



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze del Farmaco, Sezione di Biochimica

Dottorato di Ricerca in Scienze Microbiologiche e Biochimiche

XXVI Ciclo

***RUOLO DELLO STRESS OSSIDATIVO E DELL'INFIAMMAZIONE IN UN MODELLO
ANIMALE DI ARRESTO CARDIACO***

Tutor:

Prof.ssa Rosaria Acquaviva

Candidato:

Dott.ssa Anna Nicolosi

Anno accademico 2013/2014

INDICE

CAPITOLO I

Arresto Cardiaco.....	Pagina 3
Epidemiologia.....	Pagina 4
Eziologia.....	Pagina 5
Fisiopatologia.....	Pagina 6
Sindrome post rianimazione.....	Pagina 8
Disfunzione miocardica.....	Pagina 8
Danno cerebrale.....	Pagina 11
Risposta sistemica all'ischemia/riperfusione.....	Pagina 13

CAPITOLO II

Scopo del lavoro.....	Pagina 15
-----------------------	-----------

CAPITOLO III

Materiali e Metodi.....	Pagina 16
-------------------------	-----------

CAPITOLO IV

Risultati.....	Pagina 24
----------------	-----------

CAPITOLO V

Discussione.....	Pagina 42
------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	Pagina 47
--------------------------	------------------

ABSTRACT

L'arresto cardiocircolatorio è un evento improvviso, caratterizzato dalla cessazione dell'attività cardiaca e respiratoria, e da una rapida perdita di coscienza a seguito della conseguente interruzione della perfusione cerebrale. Lo scopo dello studio è stato la valutazione parametri di funzionalità cardiaca ed il rilascio di mediatori di stress e dell'infiammazione in un modello animale di arresto cardiaco. I nostri dati dimostrano l'aumentano della perossidazione lipidica (isoprostani ed LOOH) e dello danno ossidativo del DNA nel miocardio dopo 2h e 4h dall'arresto cardiaco. Simili risultati sono stati ottenuti nel rene, fegato e cervello. In particolare, nella zona CA1 dell'ippocampo abbiamo osservato una significativa perdita di neuroni ed una astrogliosi reattiva. In conclusione i nostri dati dimostrano che i livelli plasmatici e tissutali dei paprametri dello stress ossidativo sono temporaneamente alterati durante il periodo successivo alla rianimazione e correlano con l'alterata funzione cardiaca.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Arresto cardiaco

L'arresto cardiocircolatorio è un evento improvviso, caratterizzato dalla cessazione dell'attività cardiaca e respiratoria, e da una rapida perdita di coscienza a seguito della conseguente interruzione della perfusione cerebrale [1].

L'arresto cardiaco è potenzialmente reversibile, se le manovre di rianimazione cardiopolmonare (RCP) sono intraprese rapidamente [2, 3]. Le manovre di supporto vitale di base (BLS), che includono il massaggio cardiaco esterno e la ventilazione, hanno lo scopo di vicariare le funzioni cardiache e respiratorie nel soggetto in arresto cardiaco. In questo modo si riesce, sebbene in maniera minimale, a mantenere un livello basale di perfusione cardiaca e cerebrale e quindi a ritardare i danni neurologici [3, 4].

Il successo della RCP è determinato dal rapido riconoscimento dell'assenza di polso e dal precoce inizio del BLS [3, 4] e della defibrillazione dei ritmi defibrillabili, seguiti dal supporto vitale avanzato (ALS), che vede l'aggiunta di trattamenti farmacologici [5-9].

Nel 1991 è stato introdotto a livello internazionale il concetto di "*catena della sopravvivenza*"[6], al fine di organizzare, stabilire le priorità e rendere più efficace il soccorso dei soggetti in arresto cardiaco. Inizialmente, questo sistema comprendeva quattro anelli: 1) attivazione rapida del sistema di soccorso; 2) BLS precoce; 3) defibrillazione precoce; e 4) ALS precoce. Negli ultimi anni, un quinto anello è stato introdotto nella catena, la "*cura del paziente dopo rianimazione*" [7, 10]. Tra i vari interventi *stressati* in quest'ultimo anello, l'ipotermia terapeutica è l'unico che ha dato e continua a dare risultati sicuri e consolidati nel miglioramento dell'esito dell'arresto cardiaco[10].

Epidemiologia

L'arresto cardiaco extraospedaliero si manifesta con una incidenza di circa 60.000 casi/anno in Italia, 700.000/anno in Europa e 400.000/anno negli Stati Uniti d'America [8, 11]. Di questi, circa il 70% avviene tra le mura domestiche ed il 30% in luoghi pubblici. La popolazione maggiormente interessata dall'arresto cardiaco è quella sopra i 45 anni e che presenta fattori di rischio per la patologia (Tabella 1). Gli uomini sono più colpiti rispetto alle donne, ma sopra i 50 anni si raggiunge la parità.

Fattori di rischio per arresto cardiaco	
<ul style="list-style-type: none">• Sesso maschile• Patologie cardiovascolari• Diabete mellito• Dislipidemie	<ul style="list-style-type: none">• Obesità e sovrappeso• Storia familiare• Fumo di sigaretta• Stress

Tabella 1. Fattori di rischio per arresto cardiaco

La percentuale di pazienti rianimati dall'arresto cardiaco che sopravvivono fino alla dimissione ospedaliera è molto variabile, da 0% al 46% [12-15]. Le principali cause di mortalità intraospedaliera dopo rianimazione da arresto cardiaco sono riportate in tabella 2.

CAUSE DI MORTALITA' OSPEDALIERA DOPO RIANIMAZIONE	
Ipotensione refrattaria	44 %
Aritmie fatali	31 %
Cause neurologiche	25 %

Tabella 2. Principali cause di morte intraospedaliera dopo rianimazione da arresto cardiaco

Eziologia

Le cause di arresto cardiocircolatorio sono distinte in: cardiache (90%) e non cardiache (10%). La cardiopatia ischemica rappresenta la principale tra le cause cardiache, presente nel 70% dei pazienti (Tabella 3). Le cause non cardiache comprendono, invece, situazioni legate a gravi disturbi respiratori, neurologici, tossici ed eventi traumatici (Tabella 4) [16].

Cause cardiache di arresto cardiocircolatorio	
• Cardiopatia ischemica	} 70%
• Cardiopatia ipertensiva	} 30%
• Cardiopatie congenite (tetralogia di Fallot, stenosi valvolari di grado avanzato, difetti settali)	
• Valvulopatie (stenosi aortica, prolasso mitralico, endocarditi)	
• Miocardiopatie (ostruttive, miocarditi, sclerodermia, tumori)	
• Cardiopatie aritmogene	
• Malattie del pericardio (tamponamento cardiaco)	
• Origine vascolare (dissezione aortica, embolia polmonare massiva, rottura di aneurisma dell'aorta)	
• Emorragie importanti	

Tabella 3. Cause cardiache di arresto cardiocircolatorio.

Cause non cardiache di arresto cardiocircolatorio
<ul style="list-style-type: none"> • Respiratorie (ostruzione acuta delle vie aeree da corpo estraneo o caduta indietro della lingua nel soggetto non cosciente; pneumotorace ipertensivo; gravi crisi asmatiche) • Tossiche (overdose da oppiacei) • Neurologiche (ictus, tumori con compressione bulbare, emorragie subaracnoidee, crisi epilettiche) • Traumatiche (traumi cerebrali e spinali, elettrocuzione e folgorazione, annegamento)

Tabella 4. Cause non cardiache di arresto cardiocircolatorio.

Fisiopatologia

L'arresto cardiaco è caratterizzato, oltre che dall'assenza di polso, anche da tracciati elettrocardiografici di presentazione peculiari, convenzionalmente divisi in: "defibrillabili", se indicano un intervento di defibrillazione elettrica, e tra questi vi sono la fibrillazione ventricolare (FV) e la tachicardia ventricolare (TV) senza polso; e non "defibrillabili", se non indicano defibrillazione, e tra questi vi sono l'attività elettrica senza polso (PEA) e l'asistolia [16, 17].

La fibrillazione ventricolare è un'aritmia caratterizzata da un'attività contrattile caotica dei cardiomiociti, che si eccitano in maniera scoordinata ad alta frequenza (anche più di 400 battiti/minuto), impedendo la contrazione del muscolo cardiaco e di conseguenza la sua funzione di pompa. All'ECG si osservano delle oscillazioni disordinate con forma ed ampiezza irregolare ed assenza di complessi QRS, segmenti ST ed onde T [17].

La tachicardia ventricolare senza polso, all'ECG si caratterizza per la presenza di QRS larghi e ad alta frequenza, (> 180 per minuto), riferibili a rimo ectopico ventricolare.

La fibrillazione ventricolare e la tachicardia ventricolare senza polso non regrediscono spontaneamente, ma necessitano di essere interrotti dalla defibrillazione elettrica. Inoltre, per via dell'attività intensa dei cardiomiociti, questi ritmi oltre ad interrompere il flusso coronarico,

aumentano notevolmente il consumo miocardico di ossigeno, portando verso un danno cellulare irreversibile. Per questi motivi la defibrillazione elettrica, l'unico intervento in grado di *terminare* la FV e la TV senza polso, va eseguita il più rapidamente possibile [18-20]. Per ogni minuto di FV non trattato la probabilità di reversibilità si riduce del 7-10% [20, 21].

L'attività elettrica senza polso è una situazione di assenza di attività contrattile cardiaca, pur in presenza di un tracciato elettrocardiografico, di solito caratterizzato da complessi QRS larghi.

L'asistolia è sinonimo di assenza di attività elettrica, oltre che contrattile; all'ECG si osserva una linea isoelettrica con qualche piccola deflessione (inferiore al millimetro) [16].

L'assenza di contrazione cardiaca interrompe anche il circolo ematico sistemico ed il respiro, portando ad uno stato di ipossia cellulare che interessa tutti gli organi, e maggiormente il sistema nervoso centrale. Il cervello, infatti, è l'organo più vulnerabile in caso di arresto cardiaco; i neuroni corticali, in particolare, vanno incontro a processi di apoptosi e necrosi cellulare dopo appena 4-5 minuti di assenza di ossigeno [22]. Durante l'ischemia le scorte energetiche cellulari (ATP, glucosio, fosfocreatina, glicogeno) vengono deplete rapidamente, in meno di tre minuti. Tale assenza di fonti energetiche conduce al blocco della pompa Na^+/K^+ e alla perdita della selettività di membrana, con alterazione dei flussi ionici. Successivamente compare la decompartmentazione dello ione calcio (Ca^{2+}) intracellulare, che viene rilasciato dal reticolo endoplasmatico e dai mitocondri, riversandosi nel citoplasma e attivando numerose vie enzimatiche come quelle delle fosfolipasi e delle caspasi, che in ultimo conducono alla morte cellulare [23].

Sindrome da post rianimazione

Negli ultimi 50 anni si sono compiuti molti sforzi per aumentare il successo iniziale delle manovre di rianimazione, inteso come “ritorno della circolazione spontanea” (ROSC), mentre si è posta meno attenzione sulla sopravvivenza a lungo termine dei soggetti rianimati [23].

La percentuale di pazienti in arresto cardiaco che raggiunge ROSC varia da poco meno del 2% fino al 39% [24]. Tale variabilità dipende dall'efficienza e dalla solidità della “catena della sopravvivenza” locale. Tuttavia più del 70% degli arresti cardiaci rianimati muore prima della dimissione dall'ospedale, e la maggior parte entro le prime 72 ore dal ROSC [25].

Dopo ROSC, infatti, si osserva quella condizione fisiopatologica detta “*sindrome da post rianimazione*”, che include vari aspetti, i più importanti dei quali sono: 1) la disfunzione miocardica; 2) il danno cerebrale; e 3) la risposta sistemica all'ischemia/riperfusionazione [10, 23, 26].

Disfunzione miocardica

La disfunzione cardiaca post rianimazione può essere osservata già mezz'ora dopo ROSC. È caratterizzata da ridotta contrattilità miocardica, ipotensione arteriosa e da aritmie cardiache [10, 23, 26, 27], alle quali contribuiscono anche gli alti livelli ematici di catecolamine circolanti rilasciate dall'organismo dopo ROSC. Durante questo periodo la perfusione coronarica non è ridotta, e la disfunzione contrattile, il cosiddetto *stunning miocardico*, è un fenomeno reversibile. Questa situazione infatti è di solito transitoria e responsiva alla terapia in 24-48 ore [10, 23, 26, 27].

In seguito a rianimazione e ripresa della circolazione spontanea, il tessuto miocardico è soggetto a cambiamenti biochimici e metabolici, che conducono alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), all'attivazione di processi di infiammazione e all'incremento di ione calcio intracellulare. Tutti questi processi mediano, insieme, il danno e la morte dei cardiomiociti e la gravità della disfunzione miocardica post rianimazione [23, 26, 28].

I ROS, prodotti dalle cellule endoteliali, dai neutrofilo e dai cardiomiociti, mediano il danno miocardico attivando il canale mitocondriale PTP (*permeability transition pore*), che permette il rilascio del citocromo C e l'attivazione di vie apoptotiche [29-34]. I ROS causano anche la perossidazione delle membrane fosfolipidiche e di molte proteine di membrana. Inoltre, il canale PTP attivo funziona da molecola chemoattrattiva per cellule infiammatorie come neutrofilo e polimorfonucleati, scatenando una risposta infiammatoria locale. La concomitante upregolazione di molecole di adesione cellulare, come P-selettina ed ICAM-1, facilita ulteriormente la migrazione dei neutrofilo nel tessuto miocardico. Questi partecipano al danno cellulare del cardiomiocita attraverso rilascio di enzimi proteolitici, collagenasi, ulteriore generazione di ROS e altri mediatori proinfiammatori, come interleuchina-1 β , interleuchina-6 e interleuchina-8 [34]. I neutrofilo possono contribuire alla morte dei cardiomiociti anche indirettamente mediante altri meccanismi, quali l'embolizzazione del microcircolo, che può contribuire al fenomeno del "non reflusso" dopo ROSC [28, 35]. Ciò causa ischemia secondaria dovuta ad alterazione del microcircolo, allungando quindi lo stato ischemico cellulare anche nella fase di ri-perfusione, quando il macrocircolo invece è tornato ad una condizione quasi fisiologica [28, 36, 37]. In questo fenomeno svolge un ruolo importante anche l'inibizione dell'ossido nitrico sintasi (NOS) da parte dei ROS, con conseguente diminuzione della produzione di ossido nitrico (NO), un importante regolatore del tono vascolare nel microcircolo [38-40].

La combinazione di FV ed assenza di flusso coronarico causa l'attivazione del metabolismo anaerobico, conducendo ad una rapida ed intensa acidosi intracellulare. Questa attiva lo scambiatore Na⁺/H⁺ del sarcolemma, isoforma 1 (NHE-1), che inizia ad importare Na⁺ all'interno della cellula, con uno scambio Na⁺-H⁺ elettroneutro. La ri-perfusione elimina gli H⁺ extracellulari, accumulatisi durante il precedente periodo di assenza di flusso, causando un aumento dell'attività dello scambiatore Na⁺/H⁺ del sarcolemma che si traduce in un maggiore ingresso di Na⁺. Lo ione Na⁺ può

entrare nella cellula anche attraverso canali specifici o lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. L'aumento del flusso citosolico di Na^+ è favorito dalla diminuzione dell'attività della pompa Na^+/K^+ , così che l'ingresso di sodio e la sua concentrazione aumentano sempre più. L'eccesso di Na^+ citosolico, a sua volta, causa il rilascio del Ca^{2+} citoplasmatico, invertendo il funzionamento dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, con conseguente sovraccarico citoplasmatico di ioni calcio [33, 41]. Il sovraccarico di Ca^{2+} citosolico durante ischemia e riperfusione è stato indicato come fattore principale del danno mitocondriale. I mitocondri possono sequestrare grandi quantità di Ca^{2+} citosolico, un processo che viene regolato da un uniporto di Ca^{2+} , per l'influsso, e dallo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, per l'efflusso. Di conseguenza, se il livello di ione calcio citoplasmatico aumenta progressivamente, il trasportatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriale si satura e ciò causa il sovraccarico mitocondriale di Ca^{2+} . Questo fenomeno peggiora il danno cellulare, sia compromettendo la capacità di effettuare la fosforilazione ossidativa, che favorendo il rilascio di fattori proapoptotici come il citocromo C [33].

Gli ioni calcio occupano un ruolo fondamentale nell'accoppiamento eccitazione/contrazione dei cardiomiociti. Livelli anormali di ioni calcio citoplasmatico svolgono, quindi, un ruolo determinante nella gravità della disfunzione contrattile e delle aritmie osservate dopo ROSC [34].

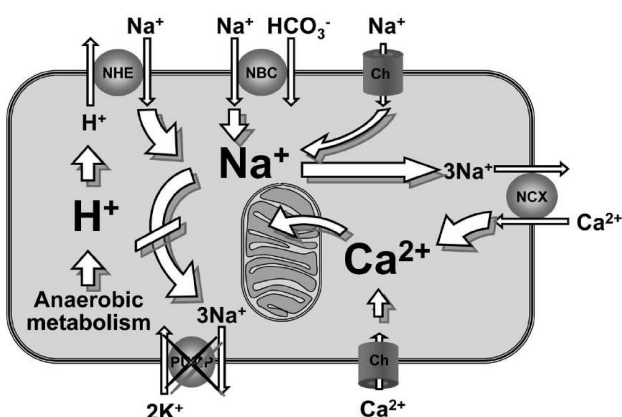


Figura 1. Rappresentazione schematica di un cardiomiocita durante ischemia e riperfusione. Si osserva il sovraccarico di calcio citosolico e mitocondriale indotto da Na^+ . NHE= Na^+/H^+ ; NBC= scambiatore $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; NCX= scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; Ch= canale. Per gentile concessione del dottor Ayoub.

Danno cerebrale

Il cervello è un organo particolarmente delicato, con una scarsissima tolleranza all'ischemia ed una risposta peculiare alla ri-perfusione. Le aree cerebrali più suscettibili all'ischemia sono l'ippocampo, la corteccia cerebrale, il cervelletto, il corpo striato ed il talamo [42]. L'entità del danno, che è visibile già da poche ore fino a giorni dopo ROSC, dipende da vari fattori, come la durata delle fasi di arresto cardiaco "non trattato" e dell'RCP, caratterizzate rispettivamente dall'assenza totale del flusso ematico e da ipoperfusione tissutale [42-44]. Anche l'età del paziente e la presenza di comorbidità influiscono sulla gravità del danno ischemico.

Il quadro clinico del danno neurologico post rianimazione presenta differenti gradi di gravità, andando dalla presenza di attacchi epilettici, mioclonie, deficit di memoria, fino al coma e alla morte cerebrale. Il coma, in particolare, è molto comune nella fase acuta del danno neurologico post rianimazione. Si tratta di uno stato di incoscienza non responsivo a stimoli, ed è conseguenza della disfunzione globale di tutte le aree responsabili dell'*arousal* e dell'attenzione (la formazione reticolare ascendente, il ponte, il mesencefalo, il diencefalo e la corteccia). Più nello specifico, un danno diencefalico e del tronco cerebrale conduce ad uno stato vegetativo, con il mantenimento dei cicli sonno-veglia, ma una totale mancanza di attenzione e percezione di sé e dello spazio. La vulnerabilità corticale, invece, porta molti pazienti a riacquistare lo stato di attenzione ma accusare severi disturbi neurologici, mioclonie ed attacchi epilettici. Infine, i disturbi motori e di coordinazione sono causati da danni alle aree motorie della corteccia, ai gangli della base o al cervelletto [23, 26, 42-44].

I meccanismi coinvolti nel danno cerebrale sono innumerevoli e complicati, tra questi l'eccitotossicità, l'alterata omeostasi dello ione calcio, la formazione di ROS e l'attivazione dei processi di apoptosi e necrosi cellulare sono i più importanti [42, 44] (figura 3). Nella fase di ischemia si verifica una depolarizzazione cellulare generalizzata con il conseguente rilascio di glutammato, un neurotrasmettitore eccitatorio che regola anche i canali dello ione calcio.

L'incremento dello ione calcio a livello intracellulare, come descritto precedentemente, attiva molti processi cellulari tra i quali la liberazione del citocromo C rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma, che determina l'attivazione della cascata apoptotica, e l'instaurarsi di processi di nitrosilazione/ossidazione delle proteine della membrana plasmatica, alterandone la permeabilità [45-47]. Il danno da ischemia si amplifica ulteriormente dopo la riperfusione a causa dell'attivazione di citochine proinfiammatorie con reclutamento di neutrofili, i quali a loro volta

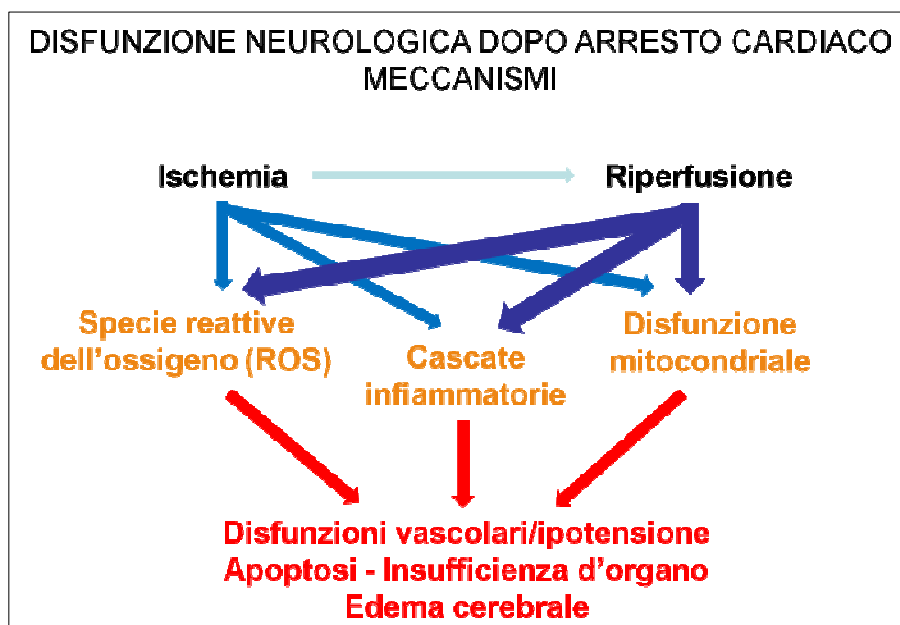


Figura 2. Principali effetti dell'ischemia e della successiva riperfusione nella generazione di danno cerebrale.

mantengono ed aggravano il danno ossidativo [42, 44].

Un arresto cardiaco prolungato, inoltre, può portare ad alterazioni trombotiche nel microcircolo cerebrale e ciò può compromettere la completa riperfusione di certe aree e causare il prolungamento dell'ischemia tissutale in seguito alla ripresa del circolo. Ciò è particolarmente evidente anche a dispetto di pressioni di perfusione cerebrale adeguate, spesso accompagnate da un macrocircolo iperemico a causa della compromissione dei sistemi cerebrovascolari di autoregolazione [22, 35, 37, 42, 44].

Una conseguenza importante del danno da ri-perfusione è l'alterazione della secrezione di molti ormoni, che influenzano negativamente anche il sistema cardiocircolatorio. I livelli di catecolamine, in particolare di adrenalina e noradrenalina, aumentano sia durante l'arresto del circolo che dopo ROSC. L'incremento massimo della secrezione di tali catecolamine si ha nelle prime ore dopo ROSC con un valore di picco nei primi minuti [48].

Un'ulteriore conseguenza della ri-perfusione è la presenza di edema cerebrale dopo ROSC. L'ischemia cerebrale, infatti, causa lo sviluppo di ipertensione endocranica, che compromette la perfusione cerebrale, aggravando ulteriormente il danno neurologico. Soprattutto l'edema che compare tardivamente, ore o giorni dopo la rianimazione, è associato ad una peggiore prognosi [23, 49].

Altri fattori che possono aggravare il danno neurologico dopo arresto cardiaco sono l'ipertermia, l'iperglicemia e gli attacchi epilettici [10, 23, 50]. Diversi studi hanno dimostrato, in particolare, che temperature superiori ai 37°C dopo ROSC sono associate ad un aumento di danni cerebrali permanenti, mentre una temperatura controllata o una moderata ipotermia possono migliorare notevolmente la prognosi [10, 23, 50].

Risposta sistemica all'ischemia/ri-perfusione

Durante l'arresto cardiaco lo scambio di ossigeno e di metaboliti tra sangue e tessuti è bruscamente interrotto. L'RCP risolve solo parzialmente il problema, dato che la gittata cardiaca generata da tali manovre è appena il 30% di quella fisiologica [36]. La carenza di ossigeno può perdurare anche dopo ROSC, a causa della disfunzione cardiaca dopo rianimazione, che conduce ad ipotensione arteriosa e riduzione del microcircolo tissutale [27, 51].

L'arresto cardiaco e l'RCP conducono ad una condizione molto simile a quella che si può riscontrare nei pazienti in sepsi [23, 52, 53]. L'ischemia e la ri-perfusione causano, infatti,

un'attivazione dell'endotelio a livello sistemico, e quindi una risposta immunitaria generalizzata, che a sua volta può portare ad insufficienza multiorgano e alla morte.

Già 3 ore dopo l'arresto, la concentrazione ematica di citochine, recettori solubili, prostaglandine, leucotrieni, trombossiani, aumenta, e vengono espresse molecole di adesione solubili ed endoteliali come P- ed E-selettine, segno di attivazione endoteliale e leucocitaria [34, 53].

La concomitante attivazione della cascata della coagulazione senza un adeguato aumento della fibrinolisi causa anche la formazione di microtrombi e fibrina disseminati in tutto il microcircolo, e questo rappresenta uno dei meccanismi alla base dei problemi di riperfusione dopo rianimazione.

Lo stress della riperfusione determina inoltre un'aumentata attività surrenalica. Tuttavia, nonostante in molti pazienti si osservi un aumento di cortisolo nel sangue, è comune una diminuita risposta alle corticotropine [52, 54].

Questa situazione causa sofferenze e/o danni a vari organi oltre al cuore ed al cervello. Ad esempio, si osserva una sofferenza epatica che si manifesta con un incremento dell'ammoniemia, AST e ALT entro 72 ore dall'arresto [54, 55]. Un danno renale è presente nel 30% dei pazienti rianimati dall'arresto cardiaco, ed esiste una stretta correlazione tra la durata della RCP e l'uso di vasopressori con l'entità della perdita della funzionalità renale [55].

Tutti questi fenomeni sono reversibili a seguito di un adeguato trattamento mirato se iniziato tempestivamente.

CAPITOLO II

Scopo del Lavoro

Obiettivo principale dello studio è stato la valutazione parametri di funzionalità cardiaca ed il rilascio di mediatori di stress e dell'infiammazione in un modello animale di arresto cardiaco. È stata in particolare valutata la perossidazione lipidica, il danno ossidativo a carico del DNA e come tali parametri correlino con la funzionalità cardiaca.

La ricerca si è articolata pertanto nei seguenti punti:

- Analisi della funzione cardiaca al baseline ed a diversi intervalli di tempo dopo arresto cardiaco
- Analisi dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria nel tessuto miocardico conseguente all'arresto cardiaco;
- Correlazione dei parametri di stress ossidativo con la funzione cardiaca
- Valutazione anatomopatologica del danno cardiaco post arresto
- Analisi dello stress ossidativo, infiammazione ed alterazioni anatomopatologiche in altri organi che potrebbero essere interessati da un eventuale danno da ischemia/riperfusion e a seguito della ROSC

CAPITOLO III

MATERIALI E METODI

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando un modello consolidato di arresto cardiaco e rianimazione cardiopolmonare nel ratto.

Tutti gli animali sono stati trattati secondo i “*Principles of Laboratory Animal Care*” formulati dalla *Società Americana per la Ricerca Medica* e dal *National Institutes of Health*. Tutti i protocolli sono stati approvati dall’*Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri” di Milano (Italia)*.

Modello animale di arresto cardiaco

Ratti Sprague Dawley (n=22) sono stati tenuti a digiuno durante la notte precedente la sperimentazione, ad eccezione dell’assunzione di acqua. L’anestesia è stata indotta con somministrazione intramuscolare di ketamina (20 mg/kg) e continuata con la somministrazione di pentobarbitale sodico (30 mg/kg). Il mantenimento è stato effettuato con richiami di pentobarbitale sodico (8 mg/kg).

Gli animali sono stati intubati endotrachealmente e ventilati meccanicamente con un ventilatore a volume controllato (MA-1, Puritan-Bennett, Carlsbad, CA), con un volume corrente di 15 mL/kg, flusso massimo 40 L/min e FiO₂ di 0,21. L’end-tidal PCO₂ (ETCO₂) è stato monitorato con un capnometro a infrarossi (01R-7101A, Nihon Kohden Corp, Tokyo, Japan). La frequenza respiratoria è stata regolata per mantenere l’ETCO₂ tra 35 e 40 mmHg prima dell’arresto cardiaco e dopo ROSC. La pressione aortica è stata monitorata con un catetere endovascolare a liquido (USCI 6523, C.R. Bard Inc., Billerica, MA) con una frequenza di risposta >10 Hz. Il catetere è stato inserito dall’arteria femorale destra fino all’aorta toracica. Per monitorare la pressione atriale destra, un catetere pentalume per termodiluizione (Abbott Critical Care 41216) è stato introdotto nella vena

femorale destra ed avanzato fino in arteria polmonare. La temperatura giugulare è stata misurata con un catetere, dotato di un sensore per temperatura all'estremità (AI-07065, Arrow International, Reading, PA), inserito nella vena giugulare interna destra ed avanzato cefalicamente (Figura 3). I cateteri sono stati periodicamente lavati con boli di soluzione fisiologica con eparina (10 UI/mL).

Elettrodi adesivi sono stati applicati sulla superficie rasata dell'arto superiore destro e sinistro e su quello inferiore sinistro per il monitoraggio dell'ECG.

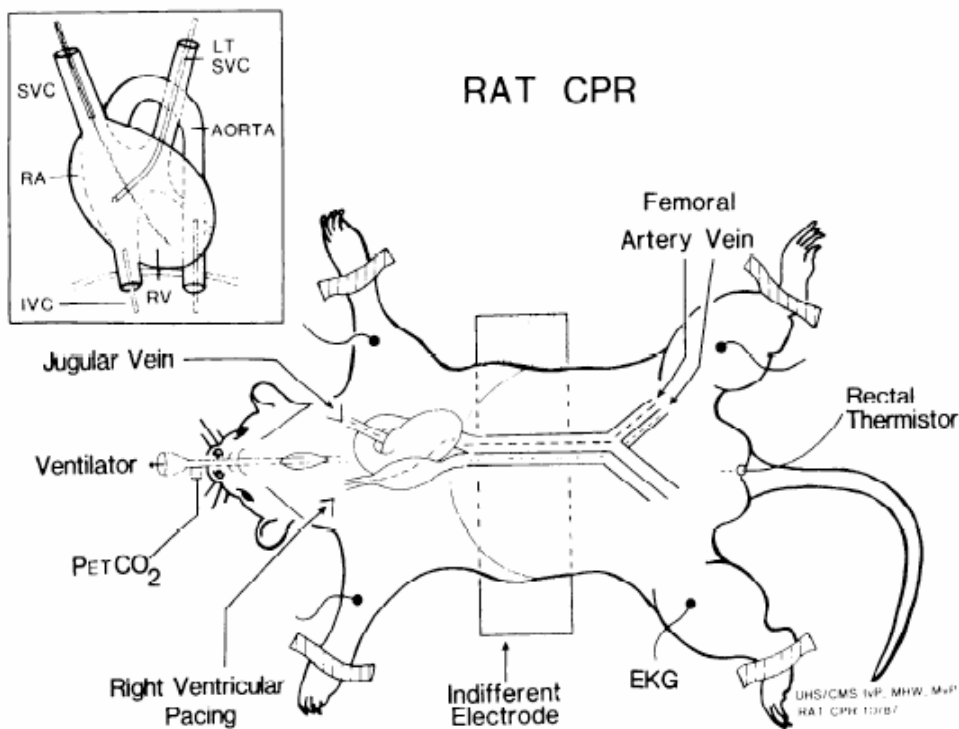


Figura 3. Schema di lavoro per la misurazione invasiva dei parametri vitali

Un catetere elettrico da pacing 5-Fr (EP Technologies, Inc., Mountain View, CA) è stato avanzato attraverso la vena succlavia destra fino al ventricolo destro, per indurre FV tramite l'erogazione di una corrente alternata di 1 mA.

La temperatura rettale degli animali prima dell'induzione di FV è stata mantenuta a 38°C con l'ausilio di una lampada riscaldante ad infrarossi e di una coperta termica controllata elettricamente

(Blanketrol® II Hyper-Hypothermia System, Cincinnati Sub-Zero, Cincinnati). È stato quindi indotto l'arresto cardiaco, e la ventilazione meccanica è stata interrotta. Dopo 10 minuti di FV non trattata, sono state iniziate le manovre di RCP, che includevano le compressioni toraciche meccaniche e la ventilazione. Per le compressioni toraciche è stato utilizzato un compressore meccanico in grado di fornire 100 compressioni/minuto (Figura 4).



Figura 4. Strumentazione utilizzata per la compressione meccanica del torace e per la defibrillazione

Contemporaneamente è stata iniziata la ventilazione con un volume corrente di 500 mL e FiO_2 di 1.0, con una frequenza di 10 respiri/minuto. Dopo 2 minuti di RCP, una dose di adrenalina di 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ è stata somministrata in atrio destro. La defibrillazione è stata tentata dopo 5 minuti di RCP con l'erogazione di uno shock bifasico di 150 Joule utilizzando un defibrillatore CodeMaster

XL (M1723A, Heartstream, Philips Medical System, Seattle, WA). Se non è stato osservato ROSC, le compressioni toraciche e le ventilazioni sono state riprese e continuate per 1 minuto prima dello shock successivo. Ulteriori dosi di adrenalina sono state somministrate a 7 e 12 minuti dopo l'inizio della RCP. La rianimazione è stata proseguita fino al ROSC o per un massimo di 15 minuti (Figura 5).

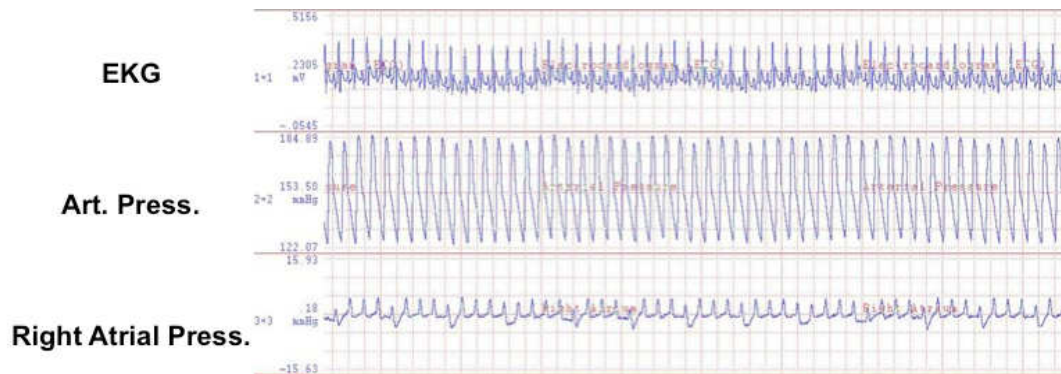


Figura 5. Tracciato EKG, pressione arteriosa ed atriale destra attestante il ritorno spontaneo della circolazione (ROSC) dopo rianimazione cardiopolmonare.

L'animale è stato considerato rianimato in caso di evidenza di un ritmo cardiaco organizzato e di una pressione aortica maggiore di 60 mmHg per almeno 5 minuti. Dopo rianimazione, gli animali sono stati monitorati invasivamente per ulteriori 240 minuti, durante i quali è stata mantenuta la ventilazione meccanica (con il 100% di ossigeno per la prima ora ed il 21% per il tempo rimanente).

Alla fine del periodo di osservazione specifico, gli animali sono stati sacrificati con somministrazione intravenosa di 150 mg/kg di pentobarbital sodico. Per ciascun time point è stato effettuato un prelievo di sangue e dopo il sacrificio, è stata effettuata un'autopsia per individuare eventuali lesioni macroscopiche e per il dosaggio dei parametri biochimici. La funzionalità miocardica è stata valutata tramite misurazione ecocardiografica della frazione d'eiezione del ventricolo sinistro, mediante la formula di Simpson modificata, e della gittata cardiaca, mediante

termodiluizione. Tali misure sono state ottenute al baseline e successivamente a 2, 4 e 72 ore dopo ROSC (Figura 6).

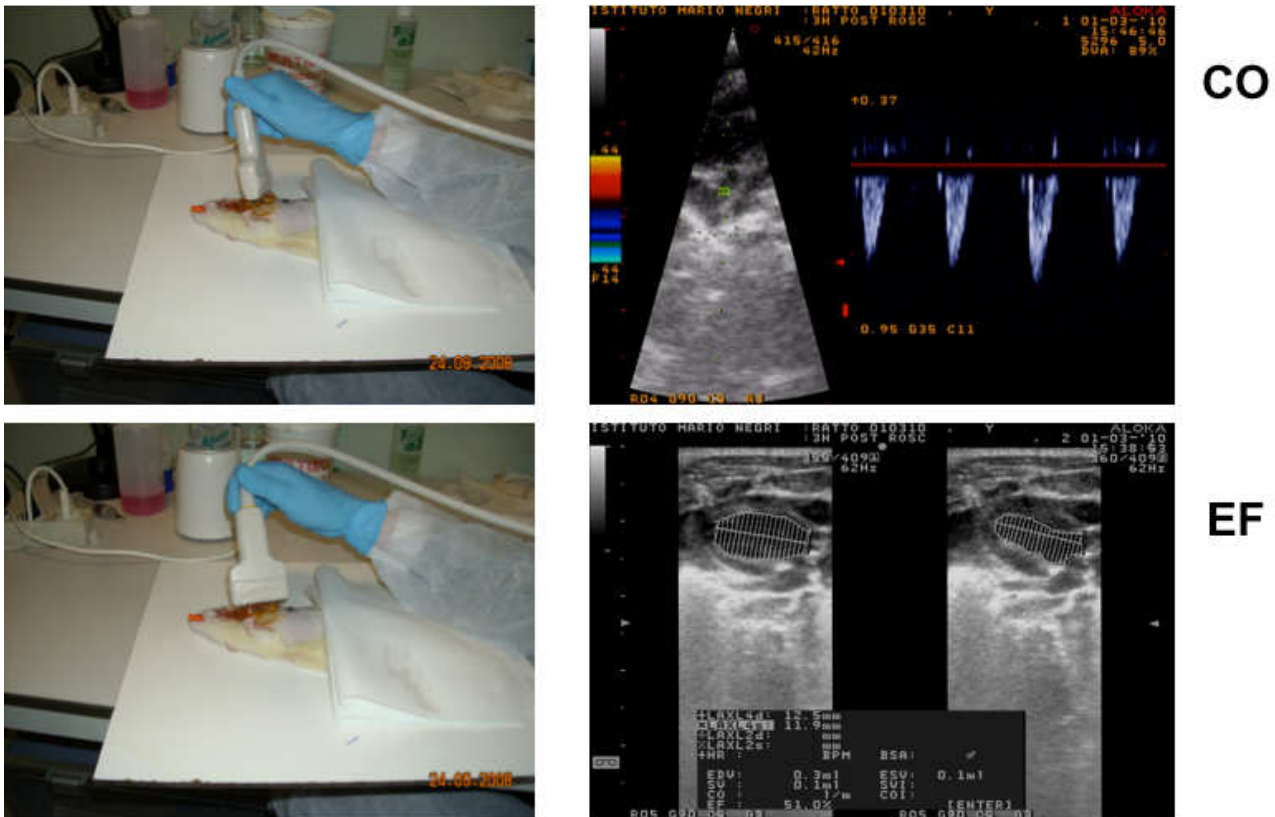


Figura 6. Valutazione ecocardiografica non invasiva per la misurazione della gittata cardiaca e della frazione di eiezione.

Dosaggio Troponina, isoprostani, 8 idrossi guanosina, IL-6, TNF alfa ed ADMA

I livelli di Troponina, isoprostani, 8 idrossi guanosina, IL-6, TNF alfa ed ADMA sono stati determinati utilizzando dei kits ELISA commercialmente disponibili seguendo le istruzioni indicate (DLD diagnostika e Cayman Chemicals). Una lettura a 450 nm è stata effettuata per valutare i livelli dell'analita da misurare e tale lettura è stata riferita ad una curva standard fornita dal produttore del kit. I risultati sono stati riferiti ad ml di plasma nel caso degli analiti misurati nel sangue ed a mg di proteine per i livelli tissutali dei biomarcatori.

Valutazione dei livelli di lipidi idroperossidi (LOOH)

I livelli di lipidi idroperossidi sono stati valutati misurando l'ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} in presenza xilenolo arancio. I lipidi idroperossidi (LOOH) ossidano il Fe^{2+} a Fe^{3+} in soluzione acida e questi ultimi, in presenza di xilenolo arancio, formano un complesso Fe^{3+} -xilenolo arancio, che assorbe a $\lambda = 560$ nm. La miscela di reazione conteneva, in un volume totale di 250 μl : 20 μl di omogenato, xilenolo arancio 100 μM , solfato ferroso ammonico 250 μM , metanolo al 90%, idrossitoluene butilato 4 mM, H_2SO_4 25mM. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la miscela è stata centrifugata a 11.000 r.p.m., a temperatura ambiente e l'assorbanza a $\lambda=560$ nm di 200 μl di sovrinatante è stata misurata spettrofotometricamente, utilizzando un lettore di micropiastre. I risultati sono stati espressi in nmoli di LOOH/mg prot. utilizzando, per la retta di calibrazione, concentrazioni note di H_2O_2 (0,2-20 μM).

Analisi istologica ed Inclusione in paraffina

Gli organi subito dopo il prelievo sono stati processati per l'inclusione in paraffina. Al prelievo è seguita la riduzione in pezzi di piccole dimensioni e la fissazione per almeno 24 ore in soluzione di formalina (Sigma-Aldrich) al 4% in acqua milliQ. Al termine della fissazione i pezzetti sono stati sciacquati in acqua distillata per eliminare i residui di formalina che potevano interferire con la successiva colorazione e quindi disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di etanolo ed acqua distillata a concentrazioni ascendenti. In particolare sono stati eseguiti passaggi di due ore in etanolo al 70%, due ore in etanolo al 80%, due ore in etanolo al 90%, una notte in etanolo al 95%, 2 ore in etanolo al 100%. Ha fatto seguito la diafanizzazione mediante passaggio di un'ora in soluzione di xilene ed etanolo assoluto (1:1, v/v) e quindi in xilene per un'ulteriore ora. Al termine della disidratazione i pezzetti sono stati posti in paraffina preriscaldata a 60°C per almeno 2 ore al

fine di impregnare tutto il tessuto di paraffina e quindi inclusi e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Al microtomo (Histoslide 2000, Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni dello spessore di 4 mm, che sono state fatte aderire su vetrini portaoggetti SuperFrost Plus (Menzel-Glaser).

Colorazione ematossilina eosina

Sulle sezioni di 4 mm ottenute al microtomo è stata eseguita la colorazione ematossilina-eosina secondo i comuni protocolli. Le sezioni sono state preventivamente deparaffinate tramite due passaggi in xilene, ciascuno di 5 minuti e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di concentrazioni di etanolo in acqua distillata: etanolo assoluto, etanolo 95%, etanolo 80% ed etanolo 70%. L'idratazione si è conclusa quindi con un passaggio di almeno 10 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con il colorante ematossilina (Merk) che colora di blu-violetto i nuclei per 3 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e contrastata per 3 minuti in acqua di fonte. Quindi è seguito il trattamento con eosina (Merck) per 1,30 minuti e lavata ancora velocemente in acqua distillata. Il montaggio è stato eseguito con Histochoice® Mounting Media (Amresco) previa disidratazione con passaggi rapidi in etanolo 80%, 95%, 100% e xilene. Per ogni animale sono state valutate 4 sezioni diverse e di ogni sezione sono stati valutati 4 campi rappresentativi.

Immunofluorescenza

L'anticorpo anti-parvalbumina è stato testato sulle sezioni di ippocampo mediante immunofluorescenza. Alla deparaffinatura ed idratazione in acqua distillata delle sezioni è seguito

lo smascheramento antigenico con sodio citrato come riportato precedentemente. In seguito è stato effettuato il blocco dei siti di legame mediante incubazione con siero al 10% in PBS e quindi l'incubazione con l'anticorpo primario (diluizione 1:2000 in PBS) per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito ad accurati lavaggi è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato direttamente con FITC. Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità).

Gestione dei dati

I dati dinamici, tra i quali la pressione aortica, la pressione atriale destra, l'end tidal CO₂ e l'elettrocardiogramma sono stati misurati in continuo e registrati su un computer, utilizzando CODAS/WINDAQ hardware/software (Computer Acquisition System, Cambridge, MA). La pressione di perfusione coronarica è stata calcolata come differenza della pressione aortica diastolica e della pressione in atrio destro. La pressione di perfusione cerebrale è stata calcolata come differenza tra la pressione aortica media e la pressione intracranica. Tutte le misure emodinamiche, la pressione di perfusione e l'elettrocardiogramma sono state mostrate in tempo reale. Per le analisi statistiche tra gruppi, sono stati usati i test ANOVA con la Scheffe's multi-comparison. Nel caso di variabili non distribuite normalmente, sono stati usati test non parametrici, quali Mann-Whitney. Nei casi in cui la variabile dipendente era una variabile categorica, è stato usato il test esatto di Fischer. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Le analisi sono state eseguite utilizzando il pacchetto SPSS 14 (SPSS Inc., Chicago, IL).

CAPITOLO IV

RISULTATI

Dati ecocardiografici e biochimici della funzionalità cardiaca, stress ossidativo ed infiammazione

I dati relativi agli animali utilizzati ed all'outcome della rianimazione cardio polmonare sono

riportati in Tabella 5.

	<i>Sprague Dawley Rats (2h,4h,72h)</i>
Peso	468 ± 25
ROSC	88%
Time to ROSC, sec	380.7 ± 38
Numero di Shock	2.8 ± 3

Tabella 5. Dati relativi al peso degli animali utilizzati ed outcome della rianimazione cardiopolmonare

I dati ottenuti mediante ecocardiografia per la valutazione della funzione cardiaca indicano una significativa riduzione ($p < 0.0001$ vs baseline) della frazione di eiezione a 2 e 4h dopo CPR ed una ripresa alle 72h (Figura 7).

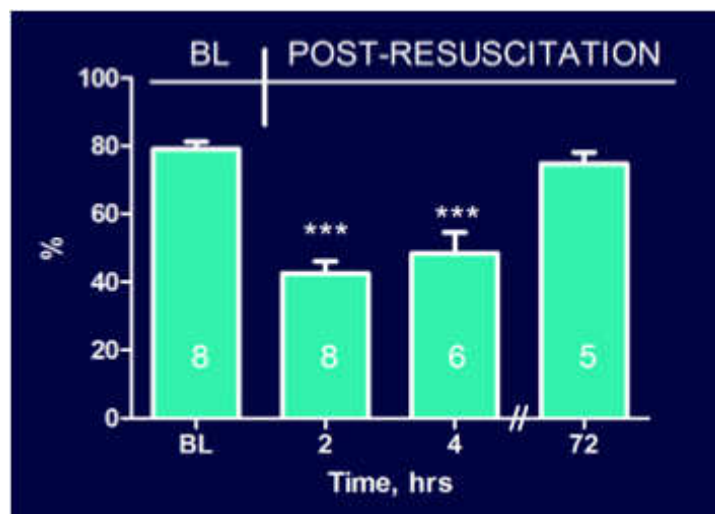


Figura 7. Dati ecocardiografici relativi alla riduzione della frazione di eiezione dopo arresto cardiaco

Parallelamente i risultati relativi alla gittata cardiaca hanno dimostrato una significativa riduzione ($p < 0.0001$ vs baseline) a 2 e 4h dopo CPR. Contrariamente a quanto accaduto per la frazione di eiezione, la gittata cardiaca rimane significativamente più bassa rispetto al baseline anche dopo 72h dalla CPR (Figura 8).

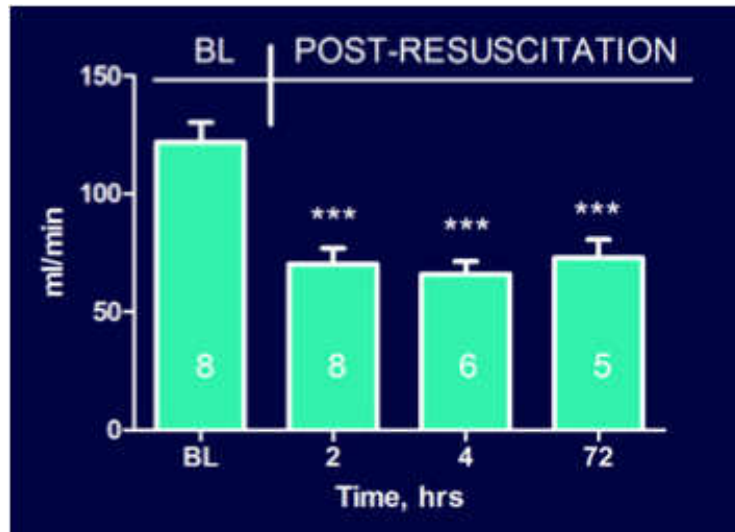


Figura 8. Dati ecocardiografici relativi alla riduzione della gittata cardiaca dopo arresto cardiaco

Il dosaggio della troponina ad alta sensibilità ha permesso di confermare ulteriormente la presenza di un danno cardiaco durante i diversi tempi di osservazione dei gruppi sperimentali. In particolare, questi dati hanno permesso di evidenziare un significativo aumento dei livelli plasmatici di troponina ad alta sensibilità ($p < 0.05$) alle 2 e 4h dopo CPR ed un ritorno ai valori di controllo dopo 72h (Figura 9).

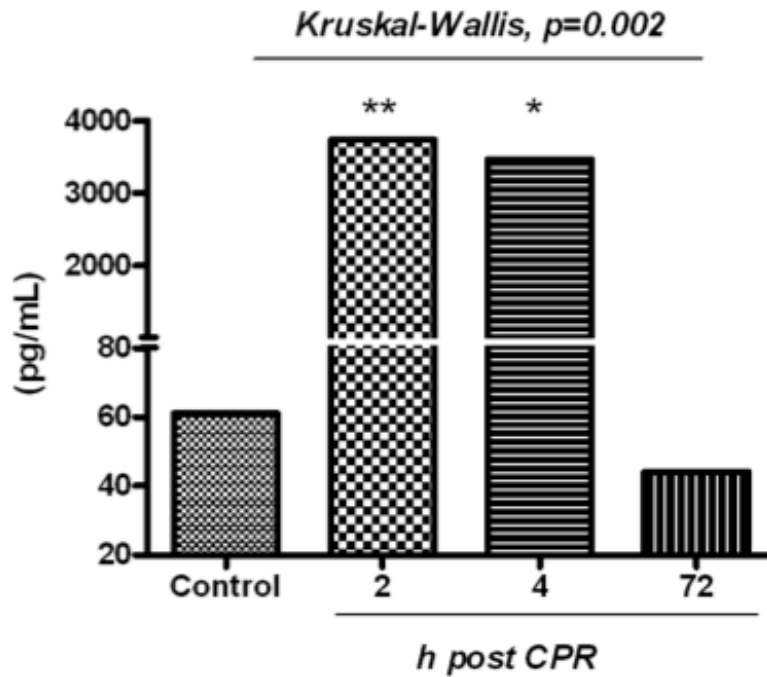


Figura 9. Dati relativi all'aumento dei livelli di troponina plasmatica durante i diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

L'analisi statistica ci ha permesso di stabilire inoltre l'esistenza di una correlazione inversa ($r=0.89$, $p<0.0001$) tra i valori di troponina plasmatica e la frazione di eiezione cardiaca (Figura 10).

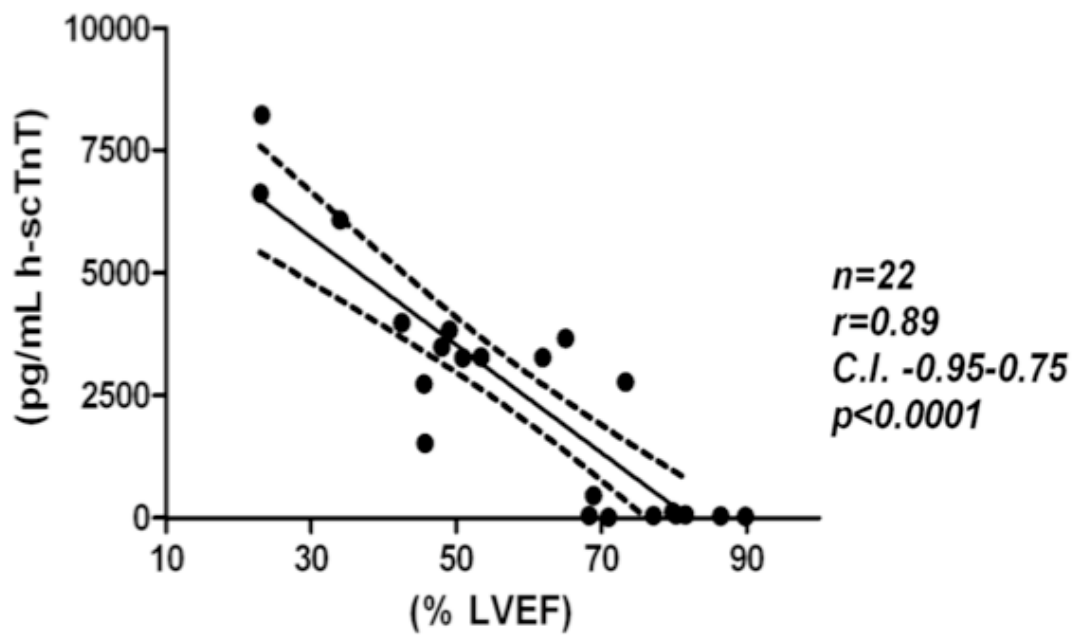


Figura 10. Correlazione tra valori di troponina plasmatica e % della frazione di eiezione

Valutazione dello stress ossidativo cardiaco

I dati relativi al dosaggio degli isoprostani cardiaci ottenuti sull'omogenato hanno permesso di dimostrare un significativo aumento della perossidazione lipidica. Questi risultati sono coerenti con i dati funzionali e biochimici della funzionalità cardiaca dimostrando un significativo aumento ($p<0.0001$) degli isoprostani a 2 e 4h dopo CPR ed una normalizzazione dopo 72h (Figura 11).

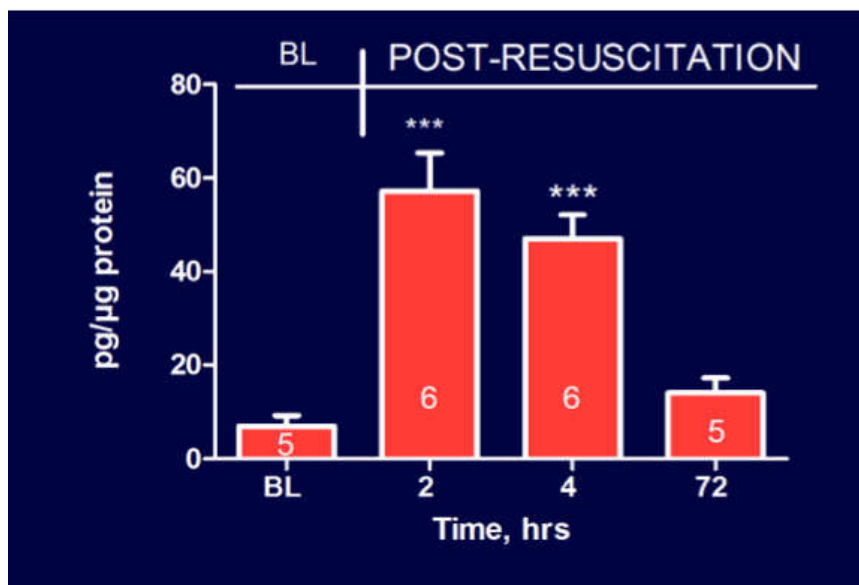


Figura 11. Livelli di isoprostani cardiaci valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

La correlazione della perossidazione lipidica con la funzionalità cardiaca è stata ulteriormente dimostrata dall'analisi statistica che ha permesso di dimostrare una correlazione inversa tra valori di isoprostani e frazione di eiezione ($r=-0.77$, $p<0.0001$) (Figura 12).

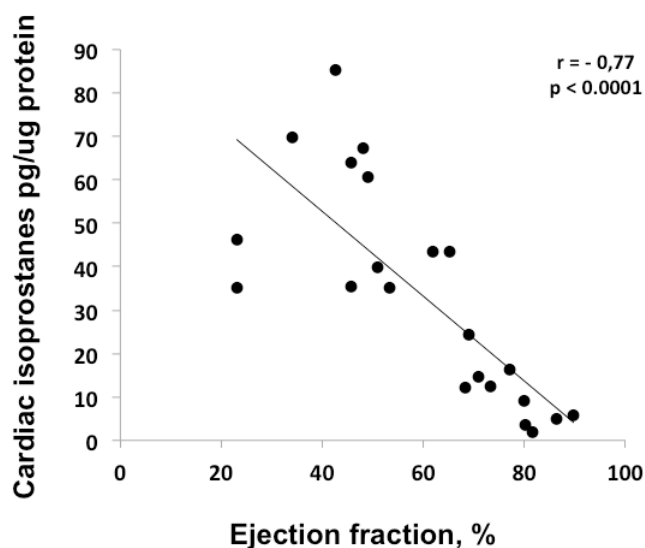


Figura 12. Correlazione tra i livelli di isoprostani cardiaci e % della frazione di eiezione

I dati degli isoprostani sono stati ulteriormente confermati dalla valutazione dei lipidi idroperossidi che sono comunemente accettati come parametro di perossidazione lipidica. Anche in questo caso, è stato osservato un significativo aumento degli LOOH a 2 e 4h dopo CPR ed una normalizzazione dopo 72h (Figura 13).

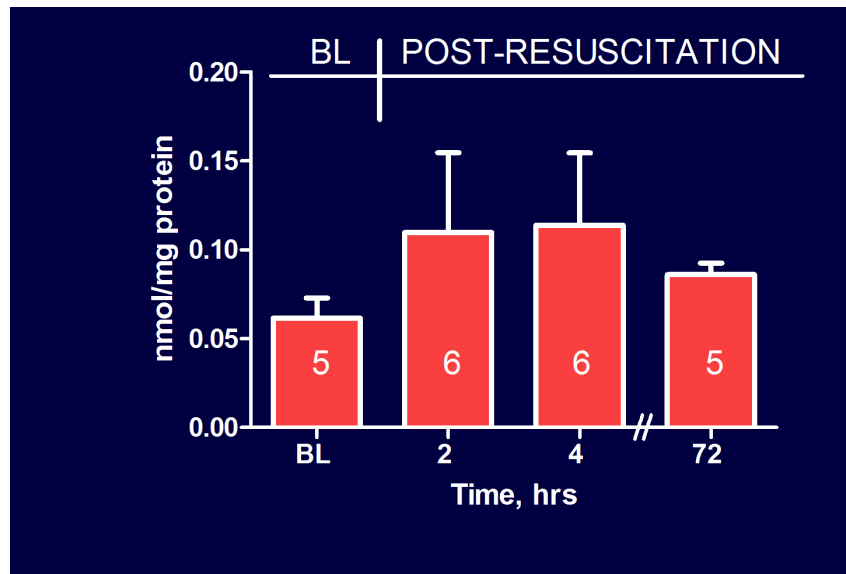


Figura 13. . Livelli di LOOH cardiaci valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

L'aumento dello stress ossidativo nel tessuto cardiaco, valutato come aumento della perossidazione lipidica, è stato inoltre confermato da un significativo aumento della 8-idrossiguanosina, marcatore di danno ossidativo del DNA. La valutazione di questo parametro ha permesso di dimostrare un significativo aumento del danno ossidativo a carico del DNA dopo 2h dalla CPR. A differenza di quanto osservato per la valutazione della perossidazione lipidica, il danno ossidativo a carico del DNA si estingue già dopo 4h dalla CPR (Figura 14).

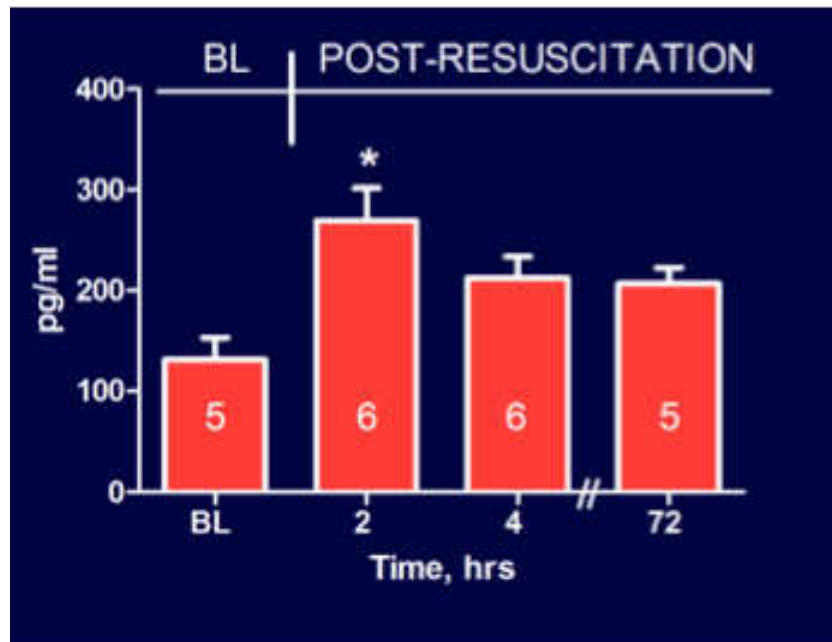


Figura 14. Livelli di 8-idrossiguanosina cardiaca valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

I dati relativi all'aumento cardiaco di 8-idrossiguanosina sono sovrapponibili e rispecchiano i valori plasmatici di questo marcatore (Figura 15).

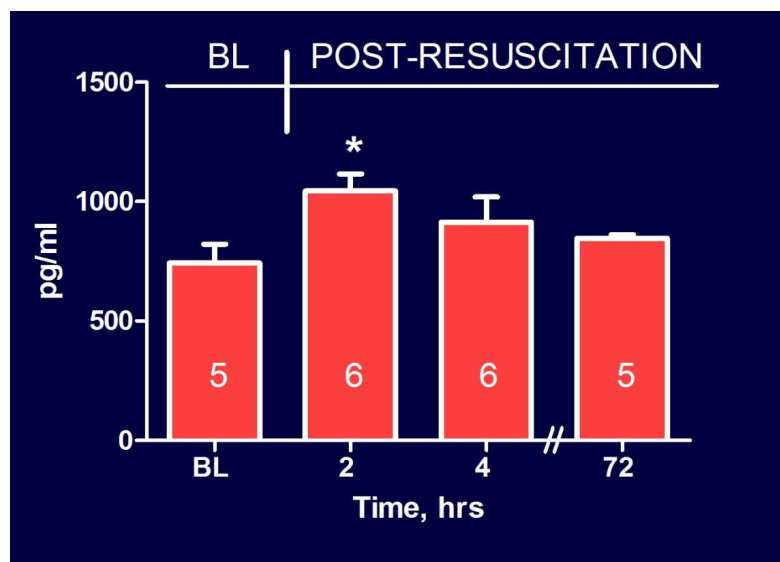


Figura 15. Livelli di 8-idrossiguanosina cardiaca valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Oltre ad un aumentato stress ossidativo valutato mediante l'utilizzo di marcatori di

perossidazione lipidica e di ossidazione del DNA, i nostri dati evidenziano un significativo aumento dei livelli di citochine infiammatorie nel tessuto cardiaco. In particolare, i nostri dati indicano un significativo aumento dei livelli di due importanti citochine pro-infiammatorie: IL-6 e TNF-alfa. Tale aumento, si è osservato ancora una volta dopo 2 e 4h dalla CPR. Entrambi i parametri si sono normalizzati dopo 72 dalla CPR (Figura 16).

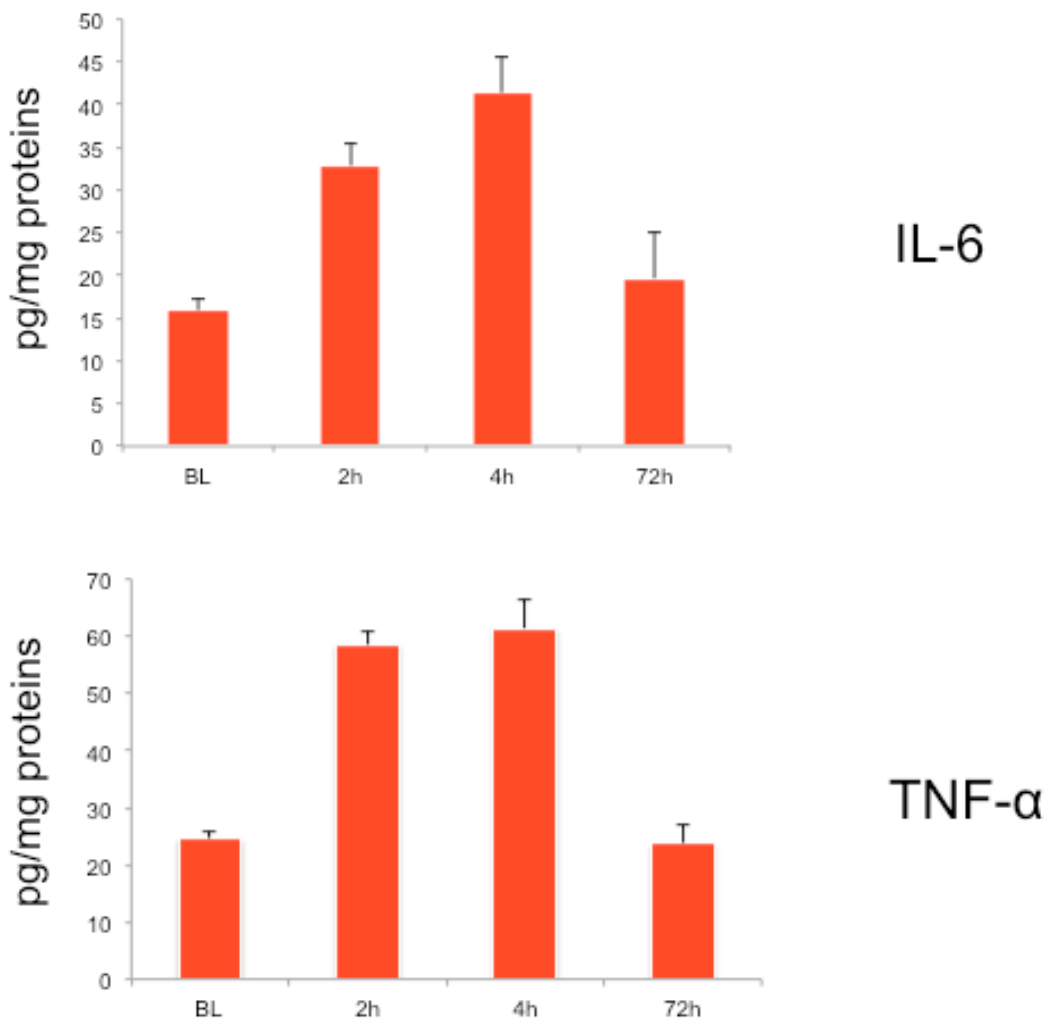


Figura 16. Livelli di IL-6 e TNF-alfa cardiaci valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Valutazione dei livelli cardiaci e plasmatici di dimetilarginina asimmetrica (ADMA)

Dal momento che numerosi dati della letteratura indicano l'importanza del sistema dell'ossido nitrico nella funzionalità cardiaca post-arresto cardiaco, in questo set di esperimenti ci siamo dedicati alla valutazione dei livelli di ADMA che come descritto precedentemente ha la funzione di inibitore endogeno dell'enzima ossido nitrico sintetasi. I nostri dati dimostrano come dopo 4h dalla CPR ci sia una significativa ($p < 0.05$) riduzione dell'ADMA cardiaca. Tali livelli si normalizzano dopo 72h dalla CPR (Figura 17).

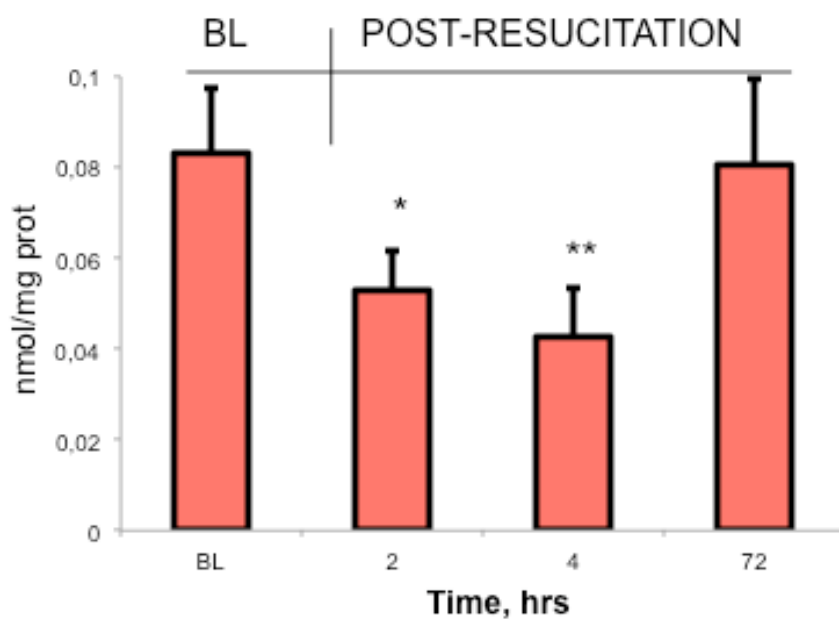


Figura 17. Livelli di ADMA cardiaca valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

I dati relativi all'ADMA plasmatica dimostrano invece un trend differente dal momento che la riduzione si evidenzia già dopo 2h dalla CPR. Anche in questo caso i livelli plasmatici ritornano ai valori del baseline dopo 72h dalla CPR.

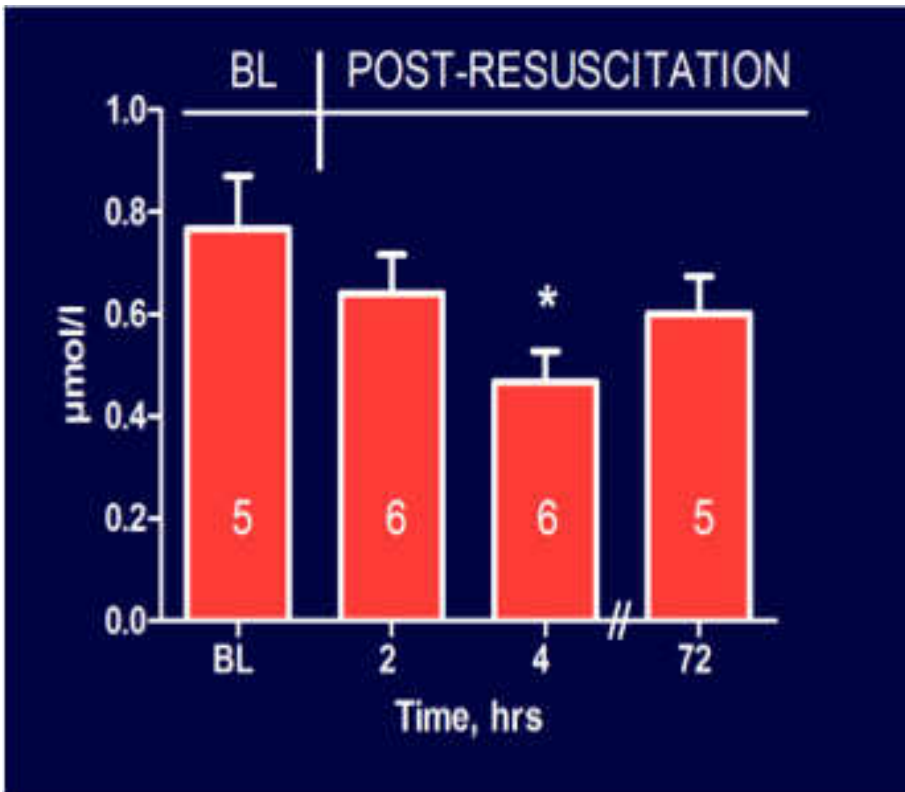


Figura 18. Livelli di ADMA plasmatica valutati nell'omogenato di miocardio a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Valutazione anatomopatologica del danno cardiaco

Coerentemente con i dati biochimici di danno cardiaco e di stress ossidativo i dati anatomopatologici dimostrano l'assenza di danni evidenti a carico dei miocardiociti dopo 72h dalla CPR (Figura 19).

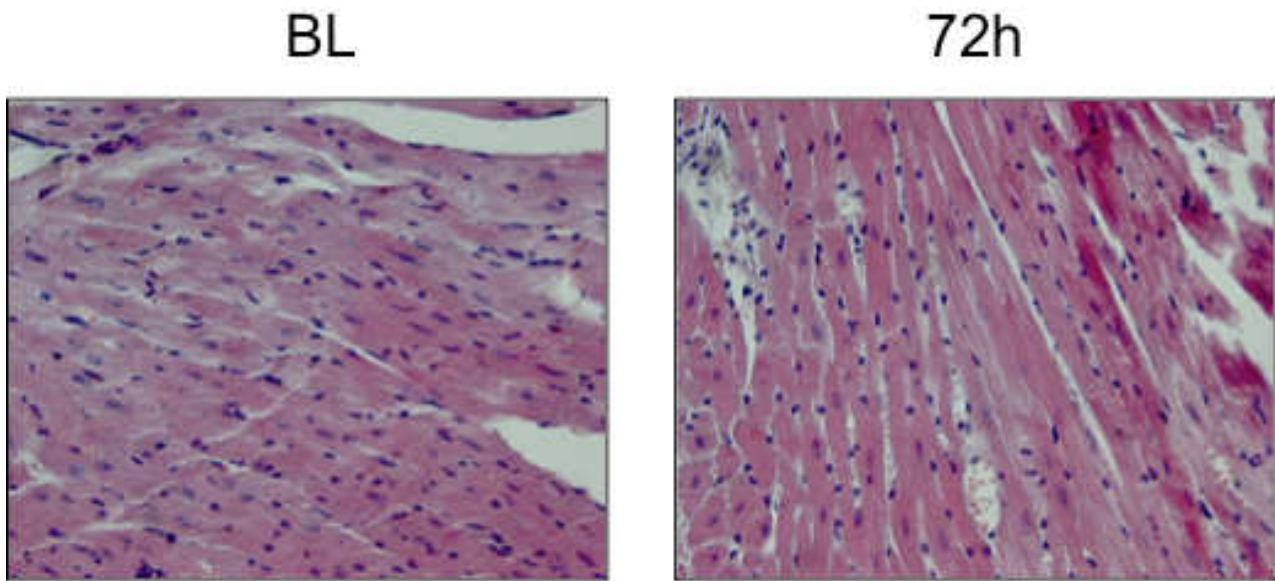


Figura 19. Valutazione anatomopatologica e morfologica del danno cardiaco

Stress ossidativo ed infiammazione nel rene, fegato e cervello

Poiché l'arresto cardiaco provoca un arresto della circolazione in tutti gli organi, abbiamo valutato l'eventuale danno ossidativo in altri organi: rene, cuore e cervello. I nostri dati dimostrano un aumento dello stress ossidativo in tutti gli organi esaminati dimostrando un trend sovrapponibile a quello osservato nel tessuto cardiaco. In particolare i nostri dati dimostrano un aumento della perossidazione lipidica a 2h e 4h dopo CPR come dimostrato dall'aumento dei LOOH e degli isoprostani. Inoltre, abbiamo osservato un aumento dello stress ossidativo a carico del DNA a 2h e 4h. Tutti i parametri sopramenzionati sono tornati ai livelli del baseline dopo 72h dalla CPR (Figura 20-22).

Rene

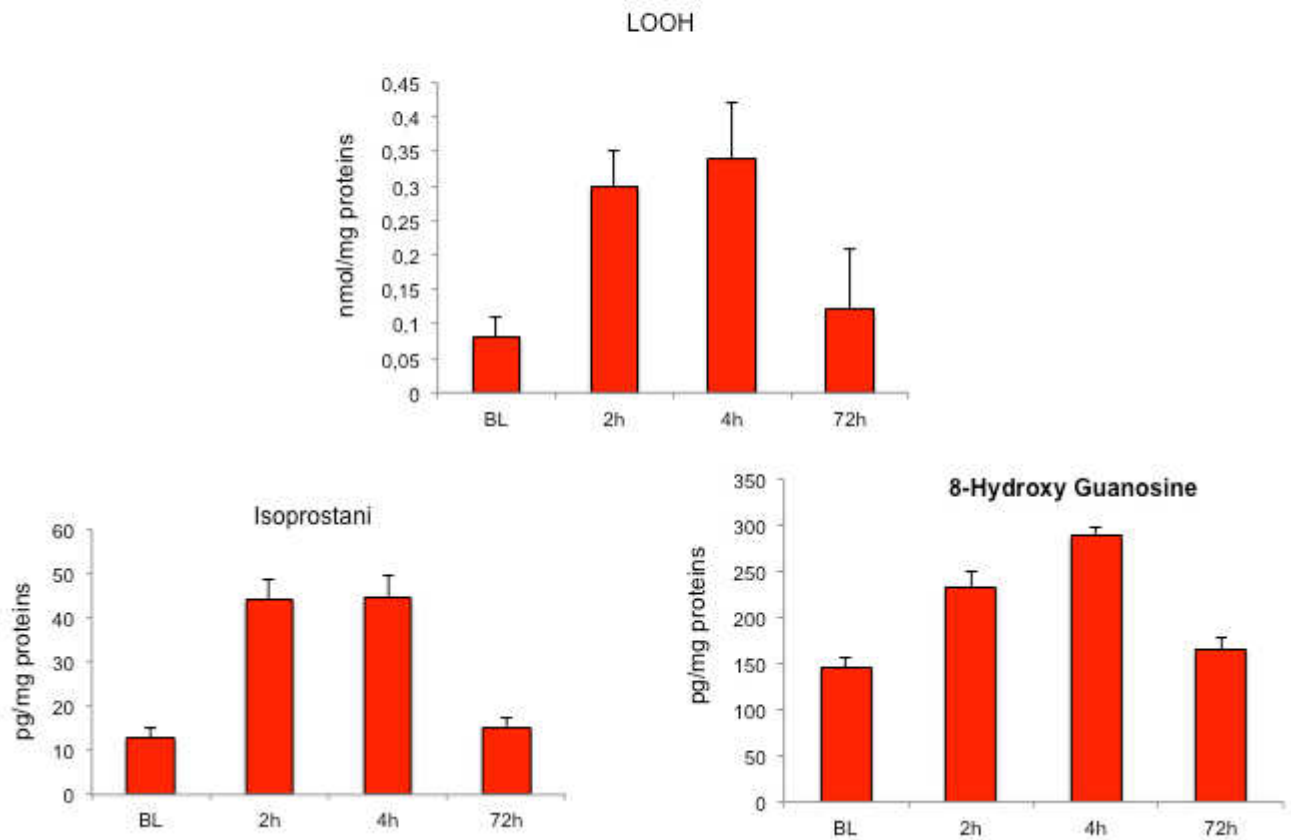


Figura 20. Livelli di LOOH, isoprostani e 8-idrossiguanosina cardiaci valutati nell'omogenato di rene a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Fegato

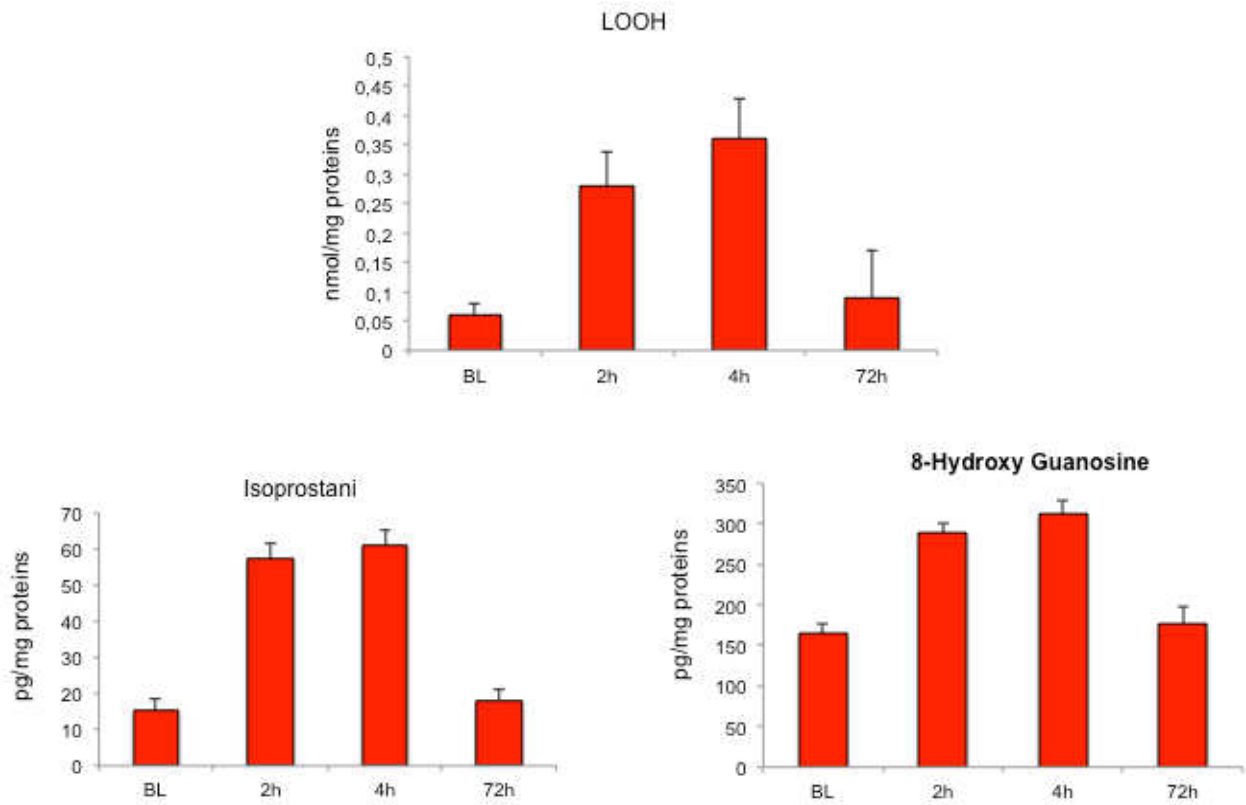


Figura 21. Livelli di LOOH, isoprostani e 8-idrossiguanosina cardiaci valutati nell'omogenato di fegato a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Cervello

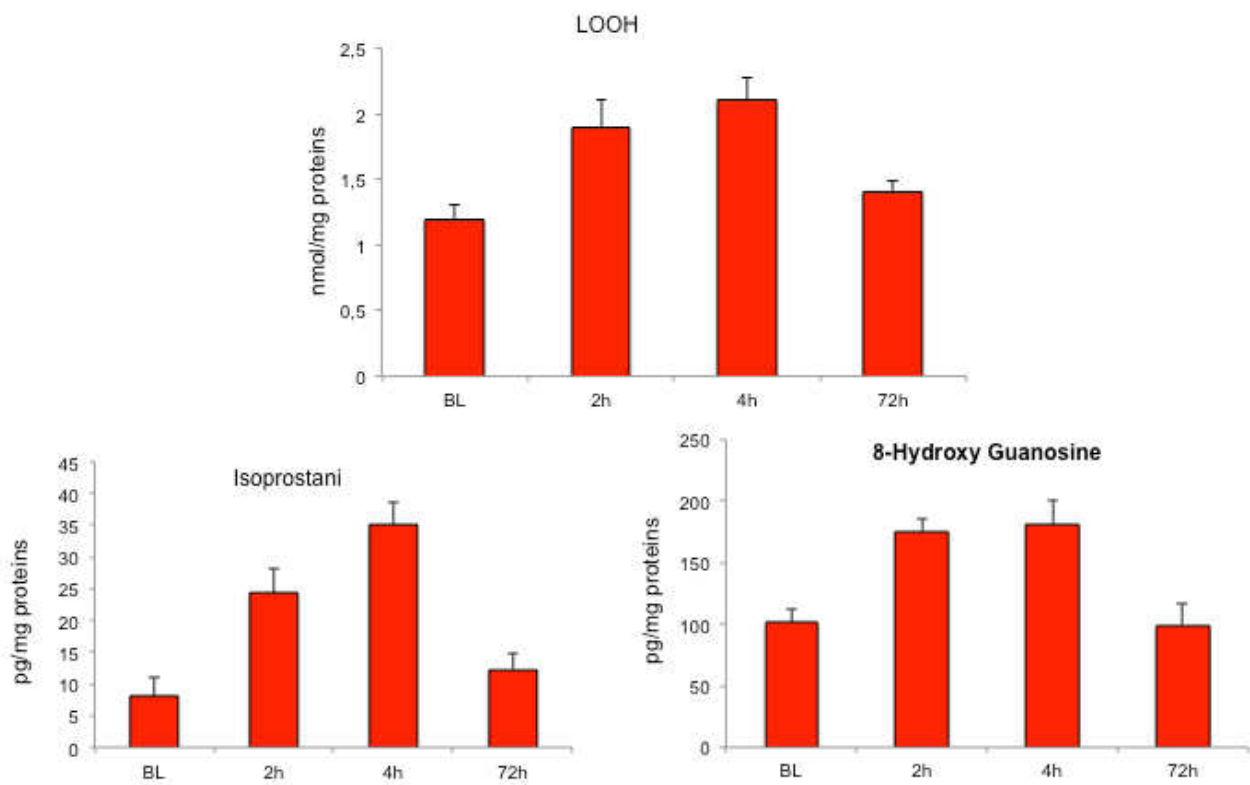


Figura 22. Livelli di LOOH, isoprostani e 8-idrossiguanosina cardiaci valutati nell'omogenato di cervello a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Dati analoghi al cuore sono stati ottenuti per le citochine infiammatorie in tutti gli organi esaminati (Figura 23).

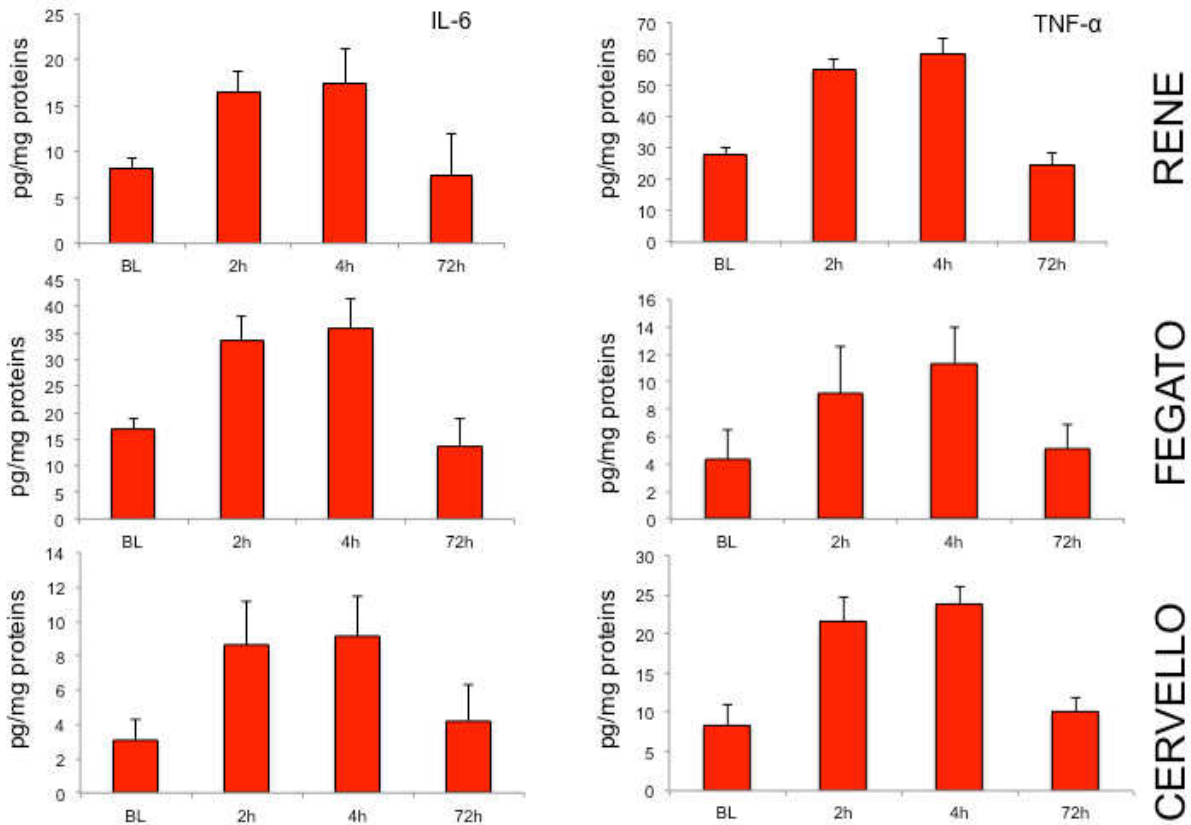


Figura 23. Livelli di IL-6 e TNF-alfa valutati nell'omogenato di rene, fegato e cervello a diversi intervalli di tempo dall'arresto cardiaco

Valutazione anatomopatologica del danno renale, epatico e cerebrale

Analogamente per quanto osservato nel cuore, nessuna alterazione anatomopatologica è stata osservata nel rene e nel fegato dopo 72h dalla CPR.

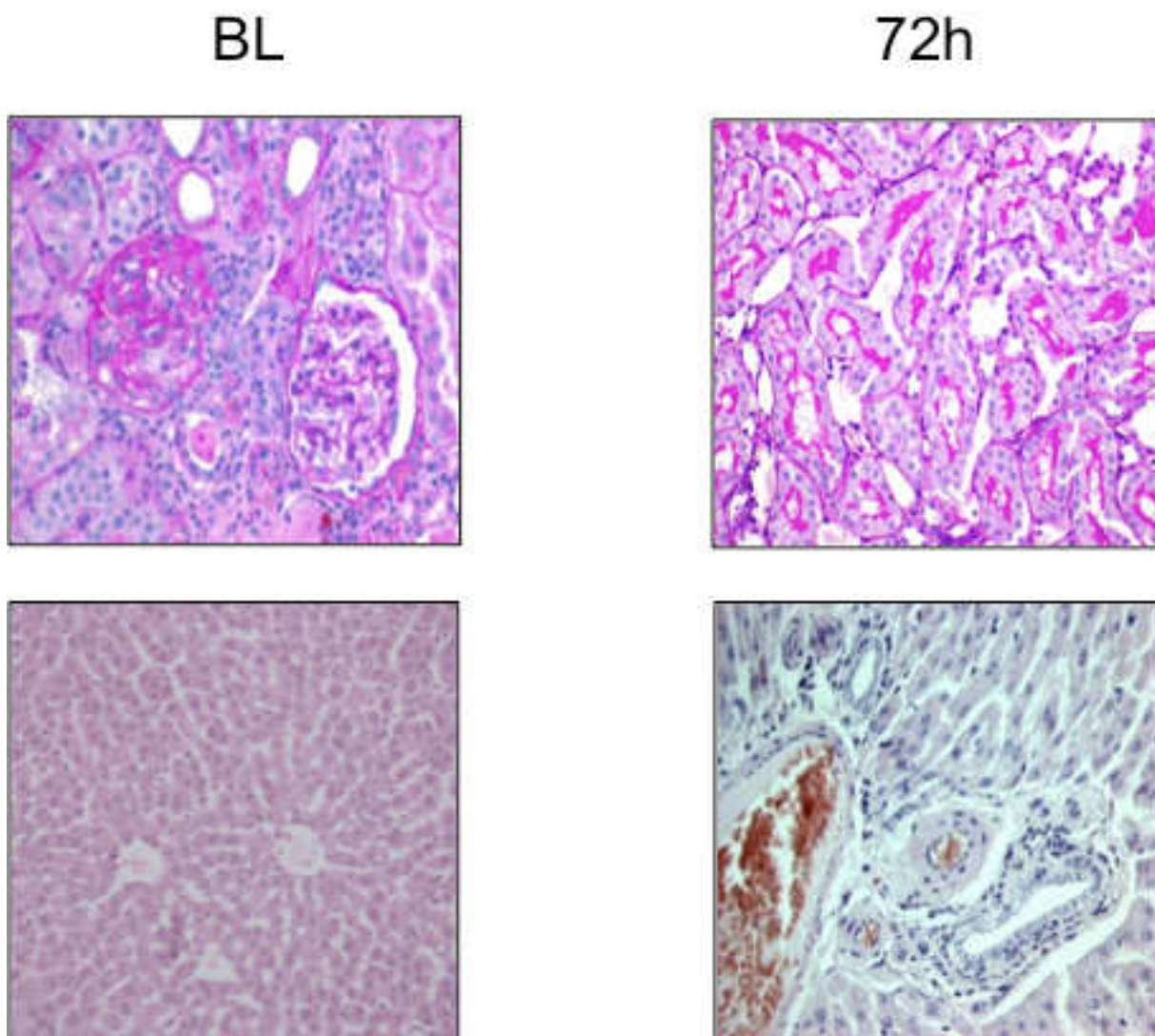
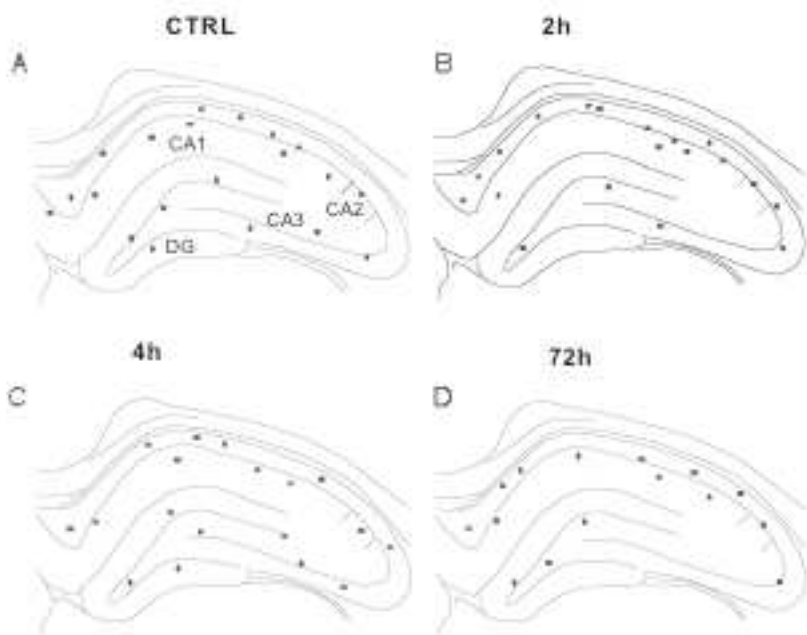
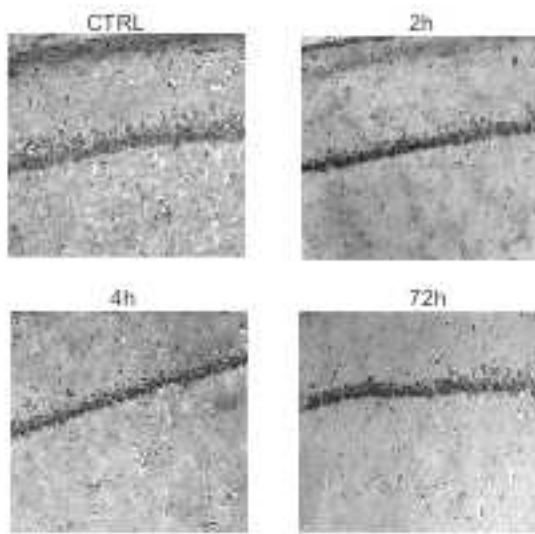


Figura 24. Valutazione anatomopatologica e morfologica del danno renale ed epatico

A differenza di quanto osservato nel rene e nel fegato, l'arresto cardiaco causa delle significative alterazioni anatomopatologiche a carico del cervello. In particolare la zona più interessata è rappresentata dalla zona CA1 dell'ippocampo che come è noto è particolarmente vulnerabile all'ipossia. I nostri dati hanno infatti evidenziato una significativa riduzione del numero di neuroni della zona CA1 dell'ippocampo dopo 4h dalla CPR (Figura 25).



• = Pvr positive cells

Table	CTRL	2h	4h	72h
N. of Pvr positive cells	1274-3	1228-4	1198-3	1188-3

Figura 25. Valutazione anatomopatologica e morfologica del danno cerebrale

Questi dati sono stati ulteriormente confermati dall'immunoistochimica che ha dimostrato una

significativa riduzione del numero di interneuroni parvalbumina positivi della regione CA1. Questi ultimi esperimenti hanno inoltre dimostrato una significativa astrogliosi reattiva a 4h e 72h dalla CPR (Figura 26).

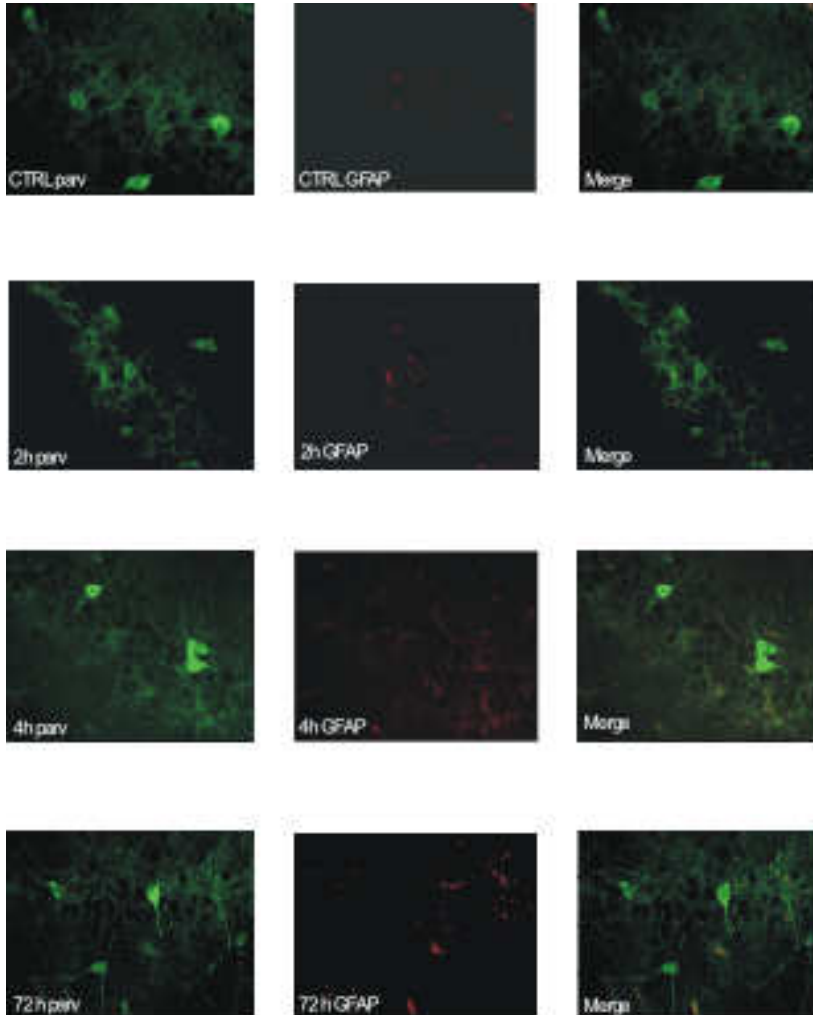


Figura 26. Immunofluorescenza per la valutazione del numero di interneuroni parvalbumina positivi nella CA1 dell'ippocampo e per la valutazione dell'astrogliosi reattiva (GFAP)

CAPITOLO V

Discussione

Il continuo apporto miocardico di ossigeno è fondamentale per la funzione e l'integrità dei miocardiociti, a causa del loro metabolismo prevalentemente aerobio. L'assenza o la carenza di ossigeno, infatti, porta ad una rapida sofferenza delle cellule miocardiche. Dal punto di vista clinico, la più frequente causa di ipossia delle cellule miocardiche è un aumento della domanda di ossigeno che non può essere soddisfatta da un proporzionale aumento del flusso ematico, a causa della presenza di una stenosi coronarica in grado di limitare la riserva di flusso. Altre cause di ischemia cardiaca sono rappresentate dall'arresto cardiaco che di fatto arrestano non solo la circolazione coronarica ma anche il flusso in altri organi di importanza vitale come rene, cervello e cuore. Le conseguenze di un'improvvisa grave riduzione, o di una totale interruzione, del flusso coronarico ai miocardiociti dipendono soprattutto dalla sua durata e variano da una sofferenza totalmente reversibile alla morte cellulare. È inoltre da sottolineare che, soprattutto dopo un'ischemia prolungata, il danno delle cellule miocardiche può derivare non solo dall'ischemia in sé, ma anche da fenomeni deleteri che si realizzano nella fase di riperfusione (danno da riperfusione). In particolare lo stress ossidativo e l'infiammazione sembrano essere due momenti eziopatogenetici importanti nell'innescare del danno cardiaco. La maggior parte degli studi della letteratura in materia di ischemia/riperfusione si sono concentrati prevalentemente su modelli sperimentali di ischemia/riperfusione ottenuta mediante legatura dell'arteria coronaria discendente. Studi condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno però dimostrato che i meccanismi alla base del danno cardiaco dopo arresto e rianimazione cardiopolmonare sono diversi rispetto a quelli da legatura della coronaria [56].

La conoscenza di questi meccanismi ci consentirà di far ipotizzare alcuni tipi di interventi terapeutici finalizzati a migliorare l'outcome dei pazienti con arresto cardiaco.

Nel primo set di esperimenti abbiamo dimostrato un significativo aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione dopo 2h e 4h dall'arresto cardiaco. Tali parametri si sono

normalizzati dopo 72h e ciò potrebbe essere dovuto all'innescò di meccanismi protettivi (es: aumento dell'espressione e dell'attività di enzimi della fase II) del miocardio. I nostri risultati suggeriscono per tanto che la finestra di un possibile intervento farmacologico con potenziali agenti anti-ossidanti dovrebbe essere compresa tra le 2h e le 4h. Inoltre i nostri studi suggeriscono l'importanza dello stress ossidativo nella perdita temporanea della funzione cardiaca come dimostrato dalla significativa correlazione tra i livelli di isoprostani e la percentuale di riduzione della frazione di eiezione. Infine i nostri dati dimostrano l'assenza di un significativo danno morfologico a carico del miocardio dopo arresto cardiaco suggerendo che una rianimazione cardiopolmonare eseguita in modo corretto ed iniziata precocemente permette di ridurre la mortalità e la disfunzione cardiaca post-arresto. Nell'ultimo set di esperimenti riguardanti la valutazione dei parametri cardiaci, i nostri risultati hanno dimostrato un coinvolgimento della regolazione endogena del sistema dell'ossido nitrico. L'ossido nitrico è stato identificato come il principale responsabile del mantenimento della pressione sanguigna e del tono vascolare: esso, infatti, media diversi processi come la vasodilatazione dell'endotelio, l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, l'inibizione dell'adesione dei monociti ed inibisce inoltre la formazione di radicali liberi. Un difetto nei processi biosintetici o nei meccanismi di regolazione porta inevitabilmente all'insorgenza di gravi disturbi che interessano *in primis* l'apparato cardiovascolare e poi in maniera sistemica tutto l'organismo; l'ossido nitrico è dunque un fattore cruciale nella patogenesi di malattie quali l'aterosclerosi, il diabete di tipo 2 e più in generale la sindrome metabolica.

L'NO è un gas e viene sintetizzato dall'ossidazione stereospecifica di un nitrogeno guanilato terminale dell'aminoacido L-arginina (L-ARG) in una reazione multi-step catalizzata dalla NOS (ossido nitrico sintasi) in cui si forma L-citrullina [57]. Le cellule dei mammiferi presentano almeno tre geni in grado di codificare per ogni isomero della NOS, dando così luogo alla formazione dei tre isoenzimi, NOS endoteliale (eNOS), NOS neuronale (nNOS) e NOS inducibile (iNOS) [58]. La produzione di NO può essere ridotta dall'inibizione competitiva della NOS mediata da inibitori

endogeni quali i derivati dell'arginina asimmetricamente metilati e cioè l'NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), l' NG,NG-dimetil-L-arginina (dimetilarginina asimmetrica ADMA) ed infine l'NG,N'GG-dimetil-L-arginina (dimetilarginina simmetrica SDMA). Si tratta di composti che derivano dal catabolismo delle proteine tissutali e che subiscono una reazione di metilazione post-trascrizionale a livello dell'atomo di azoto del gruppo guanidinico; questa reazione è catalizzata da una famiglia di enzimi chiamata protein-arginina metil transferasi (PRMTs) che utilizza la S-adenosilmetionina (SAM) come donatore di metili [59]; tra questi enzimi ne riconosciamo un tipo I (PMRT I) per la reazione specifica che produce ADMA ed L-NMMA e un tipo II (PMRT II) per la reazione che dà come prodotto finale l' SDMA. Le arginine metilate vengono eliminate dall'organismo mediante escrezione urinaria. Il metabolismo dell'ADMA e dell' L-NMMA, ma non della SDMA, avviene per mezzo dell'enzima NG NG –dimetilargininadimetilaminoidrolasi (DDAH) [60] con produzione di metaboliti quali la citrullina per l'ADMA e la dimetilamina o monometilamina per l'L-NMMA. Sono state individuate due isoforme per l'enzima DDAH di cui l'isoforma DDAH-1 si trova localizzata principalmente nei tessuti che esprimono la nNOS, mentre l'isoforma DDAH-2 si trova soprattutto nei tessuti che esprimono la eNOS. Considerata dunque la distribuzione dei due enzimi si ritiene possibile che la regolazione dei livelli intracellulari di ADMA da parte dell'enzima DDAH possa in qualche modo controllare/regolare l'attività delle NOS. Dall'analisi di tessuti adulti e fetali [61] si è visto inoltre che l'espressione delle due isoforme della DDAH differisce notevolmente ed è differentemente regolata durante lo sviluppo: la DDAH-2, infatti, è altamente espressa nei tessuti fetali e poco in quelli adulti, suggerendo così un possibile ruolo nella differenziazione cellulare e/o nel controllo del ciclo cellulare stesso, processo in cui è coinvolto anche l'ossido nitrico. Risulta ormai evidente che i disturbi cardiovascolari sono caratterizzati da ridotta disponibilità del fattore vasodilatatore Ossido Nitrico con conseguente ipertensione, aterosclerosi e sindrome metabolica. Alla base della deficienza di Ossido Nitrico si ritiene vi sia l'aumento dei livelli di ADMA, inibitore endogeno dell'Ossido Nitrico sintasi, enzima deputato alla biosintesi dello stesso: in diversi pazienti affetti da disturbi cardiovascolari, infatti, si

sono più volte riscontrati elevati livelli plasmatici di ADMA ed è per questo che l'ADMA viene proprio considerata marker diagnostico di suddetti disturbi. L'ADMA presente nel plasma deriva dalla metilazione e dalla conseguente idrolisi di proteine tissutali ed è soggetta a metabolismo da parte dell'enzima DDAH per formare metaboliti quali la citrullina e la dimetilammina. Dal momento che l'attività della DDAH, nelle sue isoforme 1 e 2, provvede al metabolismo della maggior parte dell'ADMA presente in circolo, ne deriva che alterazioni nel funzionamento dell'enzima o variazioni nei livelli si traducono in mancato smaltimento e quindi accumulo di ADMA la quale, a sua volta, provoca la comparsa di disfunzioni endoteliali e quindi di complicanze cardiovascolari. Sorprendentemente i nostri risultati hanno dimostrato una significativa riduzione dei livelli miocardici e plasmatici di ADMA. Tale riduzione potrebbe essere considerata come "compensatoria" nel tentativo di aumentare la disponibilità di NO necessario per la regolazione ed aumento del flusso coronarico e per i meccanismi di sopravvivenza cellulare del miocardiocita. Dal momento che l'arresto cardiaco causa una cessazione della circolazione sanguigna in tutti i distretti, nella seconda parte dei nostri esperimenti ci siamo dedicati allo studio dello stress ossidativo in diversi organi: rene, fegato e cervello.

Per quanto riguarda rene e fegato i nostri dati dimostrano un aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione. Nessuna alterazione morfologica è stata riscontrata per i due organi. Un discorso a parte merita il cervello ed in particolare la regione CA1 dell'ippocampo che è particolarmente vulnerabile all'ipossia. I nostri dati indicano una significativa riduzione dei neuroni di questa regione come dimostrato anche dalla colorazione selettiva con parvalbumina degli interneuroni. Questi ultimi dati dimostrano infine la presenza di una astrogliosi reattiva. Tale fenomeno potrebbe avere un significato trofico nei confronti dei neuroni in sofferenza. Infatti, come è noto, il neurone non possiede difese antiossidanti importanti e sufficienti a controbilanciare l'aumento delle specie radicaliche e l'astrocita prolifera a seguito del rilascio di molecole segnale del neurone nel tentativo di difenderlo dallo stress ossidativo.

In conclusione i nostri dati dimostrano che: esiste una stretta correlazione tra frazione di

eiezione ventricolare e valori plasmatici di troponina; la normalizzazione della funzione ventricolare dopo 72h dalla rianimazione indica che la funzione cardiaca e'preservata anche in presenza del rilascio di troponina; i livelli plasmatici e tissutali dei paprametri dello stress ossidativo sono temporaneamente alterati durante il periodo successivo alla rianimazione e correlano con l'alterata funzione cardiaca; la riduzione dei livelli plasmatici di ADMA potrebbero aumentare il rilascio di NO e preservare la funzione cardiaca; l'arresto cardiaco induce un meccanismo di danno da ischemia riperfusione anche nel rene, fegato e cervello.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Ristagno G, Tang W, Weil MH. Cardiopulmonary resuscitation: from the beginning to the present day. *Crit Care Clin* 2009; 25: 133-51, ix.
- [2] Ristagno G, Tang W, Chang YT, et al. The quality of chest compressions during cardiopulmonary resuscitation overrides importance of timing of defibrillation. *Chest* 2007; 132: 70-5.
- [3] Berg RA, Hemphill R, Abella BS, et al. Part 5: adult basic life support: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S685-705.
- [4] Ristagno G, Gullo A, Tang W, Weil MH. New cardiopulmonary resuscitation guidelines 2005: importance of uninterrupted chest compression. *Crit Care Clin* 2006; 22: 531-8, x.
- [5] Gullo A. Cardiac arrest, chain of survival and Utstein style. *Eur J Anaesthesiol* 2002; 19: 624-33.
- [6] Cummins RO, Ornato JP, Thies WH, Pepe PE. Improving survival from sudden cardiac arrest: the "chain of survival" concept. A statement for health professionals from the Advanced Cardiac Life Support Subcommittee and the Emergency Cardiac Care Committee, American Heart Association. *Circulation* 1991; 83: 1832-47.
- [7] Travers AH, Rea TD, Bobrow BJ, et al. Part 4: CPR overview: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S676-84.
- [8] . 2005 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. Part 2: Adult basic life support. *Resuscitation* 2005; 67: 187-201.
- [9] Neumar RW, Otto CW, Link MS, et al. Part 8: adult advanced cardiovascular life support: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S729-67.
- [10] Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S768-86.
- [11] Becker LB, Ostrander MP, Barrett J, Kondos GT. Outcome of CPR in a large metropolitan area--where are the survivors? *Ann Emerg Med* 1991; 20: 355-61.
- [12] Engdahl J, Bang A, Lindqvist J, Herlitz J. Time trends in long-term mortality after out-of-hospital cardiac arrest, 1980 to 1998, and predictors for death. *Am Heart J* 2003; 145: 826-33.
- [13] Eisenberg MS, Horwood BT, Cummins RO, Reynolds-Haertle R, Hearne TR. Cardiac arrest and resuscitation: a tale of 29 cities. *Ann Emerg Med* 1990; 19: 179-86.
- [14] Olasveengen TM, Vik E, Kuzovlev A, Sunde K. Effect of implementation of new resuscitation guidelines on quality of cardiopulmonary resuscitation and survival. *Resuscitation* 2009; 80: 407-11.
- [15] Eisenberg M, White RD. The unacceptable disparity in cardiac arrest survival among American communities. *Ann Emerg Med* 2009; 54: 258-60.
- [16] Li Y, Bisera J, Geheb F, Tang W, Weil MH. Identifying potentially shockable rhythms without interrupting cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med* 2008; 36: 198-203.
- [17] Caffrey SL, Willoughby PJ, Pepe PE, Becker LB. Public use of automated external defibrillators. *N Engl J Med* 2002; 347: 1242-7.
- [18] Rea TD, Eisenberg MS, Culley LL, Becker L. Dispatcher-assisted cardiopulmonary resuscitation and survival in cardiac arrest. *Circulation* 2001; 104: 2513-6.
- [19] Link MS, Atkins DL, Passman RS, et al. Part 6: electrical therapies: automated external

- defibrillators, defibrillation, cardioversion, and pacing: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010; 122: S706-19.
- [20] Chen PS, Wu TJ, Ting CT, et al. A tale of two fibrillations. *Circulation* 2003; 108: 2298-303.
- [21] Liachenko S, Tang P, Hamilton RL, Xu Y. Regional dependence of cerebral reperfusion after circulatory arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1320-9.
- [22] Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation* 2008; 79: 350-79.
- [23] Lick CJ, Aufderheide TP, Niskanen RA, et al. Take Heart America: A comprehensive, community-wide, systems-based approach to the treatment of cardiac arrest. *Crit Care Med* 2011; 39: 26-33.
- [24] . Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group. *N Engl J Med* 1986; 314: 397-403.
- [25] Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication: a scientific statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke (Part II). *Int Emerg Nurs* 2010; 18: 8-28.
- [26] Xu T, Tang W, Ristagno G, et al. Postresuscitation myocardial diastolic dysfunction following prolonged ventricular fibrillation and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med* 2008; 36: 188-92.
- [27] Kelly FE, Nolan JP. The effects of mild induced hypothermia on the myocardium: a systematic review. *Anaesthesia* 2010; 65: 505-15.
- [28] Carpi A, Menabo R, Kaludercic N, et al. The cardioprotective effects elicited by p66(Shc) ablation demonstrate the crucial role of mitochondrial ROS formation in ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 774-80.
- [29] Bianchi P, Kunduzova O, Masini E, et al. Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* 2005; 112: 3297-305.
- [30] Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, et al. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res* 2007; 100: 41-9.
- [31] Kaludercic N, Takimoto E, Nagayama T, et al. Monoamine oxidase A-mediated enhanced catabolism of norepinephrine contributes to adverse remodeling and pump failure in hearts with pressure overload. *Circ Res* 2010; 106: 193-202.
- [32] Ayoub IM, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med* 2008; 36: S440-6.
- [33] Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, et al. Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PLoS One* 2009; 4: e7588.
- [34] Bottiger BW, Krumnikl JJ, Gass P, et al. The cerebral 'no-reflow' phenomenon after cardiac arrest in rats--influence of low-flow reperfusion. *Resuscitation* 1997; 34: 79-87.
- [35] Kern KB, Zuercher M, Cragun D, et al. Myocardial microcirculatory dysfunction after prolonged ventricular fibrillation and resuscitation. *Crit Care Med* 2008; 36: S418-21.
- [36] Ristagno G, Tang W, Sun S, Weil MH. Cerebral cortical microvascular flow during and

following cardiopulmonary resuscitation after short duration of cardiac arrest. *Resuscitation* 2008; 77: 229-34.

- [37] Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, et al. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H299-308.
- [38] Ye S, Nosrati S, Campese VM. Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF). *J Clin Invest* 1997; 99: 540-8.
- [39] Murphy E, Steenbergen C. Cardioprotection in females: a role for nitric oxide and altered gene expression. *Heart Fail Rev* 2007; 12: 293-300.
- [40] Ayoub IM, Kolarova J, Gazmuri RJ. Cariporide given during resuscitation promotes return of electrically stable and mechanically competent cardiac activity. *Resuscitation* 2010; 81: 106-10.
- [41] Ristagno G, Tantillo S, Sun S, Weil MH, Tang W. Hypothermia improves ventricular myocyte contractility under conditions of normal perfusion and after an interval of ischemia. *Resuscitation* 2010; 81: 898-903.
- [42] Albertsmeier M, Teschendorf P, Popp E, et al. Evaluation of a tape removal test to assess neurological deficit after cardiac arrest in rats. *Resuscitation* 2007; 74: 552-8.
- [43] Schneider A, Bottiger BW, Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesth Analg* 2009; 108: 971-9.
- [44] D'Cruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, et al. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 843-51.
- [45] Dietrich WD, Busto R, Alonso O, Globus MY, Ginsberg MD. Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 541-9.
- [46] Ooboshi H, Ibayashi S, Takano K, et al. Hypothermia inhibits ischemia-induced efflux of amino acids and neuronal damage in the hippocampus of aged rats. *Brain Res* 2000; 884: 23-30.
- [47] Lindner KH, Haak T, Keller A, Bothner U, Lurie KG. Release of endogenous vasopressors during and after cardiopulmonary resuscitation. *Heart* 1996; 75: 145-50.
- [48] Sharma HS, Miclescu A, Wiklund L. Cardiac arrest-induced regional blood-brain barrier breakdown, edema formation and brain pathology: a light and electron microscopic study on a new model for neurodegeneration and neuroprotection in porcine brain. *J Neural Transm* 2011; 118: 87-114.
- [49] Sunde K, Pytte M, Jacobsen D, et al. Implementation of a standardised treatment protocol for post resuscitation care after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2007; 73: 29-39.
- [50] Gudipati CV, Weil MH, Bisera J, Deshmukh HG, Rackow EC. Expired carbon dioxide: a noninvasive monitor of cardiopulmonary resuscitation. *Circulation* 1988; 77: 234-9.
- [51] Adrie C, Laurent I, Monchi M, et al. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care* 2004; 10: 208-12.
- [52] Fries M, Stoppe C, Brucken D, Rossaint R, Kuhlen R. Influence of mild therapeutic hypothermia on the inflammatory response after successful resuscitation from cardiac arrest. *J Crit Care* 2009; 24: 453-7.
- [53] Larmann J, Schmidt C, Gammelin H, et al. Intercellular adhesion molecule-1 inhibition attenuates neurologic and hepatic damage after resuscitation in mice. *Anesthesiology* 2005; 103: 1149-55.
- [54] Cerchiari EL, Safar P, Klein E, Diven W. Visceral, hematologic and bacteriologic changes and neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. The visceral post-resuscitation syndrome. *Resuscitation* 1993; 25: 119-36.
- [55] Safar P. Cerebral resuscitation after cardiac arrest: research initiatives and future directions. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 324-49.

- [56] Song F, Shan Y, Cappello F, et al. Apoptosis is not involved in the mechanism of myocardial dysfunction after resuscitation in a rat model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med* 2010; 38: 1329-34.
- [57] Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
- [58] Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-30.
- [59] Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 89-91.
- [60] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264: 10205-9.
- [61] Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000; 68: 101-5.