

# Recovery from severe perinatal hypoxia;ischemia: studies of pathophysiology and treatment in the fetal sheep

## Citation for published version (APA):

Roelfsema, V. (2006). *Recovery from severe perinatal hypoxia;ischemia: studies of pathophysiology and treatment in the fetal sheep*.

## Document status and date:

Published: 01/01/2006

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

The aim of this thesis was to better understand the endocrine and cardiovascular responses of the fetus to severe hypoxia (asphyxia) and to examine the effects of rescue therapy with head cooling on neural and systemic recovery from such severe hypoxia.

**Chapter 1** discusses the clinical and experimental background to this thesis. Ischaemia-reperfusion injury remains a significant challenge for perinatal medicine today for both term and preterm infants (Volpe 2001; Shalak and Periman 2004; Salhab and Periman 2005). Severe asphyxia can initiate a cascade of events in the brain and other organs, leading to organ and brain injury, which can result in life-long neurodevelopmental handicaps for the child. During hypoxia-ischaemia there is cellular energy failure, accumulation of excitotoxins due to increased neurotransmitter release and inhibition of re-uptake, an efflux of  $K^+$  but a corresponding influx of  $Na^+$  and water, increased free intracellular  $Ca^{2+}$ , severe oxidative stress, which lead to cell swelling and induction of cell death pathways.

Recovery from asphyxia can be divided into several phases of evolving injury. After the initial period of reperfusion, there is a **latent** phase, in which there is nearly complete normalisation of oxidative cerebral energy metabolism, but electroencephalogram (EEG) activity is depressed and there is a secondary fall in cerebral blood flow (Williams et al. 1991; Lorek et al. 1994; Abi Raad et al. 1999). The latent phase may last for many hours, up to 15 h in some studies, before being followed by a phase of **secondary** deterioration (Gunn 2000). This phase is marked clinically and experimentally by the onset of seizures, delayed cytotoxic edema (cell swelling), extracellular accumulation of excitotoxins, failure of oxidative metabolism, and induction of inflammatory responses, and ultimately delayed apoptotic and necrotic cell death.

Treatment strategies to prevent the (long-term) consequences of ischaemia-reperfusion are highly necessary for both term and preterm infants. Although there is no precise way of determining the exact "window of opportunity" for neuroprotective treatment, broadly the events occurring in the latent phase after hypoxia-ischaemia appear to be potentially amenable to neuroprotective strategies, whereas generally treatments begun after the onset of the secondary deterioration seem to have very little or no benefit (Gunn 2000). Therapeutic hypothermia is currently the most promising candidate for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy (Gunn 2000).

Before new treatment strategies are studied in human infants it is vital to understand systemic effects both of the underlying hypoxic-ischaemic insult and of the treatment, and not just the effects on the brain. Thus one goal of my thesis was to better understand the systemic effects of cooling to ensure that there are no adverse systemic effects that might compromise its neuroprotective benefits, especially for preterm neonates.

The chronically instrumented fetal sheep model of both global asphyxia and cerebral ischaemia-reperfusion has several great advantages above other experimental paradigms such as rodent models. In fetal sheep it is possible to continuously monitor cerebral and systemic physiologic parameters such as temperature, blood flow, blood pressure and electro-encephalography in utero, with the mother serving as a ideal stable incubator (Gunn et al. 1997). Furthermore it allows repeated blood sampling for example to study endocrine changes and post-mortem histological examination. The sheep brain, like the human brain is gyrencephalic (in contrast to the lissencephalic rat brain) and shares many developmental features with the human infant.

This is clearly a compromise as fetal and neonatal metabolism differ in several aspects. However, this approach provides a primary insult, which occurs under fetal conditions, and avoids hypothermia and anaesthesia, which can interact with drug treatment. In terms of cerebral maturity the 0.7 gestation fetal sheep is comparable to the human brain at 30-32 weeks of gestation, whereas the near-term, 0.8-0.85 gestation fetus is equivalent to the term infant (McIntosh et al. 1979).

## Chapter 2

It is widely believed that one reason for the increased rate of neural injury after preterm birth is that the ability of the preterm fetus to defend itself from ischaemia-reperfusion is not as well developed as at term. In particular, it has been hypothesized that the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) responses to stresses such as asphyxia are immature in the preterm fetus and that this contributes to the frequent development of subsequent hypotension in the perinatal period. These experimental studies were undertaken using relatively mild insults. However, we now know that compared to the near-term fetus, survival of the premature fetus is much more prolonged during a severe asphyxial insult (Gunn et al. 2001). We therefore examined the effects of prolonged, severe asphyxia induced by complete umbilical cord occlusion on HPA responses in chronically instrumented preterm fetal sheep (at 0.7 of gestation) for 3 days.

Profound asphyxia in the preterm fetus led to a very large relative increase in ACTH and cortisol levels during asphyxia. Although the absolute levels of cortisol were much lower than at term, the pattern and magnitude of the relative changes were consistent with near-term responses. In the recovery phase there was a sustained elevation that gradually resolved between 24 and 72 h. There was a modest correlation between cortisol levels in the recovery phase and fetal mean arterial pressure suggesting that the adrenocortical response helps to sustain fetal blood pressure during a critical period of recovery.

Our conclusion is that the adrenocortical response of the preterm fetus is not immature. Rather our data suggest that the greater anaerobic tolerance of the preterm fetus, compared with near-term, means that its full range of responses is only activated by more severe insults.

## Chapter 3

Prolonged, moderate cerebral hypothermia has been shown to be able to reduce neural injury in a wide range of experimental ischaemia-reperfusion paradigms, but not yet in a model of premature brain injury. Using a chronically instrumented preterm (0.7 gestation) fetal sheep model, we examined the effects of cerebral hypothermia starting in the early recovery phase (90 min after asphyxia) and continued for 3 days, on neuronal loss and epileptiform activity.

We found that delayed, prolonged head cooling after a severe asphyxial insult in the premature fetus was neuroprotective in the hippocampus and basal ganglia, and suppressed activated caspase-3 (apoptosis) and microglia (inflammation). Neuroprotection was associated with potent, specific suppression of epileptiform transients in the early recovery phase, but not with number of delayed seizures. The histological improvement was associated with progressive normalisation of EEG frequency and carotid blood flow after reperfusion, consistent with possible functional improvements. Hypothermia was not associated with significant side-effects such as hypotension or acid-base changes, suggesting it may be safe in the preterm infant if carefully controlled.

Thus, our data demonstrate that selective cerebral hypothermia after profound asphyxia can reduce short-term injury of subcortical neuronal structures in the preterm brain. In view of the critical developmental events occurring in the preterm infant, and their potential vulnerability to the adverse systemic effects of hypothermia it will be critical to systematically evaluate the factors, such as delay before initiated cooling and the depth of hypothermia, that determine its effectiveness before human studies can be contemplated.

## Chapter 4 and 6

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is a potent endogenous neuroprotective and metabolic and growth factor. The IGF-I axis involves the peripheral effector peptide hormones GH, IGF-I, and IGF-II and a regulatory feedback loop. In blood, approximately 97% of the IGF are bound to six IGF-binding proteins

(IGFBP-1 to IGFBP-6), with the remaining IGF-I either in a bioactive-free fraction (approximately 1%) or in an easily dissociable form. The binding of IGF-I to IGFBP (especially IGFBP-1) limits the bioactivity of IGF-I, as bound IGF-I probably cannot activate the IGF-I receptor. Manipulating IGF-I by either administering IGF-I or its binding proteins or increasing IGF-I bioavailability with the use of IGF displacers could prove to be a safer and more effective alternative to growth hormone or IGF-I treatment, for example in paediatric renal failure or ischaemia-reperfusion injury.

The effects of asphyxia and hypothermia on circulating IGF-I are currently poorly understood, and may affect infants recovery from asphyxia. Our results show that the overall profile of changes in IGFs (and insulin) after asphyxia are highly consistent with facilitation of catabolic metabolism. While the primary IGF involved is clearly IGF-I, intriguingly, our study also suggests for the first time that by 0.7 of gestation IGF-II may also contribute to regulation of fetal metabolism during the acute recovery phase following asphyxia.

This study also demonstrates that therapeutic head-cooling in the preterm fetus is not associated with major changes in the responses of circulating concentrations of IGFs after asphyxia, suggesting reassuringly that hypothermia does not affect the metabolic adaptation mediated by circulating IGFs.

## **Chapter 5**

Post-resuscitation cerebral hypothermia is consistently neuroprotective in experimental preparations. Less is understood about the effects of hypothermia on white matter injury (oligodendrocytes and myelin). This is of some importance since one proposed reason for the consistent clinical failure of putative neuroprotective drugs has been their failure to protect white matter as well as neurons. Using a model of reversible cerebral ischaemia in unanaesthetised near-term fetal sheep, we examined the effects of cerebral hypothermia (fetal extradural temperature reduced from  $39.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$  to between  $30$  and  $33^\circ\text{C}$ ), induced at different times after reperfusion and continued for three days after ischaemia, on injury in the parasagittal white matter 5 days after ischaemia.

Cooling started within 90 minutes of reperfusion was associated with a significant increase in bioactive oligodendrocytes in the intragryal white matter compared with sham cooling, increased myelin basic protein density and reduced expression of activated caspase-3. Reactive microglia were profoundly suppressed compared with sham cooling with no effect on numbers of astrocytes. When cooling was delayed until 5.5 hours after reperfusion there was no significant effect on loss of oligodendrocytes.

We conclude that prolonged moderate cerebral hypothermia can prevent post-ischaemic white matter damage in the near-term fetal sheep, but there is rapid attenuation of this effect with increasing delay in the initiation of cooling. Protection of the white matter was closely associated with reduced expression of both activated caspase-3 and of reactive microglia. These data strongly support the critical importance of early initiation of cooling in clinical trials.

## **FUTURE PERSPECTIVE**

### **Prevention**

Obviously, prevention of injury of course is better than treatment. On one hand, improvements in routine obstetric care, to minimise the risk of hypoxia-ischaemia in both term and preterm infants, are possible. There is now some evidence that innovations in monitoring and early intervention can further improve detection of intrapartum asphyxia and thus reduce the rate of neonatal encephalopathy (Amer-Wahlin et al. 2001; Noren et al. 2003). However, it is improbable that complete prevention of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy could ever be achieved, and thus there will always be a need for

rescue treatment. As many agents have been shown to be only effective when treatment is started during hypoxia-ischaemia, an elegant approach would be to start treatment in at risk pregnancies before labour, for example by administering neuroprotective agents to the mother. For example, there is some evidence that magnesium sulphate, which is a partial NMDA receptor antagonist, given to women immediately before very preterm birth may improve some neurodevelopmental outcomes in the children, although in this trial there was no overall statistically significant effect (Crowther et al. 2003).

### **Therapeutic hypothermia**

As discussed in this thesis, hypothermia is currently one of the most promising interventions for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. In many different animal models it has consistently been shown to improve structural and functional outcome, and the pharmacological parameters for effective use have been reasonably well defined. Based on these experimental data randomised controlled clinical trials using either selective cerebral hypothermia ("CoolCap trial") or whole-body hypothermia have just been completed or are in progress (Jacobs et al. 2004; Shankaran et al. 2004; Gluckman et al. 2005). Results from the CoolCap trial suggested that the combination of head cooling with mild systemic hypothermia reduced death or disability in the infants with less severe electroencephalographic changes at entry of the trial. However, cooling using this protocol was not significantly beneficial in infants with the most severe electroencephalographic changes before the onset of cooling. These data strongly suggest that further research is important to find better ways of selecting newborn infants who may benefit most from treatment. Currently (amplitude integrated)-EEG appears to have the best potential selection capacities (Groenendaal and de Vries 2000), but further studies are needed to validate the CoolCap trial experience and to define the most robust, generally applicable criteria.

Many more questions remain about the best ways of optimizing clinical neuroprotection with hypothermia. For example, it is unclear whether head cooling is better than whole body. It is likely that this will be a balance between risks and benefits, and we may speculate that there may prove to be better therapeutic effects of whole body cooling on subcortical structures at the expense of an increased risk of complications from the deeper systemic hypothermia used in whole body cooling. Further, the real width of the so called "window of opportunity" after birth, the, optimal depth and duration of cooling and of the speed of warming babies up after cooling are all highly unclear, and likely depend on factors such as the severity of injury, its precise timing before birth, the type of insult (e.g. single profound episode of anoxia vs. repeated shorter episodes), the age and maturity of the infant, the presence of pre-existing growth retardation and so forth. Our results summarised above suggest that hypothermia may be potentially an effective intervention to reduce neurological morbidity in preterm infants. Given the well established finding of increased mortality in infants less than 1500 g who were allowed to get mildly hypothermic, much more basic research is needed before hypothermia could be considered for this uniquely vulnerable group.

### **Combination therapy**

Although hypothermia reduces the massive cell death the first week after ischaemia-reperfusion injury, protection is only partial, and there will often still be permanent structural and functional injury to the neonatal brain. One way of further improving protection would be to combine hypothermia with other neuroprotective agents. For example, the combination of hypothermia and NMDA-receptor antagonist xenon has recently been shown to have additive neuroprotective effects (Ma et al. 2005). Alternatively, mild early hypothermia can be used to prolong the window of opportunity for treatment with neuroprotective peptides such as insulin-like growth factor (IGF)-I (Guan et al. 2000). IGF-I has to be

given directly into the cerebral ventricles; thus combination treatment of hypothermia with an IGF-I displacer may be a more clinically acceptable approach (Loddick et al. 1998; Mackay et al. 2003).

### **Plasticity**

Finally, it may also be fruitful to combine therapeutic hypothermia with factors that improve brain recovery. The neonatal brain has very high levels of endogenous growth factors, such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and IGF-I that are further upregulated in the recovery from injury (Beilharz et al. 1998; Lee et al. 2000). These growth factors are potently anti-apoptotic, but can also stimulate the generation of new cells (both neurons and oligodendrocytes) and promote axon sprouting within and surrounding damaged areas (Zaidi et al. 2004). The endogenous adaptive responses following brain injury are termed plasticity. They include elimination of neurons through apoptosis and pruning of synapses. It is proposed that ischaemia-induced neurogenesis and plasticity contributes to the long-term recovery of function (Sharp et al. 2002). There must be some potential risk that excessive regeneration and plasticity may lead to maladaptive brain circuits. Nevertheless, the magnitude of this response in the brain compares poorly with the degree of regeneration and functional repair seen in other organs, for example the liver, and there is now intriguing evidence from adult and infant rats that environmental stimulation can enhance neurogenesis and improve recovery from various insults. Thus it seems likely that there is real potential for behavioural or drug treatments to augment neural regeneration and plasticity and thus improve long-term functional recovery from perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (Young et al. 1999; Faverjon et al. 2002).

## SAMENVATTING

Het doel van dit proefschrift was om de hormonale en cardiovasculaire effecten van asfyxie (ernstig zuurstof tekort leidend tot acidose en verminderde weefsel doorbloeding) te bestuderen en om de therapeutische effecten van koeling van het hoofd te bestuderen in premature en à terme foetale schapen.

In **hoofdstuk 1** wordt de klinische en experimentele achtergrond van dit proefschrift besproken. Hersenschade ten gevolge van asfyxie is nog steeds een veel voorkomend probleem bij zowel à terme als prematuur geboren zuigelingen. Neuronen in de grijze stof van de hersenen zijn zeer kwetsbare cellen. Voor hun functie zijn ze afhankelijk van cellen in hun omgeving (o.a. glia cellen). Het lichaam is er alles aan gelegen tijdens een periode van zuurstoftekort zo lang mogelijk de doorbloeding van de hersenen in stand te houden, zelfs ten koste van de doorbloeding van andere organen zoals de nieren. Indien er tijdens langdurige asfyxie toch een cerebraal cellulair energietekort optreedt, zullen cellen in de grijze en witte stof dood gaan. Voor een deel zal deze celdood acuut optreden (necrose). Een ander deel raakt beschadigd of verliest contacten met de omgeving door de schade in de witte stof. Beschadigde cellen zullen uren tot dagen na het insult alsnog sterven, meestal middels activatie van een cascade van zelfvernietigingseiwitten. Dit proces wordt ook wel geprogrammeerde celdood of apoptose genoemd.

Klinisch kan de herstelperiode na asfyxie in verschillende fases verdeeld worden. In de eerste fase, ook wel de latente fase genoemd, treedt herstel op van oxidatief metabolisme. Het electroencefalografie signaal (EEG) is onderdrukt. Na 6-15 uur treedt er een fase op van verslechtering, de secundaire fase. Het begin van deze fase wordt meestal gemarkeerd door het ontstaan van epileptiforme activiteit op het EEG, het ontstaan van hersenzwelling, de intrede van ontstekingscellen en celdood. Na enkele dagen komt de tertiaire fase van stabilisatie. Het is waarschijnlijk dat in deze fase nog meer celdood plaatsvindt.

Het is de laatste jaren duidelijk geworden dat niet alleen schade aan de grijze stof belangrijk is voor de klinische prognose, maar dat ook schade aan de witte stof een belangrijke rol speelt.

Inmiddels hebben vele studies aangetoond dat in de latente fase interventies mogelijk zijn om de mate van grijze stof schade te beperken. Momenteel is er nog geen klinisch bewezen effectieve behandeling om de lange termijn effecten van asfyxie te beperken. Voor zowel premature als à terme pasgeborenen is een effectieve behandeling om handicaps te voorkomen zeer gewenst. Therapeutisch koelen van de hersenen (hypothermie) is een van de meest veelbelovende behandelingsstrategieën ter voorkoming van permanente hersenschade bij pasgeborenen. Het is echter nog onduidelijk of deze therapie ook effectief is voor de witte stof en bij prematuren.

Alvorens nieuwe behandelingen kunnen worden getest op pasgeboren kinderen is het belangrijk om niet alleen naar de effecten op de hersenen te kijken maar tevens naar de systemische effecten. Een van de doelstellingen van dit proefschrift was derhalve om de systemische effecten (o.a. bloeddruk, hersendoorbloeding en hormonale effecten) van koelen in de premature foetus te bestuderen.

Het chronisch geïnstrumenteerde foetale schapen model is een model dat al vele jaren wordt gebruikt voor studies van foetale fysiologie. Op vele relevante aspecten komt het foetale schaap overeen met de mens, ook qua ontwikkeling en structuur van de hersenen. De hersenen van een foetaal schaap op 70% van de totale zwangerschapsduur komen qua ontwikkeling overeen met humane hersenen van 30-32 weken zwangerschapsduur, terwijl schapen hersenen op 85% van de zwangerschapsduur overeenkomen met de à terme humane pasgeborene.

Het is in het schapenmodel mogelijk om continue metingen te doen van hersenfunctie (EEG) en fysiologische parameters zoals temperatuur, bloeddruk en weefsel doorbloeding. Aangezien de foetus

in utero blijft, kan de ooi gezien worden als een ideale, stabiele couveuze. Tevens is het mogelijk op verschillende momenten bloedmonsters af te nemen, en na afloop van de experimenten de weefsels nader te analyseren. In het chronisch geïnstrumenteerde foetale schapenmodel is het mogelijk om selectief de doorbloeding van de hersenen tijdelijk stil te leggen (ischemie) door occlusie van de bloedvaten naar de hersenen, maar ook om de navelstreng tijdelijk af te sluiten, waardoor er een algeheel zuurstof tekort optreedt. Beide methoden leiden tot patronen van hersenschade die relevant zijn voor humane perinatale hersenschade.

## Hoofdstuk 2

Het prematuur geboren kind heeft een verhoogd risico op hersenschade. Een van de veronderstelde potentiële mechanismen hiervan is dat de prematuur minder goede beschermingsmechanismen heeft tegen episoden van zuurstofgebrek (asfyxie).

Met name de hypothalamus-hypofyse-bijnier as reactie op stress zoals asfyxie is potentieel immatuur, wat zou kunnen bijdragen tot het ontstaan van hypotensieve episoden. Echter, de studies die suggereerden dat de cortisol stress respons verminderd is in prematuren hebben relatief milde insulten gebruikt. Premature foetale schapen hebben een grotere tolerantie voor asfyxie en zijn in staat 2x zo lange insulten te overleven vergeleken met à terme foetussen, derhalve is het mogelijk dat voorgaande studies de foetale stressreactie niet maximaal gestimuleerd hebben. Om de effecten van ernstige asfyxie op de ACTH-cortisol as te bestuderen hebben wij het chronisch geïnstrumenteerde premature foetale schapen model gebruikt.

Onze studie liet zien dat de premature foetus geen immature hypothalamus-hypofyse-bijnier functie heeft. Echter, door de grote anaërobe tolerantie van de premature foetus vergeleken met een à terme foetus, hoeft de premature foetus pas in een veel latere fase de stressrespons maximaal te activeren. Er was een verband tussen cortisolwaarden en bloeddruk hetgeen suggereert dat cortisol helpt om de bloeddruk stabiel te houden tijdens de kritische herstelperiode na ernstige asfyxie.

## Hoofdstuk 3

Verskillende experimentele modellen van hersenschade hebben aangetoond dat koelen van de hersenen een effectieve manier is om de grijze stof te beschermen. Er zijn echter nog geen studies verricht naar de gevolgen van hypothermie voor hersenschade bij prematuren. Dit is relevant omdat prematuren mogelijk gevoeliger zijn voor de nadelige effecten van hypothermie en omdat het patroon van hersenschade verschilt tussen prematuren en à terme zuigelingen.

In het chronisch geïnstrumenteerde premature schapenmodel (70% van de zwangerschap, overeenkomend met 30-32 weken humaan) hebben we het effect bestudeerd van het koelen van de hersenen na een ernstig asfyctisch insult. Koelen was geassocieerd met een daling van epileptiforme activiteit. Koelen beschermt tegen het verlies van neuronen in de hippocampus en basale ganglia, en was geassocieerd met minder apoptose en microglia activatie.

We concluderen dat koelen na ernstige asfyxie in de premature foetus beschermt tegen hersenschade, zonder dat potentieel schadelijke effecten worden gezien, zoals hypotensie of verstoring van het zuur-base evenwicht.

## Hoofdstuk 4 en 6

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is een krachtige endogene groeifactor met neuroprotectieve en metabole functies. De rol van groeifactor IGF-II is minder bekend. De aanmaak van IGF-I wordt gestimuleerd door groeihormoon (GH) uit de hypofyse. In het bloed is ongeveer 97% van het IGF gebonden aan speciale bindingseiwitten (IGFBP 1-6). Het overige kleine deel is in de actieve vrije vorm



of los gebonden. Met name IGFBP-1 voorkomt dat IGF-I zich kan binden aan de IGF receptor.

Er is nog weinig bekend over de effecten van asfyxie op circulerend IGF en bindingseiwitten. We hebben daarom de effecten van asfyxie en therapeutische hypothermie onderzocht op veranderingen in IGF en IGFBP-1. Onze resultaten laten na asfyxie een daling van IGF-I en stijging van IGFBP-1 zien, waarschijnlijk om een catabole staat te faciliteren.

In hoofdstuk 6 wordt een nieuwe methode beschreven om de vrije fractie van IGF te verhogen. Behalve het direct toedienen van IGF-I lijkt het mogelijk een stof toe te dienen die IGF los maakt van het bindingseiwit om zo de biologische beschikbaarheid te verhogen. Zo'n stof is mogelijk eenvoudiger toe te dienen en mogelijk veiliger dan directe toediening van IGF-I.

Potentiele therapeutische opties van IGF displacers zijn groeistoornissen bij kinderen waarbij er een verhoogde hoeveelheid IGFBP-1 is, zoals bij nierfalen voorkomt. Daarnaast zijn IGF- displacers mogelijk werkzaam bij hersenschade op basis van ischemie en reperfusie. De studie uit hoofdstuk 4 suggereert dat de werking van therapeutische hypothermie niet het gevolg is van door effecten op circulerend IGF-I en dat milde systemische hypothermie de metabole aanpassingen na asfyxie niet verstoort.

## Hoofdstuk 5

Vele experimentele studies hebben aangetoond dat koelen van de hersenen de grijze stof (neuronen) beschermt na ischemie-reperfusie. Er is echter minder bekend over de effecten van hersenkoeling op de overige hersencellen, zoals de witte stof (myeline en oligodendrocyten) en de steuncellen (glia).

Aangezien het ter voorkoming van neurologische schade niet alleen belangrijk is om de grijze stof te beschermen, dient een potentieel succesvolle behandeling ook de witte stof te beschermen. Voor deze studie hebben we gebruik gemaakt van à terme chronisch geïnstrumenteerde schapen. Hersenschade werd aangebracht door het tijdelijk afsluiten van de arteria carotis beiderzijds. De hersenen werden gekoeld tot tussen 30 en 33 graden Celcius. Koelen werd op verschillende tijden na ischemie gestart en gecontinueerd voor 3 dagen.

Wanneer het koelen 90 minuten na herstel van de circulatie werd gestart bleek er een significant grotere dichtheid van myeline en betere overleving van oligodendrocyten te zijn in vergelijking met de controle groep zonder koeling. Tevens was er minder apoptose in de witte stof. Koelen zorgde voor een forse onderdrukking van microglia cellen, terwijl er geen significant effect was op astrocyten. Wanneer koelen pas 5,5 uur na ischemie werd gestart bleek er geen significant beschermend effect te zijn op de witte stof oligodendrocyten.

We concluderen dat het koelen van de hersenen niet alleen beschermend werkt voor de grijze stof maar ook voor de witte stof. Echter, des te later de aanvang van het koelen, hoe minder effectief de bescherming. Bescherming van de witte stof was geassocieerd met een verminderde expressie van geactiveerd caspase-3 (apoptose) en van microglia cellen (inflammatie). De data ondersteunen het belang van het vroeg beginnen met koelen in de klinische studies.

## TOEKOMST PERSPECTIEF

Koelen van de hersenen is een veel belovende therapie ter voorkoming van hersenschade voor à terme zuigelingen, maar mogelijk ook voor premature zuigelingen. Gerandomiseerde klinische studies zoals de "CoolCap trial" hebben nu ook aangetoond dat hypothermie effectief mogelijk is, maar met name in zuigelingen met matig ernstige hersenschade. Naast het vaststellen van selectiecriteria voor kinderen die mogelijk baat zullen hebben bij behandeling met hypothermie zullen nog verschillende vragen beantwoord moeten worden voordat koelen een standaard therapie zal worden op de afdeling

neonatologie. De maximale tijd waarna koelen nog gestart kan worden na de geboorte, de mate van koelen en de optimale duur van koelen vergen verder onderzoek. Alvorens koelen ook voor premature zuigelingen getest kan worden zijn meer studies naar veiligheid en effectiviteit gewenst. Behalve interventie door middel van koelen alleen, zullen er ook studies gedaan moeten worden naar combinatie therapieën, zoals koelen en behandeling met groeifactoren zoals IGF-I.