



**VENTILATION LIQUIDIENNE TOTALE ET SYNDROME
D'ASPIRATION MÉCONIALE SÉVÈRE.**

par

Olivier Avoine

Département de Physiologie biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès en science (M.Sc.) en physiologie et biophysique

15 ~~Janvier~~ 2010

Dr Hervé Walti, Département de Pédiatrie et Physiologie biophysique
Dre Miriam Santschi, Département de Pédiatrie
Pr Philippe Micheau, Département de génie mécanique
Dre Sylvie Lafrenaye, Département de Pédiatrie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-65643-3
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-65643-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■+■
Canada

VENTILATION LIQUIDIENNE ET SYNDROME D'ASPIRATION MÉCONIALE.

Par : Olivier Avoine

Mise en contexte : Le syndrome d'aspiration méconiale (SAM) sévère est une détresse respiratoire causée par l'inhalation de liquide amniotique teinté de méconium. Les nouveau-nés atteints d'un SAM sévère nécessitent souvent un support ventilatoire invasif qui mène à un haut taux de morbidité et de mortalité. La ventilation liquidienne totale (VLT) est considérée comme une avenue thérapeutique prometteuse de lavage bronchoalvéolaire (LBA) effectué avec un perfluorocarbonate dans le cas d'un SAM sévère. L'équipe Inolivent a développé récemment un 4^e prototype de ventilateur liquidien total (Inolivent 4) conçu pour des applications pédiatriques qui fait l'objet d'études expérimentales.

Objectif : Les objectifs de cette maîtrise étaient de valider le ventilateur liquidien, d'optimiser les paramètres ventilatoires de la VLT, de mettre au point un modèle néonatal ovin de SAM ainsi que de caractériser l'efficacité et la tolérance d'un VLT-LBA en comparaison avec un lavage bronchoalvéolaire contenant une dilution de surfactant exogène (S-LBA) dans ce même modèle. Notre hypothèse est que le VLT-LBA sera mieux toléré et plus efficace qu'un S-LBA dans le cas d'un SAM sévère.

Matériel et méthode : La validation du prototype 4 a été effectuée avec cinq agneaux à poumons sains et plusieurs paramètres ont été testés de façon à optimiser la ventilation. Ensuite, sept agneaux ont servis à développer le modèle pathologique de SAM. Étude animale randomisée contrôlée approuvée par notre comité d'éthique institutionnel. Une fois anesthésiés et paralysés, 20 agneaux nouveau-nés ont subi une chirurgie visant le monitoring des gaz du sang (GDS) et les paramètres hémodynamiques par thermodilution (Pulsion medical system, Ger). Un SAM sévère fut alors induit à l'aide de l'instillation de 2 aliquotes de 1mL/kg d'une dilution à 25% de méconium humain dans le salin. Les agneaux ont ensuite été randomisés dans deux groupes : VLT-LBA (n=10) à une ventilation minute de 160 mL/kg/min avec le PFDEC (Perfluorodecalin; F2Chemicals, UK) et S-LBA (n=10) ventilé conventionnellement en administrant deux LBA de 15 mL/kg contenant 5mg/mL de surfactant (BLES biochemicals Inc., Canada). Les deux groupes furent ventilés pour un total de 4 heures suivant la randomisation.

Résultats : Le VLT-LBA permet une PaO₂ significativement supérieure au S-LBA tout au long de l'expérimentation. Les valeurs de PaCO₂, de pH ainsi que les paramètres hémodynamiques sont comparables pour les deux groupes à l'exception d'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PaPm) durant la VLT. Le VLT-LBA permet le lavage de 43.14% du méconium instillé alors qu'avec le S-LBA on en retire 28.10% (p < 0,022). L'analyse histologique des coupes de poumons n'a montré aucune différence entre les scores totaux.

Conclusion: Le VLT-LBA est bien toléré et est plus efficace que le S-LBA dans ce modèle expérimental ovin de SAM sévère. Les niveaux surélevés de PaPm durant la VLT nécessite d'être investigués. Cette expérimentation ouvre la voie à une éventuelle étude clinique avec le VLT-LBA comme traitement d'un SAM sévère.

MOTS CLÉS : Ventilation liquidienne totale, syndrome d'aspiration méconiale, lavage bronchoalvéolaire, surfactant exogène, ovin.

Table des matières :

<u>Liste des illustrations</u>	II
<u>Liste des sigles</u>	III
<u>Résumé</u>	IV
<u>Introduction</u>	1
Syndrome d'aspiration méconiale.....	1
Lavage bronchoalvéolaire thérapeutique.....	5
Ventilation liquidienne.....	6
VLP.....	8
VLT.....	8
Contexte de l'étude.....	10
Inolivent 3 et SDRA.....	10
Inolivent 4 et étude préliminaire.....	11
Objectifs de l'étude comparative : VLT-LBA vs S-LBA.....	15
<u>Article</u>	16
Avant propos	16
Résumé.....	17
Article	19
<u>Discussion</u>	54
<u>Conclusion et perspectives</u>	63
<u>Remerciements</u>	64
<u>Liste des références</u>	65

Liste des illustrations

Figure 1. Radiographie d'un patient atteint d'un SAM	2
Figure 2. Physiopathologie du Syndrome d'aspiration méconiale	3
Tableau I. Tableau comparatif des propriétés du Perfluorodecalin (PFDEC) et du Perflubron (PFOB)	7
Figure 3. Prototype Inolivent-3.....	11
Figure 4. Prototype Inolivent-4.....	12
Figure 5. Variation de la PaO ₂ en fonction des Vt utilisés lors d'une VLT avec le prototype Inolivent-4 (n=7).....	13
Figure 6. Variation de la PaO ₂ en fonction de la FiO ₂ (en %) à un Vmin de 160 mL/kg/min lors d'une VLT effectuée avec le prototype Inolivent-4 (n=7).....	14
Figure 7. Courbe standard du poids sec du méconium lyophilisé en fonction du volume de l'aliquote.....	15

Liste des sigles

V_{\min}	- ventilation minute
V_t	- volume courant
Fr	- fréquence respiratoire
CRF	- capacité résiduelle fonctionnelle
Paw	- pression moyenne des voies aérienne
P_{alv}	- pression alvéolaire
PEP	- pression positive en fin d'expiration
PIP	- pression positive en fin d'inspiration
Ppeak	- pression maximale inspiratoire
PFC	- perfluorocarbone
PFDEC	- perfluorodecalin
LAV	- ventilation liquidienne assistée
VLP	- ventilation liquidienne partielle
VLТ	- ventilation liquidienne totale
ETT	- tube endotrachéal
VMC	- ventilation mécanique conventionnelle
LBA	- lavage bronchoalvéolaire
SDRA	- syndrome de détresse respiratoire aiguë
SAM	- syndrome d'aspiration méconiale
PPHN	- hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né
ECMO	- oxygénation par membrane extracorporelle
FiO ₂	- fraction inspirée en oxygène
PaO ₂	- pression artérielle en oxygène
PaCO ₂	- pression artérielle en dioxyde de carbone
PaPm	- pression artérielle pulmonaire moyenne
aPm	- pression artérielle systémique moyenne (MAP)
SaO ₂	- saturation artérielle en oxygène
Cia	- débit cardiaque indexé
SVRI	- index de résistance vasculaire systémique
PVRI	- index de résistance vasculaire pulmonaire

Introduction

Syndrome d'aspiration méconiale

On nomme méconium les premières selles d'un nouveau-né. Cette substance noire-verdâtre est stérile, épaisse, de composition uniforme et de consistance élastique. Celui-ci est présent dans le tube digestif du fœtus à partir du troisième mois de gestation et résulte de l'accumulation de débris. Il est composé de cellules mortes, de mucus gastro-intestinal, de liquide amniotique, de sécrétions intestinales, de glycoprotéines sanguines, de protéines et lipides ainsi que de matériel gras du vernix caseosa (HARRIES, 1978).

Il existe plusieurs facteurs pouvant causer le passage du méconium in utero. On peut mentionner une réponse vagale suite à la compression du cordon ombilical ou de la tête du fœtus (CO et VIDYASAGAR, 1990) (MILLER et READ, 1981) ou au stress intra-utérin (FUGIKURA et KLIONSKY, 1975) qui est souvent associé avec l'hypoxie fœtale, l'acidose (MITCHELL *et al.*, 1985) et l'asphyxie (STARKS, 1980). Le péristaltisme gastro-intestinal est augmenté lors d'une hypoxie qui induit aussi une relaxation du sphincter anal. Ce passage peut aussi être induit par une insuffisance du placenta, une hypertension maternelle, une pré éclampsie, ou une consommation de drogue par la mère lors de la grossesse. Par contre, un liquide amniotique teinté de méconium n'implique pas nécessairement de complication, il peut simplement représenter la maturation de la fonction intestinale du fœtus et il est rare de l'observer avant la 34^e semaine de gestation (MATHEWS et WARSHAW, 1979).

Le syndrome d'aspiration méconiale (SAM) est une pathologie pulmonaire du nouveau-né à terme causée par l'inhalation périnatale de liquide amniotique teinté de méconium (DARGAVILLE et COPNELL, 2006). L'incidence de cette pathologie est de 0.5-1.0 pour 100,000 naissances vivantes dans les pays industrialisés. 20% de ces nouveau-nés, soit de 2000 à 4000 aux USA, requiert l'intubation suivie de la ventilation mécanique conventionnelle (VMC) (SRIRAM et al., 2003). Ceux-ci sont considérés comme ayant un SAM sévère et le taux de mortalité qui y est associé est de 7%. (GOUYON et al., 2008). La figure 1 montre une radiographie pulmonaire d'un nouveau-né atteint d'un SAM.

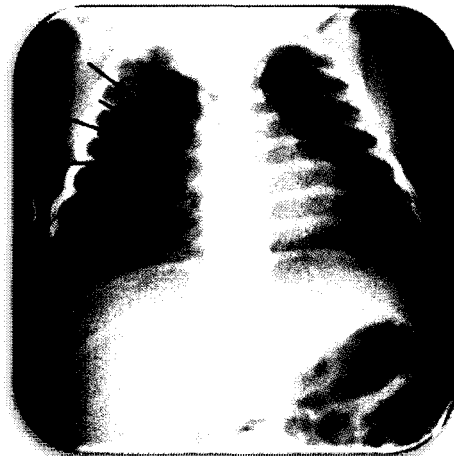


Figure 1. Radiographie pulmonaire d'un patient atteint d'un syndrome d'aspiration méconiale (Tirée de ALY, 2004).

Cette condition est donc peu fréquente mais représente une problématique pour les néonatalogistes. La présence du méconium dans les poumons induit une obstruction mécanique des voies aériennes proximales et distales, une alvéolite chimique avec lésions épithéliales, une hypertension pulmonaire et une inhibition des propriétés tensioactives du surfactant pulmonaire (MOSES et al., 1991) (DAVEY et al., 1993) (PARK et al., 1996). Ceci résulte en une détresse

respiratoire sévère accompagnée d'hypoxémie, d'hypercapnie et d'une mécanique pulmonaire déficiente (diminution de 50% de la compliance) (DARGAVILLE et MILLS, 2005). Le SAM est souvent associé à l'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né (HPPN). La figure 2 représente le schéma de la pathophysiologie du SAM.

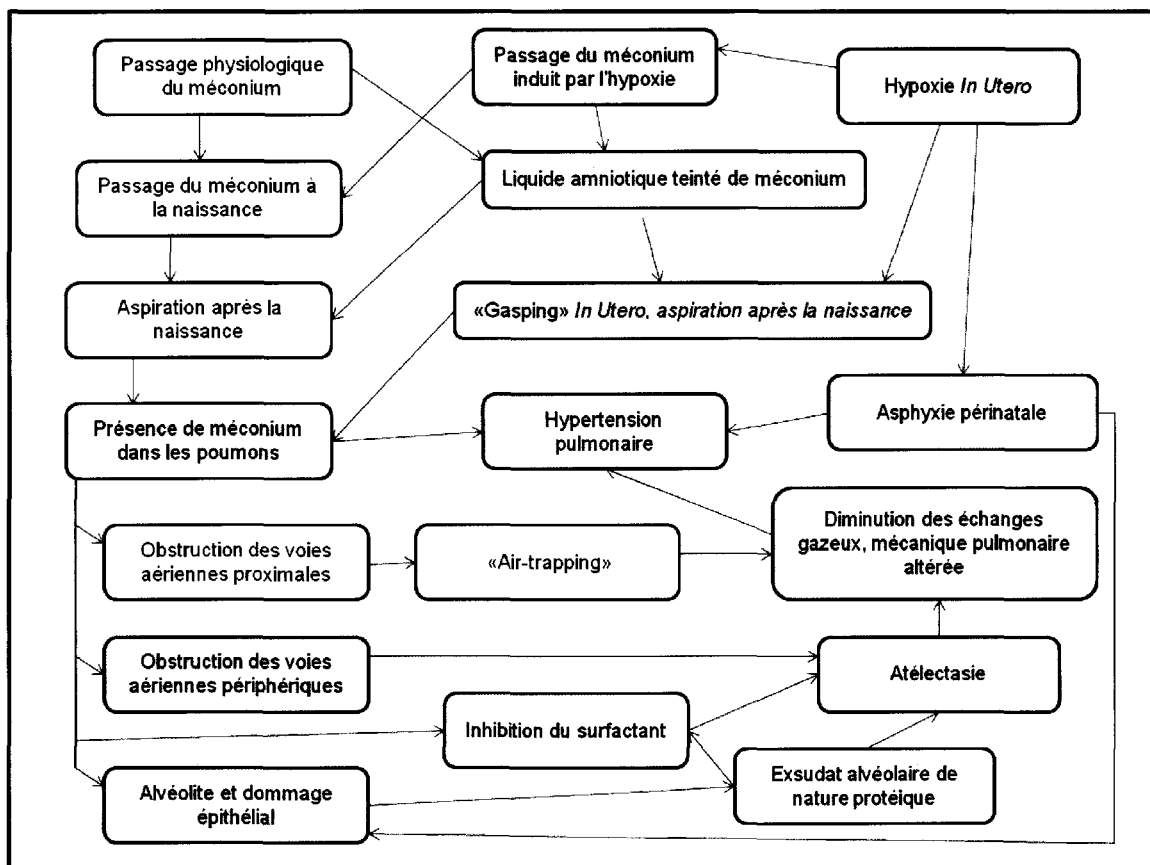


Figure 2. Physiopathologie du Syndrome d'aspiration méconiale (Tiré et traduit de DARGAVILLE et MILLS, 2005).

Les nouveau-nés avec les SAM les plus sévères nécessitent un support ventilatoire suite à l'intubation. Ils doivent être rapidement transportés vers une unité régionale néonatale de soins intensifs pour être traités. Malgré les avancées technologiques des dernières années, le SAM reste une des conditions cliniques les plus difficiles à gérer. En témoigne le grand nombre des thérapies utilisées dont l'efficacité n'est pas toujours démontrée comme le surfactant exogène dans 43% des cas, la ventilation haute-fréquence dans 30% des cas ou l'inhalation de NO dans 36% des cas (GOUYON *et al.*, 2008). L'alternative ultime est l'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO). Cependant, seulement 2% des cas de SAM sévère rencontrent les critères d'utilisation de l'ECMO. Pourtant, le SAM demeure la première cause de l'utilisation de l'ECMO en néonatalogie. Cette technique augmente le taux de survie des cas les plus sévères de 50%, mais s'accompagne de 1.9 complications diverses (mécaniques, hématologiques, neurologiques, rénales, pulmonaires, cardiovasculaires, infectieuses ou métaboliques) par patient (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2007). De nouvelles avenues de traitements possibles pour le SAM sont présentement à l'étude dont le lavage thérapeutique des poumons pour retirer le méconium.

Lavage bronchoalvéolaire thérapeutique

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est couramment utilisé comme aide au diagnostic médical lors de pneumopathies. Cette technique consiste à injecter dans les bronches un certain volume de liquide physiologique stérile. Il est ensuite possible de récupérer le liquide par succion et d'en faire l'analyse pour déceler certaines pathologies ou infections. Plusieurs études contrôlées, dont certaines sont présentement en cours, explorent les effets d'un lavage bronchoalvéolaire effectué avec une dilution de surfactant (S-LBA) exogène (WISWELL *et al.*, 2002) (DARGAVILLE *et al.*, 2007) comme traitement pour le SAM. Malgré certains résultats encourageants, les effets bénéfiques et la sécurité de cette technique sont loin d'être prouvés. Par conséquent, le problème est d'assurer l'efficacité et la sécurité en permettant un support ventilatoire adéquat lors d'un S-LBA (DARGAVILLE *et al.*, 2003). Il existe dans les études précliniques et cliniques une grande variabilité au niveau des techniques utilisées pour réaliser un S-LBA, tant en terme de volume que du nombre de lavages effectués ainsi que du type et de la concentration du surfactant exogène utilisé. Une récente étude visant l'optimisation de cette technique met en évidence les paramètres qui semblent être optimaux avec 2 lavages subséquents de 15 mL/kg d'une dilution dans du salin de 5 mg/mL de surfactant naturel (JENG *et al.*, 2009).

Ventilation liquidienne

Une autre alternative permettant de retirer le méconium des poumons est la ventilation liquidienne (VL). Cette technique de ventilation mécanique innovatrice consiste à emplir les poumons avec un liquide oxygéné afin de permettre les échanges gazeux (CURTIS, 1991). Cette technique comporte de nombreux avantages dont l'augmentation de la compliance pulmonaire, l'amélioration des échanges gazeux et la prévention de l'atélectasie puisque le liquide empêche les alvéoles de se collaber (SHAFFER *et al.* 1984). Elle permet également la protection des tissus pulmonaires ayant des lésions ainsi que la prévention des lésions causées par la ventilation mécanique (effet de mécano et cyto-protection). Il est important de souligner sa capacité à réduire l'inflammation et à permettre le lavage de débris endogènes et exogènes (WOLFSON et SHAFFER, 2005). Aussi, l'interface d'échange passe de gaz-liquide (au niveau des poumons la surface liquide étant l'hypophase alvéolaire contenant le surfactant pulmonaire) à liquide-liquide ce qui diminue la tension de surface. Plusieurs liquides ont déjà été utilisés dont le salin (par oxygénation hyperbare) et les perfluorocarbones (PFC). Ces derniers sont maintenant les seuls utilisés. Les PFC sont des composés biochimiquement inertes, hydrophobes et lipophobes, incolores, inodores, ayant un coefficient d'étalement élevé. Les atomes d'hydrogène sont remplacés, en partie ou complètement, par des atomes de Fluor ou de Brome. Ils possèdent une solubilité très élevée en ce qui concerne l'O₂ et le CO₂ ainsi qu'une faible tension de surface (en comparaison avec l'eau mais relativement élevée comparée au surfactant

pulmonaire). Ce sont des liquides de grade médical avec plusieurs utilisations en chirurgie ophtalmique notamment (larmes artificielles) et aussi comme sang artificiel. Le tableau I permet de comparer les caractéristiques biophysiques de deux différents PFC de grade médical avec le salin.

Tableau I. Tableau comparatif des propriétés biophysiques du Perfluorodecalin (PFDEC) et du Perflubron (PFOB).

CARACTÉRISTIQUES	SALIN	PFDEC C₁₀F₁₈	PFOB C₈F₁₇Br
Solubilité de l'O ₂ (ml/100 ml, 37°C)	3	49	53
Solubilité du CO ₂ (ml/100ml, 37°C)	57	140	210
Densité (g/ml, 25°C)	1	1.95	1.93
Viscosité (Cs, 25°C)	1	2.61	1
Pression de vapeur (mm Hg, 37°C)	47	6.25	5.2
Tension de surface (dyn/cm, 25°C)	72	15	18

Il existe deux types de VL soit la ventilation liquidienne partielle (VLP) et la ventilation liquidienne totale (VLT). Ces deux types de VL sont pressentis comme étant des traitements possibles pour certaines pathologies respiratoires bien que la VLP a été beaucoup plus étudiée que la VLT.

VLP

La VLP nécessite l'utilisation d'un ventilateur mécanique conventionnel (VMC). Elle consiste, comme son nom l'indique, en un remplissage partiel des poumons jusqu'à la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) avec un PFC. Il est possible d'observer la formation d'un ménisque de liquide dans le tube endotrachéal à la fin de l'expiration des volumes courants (V_t) gazeux. Il y a alors une hétérogénéité des interfaces à l'intérieur des poumons soit : liquide-liquide dans les zones dépendantes et gaz-liquide au niveau des zones indépendantes. Il est nécessaire de constamment remplacer le PFC évaporé pour conserver le niveau de PFC à la CRF. Plusieurs études précliniques ont été effectuées pour évaluer l'efficacité de la VLP, seule ou en combinaison avec d'autres techniques, pour traiter différentes pathologies dont le SAM (JENG *et al.*, 2006) (CHAPPELL *et al.*, 2001) (ONASANYA *et al.*, 2001) (BARRINGTON *et al.*, 1999) (HUMMLER *et al.*, 2001) (NAKAMURA *et al.*, 2000) (GASTIASORO-CUESTA *et al.*, 2001). Ces études ont pour conclusions générales que la VLP devrait être considérée dans des cas où les autres thérapies ne seraient pas envisageables ou inefficaces.

VLT

La VLT nécessite un ventilateur spécialement dédié, ce qui en fait une technique plus difficile à entreprendre et ce qui explique également pourquoi elle a été beaucoup moins étudiée. Différents ventilateurs liquidiens ont été développés au cours des dernières années. Les composantes de base sont un

oxygénateur, des pompes permettant l'acheminement du PFC, un condenseur afin d'éviter les pertes par évaporation, un élément chauffant pour garder le liquide à une température voulue et un système électronique permettant la gestion de la ventilation. En dehors de ces éléments la plupart des ventilateurs liquidiens comportent leurs caractéristiques propres (filtres, mélangeur de gaz, réservoir tampon, etc.). On instille d'abord du PFC jusqu'à l'atteinte de la CRF en maintenant le volume courant (V_t) gazeux. Les V_t gazeux sont remplacés par des V_t de liquide (PFC pompés) en fin d'expiration. Le V_t de liquide préoxygéné est instillé dans les poumons, où il réalise les échanges gazeux par diffusion puis chargé de gaz carbonique il est ensuite retiré du poumon pour être débarrassé de son CO_2 et réoxygéné pour être utilisé pour le cycle respiratoire suivant. Les fréquences respiratoires rapportées dans en VLT sont très inférieures à ce que l'on utilise en VMC (i.e. 4 à 7 vs 50 à 60 chez l'agneau nouveau-né) en raison des caractéristiques du liquide et des limites des appareils utilisés. L'ajustement des paramètres est effectué en fonction de la mécanique pulmonaire et des gaz du sang (GDS) tout comme en VMC.

Seulement quelques études portant sur la VLT ont été rapportées. De plus, comme les ventilateurs liquidiens et les liquides utilisés sont bien différents, il est difficile d'établir des critères de comparaison. Une étude portant sur le SAM conclut qu'une VLT de courte durée permet de nettoyer le méconium (KUO *et al.*, 1998) lors d'un SAM. Une autre étude effectue la comparaison entre la VLP, la VLT ainsi que l'administration de surfactant en bolus non dilué avec un modèle de SAM ovin. Les auteurs de cette étude concluent que la VLT serait plus

efficace que la VLP et que l'administration de bolus de surfactant. Cependant ils mentionnent également que la translation de cette technique expérimentale en clinique nécessitait la mise au pont d'un ventilateur liquidien robuste et efficace (FOUST *et al.*, 1996).

Contexte de l'étude

Inolivent 3 et SDRA

L'équipe interdisciplinaire Inolivent (génie et médecine) de l'Université de Sherbrooke existe depuis maintenant plus de 10 ans. Les membres de cette équipe travaillent au développement, à la validation et à l'optimisation d'un prototype de ventilateur liquidien. L'objectif étant de démontrer expérimentalement que la VLT a sa place en clinique. Une étude antérieure, effectuée avec le prototype Inolivent-3, a permis d'évaluer dans un essai expérimental comparatif, randomisé et contrôlé, les effets sur les échanges gazeux et l'hémodynamique à court terme (4 heures) de la VLT en comparaison avec la VMC dans un modèle ovin néonatal de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) provoqué par l'instillation d'acide chlorhydrique (HCl) (LEBON, 2007). Cette étude a démontré, qu'en comparaison avec la VMC, la VLT permettait d'assurer les échanges gazeux adéquats et comparables à ceux obtenus en VMC et qu'elle ne s'accompagnait pas d'effets hémodynamiques significativement plus importants. De plus elle montrait que Le PFDEC était aussi efficace et bien toléré que le PFOB.

Le prototype Inolivent-3 opérait avec un mode de contrôle en volume (ROBERT *et al.*, 2006) (ROBERT *et al.*, 2007).

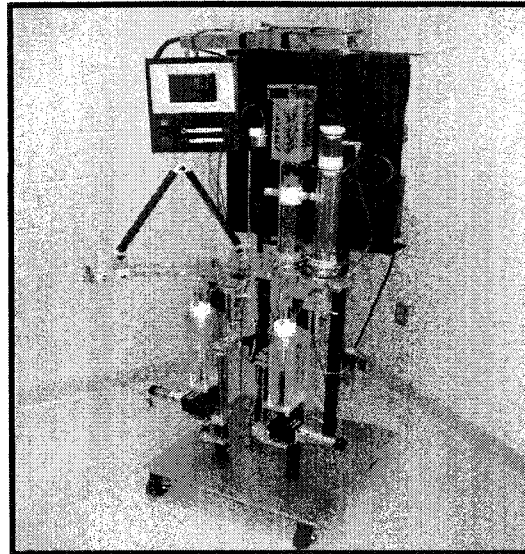


Figure 3. Prototype Inolivent-3.

Inolivent 4 et étude préliminaire

Suite aux conclusions de cette étude concernant le modèle de SDRA, un nouveau prototype (Inolivent-4) a été réalisé. Celui-ci comporte plusieurs améliorations notamment un contrôleur en pression à l'expiration (ROBERT *et al.*, 2009) ainsi qu'une nouvelle pièce en Y permettant de relier à la fois le ventilateur conventionnel et le ventilateur liquidien au patient éliminant ainsi les problématiques dues aux transitions entre les deux techniques de ventilation. Il est aussi composé d'un oxygénateur à membrane incluant des éléments chauffants, d'un réservoir tampon pour le PFC oxygéné, de deux pompes pour l'inspiration et l'expiration munies de «pinch» valves, d'un condensateur pour récupérer le PFC évaporé, d'un mélangeur de gaz, d'un filtre pour la purification

du PFC expiré, d'un ordinateur permettant l'enregistrement de données en continue et d'un écran tactile pour le contrôle des différents paramètres ventilatoires. Le prototype Inolivent-4, présenté à la figure 4, a été validé en 2009 lors d'une étude préliminaire visant à l'optimisation de la VLT, et à la mise au point d'un modèle expérimental néonatal ovin de SAM sévère et d'une technique permettant la quantification du méconium récupéré par lyophilisation.

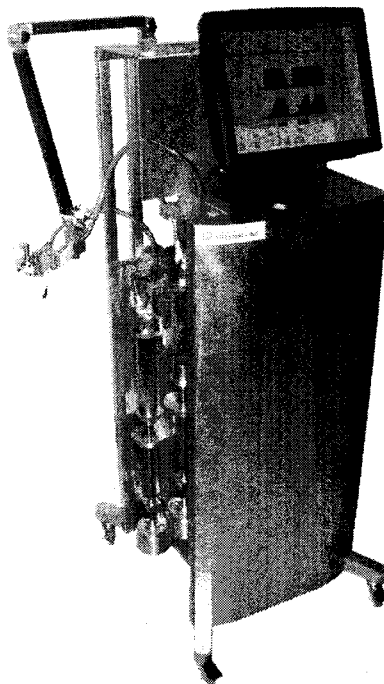


Figure 4. Prototype Inolivent-4

Le seul PFC alors disponible sur le marché avec les caractéristiques désirées pour la VLT et ayant déjà fait l'objet d'expérimentations animales en ventilation liquidienne avec des résultats intéressants était le PFDEC. Le PFOB n'était plus produit ce qui a facilité notre choix de liquide. L'idéal aurait bien sûr été de pouvoir effectuer cette étude avec les deux différents PFC afin de déterminer s'il l'un d'entre eux était supérieur.

Lors de cette étude préliminaire, sept agneaux ont été utilisés afin de valider notre modèle expérimental de SAM sévère. Comme le montre la figure 5, tous les agneaux qui ont subi l'instillation de 2 mL/kg de méconium humain dilué à 25% dans le salin avaient une PaO₂ inférieure à 90 mmHg sous 100% d'oxygène inspiré après 30 minutes de latence (niveau visé pour l'atteinte d'un SAM sévère). Cette même figure présente les différents volumes courants (Vt) qui ont été testés avec une fréquence respiratoire constante de 5,4 en vue d'optimiser l'efficacité de la VLT. Les Vt supérieurs ou égaux à 25 mL/kg ont été identifiés comme étant efficaces dans le cas d'un SAM sévère. Par contre, les Vt de 30 et 32 mL/kg s'accompagnaient d'un risque de perfluorothorax. La figure 6 montre les différentes FiO₂ testées par la suite sur les mêmes agneaux avec une ventilation minute constante de 160 mL/kg/min.

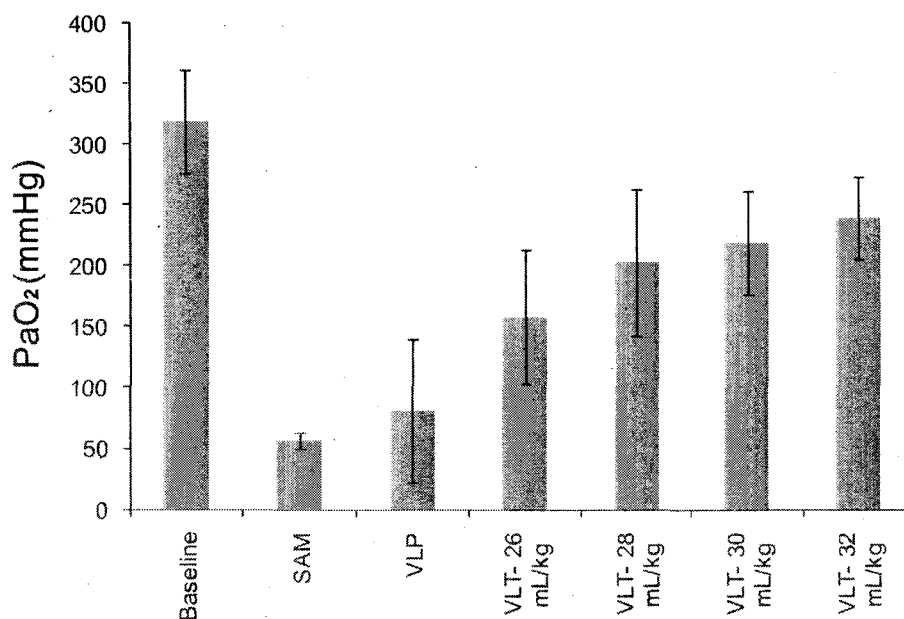


Figure 5. Variation de la PaO₂ en fonction des Vt utilisés lors d'une VLT avec le prototype Inolivent-4 (n=7).

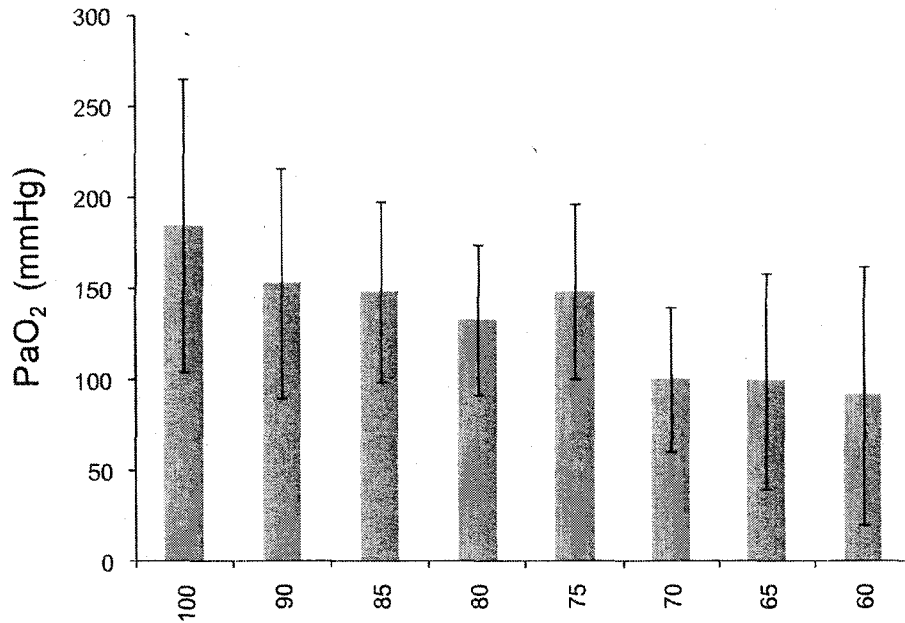


Figure 6. Variation de la PaO₂ en fonction de la FiO₂ (en %) à un Vmin de 160 mL/kg/min lors d'une VLT effectuée avec le prototype Inolivent-4 (n=7).

Cette étude préliminaire a également mis en évidence l'importance de quantifier le méconium retiré grâce à la VLT. Une courbe standard du poids sec du méconium lyophilisé en fonction du volume de l'aliquote utilisé a été préparée pour quantifier le % de méconium récupéré (figure 7).

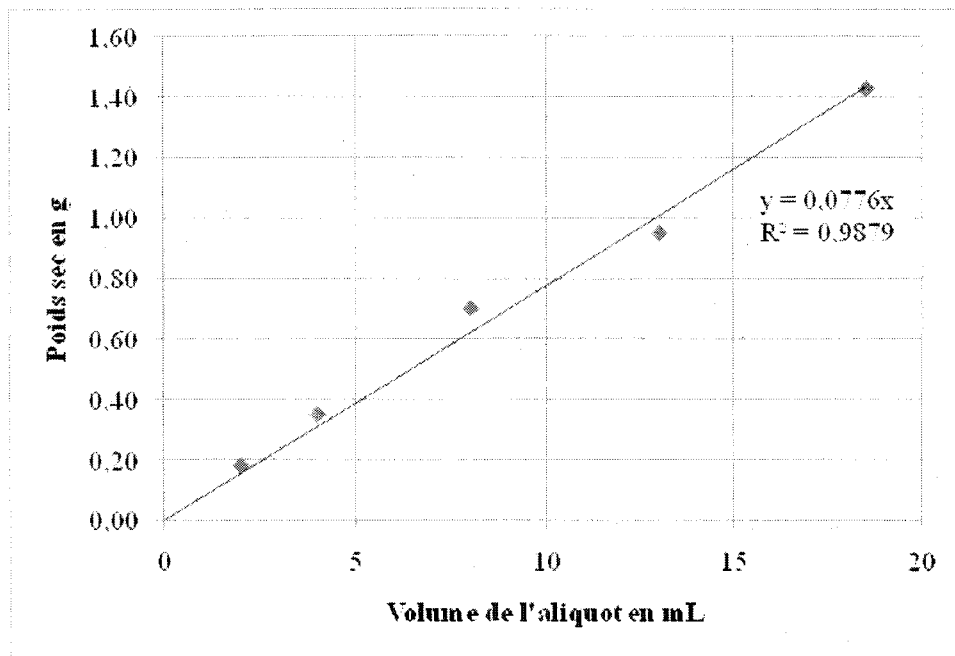


Figure 7. Courbe standard du poids sec du méconium lyophilisé en fonction du volume de l'aliquote

Objectif de l'étude comparative : VLT-LBA vs S-LBA

Lors de cette étude, l'objectif était d'effectuer une comparaison, au point de vue de l'efficacité et de la tolérance, entre un LBA effectué en VLT utilisant un ventilateur liquidien doté des dernières innovations (ROBERT et *al.*, 2006) et un S-LBA optimal dans le modèle expérimental néonatal ovin de SAM sévère. L'hypothèse de départ était que le VLT-LBA serait plus efficace, mieux toléré et permettrait une plus grande récupération de méconium que le S-LBA.

Avant-propos

L'article intitulé «*TOTAL LIQUID VENTILATION EFFICACY IN AN OVINE MODEL OF SEVERE MECONIUM ASPIRATION SYNDROME.*» fait partie intégrante de ce mémoire. Il remplace les sections "Matériel et méthode" et "Résultats". Cet article a été rédigé par l'auteur de ce mémoire et fut soumis à la revue *Critical Care Medicine* (CCMED-D-10-00708). Celui-ci découle directement des travaux expérimentaux effectués lors de cette maîtrise. Cet article démontre l'apport évident de l'équipe Inolivent (<http://www.eureka.gme.usherb.ca/inolivent/>) au développement de la ventilation liquidienne totale et de son utilisation éventuelle à des fins cliniques en néonatalogie. Les co-auteurs sont dans l'ordre Olivier Avoine, Dominick Bossé, Benoît Beaudry, Alexandre Beaulieu, Roula Albadine, Jean-Paul Praud, Raymond Robert, Philippe Micheau et Hervé Walti (directeur de maîtrise).

Résumé de l'article

Mise en contexte : Le syndrome d'aspiration méconiale (SAM) sévère est une détresse respiratoire causée par l'inhalation de liquide amniotique teinté de méconium. Les nouveau-nés atteints d'un SAM sévère nécessitent souvent un support ventilatoire invasif qui mène à un haut taux de morbidité et de mortalité. La ventilation liquidienne totale (VLT) est considérée comme une avenue thérapeutique prometteuse de lavage bronchoalvéolaire (LBA) effectué avec un perfluorocarbone dans le cas d'un SAM sévère.

Objectif : Étudier l'efficacité et la tolérance d'un LBA en VLT (VLT-LBA) en comparaison avec un LBA effectué avec une dilution de surfactant exogène (S-LBA) dans un modèle expérimental néonatal ovin de SAM sévère.

Matériel et méthode : Étude animale randomisée contrôlée approuvée par notre comité d'éthique institutionnel. Une fois anesthésiés et paralysés, 20 agneaux nouveau-nés ont subi une chirurgie visant le suivi des gaz du sang (GDS) et des paramètres hémodynamiques par thermodilution (Pulsion medical system, Ger). Un SAM sévère fut alors induit à l'aide de l'instillation de 2 aliquotes de 1mL/kg d'une dilution à 25% de méconium humain dans le salin. Les agneaux ont ensuite été randomisés dans deux groupes : VLT-LBA (n=10) à une ventilation minute de 160 mL/kg/min avec le PFDEC (Perfluorodecalin; F2Chemicals, UK) et S-LBA (n=10) ventilé conventionnellement en administrant deux LBA de 15 mL/kg contenant 5mg/mL de surfactant (BLES biochemicals Inc., Canada). Les deux groupes furent ventilés pour un total de 4 heures suivant la randomisation.

Résultats : Le VLT-LBA permet une PaO₂ significativement supérieure au S-LBA tout au long de l'expérimentation. Les valeurs de PaCO₂, de pH ainsi que les paramètres hémodynamiques sont comparables pour les deux groupes à l'exception d'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PaPm) durant la VLT. Le VLT-LBA permet le lavage de 43.14% du méconium instillé alors qu'avec le S-LBA on en retire 28.10% (p < 0,022). L'analyse histologique des coupes de poumons n'a montré aucune différence entre les scores totaux.

Conclusion: Le VLT-LBA est bien toléré et plus efficace que le S-LBA dans ce modèle expérimental ovin de SAM sévère. Les niveaux plus élevés de PaPm durant la VLT nécessitent d'être investigués. Cette expérimentation ouvre la voie à une éventuelle étude clinique avec le VLT-LBA comme traitement d'un SAM sévère.

Article

Title:

TOTAL LIQUID VENTILATION EFFICACY IN AN OVINE MODEL OF SEVERE MECONIUM ASPIRATION SYNDROME.

Authors

O. Avoine MSc‡, D. Bossé MSc‡, B. Beaudry MSc*, A. Beaulieu MSc*, R. Albadine MD†, JP Praud MD PhD‡, R. Robert PhD*, P. Micheau PhD* and H. Walti MD‡

Institutional Affiliation:

‡Department of Pediatrics and Department of Physiology and Biophysics, Université de Sherbrooke

*Department of Mechanical Engineering, Université de Sherbrooke

†Department of Pathology, Université de Sherbrooke

Abstract

Objective: To study the efficacy of total liquid ventilation (TLV) in comparison to bronchoalveolar lavage (BAL) with diluted exogenous surfactant in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome (MAS).

Design: Prospective, randomized, interventional study.

Setting: Animal research laboratory at the CHUS, Sherbrooke, Canada.

Subject: Twenty-three newborn lambs, <4 days, 2.5-4.0 kg in weight.

Interventions: Animals were intubated, anaesthetized and paralyzed. Catheters were placed in the femoral artery and jugular vein. Severe MAS was obtained by instillation of a 25% dilution of human meconium in saline (1mL/kg x 2). Lambs were then randomized in 10 TLV-BAL lambs (minute ventilation of 160 mL/kg/min with Perfluorodecalin) vs. 10 S-BAL lambs (conventional ventilation + two 15 mL/kg BAL with 5 mg/mL BLES surfactant). Both groups were ventilated for a total of 4 hours and euthanized.

Measurements: Arterial blood gases, systemic and pulmonary hemodynamic parameters using the thermodilution method (mean arterial pressure, indexed cardiac output, systemic vascular resistance index, mean pulmonary arterial pressure, pulmonary vascular resistance index), percentage of recovered meconium and lung histological scores.

Main results: TLV-BAL enabled a significantly higher PaO₂ than S-BAL throughout the experiment. PaCO₂, pH and hemodynamic parameters were comparable for both groups except for an increase in mean pulmonary arterial pressure during TLV. TLV-BAL allowed for 43 ± 14 % of the instilled meconium to be removed vs. 28 ± 10 % for S-BAL (p = 0.022). Lung histological analysis showed no difference between total scores.

Conclusions: TLV-BAL is more effective than S-BAL and well tolerated in this experimental model of severe MAS. These results open the way for a clinical trial with TLV-BAL as treatment for severe MAS.

Keywords:

Liquid assisted ventilation, respiratory distress, newborn, bronchoalveolar lavage, surfactant, perfluorocarbons.

Introduction

Meconium aspiration syndrome (MAS) is a respiratory disorder that chiefly affects term neonates. It occurs in 0.5-1.0 per 100,000 live births in industrialized countries. Twenty percent of these infants (e.g. 2000-4000 in USA) require to be intubated and mechanically ventilated and are defined as severe MAS with an overall mortality rate of 7% (1-3). Thus, while infrequent, this disorder nevertheless remains a challenging condition confronting neonatologists. Presence of meconium in the lung is critical in the pathogenesis of MAS and induces i) mechanical obstruction of proximal and distal airways, ii) chemical alveolitis and epithelial damage, iii) pulmonary hypertension and iv) inhibition of surfactant tensioactive properties (4-6). This results in severe respiratory distress with hypoxemia, hypercapnia and impaired lung mechanics often complicated by pneumothorax, persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) and pulmonary infections (7). Infants with the most severe intubated and mechanically ventilated MAS must be rapidly transferred to a tertiary neonatal intensive care unit in order to receive the latest but not always evidence-based adjuvant therapies, including any of a number of exogenous surfactant therapies (43%), high-frequency gas ventilation (30%) or inhaled nitric oxide (INO, 36%) (3). If the above therapies are ineffective, the ultimate alternative is extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). While only about 2% of severe MAS meet the entry criteria for ECMO, MAS nevertheless remains the first cause of ECMO use in neonates. When available, ECMO has a high success rate in MAS, improving the survival rate of the sickest infants by 50%. However, in

addition to being costly and not widespread, the use of EMCO in MAS is still debatable. ECMO has been associated with a high rate of mechanical as well as hematological, neurological, renal, pulmonary, cardiovascular, infectious and metabolic complications (8). Moreover, ECMO survivors display considerable neurodevelopmental morbidity and even though the outcome is much better for children with MAS, a recent study has shown that only 53% of 5 year-old ECMO survivors functioned in the normal domain (9). Hence, despite advances over the last 20 years, MAS remains one of the most worrisome clinical conditions to manage.

Present-day research is currently exploring the use of therapeutic lung lavage, namely, the possibility of clearing the lung of meconium. Two clinical randomized, controlled studies have explored the effects of lung lavages with diluted exogenous surfactant (10, 11). In spite of some encouraging preliminary results, the beneficial effects and the safety of such lavage procedures is far from proven. Globally, the problem is to ensure both the efficacy and safety of the lavage procedure, along with an adequate ventilatory support (12). One solution is liquid ventilation since previous studies have demonstrated its effectiveness in the management of acute experimental MAS (13-22). While it was concluded that there was insufficient experimental evidence to advocate clinical use of liquid ventilation in severe MAS, total liquid ventilation (TLV) nonetheless appeared more effective than partial liquid ventilation (PLV) or surfactant bolus treatment (13). In addition, translation of this experimental data to bedside has been hampered by the lack of a suitable total liquid ventilator for clinical use.

In the present study, we tested the hypothesis that total liquid ventilation using an advanced TLV device enables a more effective and better tolerated lavage procedure than a bronchoalveolar lavage performed with diluted surfactant (S-BAL) in a newborn lamb model of severe acute MAS.

Methods

The present experimental protocol was approved by our institutional Ethics Committee for Animal Care and Experimentation. Twenty-three healthy term newborn lambs weighing (mean \pm SD) 2.5 ± 0.3 kg and <4 days of age were first premedicated with intramuscular injection of ketamine (10 mg/kg), atropine (0.1 mg/kg) and midazolam (0.1 mg/kg). Lambs were orally intubated with a 5.0 or 5.5 mm cuffed endotracheal tube (ETT) (Mallinckrodt, St. Louis, MO) and restrained in supine position under radiant heat to maintain a central temperature of 39 ± 1 °C; the animals were then ventilated with a conventional mechanical ventilator (Servo 300 ventilator, Siemens-Elema AB, Solna, Sweden) in a pressure-regulated, volume controlled (PRVC) mode, according to the following parameters: positive end expiratory pressure (PEEP) at 4 cmH₂O, tidal volume (V_t) at 10 mL/kg, fraction of inspired oxygen (FiO₂) at 0.35, respiratory frequency (Fr) at 50 breaths/minute, and inspiratory/expiratory ratio (I:E) at 1:2. Heart rate was monitored using a Hewlett-Packard cardio respiratory monitor (model HP78342A, Palo Alto (CA), USA) and oxygen saturation was monitored using a pulse oximeter probe placed on the base of the tail (Radical, Masimo, Irvine (CA), USA). After cannulation of the right jugular vein (6Fr catheter, Edwards LifeSciences, Irvine (CA), USA), lambs were anaesthetized with thiopental (initially with 20 mg/kg IP, then sustained with 2 mg/kg/h i.v.) and paralyzed with an intermittent bolus of rocuronium bromide (0.1 mg/kg i.v.). Antibiotics (0.05 mg/kg duplocillin and 5 mg/kg gentamycin) were injected intramuscularly and a

continuous i.v. infusion of 4 mL/kg/h of 5% dextrose was administered throughout the experiments.

Surgery and baseline measurements

A 7Fr thermodilution catheter (PV2047, VoLEF catheter, Pulsion Medical System, Munich, Germany) was carefully inserted into the proximal pulmonary artery via a central venous inserter under pressure guidance for pulmonary thermodilution measurements. Thereafter, a 3Fr 7-cm femoral artery catheter (PV2013L07, PiCCO catheter, Pulsion Medical System, Munich, Germany) was installed using a cut-down procedure to enable transpulmonary thermodilution measurements and provide access for arterial blood gas analysis sampling. Following a 30 min recovery period, FiO_2 was elevated to 1 for the same time period in order to obtain baseline parameters.

Meconium aspiration syndrome and randomization

Severe MAS was induced with human meconium obtained from healthy babies. Retrieved meconium was pooled, diluted to 25% in weight with saline, homogenized and frozen for subsequent uses. A quantity of 2 mL/kg (13) was instilled via a 5 Fr feeding tube inserted in the ETT in two successive aliquots of 1 mL/kg. Instillation was carried out with the head and chest of the lamb slightly inclined to the left and then to the right. Repeated squeezing of the chest region was continually performed during the entire procedure to ensure a better homogenous distribution of the meconium solution in the lung. The goal was to

reach severe MAS with a $\text{PaO}_2 \leq 100$ mmHg under a FiO_2 of 1. If these conditions were not obtained after the first instillation, the procedure was repeated with two aliquots of 0.5 mL/kg. Lambs were then randomly distributed into two groups, S-BAL and TLV-BAL.

S-BAL (n=10)

The first group was treated with a bronchoalveolar lavage using an exogenous surfactant dilution under conventional mechanical ventilation (CMV) in the PRVC mode (PEEP=7 cmH₂O, V_t =11 mL/kg, $\text{FiO}_2=1$, Fr=50 breaths/minute, I:E=1:2). The ventilator was first disconnected and a dispensing catheter (12 Fr Levine catheter; Source Medical, Canada) via the ETT was used to administer two 15 mL/kg boluses of exogenous surfactant BLES (Bles Biochemicals Inc, London (ON), Canada) at a dilution of 5 mg/mL of saline. The procedure was carried out with the head elevated and chest slightly inclined to the left and then to the right. After each instillation, the gas ventilator was reconnected and a gentle vibratory chest squeeze was manually performed during expirations. A 7 Fr suction catheter was then introduced into the trachea in order to retrieve the maximum amount of lavage liquid, using a standard suction pressure (-150 mmHg) (11). If lambs did not recover predetermined arterial saturation (SaO_2) of 80% after the first lung lavage, the second lavage was not performed, in accordance with the experimental protocol (22). The collected fluid was frozen for subsequent quantification of washed meconium.

TLV-BAL (n=10)

For the second group, a TLV bronchoalveolar lavage was used using our specifically-designed TLV prototype (Inolivent 4), which has been fully described previously (24-25). Tracheal pressure was measured at the distal end of the ETT using a stainless steel capillary tube inserted in the ETT and connected to the pressure sensor (Model 1620, Measurement Specialties Inc, Hampton VA, USA). Lungs were filled at functional residual capacity (FRC) (25 mL/kg) with warmed (39.0 ± 0.5 °C) and pre-oxygenated Perfluorodecalin (PFDEC, F2 Chemicals, Lancashire, UK). Filling was achieved in increments of one tenth of the FRC using a special function of Inolivent 4, while the same PRVC mode was conducted by the gas ventilator. A PEEP of 7 cm H₂O was used to ensure that the aliquots were introduced inside the lungs as fast as possible. TLV was then initiated at the end of an expiration in volume controlled mode (Fr= 5.35/minute, Vt= 20 mL/kg, I/E = 1/3, FiO₂=100%) (24-25). The ventilation mode was then switched to expiratory pressure regulated mode (the inspiration mode was not changed) and the Vt was gradually raised to 30 mL/kg (26). Meconium was filtered with a 3 part (K-29595-03; K-29595-63; K-29595-41) filter (Cole-Parmer, Chicago IL, USA) set on the expiratory tube. Retrieved meconium was frozen for subsequent quantification of washed meconium.

Both groups were ventilated for a total of 4 hours after randomization and adjustments were made to ventilation parameters following blood gas analysis.

Ancillary experimental management

Sodium bicarbonate and tromethamine were used to maintain pH > 7.25. Infusion of crystalloids (bolus of 10 mL/kg normal saline or lactated Ringer's solution) or dopamine (up to 20 µg/kg/min) was used as needed to maintain a mean arterial pressure ≥ 50 mm Hg. At the end of the protocol, the animals were euthanized with a lethal dose of pentobarbital (60 mg/kg) and the lung and thoracic cavity carefully inspected for evidence of perfluorothorax or gross abnormalities. The right lung of every lamb was perfused with 1/10 dilution of formaldehyde as a whole for histological analysis.

Sampling and data analysis

Arterial blood gas analyses were conducted every 30 minutes using a blood gas analyzer (Rapidlab 865; Bayer, Germany). Oxygen saturation was continuously monitored. Parameter information from hemodynamic devices and both ventilators was synchronized and recorded onto our TLV prototype at 50 Hz via xPCTarget (Mathworks, Natick MA, USA). Data were compiled with Matlab (Mathworks, Natick MA, USA). Hemodynamic parameters such as cardiac output, systemic vascular resistance and pulmonary vascular resistance were standardized using body surface area calculated according to the following formula: $\text{weight}^{0.67} \times 0.084$ (27). The recovered meconium was lyophilized (Freezone 6 freeze dry system; LABCONCO, Missouri, USA) and weighed in order to compare with a standard curve (preparation volume versus dry weight) to obtain a percentage of extracted meconium for each experiment. A correction

factor (calculated *in vivo* with healthy lambs) was used to minimize any error due to other fluid recovery.

Macroscopic observations and Histopathology

Four sections of different areas of the right lung (two from the dependent zone and two from the non-dependent zone) were embedded in paraffin. Four-micrometer thick sections were stained with hematoxylin and eosin. Slides were examined and scored by a double-blinded pathologist. The score included nine different parameters (14, 18) and was attributed according to quartile of presence, with 0 representing an inexistent feature and 4 representing a prevalence greater than 75%.

Statistics

Results of blood gas analysis as well as hemodynamic and ventilatory parameters were analyzed by the statistician of our research center with the SAS 9.0 software (version 9.0, SAS Institute. Inc., USA) using a two-factor ANOVA with repeated measures. Intra and inter group comparisons were adjusted with the Bonferroni method. For the PaO₂ variable as well as histological results, the Mann-Whitney test was used to compare both groups since it was impossible to transform the data to obtain a normal distribution. Statistical significance was accepted at p values < 0.05. Results are expressed at mean ± SD, except for histological scores, which are expressed as median (min, max).

Results

Twenty-three lambs were randomized of which three died (2 TLV-BAL and 1 S-BAL) related to technical problems. The other twenty animals survived until the end of the experiment and were euthanized. During the experiment, one lamb from the TLV group suffered from a perfluorothorax, which was identified retrospectively during necropsy. One lamb from the S-BAL group did not regain predetermined arterial saturation (SaO_2) of over 80% after the first lung lavage and the second lavage was not performed in accordance with the experimental protocol.

Gas exchange and ventilation indexes

Except for a slight difference in arterial blood pH but within an acceptable clinical range (TLV-BAL= 7.422 ± 0.048 ; S-BAL= 7.357 ± 0.042), animals of both groups were similar prior to randomization with regard to other measured parameters as well as calculated indices (figure 1). After meconium instillation, all lambs had a $\text{PaO}_2 \leq 100$ mmHg under a FiO_2 of 1 and were classified as having severe MAS (TLV-BAL= 84.4 ± 7.5 ; S-BAL= 80.4 ± 15.6). There was no significant difference noted between the two groups at this stage. After randomization, measured PaO_2 rapidly increased for the TLV group and was maintained at a mean of 214 ± 18 mmHg throughout the experiment. Conversely, in the S-BAL group, PaO_2 increased slowly to reach a mean of 104 ± 19 mmHg

(figure 1a). The difference between the two groups was significant throughout except at the 120th minute of the experiment. In addition, there was a strong tendency for PaO₂ of the TLV-BAL group to return to baseline at the end of the experiment, with no observable statistical difference in PaO₂ level between baseline and the 210th minute of the TLV-BAL group. After a slight decrease in PaCO₂ for both groups within the first 30 minutes of treatment, there was no significant difference in PaCO₂ between the two groups except at the 120th minute interval of the experiment where PaCO₂ was slightly higher for the TLV-BAL (TLV-BAL=46.4 ± 3.2 mmHg; S-BAL= 34.7 ± 7.0) mmHg (figure 1b). There was no significant difference in pH values at any time during the treatments (figure 1c).

Conversely, there was a significant difference in SaO₂ values (figure 2) between the two groups at several phases of the experiment including in the first few minutes of treatment (TLV-BAL: 99.2 ± 0.3 %; S-BAL: 80.1 ± 18.8 %). In addition, this increase in SaO₂ was maintained with TLV-BAL as opposed to S-BAL.

Ventilatory parameters

Ventilation parameters and measured pressures are shown in table 1 for both groups. Ventilation frequency (Fr) and minute ventilation (V_{min}) were lower for the TLV-BAL group due to the nature of the TLV technique. Mean airway pressure (Paw) rose upon induction of MAS in both groups. However, while Paw

for S-BAL group remained elevated, Paw for the TLV-BAL group decreased rapidly and returned to baseline value for the remainder of the experiment.

Hemodynamic parameters

Table 2 shows that there was no significant difference with regard to mean systemic arterial pressure, cardiac index, heart rate and systemic vascular resistance index prior to and after randomization between the two groups. There was no significant difference between groups relative to the use of dopamine and crystalloids (data not shown). MAS induced an increase in mean pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance index, both of which were significantly higher in the TLV-BAL group as compared to the S-BAL group from the 60th minute onward after randomization.

Recovered meconium

The amount of meconium recovered in the TLV group (43.3 ± 13.8 %) was significantly higher than the amount recovered in the S-BAL group (27.5 ± 10.4 %).

Histology

Results for histological scoring are shown in table 3. Scoring results from both dependent and non-dependent lung sites were pooled since there were no differences between any of the scores at 4 hours. There was no significant

difference in terms of total score, edema or necrosis between the two groups. Overdistension was scored significantly higher for the TLV group, while interstitial inflammation and alveolar hemorrhaging were both significantly higher for the S-BAL group. Histology of dependent and non-dependent sites for both groups as well as a negative control are shown in Figure 3.

Discussion

The present study demonstrates that, in comparison to S-BAL, TLV-BAL in this acute MAS model is well tolerated, provides better gas exchange along with similar histological total score and enables larger meconium washout. Hemodynamic measurements were comparable although mean pulmonary arterial pressure was significantly higher for TLV-BAL group.

The newborn ovine acute MAS model used in the present study is comparable to a large number of ovine (13, 28) and other animal (14, 16, 17, 21) models put forth by numerous research teams. Moreover, it is a very reproducible model that is well representative of MAS with all of its complications (1).

Promptness of support and treatment for the severe MAS patient is the key in resolving morbidity and mortality (1). Our severe MAS newborn lamb model is representative of difficulties encountered clinically where fast lavage and recovery are crucial. As depicted in figure 1, MAS induction results in alarming gas exchange and is responsible for the rise in mean pulmonary arterial pressure that ultimately would lead to typical persistent pulmonary hypertension vastly linked to this pathology. Both groups herein suffered from identically severe acute deterioration of their condition after MAS induction suggesting that they had the same starting point prior to initiation of treatment.

Although TLV necessitates a dedicated ventilator, its implementation is just as rapid as S-BAL treatment. The difference between these two treatments

resides in their approach in achieving bronchial lavage. As pointed out by other authors, S-BAL therapy in itself washes the meconium but, due to the non-oxygenated liquid, punctually raises the level of respiratory distress before significant improvement is possible (11). In comparison, TLV-BAL in this study aims at lavaging the meconium while providing steady adequate ventilation. SaO₂ levels shown in figure 2 clearly demonstrate that TLV enables recovery of oxygenation after only 5 minutes. Conversely, S-LBA necessitated 30 minutes to an hour before allowing the lambs to reach an acceptable level of oxygenation even with the use of optimal volumes and settings (15 mL/kg in 2 aliquots) reported in the literature (29). Moreover, TLV-BAL not only allows a better prompt oxygenation than S-LBA, but also for the entire duration of the 4-hour post-treatment protocol (figure 1). Indeed, PaO₂ levels were doubled during TLV compared to the CMV that followed S-BAL. Similar results were also shown in a previous study in newborn lambs (13). Of note, while PaO₂ values in the present study were higher than recommended clinically in newborns throughout TLV, Inolivent-4 is equipped with a gas mixer, which enables to adjust FiO₂ and maintain PaO₂ in the normal range, as recently validated (unpublished results). This huge difference in oxygenation levels between TLV and S-BAL lambs does not translate however in PaCO₂ levels. Indeed, CO₂ removal tended to be better in the S-BAL group than in the TLV group (statistically significant at 120 min). Nevertheless, average levels of PaCO₂ remained within an acceptable clinical range in both groups, except at MAS induction. In addition, pH values did not show any significant difference between TLV-BAL and S-BAL. It should be noted

however that the better gas exchanges during TLV were obtained at a much lower ventilator pressure across the ventilator cycle as demonstrated by the significant lower mean airway pressure. In addition, it has been shown that, as a consequence of the high viscosity of PFC, proximal airway pressures are rapidly dissipated along the airways during TLV, resulting in much lower alveolar pressure than tracheal pressure (30). Thus, overall results of this study, together with that reported in the literature (23), suggest that TLV has a potential for protecting the lung against ventilator-induced lung injury.

The S-BAL group had no problem in recovering baseline mean pulmonary arterial pressure (PAPm) one hour after onset of treatment. Our main concern is the significantly higher mean pulmonary arterial pressure level observed during TLV. We assume that this is due to the larger lung tidal volumes used in comparison to gas ventilation. As shown by others, these large tidal volumes most likely lead to an increase in intra-thoracic pressure with a subsequent increase in lung alveolar capillary pressure (31). A major complication of severe MAS is the development of persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) and therefore controlling or reversing PPHN is a major goal of all new proposed MAS therapies. PAPm and pulmonary vascular resistance index (PVRI) both increased by about 50% after meconium instillation in both groups and tended to be higher in the TLV-BAL group as opposed to S-BAL, although not significantly. However, despite the dramatic improvement in gas exchange, the present study failed to show any improvement in PAPm or PVRI levels at the 240th minute of TLV-BAL. This absence of improvement has been described

previously in both TLV (13, 31) and PLV (13, 17) and may be due to the compression of small pulmonary vessels by perfluorochemical-filled alveoli (32). Other than using intrapulmonary administration of vasoactive substances (33), a decrease in end expiratory pressure could represent a better solution in addressing this issue.

However, it must be emphasized that this relatively high mean pulmonary arterial pressure in TLV does not impair the efficacy of gas exchanges or overall systemic hemodynamic parameters. Conversely, improvement in gas exchange in the liquid-filled lung described in the present study may be explained by a combination of different mechanisms including an increase in alveolar recruitment, better lung compliance as well as an increase in trans-alveolar pressure in dependent lung regions resulting in redistribution of pulmonary blood flow to the non dependent regions where lung injury is less severe. This combination of mechanisms has been demonstrated to improve ventilation/perfusion matching by homogeneously redistributing regional pulmonary blood flow (13, 20, 32, 34).

A key finding in the present study is the important difference in meconium recovery between the S-BAL and TLV-BAL groups. Unlike several studies (11, 35, 36), our study design called for the use of pure PFC as media for TLV lung lavage as opposed to perfluorocarbons emulsified with saline, resulting in a large amount of meconium being washed out during the first 5 minutes in the TLV-BAL group. Since PFDEC, as for all perfluorocarbons, is not miscible with water and is very dense, meconium solids are easily removed during TLV. It is likely that the

weight of PFDEC also enables to wash out meconium in the dependent sites of the lungs. This result was somewhat anticipated after only a few experiments since the fluid recovered after S-LBA contained diluted meconium. By diluting the meconium, it is likely that S-LBA washes a portion of the debris, but in turn also homogenizes the entire lungs with what is left of the meconium. Furthermore, it should be emphasized that there was also meconium remaining in the tubing of the TLV device (prior to the filter), therefore indicating that TLV- BAL actually washed more meconium than indicated in the results since it was impossible to recover all of the washed meconium. The fraction of meconium recovered in this study using TLV lavage is very close to the best results obtained by others using therapeutic lung lavage with or without diluted surfactant (aliquot volume of 15 ml/kg) (11,12).

Lastly, histological analysis did not show any observable differences between the two treatment groups. However it is possible that a 4-hour protocol may be too short to observe clear changes in the histological profile of the lungs. Nevertheless, slight differences were observed as shown in the photomicrographs presented in figure 3, notably regarding the higher presence of meconium deposit for the S-BAL group. An increase in the overdistension histological score was also noted for the TLV-BAL group. None of the 3 previous studies in TLV during MAS has reported such histological overdistension score (13, 20, 21). However, from a methodological standpoint, overdistension is difficult to assess by light microscopy. In addition, the fact that animals were anaesthetized during TLV may explain, at least in part, the above results. As for

histology scores for the S-BAL group, results were comparable to those reported in the literature (34).

In conclusion, we demonstrate herein the high efficacy of TLV-BAL comparatively to S-BAL in our experimental model of MAS in newborn lambs. The results obtained together with the recent progress achieved in the design of a user-friendly fully controlled and safe liquid ventilator (37) advocate for the future design of a clinical trial with TLV-BAL as treatment for severe MAS.

Acknowledgements

This research was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Foundation of Stars and by the Fonds Québécois de la Recherche sur la nature et les technologies. Special thanks to Pulsion Medical System (Munich, Germany) for the loan of PiCCO and VoLEF devices, and to BLES Biochemicals Inc. for donation of BLES™ surfactant. Nathalie Carrier, biostatistician, Centre de recherche Clinique Étienne-Le Bel, CHUS Sherbrooke, was of invaluable help for the statistical analyses. P. Micheau, J-P. Praud and H. Walti are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel.

References

1. Dargaville Peter A, Copnell B; The epidemiology of meconium aspiration syndrome: Incidence, risk factors, therapies, and outcome. *Pediatrics* 2006; 117: 1712-1721.
2. Sriram S, Wall SN, Khoshnood B, Singh JK, Hsieh HL, Lee KS; Racial disparity in meconium-stained amniotic fluid and meconium aspiration syndrome in the United States 1989-2000. *Obstet Gynecol* 2003; 102(6):1262-1268.
3. Gouyon JB, Ribakovsky C, Ferdynus C, et al.; Severe respiratory disorders in term neonates. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 22 (1): 22-30
4. Moses D, Holm BA, Spitale P, et al; Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 477-481.
5. Davey AM, Becker JD, Davis JM; Meconium aspiration syndrome: Physiologic and inflammatory changes in a newborn pig model. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16: 101-108.
6. Park K, Bae C, Chung S; In vitro effects of meconium on the physical surface properties and morphology of exogenous pulmonary surfactant. *J Korean Med Sci* 1996; 11: 429-436.
7. Dargaville Peter A, Mills John F; Surfactant therapy for meconium aspiration syndrome. *Drugs* 2005; 65: 2569-2591.

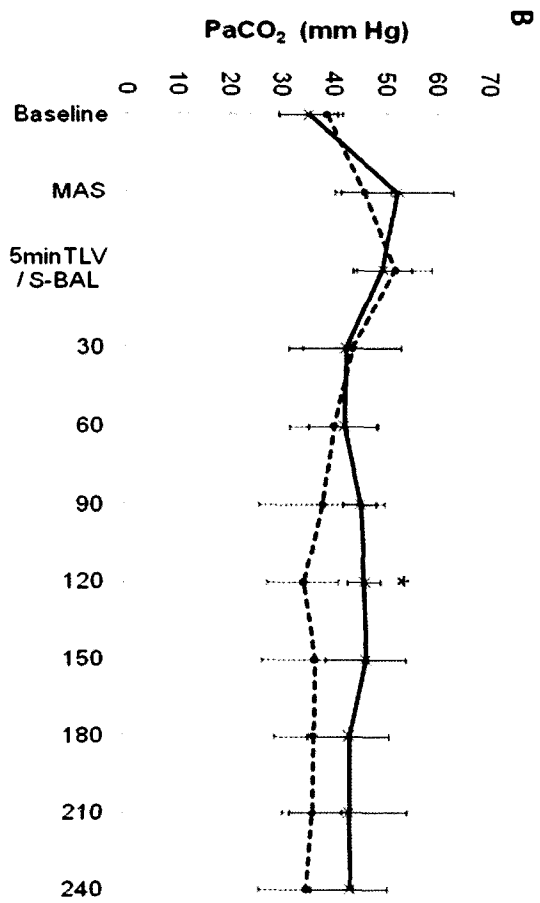
8. Radhakrishnan RS, Lally PA, Lally KP, Cox CS; ECMO for meconium aspiration syndrome: support for relaxed entry criteria. *ASAIO J* 2007; 53:489-491.
9. Nijhuis-Van der Sanden MWG, van der Cammen-van Zijp MHM, Janssen AJWM, Reuser JJCM, Mazer P, van Heijst AFJ, Gischler SJ, Tibboel D, Kollée LAA; Motor performance in five-year-old extracorporeal membrane oxygenation survivors: a population-based study. *Critical Care* 2009, 13:R47.
10. Wiswell TE, Knight GR, Finer NN, Donn SM, Desai H, Walsh WF, et al.; A multicenter, randomized, controlled trial comparing Surfaxin (Lucinactant) lavage with standard care for treatment of meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 2002; 109:1081–1087.
11. Dargaville P, Mills JF, Copnell B, Loughnan P, Tingay DG, McDougall P, Morley CJ; Therapeutic lung lavage in meconium aspiration syndrome: a preliminary report. *J Paediatr Child Health* 2007;43:539-545.
12. Dargaville P A, John F M, Bevan M H, Chan Y, Coleman L, Loughnan P M, Morley C J; Therapeutic lung lavage in the piglet model of meconium aspiration syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 456-463.
13. Foust R, Tran N N, Cox C, Miller T F, Greenspan J S, Wolfson M R, Shaffer T H; Liquid Assisted Ventilation: An Alternative Ventilatory Strategy for Acute Meconium Aspiration Injury. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 316-322.

14. Jeng M-J, Soong W-J, Lee Y-S, Chang H-L, Shen C-M, Wang C-H, Yang S-S, Betau H; Effects of therapeutic bronchoalveolar lavage and partial liquid ventilation on meconium-aspirated newborn piglets. *Critical Care Med* 2006; 34: 1099-1105.
15. Chappell S E, Wolfson M R, Shaffer Thomas S; A comparison of surfactant delivery with conventional mechanical ventilation and partial liquid ventilation in meconium aspiration injury. *Respir Med* 2001; 95: 612-617.
16. Onasanya B I, Rais-Bahrami K, Rivera O, Seale W R, Short B L; The use of intratracheal pulmonary ventilation and partial liquid ventilation in newborn piglets with meconium aspiration syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2001; 2: 69-73.
17. Barrington K, Singh A J, Etches P C, Finer N N; Partial liquid ventilation with and without inhaled nitric oxide in a newborn piglet model of meconium aspiration. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1922-1927.
18. Hummler H D, Thome U, Schulze A, Schnabel R, Pohlandt F, Frank A R; Spontaneous breathing during partial liquid ventilation in animals with meconium aspiration. *Pediatr Res* 2001; 49: 572-580.
19. Nakamura T, Matsuzawa S, Sugiura M, Tamura M; A randomised control study of partial liquid ventilation after airway lavage with exogenous surfactant in a meconium aspiration syndrome animal model. *Arch Dis Child-Fetal and Neonatal Edition* 2000; 82: 160-162.

20. Shaffer TH, Lowe CA, Bhutani VK, Douglas PR; Liquid ventilation: Effect on pulmonary function in distressed meconium-stained lambs. *Pediatr Res* 1984; 18: 47.
21. Kuo CY, Hsueh C, Wang CR; Liquid ventilation for treatment of meconium aspiration syndrome in a piglet model. *J Formos Med Assoc* 1998; 97: 392-399.
22. Dargaville PA, Copnell B; Controlled trial of therapeutic lung lavage in meconium aspiration syndrome (the less MAS trial). Available at: http://www.rch.org.au/neonatal_rch/research.cfm?doc_id=6953. Accessed January 20, 2009.
23. Wolfson M R, Shaffer T H; Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatr Respir Rev* 2005; 6(2): 117-127.
24. Robert R, Micheau P, Walti H; A supervisor for volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. *Biomedical Signal Processing and Control* 2007; 2: 267-274.
25. Robert R, Micheau P, Cyr S, Lesur O, Praud JP, Walti H; A prototype of volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. *ASAIO J* 2006; 52:638-645.
26. Robert R, Micheau P, Avoine O, Beaudry B, Beaulieu A, Walti H; A Regulator for Pressure Controlled Total Liquid Ventilation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2009.

27. Mitchell HH: Check formulas for surface area of sheep. In: A Year's Progress in Solving Farm Problems in Illinois, Champaign, Illinois, 1995; 155-158.
28. Gastiasoro-Cuesta E , Alvarez-Díaz J F, Arnaiz-Renedo A, Fernández-Ruanova B, López-de-Heredia-Y-Goya J, Román-Etxebarria L, Alfonso-Sánchez L F, Valls-i-Soler A; The cardiovascular effects of partial liquid ventilation in newborn lambs after experimental meconium aspiration. *Pediatr Crit Care Med* 2001; 2: 334-339.
29. Jeng M-Y, Soong W-J, Lee Y-S; Effective Lavage Volume of Diluted Surfactant Improves the Outcome of Meconium Aspiration Syndrome in Newborn Piglets. *Pediatr Res* 2009; 66: 107-112.
30. Curtis SE, Furhman BP, Howland DF; Airway and alveolar pressures during perfluorocarbon breathing in infant lambs. *J Appl Physiol* 1990; 68:2322-2338.
31. Curtis S E; Perfluorocarbon-associated gas exchange: a hybrid approach to mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1991; 19: 600-601.
32. Lowe C A, Shaffer T H; Pulmonary vascular resistance in the fluorocarbon-filled lung. *J Appl Physiol* 1986; 60: 154-159.
33. Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH; Pulmonary Administration of Vasoactive Substances by Perfluorochemical Ventilation. *Pediatrics* 1996; 97: 449-455.

34. Uchida T, Yokoyama K, Nakazawa K, Makita K; Inhaled nitric oxide during partial liquid ventilation shifts pulmonary blood flow to the non-dependent lung regions. *Intensive Care Med* 2000; 26: 764-769.
35. Tanveer A, Antunes MJ, Cleary GM, Greenspan JS, Wiswell T, Chander A; Lung mechanics and inflammatory response in meconium injured rats following lung lavage with perfluorochemical or KL4 surfactant. *Pediatr Res* 1998; 43: 299.
36. Schlösser RL, Veldman A, Fischer D, Funk B, Brand J, von Loewenich V. Comparison of effects of perflubron and surfactant lung lavage on pulmonary gas exchange in a piglet model of meconium aspiration. *Biol Neonate* 2002; 81:126–131.
37. Costantino ML, Micheau P, Shaffer TH, Tredici S, Wolfson MR; Clinical Design Functions: Round Table Discussions on the Bioengineering of Liquid Ventilators. *ASAIO Journal* 2009; 55: 206-208.



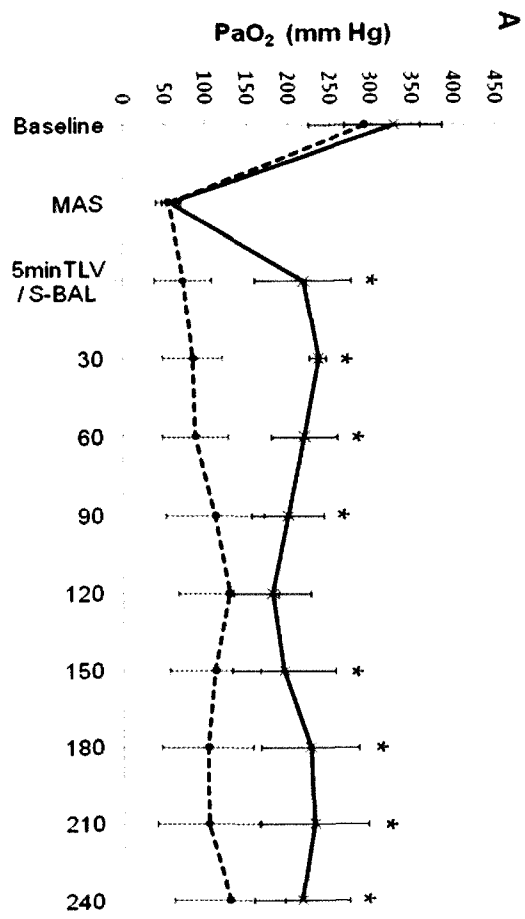


Figure and table legends

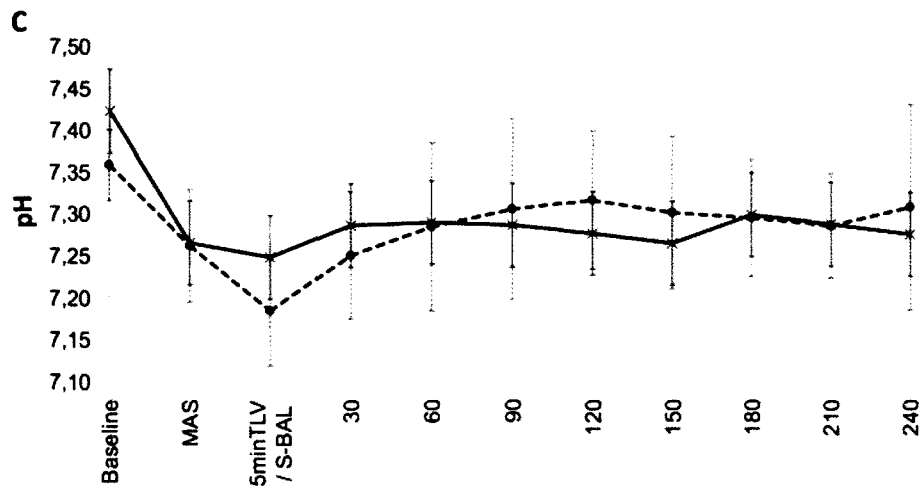


Figure 1. Arterial blood gas analysis results (A: PaO₂ ; B : PaCO₂ ; C : pH) for each stage of the experiment presented as mean ± SD. The TLV-BAL group (n=10) is represented by solid lines and the S-BAL group (n=10) by dashed lines. *p ≤ .05 (inter-groups). MAS, meconium aspiration syndrome; TLV-BAL, total liquid ventilation bronchoalveolar lavage; S-BAL, bronchoalveolar lavage with diluted surfactant.

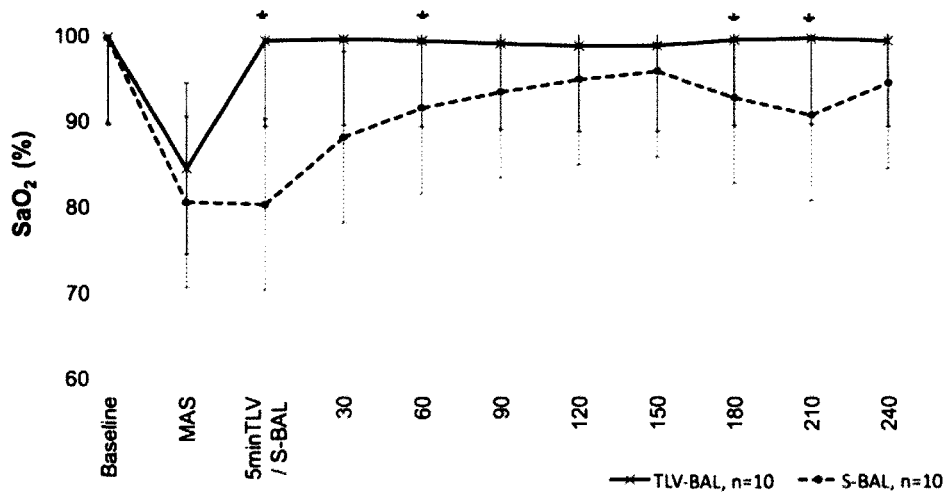


Figure 2. Arterial oxygen saturation (SaO₂) measured at each stage of the experiment presented as mean ± SD. The TLV-BAL group (n=10) is represented by the solid line and the S-BAL group (n=10) by the dashed line. *p ≤ .05 (inter-groups). MAS, meconium aspiration syndrome; TLV-BAL, total liquid ventilation bronchoalveolar lavage; S-BAL, bronchoalveolar lavage with diluted surfactant.

Parameters	Groups	Phase of the experiment										
		Baseline	MAS	TLV / S-BAL	30	60	90	120	150	180	210	240
Fr (resp/min)	TLV-BAL	55 ± 0	55 ± 0	5.4 ± 0.0	5.4 ± 0.0	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.3
	S-BAL	55 ± 4	56 ± 2	56* ± 2	58* ± 3	59* ± 4	59* ± 4	58* ± 6	57* ± 6	57* ± 7	58* ± 5	58* ± 5
Vt (mL/kg)	TLV-BAL	11 ± 2	11 ± 2	27* ± 2	31* ± 4	31* ± 3	31* ± 4	32* ± 4	31* ± 4	31* ± 4	32* ± 4	31* ± 3.6
	S-BAL	11 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	13 ± 3	13 ± 2	14 ± 2	13 ± 3	13 ± 3	14 ± 3	15 ± 2
Vmin (mL/min/kg)	TLV-BAL	596 ± 84	602 ± 78	146 ± 29	166 ± 10	167 ± 19	169 ± 18	175 ± 19	178 ± 22	182 ± 20	185 ± 24	184 ± 25
	S-BAL	621 ± 98	641 ± 70	663* ± 64	682* ± 83	763* ± 186	758* ± 140	778* ± 158	773* ± 210	768* ± 212	806* ± 191	885* ± 169
PEEP (cm H ₂ O)	TLV-BAL	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4	5.3 ± 1.6	5.8 ± 1.3	5.8 ± 1.0	5.6 ± 1.9	6.2 ± 1.4	6.0 ± 1.7	5.0 ± 2.3	5.6 ± 1.7	5.4 ± 1.8
	S-BAL	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	6.6 ± 1.1	6.6 ± 1.1	6.9 ± 1.5	7.8 ± 1.8	7.8 ± 1.7	7.6 ± 1.4	7.4 ± 1.6	7.5 ± 1.8	8.5* ± 1.4
Paw (cm H ₂ O)	TLV-BAL	6.3 ± 0.8	9.5 ± 1.0	6.9 ± 2.2	5.6 ± 1.2	5.6 ± 1.0	5.6 ± 1.1	5.5 ± 1.5	6.3 ± 1.5	6.5 ± 1.5	6.4 ± 1.6	6.1 ± 1.6
	S-BAL	6.2 ± 0.9	8.1 ± 1.4	11.1* ± 1.0	11.1* ± 2.3	11.5* ± 2.2	12.1* ± 2.7	12.2* ± 2.5	11.8* ± 2.1	11.9* ± 2.1	12* ± 2.6	12.9* ± 2.3
Ppeak (cm H ₂ O)	TLV-BAL	13 ± 3	21 ± 2	29 ± 11	31 ± 11	29 ± 10	27 ± 9	29 ± 9	27 ± 9	30 ± 11	31 ± 11	30 ± 10
	S-BAL	15 ± 2	21 ± 3	22 ± 3	22 ± 4	21 ± 5	22 ± 4	21 ± 4	22 ± 4	23 ± 4	23 ± 5	23 ± 6

Table 1. Ventilation parameters measured at each phase of the experiment presented as mean ± SD for the TLV-BAL group (n=10) and S-BAL group (n=10). *p ≤ .05 (inter-groups). MAS, meconium aspiration syndrome; TLV-BAL, total liquid ventilation bronchoalveolar lavage; S-BAL, bronchoalveolar lavage with diluted surfactant; Fr, respiratory frequency; Vt, tidal volume; Vmin, minute ventilation; PEEP, positive end expiratory pressure; Paw, mean airway pressure; Ppeak, peak pressure.

Parameters	Groups	Phase of the experiment										
		Baseline	MAS	TLV / S-BAL	30	60	90	120	150	180	210	240
APm (mmHg)	TLV-BAL	69.3 ± 15.9	59.1 ± 14.6	53.4 ± 15.9	57.7 ± 14.6	59.7 ± 9.3	60.3 ± 15.0	58.8 ± 14.2	60.6 ± 14.8	58.3 ± 12.0	57.3 ± 10.7	53.8 ± 10.4
	S-BAL	66.2 ± 15.4	58.7 ± 12.0	61.8 ± 14.6	60.4 ± 11.0	59.0 ± 11.7	62.8 ± 14.8	60.8 ± 17.0	61.5 ± 10.3	52.4 ± 7.7	60.9 ± 13.8	58.8 ± 7.1
Cia (L/min/m ²)	TLV-BAL	4.75 ± 0.66	5.69 ± 0.48	5.62 ± 0.68	5.19 ± 0.45	4.77 ± 0.90	4.64 ± 0.67	4.97 ± 0.76	5.04 ± 0.50	5.00 ± 0.57	5.09 ± 0.54	4.97 ± 0.51
	S-BAL	4.89 ± 0.78	5.03 ± 0.8	4.77 ± 1.12	5.04 ± 1.29	4.98 ± 1.50	5.03 ± 1.51	4.72 ± 1.39	4.79 ± 1.53	4.95 ± 1.46	4.89 ± 1.53	4.82 ± 1.31
HR (bpm)	TLV-BAL	192 ± 22	215 ± 17	181 ± 10	181 ± 20	187 ± 31	178 ± 21	180 ± 16	184 ± 21	172 ± 24	200 ± 29	207 ± 32
	S-BAL	215 ± 45	231 ± 26	224 ± 45	224 ± 42	226 ± 46	218 ± 36	199 ± 31	218 ± 51	212 ± 41	207 ± 33	205 ± 19
SVRI (dyn*s*cm ⁻⁵ *m ²)	TLV-BAL	843 ± 100	1160 ± 109	1138 ± 278	1232 ± 212	1317 ± 461	1178 ± 379	1059 ± 373	1078 ± 349	991 ± 265	899 ± 260	1006 ± 289
	S-BAL	920 ± 55	1075 ± 150	1125 ± 103	1114 ± 176	959 ± 284	915 ± 224	871 ± 172	882 ± 150	873 ± 102	795 ± 163	828 ± 174
PAPm (mmHg)	TLV-BAL	20.6 ± 3.1	31.8 ± 6.3	25.8 ± 3.1	28.1 ± 6.3	28.7 ± 5.4	28.2* ± 5.1	28.1* ± 6.3	28.5* ± 6.3	28.2* ± 6.2	28.4* ± 5.7	28.7 ± 5.8
	S-BAL	19.4 ± 2.1	26.0 ± 4.6	25.4 ± 2.8	22.6 ± 5.2	22.2 ± 4.6	21.5 ± 4.4	20.5 ± 5.4	21.2 ± 5.1	18.7 ± 4.5	19.7 ± 6.5	20.1 ± 8.1
PVRI (dyn*s*cm ⁻⁵ *m ²)	TLV-BAL	252 ± 43	328 ± 59	405 ± 98	399 ± 46	439* ± 112	480* ± 72	464* ± 41	460* ± 59	411* ± 53	409* ± 58	434* ± 20
	S-BAL	248 ± 22	289 ± 18	305 ± 33	308 ± 40	262 ± 24	237 ± 10	243 ± 21	229 ± 36	247 ± 27	225 ± 50	241 ± 54

Table 2. Hemodynamic measurements made at each stage of the experiment presented as mean ± SD (acquired with PiCCO & VoLEF devices ; Pulsion Medical Systems, Munich, Germany) for the TLV-BAL group (n=10) and the S-BAL group (n=10). *p ≤ .05 (inter-groups). MAS, meconium aspiration syndrome; TLV-BAL, total liquid ventilation bronchoalveolar lavage; S-BAL, bronchoalveolar lavage with diluted surfactant; APm, mean arterial pressure; Cia, indexed cardiac output; HR, heart rate; SVRI, systemic vascular resistance index; PAPm, mean pulmonary arterial pressure; PVRI, pulmonary vascular resistance index.

		S-BAL (n=10)		TLV-BAL (n=10)	
Atelectasis		1.0	(0.5, 2.5)	1.25	(0, 2)
Inflammation	alveolar	1.25	(0, 3)	1.0	(1, 2)
	interstitial	2.8 *	(2, 4)	2.25	(1, 3)
Haemorrhage	alveolar	0.5 *	(0, 3)	0.0	(0, 1)
	interstitial	1.5	(0, 2.5)	1.0	(0, 2)
Oedema	alveolar	2.0	(1, 3)	2.0	(1, 2)
	interstitial	1.5	(1, 2.5)	1.5	(1, 2)
Necrosis		0.0	(0, 1)	0.0	(0, 0)
Overdistension		0.0	(0, 1)	1.0 *	(0, 2)
Sum		10.25	(7, 21)	10.5	(4, 14)

Table 3. Median histological score (min, max) for both groups (S-BAL and TLV-BAL). Dependent and non-dependent zones were pooled since there were no differences between the various zones. *p ≤ .05 (inter-groups). TLV-BAL, total liquid ventilation bronchoalveolar lavage; S-BAL, bronchoalveolar lavage with diluted surfactant.

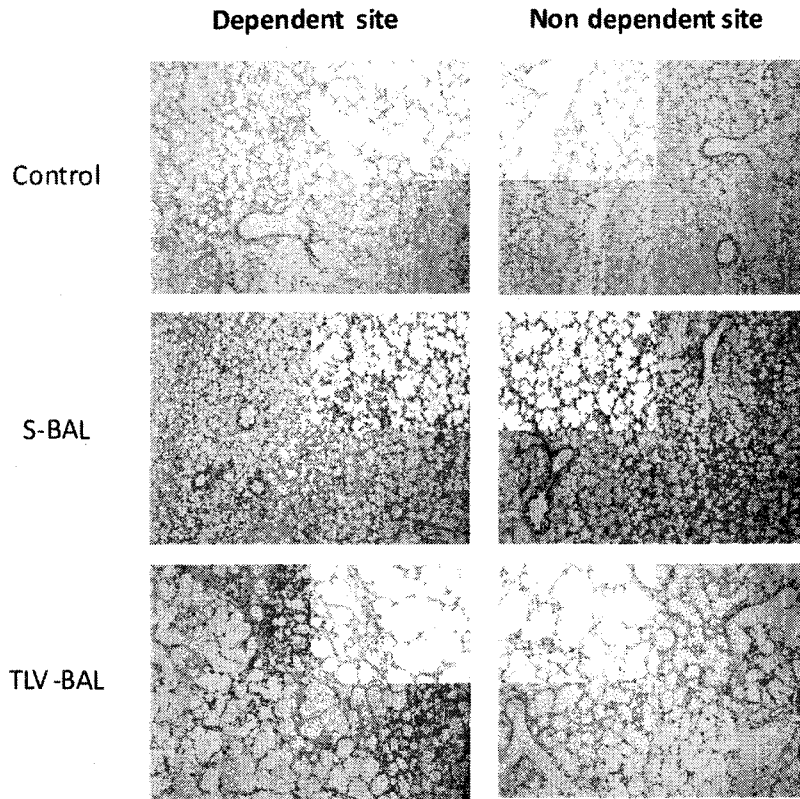


Figure 3. Photomicrographs of dependent and non-dependent lung sites in newborn lambs after S-BAL and TLV-BAL and a negative control (hematoxylin and eosin, 100X and 200X imbedded).

Discussion

L'étude pilote préliminaire sur la validation du prototype de ventilateur liquidien Inolivent-4, l'optimisation de la VLT et la mise au point du modèle expérimental néonatal ovin de SAM sévère a démontré que notre modèle était non seulement représentatif des complications cliniques (DARGAVILLE et COPNELL, 2006) qui se rattachent au SAM sévère, mais aussi très reproductible. Cette étude pilote a aussi confirmé la possibilité de quantifier le méconium récupéré avec une précision acceptable. De plus celle-ci a servi à illustrer la robustesse du contrôleur en pression à l'expiration du prototype Inolivent-4 et à vérifier les limites de celui-ci en termes de V_t et de Fr . Cette étude préliminaire a ainsi permis de définir les paramètres ventilatoires optimaux en VLT pour le modèle néonatal ovin de SAM sévère.

L'étude comparative entre le lavage bronchoalvéolaire en ventilation liquidienne totale et le lavage bronchoalvéolaire effectué avec une dilution de surfactant exogène sur le même modèle expérimental néonatal ovin démontre que la VLT est bien tolérée et permet une meilleure oxygénation ainsi qu'un lavage plus efficace du méconium instillé. Les deux techniques donnent un profil histologique similaire. Les mesures hémodynamiques effectuées sont comparables malgré le fait que la PaP_m soit significativement supérieure pour le groupe VLT.

Le modèle néonatal ovin de SAM sévère qui a été mis au point est comparable à différents modèles ovins (FOUST *et al.*, 1996) (GASTIASORO-CUESTA *et al.*, 2001) et également à des modèles utilisant d'autres espèces animales (JENG *et al.*, 2006) (ONASANYA *et al.*, 2001) (BARRINGTON *et al.*, 1999) (KUO *et al.*, 1998). Bien que cette étude ne comprenne pas de groupe contrôle, une étude en particulier avec un modèle ovin de SAM très similaire montre bien l'évolution de cette pathologie (FOUST *et al.*, 1996). Le modèle néonatal ovin fut conservé pour cette étude puisqu'il était bien connu, disponible et que la physiologie respiratoire de l'agneau était la plus près de l'humain par rapport aux autres modèles disponibles. Les volumes respiratoires ainsi que le poids à la naissance sont très similaires au nouveau-né humain à terme. Pour des raisons d'approvisionnement et de logistique, des agneaux de moins de 4 jours de vie ont été utilisés. On peut mentionner, entre autre, que le nombre d'agneaux disponibles étant restreint puisqu'ils ne proviennent que d'un seul éleveur et aussi le fait que les agneaux doivent subir un conditionnement à l'arrivée. L'idéal aurait été bien sûr d'utiliser uniquement des agneaux nouveaux-nés immédiatement après la naissance par voie vaginale ou césarienne ce qui n'était pas possible à l'animalerie au moment de cette étude. Par contre, il n'y avait aucune différence significative entre les deux groupes de cette étude par rapport à l'âge et au poids des agneaux.

La rapidité avec laquelle le support et le traitement du patient atteint d'un SAM sévère est effectué est l'élément permettant de réduire le taux de morbidité et de mortalité (DARGAVILLE *et al.*, 2006). Le modèle néonatal ovin utilisé est

représentatif des difficultés rencontrées en clinique où le lavage rapide et le retour vers une fonction respiratoire efficace est crucial. Comme le montre la figure 1, suite au SAM, la détérioration des échanges gazeux est profonde. Entre la baseline et le SAM, la PaO₂ chute drastiquement suite à la procédure d'induction du SAM sévère qui est clairement responsable de l'augmentation de la PaPm qui mènerait à une hypertension pulmonaire persistante largement associée à cette pathologie. Les deux groupes souffrent identiquement d'une détresse respiratoire sévère et sont destinés à une détérioration de leur condition après l'induction du SAM. Il est important de noter qu'il n'y a aucune différence significative entre les groupes pour aucun des paramètres ni aucune des mesures effectuées lors de la phase du SAM. Ce fait nous permet de statuer que les deux groupes avaient exactement le même point de départ avant l'administration des deux traitements à comparer.

Même si la VLT nécessite un ventilateur dédié, elle est aussi rapide à mettre en route qu'un S-LBA. La différence entre ces deux traitements se situe au niveau de leur approche pour effectuer le lavage des poumons. Comme mentionné par d'autres, le S-LBA permet le lavage d'une partie du méconium, mais aggrave le niveau de détresse respiratoire ponctuellement avant de permettre quelque amélioration (DARGAVILLE *et al.*, 2007). En comparaison, dans la présente étude, la technique de VLT assure non seulement le lavage du méconium, mais aussi un support ventilatoire adéquat et constant. Les niveaux de SaO₂ illustrés à la figure 2 démontrent clairement que la VLT permet de retrouver une très bonne oxygénation après seulement 5

minutes. À l'opposé, il faut 30 minutes suite au S-LBA avant que les agneaux ne retrouvent une oxygénation acceptable même en utilisant les volumes de lavage optimaux (15 mL/kg en 2 aliquotes) décrit dans la littérature (JENG *et al.*, 2009). La VLT ne permet pas seulement une meilleure oxygénation ponctuelle par rapport au S-LBA, mais bien pour la totalité des 4 heures post-SAM du protocole (figure 1). Comme d'autres l'ont déjà démontré (FOUST *et al.*, 1996), le niveau de PaO₂ durant la VLT est deux fois plus élevé que lors de la VMC qui suit le S-LBA. Lors de l'étude comparative, la FiO₂ n'a pas été modifiée afin de comparer les deux groupes sous une ventilation optimale. Par contre, le ventilateur liquidien utilisé pour cette étude (Inolivent-4) est équipé d'un mélangeur de gaz qui permet de modifier la FiO₂, une oxygénation normale et évitant toute hyperoxie serait donc simple à atteindre en pratique clinique.

La grande différence au niveau de l'oxygénation entre les deux groupes ne se traduit pas par des différents niveaux de PaCO₂. En effet, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les niveaux de PaCO₂ des deux groupes qui sont toujours restés à un niveau cliniquement acceptable. De plus, les valeurs de pH obtenues ne montrent pas de différence significative entre les deux traitements. Il est important de noter que la mécanique ventilatoire en VLT est très différente de celle de la VMC. Entre autre, la pression exercée par le prototype Inolivent-4 lors de l'expiration est négative ce qui a un fort impact sur le calcul de la pression moyenne des voies aériennes (Paw). En effet, la Paw en VLT (tableau 1 de l'article présenté dans ce mémoire) est de beaucoup inférieure à ce qu'on l'obtient en VMC lors des S-LBA. Comme le démontre la pression

moyenne des voies aériennes (Paw) plus basses, non seulement les résultats du groupe VLT sont meilleurs, mais ils ont été obtenus avec une pression ventilatoire nécessaire plus faible.

Le groupe S-LBA n'a eu aucun problème à retrouver des niveaux de PaPm comparable au baseline une heure après le traitement. La PaPm significativement supérieure dans le cas du groupe VLT est notre plus grande appréhension. Il est fort probable que cette PaPm augmentée soit directement liée aux grands volumes courants de liquide utilisés pour ce protocole. Comme d'autres l'ont déjà souligné, ces grands volumes courants mènent probablement à une augmentation de la pression intra-thoracique avec une augmentation subséquente de la pression exercée sur les capillaires intra-alvéolaires pulmonaires (CURTIS, 1991). Nous pensons qu'il sera possible de diminuer cette PaPm élevée en apportant des améliorations soit au prototype lui-même ou encore en modifiant certains paramètres ventilatoires utilisés. Le prototype sera sous peu en mesure d'effectuer des fréquences respiratoires plus importantes ce qui permettra la diminution des volumes courants en VLT sans modification de la ventilation minute. Aussi l'utilisation d'une PEEP plus faible en VLT sera testée afin de diminuer l'impact bien connu dans la littérature de la PEEP liquide sur la PaPm. Lors d'études suivantes visant l'implantation d'un contrôle en pression à l'inspiration qui aura lieu au courant des prochains mois ces différentes approches seront testées. Une des complications majeures attribuables à un SAM sévère est le développement de l'hypertension pulmonaire persistante. Le contrôle de celle-ci est un objectif important de toutes les nouvelles thérapies

proposées dans le cas d'un SAM. On note une augmentation de 50% de la PaPm et de la PVRI suite à l'induction du SAM dans les deux groupes. Cette augmentation tend à être supérieure dans le groupe VLT, cependant, il n'y a pas de différence significative. Malgré l'amélioration dramatique dans les échanges gazeux du groupe VLT, cette étude n'a pas montré une amélioration de la PaPm ou de la PVRI et ceci même suite aux 4 heures de VLT. Les autres paramètres hémodynamiques, dont le débit cardiaque, n'ont par contre pas été affectés. Cette absence d'amélioration a été décrite précédemment en VLT (FOUST *et al.*, 1996) (KUO *et al.*, 1998) mais aussi en VLP et est peut-être due à la compression des petits vaisseaux pulmonaires par les alvéoles remplies de PFC (LOWE et SHAFFER, 1986). De plus, l'amélioration des échanges gazeux dans les poumons contenant le PFC qui est décrit dans cette étude peut être expliquée par une combinaison de différents mécanismes incluant : une augmentation du recrutement alvéolaire, une meilleure compliance pulmonaire, une augmentation de la pression trans-alvéolaire dans la région dépendante du poumon se traduisant par une redistribution du flot sanguin vers la région non dépendante ou la lésion est moins sévère. Cette combinaison de mécanismes a été démontrée comme étant responsable de l'amélioration du ratio ventilation/perfusion en redistribuant régionalement de façon homogène le flot sanguin pulmonaire (FOUST *et al.*, 1996) (LOWE et SHAFFER, 1986) (UCHIDA *et al.*, 2000). Les autres paramètres hémodynamiques, dont le débit cardiaque, n'ont par contre pas été affectés.

En ce qui concerne la récupération du méconium, il y a une importante et significative différence entre les deux groupes. En effet, il est possible d'observer une grande quantité de méconium sortir avec le PFC lors de la TLV dans les 5 premières minutes du traitement. Comme le PFDEC n'est pas miscible avec l'eau et qu'il est très dense, il lave les poumons d'une manière à ce que des grandes quantités de méconium soient récupérées par le ventilateur liquidien. Il est probable que le simple poids du PFDEC aide fortement la récupération du méconium dans les zones dépendantes du poumon. Ce résultat était anticipé après seulement quelques expérimentations puisque le liquide récupéré lors des S-LBA contenait du méconium dilué. En diluant le méconium, il est fort probable qu'un S-LBA permette de récupérer une partie du méconium, cependant ce qui n'est pas récupéré se trouve à être distribué de façon homogène dans tout le poumon. Il est important de mentionner qu'il y a eu des pertes de méconium dans la tubulure du ventilateur liquidien avant le filtre, il y a donc eu plus de méconium retiré des poumons lors de la VLT que ce qui y a été récupéré. La fraction de méconium récupérée dans cette étude suite à la VLT est très près des meilleurs résultats obtenus par d'autres équipes qui utilisent un lavage thérapeutique avec des volumes de 15 mL/kg par aliquotes (DARGAVILLE *et al.*, 2003 et 2007). Une récupération rapide du méconium grâce à un lavage thérapeutique lors d'un SAM sévère se traduirait par une obstruction mécanique réduite des voies aériennes, un retour à une compliance normale des voies aériennes inférieures, une inactivation moins étendue du surfactant pulmonaire ainsi qu'une inflammation alvéolaire réduite. Cela aurait pour effet de restaurer

une mécanique respiratoire normale et possiblement de diminuer les séquelles à long terme dues à cette pathologie. On observe une différence nette entre les deux différentes techniques de lavages thérapeutiques présentées dans cette étude au niveau du temps de récupération de méconium. Par contre c'est la nature même de ces deux techniques qui est responsable de cette différence. En effet, les deux S-LBA consécutifs performés lors des manipulations ne permettent que de récupérer une partie des volumes de lavages (comprenant du méconium) et ce ponctuellement par aspiration endotrachéale alors qu'un VLT-LBA permet une récupération continue à chacune des expirations effectuées. Lors de l'étude clinique sur laquelle se base la technique de S-LBA qui fut utilisée (DARGAVILLE *et al.*, 2007), un nombre supérieur de lavages ou encore des plus grands volumes pour chacun des lavages étaient exclus pour traiter un SAM sévère ce qui réduit la quantité de méconium pouvant être retiré. En ce qui concerne la VLT, aucune limitation au niveau du temps de la procédure n'est avancée puisque celle-ci est bien tolérée et que le liquide utilisé permet une oxygénation importante et un retour rapide à une SaO₂ optimale. Il est donc, à notre avis, tout à fait raisonnable d'effectuer la comparaison entre les quantités de méconium retiré avec ces deux techniques. L'analyse des scores histologiques qui a été effectuée sur les tissus pulmonaires des agneaux des deux groupes ne reflète pas les différences obtenues au niveau de l'oxygénation. Il est probable qu'un protocole de 4 heures de ventilation soit trop court pour être en mesure de discerner des changements clairs au niveau du profil d'inflammation des poumons. Cependant il est possible d'observer une

différence marquée au niveau des photomicrographies présentées à la figure 3, notamment au niveau de la présence de dépôt de méconium beaucoup plus marquée dans le cas du group S-LBA. Le phénomène de surdistension est observable en ce qui concerne le groupe VLT comme dans plusieurs autres études (ONASANYA *et al.*, 2001) (HUMMLER *et al.*, 2001). Les scores histologiques pour le groupe S-BAL sont comparables aux valeurs trouvées dans la littérature.

Conclusion et perspectives

En conclusion, notre étude a démontré qu'un VLT-LBA effectué avec le prototype Inolivent 4 était mieux toléré et aussi plus efficace qu'un lavage bronchoalvéolaire effectué avec une dilution de surfactant exogène dans un modèle néonatal ovin de SAM sévère. Elle souligne la nécessité de modifier certains paramètres de la VLT tel que le volume courant ainsi que la fréquence respiratoire utilisés afin de diminuer ses effets sur la PaPm. Ces expérimentations nous ont également permis de noter le besoin de mettre sur pied une procédure de sevrage suite à une VLT. Cette étude ouvre la voie à une éventuelle étude clinique avec le VLT-LBA comme traitement d'un SAM sévère.

Remerciements

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Hervé Walti, qui m'a permis d'intégrer l'équipe Inolivent et de participer au projet conjoint avec les étudiants de la faculté de génie mécanique de l'Université de Sherbrooke sous la direction du Pr Philippe Micheau. Je n'aurais pu entreprendre un tel projet sans le soutien et l'aide de ces deux mentors ainsi que le travail qu'ils ont réalisé depuis plusieurs années. Un énorme merci à Raymond Robert qui a non seulement participé à la conception, la fabrication et l'amélioration du ventilateur liquidien mais aussi parce qu'il m'a supporté et aidé à démarrer lors de mon arrivée. Je voudrais aussi remercier Dominick Bossé, Benoît Beaudry et Alexandre Beaulieu pour l'aide qu'ils m'ont apporté pour les nombreuses expérimentations. Plusieurs stagiaires en génie mécanique ont aussi donné de leur temps afin d'aider à faire avancer le projet dont Jael Marchand et Mathieu Nadeau. Un merci tout particulier au Dr Roula Albadine qui a effectué les analyses histologiques pour notre étude. Je tiens également à remercier le Dr Jean-Paul Praud et toute son équipe (Nathalie Samson, Jean-Philippe Gagné, Charles Duvareille, Marie St-Hilaire) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à mon arrivée et m'avoir permis de me familiariser avec certains éléments essentiels à la réussite de ma maîtrise.

Personnellement, je veux remercier mes parents, Simone et Clermont, ainsi que mon frère et ma sœur, Jean-François et Marie-Pierre, qui m'ont supporté et encouragé tout le long de mes études.

Liste des références

Aly H. Respiratory Disorders in the Newborn ; Identification and Diagnosis. Pediatrics in Review 2004; 25: 201-208.

Barrington K, Singh A J, Etches P C, Finer N N; Partial liquid ventilation with and without inhaled nitric oxide in a newborn piglet model of meconium aspiration. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1922-1927.

Chappell S E, Wolfson M R, Shaffer Thomas S; A comparison of surfactant delivery with conventional mechanical ventilation and partial liquid ventilation in meconium aspiration injury. Respiratory Medecine 2001; 95: 612-617.

Co E, Vidyasagar D; Meconium aspiration syndrome. Compr Ther 1990; 16: 34-9.

Cox CA, Fox WW, Weiss CM, Wolfson MR, Shaffer TH ; Liquid ventilation: Gas exchange, perfluorochemical uptake, and biodistribution in an acute lung injury. Pediatr Crit Care Med 2002; 3(3): 288-296.

Curtis S E; Perfluorocarbon-associated gas exchange: a hybrid approach to mechanical ventilation. Crit Care Med. 1991; 19: 600-601.

Dargaville Peter A, Copnell B; The epidemiology of meconium aspiration syndrome: Incidence, risk factors, therapies, and outcome. Pediatrics 2006; 117(5): 1712-1721.

Dargaville P A, Mills J F, Bevan M H, Chan Y, Coleman L, Loughnan P M, Morley C J;
Therapeutic lung lavage in the piglet model of meconium aspiration syndrome. *Am J
Respir Crit Care Med* 2003; 168: 456-463.

Dargaville P, Mills J F, Copnell B, Loughnan P, Tingay DG, McDougall P, Morley C J;
Therapeutic lung lavage in meconium aspiration syndrome: a preliminary report.
Journal of Paediatrics and Child Health 2007; 43: 539-545.

Dargaville Peter A, Mills J F; Surfactant therapy for meconium aspiration syndrome.
Drugs 2005; 65: 2569-2591.

Davey AM, Becker JD, Davis JM; Meconium aspiration syndrome: Physiologic and
inflammatory changes in a newborn pig model. *Pediatr Pulmonol* 1993; 16: 101-108.

Foust R, Tran N N, Cox C, Miller T F, Greenspan J S, Wolfson M R, Shaffer T H; Liquid
Assisted Ventilation: An Alternative Ventilatory Strategy for Acute Meconium
Aspiration Injury. *Pediatric Pulmonol* 1996; 21 :316-322.

Fugikura T, Klionsky B. The significance of meconium staining. *Am J Obstet Gynecol*
1975; 121: 45-50.

Gastiasoro-Cuesta E , Alvarez-Díaz J F, Arnaiz-Renedo A, Fernández-Ruanova B,
López-de-Heredia-Y-Goya J, Román-Etxebarria L, Alfonso-Sánchez L F, Valls-i-Soler
A; The cardiovascular effects of partial liquid ventilation in newborn lambs after
experimental meconium aspiration. *Pediatr Critical Care Med* 2001; 2(4): 334-339.

- Gouyon JB, Ribakovsky C, Ferdynus C, et al.; Severe respiratory disorders in term neonates. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 22 (1): 22-30
- Hummler H D, Thome U, Schulze A, Schnabel R, Pohlandt F, Frank A R; Spontaneous breathing during partial liquid ventilation in animals with meconium aspiration. *Pediatric Res* 2001; 49: 572-580.
- Harries J T. Meconium in health and disease. *British medical bulletin* 1978; 34(1): 75-78.
- Jeng M-J, Soong W-J, Lee Y-S, Chang H-L, Shen C-M, Wang C-H, Yang S-S, Betau H; Effects of therapeutic bronchoalveolar lavage and partial liquid ventilation on meconium-aspirated newborn piglets. *Critical Care Med* 2006; 34: 1099-1105.
- Jeng M-Y, Soong W-J, Lee Y-S; Effective Lavage Volume of Diluted Surfactant Improves the Outcome of Meconium Aspiration Syndrome in Newborn Piglets. *Pediatr Res* 2009; 66:107-112.
- Kuo CY, Hsueh C, Wang CR; Liquid ventilation for treatment of meconium aspiration syndrome in a piglet model. *J Formos Med Assoc* 1998; 97: 392-399.
- Lebon J; Conséquences hémodynamiques de l'application de la Ventilation Liquidiennne Totale (VLT) dans un modèle expérimental de syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) chez l'agneau nouveau-né. Mémoire de maîtrise, Physiologie et biophysique, Université de Sherbrooke, 2007.
- Lowe C A, Shaffer T H; Pulmonary vascular resistance in the fluorocarbon-filled lung. *J Appl Physiol* 1986; 60: 154-159.

- Mathews TG, Warshaw JB. Relevance of the gestational age distribution of meconium passage in utero. *Pediatrics* 1979; 64: 30-31.
- Miller FC, Read JA. Intrapartum assessment of the postdate fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141: 516-20.
- Mitchell J, Schulman H, Fleischer A, Farmakides G, Nadeau D. Meconium aspiration and fetal acidosis. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 352-355.
- Moses D, Holm BA, Spitale P, et al; Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 477-481.
- Nakamura T, Matsuzawa S, Sugiura M, Tamura M; A randomised control study of partial liquid ventilation after airway lavage with exogenous surfactant in a meconium aspiration syndrome animal model. *Arch Dis Child Fetal and Neonatal Edition* 2000; 82: 160-162.
- Onasanya B I, Rais-Bahrami K, Rivera O, Seale W R, Short B L; The use of intratracheal pulmonary ventilation and partial liquid ventilation in newborn piglets with meconium aspiration syndrome. *Pediatr Critical Care Med* 2001; 2: 69-73.
- Park K, Bae C, Chung S; In vitro effects of meconium on the physical surface properties and morphology of exogenous pulmonary surfactant. *J Korean Med Sci* 1996; 11: 429-436.
- Radhakrishnan RS, Lally PA, Lally KP, Cox CS; ECMO for meconium aspiration syndrome: support for relaxed entry criteria. *ASAIO J* 2007; 53: 489-491.

Robert R, Micheau P, Avoine O, Beaudry B, Beaulieu A, Walti H; A Regulator for Pressure Controlled Total Liquid Ventilation. IEEE (online), 2009.

Robert R, Micheau P, Cyr S, Lesur O, Praud JP, Walti H; A prototype of volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. ASAIO J. 2006; 52: 638-645.

Robert R, Micheau P, Walti H; A supervisor for volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. Biomedical Signal Processing and Control. 2007; 2: 267-274.

Shaffer TH, Lowe CA, Bhutani VK, Douglas PR; Liquid ventilation: Effect on pulmonary function in distressed meconium-stained lambs. Pediatr Res 1984; 18: 47.

Shaffer TH, Wolfson MR, Greenspan JS, et al; Liquid ventilation in premature lambs: Uptake, biodistribution and elimination of perfluorodecalin liquid. Reprod Fertil Dev 1996; 8: 409-416.

Sriram S, Wall SN, Khoshnood B, Singh JK, Hsieh HL, Lee KS; Racial disparity in meconium-stained amniotic fluid and meconium aspiration syndrome in the United States 1989-2000. Obstet Gynecol 2003; 102(6): 1262-1268.

Starks GC. Correlation of meconium-stained amniotic fluid, early intrapartum fetal pH, and Apgar scores as predictors of perinatal outcome. Obstet Gynecol 1980;56: 604-609.

Uchida T, Yokoyama K, Nakazawa K, Makita K; Inhaled nitric oxide during partial liquid ventilation shifts pulmonary blood flow to the non-dependent lung regions. *Intensive Care Med* 2000; 26: 764-769.

Wiswell TE, Knight GR, Finer NN, Donn SM, Desai H, Walsh WF, et al.; A multicenter, randomized, controlled trial comparing Surfaxin (Lucinactant) lavage with standard care for treatment of meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 2002; 109: 1081–1087.

Wolfson M R, Hirschl R B, Jackson J C, Gauvin F, Foley D S, Lamm W J E, Gaughan J, Shaffer T H; Multicenter comparative study of conventional mechanical gas ventilation to tidal liquid ventilation in oleic acid injured sheep. *ASAIO journal* 2008; 54(3): 256-69.

Wolfson M R, Shaffer T H; Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatr Respir Rev* 2005; 6(2): 117-127.