

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

MEDICINA MATERNO-INFANTILE E DELL'ETA' EVOLUTIVA

Ciclo XXI

**Settore scientifico disciplinari di afferenza:
PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA MED/38**

**VALUTAZIONE DEL DANNO IPOSSICO-ISCHEMICO CEREBRALE NEL NEONATO A
TERMINE MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA ED
ELETTOENCEFALOGRAMMA AD INTEGRAZIONE DI AMPIEZZA DOPO
TRATTAMENTO IPOTERMICO: STUDIO CASO-CONTROLLO**

Presentata da: Dott.ssa SILVIA SOFFRITTI

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof LUIGI BOLONDI

Chiar.mo Prof GIACOMO FALDELLA

Esame finale anno 2009

INDICE

Introduzione	pag. 3
Scopo dello studio	pag. 6
Pazienti e metodi	pag. 6
Risultati	pag. 12
Discussione	pag. 23
Conclusione	pag. 27
Bibliografia	pag. 28

Introduzione

L'incidenza della paralisi cerebrale infantile (PCI) è rimasta stabile negli ultimi 20 anni, ed i costi individuali e sociali di questa condizione sono elevatissimi(1). Nonostante il miglioramento dell'assistenza perinatale, il 15-28% (2) delle paralisi cerebrali infantili è attribuibile all'Encefalopatia Ipossico Ischemica (EII) . L'EII è l'espressione del danno cerebrale che consegue all'asfissia intrapartum, ha un'incidenza di 3-4 casi per 1000 nati vivi (3-6) a termine ed è in generale un evento imprevedibile ed inevitabile con drammatici esiti neurologici. Il danno cerebrale si sviluppa in tappe successive. Ad una noxa ipossico-ischemica consegue un danno a carico delle cellule del sistema nervoso che è funzione della durata e dell'intensità dell'ipossi-ischemia (7). In questa fase una rianimazione cardio-respiratoria efficace alla nascita gioca un ruolo determinante. A questa prima fase di morte cellulare direttamente legata all'ipossi-ischemia segue una seconda fase correlata all' apoptosi (8-10). La morte per apoptosi cellulare inizia circa 6-24 ore dopo l'insulto, si prolunga anche per giorni ed è una fase energeticamente attiva che si innesca dopo la riperfusione cerebrale e il cui motore trainante è il sistema mitocondriale. Il mitocondrio danneggiato rilascia nel citoplasma proteine come il citocromoC che a sua volta attiva enzimi proteolitici (caspasi 3 e 9) responsabili della frammentazione nucleare (11,12). L'insorgenza tardiva di una parte del danno legata all'apoptosi fa sì che esista una finestra terapeutica temporale di circa 6 ore in cui intervenire per limitare il danno stesso (13).

Diversi approcci terapeutici, farmacologici e non, sono stati tentati in questa fase: quello attualmente più promettente è il **trattamento ipotermico**. L'ipotermia sembra avere un potente effetto neuroprotettivo, dose-dipendente, infatti, oltre a provocare l'inibizione del rilascio di glutammato, il miglioramento della funzione della barriera emato-encefalica, la prevenzione della proteolisi, la riduzione del metabolismo cerebrale, dell'accumulo di acido lattico e della produzione di NO, previene l'edema cerebrale e la morte neuronale per apoptosi (14-19).

Studi clinici condotti a livello internazionale, di recente pubblicazione, confermano l'efficacia del trattamento nel neonato asfittico quando attuato precocemente (finestra terapeutica) ovvero nelle prime 6 ore dall'evento asfittico (20-25).

Al momento sono stati pubblicati almeno 8 studi randomizzati controllati (RCT) che sono stati oggetto di una recente revisione sistematica Cochrane e dalla quale è risultato che l'applicazione dell'ipotermia terapeutica nel neonato a termine affetto da encefalopatia ipossico-ischemica (EII) di grado moderato-severo con evidenza di asfissia intrapartum, sia essa sistemica o selettiva, determina una riduzione statisticamente significativa, e clinicamente importante, dell'outcome combinato di mortalità o disabilità maggiore dello sviluppo neurologico a 18 mesi di vita [RR 0.76 (95% CI 0.65, 0.89), RD -0.15 (95% CI -0.24, -0.07), NNT 7 (95% CI 4, 14)]. A fronte degli esiti positivi sopra citati, la presenza di effetti avversi è limitata ad un modesto (di scarso significato clinico) incremento del fabbisogno di inotropi e ad un incremento significativo dell'incidenza di piastrinopenia (26).

Prima che venisse introdotto in ambito clinico l'utilizzo dell'ipotermia, la maggior parte degli studi condotti sui neonati era volta ad identificare gli esami strumentali che potessero predire precocemente l'outcome neuro-motorio. Le indagini strumentali maggiormente indagate in questo senso sono state l'elettroencefalogramma ad integrazione di ampiezza (a-EEG) e le metodiche di risonanza magnetica.

L'a-EEG è uno strumento di monitoraggio della funzione cerebrale facilmente utilizzabile al letto del neonato e di più semplice e rapida lettura rispetto all'EEG; registra l'attività elettrica corticale nel suo insieme non riuscendo a localizzare le aree epilettogene specifiche, tuttavia consente di monitorare per lungo tempo l'attività bioelettrica di fondo, di studiarne la maturazione, di valutare i cambiamenti da un pattern all'altro e di riconoscere l'attività convulsiva generalizzata.

Numerosi studi pubblicati in letteratura dimostravano, già nelle prime 3 ore di vita, un'elevata sensibilità e specificità dell'a-EEG nell'identificare i pazienti a rischio di esito neurologico e

l'appropriatezza di questo strumento per la selezione dei pazienti da trattare (27,28). Uno studio recente ha aggiunto che il 61% dei pazienti con traccianti a-EEG patologici a 6 ore di vita che recuperano nelle prime 24 h sopravvivono senza importanti esiti motori (29).

Le metodiche di risonanza magnetica tradizionale (MRI), spettroscopica ($^1\text{H-MRS}$) e di diffusione vengono utilizzate di routine nei pazienti con EII per l'alta sensibilità nella definizione anatomica e metabolica del danno e della sua estensione. La $^1\text{H-MRS}$, rispetto a quella tradizionale, permette di indagare i cambiamenti metabolici "in fieri" a carico del SNC riuscendo ad orientarci nella prognosi, già nei primi giorni di vita, quando il danno tissutale non si è ancora completato. Spesso, infatti, pazienti con quadro clinico severo alla nascita non evidenziano particolari alterazioni alla $^1\text{H-MRS}$, al contrario bambini con gli stessi sintomi neurologici presentano un esame estremamente patologico. I metaboliti con significato funzionale importante e che possono essere rilevati con la $^1\text{H-MRS}$ sono principalmente l'N- Acetilaspato (NAA) ed il lattato (lac) (30). L'NAA è considerato un marker neuronale ed assonale, è prodotto nei mitocondri e si trova esclusivamente nel SNC. La sua riduzione è espressione di morte neuronale (irreversibile), di danno assonale (spesso reversibile) ed è estremamente predittiva di prognosi sfavorevole (31). Il lac è l'espressione del metabolismo anaerobio tissutale e la sua concentrazione aumenta nell'EII, anche questo marker, come l'NAA, è predittivo di outcome sfavorevole (32). Un altro metabolita che sembra modificarsi durante l'evento asfittico è il mio-inositolo (mI). Il mI è una sostanza con struttura simile alle molecole di zucchero, ha un ruolo osmolare ed è anche un marker degli astrociti. La sua concentrazione si modifica nelle varie fasi della EII (33).

Essendo l'a-EEG e la $^1\text{H-MRS}$ due esami in grado di fotografare in vivo lo stato neurofunzionale-metabolico cerebrale nel momento in cui vengono eseguiti, con uno studio prospettico condotto tra il 2004 e il 2005 abbiamo voluto indagare la correlazione tra l'a-EEG a 24 ore di vita e $^1\text{H-MRS}$ a 7-10 giorni di vita e la loro correlazione con l'outcome (34). I risultati del lavoro dimostravano che entrambe le metodiche l'una in fase acuta, l'altra in fase sub-acuta, riuscivano a predire la prognosi motoria e intellettiva dei pazienti affetti da encefalopatia ipossico ischemica in modo altamente

sensibile e specifico; inoltre era presente una significativa correlazione tra a-EEG e ¹H-MRS, infatti i pazienti con tracciati a-EEG che miglioravano nelle prime 24 ore di vita presentavano un esame spettroscopico nella norma, quelli che peggioravano da un punto di vista elettrico presentavano una spettroscopia patologica. Mediante lo stesso studio si era riusciti a ricavare un range di normalità per i metaboliti più significativi (Naa/Cr > 0.5 e Lac/Cr < 0.3, mI <3.0) che permettevano di discriminare tra i pazienti con outcome normale e quelli con outcome sfavorevole (34).

Questo studio era stato condotto prima dell'introduzione dell'ipotermia in ambito clinico; risultava a questo punto interessante identificare un esame strumentale che fosse in grado di predire precocemente l'outcome neuromotorio dopo trattamento ipotermico.

Scopo dello studio

Valutare attraverso uno studio caso-controllo, il grado di predittività dell'aEEG e della ¹H-MRS nei pazienti sottoposti ad ipotermia e la eventuale capacità di queste metodiche di identificare in fase acuta e subacuta, rispettivamente, l'efficacia del trattamento ipotermico nel prevenire la morte neuronale ritardata.

Pazienti e metodi:

Nel periodo compreso tra gennaio 2004 e novembre 2008, presso l'Istituto di Neonatologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, sono stati studiati 20 neonati consecutivi, a termine (EG > 36 sett.), con:

1) segni di asfissia intrapartum definiti dai seguenti criteri:

- anomalie al tracciato cardiocografico e/o liquido amniotico tinto e/o necessità di rianimazione cardiorespiratoria
- Apgar score < 5 a 5' e/o pH < 7.10 e/o deficit di basi > 12 mmol/L nel campione di sangue prelevato dall'arteria ombelicale o nel sangue arterioso o venoso prelevato entro 60 min dalla nascita

- 2) encefalopatia ipossico-ischemica di grado moderato-severo, valutata mediante esame neurologico e stadiata secondo Sarnat e Sarnat (Arch of Neurology, 1976) (35)
- 3) tracciato aEEG patologico, di tipo moderatamente (margine superiore > 10 mcv, margine inferiore < 5 mcv) o severamente (margine superiore < 10 mcv, margine inferiore < 5 mcv) alterato (36)
- 4) sopravvissuti ad una settimana di vita

Criteri di esclusione:

- 1) EG < 36 sett,
- 2) malformazioni cardiache congenite,
- 3) emorragie intracraniche generate da trauma,
- 4) severo IUGR

I pazienti con EII di grado moderato-severo sono stati suddivisi in 2 gruppi in base al periodo di nascita ed al diverso approccio terapeutico:

1. **Gruppo di controllo sottoposto a trattamento convenzionale (gruppo TC)** per i nati tra gennaio 2004 l'ottobre 2006 prima dell'implementazione del trattamento ipotermico.

I neonati in questo gruppo venivano assistiti attraverso:

- mantenimento di un'adeguata ventilazione e perfusione
- controllo glicemico e trattamento dell'attività convulsiva
- infusione di cardiocinetici (dopamina/ dobutamina)

Il monitoraggio aEEG è stato mantenuto almeno fino a 24 ore di vita.

2. **Gruppo sperimentale sottoposto a trattamento ipotermico (gruppo TI)** per i nati a partire da Ottobre 2006.

Questi pazienti sono stati sottoposti ad ipotermia dapprima mediante borse di ghiaccio attorno al corpo e, dall'Aprile 2007, mediante Cool Cap® (20). Questi neonati sono stati

comparati con un controllo storico paragonabile per severità dell'EII.

- Ipotermia sistemica: è stata effettuata mediante l'applicazione di borse di ghiaccio attorno al corpo e monitorizzando e mantenendo la Temp. Rettale tra 33-34°C per un periodo di 72 ore.
- Ipotermia selettiva mediante l'applicazione del Cool Cap Device (Olympic Medical) sempre per un periodo di 72 h.



Fig. 4. ©Cool Cap Device (Olympic Medical)

Il Cool-Cap è costituito da una cuffietta in silicone entro la quale circola acqua fredda ad una temperatura di circa 11 °C. Viene costantemente monitorata la Tr che deve essere mantenuta tra i 34-35°C. Questo range viene mantenuto agendo sulla temperatura dell'acqua che circola all'interno del caschetto o su un sistema di riscaldamento posto al di sopra del neonato (Infant warmer).

Durante l'ipotermia eventuali episodi convulsivi sono stati trattati fenobarbitale.

Al termine delle 72 h si è proceduto al riscaldamento dei neonati con un incremento moderato della temperatura circa 0,5°C/h fino al raggiungimento di una temperatura in range di normalità 36,5-37,5°C.

Il monitoraggio aEEG è stato mantenuto fino al termine del rewarming.

Al fine di ottenere dei valori di riferimento dei principali metaboliti cerebrali a 7-10 giorni di vita

sono stati valutati 10 neonati sani (GS) nati tra 2000-2002 (6 di sesso femminile e 4 di sesso maschile) comparabili per età gestazionale ed età postnatale ai nostri pazienti con EII. Questi neonati sono stati sottoposti a ^1H -MRS ed il loro profilo metabolico è stato utilizzato per ottenere valori normali di riferimento.

a-EEG

Il monitoraggio (Olympic CFM 6000) è stato iniziato prima della eventuale somministrazione di terapia anticonvulsivante, nel minor tempo possibile dalla nascita e comunque sempre entro le 6 h dall'insulto ipossico-ischemico.

I tracciati sono stati classificati secondo un criterio basato sui voltaggi del margine inferiore e superiore (36):

- 1) **tracciato normale**: margine superiore > 10 mcv e margine inferiore > 5 mcv.

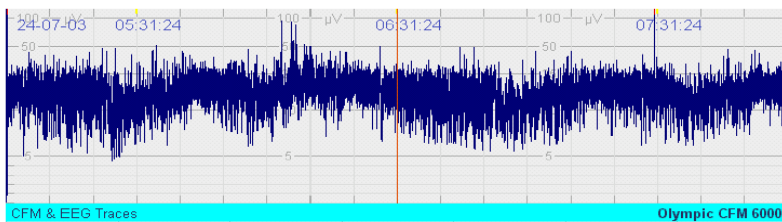


Fig. 1. Tracciato normale

- 2) **tracciato moderatamente alterato**: con margine superiore > 10 mcv e margine inferiore < 5 mcv.

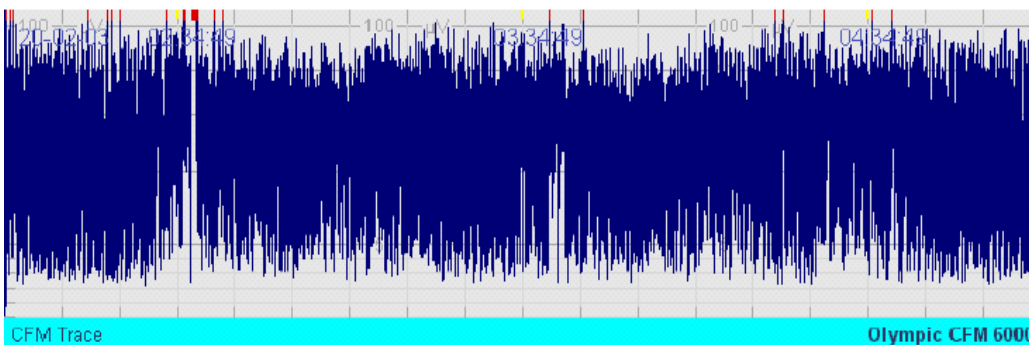


Fig. 2. Tracciato moderatamente alterato

- 3) tracciato severamente alterato: < 10 mcV e margine inferiore < 5 mcV, solitamente associato a burst suppression (BS)

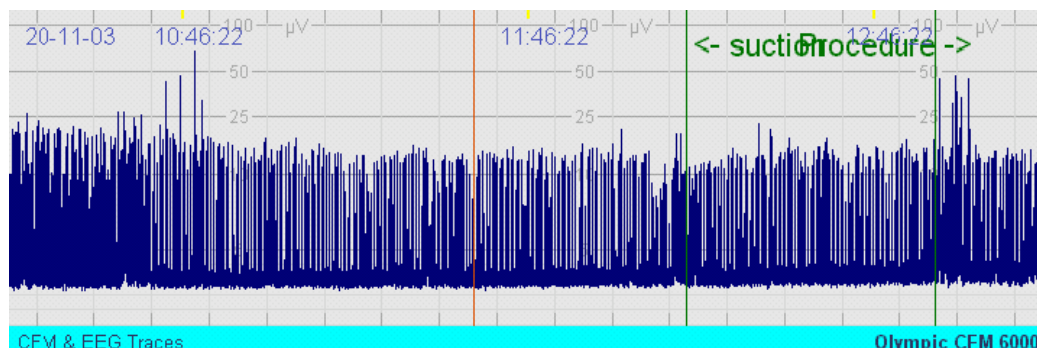


Fig. 3. **Tracciato severamente alterato**

MRI e ¹H-MRS

Gli studi di MRI sono stati eseguiti con una apparecchiatura MR total body con campo statico di 1.5 Tesla (Signa Horizon LX, General Electric Medical Systems) utilizzando una bobina tipo “quadrature birdcage” sintonizzata sulla frequenza del protone del diametro di 25 cm.

Tutti i neonati sono stati trasferiti nell’unità di Risonanza dal reparto di Terapia Intensiva Neonatale e Neonatologia mediante incubatrice da trasporto non appena le loro condizioni cliniche lo hanno reso possibile. L’esame nella maggior parte è stato eseguito durante il sonno dopo la somministrazione di cloralio idrato 10% (50mg/Kg) per via orale. Frequenza cardiaca e saturazione di O₂ sono stati monitorati in continuo durante tutta la durata dell’esame.

MRI. Sono state acquisite immagini pesate in T₁ spin-echo (SE) assiali di 4 mm di spessore (inter-slice gap di 1 mm) ottenute con un tempo di ripetizione (TR) di 400 ms, un tempo di eco (TE) di 9 ms e 2 eccitazioni (NEX) utilizzando una matrice di 256x192 e campo di vista (FOV) di 16x16 cm.

¹H-MRS. Un volume rettangolare di 15x20x15 mm² è stato selezionato sulle immagini assiali sia a livello corticale (corteccia parieto-occipitale paramediana-CPO) che a livello della sostanza grigia profonda comprendente il talamo antero-laterale, il nucleo lenticolare e la testa del nucleo caudato

(GB). In entrambe le localizzazioni gli spettri del protone sono stati acquisiti utilizzando la sequenza PRESS (point resolved spectroscopy) con TR di 1500 ms, TE di 40 ms e 128 acquisizioni. Il segnale dell'acqua è stato soppresso utilizzando un impulso selettivo di chemical-shift (CHESS). Le aree dei picchi N-acetil-aspartato (NAA) a 2.02 ppm, di creatina-fosfocreatina (Cr) a 3.03, di colina (Cho) a 3.22 e di *mio*-inositolo a 3.56 sono state calcolate utilizzando il programma di fitting nel dominio del tempo AMARES/MRUI. (<http://carbon.uab.es/mrui>).

In tutti i neonati è stata eseguita una indagine di ¹H-MRS a 7-10 giorni di vita ed, in particolare, sono stati valutati i rapporti NAA/Cr, LAC/Cr e la concentrazione di mio-inositolo (mI).

I valori misurati nella popolazione con EII (gruppo TC e TI) sono stati poi correlati con quelli della popolazione sana di controllo (gruppo C) e con i range di normalità ricavati dallo studio condotto in precedenza (Naa/Cr > 0.5, Lac/Cr < 0.3 e mI >3.0) (34).

Outcome

Lo sviluppo neuromotorio è stato indagato a 3, 6, 12, 24 mesi utilizzando l'esame neurocomportamentale di Brazelton (37). Una valutazione ai 9 e 18 mesi è stata eseguita qualora non fosse stata acquisita la capacità di mantenere la posizione seduta ai 6 mesi o la deambulazione autonoma ai 12 mesi. La paralisi cerebrale infantile (PC) è stata classificata secondo Hagberg et al (38)

Analisi statistica

I dati sono stati raccolti in un database costruito ad hoc mediante l'utilizzo di Excel 2003. Sono stati successivamente analizzati usando il pacchetto statistico SPSS 16 per Windows XP.

I dati tra i gruppi sono stati confrontati mediante Fisher's Exact test o CHI quadro test. Un p < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

I pazienti appartenenti al gruppo trattamento convenzionale (TC) presentavano le seguenti caratteristiche:

- N° totale 6, M/F: 5/1
- età gestazionale (EG) media di 38,6 settimane DS \pm 1,51 (range 37-41); peso medio alla nascita di 2822 grammi DS \pm 163,86 (range 2610-3000)
- 4 nati da taglio cesareo, 2 da parto spontaneo
- 1 neonato grado 3 di Sarnat, 5 neonati grado 2 di Sarnat
- tutti i neonati sono stati seguiti in follow up per 24 mesi
- 3 pazienti hanno sviluppato una paralisi cerebrale infantile

I pazienti appartenenti al gruppo trattamento ipotermico (TI) presentavano le seguenti caratteristiche:

- N° totale 14, M/F: 8/6
- EG media di 39,2 settimane DS \pm 1,12 (range 37-41) ed un peso medio alla nascita di 3497 grammi DS \pm 598,9 (range 2640-5100)
- 3 nati da taglio cesareo, 11 da parto spontaneo
- 2 neonati grado 3 di Sarnat, 12 neonati grado 2 di Sarnat
- il 29% dei pazienti ha raggiunto i 24 mesi di età, il 36% i 12 mesi, il 21% i 9 mesi ed il 14% i tre mesi
- 2 pazienti hanno sviluppato una paralisi cerebrale infantile

In tabella 1 vengono riportati i principali dati generali dei neonati inclusi nello studio. I due gruppi erano comparabili statisticamente per quel che riguarda tutte le variabili considerati.

In tabella 2 sono riportati gli esiti motori nei 2 gruppi.

Tab. 1 **Dati generali dei neonati inclusi nello studio.**

Gruppo di controllo (n=6)

nome	anamnesi	EG	peso	AS1	AS5	AS10	pH	BE	sarnat	
M.F.	PS	38	2750	4	5	7	6,80	-19,00	2	
A.A.	TC (anidramnios)		3000	Outborn: non valutato						3
A.S.	TC (distocia)	39	2965	5	7	9	7,60	-13,90	2	
A.G.	TC Distacco pl	37	2680	outborn			6,92	-18,20	2	
R.J.	sofferenza	38	2610	outborn					2	
K.R.	sofferenza	41	2930	2	3	5	7,10	-18,00	2	

Gruppo trattato con ipotermia (n=14)

nome	anamnesi	EG	peso	AS1	AS5	AS10	pH	BE	Sarnat
L.D.	applicazione ventosa	41	3366	2	4	5	nv	nv	2
M.L.N.	PS	40	3600	2	4	6	6,90	-17,90	2
B.A.	PS	40	3270	3	5	5	6,80	-21,00	2
D.S.	distacco pl	38	3900	1	2	4	7,06	-13,90	2
M.S.	PS	39	3265	2	6	7	7,19	-11,70	2
M.A.	Distacco pl	41	3290	3	5	6	7,2	-14,2	2
B.F.	PS	39	3760	5	7		6,90	-19,6	2
E.H.	sofferenza	38	2640	3	4	7	6,93	-18,1	2
C.M.	PS	37	2765	9		10	7,05	-19,4	3
V.S.	distacco pl	39	5100	2	5	5	nv	nv	3
L.D.	applicazione ventosa	39	3540	1	4	5	7,02	-15,8	2
B.L.	applicazione ventosa	39	3130	1	5	6	6,86	-17,4	2
G.R.	applicazione ventosa	39	3336	2	4	4	6,86	-17,9	2
A.A.	applicazione ventosa	40	4000	2	2	4	6,75	-19,2	2

Tab. 2 **Dati generali dei neonati inclusi nello studio.**

	outcome	
	Paralisi cerebrale	Outcome normale
Trattamento convenzionale (n)	3	3
Trattamento ipotermico (n)	2	12

Test di Fisher: $p > 0.05$

a-EEG

Entro le prime ore di vita tutti i neonati sono stati sottoposti a monitoraggio del tracciato elettroencefalografico mediante l'applicazione di a-EEG e tale monitoraggio è stato mantenuto e valutato per 24-72 h.

In entrambi i gruppi sono state valutate le eventuali variazioni di tracciato aEEG nell'intervallo di tempo compreso tra il momento dell'ingresso e le 24 h di vita e la correlazione con l'outcome motorio.

Tab. 3 Variazioni di tracciato aEEG tra il momento dell'ingresso e le 24 h di vita nei 2 gruppi esaminati.

Gruppo di controllo				Gruppo trattato con ipotermia			
nome	CFM all'ingresso	CFM 24 h	outcome	nome	CFM all'ingresso	CFM 24 h	outcome
M.F.	MA	N	normale	L.D.	MA	MA	normale
A.A.	SA	SA	paralisi cerebrale	M.L.N.	SA	MA	normale
A.S.	MA	SA	paralisi cerebrale	B.A.	SA	N	normale
A.G.	MA	N	normale	D.S.	SA	SA	paralisi cerebrale
R.J.	MA	SA	paralisi cerebrale	M.S.	SA	SA	normale
K.R.	SA	N	normale	M.A.	MA	N	normale
				B.F.	SA	N	normale
				E.H	Convulsioni	N	normale
				C.M	SA	SA	normale
				V.S	SA	SA	paralisi cerebrale
				BL	MA	SA	normale
				L.D	SA	MA	normale
				G.R	MA	SA	normale
				A.A	SA	MA	normale

(N: tracciato aEEG normale; MA: tracciato aEEG moderatamente alterato; SA: tracciato aEEG severamente alterato).

Tab. 4 Valore predittivo del CFM a 24 ore di vita rispetto all'outcome motorio nei due gruppi esaminati

	VPP	95% CI	VPN	95%CI	p value
gruppo TC	100	61-100	100	61-100	>0.05
gruppo TI	20	8-20	100	69-100	n.s

¹H-MRS

La ¹H-MRS è stata eseguita in tutti i neonati tra il 7° ed il 10° giorno di vita.

Nel gruppo sottoposto a trattamento convenzionale si è osservata una significativa correlazione tra outcome motorio e variazioni dell'Naa/Cr, dell'Lac/ Cr e del mI (Tab. 5), quando misurati a livello della CPO. In particolare nei pazienti con outcome severo si è osservata una riduzione dell'Naa/Cr e del mI ed un aumento del rapporto Lac/Cr. Al contrario i metaboliti misurati a livello dei GB non correlavano con l'outcome. Nel gruppo sottoposto a trattamento ipotermico la correlazione con l'outcome si è mantenuta significativa per tutti i metaboliti a livello della CPO e per il Lac/ Cr ed il mI a livello dei GB (Tab. 6).

Tab.5: correlazione tra ¹H-MRS eseguita a livello della CPO e outcome nel gruppo TC

	MEDIA		DS		P value
	Pz normali	Pz con PC	Pz normali	Pz con PC	
Naa/Cr	0.91	0.16	0.02	0.14	0.00
Lac/Cr	0.14	1.38	0.07	0.17	0.00
mI (mM)	7.66	2.42	0.60	0.59	0.02

Tab.6: correlazione tra ¹H-MRS eseguita a livello della CPO/GB e outcome nel gruppo TI

	MEDIA		DS		P value
	Pz normali	Pz con PC	Pz normali	Pz con PC	
Naa/Cr (CPO)	0.83	0.18	0.11	0.24	0.00
Naa/Cr (GB)	0.75	0.66	0.66	0.26	0.26
Lac/Cr (CPO)	0.13	0.58	0.11	0.02	0.00
Lac/Cr (GB)	0.1	1.70	0.05	1.84	0.02
mI (mM) (CPO)	8.54	0.91	2.1	0.24	0.01
mI (mM) (GB)	5.39	0.92	0.89	0.64	0.00

Considerando come range di normalità i valori ottenuti con lo studio precedente (Naa/Cr > 0.5,

Lac/Cr < 0.3 e mI >3.0) abbiamo ottenuto i valori predittivi descritti nella tabella 7 (34).

Tab. 7 Valore predittivo della ¹H-MRS a 7-10 giorni di vita rispetto all'outcome motorio nei due gruppi esaminati.

Voxel in sede **parieto-occipitale**

	VPP	95% CI	VPN	95%CI
gruppo TC	100	61-100	100	61-100
gruppo TI	100	43-100	100	90-100

Le figure 4,5,6,7,8,9 mostrano la distribuzione dei metaboliti nel gruppo TC e TI con outcome normale o patologico rispetto alla popolazione sana

Voxel localizzato a livello della corteccia parieto-occipitale

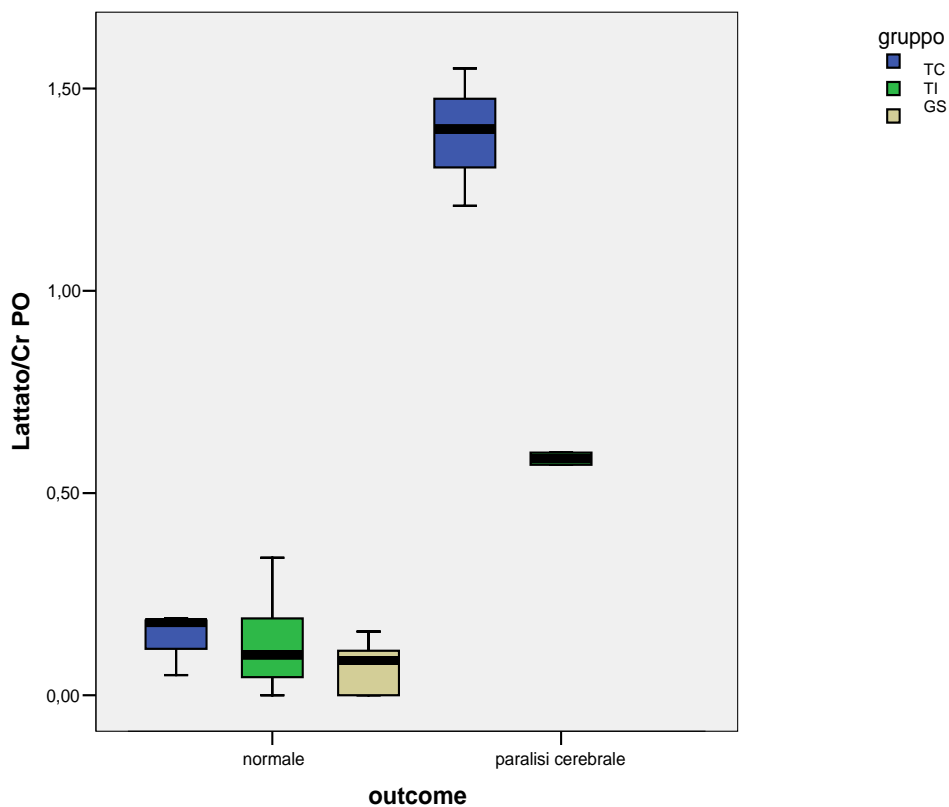


Fig.4

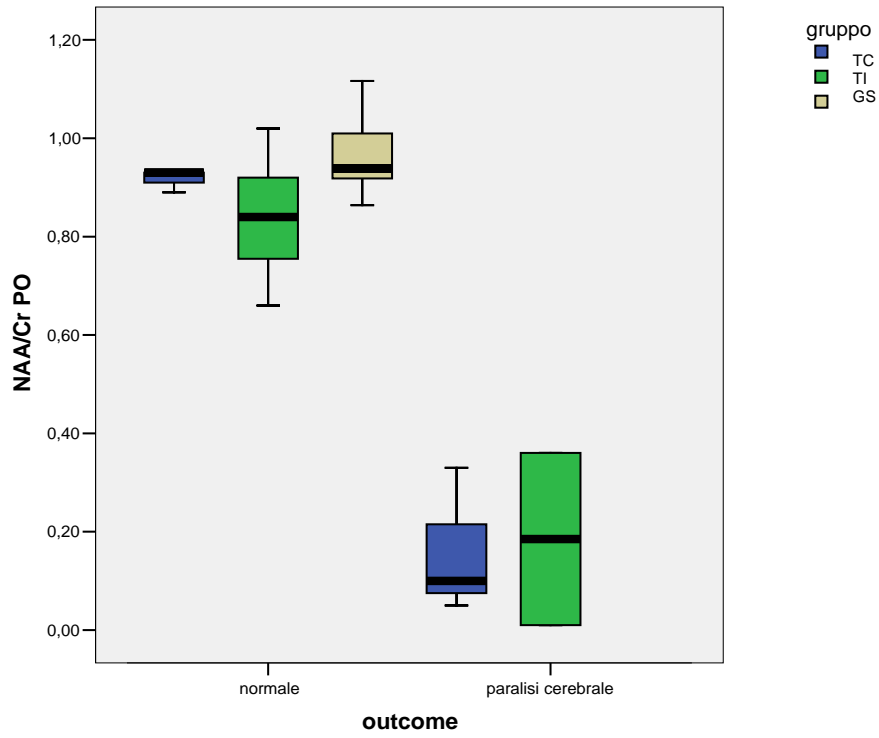


Fig.5

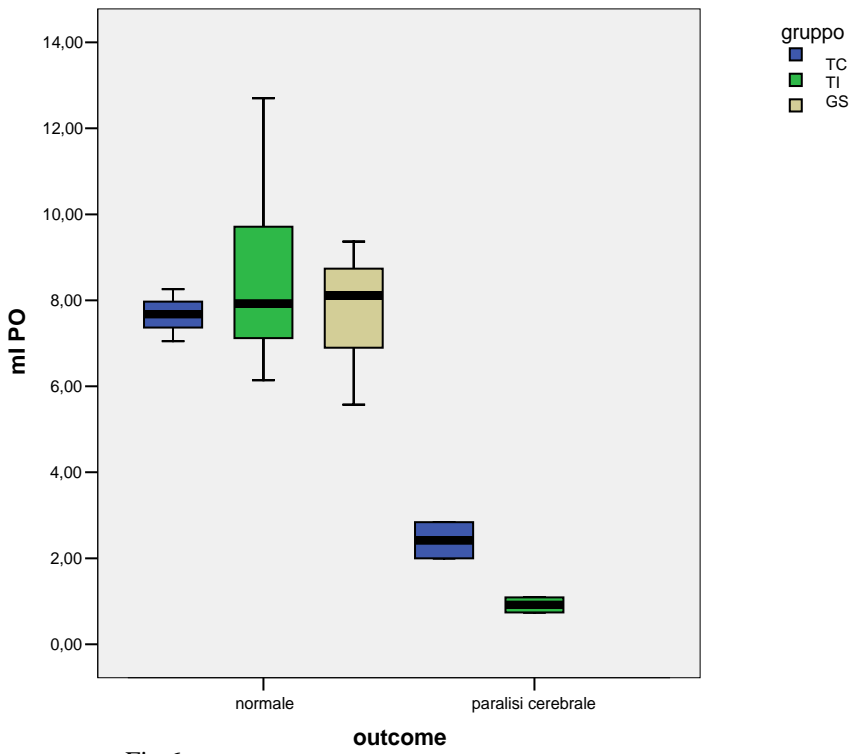


Fig.6

Voxel localizzato a livello dei gangli della base

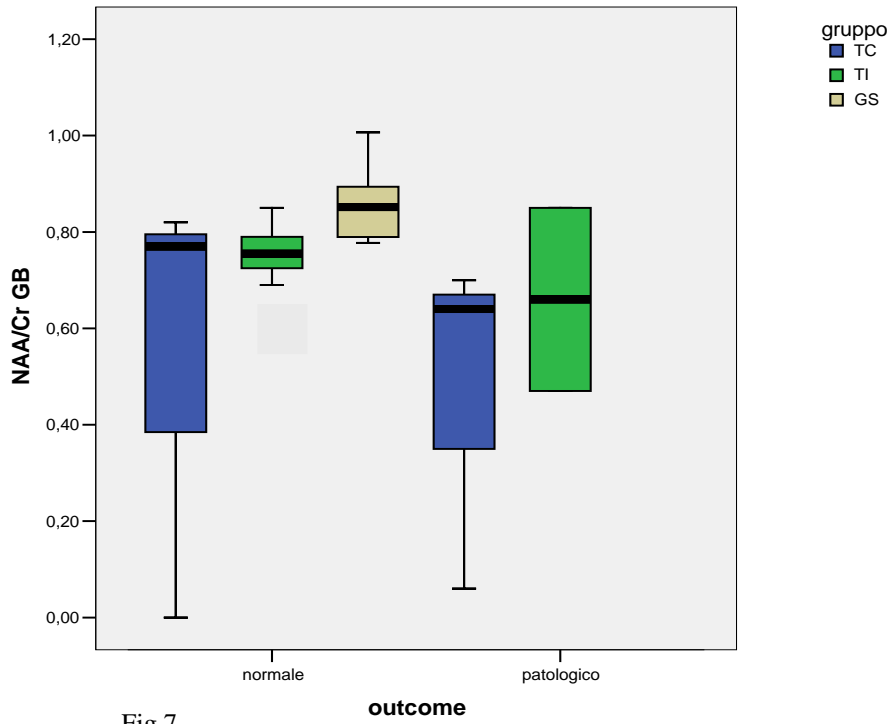


Fig.7

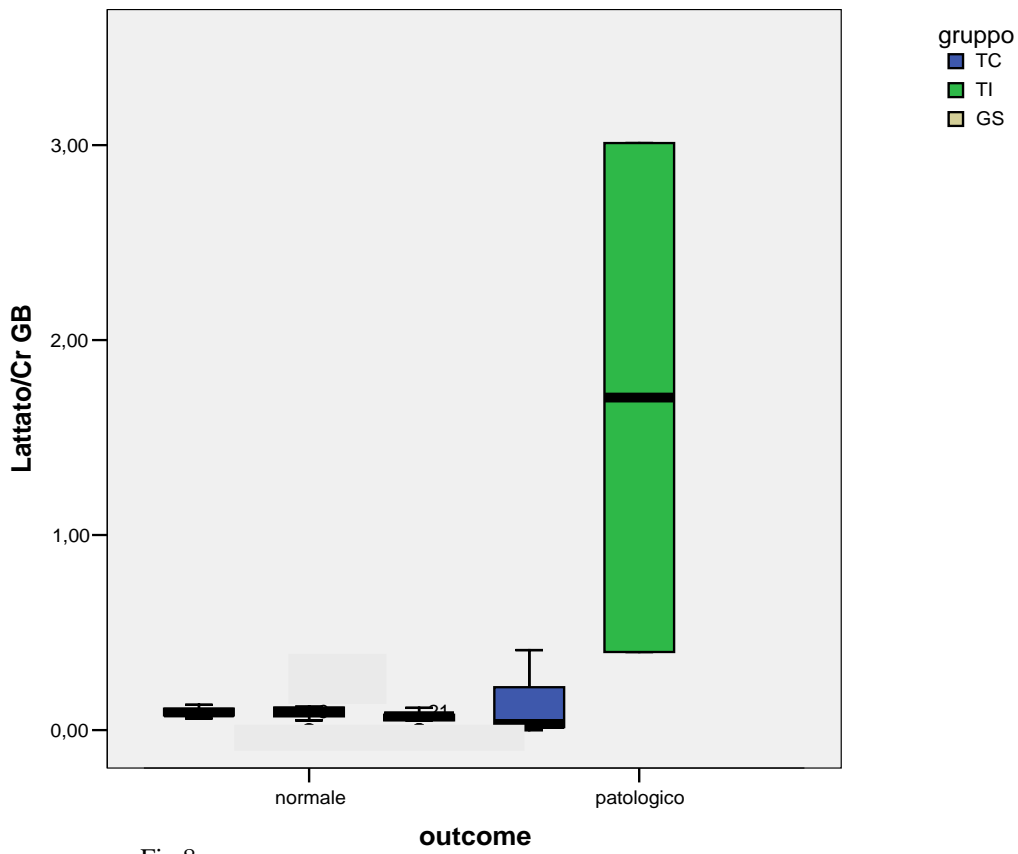
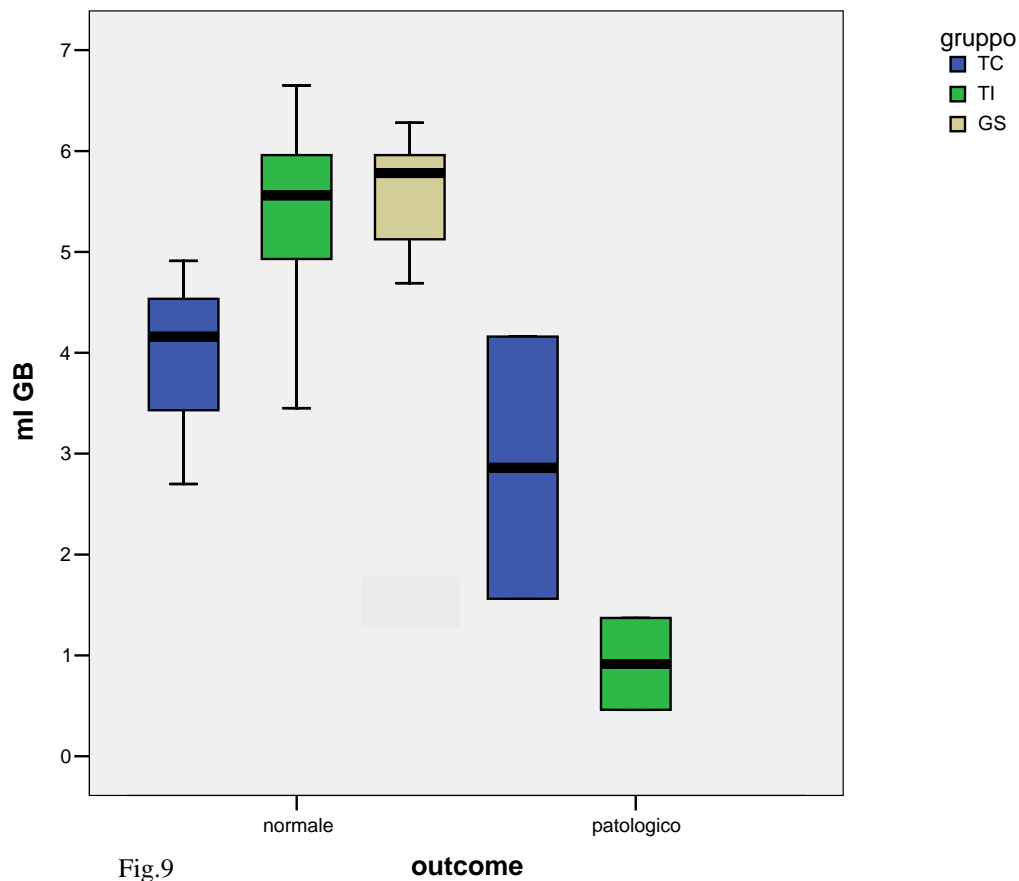


Fig.8



¹H-MRS e a-EEG

Confrontando i due gruppi si può apprezzare che (vedi fig. 10,11,12,13,14,15,16):

1. nel gruppo TC (colonna blu) esiste una perfetta correlazione tra a-EEG a 24 h e ¹H-MRS a livello della CPO (VPP e VPN: 100%)
2. nel gruppo TI (colonna verde) l'a-EEG presenta un VPN del 100% nei confronti del danno subacuto rilevato mediante ¹H-MRS e un VPP del 20%. Infatti, 8 dei pazienti con tracciato a-EEG patologico a 24h presentano poi una ¹H-MRS ed un outcome nella norma .

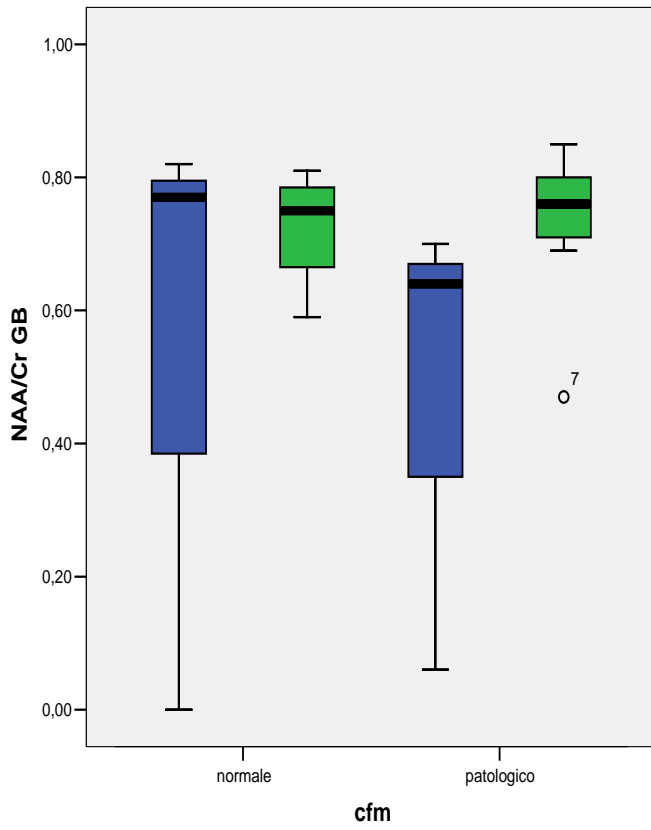


Fig.10

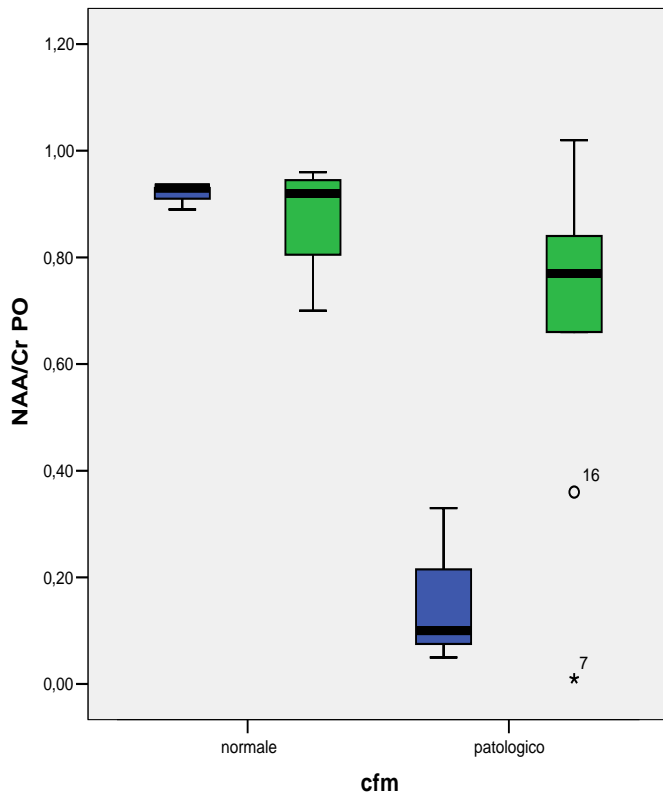


Fig.11

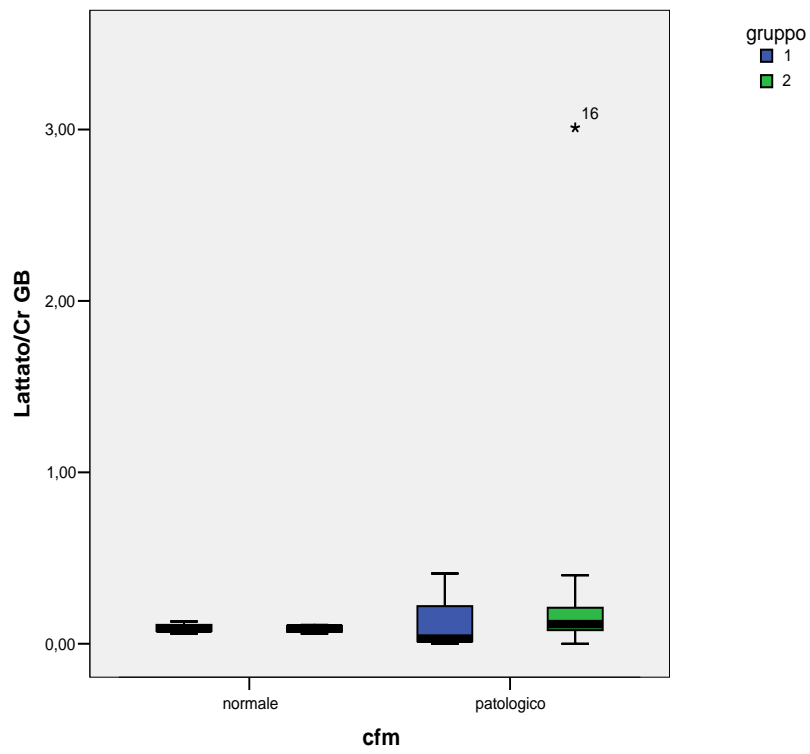


Fig.12

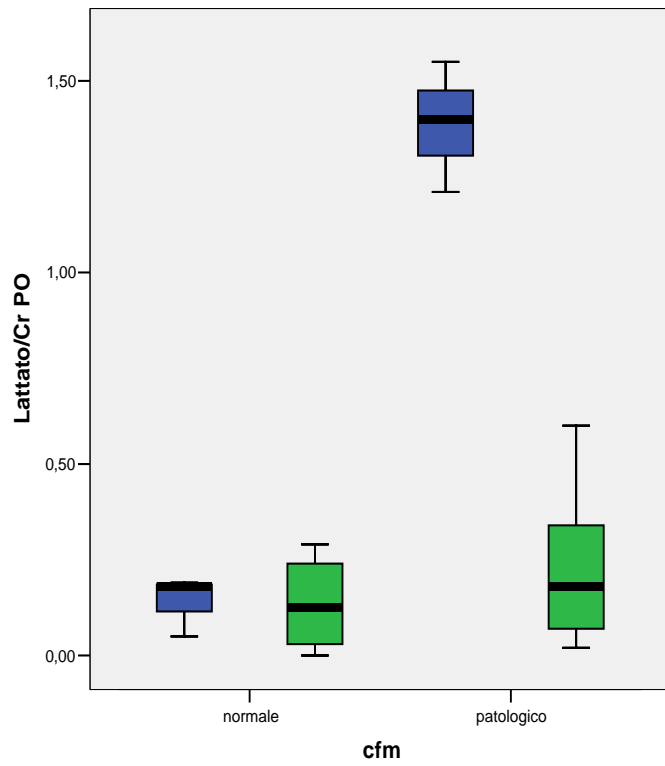


Fig.13

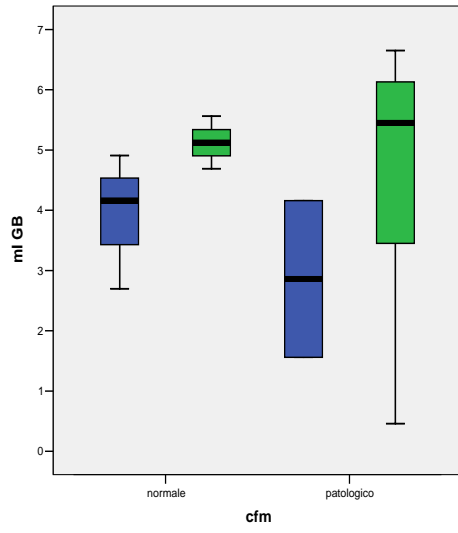


Fig.14

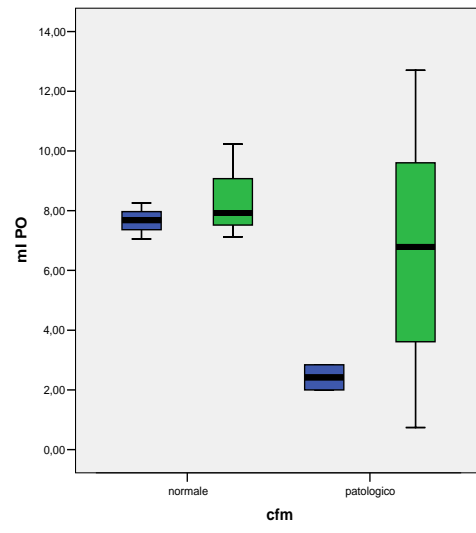


Fig.15

Discussione

Gli sforzi fatti negli ultimi anni dai ricercatori in ambito di EII sono stati rivolti ad individuare parametri clinico-strumentali in grado di fornire precoci indicazioni prognostiche al fine di un adeguato counselling e, in misura ancora più importante, per identificare i pazienti da sottoporre a trattamento specifico. Criteri clinici come l'Indice di Apgar, la presenza alla nascita di acidosi fetale e la classificazione secondo Sarnat e Sarnat risultano estremamente importanti per l'identificazione dei pazienti con EII ma non altrettanto significativi nel predire la severità dell'outcome (39,40). L'ecografia cerebrale, di semplice esecuzione al letto del paziente, non è ancora entrata come indagine diagnostica nella routine del neonatologo per indagare le patologie cerebrali, basti pensare che negli Stati Uniti e nei paesi anglosassoni viene effettuata dal medico radiologo, spesso disgiunta dalla realtà clinica. Una review canadese del 2006 sottolinea la necessità di indagare questa metodica per valutarne l'attendibilità prognostica nel neonato asfittico a termine, tuttavia al momento non esistono studi che convincano in questo senso; inoltre, da un punto di vista prognostico, l'ecografia cerebrale è sicuramente inferiore alla MRI (41). La MRI, infatti, definisce precisamente l'estensione e l'anatomia del danno stabilizzato, tuttavia l'interpretazione rimane operatore dipendente e non è in grado di quantificare con un valore numerico il danno tissutale come invece la ¹H-MRS riesce ad esprimere.

Essendo l'EII caratterizzata da un danno ad andamento bifasico, l'aEEG in continuo e la ¹HMRS sembrano superiori nel seguire i cambiamenti neuro-metabolici che si verificano a livello cerebrale. Numerosi studi hanno dimostrato un buon valore predittivo dell'a-EEG nelle prime ore di vita (27-29). Pertanto la presenza di un a-EEG alterato nelle prime 6 ore dopo la nascita è stato utilizzato sia nello studio di Gluckman sull'ipotermia del 2005 che in 3 trial ancora in corso (TOBY trial, Ice study, neo.nEuro.network) come criterio di ingresso fondamentale per stabilire l'inizio del trattamento (20, 42,43).

Negli ultimi 3 anni sono stati pubblicati diversi trial clinici randomizzati che hanno dimostrato l'efficacia dell'ipotermia sistemica e selettiva nel ridurre la mortalità e le disabilità maggiori nei

neonati con EII di grado moderato-severo (26). Risulta tuttavia necessario continuare ad eseguire studi clinici per valutare l'efficacia del trattamento ipotermico, per migliorare l'identificazione dei pazienti a cui offrire questa terapia e per verificare gli esami strumentali precocemente prognostici in termini di outcome a distanza. In particolare non è sufficientemente noto quale sia il ruolo prognostico delle varie tecniche di neuroimaging, dell'EEG e dell'a-EEG nei pazienti sottoposti ad ipotermia.

Il nostro studio offre alcune risposte in questa direzione. Attraverso un'indagine condotta su una popolazione di pazienti trattata convenzionalmente confrontata con un gruppo sottoposto ad ipotermia abbiamo valutato il grado di predittività dell'a-EEG e della ¹H-MRS.

Dai risultati dello studio l'a-EEG a 24 ore si è mostrato in grado di predire l'outcome motorio nei pazienti trattati con terapia convenzionale. Infatti tutti i pazienti con tracciati patologici a 24 ore hanno sviluppato paralisi cerebrale (VPP 100%) e tutti i pazienti con tracciati normali hanno mostrato uno sviluppo motorio nella norma (VPN 100%). Questo dato conferma quello che viene riportato in letteratura (29). Se analizziamo invece il gruppo trattato con ipotermia possiamo osservare una riduzione del VPP dal 100% al 20%, infatti 8 pazienti con tracciato alterato a 24 ore hanno sviluppato un outcome normale. Dati non pubblicati, presentati recentemente al 4th Neuroimaging and Neuroprotection Conference (Orlando, Florida 2009), confermavano quanto da noi riportato segnalando una riduzione del valore predittivo positivo dell'a-EEG a 24 h nei neonati sottoposti ad ipotermia rispetto al gruppo non trattato. Al contrario, lo studio eseguito da Horan condotto su neonati non asfittici trattati con ossigenazione extracorporea delle membrane (ECMO), mostrava un'assenza dell'influenza del trattamento ipotermico sui pattern a-EEG (44). La persistenza di una bassa attività elettrica nel gruppo TI potrebbe essere correlata all'ipotermia a sua volta causa o concausa di due condizioni che si verificano nel neonato asfittico: la depressione dell'attività elettrica conseguente alla riduzione del metabolismo cellulare ed il rallentamento del metabolismo epatico di farmaci come morfina e fenobarbitale utilizzati nel trattamento di questi soggetti che intervengono sulla depressione elettrica (45-47).

I risultati della spettroscopia confermavano la predittività dell'esame per l'outcome motorio sia nel gruppo trattato con terapia convenzionale che in quello sottoposto ad ipotermia. Nel caso del gruppo TI la predittività dell'esame si manteneva per tutti i metaboliti a livello della CPO e per il Lac/ Cr ed il mI a livello dei GB. Nel gruppo TC invece si conservava solo per la regione della CPO. Questa differenza tra i due gruppi esprimeva una diversa localizzazione del danno ipossico-ischemico. Nel gruppo TC i tre pazienti con ¹H-MRS patologica presentavano prevalentemente un danno localizzato nei distretti più periferici irrorati dai rami terminali delle maggiori arterie cerebrali (regioni 'watershed') con risparmio dei gangli della base; nel gruppo TI invece i pazienti presentavano un danno diffuso e quindi una ¹H-MRS patologica sia a livello dei gangli della base che della corteccia parieto-occipitale.

L'aumento del rapporto Lac/Cr e la riduzione dell'Naa/Cr è stato largamente riportato negli studi effettuati su pazienti con danno cerebrale conseguente ad EII (48-54), più dibattuto è il ruolo del mI. Il mI è una sostanza con struttura simile alle molecole di zucchero, ha un ruolo osmolare ed è anche un marker delle cellule gliali; un suo aumento riflette una proliferazione ed una attivazione delle cellule gliali conseguente ad una perdita o ad una disfunzione neuronale (55). Robertson et al hanno riportato un incremento del mI nei pazienti affetti da EII con outcome neurologico sfavorevole (56), l'indagine ¹H-MRS era stata eseguita precocemente (media 3,5 giorni). Questi autori hanno ipotizzato che l'incremento del metabolita fosse conseguente ad una alterazione del trasporto della molecola nello spazio extracellulare determinata da una riduzione del metabolismo aerobio. Fan et al (57) hanno a loro volta osservato un significativo incremento del mI nei neonati con EII di grado moderato-severo suggerendo la gliosi come causa determinante. Nel nostro studio i pazienti hanno condotto l'esame spettroscopico più tardivamente rispetto a quelli di Robertson ed i neonati che hanno sviluppato PC presentavano una significativa riduzione del mI. Uno studio sperimentale condotto sui topi ha dimostrato che un evento ipossico-ischemico moderato determina una importante proliferazione delle cellule gliali mentre un evento prolungato comporta la morte di queste cellule stromali (58). A conferma di questa ipotesi la riduzione del mI nella nostra

popolazione di pazienti era documentata in regioni in cui la RM tradizionale ha in seguito dimostrato la presenza di lesioni cistiche.

Per quanto riguarda la correlazione tra a-EEG, ¹H-MRS ed outcome abbiamo osservato che nel gruppo trattato con ipotermia l'a-EEG presentava un VPN del 100% nei confronti del danno subacuto rilevato mediante ¹H-MRS e un VPP del 20%. Infatti, 8 dei pazienti con tracciato a-EEG patologico a 24h mostravano poi una ¹H-MRS ed un outcome nella norma. Nello studio condotto presso il nostro Istituto negli anni 2004-2005 avevamo dimostrato una significativa correlazione tra a-EEG, ¹H-MRS ed outcome infatti i pazienti con tracciati a-EEG che miglioravano nelle prime 24 ore di vita presentavano un esame spettroscopico nella norma, quelli che peggioravano da un punto di vista elettrico presentavano una spettroscopia patologica (34). Questo dato si è mantenuto nello studio attuale per la popolazione non trattata e si è perso per quella sottoposta ad ipotermia. I motivi, come precedentemente spiegato, sono probabilmente legati all'influenza del trattamento ipotermico sulla attività cerebrale dei soggetti asfittici trattati.

Conclusioni:

Il nostro studio dimostra che l' a-EEG non può essere considerato un indicatore prognostico precoce nei pazienti sottoposti a trattamento ipotermico in quanto anche nei neonati con outcome favorevole si può osservare un recupero tardivo dell'attività elettrica. La spettroscopia di risonanza magnetica mantiene il suo valore predittivo e permette di valutare in fase sub-acuta la presenza di un danno cerebrale. Tra i metaboliti valutati il mI è risultato significativamente ridotto nella popolazione di pazienti che ha sviluppato paralisi cerebrale e può pertanto essere considerato un indicatore precoce di danno cerebrale insieme all'Naa/Cr e al Lac/Cr più largamente descritti in letteratura. Tuttavia, considerando le dimensioni della popolazione studiata, sarebbe opportuno eseguire studi allargati con protocolli concordati che possano approfondire questi aspetti. A questo proposito il gruppo di Neurologia Neonatale della Società Italiana di Neonatologia sta concludendo un protocollo di trattamento per il neonato con EII di grado moderato-severo che speriamo possa aiutarci a raccogliere il maggior numero possibile di informazioni sull'efficacia dell'ipotermia e sugli indicatori prognostici precoci.

Bibliografia:

1. Blair E, Watson L: Epidemiology of cerebral palsy. *Semin Fetal Neonatal Med.* Apr;11(2):117-25, 2006
2. Rutherford MA, Azzopardi D et al: Mild hypothermia and the distribution of cerebral lesions in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* Oct;116(4):1001-6, 2005
3. De Vries LS, Hellstrom-Westas L: Role of cerebral function monitor in the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90: F201-F207, 2005
4. Smith J, Wells L, Dodd K: The continuing fall incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *Br J Obstet Gynaecol* 107: 461-466, 2000
5. Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I : Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population, *Acta Paediatr* 84:927-932, 1995
6. Hagberg B, Hagberg G, Olow I: The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VI. Prevalence and origin during the year period 1983-1986. *Acta Paediatr* 82:387-393, 1993
7. Wyatt JS, Edwards AD, Azzopardi D, Reynolds EOR: Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Arch Dis Child* 64:953-963, 1989
8. Olney JW: Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 3: 101-109, 2003
9. Grow J, Barks DE: Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in term infant: current concepts. *Clin Perinatol* 29:585-602, 2002
10. Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol* 22: 481-517, 1995

11. Hu Br, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjo BK: Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxic-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1294-1300, 2000
12. Martin IJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309, 1998
13. Siesjo BK, Katsura K, Kristian T: The biochemical basis of cerebral ischemic damage. *J Neurosurg Anesthiosol* 7:47-52, 1995
14. Smith SL, Hall ED: Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 13:1-9, 1996
15. Akisu M, Huseyinov A, Yalaz M, Cetin H, Kultursay N: Selective head cooling with hypothermia suppresses the generation of platelet-activating factor in cerebrospinal fluid of newborn infants with perinatal asphyxia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:45-50, 2003
16. Qing M, Nimmesgern A, Heinrich PC, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, Hess J, von Bernuth G, Seghaye MC: Intrahepatic synthesis of tumor necrosis factor-alpha related to cardiac surgery is inhibited by interleukin-10 via the Janus kinase (Jak)/signal transducers and activator of transcription (STAT) pathway. *Crit Care Med* 31:2769-75, 2003
17. Edwards AD, Wyatt JS, Thorens M: Treatment of hypoxic-ischaemic brain damage by moderate hypothermia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 78: 85-91,1998
18. Laptok AR, Corbett RJT. Therapeutic hypothermia: a potential neuroprotective and resuscitative strategy for neonatal hypoxia-ischemia. *Prenat Neonat Med* 1: 199-212, 1996
19. Nakashima K, Todd MM: Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarisation. *Stroke* 27: 913-8,1996

20. Gluckman P, Wyatt J, Azzopardi D, Ballard R, Edwards D, Ferriero D, et al: selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365:663-70, 2005
21. Shankaran S, Laptook A, Ehrenkranz R, Tyson J, McDonald S, Donovan E, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 353:1574-84, 2005
22. Inder TE, Hunt RW, Morley CJ, Coleman L, Stewart M, Doyle LW, Jacobs SE: Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*, 145:835-7, 2004
23. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulsey TC, Bass WT, Kaufman DA, Horgan MJ, Languani S, Bhatia JJ, Givelichian LM, Sankaran K, Yager JY: Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: safety outcomes. *Pediatr Neurol* 32: 18-24, 2005
24. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI, Williams CE, Gluckman PD: Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics* 102:1098-106, 1998
25. Lin ZL, Yu HM, Lin J, Chen SQ, Liang ZQ, Zhang ZY : Mild hypothermia via selective head cooling as neuroprotective therapy in term neonates with perinatal asphyxia: an experience from a single neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 26:180-4, 2006
26. Jacobs S , Hunt R, Tarnow-Mordi, W Inder T , Davis P: Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* Issue 2 - DOI: 10.1002/14651858.CD003311.pub2, 2008
27. Toet MC, Hellstrom-Westas L, Groenendaal F, Eken P, de Vries LS: Amplitude ad integrated EEG 3 and 6 hours after birth in full term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81:F19-F23, 1999
28. de Vries LS, Hellstrom-Westas L: Role of cerebral function monitor in the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90: F201-F207, 2005

29. van Rooij LGM, Toet MC, Osredkar D, van Huffelen AC, Groenendaal F, de Vries LS: Recovery of amplitude integrated electroencephalographic background patterns within 24 hours of perinatal asphyxia. . Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 90: F245-F251, 2005
30. Azzopardi D, Edwards D: Magnetic resonance spectroscopy in neonates, Curr Opin Neurol 8:145-149, 1995
31. Wyatt JS: Non-invasive techniques to investigate the newborn brain in The newborn brain : neuroscience and clinical applications, first published, Cambridge University Press, 2002
32. Groenendaal F, Veenhoven RH, van der Grond J, et al: Cerebral lactate and N-acetyl-aspartate/choline ratios in asphyxiated full term neonates demonstrated in vivo using proton magnetic resonance spectroscopy. Pediatr Res 35: 148-151, 1994
33. Kreis R Ernst T, Arcinue E, et al: Myo-inositol in short TE 1H-MRS: A new indicator of neonatal brain development and pathology. Proceedings of the 10th Society Magnetic Resonance in Medicine, San Francisco, p 1007, 1991
34. Gina Ancora, Silvia Soffritti, Raffaele Lodi, Caterina Tonon, Sara Grandi, Chiara Locatelli, Laura Nardi, Nicoletta Bisacchi, Claudia Testa, Giovanni Tani, Paolo Ambrosetto, Giacomo Faldella. Early predictors of neurodevelopmental outcome in term newborns with HIE. A combined brain a-EEG patterns and MR Spectroscopy study. Submitted.
35. Sarnat HB Sarnat MS: Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. Arch of Neurology 33:696-705, 1976
36. al Naqeeb N., Edwards A.D, Cowan F.M, Azzopardi D. Assessment of neonatal encephalopathy by amplitude-integrated electroencephalography. Pediatrics 103: 1263-1269, 1999
37. Brazelton TB, Nugent JK. 1995. Neonatal Behavioral Assessment Scale. 3rd ed. London:McKeith Press.

38. Hagberg B, Hagberg G, Olow I, v Wendt L: The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VII. Prevalence and origin in the birth year period 1987–90. *Acta Paediatr* 1996;85:954–60.
39. Carli G, Reiger I, Evans N: One-year neurodevelopmental outcome after moderate newborn hypoxic ischaemic encephalopathy. *J Paediatr Child Health* 40(4):217-20, 2004
40. Lavrijsen SW, Uiterwaal CS, Stigter RH, de Vries LS, Visser GH, Groenendaal F: Severe umbilical cord acidemia and neurological outcome in preterm and full-term neonates. *Biol Neonate* 88(1):27-34, 2005
41. Daneman A, Epelman M, Blaser S, Jarrin JR: Imaging of the brain in full-term neonates: does sonography still play a role? *Pediatr Radiol* 36(7):636-46, 2006
42. The TOBY study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy. Online. Available at: <http://www.npeu.ox.ac.uk/Toby> [last accessed 1 October 2006].
43. neo.nEuro.network. HYPOTHERMIA trial. Online. Available at:<http://www.neonatal-research> [last accessed 20 September2005].
44. Horan M, Azzopardi D, Edwards AD, Firmin RK, Field D: Lack of influence of mild hypothermia on amplitude integrated-electroencephalography in neonates receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Early Hum Dev* 83:69-75, 2007
45. Róka A, Melinda KT, Vásárhelyi B, Machay T, Azzopardi D, Szabó M: Elevated morphine concentrations in neonates treated with morphine and prolonged hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 121: e844-9, 2008
46. Thoresen MS, Hoem NO, Brin C et al: Hypothermia after perinatal asphyxia more than doubles the plasma half-life of Phenobarbitone. *Ped Res* 2003; Abstract
47. Thoresen M: Supportive care during neuroprotective hypothermia in the term newborn: adverse effects and their prevention. *Clin Perinatol*. 35: 749-63, 2008

48. Penrice J, Lorek A, Cady EB, Amess PN, Wylezinska M, Cooper CE, D'Souza P, Brown GC, Kirkbride V, Edwards AD, Wyatt JS, Reynolds EO: Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain during acute hypoxia-ischemia and delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res* 41(6):795-802, 1997
49. Shu SK, Ashwal S, Holshouser BA, Nystrom G, Hinshaw DB Jr: Prognostic value of ¹H-MRS in perinatal CNS insults. *Pediatr Neurol* 17(4):309-18, 1997
50. Penrice J, Cady EB, Lorek A, Wylezinska M, Amess PN, Aldridge RF, Stewart A, Wyatt JS, Reynolds EO. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in normal preterm and term infants, and early changes after perinatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 40(1):6-14, 1996
51. Hanrahan JD, Sargentoni J, Azzopardi D, Manji K, Cowan FM, Rutherford MA, Cox IJ, Bell JD, Bryant DJ, Edwards AD: Cerebral metabolism within 18 hours of birth asphyxia: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Pediatr Res* 39(4 Pt 1):584-90, 1996
52. Leth H, Toft PB, Peitersen B, Lou HC, Henriksen O: Use of brain lactate levels to predict outcome after perinatal asphyxia. *Acta Paediatr* 85(7):859-64, 1996
53. Hanrahan JD, Cox IJ, Edwards AD, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD, Bryant DJ, Rutherford MA, Azzopardi D: Persistent increases in cerebral lactate concentration after birth asphyxia. *Pediatr Res* 44(3):304-11, 1998
54. Hanrahan JD, Cox IJ, Azzopardi D, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD, Bryant DJ, Edwards AD: Relation between proton magnetic resonance spectroscopy within 18 hours of birth asphyxia and neurodevelopment at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol* 41(2):76-82, 1999
55. Ashwal S, Holshouser B, Tong K, Serna T, Osterdock R, Gross M, Kido D: Proton Spectroscopy Detected Myoinositol in Children with Traumatic Brain Injury. *Ped Res* 56: 630-638, 2004

56. Robertson NJ, Lewis RH, Cowan FM., Allsop JM, Counsell SJ, Edwards AD, Cox IJ: Early Increases in Brain myo-Inositol Measured by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Term Infants with Neonatal Encephalopathy. *Ped Res* 50:692-700, 2001
57. Fan G, Wu Z, Chen L, Guo Q, Ye B, Mao J: Hypoxia-ischemic encephalopathy in full-term neonate: correlation proton MR spectroscopy with MR imaging. *European Journal of Radiology* 45: 91- 98, 2003
58. Sizonenko VS, Camm EJ, Dayer A, Kiss JZ: Glial responses to neonatal hypoxic–ischemic injury in the rat cerebral cortex. *Int. J. Devl Neuroscience* 26:37–45, 2008