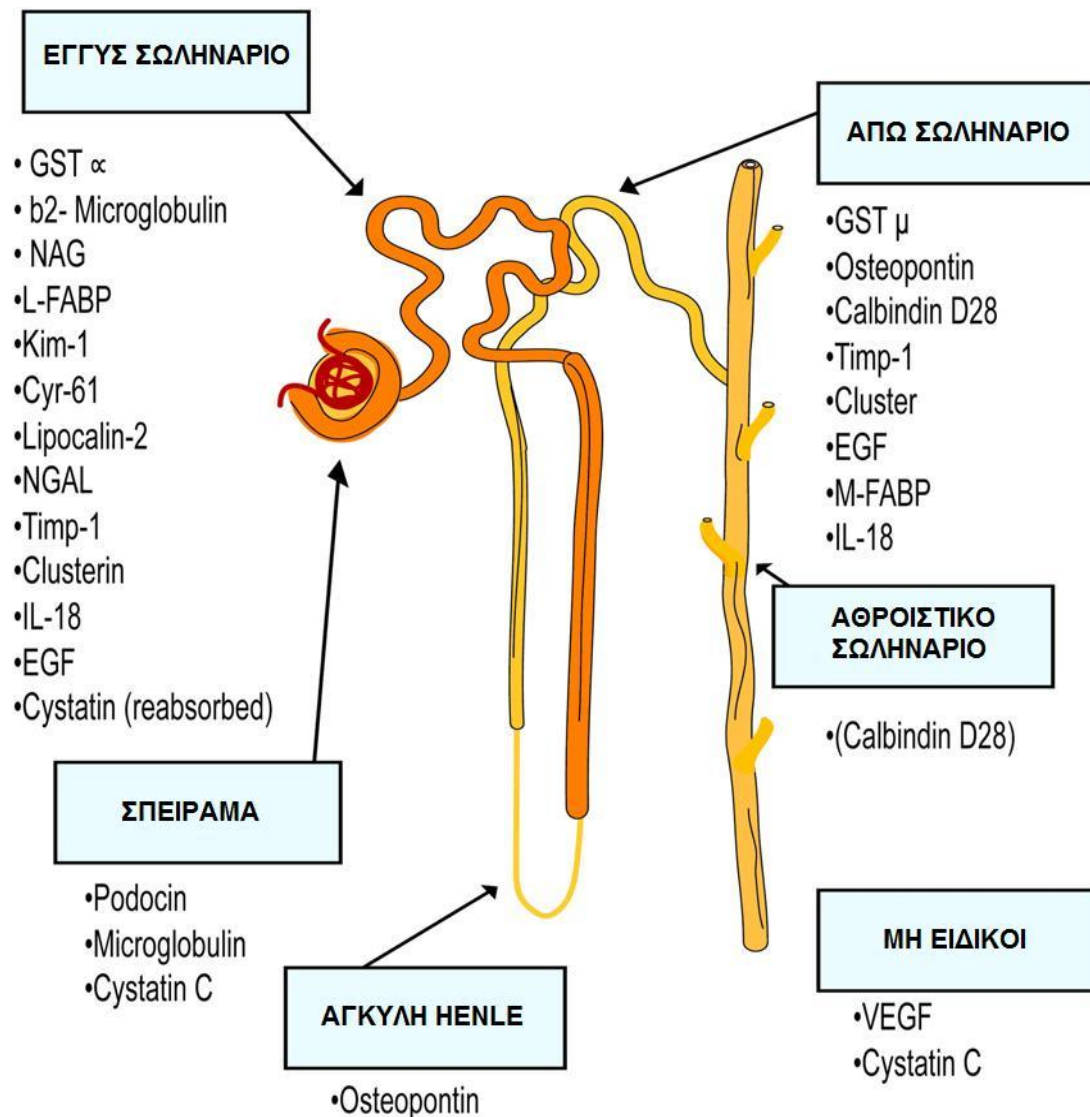
Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν τους ερευνητές στο να εξετάσουν τον πιθανό ρόλο της IL - 18 ως δείκτη λοίμωξης και ONB μετά από σήψη στα νεογνά [75]. Ωστόσο, η IL - 18 στα ούρα νεογνών σε εντατική μονάδα, χωρίς σήψη σχετιζόταν με την ONB [50].

Καθένας από τους παραπάνω δείκτες έχει κάποια πλεονεκτήματα. Η CysC στο αίμα των νεογνών δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα της μητέρας όπως συμβαίνει με την κρεατινίνη [46, 47] αλλά ο ρόλος της για την εκτίμηση του GFR στα νεογνά παραμένει αμφιλεγόμενος [53]. Η NGAL φαίνεται να είναι ο πιο πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης στα νεογνά [76]. Αυξάνεται νωρίτερα από άλλους δείκτες σε ισχαιμική ONB [60]. Σε νεογνά και παιδιά που υπέστησαν καρδιοχειρουργική επέμβαση αυξήθηκε 2 ώρες μετά από αυτήν [60], ενώ μόνο σε παιδιά που υπεβλήθηκαν σε καρδιοχειρουργική επέμβαση η CysC στο πλάσμα, το KIM - 1 στα ούρα και η IL - 18 στα ούρα αυξήθηκαν σημαντικά μέσα σε 12 - 24 [77], 6 - 12 [78] και 4 - 6 [79] ώρες, αντίστοιχα. Η NGAL και το KIM-1 στα ούρα αποτέλεσαν καλούς δείκτες τοξικής ONB [56, 58, 67, 68, 71]. Το KIM - 1 στα ούρα και η IL - 18 στο πλάσμα έχουν συσχετιστεί με την κλινική έκβαση. Όμως, χρειάζονται περισσότερες μελέτες, ειδικά για την IL - 18 της οποίας ο ρόλος στη διάγνωση και πρόγνωση της ONB παραμένει αμφιλεγόμενος [70, 74, 80]. Επίσης, μόρια που εμποδίζουν την παραγωγή της ενεργού μορφής της IL - 18 μπορούν να χρησιμεύσουν στην πρόληψη της ONB.

Στην έρευνα για νέους βιοδείκτες ONB εμπλέκονται και άλλα μόρια εκτός από τα παραπάνω (Εικόνα 1.11.2.4) [81, 82, 83, 84]. Μερικά από αυτά είναι:

- Calbindin (νεφροτοξική βλάβη, βλάβη άπω σωληναρίων)
- Clusterin (προστατευτική δράση σε σωληναριακή βλάβη)
- Cyr - 61 (Cystein rich protein, νεφρική βλάβη)

- EGF (Epidermal Growth Factor, σωληναριακή βλάβη)
- π GST (Glutathione S Transferase, διαφοροδιάγνωση βλάβης εγγύς και άπω σωληναρίων)
- α GST (Glutathione S Transferase, διαφοροδιάγνωση βλάβης εγγύς και άπω σωληναρίων)
- L - FABP (Liver type Fatty Acid Binding Protein, ONB, μη διαβητική χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, πρώιμα στάδια διαβητικής νεφροπάθειας, πολυκυστικοί νεφροί)
- Microalbumin (δείκτης λειτουργίας των εγγύς σωληναρίων)
- β_2 microglobulin (σωληναριακή δυσλειτουργία)
- NAG (N Acetyl β Glucosaminidase, νεφροτοξική βλάβη, βλάβη μετά από επέμβαση καρδιάς, χρόνια σπειραματική νόσος, διαβητική νεφροπάθεια, όψιμη απόρριψη μοσχεύματος)
- Osteopontin (νεφροτοξική βλάβη, βλάβη από ισχαιμία / επαναιμάτωση)
- Retinol Binding Protein (μεταφορά βιταμίνης A, νεφρική βλάβη)
- Podocin (οξεία νεφρική βλάβη)
- TIMP - 1 (Tissue Inhibitor of MetallProteinase, νεφρική βλάβη, σπειραματική σκλήρυνση)
- Trefoil factor 3 (προστατευτική δράση σε νεφρική βλάβη)
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, αγγειογένεση – μεσολαβητής φλεγμονής – ανακατασκευή βλάβης)



Εικόνα 1.11.2.4: Υπό μελέτη πρωτεϊνικοί δείκτες ONB και η αντιστοίχισή τους στο νεφρώνα [τροποποιημένη από Uwe Christians *et al* (2011). The role of Proteomics in the study of kidney disease and in the development of diagnostic tools. In C. Edelstein (Eds.), *Biomarkers of kidney disease*. Elsevier Inc, page 111.]

Περισσότερες μελέτες σε όλες τις ηλικιακές ομάδες πρέπει να διεξαχθούν προτού χρησιμοποιηθούν οι παραπάνω δείκτες στην καθημερινή κλινική πράξη. Η σύγκριση των υπό έρευνα βιοδεικτών με τους παραδοσιακούς δείκτες καθώς και μεταξύ τους είναι απαραίτητη ώστε να βρεθούν οι πιο αξιόπιστοι για την έγκαιρη διάγνωση της βλάβης. Επίσης, είναι σημαντικό να καθορίσουμε τις φυσιολογικές τιμές αυτών των δεικτών ξεχωριστά στα τελειόμηνα και στα πρόωρα νεογνά και να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές μεταξύ τους. Πρόωρα νεογνά είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις

CysC στο πλάσμα από τα τελειόμηνα [85]. Σε πρόσφατη μελέτη σε πρόωρα νεογνά με διαφορετική ηλικία κύησης, τα βασικά (baseline) επίπεδα των NGAL, KIM - 1 και CysC στα ούρα μειώνονταν όσο η ηλικία κύησης αυξανόταν [86]. Αντίθετα, τα επίπεδα της NGAL στα ούρα ήταν σταθερά σε διάφορες ηλικίες κύησης σε χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά [87]. Επιπλέον, σύγκριση των επιπέδων της NGAL στα ούρα με βάση το φύλο έδειξε υψηλότερα επίπεδα στα θηλυκά νεογνά [88]. Αφού κανένας από τους υπό μελέτη δείκτες δεν πληροί όλα τα χαρακτηριστικά του ιδανικού βιοδείκτη, ο συνδυασμός των παραπάνω δεικτών θα μπορούσε να αποτελέσει έναν «πίνακα βιοδεικτών» για την έγκαιρη διάγνωση και σταδιοποίηση της ONB στα νεογνά, με υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και προγνωστική αξία.

1.11.3 Μεταβολομική (Metabolomics)

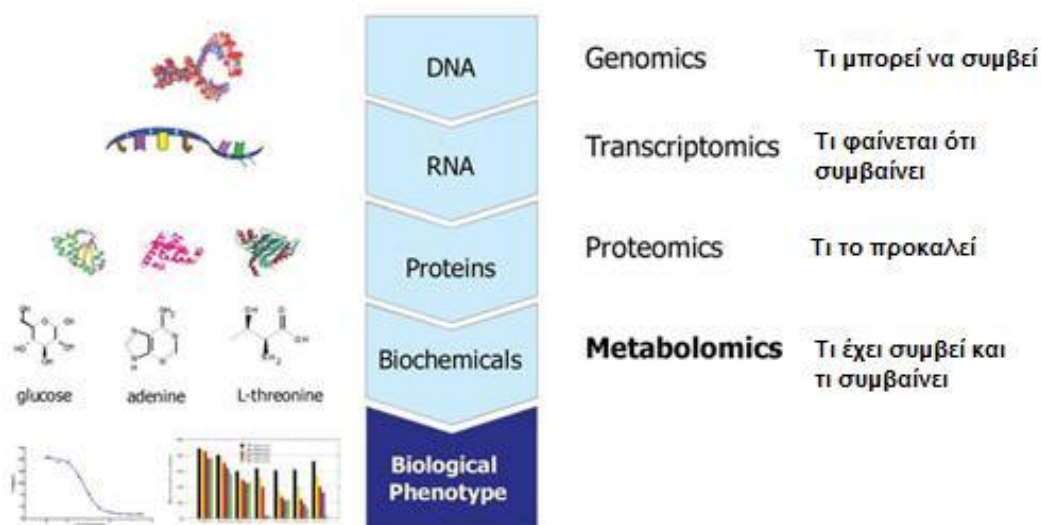
1.11.3.1 Ορισμός

Ο όρος “metabolomics” («μεταβολομική») προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις μεταβολή (όπως και ο μεταβολισμός) και την κατάληξη “omics” που πρωτοχρησιμοποιήθηκε για τη λέξη “genomics”. Αν και η λέξη genomics προέρχεται από τη λέξεις “gene” και “chromosome” έκτοτε η κατάληξη “omics” χρησιμοποιήθηκε για να δηλώσει την αποτύπωση των γονιδίων ενός οργανισμού (genomics), των πρωτεϊνών (proteomics) και των μεταβολιτών (metabolomics). Η Μεταβολομική είναι η πιο πρόσφατη «ομική» επιστήμη που μελετάει το αποτέλεσμα των χημικών αντιδράσεων κατά τον μεταβολισμό, *τους μεταβολίτες*. Δηλαδή, δηλώνει την ποσοτική αποτύπωση των αλλαγών που συμβαίνουν στη συγκέντρωση των μεταβολιτών σε ένα οργανισμό, ως αποτέλεσμα γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών αλλαγών, όπως αυτά προσδιορίζονται σε βιολογικά υγρά και ιστούς (Εικόνα 1.11.3.1.). Ο μεταβολίτης είναι κάθε μόριο που έχει βάρος μικρότερο από 1kDa [89]. Επειδή το σύνολο των μεταβολιτών εξαρτάται εκτός από το γενετικό υπόβαθρο και από το χρόνο μέτρησης σε συνάρτηση με διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους, η αποτύπωση του μεταβολικού προτύπου για κάθε άτομο είναι μοναδική.

Το μεταβολικό προφίλ περιλαμβάνει ενδογενείς και εξωγενείς χημικές οντότητες, όπως νουκλεϊκά οξέα, οργανικά οξέα, πεπτίδια, υδατάνθρακες, αμινοξέα, βιταμίνες, ορμόνες, φάρμακα, μεταβολίτες φαρμάκων και τοξίνες. Μπορεί να επηρεαστεί από το περιβάλλον, την εντερική χλωρίδα, τη διατροφή, το άγχος, τις ορμόνες, το τραύμα και την άσκηση [90]. Για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες τεχνικές όπως η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) που περιλαμβάνει την αέρια χρωματογραφία (Gas Spectrometry, GS – MS) και την υγρή χρωματογραφία (Liquid Spectrometry, LS – MS) [91]. Άλλες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται είναι η Raman και η υπέρυθρη φασματοσκοπία [92]. Φαίνεται πως ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών είναι καλύτερος [93]. Με αυτές τις μεθόδους μπορούν να ανακαλυφθούν μονοπάτια σε άγνωστους μέχρι τώρα παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς [94, 95, 96].

Το πρωτεομικό και μεταβολομικό προφίλ των βιολογικών υγρών και ιστών μπορεί να μας παρέχει πληροφορίες για αλλαγές που συμβαίνουν σε πρωτεΐνες και μεταβολίτες κατά την απόκριση του οργανισμού σε ασθένειες και φαρμακευτικές θεραπείες δίνοντας τη δυνατότητα για εξατομίκευση της ιατρικής και καθορισμό της προδιάθεσης, της έγκαιρης διάγνωσης και παρέμβασης και της πρόγνωσης. Επίσης, μπορούν να επιταχύνουν την ανακάλυψη νέων φαρμάκων στη φαρμακευτική βιομηχανία.

The "omics" cascade



Εικόνα 1.11.3.1: Ο καταρράκτης των «ομικών» (τροποποιημένο από <http://www.metabolomics.se>)

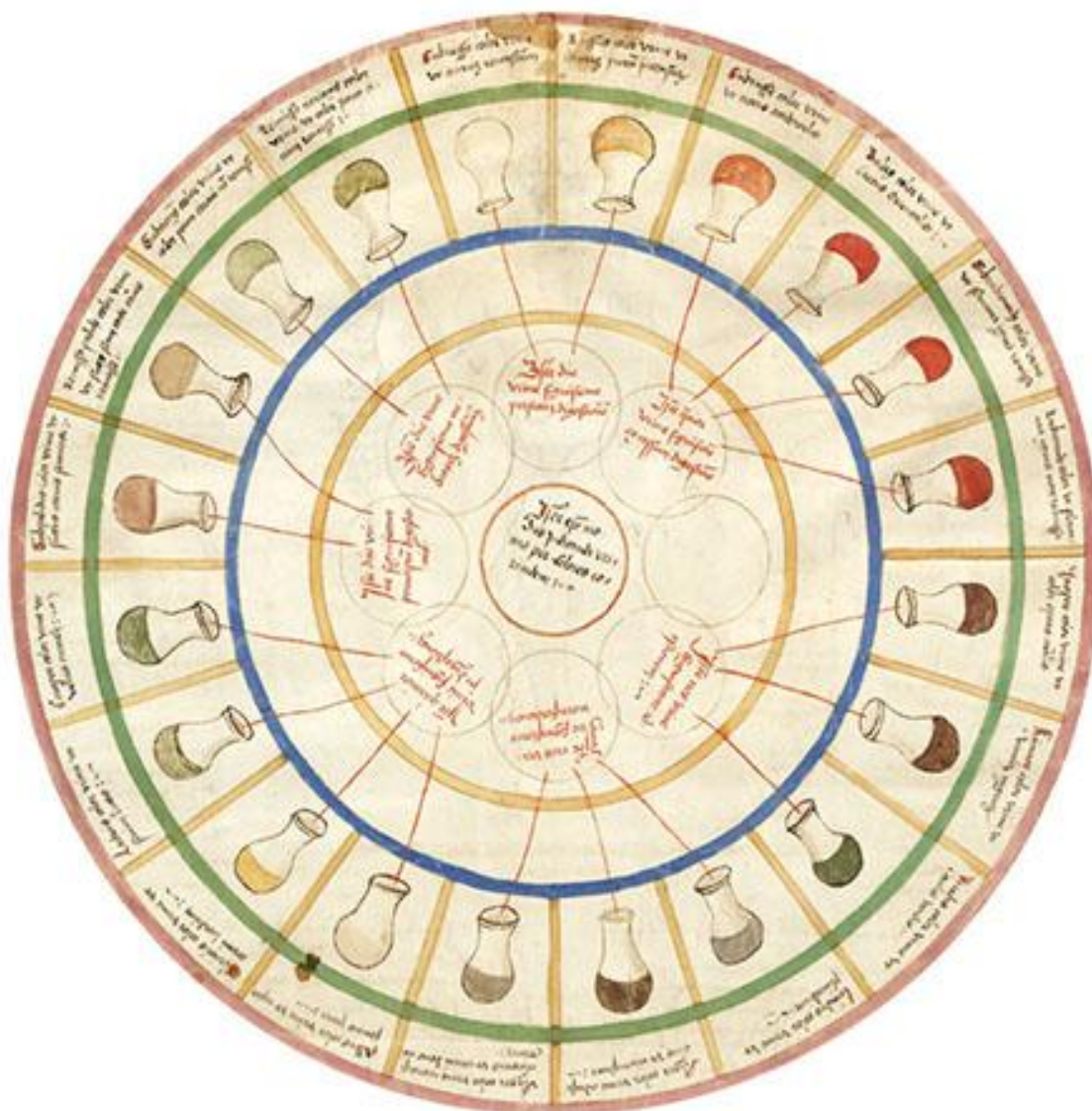
1.11.3.2 Ιστορική αναδρομή

Η ιδέα πως τα βιολογικά υγρά αντανakλούν την υγεία ενός ατόμου υπήρχε από τα αρχαία χρόνια. Στην αρχαία Ελλάδα είχε αναγνωριστεί το γεγονός ότι αλλαγές στους ιστούς και στα βιολογικά υγρά συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις. Οι αρχαίοι κινέζοι ιατροί χρησιμοποιούσαν μυρμήγκια για να αξιολογήσουν την περιεκτικότητα των ούρων σε γλυκόζη και να θέσουν τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη. Κατά το μεσαίωνα αναπτύχθηκαν τα «διαγράμματα ούρων» που συνδύαζαν το χρώμα, τη γεύση και την οσμή των ούρων με διάφορες κλινικές καταστάσεις (Εικόνα 1.11.3.2) [97].

Οι εξελίξεις στη χημεία στα τέλη του 18^{ου} αιώνα έθεσαν τις βάσεις για τα πρώτα διαγνωστικά εργαλεία στο τομέα της νεφρολογίας. Το 1795 περιγράφηκε η δοκιμασία του νιτρικού οξέος για πρωτεϊνουρία και λίγες δεκαετίες αργότερα περισσότερα από 100 οργανικά και ανόργανα συστατικά των ούρων ανακαλύφθηκαν. Το 1905 ο Thomson δημιούργησε το πρώτο φασματόμετρο μάζας. Στα τέλη της δεκαετίας του 1940, ο Williams

χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία για να προτείνει πως χαρακτηριστικά μεταβολικά μοτίβα των ούρων και του σάλιου συνδέονταν με διάφορες παθήσεις, όπως η σχιζοφρένεια. Οι τεχνολογικές εξελίξεις μεταξύ 1960-1970 οδήγησαν όχι μόνο στην ποιοτική αλλά και στην ποσοτική μέτρηση των μεταβολικών προφίλ [98]. Ο όρος «μεταβολικό προφίλ» εισήχθη από τους Horning *et al* [99] το 1971, αφού απέδειξαν ότι η αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC - MS) μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ενώσεων που υπήρχαν στα ούρα και σε εκχυλίσματα ιστών. Τότε διαμορφώθηκαν τα πρώτα εξατομικευμένα μεταβολικά προφίλ. Παράλληλα, η NMR φασματομετρία γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη μετά την ανακάλυψή της το 1940. Το 1984 ο Nicholson έδειξε πως το ^1H NMR (proton NMR) προφίλ συσχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως σακχαρώδη διαβήτη και νεφρική δυσλειτουργία από κάδμιο [100]. Το 1998 επινοήθηκε ο όρος “metabolome” που αφορούσε στο σύνολο των ενώσεων με χαμηλό μοριακό βάρος [101].

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε από το Human Metabolome Database (HMDB version 3.0) μια λίστα με 40.000 μεταβολίτες και τις κατηγορίες αυτών [102]. Μερικές από τις κατηγορίες είναι: φωσφολιπίδια, γλυκερολιπίδια, στεροειδή, αμινοξέα, υδατάνθρακες, γλυκολιπίδια, λιπαρά οξέα, παράγωγα συνενζύμου A, νουκλεοτίδια, αλκοόλες, οργανικά οξέα, πεπτίδια. Τα τελευταία χρόνια επικρατούσε διχογνωμία σχετικά με τη χρήση των όρων “metabonomics” και “metabolomics”. Σήμερα, αυτοί οι όροι θεωρούνται συνώνυμοι. Τα metabolomics έχουν χαρακτηριστεί και ως “Biochemistry’s new look” («νέα εμφάνιση της βιοχημείας»).



Εικόνα 1.11.3.2: Ο τροχός ούρων (urine wheel) που δημοσιεύτηκε το 1506 από τον Ulrich Pinder στο βιβλίο του με τίτλο “Eriphanie Medicorum”. Ο τροχός περιγράφει τα πιθανά χρώματα, μυρωδιές και γεύσεις των ούρων και τα συνδυάζει για τη διάγνωση νοσημάτων.

1.11.3.3 Πλεονεκτήματα

Τα metabolomics υπερέχουν σε σχέση με τα genomics και proteomics. Το mRNA και οι πρωτεΐνες δεν σχετίζονται με τις αλλαγές που συμβαίνουν στο μεταβολισμό σε κυτταρικό επίπεδο. Σε σύγκριση με τις μεγάλοι μεγέθους πρωτεΐνες και το mRNA, οι μεταβολίτες μπορούν να διανεμηθούν σε όλο το σώμα αφού έχουν μικρό μέγεθος. Επίσης, η αλλαγή στο μεταβολομικό προφίλ

ενός οργανισμού συμβαίνει άμεσα μετά από κάποιο ερέθισμα, ενώ το mRNA και οι πρωτεΐνες μπορεί να χρειαστούν ώρες, ημέρες ή και εβδομάδες [90]. Άλλα χαρακτηριστικά που κάνουν τα metabolomics να ξεχωρίζουν είναι ότι αυτά είναι:

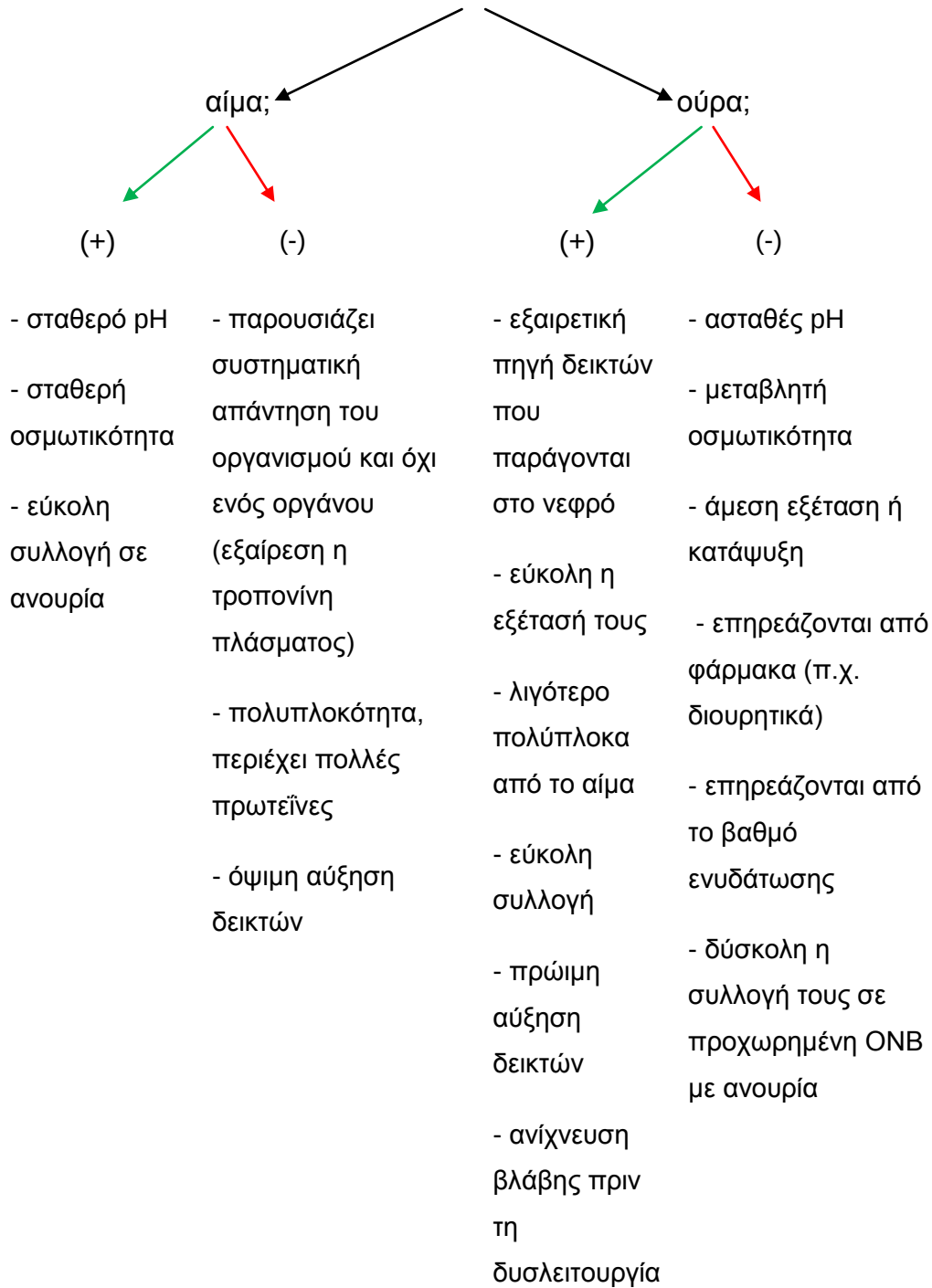
- πιο διαγνωστικά (γρήγορη αλλαγή του μεταβολομικού προφίλ και μεγαλύτερες διακυμάνσεις)
- πιο «ολιστικά» (μελετούν όλους τους μεταβολίτες σε ένα μεταβολικό σύστημα και αντνακλούν τις επιδράσεις του περιβάλλοντος)
- πιο εύκολα (οι μεταβολίτες είναι λιγότεροι από τις πρωτεΐνες και τις μεταγραφές)
- πιο οικονομικά (όταν έχει εξασφαλιστεί το κόστος του εξοπλισμού) [103].

1.11.3.4 Πηγές μεταβολιτών: αίμα ή ούρα:

Το είδος της πηγής μεταβολιτών που χρησιμοποιείται κάθε φορά εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης. Τα ούρα, το πλάσμα και ο ορός του αίματος είναι οι πιο συχνές πηγές για μεταβολομικές μελέτες. Άλλες πηγές είναι το ΕΝΥ, το σάλιο, το γαστρικό/παγκρεατικό υγρό, το αρθρικό υγρό, το μητρικό γάλα, το σπερματικό υγρό και οι ιστοί [104]. Ο αριθμός και το είδος των μεταβολιτών διαφέρει μεταξύ των πηγών [105].

Το αίμα και τα ούρα παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα στη χρήση τους ως πηγές εύρεσης βιοδεικτών στα νεογνά που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά την ερευνητική διαδικασία [106, 107]. Στο παρακάτω διάγραμμα αναφέρονται τα θετικά και αρνητικά κάθε πηγής:

Πηγή εύρεσης βιοδεικτών

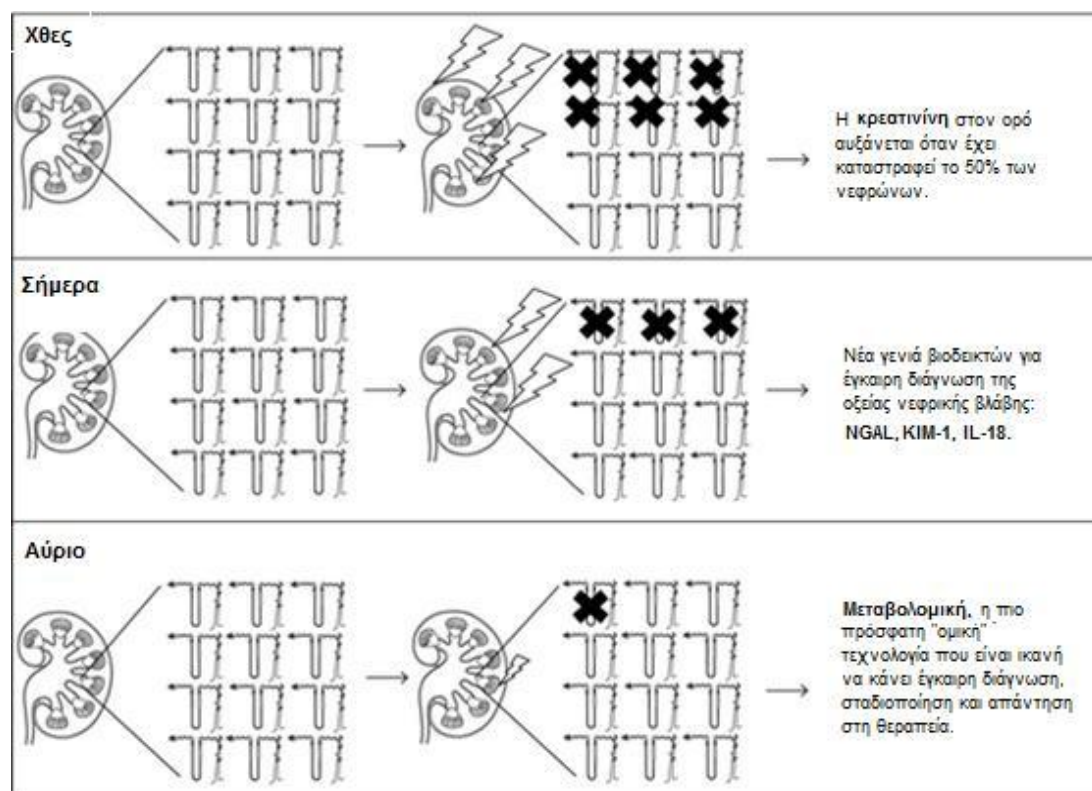


1.11.3.5 Ρόλος των metabolomics στην οξεία νεφρική βλάβη

Η χρησιμότητα των metabolomics στην οξεία νεφρική βλάβη και γενικότερα στη νεογνολογία αφορά στα παρακάτω πεδία:

- τη διερεύνηση άγνωστων μοριακών μηχανισμών
 - την ανακάλυψη μοριακών δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δημιουργία νέων φαρμάκων
 - την εύρεση νέων διαγνωστικών εργαλείων
- έτσι ώστε να αποφευχθεί η νεφρική βλάβη και να μειωθεί η θνησιμότητα λόγω αυτής καθώς και η εμφάνιση απώτερων επιπλοκών.

Συγκεκριμένα, η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών οξείας νεφρικής βλάβης στα νεογνά θα συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση και ταξινόμηση, στη διευκρίνιση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού, στο καθορισμό της αιτίας, στη τοπογραφία της βλάβης, στην πρόληψη και στην πρόγνωση μειώνοντας το βαθμό της νεφρικής βλάβης (Εικόνα 1.11.3.5) και προσφέροντας εξατομικευμένη και έγκαιρη θεραπεία [108].



Εικόνα 1.11.3.5: Μεταβολομική, μία πολλά υποσχόμενη "ομική" τεχνολογία (μεταφρασμένη από Mussap et al [108]).

1.11.3.6 Εφαρμογές στη νεογνολογία

– Προγεννητικά

Μεταβολομική μελέτη του αμνιακού υγρού έδειξε ότι ορισμένοι μεταβολίτες σχετίστηκαν με νεογνικές δυσμορφίες, εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη, πρόωρο τοκετό και πρόωρη ρήξη εμβρυϊκών υμενών [109].

– Κατά το τοκετό

Μελέτες που να μελετούν την επίδραση του είδους του τοκετού (φυσιολογικός ή καισαρική τομή) στο μεταβολικό προφίλ νεογνών και έκβαση αυτών δεν έχουν γίνει. Μόνο μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι ο φυσιολογικός τοκετός προωθεί την ωρίμανση του ήπατος και μειώνει την εμφάνιση λιπώδους διήθησης αυτού [110].

– Φυσιολογικά νεογνά

Σε μεταβολομική μελέτη βρέθηκε διαφορά στο μεταβολικό προφίλ του αίματος ανάμεσα σε χαμηλού και υψηλού βάρους γέννησης νεογνών, καθώς και συσχέτιση της IUGR (ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης) με διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης που πιθανώς μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη κατά την ενήλικη ζωή [111]. Διαφορές παρατηρήθηκαν και στο μεταβολικό προφίλ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών, ενισχύοντας την άποψη ότι υπάρχουν διαφορές στην παθοφυσιολογία μεταξύ των νεογνών με διαφορετική ηλικία κύησης [112].

– Περιγεννητική ασφυξία

Υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εφαρμογή των metabolomics στην περιγεννητική ασφυξία για την εύρεση βιοδεικτών που θα ανιχνεύουν την υποξία και θα επιτρέπουν την παρακολούθηση και εκτίμηση των στρατηγικών ανάνηψης [113]. Όσον αφορά στην ανίχνευση της υποξίας, το μεταβολικό προφίλ του αίματος και των επινεφριδίων νεογνών ποντικών είχε υποστεί ειδικές αλλαγές από την υποξία [114].

Αρκετοί προβληματισμοί υπάρχουν για την καταλληλότερη συγκέντρωση οξυγόνου κατά την ανάνηψη νεογνών (αναλύονται στο κεφάλαιο 3). Τα metabolomics φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την έρευνα σε αυτόν το τομέα. Σε πειραματικό μοντέλο υποξίας – επανοξυγόνωσης νεογνών χοιριδίων βρέθηκε ότι ορισμένοι μεταβολίτες

σχετίστηκαν με τη διάρκεια της υποξίας και ότι η επανοξυγόνωση με 100% οξυγόνο καθυστέρησε το μεταβολισμό της κυτταρικής ανάπτυξης [113]. Σε πρόσφατη πειραματική μελέτη υποξίας – επανοξυγόνωσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (18%, 21%, 40%, 100%), τα νεογνά χοιρίδια που δεν ανένησαν είχαν διαφορετικό μεταβολικό προφίλ στα ούρα προ της υποξίας από τα επιζήσαντα [94]. Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι διαφορετικά μεταβολικά προφίλ σχετίζονται με διαφορετική απάντηση στην υποξία και στην οξυγονοθεραπεία. Στην ίδια μελέτη βρέθηκαν διαφορές στο μεταβολικό προφίλ ανάμεσα στις ομάδες που επανοξυγονώθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η αδενοσίνη, η ινοσίνη και η υποξανθίνη αυξάνονται κατά την υποξία και οδηγούν στην παραγωγή μαλονδιαλδεϋδης (MDA). Πιθανώς, ο λόγος MDA / κρεατινίνη στα ούρα μπορεί να προβλέψει το θάνατο κατά την περιγεννητική ασφυξία [115]. Σε άλλη μελέτη, βρέθηκε ότι υψηλά επίπεδα αδενοσίνης, υποξανθίνης και ουρικού οξέος στα ούρα προ της ανάνηψης ήταν προγνωστικοί δείκτες της έκβασης [116, 117]. Επιπλέον, σε κλινικές μελέτες φάνηκε ότι η αύξηση του ουρικού οξέος, της MDA και της πρωτεΐνης στα ούρα σχετίζεται με το Apgar score [117, 118]. Πειραματική μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι η υποξία προκάλεσε αύξηση μερικών μεταβολιτών στα ούρα, η οποία διορθώθηκε μετά τη χορήγηση βιταμίνης B₁ και B₂ [119]. Παρόμοια αποτελέσματα σε αντίστοιχες μελέτες μπορεί να οδηγήσουν στην αύξηση της διατροφικής πρόσληψης αυτών των βιταμινών, ως νέα πρακτική κατά την υποξία.

– *Νεφροπάθειες και νεφροτοξικότητα*

Το μεταβολικό προφίλ των ούρων διέκρινε τους ασθενείς με υγιή νεφρό και αυτούς με κάποια νεφροπάθεια (π.χ. ONB, κυστεουρητηρική παλινδρόμηση, ουρολοίμωξη, νεφρική δυσπλασία) [120]. Στα νεογνά συχνά χορηγούνται φάρμακα που μερικά από αυτά είναι ιδιαίτερα νεφροτοξικά (όπως αναφέρθηκε στα αίτια της ONB). Πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρει το ρόλο των metabolomics στη μελέτη της νεφροτοξικής βλάβης από φάρμακα [121]. Κάποιοι μεταβολίτες στα ούρα έχουν συσχετιστεί με βλάβη σε συγκεκριμένα τμήματα του νεφρού (αθροιστικά σωληνάκια, εσπειραμένα σωληνάκια, νεφρικές θηλές, φλοιός) [122] και συνδυασμοί τους με συγκεκριμένες δυσλειτουργίες (σπειραματική διήθηση, επαναρρόφηση, έκκριση, μεταβολισμός σωληναρίων, οξειδωτικό stress) [123].

– Άλλες εφαρμογές

Πρόσφατη μελέτη καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το μεταβολικό προφίλ των ούρων μπορεί να αποτελέσει ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο για τη συγγενή λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό [124]. Όσον αφορά στη διατροφή, νέα μελέτη έδειξε διαφορές ανάμεσα στο μητρικό γάλα προ του τοκετού και σε τεχνητό γάλα για πρόωρα [125].

2.11.7 Περιορισμοί

Όπως η πρωτεομική και η γενομική, έτσι και η μεταβολομική έχει κάποιες αδυναμίες στην εφαρμογή της [126]:

- Λόγω της πολυπλοκότητας των αναλύσεων, οι μελέτες γίνονται σε μικρά δείγματα στα οποία μετρώνται χιλιάδες παράμετροι.
- Το περιβάλλον, η διατροφή και η άσκηση μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολικό προφίλ.
- Η ποιότητα των δεδομένων δεν ελέγχεται εύκολα. Εξαρτάται από το εργαστήριο που κάνει τις αναλύσεις και το χρόνο που μεσολάβησε έως την ανάλυση των δειγμάτων.
- Η στατιστική κατανομή των δεδομένων είναι άγνωστη. Πολλές μέθοδοι χρησιμοποιούν υποθετικά την κανονική κατανομή, αλλά τα βιολογικά δεδομένα συχνά είναι ασύμμετρα.
- Η χρήση τους απαιτεί καλή γνώση της παθοφυσιολογίας.
- Υπάρχει πρόβλημα στο να μεταφέρουμε τα αποτελέσματα πειραματικών μελετών στους ανθρώπους και αντίστροφα. Βέβαια αυτό είναι λιγότερο πρόβλημα για τους μεταβολίτες παρά για τις πρωτεΐνες και τα γονίδια. Όμως, οι μεταβολίτες είναι πιο ανεξάρτητοι από τους ιστούς και τα είδη [127].
- Σημαντικό ρόλο παίζει η χρονική στιγμή λήψης του δείγματος γιατί το βιοχημικό προφίλ μεταβάλλεται καθώς προχωρά η βλάβη [128].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΑΝΑΝΗΨΗ ΝΕΟΓΝΟΥ

2.1 Εισαγωγή

Τα πρώτα λεπτά της ζωής ενός νεογνού είναι πολύτιμα για το ίδιο και τους γονείς του καθώς και καθοριστικά για τη διάρκεια και ποιότητα της μετέπειτα ζωής του. Το νεογνό καλείται να μεταβεί από ένα ζεστό και φιλικό περιβάλλον σε ένα ασταθές, ψυχρό και με νέα ερεθίσματα περιβάλλον στο οποίο πρέπει να προσαρμοστεί σε σύντομο χρονικό διάστημα. Για αυτή την προσαρμογή έχει προνοήσει η φύση αλλά αρκετές φορές χρειάζεται ιατρική παρέμβαση ώστε να είναι επιτυχής. Ένα σημαντικό ποσοστό νεογνών της τάξης του 10% - 20% εκτιμάται ότι θα χρειαστεί κάποια παρέμβαση μετά τη γέννηση και το 1% θα χρειαστεί εξειδικευμένη ανάνηψη [129]. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι ανάνηψης οι περισσότερες από τις οποίες αποδείχτηκαν τόσο ανασφαλείς όσο και επιβλαβείς. Σήμερα η ανάνηψη του νεογνού στις περισσότερες χώρες ακολουθεί τις οδηγίες της ILCOR (International Liaison Committee on Resuscitation) οι οποίες ανανεώνονται κάθε πέντε χρόνια.

2.2 Ιστορική αναδρομή

Από την αρχαιότητα πολλές διαφορετικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναζωογόνηση των νεογνών. Ο αρχαίος κινέζος αυτοκράτορας Χουάνγκ-Τι (2698 - 2599 π.Χ.), αναγνώρισε τον θάνατο νεογνών από αναπνευστική ανακοπή, καθώς και ότι αυτό ήταν πιο συχνό φαινόμενο στα πρόωρα νεογνά. Επίσης, η Παλαιά Διαθήκη περιέχει αναφορές σε προσπάθειες ανάνηψης. Στο Ταλμούντ (200 π.Χ - 400 μ.Χ) περιγράφονται προσπάθειες τεχνητής αναπνοής σε νεογνά και προσπάθεια αναζωογόνησης ενός νεογέννητου αρνιού με την εισαγωγή ενός καλαμιού στην τραχεία του . Ο Ιπποκράτης (460 - 380 π.Χ.) περιέγραψε ενδοτραχειακή διασωλήνωση ανθρώπων για την υποστήριξη της αναπνοής και ο Γαληνός (129 - 199 μ.Χ.), περιέγραψε την ανύψωση του θώρακος με την είσοδο αέρα στους πνεύμονες, όταν αέριζε τους πνεύμονες νεκρών ζώων με φουσητήρες στην τραχεία [130].

Ο Μουλσουμάνος φιλόσοφος και ιατρός Avicenna (980 - 1037 μ.Χ.) περιέγραψε τη διασωλήνωση της τραχείας με τη χρήση κάνουλας από χρυσό ή ασήμι γύρω στο 1000 μ.Χ. Το 1472, ο Παύλος Βαγελλάρδος δημοσίευσε το πρώτο βιβλίο πάνω στις παιδικές ασθένειες και περιέγραψε την ανάνηψη νεογνού με εμφύσηση αέρα στόμα με στόμα, ενώ το 1667 ο Άγγλος Robert Hook διατήρησε στη ζωή ένα σκύλο για περισσότερο από μία ώρα, δίνοντας αερισμό μέσω φουσητήρων στην τραχεία [130].

Το 1752 ο μαιευτήρας William Smellie περιέγραψε την αντιμετώπιση του νεογνού που χρειάζεται ανάνηψη ως εξής: τρίψιμο κεφαλής, κροτάφων και στήθους με οينوπνευματώδη και εφαρμογή σκόρδου, κρεμμυδιού ή μουστάρδας στο στόμα και τη μύτη. Επίσης, περιέγραψε την άμεση ενδοτραχειακή διασωλήνωση για την αναζωογόνηση νεογνών, ενώ το 1754 ο Benjamin Pugh συνέκρινε τις εμπειρίες του περί ανάνηψης νεογνών με διασωλήνωση ή με εμφυσήσεις στόμα με στόμα [130, 131].

Η πρώτη εταιρεία αναζωογόνησης ιδρύθηκε το 1774 στο Λονδίνο και ονομάστηκε "Institution for Affording Immediate Relief to Persons Apparently dead from Drowning" (η οποία μετά ονομάστηκε "Society for People Apparently Drowned" και μετέπειτα, το 1787, "Royal Human Society"). Ίδρυση παρόμοιων οργανισμών ακολούθησε και στην Αμερική, οι οποίοι μετεξελίχθηκαν σε οργανισμούς όπως ο Αμερικανικός Ερυθρός Σταυρός και η Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας (American Heart Association) [130].

Από το 1774 η Royal Humane Society στο Λονδίνο υποστήριξε τη μέθοδο με εμφύσηση αέρα στόμα με στόμα, αλλά από το 1782 υποστήριξε τη μέθοδο διασωλήνωσης, αφού ο William Hunter είχε σχεδιάσει ειδικά σωληνάκια για ενδοτραχειακή διασωλήνωση. Το 1798 ο Scheel χρησιμοποίησε για πρώτη φορά την ενδοτραχειακή διασωλήνωση στην ανάνηψη των νεογνών. Ο πρώτος χειροκίνητος αναπνευστήρας με βαλβίδες πίεσεων κατασκευάστηκε από τον Hunter το 1755 και ακολούθησαν αυτοί των Chaussier και Gorcy. Αυτοί οι αναπνευστήρες έθεσαν τη βάση για το τεχνητό αερισμό στα τέλη του 18^{ου} αιώνα. Ωστόσο, η αποκάλυψη του Leroy d'Etiolles το 1828 περί συσχετισμού εφαρμογής αερισμού και πνευμοθώρακα σε νεογνά, οδήγησε την Paris Academy of Science να στραφεί κατά του αερισμού θετικής πίεσης, για περισσότερο από 100 χρόνια [130, 131, 132].

Ο Alex F Robertson χωρίζει τον 20^ο αιώνα με βάση την ιστορία της νεογνολογίας ως εξής: «Hands-off» περίοδος (1920 - 1950) [133], «Heroic» περίοδος (1950 - 1970) [134], «Experienced» περίοδος (1970 - 2000) [135]. Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και στις αρχές του 20^{ου} αιώνα τα νεογνά με ασφυξία ταξινομούνταν σε δύο κατηγορίες: «μπλε» ασφυξία (asphyxia livida) και «ωχρή» ασφυξία (asphyxia pallida). Τα νεογνά με «μπλε» ασφυξία ήταν τα κυανά που είχαν κίνηση, καλή καρδιακή συχνότητα και ίσως gasping, ενώ αυτά με «ωχρή» ασφυξία ήταν χλωμά, χωρίς κίνηση, με χαμηλή καρδιακή συχνότητα και καμία αναπνευστική προσπάθεια. Το λαρυγγοσκόπιο του Fell, η λαβίδα διασωλήνωσης του Magill και φιλικά στους ιστούς υλικά ήταν σημαντικές ανακαλύψεις του 20^{ου} αιώνα που συνέβαλαν στη βελτίωση της αναζωογόνησης των νεογνών. Κατά την περίοδο 1850 - 1950 η ανάνηψη των νεογνών περιελάμβανε διάφορες τεχνικές, οι οποίες αργότερα αποδείχτηκαν ανασφαλείς και επιβλαβείς. Μερικές από αυτές ήταν η εναλλάξ εμβύθιση σε κρύο και ζεστό νερό που χρησιμοποιήθηκε κυρίως στη Σκανδιναβία, πλύση ή εντριβή του νεογνού με μουστάρδα ή κονιάκ που χρησιμοποιήθηκε στη Βρετανία, διαστολή του πρωκτού, εμφύσηση αέρα ή καπνού στο ορθό, χτυπήματα στους γλουτούς, έντονο τρίψιμο, απτικά ερεθίσματα σε θώρακα, τράχηλο και στόμα, ηλεκτροπληξία, αιώρηση του νεογνού πάνω - κάτω (μέθοδος Schultze - Εικόνα 2.2.1) [136], δίπλωμα και ξεδίπλωμα του νεογνού (μέθοδος Dew - Εικόνα 2.2.2) [137], ανύψωση και επαναφορά άνω άκρων ενώ βοηθός συμπιέζει το θώρακα (μέθοδος Silvester), θωρακικές συμπιέσεις (μέθοδος Prochownich), έλξη της γλώσσας με ρυθμό 10 - 12 φορές/λεπτό (μέθοδος Laborde) [130].

Από τις πρώτες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα άρχισε το ενδιαφέρον για τη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος με επιρροή από την έρευνα στο χώρο της αεροπορίας, τις επιδράσεις της δηλητηρίασης με αέρια κατά τη διάρκεια του Α' Παγκόσμιου Πολέμου και την επίδραση του υψηλού υψομέτρου στην ορειβασία. Ο Φιλανδός παιδίατρος Arvo Ylppö έκανε έρευνα στη φυσιολογία και παθολογία των νεογνών και ιδιαίτερα των πρόωρων στο Βερολίνο μεταξύ 1912 και 1920. Η δουλειά του επηρέασε σημαντικούς επιστήμονες όπως τον Yandell Henderson, Nicholson J Eastman και Sir Joseph Barcroft. Το 1928 ο Henderson δημοσίευσε ένα άρθρο στο JAMA με τίτλο «The prevention and treatment of asphyxia in the new-born» στο οποίο

αναφέρει: «Τα πρώτα 15 λεπτά μετά τη γέννηση είναι η πιο επικίνδυνη περίοδος της ζωής. Η θνησιμότητα είναι τόσο μεγάλη όσο σε οποιοδήποτε επόμενο μήνα» [138].

Στη διάρκεια του μεσοπολέμου αναπτύχθηκαν τρεις τεχνικές αερισμού κατά την ανάνηψη του νεογνού με επιρροή από την ανάνηψη των ενηλίκων, οι οποίες έδειχναν να αποτελούν επιστημονική και μοντέρνα προσέγγιση στη νεογνική ανάνηψη. Αυτές οι τεχνικές ήταν η μέθοδος αερισμού του Henderson, η λαρυγγοσκοπήση με αερισμό θετικής πίεσης και ο αναπνευστήρας αρνητικής πίεσης του Drinker. Ο Henderson πρότεινε τον αερισμό με μίγμα διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου σε χαμηλές πιέσεις μέσω μάσκας, θεωρώντας το διοξείδιο του άνθρακα κύριο ερέθισμα για τη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Αργότερα ο Flagg, επηρεασμένος από την επιστήμη της αναισθησιολογίας, υποστήριξε τον αερισμό του Henderson αλλά αντί της μάσκας χρησιμοποίησε την άμεση επισκόπηση του λάρυγγα με τη χρήση λαρυγγοσκοπίου. Υποστήριξε πως η διασωλήνωση είναι η μόνη τεχνική που εξασφαλίζει ανοιχτό αεραγωγό. Επίσης, διέκρινε τρεις κατηγορίες νεογνών: πιεσμένα (depressed), σπαστικά (spastic), άτονα (flaccid). Σύμφωνα με τον Flagg, τα άτονα νεογνά χρειάζονταν ανάνηψη και η διάκρισή τους από τα υπόλοιπα γινόταν από την απώλεια του αντανακλαστικού του εμετού κατά τη διασωλήνωση [139]. Η τρίτη τεχνική χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τους Drinker και McKhann σε ασθενείς με πολιομυελίτιδα που χρειάζονταν παρατεταμένη τεχνητή υποστήριξη της αναπνοής [140]. Το 1930 οι μαιευτήρες Murphy και Sessums ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν τον αναπνευστήρα αρνητικής πίεσης του Drinker στην ανάνηψη των νεογνών [141].

Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου δεν υπήρξε εξέλιξη στο τομέα της ανάνηψης των νεογνών. Μεταξύ 1950 και 1960 αναπτύχθηκαν τρεις τεχνικές για τις οποίες υπήρχε μεγάλη διαφωνία στην επιστημονική κοινότητα. Αυτές ήταν ο θάλαμος Bloxson Air Lock (Εικόνα 2.2.3), χορήγηση υπερβαρικού οξυγόνου (Εικόνα 2.2.4) και ενδογαστρική χορήγηση οξυγόνου [142, 143]. Το 1953 η αναισθησιολόγος, από το πανεπιστήμιο Columbia, Virginia Apgar δημοσίευσε τη μέθοδο αξιολόγησης νεογνών μετά τη γέννα (το γνωστό και χρησιμοποιούμενο μέχρι σήμερα, Apgar score) (Εικόνα 2.2.5) [144]. Την ίδια χρονιά, ο Noel Jackson δημοσίευσε στο Lancet τη δική του

μέθοδο αερισμού νεογνών (Εικόνα 2.2.6) στην προσπάθεια να κάνει εφικτή την εφαρμογή αερισμού σε ένα νεογνό ακόμα και όταν δεν υπάρχει ο κατάλληλος εξοπλισμός [145].

Το 1966 στις ΗΠΑ, η Εθνική Ακαδημία Επιστημών πρότεινε κατευθυντήριες οδηγίες για την ανάνηψη ενηλίκων. Το 1985 η Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας (American Heart Association) και η Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής (American Academy of paediatrics), ξεκίνησαν το Πρόγραμμα Ανάνηψης Νεογνών (Neonatal Resuscitation Program, NRP). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, το 1980, ο Edmund Hey δημοσίευσε ένα εγχειρίδιο για μαίες, γιατρούς και όσους εμπλέκονται στην ανάνηψη νεογνού. Μετέπειτα εκδόσεις από το Βόρειο Δίκτυο Νεογνολογικών Κέντρων στην Αγγλία (Northern Neonatal Network), αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία του Αγγλικού Συμβουλίου Αναζωογόνησης (UK Resuscitation Council) [130]. Η Διεθνής Επιτροπή Αναζωογόνησης (International Liaison Committee on Resuscitation, ILCOR), σχηματίστηκε το 1992 με τη συνεργασία επιστημονικών επιτροπών και εταιρειών από Ευρώπη, Αφρική, Ασία, Βόρεια και Νότια Αμερική, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία. Σκοπός της είναι η δημοσίευση και εφαρμογή οικουμενικά αποδεκτών κατευθυντήριων οδηγιών στην ανάνηψη. Όσον αφορά στην ανάνηψη νεογνού, οι πρώτες κατευθυντήριες οδηγίες δημοσιεύτηκαν το 1999 και έκτοτε ανανεώνονται κάθε 5 χρόνια με βάση τα καινούρια δεδομένα. Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες εκδόθηκαν από την ILCOR το 2010.



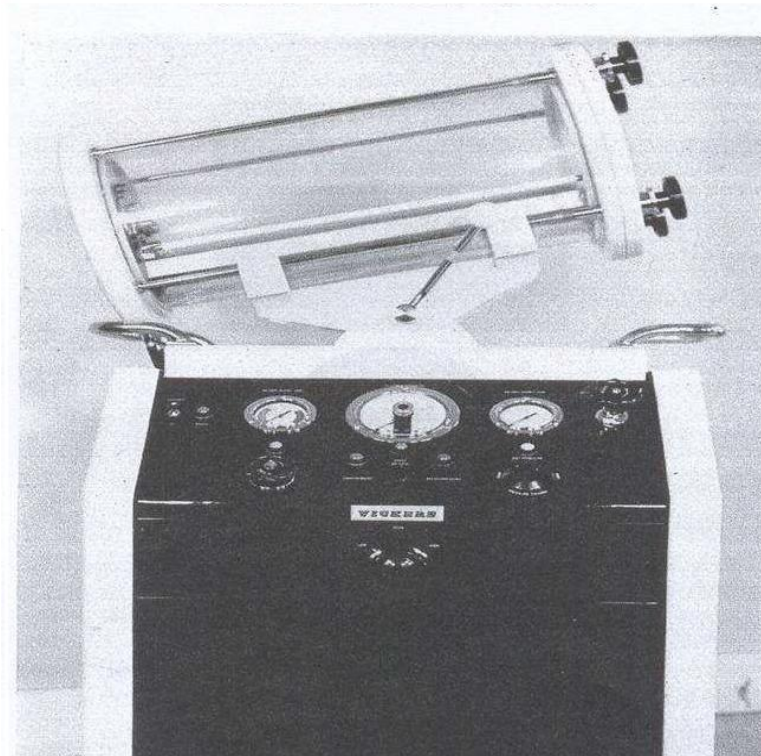
Εικόνα 2.2.1: Μέθοδος Schultze: Η συμπίεση και έκταση του θώρακα προκαλεί παθητική εκπνοή και εισπνοή [136].



Εικόνα 2.2.2: Μέθοδος Dew: Το νεογνό κρατιέται κατά μήκος της αγκαλιάς και εναλλάξ το διπλώνει και το ξεδιπλώνει [137].



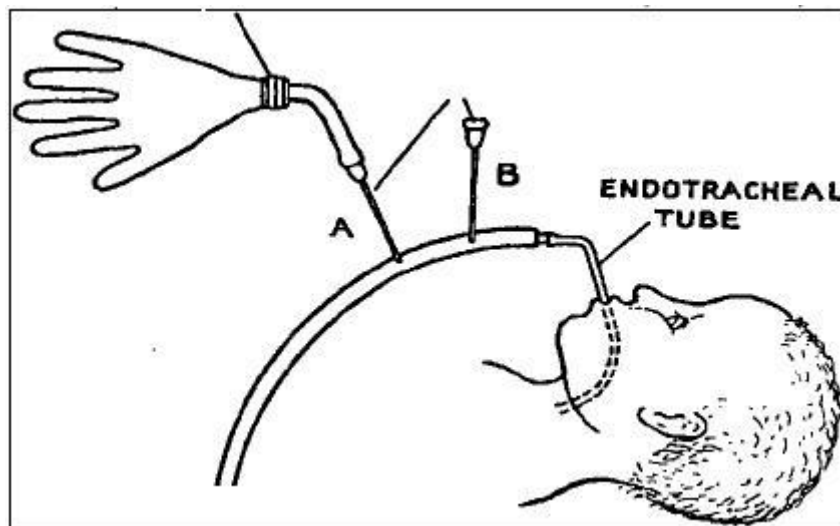
Εικόνα 2.2.3: Θάλαμος Bloxson Air Lock χορηγείται 60% οξυγόνο με κυκλικές αυξήσεις στην πίεση ώστε να αναπαράγει τις συσπάσεις της μήτρας. Ο παιδίατρος Allan Bloxson παρατήρησε πως τα παιδιά που γεννιούνται με καισαρική τομή χρειάζονται ανάνηψη σε αντίθεση με τα παιδιά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό. Τόνισε τη σημασία των συσπάσεων της μήτρας για την προσαρμογή του νεογνού στο εξωμήτριο περιβάλλον [140].



Εικόνα 2.2.4: Θάλαμος υπερβαρικού οξυγόνου για νεογνά. Το 1963 ο James Holmes Hutchison, από το πανεπιστήμιο της Γλασκώβης, προτείνει τη χορήγηση υπερβαρικού οξυγόνου στα ασφυκτικά νεογνά με σκοπό τη μείωση του βαροτραύματος των πνευμόνων από τον αερισμό με θετικές πιέσεις [141].



Εικόνα 2.2.5: Η Virginia Apgar, κατά τη διαδικασία αξιολόγησης νεογνού (από Wikipedia).



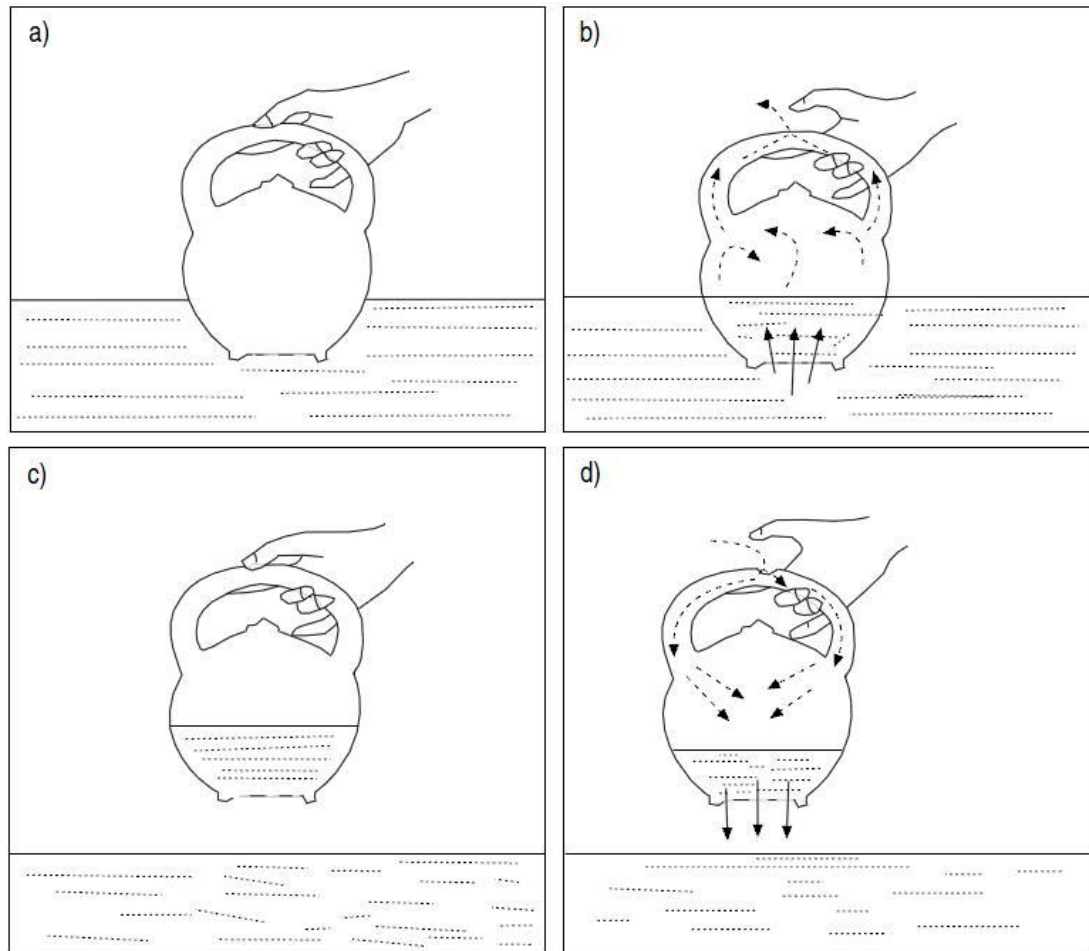
Εικόνα 2.2.6: Μέθοδος αερισμού νεογνών από τον Noel Jackson. Στην εικόνα φαίνεται το αυτοσχέδιο reservoir με τη χρήση ενός γαντιού και καθετήρα από καουτσούκ [143].

2.3 Φυσιολογία νεογνικής υποξίας

2.3.1 Συμβολή της αρχαιότητας στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος

Οι αρχαίοι Έλληνες ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν θεωρίες για να εξηγήσουν τη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Ο Όμηρος, τον 9^ο αιώνα π.Χ., αναφέρει το αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα περιγράφοντας τους τραυματισμούς κατά τον Τρωικό πόλεμο. Αργότερα, ο Εμπεδοκλής ο Ακραγαντίνος (495 - 435 π.Χ.) αναπτύσσει τη δική του θεωρία περί αναπνοής [146]. Σύμφωνα με αυτή, η αναπνοή είναι η προς τα έσω και προς τα έξω κίνηση αέρα διαμέσου μικρών πόρων του δέρματος. Παρομοιάζει την αναπνοή με τη λειτουργία της κλεψύδρας όπως φαίνεται στην (Εικόνα 2.3.1). Ο Αριστοτέλης (384 - 322 π.Χ.) ήταν ο πρώτος που ασχολήθηκε με το μηχανισμό της αναπνοής. Με βάση την καρδιοκεντρική του θεωρία, η αναπνοή σχετίζεται με τους πνεύμονες (αφού έβρισκε πνεύμονες μόνο στα ζώα που αναπνέουν) και με συγκεκριμένη κίνηση του θώρακα, κινητήριος δύναμη της οποίας είναι η καρδιά. Μετά την πτώση της αυτοκρατορίας του Μεγάλου Αλεξάνδρου, ο Ηρόφιλος (331 - 280 π.Χ.) και ο Ερασίστρατος (304 -

250 π.Χ.) εισάγουν δύο σημαντικές έννοιες στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος: την ύπαρξη νευρικού συστήματος με κέντρο τον εγκέφαλο ο οποίος συνδέεται μέσω νεύρων με άλλα όργανα και την ύπαρξη ενός μυός (το διάφραγμα) που προκαλεί την κίνηση, αντίστοιχα. Επίσης, ο Ηρόφιλος διαίρεσε τον κύκλο της αναπνοής σε τέσσερις φάσεις: έκπτυξη του θώρακα, διαστολή των πνευμόνων, συστολή των πνευμόνων και συστολή του θώρακα. Στη συνέχεια, ο Γαληνός (129 - 200μ.Χ.) συσχέτισε την αναπνοή με το διάφραγμα, τους θωρακικούς και μεσοπλεύριους μύες [146].



Εικόνα 2.3.1: Η «κλεψύδρα» του Εμπεδοκλή. Το πρώτο μοντέλο ερμηνείας του μηχανισμού της αναπνοής [146].

2.3.2 Σύγχρονη ερμηνεία της νεογνικής υποξίας

Η αιφνίδια έναρξη της ενδομήτριας υποξίας προκαλεί βαθύτερες και ταχύτερες αναπνευστικές κινήσεις στο έμβρυο που ελέγχονται από το κέντρο της αναπνοής. Σε αυτή τη φάση παρατηρείται ταχεία πτώση του pO_2 η οποία οδηγεί σε απώλεια συνείδησης. Μέσα σε λίγα λεπτά, σταματά η λειτουργία των αναπνευστικών κέντρων με απόρροια την παύση των αναπνευστικών κινήσεων και το έμβρυο εισέρχεται σε μια κατάσταση γνωστή ως πρωτογενής άπνοια. Έως αυτό το σημείο, η καρδιακή συχνότητα παραμένει σταθερή αλλά σύντομα αρχίζει να πέφτει στο μισό, ενώ η αρτηριακή πίεση παραμένει ανεπηρέαστη.

Η αρχική μείωση της καρδιακής συχνότητας συμβαίνει λόγω δράσης του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, ενώ η παραμονή της σε χαμηλά επίπεδα αποδίδεται στη δυνατότητα του καρδιακού μυός να λειτουργεί αναεροβίως στην υποξία, αφού έχει αποθέματα γλυκογόνου. Η αρτηριακή πίεση παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα, παρά τη χαμηλή καρδιακή συχνότητα, λόγω ανακατανομής της αιματικής ροής σε ζωτικές περιοχές. Την ίδια στιγμή, η μειωμένη καρδιακή συχνότητα επιτρέπει την καλύτερη επαναπλήρωση των κοιλιών στη διαστολή και ταυτόχρονα αυξάνεται ο όγκος παλμού. Συνολικά, η καρδιακή παροχή μειώνεται αλλά η μείωσή της δεν είναι τόσο σημαντική όσο φαίνεται από την πτώση της καρδιακής συχνότητας. Με αυτό τον τρόπο, η αιματική ροή συνεχίζεται στα σημαντικά για την επιβίωση του οργανισμού όργανα, αλλά με το κόστος της επιπλέον επιδείνωσης του βιοχημικού περιβάλλοντος, λόγω απελευθέρωσης γαλακτικού οξέος.

Εάν η υποξία συνεχίζεται, μετά από ένα κριτικό διάστημα, πρωτογενή νωτιαία κέντρα αναλαμβάνουν δράση, λόγω άρσης της αναστολής τους από ανώτερα αναπνευστικά κέντρα του εγκεφάλου, προκαλώντας παρατεταμένες, ακανόνιστες αναπνοές (gasping) (βέλος 2, Εικόνα 2.3.2.1) με συχνότητα περίπου 12/λεπτό [147]. Αναισθητικά φάρμακα, όπως πεθιδίνη, επιμηκύνουν τη χρονική διάρκεια της πρωτογενούς άπνοιας, ενώ μειώνουν τη διάρκεια της επόμενης φάσης του gasping [148].

Εάν αυτές οι ακανόνιστες αναπνευστικές προσπάθειες αποτύχουν να αερίσουν τους πνεύμονες επιδεινώνεται η οξέωση και η υποξία και επέρχεται η φάση της τελικής άπνοιας. Σύντομα, το ταχέως επιδεινούμενο βιοχημικό

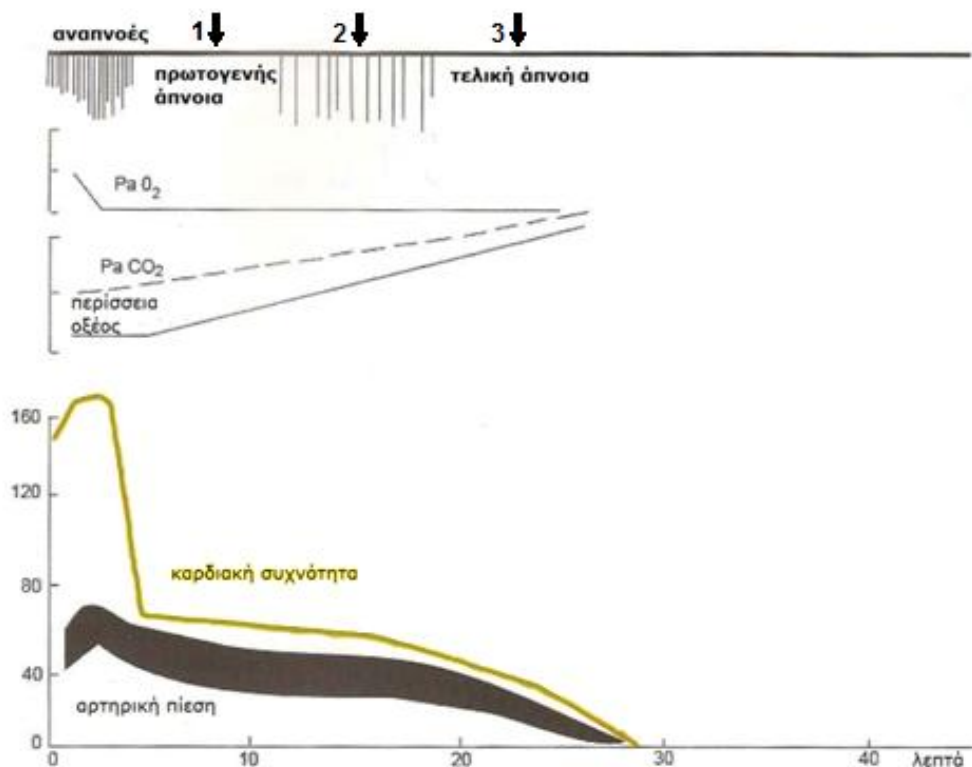
περιβάλλον προκαλεί παύση της λειτουργίας του μυοκαρδίου και χωρίς επιπλέον παρέμβαση, το νεογνό πεθαίνει. Όλη η παραπάνω διαδικασία, από την πρωτογενή άπνοια έως τη τελική, διαρκεί περίπου 20 λεπτά [149].

Το νεογνό το οποίο δεν αναπνέει μέσα σε ένα ή δυο λεπτά από τη γέννηση, μπορεί να εισέλθει σε ένα από τα τρία στάδια που φαίνονται με βέλη στην Εικόνα 2.3.2.1. Το νεογνό το οποίο θα γεννηθεί στο σημείο που δείχνει το πρώτο βέλος, θα είναι πλήρως ικανό να ανανήψει μόνο του, με την προϋπόθεση πως έχει ανοιχτό αεραγωγό. Μετά από μία παύση, το συγκεκριμένο νεογνό θα κάνει την πρώτη από μία σειρά αναπνοών gasping. Εάν αυτές οι αναπνοές καταφέρουν να αερίσουν τους πνεύμονες, και επειδή η κυκλοφορία του αίματος είναι ακόμη ενεργής, οξυγονωμένο αίμα από τους πνεύμονες θα μεταφερθεί στα στεφανιαία αγγεία και η καρδιακή συχνότητα θα αυξηθεί ταχέως. Επιπρόσθετα, αυτό σημαίνει πως οξυγονωμένο αίμα θα μεταφερθεί και στον εγκέφαλο, λόγω βελτίωσης της κυκλοφορίας. Το αναπνευστικό κέντρο θα λειτουργήσει αποδοτικότερα, με αποτέλεσμα την επαναφορά της φυσιολογικής αναπνευστικής λειτουργίας, ενώ οι αναπνοές gasping θα σταματήσουν. Παρόμοια αλληλουχία γεγονότων θα ακολουθήσει και στην περίπτωση που το νεογνό γεννηθεί τη χρονική στιγμή που υποδηλώνει το δεύτερο βέλος, αν και η ανάνηψη θα είναι λίγο βραδύτερη.

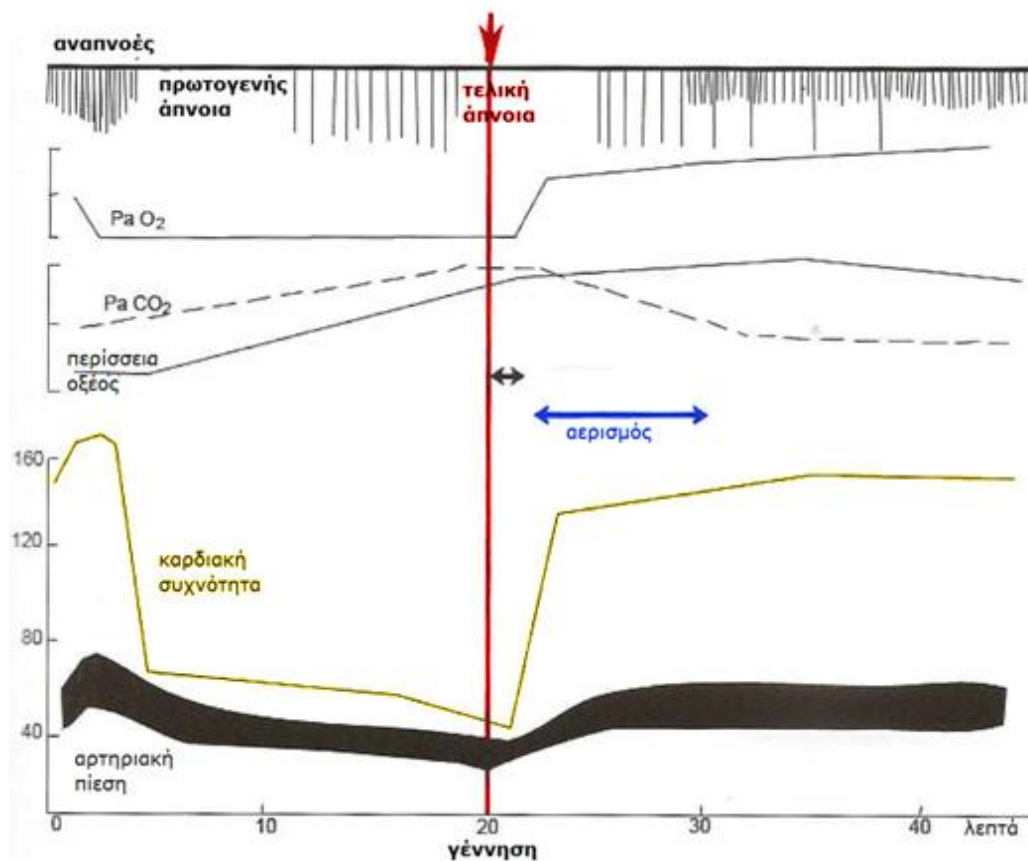
Το νεογνό το οποίο θα γεννηθεί τη χρονική στιγμή που δηλώνει το τρίτο βέλος, σίγουρα θα καταλήξει χωρίς παρέμβαση και είναι πολύ πιθανό να απεβιώσει ακόμη και εάν γίνει αποτελεσματική ανάνηψη. Ωστόσο, επαρκής αερισμός μπορεί να είναι αρκετός για αποτελεσματική ανάνηψη, με την προϋπόθεση πως η κυκλοφορία του αίματος λειτουργεί επαρκώς έτσι ώστε οξυγονωμένο αίμα να φτάσει στον καρδιακό μυ (Εικόνα 2.3.2.2).

Δυστυχώς, δεν είναι δυνατό να πει κανείς με σιγουριά εάν ένα απνοϊκό νεογνό κατά τη γέννηση βρίσκεται στην πρωτογενή άπνοια και ετοιμάζεται για gasping, ή εάν έχει ήδη κάνει gasping ενδομητρίως. Είναι ενθαρρυντικό πάντως, το γεγονός πως σχεδόν όλα τα νεογνά τα οποία χρειάζονται ανάνηψη κατά τη γέννηση, ανταποκρίνονται ταχύτατα μόλις εισέλθει οξυγόνο στους πνεύμονες. Η Εικόνα 2.3.2.2 δείχνει ακριβώς αυτή τη διαδικασία ανάνηψης ενός νεογνού που μόλις έχει εισέλθει σε τελική άπνοια.

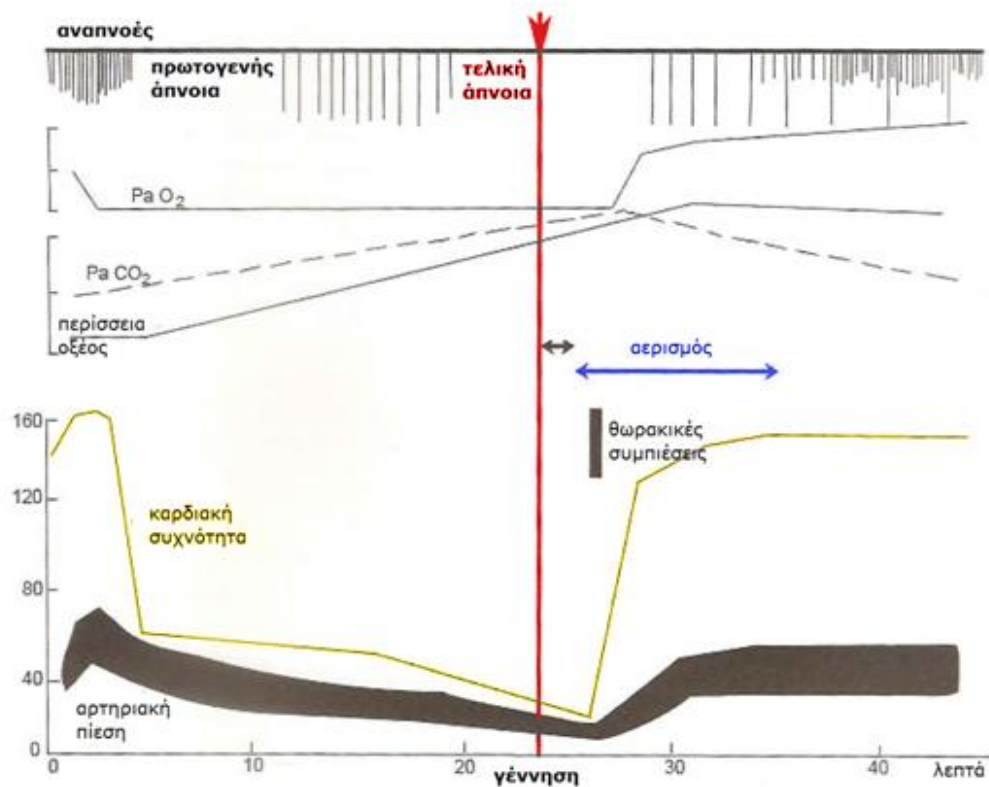
Σε μερικά νεογνά, η κατάσταση θα έχει προχωρήσει τόσο, ώστε η καρδιά να αδυνατεί να μεταφέρει οξυγονωμένο αίμα από τους πνεύμονες στα στεφανιαία αγγεία, παρά τον επαρκή αερισμό των πνευμόνων με το κατάλληλο αέριο. Και σε αυτή την περίπτωση, ανάνηψη μπορεί να επιτευχθεί αν πραγματοποιηθούν σύντομα θωρακικές συμπίεσεις οι οποίες μπορούν ικανοποιητικά να μεταφέρουν μια μικρή ποσότητα οξυγονωμένου αίματος στην καρδιά, με την προϋπόθεση πως το μυοκάρδιο είναι σε θέση να αντιδράσει, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3.2.3. Αυτό πρέπει να ακολουθηθεί από μία περίοδο διαλείποντος πνευμονικού αερισμού με θετική πίεση, έως ότου εγκατασταθεί φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία (από το εγχειρίδιο "Υποστήριξη της Ζωής του Νεογνού", ©Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, 2011®).



Εικόνα 2.3.2.1: Σχηματική απεικόνιση της πρωτογενούς και της τελικής άπνοιας μετά από αιφνίδια ολική ασφυξία στο χρόνο 0 (τροποποιημένη από το εγχειρίδιο "Newborn Life Support", ©European Resuscitation Council, 2008®).



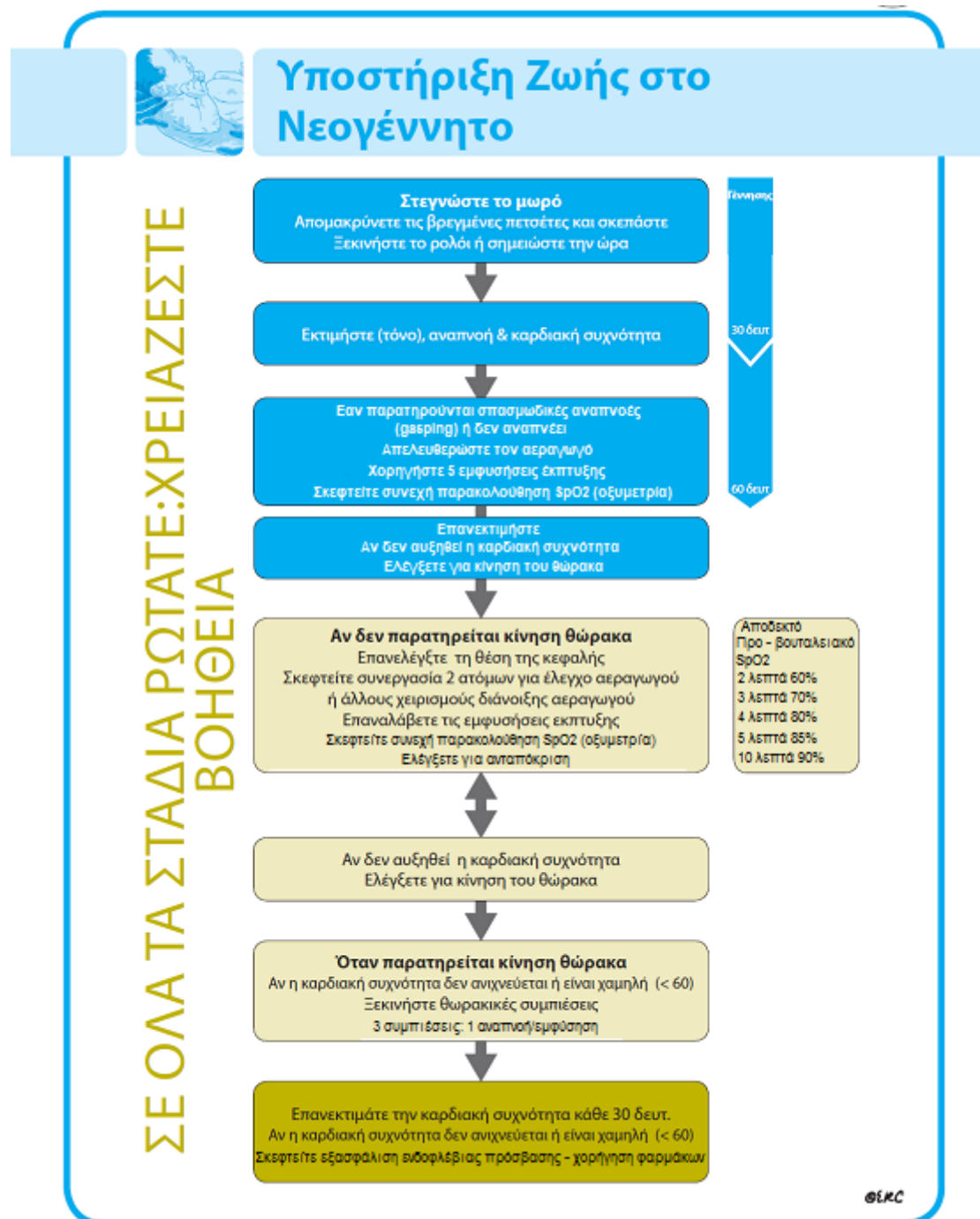
Εικόνα 2.3.2.2: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού αποτελέσματος πνευμονικού αερισμού σε νεογνό που γεννιέται στα αρχικά στάδια τελικής άπνοιας (τροποποιημένη από το εγχειρίδιο "Newborn Life Support", ©European Resuscitation Council, 2008®).



Εικόνα 2.3.2.3: Σχηματική απεικόνιση του φυσιολογικού αποτελέσματος των θωρακικών συμπίεσεων σε νεογνό που γεννήθηκε σε πρόωρη τελική άπνοια και δεν ανταποκρίνεται στον πνευμονικό αερισμό (τροποποιημένη από το εγχειρίδιο "Newborn Life Support", ©European Resuscitation Council, 2008®).

2.4 Σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες

Σε αντίθεση με τους ενήλικες η αναζωογόνηση στα νεογνά είναι τις περισσότερες φορές προβλέψιμο γεγονός. Επομένως, δίνεται η δυνατότητα να γίνει η κατάλληλη προετοιμασία όσον αφορά στον εξοπλισμό και στην παρουσία εξειδικευμένου προσωπικού στην αίθουσα τοκετών. Οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες από την ILCOR δημοσιεύτηκαν το 2010 (Εικόνα 2.4) και περιλαμβάνουν τα παρακάτω βήματα:



Εικόνα 2.4: Αλγόριθμος υποστήριξης της ζωής στα νεογέννητα (μεταφρασμένη από το εγχειρίδιο "Newborn Life Support", ©European Resuscitation Council, 2008 ®).

Βήμα 1^ο - Στέγνωμα και κάλυψη

Αρχικά γίνεται το στέγνωμα του νεογέννητου με καθαρές και ζεστές πετσέτες και η καθολική κάλυψή του εκτός του προσώπου με στεγνή πετσέτα. Εάν το νεογνό είναι πρόωρο μπορούμε να το τυλίξουμε με διάφανη πλαστική μεμβράνη χωρίς να προηγηθεί στέγνωμα. Όλα τα παραπάνω πραγματοποιούνται κάτω από θερμαντική πηγή.

Βήμα 2^ο - Αξιολόγηση

Ταυτόχρονα με το στέγνωμα δίνονται απτικά ερεθίσματα και γίνεται αξιολόγηση της κατάστασης του νεογνού η οποία περιλαμβάνει το χρώμα, την αναπνοή, την καρδιακή συχνότητα και τον μυϊκό τόνο. Ένα νεογνό που έχει καλό χρώμα και μυϊκό τόνο, αναπνέει και η καρδιακή συχνότητα είναι >100/λεπτό δεν χρειάζεται κάποια επιπλέον παρέμβαση παρά να παραδοθεί στη μητέρα.

Τα επόμενα βήματα εφαρμόζονται όταν η αξιολόγηση του νεογνού δείξει αποτυχία στην επαρκή αναπνοή ή καρδιακή συχνότητα <100/λεπτό. Σε αυτά τα βήματα ακολουθείται η συστηματική προσέγγιση ABC (A=Airway, B=Breathing, C=Circulation), όπως στα παιδιά και τους ενήλικες.

Βήμα 3^ο - Διάνοιξη αεραγωγού (A - Airway)

Για να επιτευχθεί η διάνοιξη του αεραγωγού, το νεογνό πρέπει να τοποθετηθεί σε ύπτια θέση με το κεφάλι σε ουδέτερη θέση και να γίνει υποστήριξη του πώγωνα και ανάσπαση της κάτω γνάθου. Αναρρόφηση είναι απαραίτητη μόνο όταν υπάρχει απόφραξη του αεραγωγού από μηκόνιο, πρήγματα αίματος ή παχύρρευστη βλέννη. Ωστόσο, η επιθετική αναρρόφηση μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της αυτόματης αναπνοής λόγω λαρυγγόσπασμου και να προκαλέσει βραδυκαρδία λόγω διέργεσης του πνευμονογαστρικού.

Βήμα 4^ο - Αερισμός (B - Breathing)

Εάν μετά τους χειρισμούς διάνοιξης αεραγωγού δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην κατάσταση του νεογνού, το επόμενο βήμα είναι οι πέντε εμφυσήσεις έκπτυξης. Οι εμφυσήσεις αυτές χορηγούνται με αερισμό με θετική πίεση (30 cmH₂O), ιδανικά μέσω ενός συστήματος T piece. Οι εμφυσήσεις έκπτυξης διαρκούν τουλάχιστον 3 δευτερόλεπτα και βοηθούν στην έκπτυξη των πνευμόνων και στην εγκατάσταση λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας, καθώς οι πνεύμονες των νεογνών είναι γεμάτοι με υγρό πριν από τη γέννηση. Μετά από 5 εμφυσήσεις έκπτυξης γίνεται επαναξιολόγηση της αναπνοής και της καρδιακής συχνότητας, και εάν δεν υπάρχει καμία μεταβολή, τότε ακολουθούν οι εμφυσήσεις αερισμού, οι οποίες διαρκούν ελαφρώς λιγότερο από τις εμφυσήσεις έκπτυξης και συνεχίζονται για 30 δευτερόλεπτα μέχρι να επαναξιολογηθεί το νεογνό. Η παθητική έκπτυξη του θώρακα αποτελεί ένδειξη επιτυχούς διάνοιξης αεραγωγού και επαρκή αερισμού. Εάν ο θώρακας δεν εκπτύσσεται πρέπει να γίνει επανεκτίμηση των βημάτων 3 και 4 (Α και Β).

Βήμα 5^ο - Υποστήριξη της κυκλοφορίας (C - Circulation)

Εάν παρά τον επαρκή αερισμό η καρδιακή συχνότητα είναι <60/λεπτό, τότε εφαρμόζονται θωρακικές συμπίεσεις σε αναλογία 3 συμπίεσεις : 1 εμφύσηση αέρα έτσι ώστε να πετυχαίνονται 90 συμπίεσεις/λεπτό και 30 εμφυσήσεις/λεπτό. Οι θωρακικές συμπίεσεις εφαρμόζονται με δύο δάκτυλα στη μέση γραμμή του κατώτερου τριτημορίου του στέρνου με διάφορες τεχνικές ώστε το στέρνο να συμπιέζεται σε βάθος περίπου το 1/3 της προσθοπίσθιας διαμέτρου του θώρακα.

Βήμα 6^ο - Χορήγηση φαρμάκων

Φάρμακα σπάνια ενδείκνυται στην αναζωογόνηση των νεογνών. Ωστόσο εάν η καρδιακή συχνότητα παραμένει <60/λεπτό παρά τον επαρκή αερισμό και τις θωρακικές συμπίεσεις, τότε γίνεται χορήγηση φαρμάκων (αδρεναλίνη 1:10000 σε δόση 0,1-0,3 ml/kg, διττανθρακικά 1-2 mmol/kg και γλυκόζη ή όγκος εάν κριθεί απαραίτητο).

Οι προσπάθειες ανάνηψης επαναξιολογούνται κάθε 30 δευτερόλεπτα. Σε περίπτωση επαναφοράς της κυκλοφορίας, ο αερισμός συνεχίζεται μέχρι την εγκατάσταση κανονικής αναπνοής. Η χρονική στιγμή διακοπής των προσπαθειών ανάνηψης λόγω μη ανταπόκρισης, παρά την τέλεση όλων των προαναφερθεισών ενεργειών, είναι ακόμη και σήμερα ασαφής, και εξαρτάται από τις τοπικές και εθνικές επιτροπές καθώς και από την κρίση των παρευρισκόμενων νεογνολόγων. Σε γενικές γραμμές, θεωρείται ότι εάν μετά από 10 - 20 λεπτά δεν υπάρχει καρδιακή παροχή, θα πρέπει μάλλον να γίνει εγκατάλειψη των προσπαθειών ανάνηψης λόγω σοβαρών νευρολογικών αναπηριών στην περίπτωση επιβίωσης (από το εγχειρίδιο "Υποστήριξη της Ζωής του Νεογνού", ©Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, 2011).

Το βασικό στέλεχος που αφορά στον αλγόριθμο ανάνηψης νεογνού (ABC) δεν υπέστη σημαντικές αλλαγές από το 2005 μέχρι το 2010. Ωστόσο, με βάση τα νεότερα δεδομένα υπήρξαν κάποιες άλλες αλλαγές που αφορούν στην αξιολόγηση και σταθεροποίηση νεογνού στην αίθουσα τοκετών. Γενικότερα, είναι αποδεκτό ότι η ακριβής εκτίμηση της καρδιακής συχνότητας, χρησιμοποιώντας στηθοσκόπιο ή τις σφύξεις του ομφαλίου λώρου, είναι ανακριβής. Επιπλέον, η εκτίμηση του χρώματος του νεογνού είναι σε μεγάλο βαθμό υποκειμενική και διαφέρει μεταξύ παρατηρητών, ενώ έχει βρεθεί ότι δεν συνάδει πάντα με τον πραγματικό κορεσμό οξυγόνου σε αιμοσφαιρίνη. Επίσης, σήμερα είναι γνωστό ότι ο κορεσμός οξυγόνου τα πρώτα λεπτά μετά τη γέννηση είναι χαμηλός και αυξάνεται σταδιακά μέσα στα πρώτα 10 λεπτά. Για τους παραπάνω λόγους, οι σημερινές κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν τη χρήση παλμικού οξύμετρου για την εκτίμηση της καρδιακής συχνότητας και του κορεσμού σε νεογνά τα οποία χρήζουν ανάνηψης.

Τελειόμηνια νεογέννητα ή νεογέννητα που είναι κοντά στην προβλεπόμενη εβδομάδα τοκετού με μέτρια ή σοβαρή υποξική - ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια θα πρέπει να τίθεται σε θεραπευτική υποθερμία καθώς στη τελευταία μετα-ανάλυση αποδείχτηκε ότι τα επιζώντα νεογνά έχουν καλύτερη μακροχρόνια νευρολογική εξέλιξη. Ωστόσο, ο ακριβής χρόνος έναρξης της θεραπευτικής υποθερμίας δεν καθορίζεται σαφώς από τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες [150].

Σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες, σε νεογνά τα οποία γεννιούνται σε καλή κατάσταση, συνιστάται η καθυστέρηση απολίνωσης του ομφαλίου λώρου για μερικά λεπτά, καθώς πιστεύεται ότι αυτό βελτιώνει τον όγκο παλμού και την καρδιακή παροχή, τα επίπεδα σιδήρου στα τελειόμηνα νεογνά και την άμεση μεταγεννητική σταθερότητα των πρόωρων νεογνών, ενώ ελαττώνει τις πιθανότητες μετάγγισης αίματος. Ωστόσο, κάποιες μελέτες έδειξαν αύξηση του νεογνικού ίκτερου και της χρήσης φωτοθεραπείας αλλά αυτό δεν θεωρήθηκε σημαντικό εφόσον δεν χρειάστηκε αφαιμαξομετάγγιση [151].

Επιπλέον, σε πειραματικά μοντέλα αποδείχτηκε ότι η χορήγηση αδρεναλίνης μέσω ενδοτραχειακού σωλήνα δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο η ενδοφλέβια χορήγηση. Εάν χρησιμοποιηθεί η ενδοτραχειακή οδός απαιτείται δόση τουλάχιστον 50 - 100 $\mu\text{g/kg}$ για την επίτευξη παρόμοιου αποτελέσματος με την ενδοφλέβια χορήγηση αδρεναλίνης σε δόση 10 $\mu\text{g/kg}$. Εκτός από την κλινική αξιολόγηση η ανίχνευση του εκπνεόμενου διοξειδίου του άνθρακα συνιστάται ως η πλέον αξιόπιστη μέθοδος επιβεβαίωσης τοποθέτησης του τραχειοσωλήνα σε νεογνά με αυτόματη κυκλοφορία [151].

Η μεγαλύτερη αλλαγή και σημείο διαφωνίας τα τελευταία δέκα χρόνια αφορά στη συγκέντρωση χορηγούμενου οξυγόνου κατά την ανάνηψη. Τα προηγούμενα χρόνια χορηγείτο 100% οξυγόνο στα νεογνά τα οποία χρειάζονταν ανάνηψη. Νεότερα δεδομένα περί τοξικότητας οξυγόνου πυροδότησαν πειραματικές και κάποιες, περιορισμένες σε αριθμό, κλινικές μελέτες. Παρά την αναγνώριση κάποιων περιορισμών αυτών των μελετών, η ILCOR συνιστά την έναρξη ανάνηψης τελειόμηνων νεογνών με 21% οξυγόνο (βλέπε υποκεφάλαιο 2.5.2).

Παρά τις όποιες εξελίξεις στον τομέα της νεογνολογίας και συγκεκριμένα στην αναζωογόνηση νεογνών, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν πολύ λίγες κλινικές μελέτες και επιστημονικά δεδομένα. Κατ' επέκταση, αρκετές από τις χρησιμοποιούμενες πρακτικές έχουν εδραιωθεί, αυθαίρετα, εφόσον προέρχονται από την κλινική εμπειρία και δεν έχουν στοιχειοθετηθεί από ισχυρά επιστημονικά δεδομένα (π.χ. ο ορισμός των 30 δευτερολέπτων ως το χρονικό διάστημα στο οποίο οι όποιες ενέργειες πρέπει να πραγματοποιούνται ή η αναλογία θωρακικών συμπίεσεων και ο ιδανικός χρόνος έναρξής τους). Επιπλέον πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα

όπως ο ιδανικός χρόνος απολίνωσης του ομφαλίου λώρου, ο καλύτερος τρόπος τοποθέτησης των νεογνών, η βέλτιστη θερμοκρασία σώματος, ο καλύτερος τρόπος διατήρησης σωστής θερμοκρασίας σώματος αποφεύγοντας την υπερθέρμανση του νεογνού, ο καλύτερος τρόπος παρακολούθησης και υποστήριξης της αναπνοής, η βέλτιστη περιεκτικότητα χορηγούμενου οξυγόνου [150, 151].

2.5 Οξυγόνο και ανάνηψη

2.5.1 Τοξικότητα οξυγόνου

Η τοξικότητα του οξυγόνου έχει μελετηθεί όχι μόνο στην ιατρική αλλά και σε άλλους χώρους στους οποίους χρησιμοποιείται οξυγόνο σε μερικές πιέσεις μεγαλύτερες από τις κανονικές, όπως στις καταδύσεις και στις επανδρωμένες διαστημικές πτήσεις.

Κατά την επανοξυγόνωση μετά από υποξία φαίνεται πως δημιουργούνται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS). Οι ROS ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: *ελεύθερες ρίζες* (π.χ. ρίζα υδροξυλίου $\cdot\text{OH}$), *ιόντα* (π.χ. υποχλωριώδες ανιόν ClO^-), *συνδυασμοί ελευθέρων ριζών και ιόντων* (π.χ. ανιόν σουπεροξειδίου $\cdot\text{O}_2^-$) και *μόρια* (π.χ. υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια οξυγόνου που έχουν στο μοριακό τροχιακό τους ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Για αυτό το λόγο, μια ρίζα οξυγόνου είναι πολύ δραστική χημικά αφού το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας έχει τη τάση να συζευχθεί με άλλο ηλεκτρόνιο και με αυτόν τον τρόπο να σταθεροποιηθεί. Η κυριότερη πηγή ROS είναι η διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια, το οποίο φυσιολογικά εμφανίζεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η τελική του τύχη είναι ο σχηματισμός μορίων νερού. Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μπορούν να παράγουν ποικίλα ένζυμα, μεταξύ των οποίων αρκετές οξειδάσες. Τα κυριότερα από αυτά είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση του NADPH και το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος P450 [152].

Αποτέλεσμα της δράσης των ROS είναι η δημιουργία οξειδωτικού stress. Η κυτταροτοξική δράση του οξειδωτικού stress, που περιλαμβάνει βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών, αλλαγές στην κυτταρική δομή, δυσλειτουργία διαμεμβρανικών αντλιών, καταστροφή ισχυρών ενδοθηλιακών δεσμών και ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία παράγουν μόρια προσκόλλησης και κυτταροκίνες και αποδίδεται στην προσβολή λιπιδίων (υπεροξειδωση), πρωτεϊνών (μετουσίωση), ενζύμων (απενεργοποίηση) και νουκλεϊκών οξέων (μεταλλάξεις). Όμως, τα κύτταρα διαθέτουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που εξουδετερώνουν τις ROS. Αυτοί περιλαμβάνουν τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η εμφάνιση ή όχι του οξειδωτικού stress εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στους αντιοξειδωτικούς παράγοντες και τις ROS [152].

Τα νεογνά έχουν αυξημένη τάση προς οξειδωτικό stress, καθώς έχει αποδειχτεί πως υπάρχει ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Καταρχάς, η ίδια η γέννηση αποτελεί μία πρόκληση για το νεογνό καθώς κατά τη μετάβαση από την εμβρυϊκή στην εξωμήτρια ζωή, εκτίθεται σε συγκεντρώσεις οξυγόνου πολύ μεγαλύτερες από αυτές που είχε συνηθίσει στο ενδομήτριο περιβάλλον. Επιπλέον, η υποξία, η επανοξυγόνωση, η υπεροξία, η ενεργοποίηση ουδετεροφίλων και μακροφάγων, η δυσλειτουργία μιτοχονδρίων, ο μεταβολισμός προσταγλανδινών και άλλα, έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Ειδικότερα στα νεογνά που χρειάζονται επιπλέον στήριξη, ο μηχανικός αερισμός, η χορήγηση επιφανειοδραστικού παράγοντα, η χορήγηση παρεντερικής διατροφής και άλλα, αυξάνουν τη διάχυση οξυγόνου στους ιστούς και επιτείνουν το οξειδωτικό stress [152].

Μελέτες έχουν δείξει τη τοξική δράση του οξυγόνου στους πνεύμονες, στους νεφρούς (οξεία νεφρική βλάβη) και στον εγκέφαλο [153, 154, 155]. Ο φλοιός του εγκεφάλου νεογέννητων χοιριδίων που ανένηψαν κατόπιν ασφυξίας είτε με 21% είτε με 100% οξυγόνο επί 2 ώρες, εξετάστηκε για κυτταρική βλάβη χρησιμοποιώντας ως δείκτη το ένζυμο $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-άση}$ της κυτταρικής μεμβράνης των νευρικών κυττάρων. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η ανάνηψη με χορήγηση οξυγόνου 100% προκάλεσε ελάττωση της δραστηριότητας της $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP-άσης}$ σε επίπεδα παρόμοια με αυτήν των

πειραματόζων που δεν ανένησαν, ενώ η ανάνηψη με χορήγηση οξυγόνου 21% είχε ως αποτέλεσμα την επάνοδο της δραστηριότητας της $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -άσης στα φυσιολογικά επίπεδα. Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι τοξικότητα του O_2 συμβάλλει περαιτέρω στην μετα-ασφυκτική ιστική βλάβη των κυττάρων του φλοιού του εγκεφάλου [155]. Από άλλες μελέτες έχει βρεθεί πως η παραγωγή ελεύθερων ριζών αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης αμφιβληστροειδοπάθειας της προωρότητας και βρογχοπνευμονικής δυσπλασίας [156, 157].

2.5.2 Αέρας ή 100% οξυγόνο

Το οξυγόνο ανακαλύφθηκε το 1774 από τον ερασιτέχνη χημικό Joseph Priestly (Εικόνα 2.5.2) ως "dephlogisticated air", μετά από θέρμανση του οξειδίου του υδραργύρου. Στα νεογνά το οξυγόνο χορηγήθηκε ως θεραπεία για πρώτη φορά στη Γαλλία το 1780, λίγο μετά την ανακάλυψή του από τον Priestly. Οι πρώτες ανησυχίες των παιδιατρών περί της χρήσης οξυγόνου, ξεκίνησαν το 1949, με την αναγνώριση της οπισθοφακικής ινοπλασίας (αμφιβληστροειδοπάθειας της προωρότητας) και της συσχέτισής της με τη χορήγηση οξυγόνου [158]. Η πρώτη κλινική μελέτη οπισθοφακικής ινοπλασίας που ανέφερε ως αίτιο τη χορήγηση υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (60%) ταυτόχρονα με τη χρήση κλειστής θερμοκοιτίδας δημοσιεύτηκε από τους Godman και Tobler στην Ελβετία [159]. Ακολούθως στην Αμερική, ξεκίνησε εκστρατεία ελάττωσης του χορηγούμενου οξυγόνου στα πρόωρα νεογνά, η οποία όμως είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας και εγκεφαλοπάθειας. Στο παρελθόν η χορήγηση 100% οξυγόνου κατά την ανάνηψη των νεογνών ήταν αδιαμφισβήτητη. Όμως, τα τελευταία 30 χρόνια άρχισε να αναγνωρίζεται η τοξικότητα της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στους υποξαιμικούς ιστούς.

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η βλάβη στα κύτταρα μεγαλώνει όταν οι υποξικοί ιστοί εκτίθενται σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου - ο ρόλος των ελεύθερων ριζών, των αντιοξειδωτικών και η σχέση τους με την απόπτωση και τη βλάβη από επαναιμάτωση και επανοξυγόνωση έχει μελετηθεί και έχει καθιερωθεί η έννοια του «οξειδωτικού stress». Έκτοτε, αυξανόμενα

επιστημονικά στοιχεία προτείνουν ότι όχι μόνο ο αέρας σε σχέση με 100% οξυγόνο μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματικός για την αναζωογόνηση νεογνών, αλλά και ότι η χορήγηση υψηλών περιεκτικοτήτων οξυγόνου, ακόμα και για μικρά χρονικά διαστήματα, μπορεί να είναι ζημιογόνος. Παρακάτω αναφέρονται πειραματικές και κλινικές μελέτες που δείχνουν ότι η υπεροξυγοναιμία είναι καταστροφική για διάφορα όργανα, ιδιαίτερα μετά από υποξυγοναιμία με αποτέλεσμα ο αέρας να υπερέχει του 100% οξυγόνου στην ανάνηψη και άλλες που αμφισβητούν κάτι τέτοιο.

Πειραματικές μελέτες

- Rootwelt (1993): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία και αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην αρτηριακή πίεση, στο έλλειμμα βάσης, στην υποξανθίνη του πλάσματος και στη μορφολογία του εγκεφάλου [160].
- Goplerud, Kim, Delivoria – Papadopoulos (1995): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία και αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - η δραστηριότητα της $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -άσης στο ραβδωτό σώμα των ασφυκτικών χοιριδίων, επέστρεφε γρηγορότερα σε φυσιολογικά επίπεδα στα ζώα που επανοξυγονώνωνταν με 21% οξυγόνο, σε σχέση με αυτά που επανοξυγονώνωνταν με 100% [161].
- Medbo *et al* (1998): μελέτη σε 18 νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία (8% οξυγόνο) και έπειτα σε επανοξυγόνωση με 21% ή 100% οξυγόνο έδειξε ότι:
 - δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην αποκατάσταση της πνευμονικής υπέρτασης και των επιπέδων της ενδοθηλίνης – 1 στο πλάσμα ανάμεσα στις δύο ομάδες [162].

➤ Børke *et al* (2004): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία (8% οξυγόνο) και έπειτα σε επανοξυγόνωση με 21% ή 100% οξυγόνο έδειξε ότι:

- τα ζώα που ανένηπταν με 21% οξυγόνο, είχαν ίδιους βιοχημικούς δείκτες βλάβης του μυοκαρδίου με αυτά που ανένηπταν με 100% οξυγόνο [163].

➤ Fugelseth *et al* (2005): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία (8% οξυγόνο) και έπειτα σε επανοξυγόνωση με 21% ή 100% οξυγόνο έδειξε ότι:

- δεν παρατηρήθηκε σημαντική υπεροχή της ανάνηψης με 100% οξυγόνο όσον αφορά στην αποκατάσταση της λειτουργίας του μυοκαρδίου και της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης μετά την υποξία [164].

➤ Domoki *et al* (2006): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που επανοξυγονώθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:

- η επανοξυγόνωση ασφυκτικών χοιριδίων με 100% οξυγόνο, είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη βλάβη νευρώνων στον ιππόκαμπο και στην παρεγκεφαλίδα, άλλα όχι στον εγκεφαλικό φλοιό ή στα βασικά γάγγλια [165].

➤ Hoffman *et al* (2007): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που επανοξυγονώθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε:

- ίδια δραστηριότητα των υποδοχέων NMDA και της Na^+ - K^+ - ATP-άσης μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ τα ανιχνεύσιμα προϊόντα μεταβολισμού υπεροξειδωσης λιπιδίων ήταν περισσότερα στην ομάδα 100% [166].

➤ Mendoza – Paredes *et al* (2008): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενα, διαλείποντα επεισόδια άπνοιας και επανοξυγόνωσης με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:

- η ανάνηψη με 100% οξυγόνο, προστατεύει καλύτερα τις ευαίσθητες περιοχές του ραβδωτού σώματος και ιππόκαμπου από αποπτωτικές βλάβες [167].

- Solberg *et al* (2012): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που επανοξυγονώθηκαν με 21%, 40% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - η ανάνηψη ασφυκτικών χοιριδίων με 40% ή 100%, είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερα επίπεδα οξειδωτικού στρες των εγκεφαλικών κυττάρων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν μέσω επιπέδων νευροπροστατών και νευροφουρανών, τα οποία αποτελούν παράγωγα υπεροξειδωσης λιπιδίων κατά το οξειδωτικό stress [168].
- Faa *et al* (2014): μελέτη σε νεογνά χοιρίδια που υποβλήθηκαν σε υποξία (8% οξυγόνο) και έπειτα σε επανοξυγόνωση με 18%, 21%, 40% ή 100% οξυγόνο έδειξε ότι:
 - ο βαθμός των ιστολογικών βλαβών στο φλοιό του εγκεφάλου εξαρτάται από τη συγκέντρωση οξυγόνου που χρησιμοποιείται κατά την ανάνηψη
 - στα χοιρίδια που επανοξυγονώθηκαν με 100% παρατηρήθηκαν περισσότερες βλάβες από ότι σε εκείνα που έλαβαν 18% ή 21% οξυγόνο [169].

Οι παραπάνω μελέτες παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς. Όλες οι μελέτες αφορούσαν σε ζώα τα οποία είχαν ήδη μεταβεί από την ενδομήτρια στην εξωμήτρια ζωή. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν στα μοντέλα τους διαφορετικούς συνδυασμούς υποξίας - ισχαιμίας - υπερκαπνίας, διαφορετικούς μηχανισμούς πρόκλησης υποξίας και διαφορετικά χρονικά διαστήματα υποξίας και επανοξυγόνωσης (για παράδειγμα σε αρκετά μοντέλα τα ζώα υποβάλλονταν σε ανάνηψη με 100% οξυγόνο για περισσότερο από 1 ώρα [165], που κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στις πραγματικές συνθήκες ανάνηψης). Για τους παραπάνω λόγους, υπάρχει η ανάγκη για πραγματοποίηση περισσότερων κλινικών μελετών.

Κλινικές μελέτες

- Ramji S *et al* (1993): 42 νεογνά ανένηψαν με ατμοσφαιρικό αέρα και 42 νεογνά με 100% O₂ και διαπιστώθηκε ότι :

- η αποκατάσταση των καρδιακών παλμών, τα αέρια αίματος, η οξεοβασική ισορροπία και τα Apgar Scores μεταξύ των δύο ομάδων δεν διέφεραν [170].
- Μελέτη Resair 2 (1998): μελέτη σε 591 νεογνά από 10 κέντρα, έδειξε ότι :
 - τα νεογνά που ανένηψαν με ατμοσφαιρικό αέρα είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης από αυτά που ανένηψαν με 100% οξυγόνο
 - ο χρόνος εμφάνισης της πρώτης αναπνοής (κλάματος) ήταν μικρότερος για τα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 21% οξυγόνο
 - το 1'-Apgar score ήταν χαμηλότερο στα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 100% οξυγόνο [171].
- Saugstad *et al* (2003): follow-up 410 παιδιών (ηλικίας 18 – 24 μηνών) από 7 κέντρα που είχαν αναζωογονηθεί με 21% ή 100% οξυγόνο (τα οποία συμμετείχαν στη μελέτη Resair 2), έδειξε ότι:
 - δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά και νευρολογική κατάσταση μεταξύ των δύο ομάδων [172].
- Vento (2003): μελέτη σε 101 τελειόμηνα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - η ανάνηψη με 100% οξυγόνο προκαλεί μακροχρόνιο οξειδωτικό στρες στα νεογνά
 - τα νεογνά που ανένηψαν με 100% οξυγόνο είχαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress στις 28 ημέρες ζωής σε σχέση με αυτά που ανένηψαν με ατμοσφαιρικό αέρα. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την ανεύρεση αυξημένης ποσότητας οξειδωμένης γλουταθειόνης και αυξημένης δραστηριότητας υπεροξειδίου της δισμουτάσης [173].
- Ramji *et al* (2003): μελέτη σε 431 νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων
 - η ανάνηψη με αέρα δεν υστερεί της ανάνηψης με 100% οξυγόνο [174].

- Vento *et al* (2005): μελέτη σε τελειόμηνα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - η αναζωογόνηση με 21% οξυγόνο προκαλεί λιγότερο οξειδωτικό stress και λιγότερες βλάβες στους νεφρούς και την καρδιά (η νεφρική βλάβη προσδιορίστηκε από αύξηση της NAG στα ούρα, η καρδιακή βλάβη από αύξηση της τροπονίνης στο πλάσμα και το οξειδωτικό stress από την αύξηση της δράσης του υπεροξειδίου της δισμουτάσης – SOD και από τη μείωση του λόγου γλουταθειόνη / οξειδωμένη γλουταθειόνη – GSH / GSSG) [175].
- Wang (2008): μελέτη σε πρόωρα νεογνά (<32 εβδομάδες) που αναζωογονήθηκαν με 21% ή 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - η αναζωογόνηση με 21% οξυγόνο δεν πέτυχε τους κορεσμούς οξυγόνου – στόχους την 3^η ημέρα ζωής [176].
- Rabi *et al* (2007): μετα-ανάλυση 7 μελετών, έδειξε ότι:
 - τα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 21% οξυγόνο είχαν μικρότερη θνησιμότητα από αυτά που αναζωογονήθηκαν με 100% οξυγόνο [177].
- Vento (2009): μελέτη σε πρόωρα νεογνά (24-28 εβδομάδες) που αναζωογονήθηκαν με 30% ή 90% οξυγόνο, έδειξε ότι:
 - τα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με 30% οξυγόνο παρουσίασαν μικρότερη ανάγκη για οξυγόνο και λιγότερο οξειδωτικό stress, φλεγμονή και κίνδυνο εμφάνισης βρογχοπνευμονικής δυσπλασίας [178].
- Davis *et al* (2004): μετα-ανάλυση 5 μελετών που περιελάμβανε συνολικά 1302 τελειόμηνα νεογνά από αναπτυσσόμενες χώρες, έδειξε ότι:
 - μολονότι τα αποτελέσματα της κάθε μελέτης ξεχωριστά δεν έδειξαν διαφορές ως προς την θνησιμότητα, η μετα-ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα νεογνά που αναζωογονήθηκαν με αέρα είχαν καλύτερη έκβαση [179].

➤ Harling *et al* (2005): μελέτη σε πρόωρα νεογνά (< 31 εβδομάδες) που αναζωογονήθηκαν με 50% και 100% οξυγόνο, έδειξε ότι:

- δεν υπήρξε διαφορά στην πνευμονική βλάβη (μετρώντας την IL-1β, την IL-6 και την IL-10) και την έκβαση ανάμεσα στις δύο ομάδες [180].

➤ Kapadia *et al* (2013): μελέτη σε πρόωρα νεογνά (24-34 εβδομάδες) που αναζωογονήθηκαν με υψηλές ή περιορισμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου έδειξε ότι:

- η στρατηγική περιορισμένου οξυγόνου οδήγησε σε μικρότερη έκθεση σε οξυγόνο, λιγότερο οξειδωτικό stress και μικρότερη νοσηρότητα του αναπνευστικού συστήματος [181].

Συμπερασματικά, τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ανάνηψη νεογνών με 21% οξυγόνο, είναι εξίσου αποτελεσματική με τη χορήγηση 100% οξυγόνου. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι η χορήγηση 100% μπορεί να είναι πιο επιβλαβής για τα νεογνά. Τα στοιχεία αυτά έχουν φέρει ενθουσιασμό, μαζί με σκεπτικισμό, στον χώρο της νεογνολογίας καθώς ακόμα υπάρχουν πολλές ελλείψεις γνώσεων και δεδομένων σε αυτό το θέμα. Ο αριθμός των κλινικών μελετών και ο αριθμός των νεογνών που μελετήθηκαν σε αυτές, είναι περιορισμένος. Επίσης, αρκετές από αυτές τις μελέτες διεξήχθησαν σε χώρες αναπτυσσόμενες, όπου η έλλειψη μέσων και εξειδικευμένης υποστήριξης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αρκετά σφάλματα. Τα κριτήρια εισόδου στις μελέτες αυτές ήταν πολλές φορές διαφορετικά όπως διαφορετικοί ήταν και οι ορισμοί ασφυξίας, θνησιμότητας ενώ παράλληλα στις περισσότερες από αυτές τα θνησιγενή νεογνά δεν περιλήφθηκαν στα τελικά αποτελέσματα, μη γνωρίζοντας έτσι εάν κάποιοι από αυτούς τους θανάτους σχετίζονταν με χαμηλότερη περιεκτικότητα χορηγούμενου οξυγόνου ή με συνθήκες πολύ προχωρημένης ασφυξίας. Ένας ακόμη πολύ μεγάλος περιοριστικός παράγοντας αυτών των μελετών είναι ότι αρκετές από αυτές δεν ήταν τυχαιοποιημένες και οι περισσότερες από αυτές δεν ήταν τυφλές.

Οι νεότερες οδηγίες της ILCOR το 2010 προτείνουν την έναρξη ανάνηψης με αέρα σε τελειόμηνα νεογνά. Εάν, παρά την επίτευξη

ικανοποιητικού αερισμού, δεν υπάρχει ικανοποιητική βελτίωση του καρδιακού ρυθμού ή της οξυγόνωσης, όπως αυτή κρίνεται από τις μετρήσεις του παλμικού οξύμετρου, τότε πρέπει να σκεφτεί κανείς τη χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου. Το ποσό του επιπλέον οξυγόνου πρέπει να κατευθύνεται από το παλμικό οξύμετρο [182]. Όμως, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να θέσουν τις τιμές αναφοράς του κορεσμού οξυγόνου γιατί οι παρατηρήσεις επηρεάζονται από τη σταδιακή αύξηση της οξυαιμοσφαιρίνης η οποία συμβαίνει φυσιολογικά μετά την γέννηση [183]. Στις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες αναφέρονται οι φυσιολογικές τιμές κορεσμού οξυγόνου (προ βοτάλειου πόρου) στα πρώτα λεπτά μετά τη γέννηση, πάνω στις οποίες βασίζεται πλέον η ανάνηψη νεογνού. Οι τιμές αυτές είναι: 60% στα 2 πρώτα λεπτά, 70% στα 3 λεπτά, 80% στα 4 λεπτά, 85% στα 5 λεπτά και 90% στα 10 λεπτά. Για τα πρόωρα νεογνά δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η εις βάθος διερεύνηση του θέματος με την πραγματοποίηση περισσότερων πειραματικών και κλινικών μελετών προσεκτικά σχεδιασμένων (από το εγχειρίδιο "Υποστήριξη της Ζωής του Νεογνού", ©Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, 2011 ®).



Εικόνα 2.5.2: Ο Joseph Priestly που ανακάλυψε το οξυγόνο (από Wikipedia).

2.5.3 Προβληματισμοί και ελλείψεις γνώσεων

Παρόλο το γεγονός ότι οι καταστρεπτικές συνέπειες της υπεροξίας είναι πολλές, η χρήση του οξυγόνου στα νεογνά είναι αναγκαία. Δεν πρέπει να παραβλέψουμε τα λάθη που έγιναν το '50, όταν προσωρινά εγκαταλείφθηκε η χρήση του οξυγόνου ακόμη και σε περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη, με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού νοητικής υστέρησης στα πρόωρα. Παρά τις προαναφερόμενες εξελίξεις, πολλά ζητήματα στην ανάνηψη νεογνού παραμένουν διφορούμενα. Η επιστημονική κοινότητα έχει αποδεχτεί τη θεωρία της πιθανής βλαπτικότητας αυξημένων συγκεντρώσεων οξυγόνου κατά την ανάνηψη, αλλά υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα που υποστηρίζουν την αντίθετη άποψη και τα οποία δεν μπορούν να παραληφθούν. Σήμερα, η απάντηση στην ερώτηση «ποια είναι η σωστή χρήση του οξυγόνου;» παραμένει ακόμα ασαφής. Σύμφωνα με τα σημερινά δεδομένα, η πιο ασφαλής απάντηση σε αυτό το ερώτημα είναι «quantum satis», δηλαδή τόσο όσο είναι απαραίτητο. Ιδανική συνθήκη θα αποτελούσε η δυνατότητα εξατομίκευσης της οξυγονοθεραπείας, δηλαδή η θεραπεία κάθε νεογνού να είναι ξεχωριστή και να στηρίζεται στο μεταβολομικό προφίλ του καθενός. Σε κάτι τέτοιο μπορούν να συμβάλλουν τα “metabolomics” με την εύρεση νέων βιοδεικτών που θα καθόριζαν για κάθε νεογνό την κατάλληλη συγκέντρωση οξυγόνου, την απάντηση σε αυτήν, τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της βλάβης λόγω υποξίας – επανοξυγόνωσης και την ανακάλυψη νέων ουσιών – φαρμάκων που θα μπορούσαν να έχουν προστατευτική δράση για αυτή τη βλάβη. Ίσως στο μέλλον η απάντηση στην ερώτηση για την ορθή χρήση του οξυγόνου να είναι «τόσο όσο είναι απαραίτητο για κάθε νεογνό ξεχωριστά».

Επιπλέον, οι περισσότερες μέχρι σήμερα διαθέσιμες μελέτες αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ χορήγησης 21% και 100% οξυγόνου. Ελάχιστες μελέτες έχουν ερευνήσει την επίδραση ενδιάμεσων περιεκτικοτήτων ή τη γραμμική συσχέτιση οξυγόνου και αποτελεσμάτων. Υπό αυτή την έννοια, και εφόσον οι σύγχρονες οδηγίες στηρίζουν τη σταδιακή αύξηση του οξυγόνου και όχι την απευθείας αύξηση σε 100%, είναι σημαντικό να υπάρχουν περισσότερα επιστημονικά δεδομένα που αφορούν σε νεογνά που ανανήπτονται με ενδιάμεσες συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Μία επιπλέον έλλειψη είναι ότι δεν υπάρχει σαφής οδηγός αντιστοίχισης των τιμών του παλμικού οξυμέτρου με την προσαρμογή της συγκέντρωσης οξυγόνου. Υπάρχουν κάποια αναπάντητα ερωτήματα, όπως: «σε περίπτωση μη ικανοποιητικών τιμών κορεσμού αιμοσφαιρίνης, για πόσες ποσοστιαίες μονάδες και πόσο γρήγορα πρέπει να αυξάνεται η περιεκτικότητα οξυγόνου;», «υπάρχουν επιπτώσεις από την πολύ αργή ή πολύ γρήγορη προσαρμογή του οξυγόνου όσον αφορά στην έκβαση της ανάνηψης και στις ιστικές βλάβες;» και «ποια τιμή καρδιακής συχνότητας πρέπει να θεωρηθεί το κατώτερο όριο στο οποίο πρέπει να χορηγούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις από την αρχή της ανάνηψης;».

Οι εξελίξεις στο τομέα της νεογνολογίας είναι πολύ γρήγορες και σημαντικές. Πιθανώς, οι καινούριες κατευθυντήριες οδηγίες να βελτιώσουν τη βιωσιμότητα και τη μακροχρόνια έκβαση πολλών νεογνών. Ωστόσο, η ιστορία έχει δείξει ότι στο παρελθόν, εδραιωμένες για χρόνια πρακτικές δεν ήταν βασισμένες σε επιστημονικά κριτήρια και αποδείχτηκαν στη συνέχεια ακόμα και βλαπτικές για τα νεογνά. Πλέον, οποιαδήποτε παρέμβαση και αλλαγή πρακτικής οφείλει να βασίζεται σε ισχυρά επιστημονικά δεδομένα και οι αμφισβητήσεις πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν. Για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή περισσότερων πειραματικών και κλινικών ερευνών στο τομέα της ανάνηψης νεογνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

3.1. Γιατί χρησιμοποιούνται πειραματικά μοντέλα;

Η χρήση πειραματικών μοντέλων είναι απαραίτητη για την ιατρική έρευνα. Σύμφωνα με το U.S. Foundation for Biomedical Research: «Η πειραματική έρευνα έχει διαδραματίσει ένα καίριο ρόλο σε κάθε σημαντική ιατρική ανακάλυψη και καινοτομία τον προηγούμενο αιώνα, τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για την υγεία των ζώων.»

Όσον αφορά στις κλινικές μελέτες, υπάρχουν ηθικοί προβληματισμοί, διλήμματα και αμφισβητήσεις. Από τη μια αυτές οι έρευνες κρίνονται απαραίτητες για την εξέλιξη της ιατρικής γνώσης και από την άλλη, η προστασία των συμμετεχόντων σε αυτές τις έρευνες από αμφισβητούμενες ή ενδεχομένως επιβλαβείς επιδράσεις σε αυτούς κρίνεται ζωτικής σημασίας. Η προσπάθεια ισορροπίας ανάμεσα στις δύο αυτές αντίθετες βασικές αρχές προκαλεί, αναπόφευκτα, εντάσεις και προβληματισμούς. Στις κλινικές μελέτες είναι πολύ δύσκολο να κρίνει κανείς με αυστηρά αντικειμενικά, επιστημονικά και νομικά δεδομένα, ποιες μελέτες είναι δικαιολογημένες, ποιοι πληθυσμοί πρέπει να ενταχθούν σε αυτές, και ποιοι κίνδυνοι μπορούν να παραβλεφθούν. Όσοι παίρνουν αυτές τις αποφάσεις, μπορεί να μη γνωρίζουν απόλυτα όλα τα οφέλη και όλους τους κινδύνους, οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν κατά τη διάρκεια της έρευνας.

Ειδικότερα, η επιστημονική έρευνα που αφορά στον παιδιατρικό πληθυσμό αποτελεί ιδιαίτερη περίπτωση η οποία έχει δημιουργήσει αμέτρητες συζητήσεις σε επιστημονικό και νομικό επίπεδο. Αρκετές μελέτες σε παιδιά είναι επικίνδυνες για αυτά και μη ηθικά αποδεκτές. Η ιδιαιτερότητα της παιδιατρικής ομάδας συνίσταται στην ανεπάρκεια συγκατάθεσης, δηλαδή ενώ οι ενήλικες, μετά από πλήρη ενημέρωση, μπορούν να δώσουν τη συγκατάθεσή τους για τη δική τους συμμετοχή σε τέτοιες έρευνες, τα παιδιά δεν μπορούν ενσυνείδητα να δώσουν συγκατάθεση, οπότε καλούνται γονείς, κηδεμόνες και ιατροί να αποφασίσουν για αυτά.

Όσον αφορά στις έρευνες ανάνηψης, εκτός των δυσκολιών συγκατάθεσης, έχουν τον επιπλέον περιορισμό ότι η εφαρμογή

αμφισβητούμενων τεχνικών ή η μη εφαρμογή μεθόδων αναζωογόνησης, ειδικά σε άτομα σε τέτοιο κριτικό σημείο ζωής ή θανάτου, δεν είναι ηθικά αποδεκτές. Επιπλέον, η δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών είναι αδύνατη. Η ανάγκη ανάνηψης ενός ατόμου είναι απρόσμενη και μη προβλέψιμη και οι συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο συντελούνται οι προσπάθειες ανάνηψης δεν αποτελούν ιδανικό πλαίσιο για τη διεξαγωγή κλινικών μελετών. Το επείγον και απρόσμενο δε, των καταστάσεων αυτών, κάνει τη συγκατάθεση σε ερευνητικές μελέτες ακόμα πιο δύσκολη, έως και αδύνατη και ηθικά μη αποδεκτή.

Άλλα πλεονεκτήματα των πειραματικών μοντέλων είναι:

- Χρησιμοποιώντας ζωικά πρότυπα μπορούμε να έχουμε απόλυτο έλεγχο των παρεμβάσεων και των συνθηκών.
- Προσφέρεται η δυνατότητα πραγματοποίησης μίας ή και περισσότερων παρεμβάσεων.
- Υπάρχει συστηματική απάντηση του οργανισμού σε κάθε ερέθισμα που δίνουμε, προσομοιάζοντας τον ανθρώπινο οργανισμό.
- Ο σχετικά μικρός χρόνος ζωής των προτύπων και η μεγάλη τοκετο - ομάδα επιτρέπουν την παρακολούθηση πολλών γενεών σε μικρό χρονικό διάστημα.
- Τα ζωικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται έχουν εκτραφεί για αυτό το σκοπό και είναι ελεύθερα ασθενειών.

3.2 Περιορισμοί και επικρίσεις

Εκτός από τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν και περιορισμοί στη χρήση των πειραματικών μοντέλων. Για έναν αριθμό ασθενειών είναι ατυχής η προσπάθεια εξομοίωσής τους με ζωικό πρότυπο γιατί δεν υφίσταται απόλυτη ομολογία. Πολλές φορές υπάρχει αδυναμία εξομοίωσης των συνθηκών, όπως συμβαίνει στα πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας. Πολύ λίγες μελέτες υπάρχουν που να προσομοιάζουν αληθινή ενδομήτρια υποξία. Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό ήταν η πρόκληση υποξαιμίας στη μητέρα, απόφραξη (clamping) του ομφάλιου λώρου ή άνοιγμα της μήτρας και τοποθέτηση του κεφαλιού του εμβρύου σε σακούλα με φυσιολογικό ορό [184, 185, 186]. Επιπλέον, πολλές φορές δεν εντοπίζονται όλες οι παρενέργειες των παρεμβάσεων με χρήση ζωικών προτύπων. Τέλος, οι συνθήκες διαβίωσης των ζώων είναι ικανές να αλλοιώσουν σημαντικά τα αποτελέσματα των μελετών: θόρυβος, κράτηση, απομόνωση, πόνος, στρες, συνωστισμός, εναλλαγή των ομάδων διαβίωσης, πρόωρη απομάκρυνση από τη μητέρα, αϋπνία και συχνή έκθεση σε αναισθησία μπορούν να επιδράσουν σημαντικά στο ανοσοποιητικό και γενικά στο σύνολο του οργανισμού των ζώων.

Επιπλέον των ανωτέρω, η χρήση ζωικών προτύπων για την έρευνα χαρακτηρίζεται από τους επικριτές της ως κακής ποιότητας επιστήμη. Υποστηρίζουν πως πολλές έρευνες δεν περιέχουν το απαραίτητο επιστημονικό ενδιαφέρον και δεν πραγματοποιούνται με σκοπό το ερευνητικό αποτέλεσμα. Πιστεύουν ότι υπάρχει ελλιπής έλεγχος των εγκαταστάσεων που πραγματοποιούνται τα πειράματα και δε τηρούνται οι κανόνες κατά την υλοποίηση. Επίσης, υποστηρίζουν ότι ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων δεν εξισορροπείται από ένα θετικό ερευνητικό αποτέλεσμα. Όμως, τα περισσότερα από τα προβλήματα που έχουν επισημανθεί αντιμετωπίζονται με προσεκτικό σχεδιασμό των πειραμάτων, τήρηση των κανόνων που διέπουν τις αρχές πειραματισμού, τακτικό έλεγχο ερευνητών και εγκαταστάσεων πειραματισμού, εκλέπτυνση (refinement - χρήση μη επεμβατικών μεθόδων, υιοθέτηση κάθε σύγχρονης μεθόδου που μειώνει την πρόκληση του πόνου ή stress, κατάλληλη εκπαίδευση του προσωπικού για τη βέλτιστη φροντίδα των πειραματόζωνων, βελτιστοποίηση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων σε κάθε

στάδιο), μείωση (reduction - αντίστοιχο ποσό πληροφορίας από μικρότερο αριθμό πειραματόζων, μεγαλύτερου ποσού πληροφορίας από τον ίδιο αριθμό πειραματόζων, επιλογή του ελάχιστου αριθμού πειραματόζων, αξιοποίηση των πειραματόζων σε περισσότερα από ένα πρωτόκολλα, βελτίωση της ποιότητας των μοντέλων), και αντικατάσταση (replacement - υιοθέτηση μεθόδων που δεν χρησιμοποιούν ζωικά πρότυπα, σε περιπτώσεις που είναι εφικτή η επίτευξη του ίδιου επιστημονικού στόχου) [187].

3.3. Πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής υποξίας

Είναι γνωστό ότι η περιγεννητική ασφυξία προκαλεί πολυοργανική ανεπάρκεια, όπως υποξική - ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, οξεία νεφρική βλάβη, πνευμονική υπέρταση, αγγειοπαθητική εντεροκολίτιδα, υπόταση και θρομβοεμβολικές επιπλοκές. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας που μας δίνουν πληροφορίες για την παθοφυσιολογία και φαρμακολογία αυτής.

Όπως αναφέρθηκε στο αμέσως προηγούμενο υποκεφάλαιο, σε λίγες πειραματικές μελέτες έχει γίνει προσπάθεια μίμησης της φυσικής εξέλιξης της περιγεννητικής ασφυξίας. Μέχρι πρόσφατα, η πρόκληση μητρικής υποξαιμίας και ο αποκλεισμός του ομφάλιου λώρου σε νεογνά πρόβατα ήταν τα πιο ευρέως διαδεδομένα πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας. Παρόλο την πληθώρα πληροφοριών που μας παρείχαν αυτά τα μοντέλα άρχισαν να εγκαταλείπονται λόγω κάποιων μειονεκτημάτων. Οι έγκυες προβατίνες είναι μεγάλες σε μέγεθος και ακριβές και τα νεογνά τους φαίνεται να έχουν λιγότερες βλάβες στον εγκέφαλο από ότι το ανθρώπινο είδος, γεγονός που τα καθιστά ακατάλληλα για την έρευνα νευρολογικών προβλημάτων. Το 2004 ένα νέο μοντέλο περιγεννητικής ασφυξίας σε νεογνά κουνέλια ήρθε να εξαλείψει τους παραπάνω περιορισμούς. Με τη συνεχιζόμενη αύξηση του αριθμού των διαθέσιμων στελεχών διαγονιδιακών ποντικών, τα ποντίκια άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας με κάποιες προσαρμογές λόγω της διαφορετικότητας των ειδών. Για παράδειγμα, η διάρκεια έκθεσης σε συνθήκες υποξίας ώστε να προκληθεί ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια είναι 90 λεπτά και 40-70 λεπτά στα κουνέλια και στα

ποντίκια, αντίστοιχα [188]. Πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της συμβολής της υποθερμίας στη μείωση των εγκεφαλικών βλαβών κατά την ασφυξία [189]. Επίσης, νεογέννητα χοιρίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της περιγεννητικής ασφυξίας [190]. Σε πειραματικό μοντέλο περιγεννητικής ασφυξίας σε χοιρίδια, που χρησιμοποιήθηκε ο αποκλεισμός του ομφάλιου λώρου κατά την καισαρική τομή για την πρόκληση υποξίας, η μικτή οξέωση που δημιουργήθηκε στα νεογνά χοιρίδια δεν ήταν τόσο σοβαρή όσο αναμένεται να είναι σε νεογνά χοιρίδια που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό, γεγονός που θέτει αυτό το μοντέλο πιθανώς ακατάλληλο για την προσομοίωση πραγματικών συνθηκών προγεννητικής ασφυξίας [190]. Σήμερα, τα περισσότερα μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας σε χοιρίδια αφορούν σε μεταγεννητική ασφυξία και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για αυτήν είναι ο αερισμός με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (συνήθως 8%) μέσω τραχειοσωλήνα. Παλιότερη μελέτη αναφέρει ότι η συχνότητα χρήσης του κάθε είδους ζώου σε 292 πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής ασφυξίας ήταν: κουνέλια (26%), χοιρίδια (23%) και πρόβατα (22%). Στην ίδια μελέτη φαίνεται πως τα χοιρίδια και τα πρόβατα είναι καταλληλότερα για τη μελέτη οξείων βλαβών και άμεσων εκβάσεων, ενώ τα κουνέλια για απώτερες εκβάσεις και επιπλοκές [184]. Σήμερα, τα νεογέννητα χοιρίδια κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στο τομέα της περιγεννητικής ασφυξίας.

Τα νεογνά χοιρίδια έχουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα. Η κύηση των χοίρων διαρκεί 115 ημέρες, ενώ των ποντικών 21 ημέρες και των προβάτων 149 ημέρες. Το νεογνό χοιρίδιο είναι καταλληλότερο για τη μελέτη της περιγεννητικής υποξίας γιατί έχει παρόμοια ανάπτυξη και ωριμότητα με ένα νεογνό του ανθρώπινου είδους ηλικίας 36-38 εβδομάδων. Αντίθετα, η μέγιστη ωριμότητα του εγκεφάλου έχει επιτευχθεί προ της γέννησης στα πρόβατα και την 7^η με 8^η ημέρα ζωής στα ποντίκια. Ο εγκέφαλος του νεογέννητου χοιριδίου αποτελεί το 2% του σωματικού βάρους και μόλις το < 0.5% κατά την ενήλικη ζωή. Κανένα είδος δεν έχει μεγαλύτερο εγκέφαλο σε σχέση με το βάρος του, εκτός από τον άνθρωπο. Και στον άνθρωπο και στους χοίρους ο πολλαπλασιασμός των νευρώνων φτάνει στο μέγιστο τις τελευταίες 5-6 εβδομάδες της εμβρυϊκής ζωής και συνεχίζεται για 5 εβδομάδες μετά τη γέννηση. Αντίθετα, η μυελίνωση είναι πιο ανεπτυγμένη στον εγκέφαλο του νεογνού χοιριδίου. Οι χοίροι είναι το μόνο είδος που όταν

επιζήσει μετά από υποξία παρουσιάζει απώτερες επιπλοκές της ισχαιμικής - υποξικής εγκεφαλοπάθειας, όπως σπασμούς. Επομένως, είναι το καταλληλότερο είδος για τη μελέτη απώτερων επιπλοκών. Η κύρια ανατομία των εγκεφαλικών αγγείων είναι ίδια και στα δύο είδη [191, 192]. Επιπλέον, ίδιες είναι και οι απαντήσεις του κυκλοφορικού συστήματος στις αλλαγές του διοξειδίου του άνθρακα και της αρτηριακής πίεσης [193]. Όσον αφορά στο ήπαρ, υπάρχει μια ανατομική διαφορά. Το ήπαρ των χοίρων έχει 4 λοβούς, ενώ των ανθρώπων 2. Η ωριμότητα του ηπατικού παρεγχύματος είναι παρόμοια με μικρές διαφορές στη λειτουργία κάποιων ενζύμων. Η ανικανότητα να χρησιμοποιούν την αλανίνη ως υπόστρωμα για την παραγωγή γλυκόζης, λόγω ενζυμικής δυσλειτουργίας, είναι κοινή στο τελειόμηνο χοιρίδιο και το πρόωρο νεογνό. Υπό κανονικές συνθήκες, στα υγιή τελειόμηνα χοιρίδια και νεογνά παρατηρείται αύξηση των AST και LDH στο αίμα τις πρώτες 12-24 ώρες ζωής, οι τιμές των οποίων επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα τις πρώτες 72 ώρες. Επίσης, τα επίπεδα των AST, ALT και LDH είναι παρόμοια ανάμεσα σε τελειόμηνα χοιρίδια και τελειόμηνα/πρόωρα νεογνά. Όσον αφορά στους νεφρούς, η ανάπτυξη των νεφρικών σπειραμάτων στα χοιρίδια ολοκληρώνεται τη 3^η εβδομάδα ζωής σε αντίθεση με τα αντίστοιχα των ανθρώπων που η ανάπτυξή τους ολοκληρώνεται τη 34^η εβδομάδα ζωής και μετά απλά αυξάνεται ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης. Επίσης, το μέγεθος των νεογέννητων χοιριδίων είναι αρκετό ($\approx 1.5 - 2$ κιλά) ώστε να γίνονται εύκολα διάφορες παρεμβάσεις και να χορηγούνται υγρά και φάρμακα μέσω ενδοφλέβιων ή ομφαλικών καθετήρων. Ο αρκετός όγκος αίματος που έχουν (100 ml/kg) επιτρέπει τη συχνή αιμοληψία χωρίς να επηρεάζεται η φυσιολογία. Παρά ταύτα, υπάρχει μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στο αίμα χοίρων και ανθρώπων. Τα νεογέννητα χοιρίδια δεν έχουν εμβρυική αιμοσφαιρίνη και η τιμή της αιμοσφαιρίνης κατά τη γέννηση είναι $\approx 8 \text{ gr/dl}$, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα μεταφοράς του οξυγόνου. Τέλος, οι χοίροι δεν κοστίζουν πολύ και η εκτροφή τους είναι εύκολη με αποτέλεσμα να υπάρχουν σε πληθώρα στην αγορά [194, 195, 196].

3.4 Πειραματικά μοντέλα οξείας νεφρικής βλάβης

Πειραματικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της οξείας νεφρικής βλάβης (ONB). Παρέχουν πληροφορίες για την παθοφυσιολογία της ONB καθώς οι μέχρι σήμερα γνώσεις είναι ανεπαρκείς και συμβάλλουν στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών ONB που θα οδηγήσουν σε έγκαιρη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση καθώς και στην εύρεση νέων φαρμακευτικών θεραπειών. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους ως προς το τύπο της βλάβης, τον τρόπο πρόκλησης αυτής και το είδος του ζώου που χρησιμοποιείται [197].

Τα βασικά είδη πειραματικών μοντέλων (ONB) ανάλογα με το τύπο της βλάβης είναι: ισχαιμικά (π.χ. ασφυξία, αιμορραγία, καρδιοχειρουργική επέμβαση, μεταμόσχευση νεφρού), τοξικά (π.χ. γενταμικίνη, σισπλατίνη, σκιαγραφικά) και σηπτικά (π.χ. λοιμώξεις). Καθένα από αυτά έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Από το 1960, ποικίλα μοντέλα ισχαιμικής ONB έχουν δοκιμαστεί. Σήμερα, η αμφοτερόπλευρη ή μονόπλευρη (με ή χωρίς ετερόπλευρη νεφρεκτομή) νεφρική ισχαιμία – επαναιμάτωση χρησιμοποιείται για την πρόκληση ισχαιμικής βλάβης. Η αμφοτερόπλευρη ισχαιμία – επαναιμάτωση προσομοιάζει περισσότερο τις παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε ONB. Οι χρόνοι ισχαιμίας και επαναιμάτωσης ποικίλουν ανάλογα το μοντέλο. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν σκύλοι και κουνέλια, τα οποία αργότερα έδωσαν τη θέση τους στα ποντίκια. Επίσης, μελέτες ισχαιμικής βλάβης έχουν γίνει σε καλλιέργειες νεφρικών κυττάρων και σε απομονωμένα νεφρικά σωληνάκια ή νεφρούς [198, 199, 200]. Τα σηπτικά πειραματικά μοντέλα χωρίζονται σε τρεις επιπλέον κατηγορίες με βάση τον τρόπο πρόκλησης της σήψης: ένεση εξωγενούς τοξίνης (π.χ. LPS – Lipopolysaccharide τοξίνη από *E.coli*), αλλαγή των ενδογενών προστατευτικών φραγμών (π.χ. εντέρου με αποτέλεσμα την περιτονίτιδα), έγχυση εξωγενούς βακτηρίου (π.χ. *E. coli* και *P. Aeruginosa*). Το ιδανικό πειραματικό μοντέλο σήψης είναι εφικτό όταν μιμείται τα βήματα και τη σοβαρότητα της σήψης στο ανθρώπινο είδος και τις αιμοδυναμικές, ανοσολογικές και ιστολογικές αλλαγές που συμβαίνουν [201]. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση τοξινών κατά μήκος των νεφρικών σωληναρίων και το pH του αυλού τους επηρεάζει τη διαλυτότητα των φαρμάκων. Παραδείγματα τοξικών πειραματικών μοντέλων είναι η χορήγηση φολικού οξέος, σισπλατίνης ενδοπεριτοναϊκά, γλυκερόλης

ενδομυϊκά (μοντέλο ραβδομυόλυσης), αμινογλυκοσίδης, κυκλοσπορίνης, βαρεών μετάλλων, σκιαγραφικού [197, 202].

Πολύ λίγες αντίστοιχες μελέτες έχουν γίνει σε νεογέννητα πειραματόζωα. Οι περισσότερες που αφορούν στη μελέτη της ισχαιμικής ONB χρησιμοποιούν το μοντέλο ισχαιμία μέσω υποξίας – επανοξυγόνωση. Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη χορηγήθηκε αμινογλυκοσίδη σε νεογέννητους αρουραίους και μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ αυτών [202].

Παρά τα όσα αναφέρθηκαν, κανένα πειραματικό μοντέλο δεν είναι διαθέσιμο να παρέχει ένα αναπαραγώγιμο μοντέλο της κλινικής οξείας νεφρικής βλάβης, όπως αυτή εμφανίζεται στους ανθρώπους. Η ONB είναι πολυπαραγοντική και πολύπλοκη στους ανθρώπους και πολλές φορές επηρεάζεται από άλλες συνοδές παθήσεις και θεραπείες. Αντίθετα, η ONB στα πειραματικά μοντέλα εφαρμόζεται σε υγιή ζώα και δεν υπάρχει απόλυτη αντιστοίχιση της παθοφυσιολογίας με τους ανθρώπους.

Τέλος, οι γενικές αρχές που πρέπει να διέπουν την ανάπτυξη και τη μελέτη πειραματικών μοντέλων οξείας νεφρικής βλάβης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Γενικές αρχές ανάπτυξης και μελέτης πειραματικών μοντέλων οξείας νεφρικής βλάβης [2].

Γενικές αρχές σχεδιασμού πειραματικού μοντέλου	Επιπρόσθετα θέματα για βελτίωση του μοντέλου
Κατάλληλη τυχαιοποίηση των ζώων	Το μοντέλο θα πρέπει να επιλέγεται με βάση τη συνάφειά του με την κλινική κατάσταση, και όχι μόνο από τη δυνατότητα αναπαραγωγής του
Παρόμοια βασικά (baseline) χαρακτηριστικά ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες	Φυσιολογικοί παράμετροι που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη νεφρική λειτουργία ή προδιαθέτουν σε βλάβη πρέπει να ελέγχονται, να μετριοούνται και να αναφέρονται (π.χ. θερμοκρασία, αρτηριακή πίεση, βαθμός ενυδάτωσης, τύπος αναισθησίας)
Ταυτόχρονη κατάλληλη ομάδα ελέγχου (control group)	Κατάλληλη προετοιμασία των ιστών και των βιολογικών υγρών για έγκυρη ερμηνεία της παθολογίας και των αποτελεσμάτων
Τυφλή εκτίμηση του αποτελέσματος	Βασικές απαιτήσεις ενός μοντέλου θα πρέπει να είναι η μορφολογία, τα αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά και η λειτουργία
Να λαμβάνεται υπόψιν η θνησιμότητα και να αναφέρεται	Τα αποτελέσματα θα πρέπει να προκύπτουν από μετρήσεις σε διαφορετικές χρονικές στιγμές
Ο αριθμός των ζώων σε ένα μοντέλο πρέπει να είναι κατάλληλος για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων	Μη επεμβατικοί βιοδείκτες οξείας βλάβης των νεφρικών κυττάρων πρέπει να μελετηθούν και να αναπτυχθούν
	Τα μοντέλα να αναφέρονται σε τυχόν συνοδά νοσήματα που πιστεύεται ότι προδιαθέτουν σε οξεία νεφρική βλάβη στους ανθρώπους
	Οι πειραματικές παρατηρήσεις θα πρέπει να αναπαράγονται σε άλλα εργαστήρια πριν γίνουν ευρέως αποδεκτές

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

4.1 Εισαγωγή

Οι νέες κατευθυντήριες οδηγίες της ILCOR (International Liaison Committee on Resuscitation) του 2010 διαφέρουν από αυτές του 2005 [203] όσον αφορά στη χορηγούμενη συγκέντρωση O_2 κατά την αναζωογόνηση του νεογνού (από το εγχειρίδιο "Υποστήριξη της Ζωής του Νεογνού", ©Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης, 2011 ©). Συγκεκριμένα, κατά την αναζωογόνηση τελειόμηνων νεογνών προτείνεται η χορήγηση αέρα (21% O_2 vs 100% O_2) αρχικά και η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου επί μη βελτίωσης της καρδιακής συχνότητας [203]. Σε νεογνά που η διάρκεια κύησης είναι μικρότερη των 32 εβδομάδων προτείνεται η χορήγηση μίγματος οξυγόνου και αέρα ελεγχόμενη με παλμική οξυμετρία [203]. Παρά ταύτα, επικρατεί έντονος προβληματισμός για πιθανές καταστροφικές συνέπειες σε διάφορους ιστούς που έχει η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου κατά την αναζωογόνηση των νεογνών [179, 204, 205].

Οι νεφροί έχουν αυξημένες ανάγκες σε υπόστρωμα (οξυγόνο, γλυκόζη) λόγω των πολλαπλών λειτουργιών που πραγματοποιούν, γεγονός που τους καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητους στην υποξία και επανοξυγόνωση [175, 206, 207]. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, η οξεία νεφρική βλάβη στα νεογνά εμφανίζεται στο 0.4% ζώντων νεογνών και στο 8-24% νεογνών στη μονάδα εντατικής θεραπείας [11, 208]. Νεογνά με οξεία νεφρική βλάβη έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν χρόνια νεφρική νόσο και υπέρταση στη μετέπειτα ζωή τους [208]. Επομένως η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση της οξείας νεφρικής βλάβης λόγω υποξίας στα νεογνά είναι σημαντική. Έτσι έχει προκύψει η ανάγκη για την εύρεση νέων δεικτών που σε αντίθεση με την ουρία και την κρεατινίνη θα διαγιγνώσκουν εγκαίρως την οξεία νεφρική βλάβη πριν χαθεί η νεφρική λειτουργία καθώς και θα περιγράφουν το μέγεθος της βλάβης και θα καθορίζουν τη θεραπεία [209]. Αρκετές μελέτες για νέους δείκτες οξείας νεφρικής βλάβης στο πλάσμα και στα ούρα έχουν πραγματοποιηθεί σε ενήλικες και παιδιά σε αντίθεση με τα νεογνά [210, 211, 212, 213]. Επομένως, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτοί οι δείκτες στην κλινική πράξη σε όλες τις ηλικίες. Το πρωτεομικό και μεταβολομικό προφίλ των βιολογικών υγρών και ιστών

μπορεί να παρέχει πληροφορίες για αλλαγές που συμβαίνουν σε πρωτεΐνες και μεταβολίτες κατά την απόκριση του οργανισμού στην οξεία νεφρική βλάβη δίνοντας τη δυνατότητα για εξατομίκευση της θεραπείας και καθορισμό της προδιάθεσης, της έγκαιρης διάγνωσης και παρέμβασης και της πρόγνωσης.

Σκοπός του συγκεκριμένου πειραματικού πρωτοκόλλου είναι να μελετήσει την εφαρμογή της μεταβολομικής σε πειραματικό μοντέλο υποξίας - επανοξυγόνωσης, τις ιστολογικές αλλοιώσεις των νεφρών μετά από υποξία - επανοξυγόνωση και να απαντήσει στα παρακάτω ερωτήματα: πώς η ασφυξία προκαλεί οξεία νεφρική σωληναριακή βλάβη στα νεογνά; τι ιστολογικές αλλαγές συμβαίνουν; και ποιος είναι ο ρόλος της συγκέντρωσης του οξυγόνου;

4.2 Υλικό και μέθοδοι

Το συγκεκριμένο ερευνητικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε στους χώρους του Ερευνητικού Πειραματικού Εργαστηρίου της ELPEN Α.Ε. στο Πικέρμι Αττικής. Το Εργαστήριο πληροί όλες τις απαιτούμενες από το νόμο προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση πειραμάτων σε ζώα. Η άδεια πραγματοποίησης πειράματος σε ζώα έχει δοθεί από την Νομαρχιακή Αυτ/ση Αν. Αττικής με αριθμ. Πρωτ. 330/27-1-2009 (αριθμός άδειας 414/21-04-2009) σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία περί επιστημονικών και πειραματικών διαδικασιών (Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 86/609/EEC). Η Επιτροπή Έρευνας του Αρεταίου νοσοκομείου και η Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών έχουν αποδεκτεί το αίτημα για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού πρωτοκόλλου.

ΣΤΑΔΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Προετοιμασία - Σταθεροποίηση (baseline)

Γι' αυτό το πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν 40 αρσενικά Landrace/Large White νεογνά χοιρίδια ηλικίας 1-4 ημερών και βάρους 2.3 - 3.8 kg. Όλα τα χοιρίδια προέρχονταν από τον ίδιο εκτροφέα (N. Βαλιδάκης, Κορωπί, Ελλάδα) την ημέρα του πειραματισμού. Στην εκτροφική μονάδα, παρέμεναν από τη γέννηση μέχρι τη στιγμή της συλλογής μαζί με τη μητέρα, μέσα σε ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά. Τα κλουβιά ήταν μονοθέσια και εξοπλισμένα με ειδικό σύστημα, τοποθετημένα κάτω από τον θάλαμο της μητέρας και χωρισμένα με ειδικές μπάρες από αυτήν, έτσι ώστε να γίνεται εφικτός ο θηλασμός αποτρέποντας, ωστόσο, να ξαπλώνει η μητέρα πάνω στα νεογννήτα χοιρίδια. Στην εκτροφική μονάδα η θερμοκρασία δωματίου ήταν ρυθμισμένη στους 35 ± 2 °C. Για τη διατήρηση της συγκεκριμένης θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετες υπερκείμενες θερμαντικές πηγές. Επιπλέον, οι θάλαμοι αερίζονταν 15 φορές την ώρα και η σχετική υγρασία δωματίου κυμαινόταν στους $55 \pm 5\%$. Ο φωτισμός εναλλασσόταν κάθε 12 ώρες (12 ώρες φως - 12 ώρες σκοτάδι, με σταθερή εναλλαγή στις 06:00 πμ και 18:00 μμ). Τα ζώα μεταφέρονταν την ημέρα του πειράματος από την εκτροφική μονάδα στο πειραματικό εργαστήριο (Ερευνητικό - Πειραματικό Κέντρο Ε.Λ.Π.Ε.Ν) με ειδικά διαμορφωμένα και θερμο-ρυθμιζόμενα φορτηγά - οχήματα και τοποθετημένα σε προ-θερμασμένα κουτιά. Η μεταφορά των ζώων πραγματοποιούνταν μέσα σε μισή ώρα. Η συλλογή των χοιριδίων γινόταν νωρίς το πρωί την ημέρα του πειράματος, συνεπώς δεν χρειαζόταν θηλασμός ή σίτιση των χοιριδίων στο ερευνητικό εργαστήριο πριν την έναρξη του πειράματος.

Αρχικά, σε όλα τα ζώα γινόταν προνάρκωση με ενδομυϊκή (IM) χορήγηση κεταμίνης 10 mg/kg (Narketan, Vetoquinol UK Ltd) και μιδαζολάμης 0.5 mg/kg (Dormicum®, Hoffmann-La Roche, Germany). Η εισαγωγή στην αναισθησία γινόταν με bolus ενδοφλέβια (IV) χορήγηση φεντανύλης 10 μg/kg (Fentanyl, Jassen-Cilag) και προποφόλης 1 mg/kg (Diprivan, AstraZeneca), κατόπιν καθετηριασμού περιφερικής φλέβας χρησιμοποιώντας

φλεβοκαθετήρα μεγέθους 24G (Jelco R, Smiths Medical, N. Παπαποστόλου ΑΕ, Αθήνα, Ελλάδα). Προκειμένου τα ζώα να διασωληνωθούν τους χορηγήθηκε ενδοφλέβιο (IV) cis-ατρακούριο 0.2 mg/kg (Nimbex, Abbott) για μυοχάλαση. Στη διασωλήνωση χρησιμοποιήθηκε ενδοτραχειακός σωλήνας διαμέτρου 3 – 3.5 mm (Portex, Smiths Medical, UK) (Εικόνα 4.2.1). Η σωστή τοποθέτηση του ενδοτραχειακού σωλήνα επιβεβαιωνόταν μετά από ακρόαση των πνευμόνων αμφοτερόπλευρα και συνεχή καταγραφή του $E_T CO_2$ μέσω καπνογράφου (Datex Engstrom, Type TC 200-22-01 Instrumentarium Corp., Helsinki, Finland) (Εικόνα 4.2.2). Μετά την εξασφάλιση του αεραγωγού με τη τοποθέτηση τραχειοσωλήνα και μία bolus ενδοφλέβια δόση φεντανύλης 20 $\mu g/kg$, τα χοιρίδια συνδέονταν σε μηχανικό αερισμό (Soxil, Soxitronic, Felino, Italy).

Ο αερισμός γινόταν με μίγμα από O_2 και N_2O έτσι ώστε το fiO_2 (κλάσμα εισπνεόμενου οξυγόνου) να είναι μεταξύ 0.21 και 0.25 και να εξασφαλίζεται ικανοποιητικός κορεσμός αιμοσφαιρίνης (SpO_2 90% - 95%). Ο tidal volume (V_T – όγκος εισπνεόμενου αέρα) ήταν 10-15 ml/kg και η πίεση 19 cmH₂O. Η αναπνευστική συχνότητα ρυθμιζόταν σε 30 - 40 αναπνοές/λεπτό έτσι ώστε το τελοεκπνευστικό διοξείδιο του άνθρακα ($PETCO_2$) να κυμαίνεται μεταξύ 35 με 45 mmHg.

Η παρακολούθηση της κατάστασης των χοιριδίων γινόταν με monitor καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Υπήρχε συνεχής καταγραφή της καρδιακής συχνότητας, του ΗΚΓ (με τη χρήση των απαγωγών I, II, III, aVR, aVL, aVF), του κορεσμού αίματος σε οξυγόνο με παλμικό οξύμετρο τοποθετημένο στη γλώσσα του ζώου και της θερμοκρασίας από το ορθό (Matron, BPM 1000, VET, ET Medical Devices Spa). Η θερμοκρασία του σώματος ρυθμιζόταν με τη χρήση ακτινοβολούσας πηγής θερμότητας στους 37 – 39 °C. Από την αρχή του πειράματος και με την εξασφάλιση περιφερικής φλεβικής προσπέλασης, γινόταν συνεχής έγχυση φυσιολογικού ορού 0.9% (ρυθμός έγχυσης 10 ml/kg/ώρα) και Dextrose in water 5% (ρυθμός έγχυσης 5 ml/kg/ώρα), με σκοπό να αποφευχθεί αφυδάτωση και υπογλυκαιμία. Η αναισθησία διατηρήθηκε με συνεχή στάγδην έγχυση προποφόλης 8 - 10 mg/kg/h και εφάπαξ δόσεις φεντανύλης 10 $\mu g/kg$ για αναλγησία και cis-ατρακούριου 0.15 mg/kg για επαρκή μυοχάλαση ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με το επίπεδο της αναισθησίας του ζώου.

Στη συνέχεια αποκαλύπτονταν χειρουργικά η δεξιά έσω σφαγίτιδα και η δεξιά καρωτίδα μέσω μιας παρατραχειακής τομής (Εικόνα 4.2.3) και καθετηριάζονταν με καθετήρες σιλικόνης μονού αυλού (S1UVC5.0, NeoCare®, Klein-Baker Medical Co., San Antonio, TX, USA) οι οποίοι συνδέονταν με κατάλληλους μορφομετατροπείς (Transpac, Abbott Critical Care Systems, USA) για τη συνεχή καταγραφή της αρτηριακής πίεσης (συστολικής και διαστολικής) και της κεντρικής φλεβικής πίεσης (CVP) (Εικόνα 4.2.4). Μετά τον καθετηριασμό, γινόταν συρραφή της παρατραχειακής τομής και το χειρουργικό πεδίο καλυπτόταν με αποστειρωμένες γάζες προκειμένου να αποφευχθεί απώλεια θερμότητας.

Μετά τους χειρουργικούς χειρισμούς τα ζώα σταθεροποιούνταν για τουλάχιστον μισή ώρα. Ως σταθεροποίηση ορίστηκε: α) καρδιακή συχνότητα στο 10% της καρδιακής συχνότητας πριν τους χειρουργικούς χειρισμούς, β) πίεση δεξιού κόλπου 2 - 8 mmHg, γ) μέση αρτηριακή πίεση 60 – 80 mmHg, δ) pH αίματος 7.35 – 7.45, ε) HbSat 90% - 95%, στ) θερμοκρασία ορθού 38.5 – 39.5 °C. Στο monitor καταγράφονταν οι πιέσεις και τα αντίστοιχα κύματα.

Με τη σταθεροποίηση των ζώων και πριν τη μετάβαση στην επόμενη φάση του πειράματος (πρόκληση υποξαιμίας), γινόταν συλλογή δειγμάτων αρτηριακού αίματος και ούρων (με υπερηβική παρακέντηση).

Υποξαιμία

Μετά από τη σταθεροποίηση γινόταν πρόκληση υποξαιμίας ($PaO_2 < 60$ mmHg) με μείωση του εισπνεόμενου O_2 (FiO_2 0.06 – 0.08) αυξάνοντας την συγκέντρωση του εισπνεόμενου αζώτου μέχρι να επιτευχθεί αιμοδυναμική αστάθεια, δηλαδή βραδυκαρδία (< 60 σφύξεις/λεπτό) ή μέση αρτηριακή πίεση < 15 mmHg. Ταυτόχρονα σταματούσαμε την αντλία συνεχούς στάγδην ενδοφλέβιας χορήγησης προποφύλης. Στο σημείο αυτό, γινόταν άμεση λήψη δειγμάτων αίματος από την αρτηριακή γραμμή και επιβεβαίωση της υποξαιμίας με αέρια αρτηριακού αίματος (pO_2 30 - 50 mmHg). Σε αυτή τη φάση καταγράφονταν η διάρκεια του υποξαιμικού επεισοδίου και οι τιμές του

monitor. Ως διάρκεια του υποξαιμικού επεισοδίου ορίσαμε το χρόνο που χρειάστηκε το κάθε ζώο για να εμφανίσει αιμοδυναμική αστάθεια.

Επανοξυγόνωση

Τα χοιρίδια τυχαιοποιούνταν σε 4 ομάδες των 10 χοιριδίων που επανοξυγονώνονταν με διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2 (ομάδα 1 με 18%, 2 με 21%, 3 με 40% και 4 με 100% O_2). Για αυτή τη διαδικασία, η ένδειξη του οξυγόνου του αναπνευστήρα καλύπτονταν και η χορήγηση οξυγόνου στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γινόταν από ανεξάρτητο προς την έρευνα άτομο, έτσι ώστε οι ερευνητές να μην γνωρίζουν το εκάστοτε χοιρίδιο σε ποια ομάδα ανήκει (ομάδα 1, ομάδα 2, ομάδα 3, ομάδα 4). Η διάρκεια της επανοξυγόνωσης ορίστηκε μέχρι την αποκατάσταση της καρδιακής συχνότητας και της μέσης αρτηριακής πίεσης στα βασικά επίπεδα (baseline). Εάν η καρδιακή συχνότητα παρέμενε χαμηλή ή παρουσιαζόταν ασυστολία, εφαρμόζαμε καρδιοαναπνευστική αναζωογόνηση σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες ανάνηψης νεογνού (NLS, Newborn Life Support) που δημοσιεύτηκαν από την ILCOR (International Liaison Committee Of Resuscitation) το 2005. Παρά ταύτα, κάποια ζώα δεν κατάφεραν να ανανήψουν μετά από 20 λεπτά αναζωογόνησης. Η αναισθησία διατηρήθηκε με τη συνεχή στάγδην ενδοφλέβια έγχυση προποφόλης.

Στη λήξη του πειράματος τα ζώα ετέθησαν σε ευθανασία με ενδοφλέβια χορήγηση θειοπεντάλης (Pentothal, Hospira Enterprises BV, The Netherlands) με μία δόση 3 mg/kg. Ο θάνατός τους επιβεβαιωνόταν με ισοηλεκτρική γραμμή στο ηλεκτροκαρδιογράφημα και με ακρόαση καρδιάς. Έπειτα ακολουθούσε νεκροψία.

Ομάδα ελέγχου (control group)

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν τέσσερα αρσενικά νεογνά χοιρίδια (Landrace/Large White) τα οποία δεν υπέστησαν υποξία.

Τα ζώα τοποθετούνταν σε ύπτια θέση και γινόταν μία κάθετη τομή στο μέσο της κοιλιακής χώρας (Εικόνα 4.2.5). Μετά την αποκάλυψη των νεφρών γινόταν η συλλογή τους και τοποθετούνταν σε κατάλληλα υλικά συντήρησης (δεξιός νεφρός σε φορμόλη 10% και αριστερός νεφρός σε υγρό άζωτο και μετά συντήρηση στους -80°C) ώσπου να εξεταστούν για οποιαδήποτε υποκείμενη παθολογία, είτε για βλάβη που προέκυπτε από την υποξία και την επανοξυγόνωση με διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2 . Επίσης, σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας (baseline, υποξία, επανοξυγόνωση) γινόταν συλλογή ούρων μέσω υπερηβικής παρακέντησης.

Οι νεφρικοί ιστοί, μεταφέρθηκαν σε δεύτερο χρόνο υπό ειδικές συνθήκες στην Σαρδηνία Ιταλίας όπου έγινε η ανάλυση των δειγμάτων από το εργαστήριο Department of Surgery, Section of Pathology, University of Cagliari, Italy. Οι νεφροί που ήταν διατηρημένοι σε φορμόλη σταθεροποιούνταν σε block παραφίνης. Οι πέντε τομές του κάθε block παραφίνης χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη, ηωσίνη και PAS (Periodic Acid Schiff) και παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο 0.05 και η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το chi-square test (χ^2 test).

Όλα τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως ότου γίνει η NMR ανάλυση για την οποία χρησιμοποιήθηκε Varian 400 Unity Inova φασματόμετρο. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν όλες οι μεταβολικές πληροφορίες από το NMR φάσμα χρησιμοποιήθηκε ένα λογισμικό πρόγραμμα της Mnova (Mestrelab Research S.L.). Έγινε χωρισμός των δεδομένων σε «δοχεία» πλάτους 0.04 ppm στην περιοχή χημικού ενδιαφέροντος: $[10 - 5.5] - [4.5 - 0]$ ppm. Η περιοχή του νερού δεν αναλύθηκε ($4.5 - 5 - 5.5$ ppm). Η ανάλυση πολλών μεταβλητών έγινε με τη χρήση του SIMCA-P (Version 12, Umetrics, Umea°, Sweden) λογισμικού πακέτου. Η στατιστική ανάλυση έγινε με Principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS) and PLS - discriminant analysis (PLS - DA).



Εικόνα 4.2.1: Διασωλήνωση αναισθητοποιημένου χοίρου



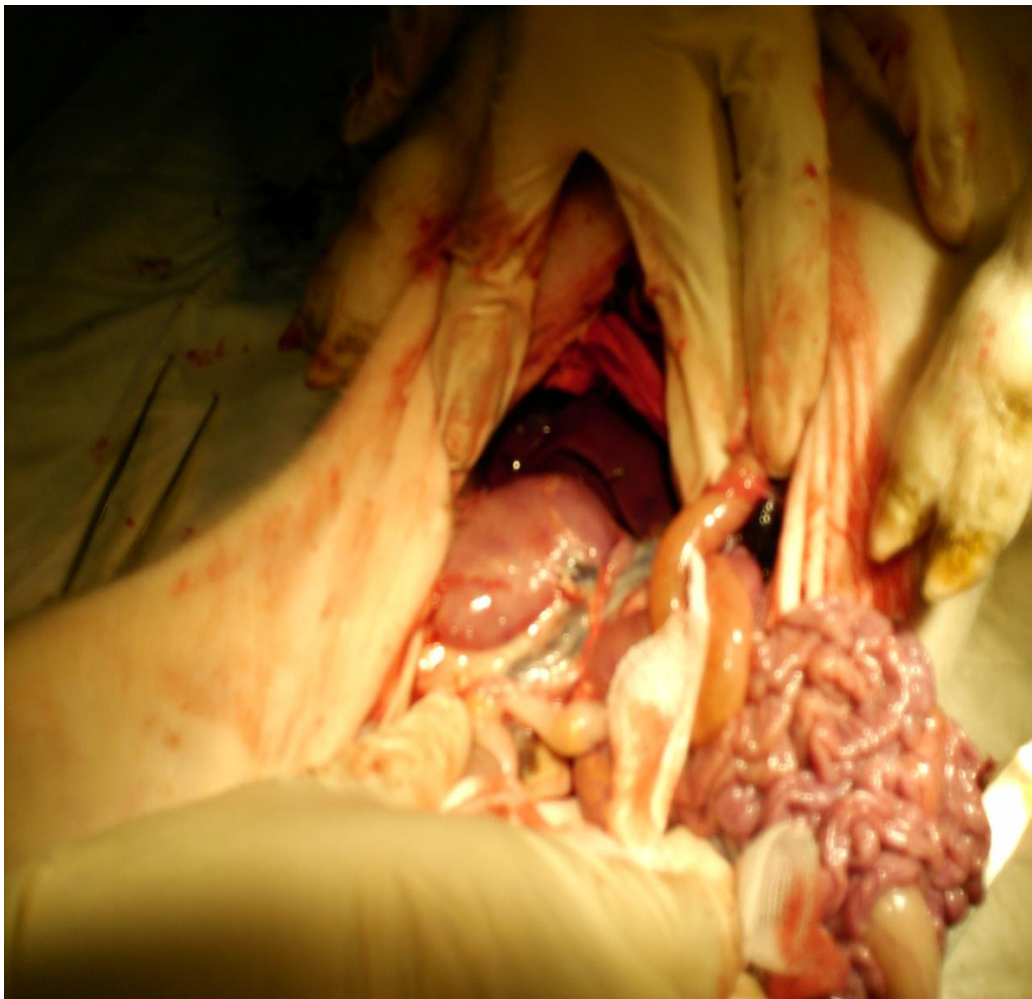
Εικόνα 4.2.2: Έλεγχος θέσης τραχειοσωλήνα αμέσως μετά τη διασωλήνωση



Εικόνα 4.2.3: Παρατραχειακή τομή και αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας και καρωτίδας



Εικόνα 4.2.4: Σύνδεση καθετήρων έσω σφαγίτιδας και καρωτίδας με εξωτερικούς μορφομετατροπείς για την καταγραφή κεντρικής φλεβικής πίεσης και συστολικής, μέσης και διαστολικής αρτηριακής πίεσης. Φαίνεται η τοποθέτηση παλμικού οξύμετρου στη γλώσσα του ζώου για συνεχή καταγραφή κορεσμού οξυγόνου.



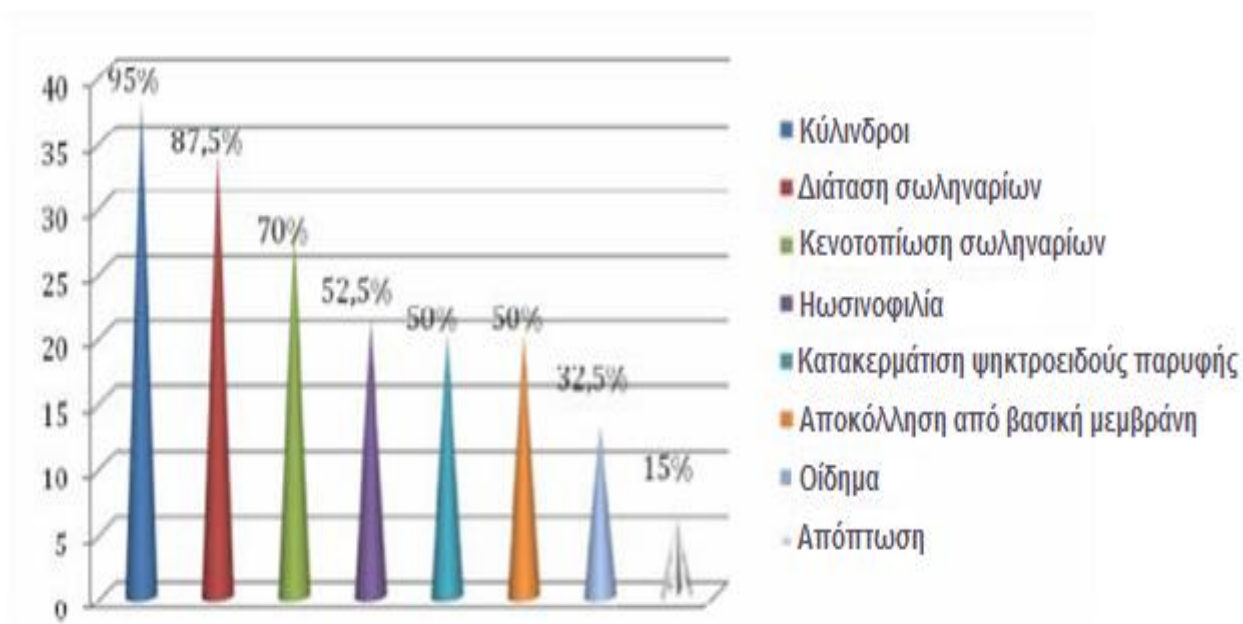
Εικόνα 4.2.5: Αποκάλυψη δεξιού νεφρού του χοίρου μετά από κάθετη τομή στη μέση γραμμή της κοιλιακής χώρας

4.3 Αποτελέσματα

Ιστολογική μελέτη των νεφρών

Οι νεφροί της ομάδας ελέγχου διατήρησαν την αρχιτεκτονική τους. Σωληναριο - σπειραματικά οζίδια παρατηρήθηκαν και στα 4 ζώα της ομάδας ελέγχου, αποτελώντας ένδειξη ενεργούς σπειραματογένεσης, όπως έχει αποδειχτεί σε πρόσφατη μελέτη [214]. Επίσης, παρατηρήθηκαν μερικά «γερασμένα» σπειράματα με διαφορετικό βαθμό σπειραματικής σκλήρυνσης στον έσω φλοιό καθώς και λίγοι διάσπαρτοι PAS - θετικοί κύλινδροι στα σωληνάκια.

Σε όλους τους νεφρούς που υπέστησαν υποξία παρατηρήθηκαν παθολογικές ιστολογικές αλλαγές κυρίως στα σωληναρικά κύτταρα (Εικόνα 4.3.1), όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:

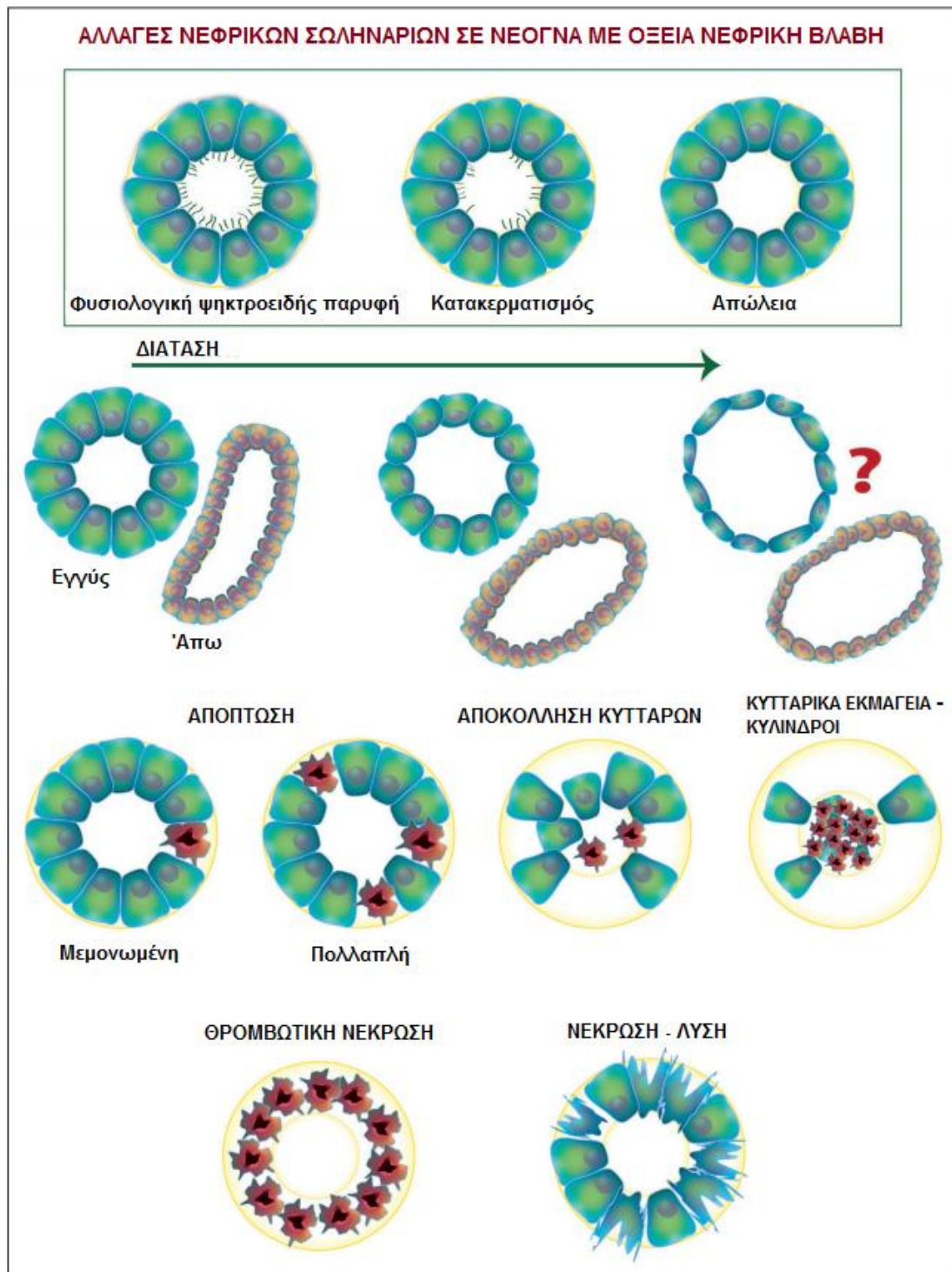


Ιστολογικές αλλοιώσεις των νεφρών αναλυτικά:

- 1) Διάταση του αυλού των σωληναρίων (tubular dilatation): Παρατηρήθηκε κυρίως στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια στο 87.5% των δειγμάτων (35/40). Σε 7/35 περιπτώσεις η διάταση ήταν διάχυτη, ακόμα και σε υποκαψικές περιοχές και σε αναπτυσσόμενους νεφρώνες.
- 2) Κενοτοπίωση των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων (tubular vacuolization): Παρατηρήθηκε στο 70% των δειγμάτων (28/40), κυρίως στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια, και καταλάμβαναν το κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων κυττάρων (Εικόνα 4.3.2). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν εστιακή και εντοπιζόταν στο όριο φλοιού - μυελού, ενώ σε 7 δείγματα ήταν διάχυτη. Σε λίγες περιπτώσεις η κενοτοπίωση εντοπίστηκε σε υποκαψικές περιοχές.
- 3) Απόπτωση (apoptosis): Παρατηρήθηκε στο 15% των δειγμάτων (6/40) και εντοπιζόταν κυρίως στα σωληναριακά κύτταρα. Τα αποπτωτικά κύτταρα χαρακτηρίζονταν από κατακερματισμό και σχηματισμό ηωσινοφιλικών σφαιριδίων μερικά από τα οποία περιείχαν πυρηνικά κατάλοιπα (Εικόνα 4.3.3). Οι αποπτωτικές περιοχές ήταν PAS - θετικές. Στα σπειράματα δεν παρατηρήθηκε απόπτωση.
- 4) Ηωσινοφιλία (tubular eosinophilia): Παρατηρήθηκε στο 52.5% των δειγμάτων (21/40). Η εντόπισή της ήταν σε σωληνάρια μεμονομένων νεφρώνων που το κυτταρόπλασμά τους ήταν έντονα χρωματισμένο με ηωσίνη. Ηωσινοφιλία παρατηρήθηκε και στον έσω αλλά και στον έξω φλοιό και σχετιζόταν με άλλες ιστολογικές αλλοιώσεις όπως την κενοτοπίωση.
- 5) Κύλινδροι (tubular casts): Παρατηρήθηκαν στο 95% των δειγμάτων (38/40) καθώς και σε όλα τα δείγματα της ομάδας ελέγχου. Ήταν κυρίως υαλώδεις και παρατηρήθηκαν κυρίως σε περιοχές με κενοτοπίωση και διάμεσο οίδημα. Σε λίγα δείγματα παρατηρήθηκαν κοκκώδεις κύλινδροι σε περιοχές με απόπτωση.
- 6) Οίδημα (oedema): Παρατηρήθηκε στο 32.5% των δειγμάτων (13/40). Σε δέκα δείγματα το οίδημα ήταν εντοπισμένο στις υποφλοιικές περιοχές και σε τρία δείγματα το διάμεσο οίδημα ήταν διάχυτο σε όλο τον φλοιό.

- 7) Αποκόλληση των σωληναριακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη (sloughing): Παρατηρήθηκε στο 50% των δειγμάτων (20/40) στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια και σε ολόκληρο τον φλοιό. Σε μία περίπτωση το sloughing ήταν διάχυτο (> 50% των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων).
- 8) Κατακερμάτιση ψηκτροειδούς παρυφής (fragmentation of brush border): Παρατηρήθηκε στο 50% των δειγμάτων (20/40). Η ψηκτροειδής παρυφή έχασε την ακεραιότητά της, κατακερματίστηκε και ήταν απύσχα σε ένα μέρος των κυττάρων του αυλού. Σχετίστηκε περισσότερο με το sloughing, τη διάταση και την κενотоπίωση.
- 9) Αλλαγές σπειράματος (glomerular changes): Παρατηρήθηκαν σε όλα τα δείγματα και κυρίως στον έσω φλοιό και στην φλοιο - μυελική συμβολή. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν ήταν πολλαπλασιασμός των μεσαγγειακών κυττάρων, σπειραματοσκλήρυνση, ίνωση και κύτταρα σαν «μισοφέγγαρα» (Εικόνα 4.3.4) οι οποίες εντοπίζοταν και σε υποκαψικές περιοχές. Στον έσω φλοιό όλων των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου παρατηρήθηκε εστιακή σπειραματοσκλήρυνση. Επομένως, αυτή η περιοχή του σπειράματος δεν θα συζητηθεί αφού αυτές οι αλλαγές πιθανώς να χαρακτηρίζουν τους ανώριμους νεφρούς.

Η στατιστική ανάλυση έγινε χωρίζοντας τα χοιρίδια τόσο σε 4 ομάδες με βάση τη συγκέντρωση του χορηγούμενου O_2 κατά την επανοξυγόνωση (Πίνακας 4.3.1) όσο και σε 5 ομάδες με βάση το χρόνο ανάνηψης (Πίνακας 4.3.2). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφορά στις αλλοιώσεις των νεφρών μεταξύ των διάφορων ομάδων (chi-square test, στατιστική σημαντικότητα στο 0.05).



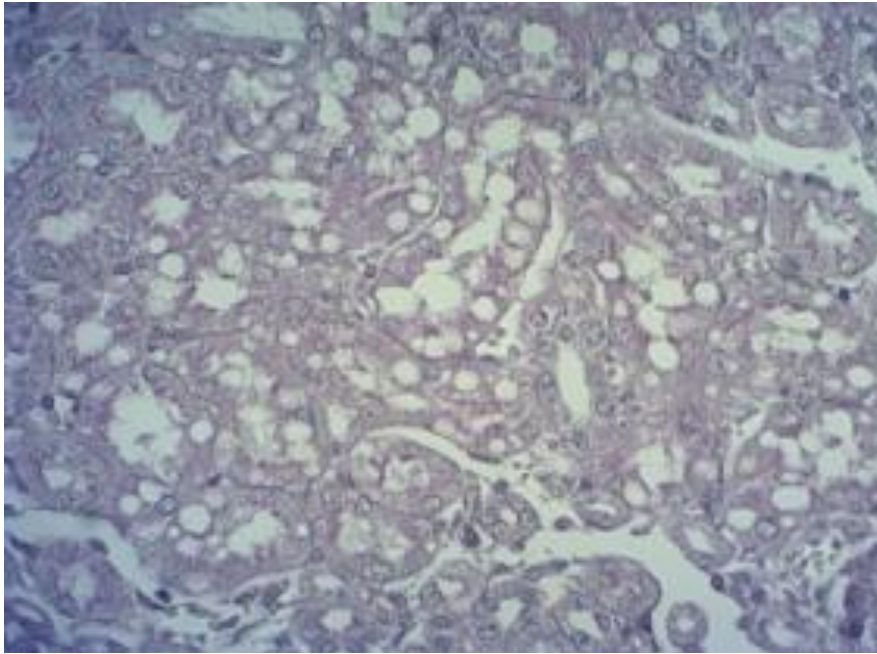
Εικόνα 4.3.1: Σχηματική απεικόνιση των ιστολογικών αλλαγών κατά την οξεία νεφρική βλάβη στα νεογνά (τροποποιημένη από [215]).

Πίνακας 4.3.1: Τέσσερις ομάδες ζώων με βάση τη χορηγούμενη συγκέντρωση οξυγόνου κατά την επανοξυγόνωση και έκβαση πειράματος

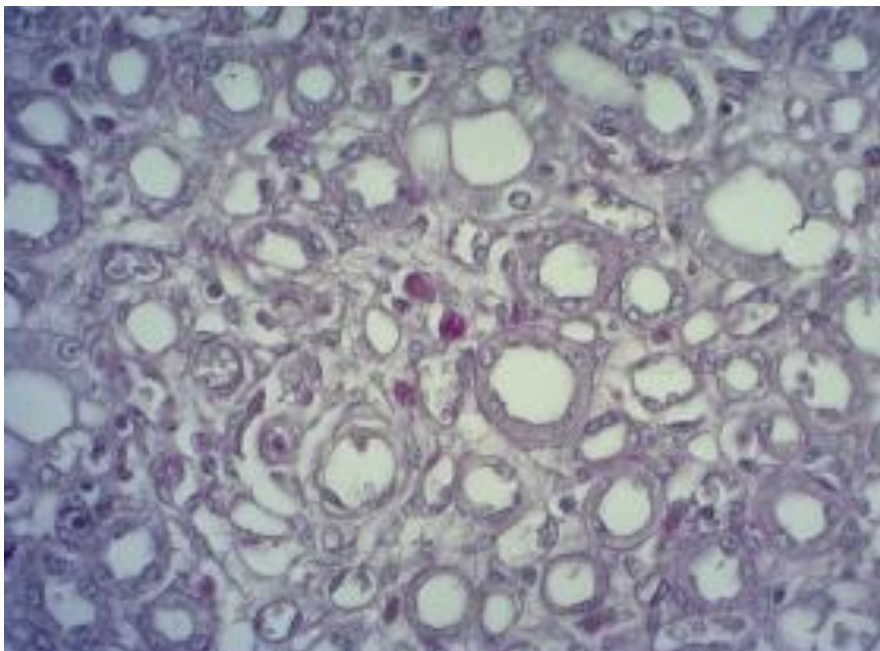
	O₂	Θάνατοι	Επιζήσαντα	Μέσος χρόνος ανάνηψης
Ομάδα 1	18%	3	7	5 λεπτά – 26 λεπτά
Ομάδα 2	21%	1	9	7 λεπτά – 75 λεπτά
Ομάδα 3	40%	2	8	12 λεπτά – 142 λεπτά
Ομάδα 4	100%	3	7	30 λεπτά – 120 λεπτά

Πίνακας 4.3.2: Τα νεογνά χοιρίδια της μελέτης χωρισμένα σε πέντε ομάδες ανάλογα με το χρόνο ανάνηψης και οι αντίστοιχες ιστολογικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν.

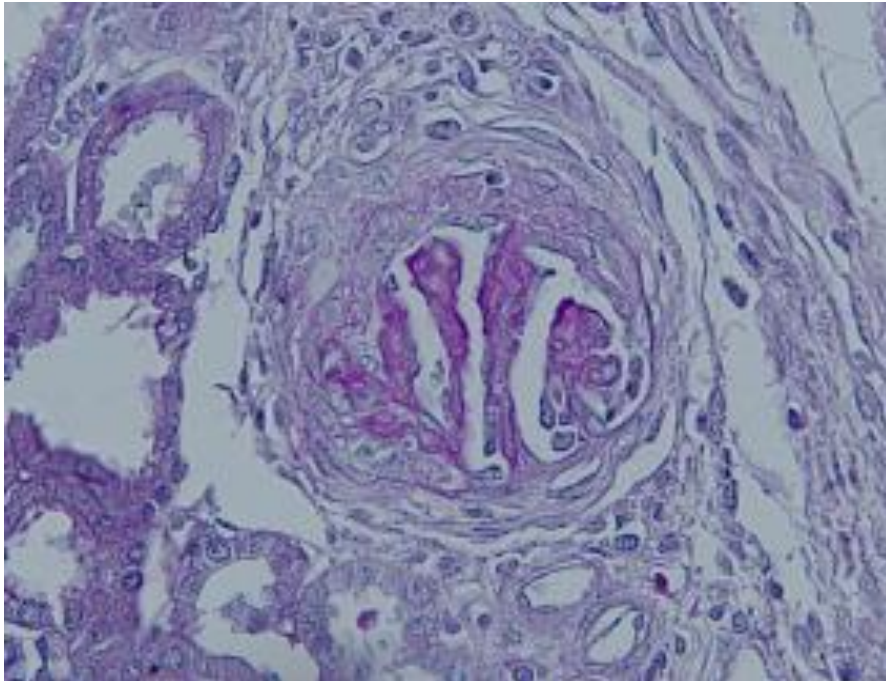
	Ανάνηψη				
	Ομάδα Α Γρήγορη < 15'	Ομάδα Β Μέτρια 16' – 45'	Ομάδα Γ Αργή 45' – 90'	Ομάδα Δ Πολύ αργή > 90'	Ομάδα Ε Θάνατος
Οίδημα	12,5%	50%	28,5%	0%	44,4%
Ηωσινοφιλία	50%	50%	42,8%	100%	44,4%
Διάταση σωληναρίων	87,5%	83,3%	85,7%	75%	100%
Κύλινδροι	100%	100%	85,7%	100%	88,8%
Κενοτοπίωση σωληναρίων	75%	83,3%	42,8%	75%	66,6%
Αποκόλληση από βασική μεμβράνη	75%	41,6%	42,8%	25%	55,5%
Κατακερμάτιση ψηκτροειδούς παρυφής	75%	41,6%	42,8%	25%	55,5%
Απόπτωση	25%	8,3%	0%	25%	22,2%



Εικόνα 4.3.2: Κενोटόπια εγγύς νεφρικών σωληναρίων.



Εικόνα 4.3.3: Απόπτωση



Εικόνα 4.3.4: Ινώδη και κυτταρικά «μυσοφέγγα» που σχετίζονται με καταστροφή των σπειραμάτων

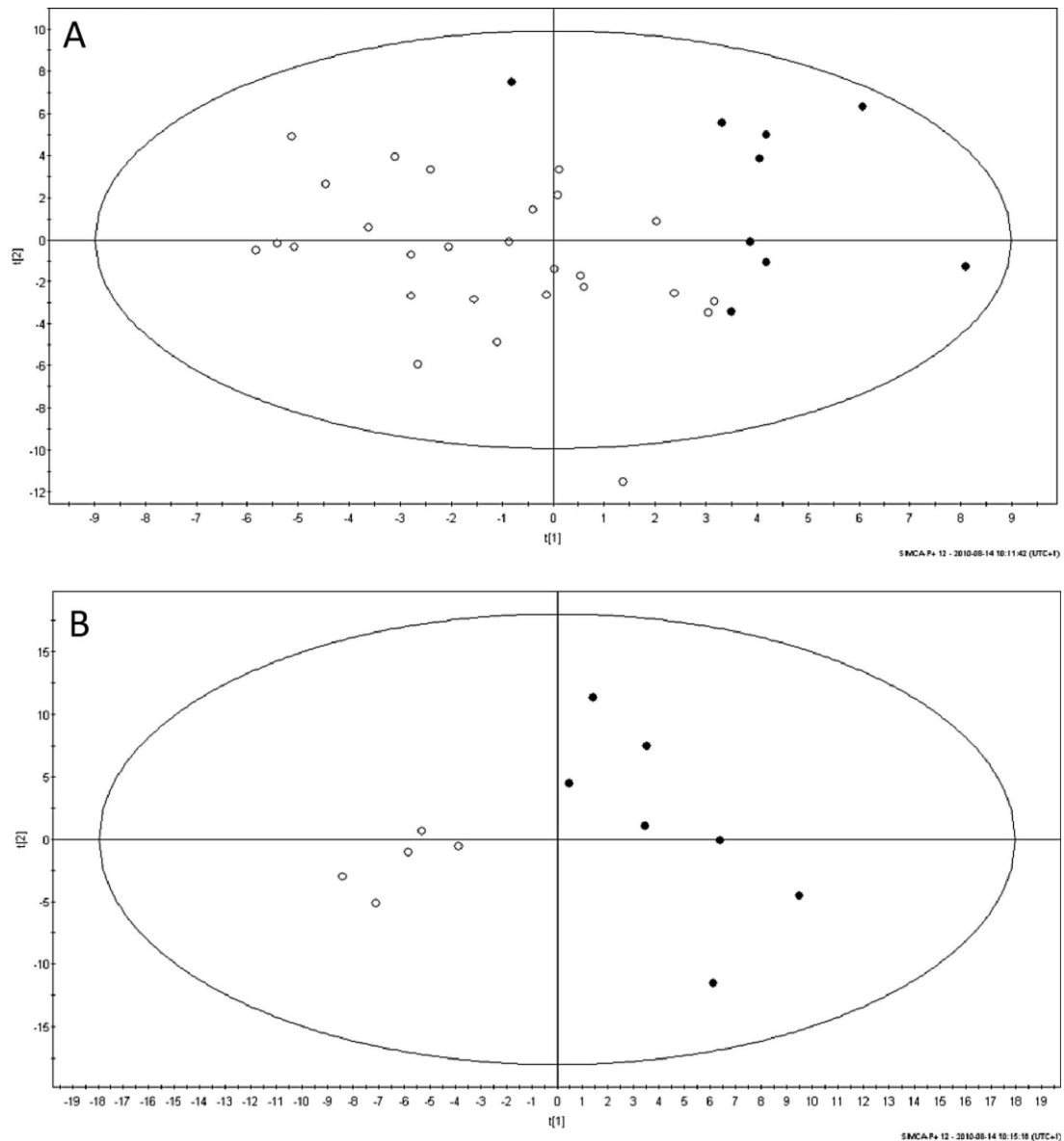
Τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες έτσι ώστε να αναζωογονηθούν με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (18%, 21%, 40%, 100%) μετά την υποξία. Τα ούρα που ελήφθησαν προ της υποξίας ήταν τα «βασικά» ούρα (baseline). Μετά την υποξία δεκατρία ζώα παρουσίασαν ασυστολία εκ των οποίων τέσσερα επανήλθαν στη ζωή μετά την ανάνηψη και εννέα απεβίωσαν (Πίνακας 4.3.3). Χρησιμοποιώντας την NMR φασματομετρία, μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ των ούρων προ της υποξίας (baseline) στα χοιρίδια με και χωρίς ασυστολία έτσι ώστε να εξετασθεί εάν τα διαφορετικά μεταβολικά προφίλ σχετίζονται με τη διαφορετική ανταπόκριση στην επανοξυγόνωση. Η PCA ανάλυση δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα, η PLS (Partial Least Squares) ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μεταβολικό προφίλ ανάμεσα στα ζώα με και χωρίς ασυστολία ($R^2_X=0.24$, $R^2_Y=0.66$) (Σχήμα 4.3.1.A).

Ανάλογες σημαντικές διαφορές στο μεταβολικό προφίλ βρέθηκαν ανάμεσα στα ζώα που απεβίωσαν και σε εκείνα που δεν παρουσίασαν ασυστολία και ανένηψαν γρήγορα < 20 λεπτά (Σχήμα 4.3.1.B). Σημαντικές ήταν και οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων των χοιριδίων που επανοξυγονώθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, συγκρίνοντας το μεταβολικό προφίλ στην αρχή του πειράματος (baseline) και στο τέλος (φάση επανοξυγόνωσης). Οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που συνέβαλαν στη διαφοροποίηση των παραπάνω ομάδων ήταν η ουρία, η κρεατινίνη, το μηλονικό οξύ, η μεθυλ-γουανιδίνη και το υδροξυ-ισοβουτυρικό οξύ.

Πίνακας 4.3.3

χοιρίδιο	% O2	Χρόνος ανάνηψης (λεπτά)	έκβαση
1	18%	5	
2	18%	8	A/A
3	18%	10	
4	18%	15	A/A
5	18%	15	
6	18%	θάνατος	A/Θ
7	18%	26	
8	18%	θάνατος	A/Θ
9	18%	θάνατος	A/Θ
10	18%	23	
11	21%	20	
12	21%	θάνατος	A/Θ
13	21%	10	
14	21%	25	
15	21%	7	
16	21%	37	
17	21%	46	
18	21%	42	
19	21%	42	
20	21%	75	A/A
21	40%	12	
22	40%	48	A/A
23	40%	107	
24	40%	142	
25	40%	41	
26	40%	122	
27	40%	θάνατος	A/Θ
28	40%	68	
29	40%	θάνατος	A/Θ
30	40%	72	
31	100%	85	
32	100%	120	
33	100%	44	
34	100%	θάνατος	A/Θ
35	100%	58	
36	100%	θάνατος	A/Θ
37	100%	33	
38	100%	θάνατος	A/Θ
39	100%	30	
40	100%	29	

A/A: ασυστολία/ανάνηψε, A/Θ: ασυστολία/θάνατος



Σχήμα 4.3.1: **A.** PLS scores plot (SIMCA-P + 12), ^1H NMR φασματομετρία των ούρων των χοιριδίων. (●) ομάδα χοιριδίων με ασυστολία και (○) ομάδα χοιριδίων χωρίς ασυστολία. **B.** PLS-DA scores plot (SIMCA-P + 12), ^1H NMR φασματομετρία των ούρων των χοιριδίων. (●) θάνατος και (○) σύντομος χρόνος ανάνηψης (< 20 λεπτά).

4.4 Συζήτηση

Η περιγεννητική ασφυξία παραμένει ένα σημαντικό αίτιο νεογνικής θνησιμότητας. Ο νεφρός είναι ένα όργανο ιδιαίτερα ευαίσθητο στην υποξία [207], αφού τα νεφρικά σωληνάκια έχουν αυξημένο μεταβολικό ρυθμό και αυξημένες ανάγκες σε οξυγόνο για τη ρύθμιση των υγρών του σώματος και την αερόβια γλυκόλυση [216, 217]. Η μειωμένη παροχή οξυγόνου στους νεφρούς προκαλεί κυτταρική δυσοξία, δηλαδή μία παθολογική κατάσταση κατά την οποία τα μιτοχόνδρια χάνουν την ικανότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [207]. Απόρροια της νεφρικής δυσοξίας είναι η εμφάνιση συμπτωμάτων οξείας νεφρικής βλάβης ή ανεπάρκειας, όπως ολιγουρία, ανουρία, οίδημα, υπερκαλιαιμία [218]. Η οξεία νεφρική βλάβη παρατηρείται στο 8 - 24% των νεογνών στις μονάδες εντατικής νοσηλείας [11] και παρουσιάζει 40% θνησιμότητα [219]. Αν και επικρατεί η άποψη ότι η οξεία σωληναριακή νέκρωση αποτελεί το κύριο συμβάν κατά την οξεία νεφρική βλάβη, δεδομένα από ασθενείς έδειξαν ελάχιστη ή καθόλου νέκρωση των σωληναρίων [220, 221]. Ιστολογικές αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες οξείας νεφρικής βλάβης είναι η καταστροφή της ψηκτροειδούς παρυφής, η κενотоπίωση των σωληναριακών κυττάρων, η απόπτωση και οι κύλινδροι από νεκρωτικά επιθηλιακά κύτταρα [216]. Σε χοιρίδια με περιτονίτιδα και σηπτική καταπληξία παρατηρήθηκαν ελάχιστες ιστολογικές αλλαγές, όπως ήπια καταστροφή ψηκτροειδούς παρυφής και κενотоπίωση των σωληναριακών κυττάρων [222], ενώ σε νεογνά χοιρίδια που υπέστησαν καρδιοπνευμονική παράκαμψη παρατηρήθηκαν διάταση σωληναρίων, κενотоπία, λευκοκυτταρική διήθηση, καταστροφή των επιθηλίων και διάμεσο οίδημα [223].

Παρά τις εξελίξεις τη τελευταία δεκαετία για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού κατά τον οποίο η περιγεννητική ασφυξία προκαλεί ιστική καταστροφή, είναι ακόμη άγνωστος ο ακριβής μηχανισμός της οξείας νεφρικής βλάβης. Μερικοί επιστήμονες πιστεύουν πως η υποξία έχει κυρίαρχο ρόλο στην οξεία νεφρική βλάβη [207], ενώ άλλοι υποστηρίζουν πως η επανοξυγόνωση έχει σημαντικό ρόλο στο θάνατο των σωληναριακών κυττάρων [224].

Η παρούσα μελέτη δίνει πληροφορίες για τις ιστολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στους νεφρούς νεογνών χοιριδίων μετά από οξεία ασφυξία και

επανοξυγόνωση. Οι περισσότερες ιστολογικές αλλοιώσεις συνέβησαν στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια και αμέσως μετά στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα σπειράματα ή στα αγγεία. Επομένως, τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια φαίνεται να είναι ο στόχος της υποξίας, λόγω του υψηλού μεταβολικού τους ρυθμού και της αερόβιας γλυκόλυσης [207]. Τα άπω εσπειραμένα σωληνάρια παρουσίασαν ιστολογικές αλλοιώσεις παρά το χαμηλότερο μεταβολικό τους ρυθμό. Σε αυτά παρατηρήθηκε κυρίως η διάταση των σωληναριακών αυλών, ενώ η κενотоπίωση παρατηρήθηκε τόσο στα άπω όσο και στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια. Σύμφωνα με την κλασσική κατάταξη των νεφρικών νοσημάτων σε σπειραματικά, σωληναριακά και αγγειακά, μπορούμε να κατατάξουμε την οξεία νεφρική βλάβη στην ομάδα των νοσημάτων που προκαλούν βλάβη των νεφρικών σωληναρίων και όχι του σπειράματος ή των αγγείων. Τα ιστολογικά ευρήματα της μελέτης βοηθούν στο καθορισμό της ιστολογικής μελέτης κατά την οξεία νεφρική βλάβη στα νεογνά και ενισχύουν τον σχεδιασμό προοπτικών μελετών που θα αξιολογούν πιθανές προληπτικές και θεραπευτικές στρατηγικές σε μία τόσο σοβαρή κλινική κατάσταση.

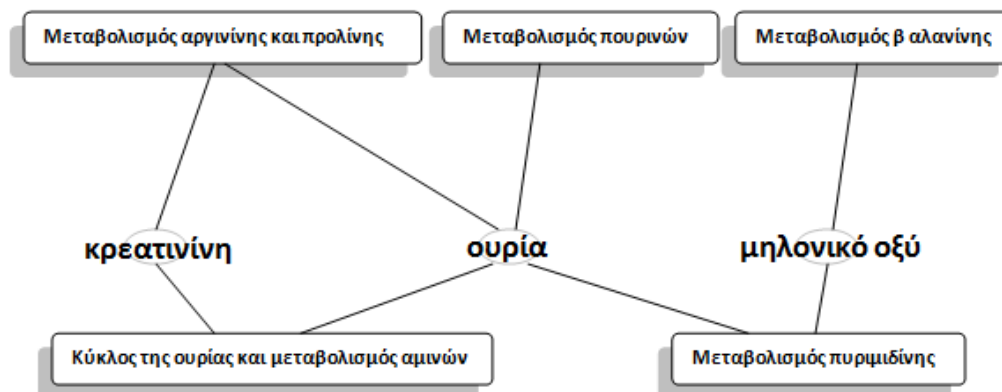
Μελετώντας τους νεφρούς με βάση τη συγκέντρωση του O_2 κατά τη φάση της επανοξυγόνωσης, διαπιστώθηκε πως δεν υπήρχε κάποια διαφορά στην επίπτωση των ιστολογικών αλλοιώσεων μεταξύ των τεσσάρων ομάδων (Πίνακας 4.3.1). Λόγω του οξέος χαρακτήρα του πειράματος και της ευθανασίας των ζώων, δεν μπορούμε να μελετήσουμε μακροχρόνιες επιπτώσεις στους νεφρούς από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις O_2 κατά την επανοξυγόνωση. Αντίθετα, πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η συγκέντρωση οξυγόνου που χρησιμοποιείται κατά την ανάνηψη των νεογνών φαίνεται να επηρεάζει την ισορροπία προ- και αντι- αγγειογεννητικών παραγόντων [224]. Σε νεογνά χοιρίδια η επανοξυγόνωση με 100% οξυγόνο μετά την υποξία προκάλεσε μείωση των επιπέδων της αγγειοστατίνης και του πλασμινογόνου που πιθανώς παίζουν σημαντικό ρόλο στη νεφρική βλάβη και την περαιτέρω ανάπτυξη των νεφρών [224]. Επίσης, μελέτη των Vento *et al* έδειξε ότι η χρήση του ατμοσφαιρικού αέρα κατά την ανάνηψη των νεογνών προκάλεσε λιγότερη βλάβη στους νεφρούς και την καρδιά σε σύγκριση με τη χορήγηση 100% οξυγόνου [175].

Σημαντικά δεδομένα προέκυψαν όταν τα χοιρίδια χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες με βάση το χρόνο ανάνηψης (Πίνακας 4.3.2). Το *διάμεσο οίδημα* φαίνεται να είναι μια ιστολογική αλλοίωση που αργεί να εμφανιστεί αφού παρατηρήθηκε μόνο στο 12.5% των χοιριδίων που ανένηψαν σε χρόνο < 15 λεπτά (ομάδα Α). Αντίθετα, η *ηωσινοφιλία* στα σωληναριακά κύτταρα φαίνεται να είναι μια ιστολογική αλλοίωση που εμφανίζεται νωρίς αφού παρατηρήθηκε στο 50% των χοιριδίων της ομάδας Α καθώς και στα αποθανόντα χοιρίδια. Η *διάταση* των άπω εσπειραμένων σωληναρίων παρατηρήθηκε στο 87.5% των χοιριδίων της ομάδας Α και σε όλους τους νεφρούς των αποθανόντων χοιριδίων. Αυτό το αποτέλεσμα καθιστά τη διάταση των άπω εσπειραμένων σωληναρίων ως την πιο άμεση ιστολογική αλλοίωση στην υποξία - επανοξυγόνωση. Επομένως, τα άπω εσπειραμένα σωληνάρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξεία νεφρική βλάβη λόγω υποξίας - επανοξυγόνωσης. Οι σωληναριακοί *κύλινδροι* παρατηρήθηκαν στην πλειοψηφία των δειγμάτων καθώς και στους νεφρούς της ομάδας ελέγχου, γεγονός που τους καθιστά λιγότερο σημαντικούς στην οξεία νεφρική βλάβη. Η εμφάνιση *κενοτοπίων* στο κυτταρόπλασμα των εγγύς και άπω εσπειραμένων σωληναρίων παρατηρήθηκε στο 75% της ομάδας Α με γρήγορη ανάνηψη (< 15 λεπτά). Σε αντίθεση με τις άλλες βλάβες, η συχνότητα της κενοτοπίωσης δεν αυξήθηκε σημαντικά στα χοιρίδια με πιο καθυστερημένη ανάνηψη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μόνο στο 66.6% των αποθανόντων χοιριδίων που πιθανώς δεν έζησαν αρκετό χρόνο μετά την υποξία ώστε να σχηματιστούν τα κενοτόπια. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και για την *αποκόλληση των σωληναριακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη* (sloughing) και τις *αλλαγές της ψηκτροειδούς παρυφής*. Παρατηρήθηκαν στο 75% των νεφρών της ομάδας Α και μειώθηκε η συχνότητα στα χοιρίδια που ανένηψαν αργά και πολύ αργά (Πίνακας 4.3.2). Η μικρή συχνότητα (25%) εμφάνισης της *απόπτωσης* στα χοιρίδια που ανένηψαν γρήγορα (< 15 λεπτά) ίσως οφείλεται στο μικρό χρονικό διάστημα κατά το οποίο δεν προλαβαίνει να ολοκληρωθεί η διαδικασία της απόπτωσης. Σε αντίθεση, η εμφάνιση της απόπτωσης σε ποσοστό 25% στα χοιρίδια με πολύ αργή ανάνηψη (> 90 λεπτά) μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η απόπτωση κατέχει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της οξείας νεφρικής βλάβης λόγω υποξίας - επανοξυγόνωσης. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορούμε να υποθέσουμε πως το

sloughing αποτελεί τη μορφολογική ένδειξη της απόπτωσης των σωληναριακών κυττάρων.

Η έκβαση του πειράματος (ανάνηψη ή ανακοπή - θάνατος) φαίνεται να εξαρτάται από το αρχικό μεταβολικό προφίλ των χοιριδίων προ της υποξίας. Η ^1H NMR μεταβολική ανάλυση των ούρων είναι ικανή να εκτιμήσει τη μεταβολική κατάσταση προ και μετά την επανοξυγόνωση. Η εξακρίβωση ειδικών μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με ειδικές συνθήκες θα μπορούσε να εξηγήσει καλύτερα τη βιολογική τους λειτουργία και να τα κάνει χρήσιμα στην κλινική πράξη όσον αφορά στη διάγνωση και θεραπεία. Μερικοί από τους διαφοροδιαγνωστικούς μεταβολίτες, όπως το μηλονικό οξύ, η ουρία, η κρεατινίνη, είναι γνωστό ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο σε νευρολογικές και νεφρικές δυσλειτουργίες, στον ATP μεταβολισμό και στον κυτταρικό θάνατο (Σχήμα 4.3.2).

Η στατιστική ανάλυση των ούρων έδειξε διαφορές στα βασικά μεταβολικά προφίλ (baseline) ανάμεσα στα χοιρίδια που έπαθαν ασυστολία και σε αυτά που επιβίωσαν. Αυτό το αποτέλεσμα μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο βασικός μεταβολικός φαινότυπος καθορίζει την απάντηση στην επανοξυγόνωση. Επιπλέον, γνωρίζοντας ποια μεταβολικά μονοπάτια επηρεάζονται από τη χορήγηση οξυγόνου, μπορούμε να έχουμε ένα θεραπευτικό σημείο - στόχο για να μειώσουμε τις αρνητικές επιδράσεις της θεραπείας. Η μεταβολομική ανάλυση των ούρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως στη νεογνολογία [225, 226], όπως για τη διάγνωση, τη σταδιοποίηση, την παρακολούθηση της θεραπείας, την πρόγνωση και τη θεραπεία.



Σχήμα 4.3.2: Αλληλεπιδράσεις και λειτουργίες μερικών από τους υπό μελέτη μεταβολίτες στο μοντέλο υποξίας – επανοξυγόνωσης (www.ingenuity.com).

Το συγκεκριμένο χοίριο μοντέλο υποξίας – επανοξυγόνωσης επιτρέπει τη μελέτη ιστολογικών αλλαγών στους νεφρούς ακόμα και σε επιζήσαντα μετά την υποξία νεογνά χοιρίδια γεγονός που είναι αδύνατο σε πραγματικές συνθήκες. Όμως, όπως κάθε μελέτη έτσι και η παρούσα έχει περιορισμούς. Η ακριβής προσομοίωση των πραγματικών συνθηκών οξείας νεφρικής βλάβης λόγω υποξίας στα νεογνά είναι εξαιρετικά δύσκολη. Η μελέτη έγινε σε νεογνά χοιρίδια που βρίσκονταν υπό γενική αναισθησία και η πιθανή επίδραση των αναισθητικών φαρμάκων στους νεφρούς, το καρδιαγγειακό σύστημα και την έκβαση του πειράματος δεν αξιολογήθηκε.

4.5 Συμπεράσματα

Η ανταπόκριση στην ανάνηψη φαίνεται ότι είναι εξατομικευμένη και εξαρτάται από το αρχικό μεταβολικό προφίλ των χοιριδίων. Επίσης, στόχος της υποξίας φαίνεται να είναι τα νεφρικά σωληνάκια και όχι το σπείραμα ή τα αγγεία. Η κενотоπίωση τόσο των εγγύς όσο και των άπω εσπειραμένων σωληναρίων αποτελεί μία από τις συχνότερες ιστολογικές αλλοιώσεις. Η διάταση των άπω εσπειραμένων σωληναρίων αποτελεί την πιο άμεση ιστολογική αλλοίωση στην υποξία – επανοξυγόνωση. Αντίθετα, οι σωληναριακοί κύλινδροι φαίνεται να μην αποτελούν ειδικό εύρημα της νεφρικής βλάβης. Η υποξία προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις στους νεφρούς από πολύ νωρίς. Επομένως, η έγκαιρη διάγνωση με νέους βιοδείκτες και παρέμβαση θα μπορούσαν να αποτρέψουν την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης

και να βελτιώσουν την πρόγνωση. Μελλοντικές μελέτες οξείας νεφρικής βλάβης σε νεογνά ίσως απαιτούν τη συνεργασία διαφόρων ειδικοτήτων όπως νεογνολόγων, νεφρολόγων, παθολογοανατόμων και κλινικών χημικών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;365:417-30.
2. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:204-212.
3. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007;71:1028-1035.
4. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:31.
5. Ozçakar ZB, Yalçinkaya F, Altas B, Ergün H, Kendirli T, Ateş C, Elhan AH, Ekim M. Application of the new classification criteria of the Acute Kidney Injury Network: a pilot study in a pediatric population. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1379-1384.
6. Ricci Z, Ronco C. Neonatal RIFLE. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:2211-2214.
7. Liangos O, Wald R, O' Bell JW, Price L, Pereira BJ, Jaber BL. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: A national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:43-51.
8. Raggal NE, Khafagy SM, Mahmoud NH, Beltagy SE. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr* 2013;50:459-462.
9. Picca S, Ricci Z, Picardo S. Acute kidney injury in an infant after cardiopulmonary bypass. *Semin Nephrol* 2008;28:470-476.
10. Askenazi DJ, Montesanti A, Hunley H, Koralkar R, Pawar P, Shuaib F, Liwo A, Devarajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2011;159:907-912.

11. Andreoli SP. Acute renal failure in the newborn. *Semin Perinatol* 2004;8:112-123.
12. Bezerra CT, Vaz Cunha LC, Libório AB. Defining reduced urine output in neonatal ICU: importance for mortality and acute kidney injury classification. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:901-909.
13. Koralkar R, Ambalavanan N, Levitan EB, McGwin G, Goldstein S, Askenazi D. Acute kidney injury reduces survival in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2011;69:354-358.
14. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:609813.
15. Gupta BD, Sharma P, Bagla J, Parakh M, Soni JP. Renal failure in asphyxiated neonates. *Indian Pediatrics* 2005;42:928-934.
16. Morgan CJ, Zappitelli M, Robertson CM, Alton GY, Sauve RS, Joffe AR, Ross DB, Rebeyka IM. Risk factors for and outcomes of acute kidney injury in neonates undergoing complex cardiac surgery. *Journal of Pediatrics* 2013;162:120-127.
17. Vachvanichsanong P, McNeil E, Dissaneevate S, Dissaneewate P, Chanvitan P, Janjindamai W. Neonatal acute kidney injury in a tertiary center in a developing country. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012; 27:973–977.
18. Cataldi L, Leone R, Moretti U, De Mitri B, Fanos V, Ruggeri L, Sabatino G, Torcasio F, Zanardo V, Attardo G, Riccobene F, Martano C, Benini D, Cuzzolin L. Potential risk factors for the development of acute renal failure in preterm newborn infants: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:514-519.
19. Στεφανίδης, Κ. (1996). Νεφρολογία. Στο Χ. Κώσταλος (Επιμ.), *Νεογνολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 678-683.
20. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1503-1520.
21. Husi H, Sanchez-Niño MD, Delles C, Mullen W, Vlahou A, Ortiz A, Mischak H. A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI):

- involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Syst Biol*. 2013;7:110.
22. Ellis EN, Arnold WC. Use of urinary indexes in renal failure in the newborn. *Am J Dis Child* 1982;136:615-617.
 23. Zübarioğlu AU, Bülbül A, Uslu HS. Neonatal Acute Kidney Injury. *JAREM* 2013;3:53-59.
 24. Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet* 2000;356:2139-2143.
 25. Friedrich JO, Adhikari N, Herridge MS, Beyene J. Meta-analysis: low-dose dopamine increases urine output but does not prevent renal dysfunction or death. *Ann Intern Med* 2005;142:510-524.
 26. Marik PE. Low-dose dopamine: a systematic review. *Intensive Care Med* 2002;28:877-883.
 27. Luciani GB, Nichani S, Chang AC, Wells WJ, Newth CJ, Starnes VA. Continuous versus intermittent furosemide infusion in critically ill infants after open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1133-1139.
 28. Karlowicz MG, Adelman RD. Acute renal failure in the neonate. *Clin Perinatol* 1992;19:139-158.
 29. Bulbul A, Uslu S. Fluid and electrolyte homeostasis in neonatal period. *SETB* 2012;46:36-42.
 30. Sell LL, Cullen ML, Whittlesey GC, Lerner GR, Klein MD. Experience with renal failure during extracorporeal membrane oxygenation: treatment with continuous hemofiltration. *J Pediatr Surg* 1987;22:600- 602.
 31. Jordan M Symons JM, Brophy PD, Gregory MJ, McAfee N, Somers MJG, Bunchman TE, Goldstein SL. Continuous renal replacement therapy in children up to 10 kilograms. *Am J Kidney Dis* 2003;41:984-989.
 32. Picca S, Bartuli A, Dionisi-Vici C. Medical management and dialysis therapy for the infant with an inborn error of metabolism. *Semin Nephrol* 2008;28:477-480.
 33. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Hamilton K, Cutter G, Laney D,

- Kaslow R, Georgeson K, Barnhart DC, Dimmitt RA. Acute kidney injury and renal replacement therapy independently predict mortality in neonatal and pediatric noncardiac patients on extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Crit Care Med* 2011;12:1-6.
34. Iacobelli S, Loprieno S, Bonsante F, Latorre G, Esposito L, Gouyon JB. Renal function in early childhood in very low birthweight infants. *Am J Perinatol*. 2007;24:587-592.
 35. Durkan AM, Alexander RT. Acute kidney injury post neonatal asphyxia. *J Pediatr* 2011;158:29-33.
 36. Sarkar S, Askenazi DJ, Jordan BK, Bhagat I, Bapuraj JR, Dechert RE, Selewski DT. Relationship between acute kidney injury and brain MRI findings in asphyxiated newborns after therapeutic hypothermia. *Pediatr Res*. 2014;75:431-435.
 37. Blowey DL, McFarland K, Alon U, McGraw-Houchens M, Hellerstein S, Warady BA. Peritoneal dialysis in the neonatal period: outcome data. *J Perinatol*. 1993;13:59-64.
 38. Bariciak E, Yasin A, Harrold J, Walker M, Lepage N, Filler G. Preliminary reference intervals for cystatin C and beta-trace protein in preterm and term neonates. *Clin Biochem* 2011;44:1156-1159.
 39. Drukker A, Guignard JP. Renal aspects of the term and preterm infant: a selective update. *Curr Opin Pediatr* 2002;14:175-182.
 40. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: What do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol* 2009;24:265-274.
 41. Murray P, Le Gall JR, Miranda DDR, Pinsky MR, Tetta C. Physiologic endpoints (efficacy) for acute renal failure studies. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:519-525.
 42. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89e95.
 43. Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2007;27:637e51.

44. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008;36:S159-S165.
45. Westhuyzen J. Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired renal function. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:387-394.
46. Plebani M, Mussap M, Bertelli L, et al. Determination of blood cystatin C in pregnant women during labor and in their newborns. *Pediatr Med Chir* 1997;19:325-329.
47. Cataldi L, Mussap M, Bertelli L, Ruzzante N, Fanos V, Plebani M. Cystatin C in healthy women at term pregnancy and in their infant newborns : relationship between maternal and neonatal serum levels and reference values. *Am J Perinatol* 1999;16:287-295.
48. Lee BS, Byun SY, Chung ML, et al. Effect of furosemide on ductal closure and renal function in indomethacin-treated preterm infants during the early neonatal period. *Neonatology* 2010;98:191-199.
49. Elmas AT, Tabel Y, Elmas ON. Serum cystatin C predicts acute kidney injury in preterm neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatr Nephrol* 2013;28:477-484.
50. Li Y, Fu C, Zhou X, Xiao Z, Zhu X, Jin M, Li X, Feng X. Urine interleukin-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonates. *Pediatr Nephrol* 2012;27:851-860.
51. Parvex P, Combescure C, Rodriguez M, Girardin E. Is Cystatin C a promising marker of renal function, at birth, in neonates prenatally diagnosed with congenital kidney abnormalities? *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:3477-3482.
52. Maruniak-Chudek I, Owsianka-Podlesny T, Wróblewska J, Jadamus-Niebrój D. Is serum cystatin C a better marker of kidney function than serum creatinine in septic newborns? *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2012;66:175-180.
53. Treiber M, Pecovnik-Balon B, Gorenjak M. Cystatin C versus creatinine as a marker of glomerular filtration rate in the newborn. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118:66-70.
54. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J of Kidney Dis* 2008;52:595-605.

55. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of NGAL as a novel urine biomarker for ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;4:2534-2543.
56. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A novel early urine biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004;24:307-315.
57. Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Devarajan P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol* 2006;21:856-863.
58. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol* 2010;25:889-897.
59. Lavery AP, Meinen-Derr JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, Schibler KR. Urine NGAL in premature infants. *Pediatr Res* 2008;64:423-428.
60. Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, Bennett MR, Ma Q, Devarajan P. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentrations Predict Development of Acute Kidney Injury in Neonates and Children after Cardiopulmonary Bypass. *J Pediatr* 2011;158:1009-1015.
61. Koch AM, Dittrich S, Cesnjevar R, Ruffer A, Breuer C, Glockler M. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin measured in consecutive patients after congenital heart surgery using point-of-care technology. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011;13:133-136.
62. Sarafidis K, Tsepkenzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, Papachristou F, Drossou V. Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. *Pediatr Nephrol* 2012;27:1575-1582.
63. Parravicini E, Nemerofsky SL, Michelson KA, Huynh TK, Sise ME, Bateman DA, Lorenz JM, Barasch JM. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a promising biomarker for late onset culture-positive sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2010;67:636-640.
64. La Manna G, Galletti S, Capelli I, Vandini S, Nisi K, Aquilano G, Mancini R, Carretta E, Montini G, Faldella G and Stefoni S. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin at birth predicts early renal function in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2011;70:379-383.

65. Tabel Y, Elmas A, Ipek S, Karadag A, Elmas O, Ozyalin F. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for prediction of acute kidney injury in preterm infants. *Amer J of Perinatol* 2014;31:167–174.
66. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urine biomarker and much more. *Nephrol Dial Transpl* 2009;24:3265-3268.
67. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urine kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F517-F529.
68. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP, Zhang J, Rosenzweig BA, Thompson KL, Miller TJ, Bonventre JV, Goering PL. Comparison of Kidney Injury Molecule-1 and Other Nephrotoxicity Biomarkers in Urine and Kidney Following Acute Exposure to Gentamicin, Mercury and Chromium. *Toxicological Sciences* 2008;101:159-170.
69. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urine biomarker for nephrotoxicant induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:552-563.
70. Askenazi DJ, Montesanti A, Hunley H, Koralkar R, Pawar P, Shuaib F, Liwo A, Devarajan P, Ambalavanan N. Urine biomarkers predict acute kidney injury and mortality in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2011;159:907-912.
71. McWilliam SJ, Antoine DJ, Turner M, Sabbisetti V, Bonventre JV, Park BK, Smyth RL, Pirmohamed M. Urinary KIM-1 as a biomarker of aminoglycoside-induced nephrotoxicity in premature neonates. *Pediatr Res* 2011;70:107.
72. Dimarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Móhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon- γ inducing factor. *J Leukoc Biol* 1998;63:658-664.
73. Melnikov VY, Ecder T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia, MS, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein Impaired CL. Impaired IL 18 processing protects caspase 1 deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001;107:1145-1152.
74. Cusumano V, Midiri A, Cusumano VV, Bellantoni A, De Sossi G, Teti G, Beninati C, Mancuso G. Interleukin-18 is an essential element in host

resistance to experimental group B streptococcal disease in neonates. *Infect Immun* 2004;72:295-300.

75. Kingsmore SF, Kennedy N, Halliday HL, Van Velkinburgh JC, Zhong S, Gabriel V, Grant J, Beavis WD, Tchernev VT, Perlee L, Lejnine S, Grimwade B, Sorette M, Edgar JD. Identification of diagnostic biomarkers for infection in premature neonates. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1863-1875.
76. Mussap M, Degrandi R, Fravega M, Fanos V. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:70-72.
77. Krawczeski CD, Vandevoorde RG, Kathman T, Bennett MR, Woo JG, Wang Y, Griffiths RE, Devarajan P. Serum Cystatin C is an early predictive biomarker of acute kidney injury after pediatric cardiopulmonary bypass. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1552-1557.
78. Han WK, Waikar SS, Johnson A, Betensky RA, Dent CL, Devarajan P, Bonventre JV. Urine biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 2008;73:863-869.
79. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, Dursun B, Ma Q, Kelly C, Dent C, Devarajan P, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Intern* 2006;70:199-203.
80. Bender L, Thaarup J, Varming K, Krarup H, Ellermann-Eriksen S, Ebbesen F. Early and late markers for detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan Med Bull* 2008;55:219-223.
81. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:463-468.
82. Muller PY, Dieterle F. Tissue specific, non invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5:1023-1038.
83. Devarajan P, Williams LM. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2007;6:637-651.
84. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2:387-398.

85. Harmoinen A, Ylinen E, Ala-Houhala M, Janas M, Kaila M, Kouri T. Reference intervals for cystatin C in pre- and full-term infants and children. *Pediatr Nephrol* 2000;15:105-108.
86. Askenazi DJ, Koralkar R, Levitan EB, Goldstein SL, Devarajan P, Khandrika S, Mehta RL, Ambalavanan N. Baseline values of candidate urine acute kidney injury biomarkers vary by gestational age in premature infants. *Pediatr Res* 2011;70:302-306.
87. Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, O' Rourke M, Barasch J, Bateman D. Reference range of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low birth weight infants: preliminary data. *Am J Perinatol* 2009;26:437-440.
88. Huynh TK, Bateman DA, Parravicini E, Lorenz JM, Nemerofsky SL, Sise ME, Bowman TM, Polesana E, Barasch JM. Reference values of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2009;66:528-532.
89. Samuelsson LM, Larsson DGJ. Contributions from metabolomics to fish research. *Mol Biosyst* 2008;4:974–9.
90. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008;134:714-717.
91. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:525-527.
92. Dunn WB, Bailey NJ, Johnson HE. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 2005;130:606-625.
93. Van der Werf MJ, Overkamp KM, Muilwijk B, Coulier L, Hankemeier T. Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolic coverage. *Anal Biochem* 2007;370:17-25.
94. Atzori L, Xanthos T, Barberini L, Antonucci R, Murgia F, Lussu M, Aroni F, Varsami M, Papalois A, Lai A, D'Aloja E, Iacovidou N, Fanos V. A metabolomic approach in an experimental model of hypoxia-reoxygenation in newborn piglets: urine predicts outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:134-137.
95. Beger RD, Holland RD, Sun J, Schnackenberg LK, Moore PC, Dent CL, Devarajan P, Portilla D. Metabolomics of acute kidney injury in children after cardiac surgery. *Pediatr Nephrol* 2008;23:977-984.

96. Atzori L, Mussap M, Noto A, Barberini L, Puddu M, Coni E, Murgia F, Lussu M, Fanos V. Clinical metabolomics and urinary NGAL for the early prediction of chronic kidney disease in healthy adults born ELBW. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24:40-43.
97. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054-1056.
98. Preti G. Metabolomics comes of age? *The Scientist* 2005;19:8–12.
99. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem* 1971;17:802-809.
100. Bales JR, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem* 1984;30:426–432.
101. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373–378.
102. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorndahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D801-7. doi: 10.1093/nar/gks1065.
103. Fanos V, Antonucci R, Barberini L, Atzori L. Urinary metabolomics in newborns and infants. *Adv Clin Chem* 2012;58:193-223.
104. Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008;21:9–27.
105. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D521-526.

- 106.** Drake SK, Bowen RAR, Remaley AT, Hortin GL. Potential interferences from blood collection tubes in mass spectrometric analyses of serum polypeptides. *Clin Chem* 2004;50:2398-2401.
- 107.** Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2:2692-2703.
- 108.** Mussap M, Noto A, Fanos V, Van Den Anker JN. Emerging biomarkers and metabolomics for assessing toxic nephropathy and acute kidney injury (AKI) in neonatology. *Biomed Res Int* 2014;2014:ID 602526.
- 109.** Graca G¹, Duarte IF, Barros AS, Goodfellow BJ, Diaz SO, Pinto J, Carreira IM, Galhano E, Pita C, Gil AM. Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance metabonomic study. *J Proteome Res.* 2010;9:6016-6024.
- 110.** Hyde MJ, Griffin JL, Herrera E, Byrne CD, Clarke L, Kemp PR, Delivery by Caesarean section, rather than vaginal delivery, promotes hepatic steatosis in piglets. *Clin. Sci* 2009;118:47–59.
- 111.** Nissen PM, Nebel C, Oksbjerg N, Bertram HC. Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible markers for fetal programming of type 2 diabetes. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011 ID 378268.
- 112.** Hyde MJ, Beckkonert OP, Yap IKS, Booms C, Gale CRK, Logan K, Karataza A, Murgasova D, Holmes E, Modi N. The effect of preterm delivery on the urinary metabolome, in: Summer Meeting. The Neonatal Society, Nottingham UK 2010 (www.neonatalsociety.ac.uk).
- 113.** Solberg R, Enot D, Deigner HP, Koal T, Scholl-Burgi S, Saugstad od, Keller M. Metabolomic analyses of plasma reveals new insights into asphyxia and resuscitation in pigs. *PLoS One* 2010;5:e9606.
- 114.** Bruder ED, Lee PC, Raff H. Metabolomic analysis of adrenal lipids during hypoxia in the neonatal rat: implications in steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E697–E703.

115. Poulsen JP, Oyasaeter S, Sanderud J, Rognum TO, Saugstad OD. Hypoxanthine, xanthine, and uric acid concentration in the cerebrospinal fluid, plasma and urine of hypoxemic pigs. *Pediatr Res* 1990;28:477–481.
116. Seidl R, Stöckler-Ipsiroglu S, Rolinski B, Kohlhauser C, Herkner KR, Lubec B, Lubec G. Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life Sci*. 2000 Jun 16;67:421-435.
117. Banupriya C, Ratnakar P, Doureradjou N, Mondal N, Vishnu B, Koner BC. Can urinary excretion rate of malondialdehyde, uric acid and protein predict the severity and impending death in perinatal asphyxia? *Clin Biochem* 2008;41:968–973.
118. Pallab B, Sabyasachi S, Nabendu C, Harendranath D. Correlation between Apgar Score and urinary uric acid to creatinine ratio in perinatal asphyxia. *Indian J Clin Biochem* 2008;23:361–364.
119. Liu J, Wu JQ, Yang JJ, Wei JY, Gao WN, Guo CJ. Metabolomic study on vitamins B1, B2, and PP supplementation to improve serum metabolic profiles in mice under acute hypoxia based on ¹H NMR analysis. *Biomed Environ Sci* 2010;23:312–318.
120. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Locci E, Cesare Marincola F, Scano P, Cortesi P, Agostiniani R, Weljie A, Lai A, Fanos V. ¹H NMR-based metabolic profiling of urine from children with nephrouropathies, *Front Biosci* 2010;2:725–732.
121. Boudonck KJ, Rose DJ, Karoly ED, Lee DP, Lawton KA, Lapinskas PJ. Metabolomics for early detection of drug-induced kidney injury: review of the current status. *Bioanalysis* 2009;1:1645–1663.
122. Wishart DS. Application of metabolomics in drug discovery and development. *Drugs R&D* 2008;9:307–322.
123. Christians U, Schmitz V, Schöning W, Bendrick-Peart J, Klawitter J, Haschke M, Klawitter J. Toxicodynamic therapeutic drug monitoring of immunosuppressants: promises, reality, and challenges. *Ther Drug Monit* 2008;30:151-158.

124. Fanos V¹, Locci E, Noto A, Lazzarotto T, Manzoni P, Atzori L, Lanari M. Urinary metabolomics in newborns infected by human cytomegalovirus: a preliminary investigation. *Early Hum Dev* 2013;89:S58-61.
125. Marincola FC, Noto A, Caboni P, Reali A, Barberini L, Lussu M, Murgia F, Santoru ML, Atzori L, Fanos V. A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: preliminary results. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:62-67.
126. Baker M. In biomarkers we trust? *Nat Biotechnol* 2005;23:297-304.
127. Xu EY, Schaefer WH, Xu Q. Metabolomics in pharmaceutical research and development: metabolites, mechanisms and pathways. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009;12:40-52.
128. Billelo JA. The agony and ecstasy of 'omic' technologies in drug development. *Curr Mol Med* 2005;5:39-52.
129. Vento M, Saugstad OD. Oxygen supplementation in the delivery room: updated information. *J Pediatr* 2011;158:e5–7.
130. O'Donnell CPF, Gibson AT, Davis PG. Pinching, electrocution, ravens' beaks, and positive pressure ventilation: a brief history of neonatal resuscitation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F369–373.
131. Obladen M. History of neonatal resuscitation. Part 1: Artificial ventilation. *Neonatology* 2008;94:144–149.
132. Obladen M. History of neonatal resuscitation. Part 2: oxygen and other drugs. *Neonatology* 2009;95:91–96.
133. Robertson AF. Reflections on errors in neonatology: I. The "Hands-Off" years, 1920 to 1950. *J Perinatol* 2003;23:48-55.
134. Robertson AF. Reflections on errors in neonatology: II. The "Heroic" years, 1950 to 1970. *J Perinatol* 2003;23:154-161.
135. Robertson AF. Reflections on errors in neonatology III. The "experienced" years, 1970 to 2000. *J Perinatol* 2003;23:240-249.
136. DeLee, J. (1913). *The principles and practice of obstetrics, 1st edition*. Philadelphia and London, WB Saunders & Company.
137. Davis, E. (1904). *Obstetric and gynecologic nursing*. New York & London, WB Saunders & Company.

- 138.** Henderson Y. The prevention and treatment of asphyxia in the newborn. JAMA 1928;90:583-586.
- 139.** Flagg P. The treatment of asphyxia in the newborn. JAMA 1998;91: 788-791.
- 140.** Drinker P, McKhann C. The use of a new apparatus for the prolonged administration of artificial respiration. JAMA 1929;92:1658-1660.
- 141.** [Anon]. New york obstetrical society. Meeting of december 9, 1930. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1931;31:599-603.
- 142.** Bloxson A. Resuscitation of the newborn infant: Use of the positive pressure oxygen air lock. J Pediatr 1950;37:311-319.
- 143.** Hutchison JH, Kerr MM, Inall JA, Shanks RA. Controlled trials of hyperbaric oxygen and tracheal intubation in asphyxia neonatorum. Lancet 1966;1:935-939.
- 144.** Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. Curr Res Anesth Analg 1953;32:260-267.
- 145.** Jackson JN. Asphyxia in the newborn. Lancet 1953;265:834.
- 146.** Derenne J, Debru A, Grassino AE, Whitelaw WA. The earliest history of diaphragm physiology. Eur Respir J 1994;7:2234–2240.
- 147.** Dawes G. Fetal and neonatal physiology. Year Book Publisher, Chicago, 1968; Chapter 12:141-159.
- 148.** Moore WM, Davies JA. Response of the newborn rabbit to acute anoxia and variations due to narcotic agents. Br J Anaesth 1966;38:787-793.
- 149.** Hey E, Kelly J. Gaseous exchange during endotracheal ventilation for asphyxia at birth. J Obstet Gynaecol Br Commonw 1968;75:414-424.
- 150.** Raghuveer TS, Cox AJ. Neonatal Resuscitation: An Update. American Family Physician 2011;83:911-918.
- 151.** Richmond S, Wyllie J. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 7. Resuscitation of babies at birth. Resuscitation. 2010;81:1389–1399.
- 152.** Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. Semin Fetal Neonatal Med 2007;12:287–295.
- 153.** Buczynski BW¹, Maduekwe ET, O'Reilly MA. The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. Semin Perinatol 2013;37:69-78.

- 154.** Palipoch S.
A review of oxidative stress in acute kidney injury: protective role of medicinal plants-derived antioxidants. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2013;10:88-93.
- 155.** Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tramontina AC, Wartchow KM, Tagliari B, Souza DO, Wyse AT, Gonçalves CA. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicol In Vitro* 2014;28:544-551.
- 156.** Wang H, Zhang SX, Hartnett ME. Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:80-85.
- 157.** Perrone S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Neonatol* 2012;1:109-114.
- 158.** Kinsey VE, Zacharias L. Retrolental fibroplasia; incidence in different localities in recent years and a correlation of the incidence with treatment given the infants. *J Am Med Assoc* 1949;139:572-578.
- 159.** Goldmann H, Tobler W. Etiology of retrolental fibroplasia. *Schweiz Med Wochenschr* 1952;82:381-385.
- 160.** Rootwelt T, Løberg EM, Moen A, Oyasaeter S, Saugstad OD. Hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs: changes in blood pressure, base deficit, and hypoxanthine and brain morphology. *Pediatr Res* 1992;32:107–113.
- 161.** Goplerud JM, Kim S, Delivoria-Papadopoulos M. The effect of post-asphyxial reoxygenation with 21% vs. 100% oxygen on Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in striatum of newborn piglets. *Brain Res* 1995;696:161–164.
- 162.** Medbø S¹, Yu XQ, Asberg A, Saugstad OD. Pulmonary hemodynamics and plasma endothelin-1 during hypoxemia and reoxygenation with room air or 100% oxygen in a piglet model. *Pediatr Res* 1998;44:843-849.
- 163.** Børke WB, Munkeby BH, Mørkrid L, Thaulow E, Saugstad OD. Resuscitation with 100% O₂ does not protect the myocardium in hypoxic newborn piglets. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89:156–160.

164. Fugelseth D, Børke WB, Lenes K, Matthews I, Saugstad OD, Thaulow E. Restoration of cardiopulmonary function with 21% versus 100% oxygen after hypoxaemia in newborn pigs. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:229-234.
165. Domoki F, Zimmermann A, Cserni G, Bori R, Temesvári P, Bari F. Reventilation with room air or 100% oxygen after asphyxia differentially affects cerebral neuropathology in newborn pigs. *Acta Paediatr* 2006;95:1109–1115.
166. Hoffman DJ, Lombardini E, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of resuscitation with 21% oxygen and 100% oxygen on NMDA receptor binding characteristics following asphyxia in newborn piglets. *Neurochem Res* 2007;32:1322–1328.
167. Mendoza-Paredes A, Liu H, Schears G, Yu Z, Markowitz SD, Schultz S, Pastuszko P, Greeley WJ, Nadkarni V, Kubin J, Wilson DF, Pastuszko A. Resuscitation with 100%, compared with 21%, oxygen following brief, repeated periods of apnea can protect vulnerable neonatal brain regions from apoptotic injury. *Resuscitation* 2008;76:261–270.
168. Solberg R, Longini M, Proietti F, Vezzosi P, Saugstad OD, Buonocore G. Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. *Free Radic Biol Med* 2012;53:1061–1067.
169. Faa G, Fanos V, Fanni D, Gerosa C, Faa A, Fraschini M, Pais ME, Di Felice E, Papalois A, Varsami M, Xanthos T, Iacovidou N. Reoxygenation of asphyxiated newborn piglets: administration of 100% oxygen causes significantly higher apoptosis in cortical neurons, as compared to 21%. *Biomed Res Int* 2014;2014:476349.
170. Ramji S, Ahuja S, Thirupuram S, Rootwelt T, Rooth G, Saugstad OD. Resuscitation of asphyxic newborn infants with room air or 100% oxygen. *Pediatr Res* 1993;34:809–812.
171. Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: an international controlled trial: the Resair 2 study. *Pediatrics* 1998;102(1):e1.
172. Saugstad OD, Ramji S, Irani SF, El-Meneza S, Hernandez EA, Vento M, Talvik T, Solberg R, Rootwelt T, Aalen OO. Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: follow-up at 18 to 24 months. *Pediatrics* 2003;112:296-300.

- 173.** Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Viña J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr* 2003;142:240–246.
- 174.** Ramji S, Rasaily R, Mishra PK, Narang A, Jayam S, Kapoor AN, et al. Resuscitation of asphyxiated newborns with room air or 100% oxygen at birth: a multicentric clinical trial. *Indian Pediatr* 2003;40:510–517.
- 175.** Vento M, Sastre J, Asensi MA, Viña J. Room-air resuscitation causes less damage to heart and kidney than 100% oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1393–1398.
- 176.** Wang CL, Anderson C, Leone TA, Rich W, Govindaswami B, Finer NN. Resuscitation of preterm neonates by using room air or 100% oxygen. *Pediatrics* 2008;121:1083-1089.
- 177.** Rabi Y, Rabi D, Yee W. Room air resuscitation of the depressed newborn: a systematic review and meta-analysis. *Resuscitation* 2007;72:353-363.
- 178.** Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, Roberts LJ 2nd, Arduini A, Escobar JJ, Sastre J, Asensi MA. Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics* 2009;124:439-449.
- 179.** Davis PG, Tan A, O'Donnell CPF, Schulze A. Resuscitation of newborn infants with 100% oxygen or air: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004;364:1329–1333.
- 180.** Harling AE, Beresford MW, Vince GS, Bates M, Yoxall CW. Does sustained lung inflation at resuscitation reduce lung injury in the preterm infant? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:406-410.
- 181.** Kapadia VS, Chalak LF, Sparks JE, Allen JR, Savani RC, Wyckoff MH. Resuscitation of preterm neonates with limited versus high oxygen strategy. *Pediatrics* 2013;132:1488-1496.
- 182.** Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, Guinsburg R, Hazinski MF, Morley C, Richmond S, Simon WM, Singhal N, Szyld E, Tamura M, Velaphi S; Neonatal Resuscitation Chapter Collaborators. Part 11: Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and

Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation* 2010;122:516-538.

- 183.** International Liaison Committee on Resuscitation. The International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) consensus on science with treatment recommendations for pediatric and neonatal patients: neonatal resuscitation. *Pediatrics* 2006;117:978–988.
- 184.** Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev* 1997;47:115–146.
- 185.** Derrick M, Luo NL, Bregman JC, Jilling T, Ji X, Fisher K, Gladson CL, Beardsley DJ, Murdoch G, Back SA, Tan S. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci* 2004;24:24–34.
- 186.** Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, Tan S. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. *Stroke* 2007;38:731–735.
- 187.** Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim* 1995;23:298-304.
- 188.** Northington FJ. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J* 2006;47:32–38.
- 189.** Larson AC, Jamrogowicz JL, Kulikowicz E, Wang B, Yang ZJ, Shaffner DH, Koehler RC, Lee JK. Cerebrovascular autoregulation after rewarming from hypothermia in a neonatal swine model of asphyxic brain injury. *J Appl Physiol* (1985). 2013;115:1433-1442.
- 190.** van Dijk AJ, van Loon JP, Taverne MA, Jonker FH. Umbilical cord clamping in term piglets: a useful model to study perinatal asphyxia? *Theriogenology* 2008;70:662-674.
- 191.** Alonso-Spilsbury M, Mota-Rojas D, Villanueva-García D, Martínez-Burnes J, Orozco H, Ramírez-Necoechea R, Mayagoitia AL, Trujillo ME. Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. *Anim Reprod Sci* 2005;90:1–30.
- 192.** Cheung PY, Gill RS, Bigam DL. A swine model of neonatal asphyxia. *J Vis Exp* 2011;(56): pii: 3166. doi: 10.3791/3166.

- 193.** Xanthos T, Bassiakou E, Koudouna E, Tsirikos-Karapanos N, Lelovas P, Papadimitriou D, Dontas I, Papadimitriou L. Baseline hemodynamics in anesthetized landrace-large white swine: reference values for research in cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation models. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2007;46:21–25.
- 194.** Book SA, Bustad LK. The fetal and neonatal pig in biomedical research. *J Anim Sci* 1974;38:997-1002.
- 195.** Swindle MM, Smith AC. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Anim Sci* 1998;25:1-10.
- 196.** Curtis SE. Responses of the piglet to perinatal stressors. *J Anim Sci* 1974;38:1031–1036.
- 197.** Singh AP¹, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* 2012;64:31-44.
- 198.** Skrypnik NI¹, Harris RC, de Caestecker MP. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice. *J Vis Exp* 2013;(78).
- 199.** Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303:1487-1494.
- 200.** Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997;99:2682-2690.
- 201.** Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 2009;119:2868-2878.
- 202.** Hanna MH, Segar JL, Teesch LM, Kasper DC, Schaefer FS, Brophy PD. Urinary metabolomic markers of aminoglycoside nephrotoxicity in newborn rats. *Pediatr Res* 2013;73:585-591.
- 203.** Biarent D, Bingham R, Richmond S, Maconochie I, Wyllie J, Simpson S, Nunez AR, Zideman D; European Resuscitation Council. European

Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2005. Section 6
Pediatric life support. Resuscitation 2005;67:97-133.

204. Saugstad OD, Ramji S, Vento M. Oxygen for Newborn Resuscitation: How Much Is Enough? Pediatrics 2006;118: 789-792.
205. Tan A, Schulze A, O' Donnell CP, Davis PG. Air versus oxygen for resuscitation of infants at birth. Cochrane Database Syst Rev 2005;(2):CD002273.
206. Cheung PY, Obaid L, Emara M, Brierley Y, Johnson ST, Chan GS, Jewell L, Korbutt G, Bigam DL. Cardio-renal recovery of hypoxic newborn pigs after 18%, 21% and 100% reoxygenation. Intensive Care Med 2008;34:1114-1121.
207. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal Hypoxia and Dysoxia After Reperfusion of the Ischemic Kidney. Mol Med 2008;14:502-516.
208. Airede A, Bello M, Weerasinghe HD. Acute renal failure in the newborn: incidence and outcome. J Paediatr Child Health 1997;33: 246-249.
209. Trof RJ, Di Maggio F, Leemreis J, Groeneveld ABJ. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. Shock 2006;26:245-253.
210. Zappitelli M, Washburn KK, Arikan AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, Parikh CR, Goldstein SL. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. Crit Care 2007;11: R84.
211. Han WK, Wagener G, Zhu Y, Wang S, Lee HT. Urinary Biomarkers in the Early Detection of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:873-882.
212. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. Lancet 2005;365:1231-1238.
213. Zaffanello M, Antonucci R, Cuzzolin L, Cataldi L, Fanos V. Early diagnosis of acute kidney injury with urinary biomarkers in the newborn. J Matern Fetal Neonatal Med 2009;22:62-66.
214. Gerosa C, Fanos V, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Xanthos T, Papalois A, Faa G, Iacovidou N. Toward nephrogenesis in the pig kidney: the

composite tubulo- glomerular nodule. *Maternal Fetal Neonat Medicine* 2011;24:52-54.

215. Daniela Fanni, Vassilios Fanos, Clara Gerosa, Alice Sanna, Peter Van Eyken, Luigi Cataldi, Gavino Faa. Acute kidney injury in the newborn: the role of the perinatal pathologist. *J Pediatr Neonatal Indiv Med* 2014;3(2):e030262.
216. Baricos WH. Protease mediated tubular injury: a new direction in acute renal failure? *Kidney Int* 2002;61:1174-1175.
217. Rosen S, Epstein FH, Brezis M. Determinants of intrarenal oxygenation: factors in acute renal failure. *Ren Fail* 1992;14:321-325.
218. Subramanian PT. Acute renal failure in the neonate. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 1998;9:320-334.
219. Putensen C. Acute renal failure: still a cause of increased mortality. *Anaesthesist* 2007;56:1103-1104.
220. Hoste EA, Kellum JA. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr Opin Care* 2006;12:531-537.
221. Rosen S, Heyman SN. Difficulties in understanding human “acute tubular necrosis”: limited data and flawed animal models. *Kidney Int* 2001;60:1220-1224.
222. Chvojka J, Sykora R, Krouzecky A, Radej J, Varnerova V, Karvunidis T, Hes O, Novak I, Radermacher P, Matejovic M. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care*. 2008;12:R164.
223. Tirilomis T, Tempes T, Waldmann-Beushausen R, Ballat C, Bensch M, Schoendube FA. Histological changes in neonatal kidneys after cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009;57:7-9.
224. Emara M, Obaid L, Johnson S, Bigam DL, Cheung P-Y. Angiostatins decrease in the kidney of newborn piglets after hypoxia-reoxygenation. *Eur J Pharmacol* 2010;644:203-208.
225. Antonucci R, Atzori L, Barberini L, Fanos V. Metabolomics: the “new clinical chemistry” for personalized neonatal medicine. *Min Ped* 2010;3:145–148.
226. Atzori L, Antonucci R, Barberini L, Griffin JL, Fanos V. Metabolomics: a new tool for the neonatologist. *J Mat Fet Neonat Med* 2009;22:50–53.