

DISCUSSIONE

In questo studio, abbiamo dimostrato che il gas anestetico isoflurano, comunemente usato per l'anestesia generale, da solo e/o in combinazione con il protossido d'azoto e/o il midazolam, induce una severa e diffusa degenerazione neuronale di tipo apoptotico nel cervello fetale di guinea pig e piglet. Il periodo di maggiore suscettibilità a sviluppare il danno neuronale corrisponde al picco della sinaptogenesi che nei guinea pig coincide con il 35°-40° giorno di gestazione mentre nei piglet equivale al 5°-10° giorno di vita postatale. Inoltre il danno neuronale, realizzatosi durante il periodo dello sviluppo cerebrale, si concretizza con una perdita permanente di un numero significativo di neuroni nelle regioni cerebrali sensibili (vulnerabili) del cervello maturo di guinea pig suggerendo che il danno neuronale apoptotico, secondario ad anestesia, causa un danno cerebrale permanente.

Al contrario il fentanyl, oppiaceo endovenoso, non causa un aumento dell'apoptosis neuronale nelle regioni cerebrali analizzate di guinea pig e piglet e di conseguenza non altera in alcun modo la densità neuronale nel cervello maturo dei guinea pig e piglet.

La valutazione quantitativa del danno apoptotico nel presente studio si basa sulla attivazione della caspase-3 poiché rappresenta lo stadio finale dell'apoptosis ovvero della morte neuronale programmata.

La positività alla caspase-9 attivata osservata nei cervelli fetali, esposti al triplice cocktail anestetico, mostra una distribuzione sovrapponibile a quella della caspase-3 attivata suggerendo che l'attivazione della caspase-3 è almeno in parte mediata dall'attivazione della caspase-9.

Lo sviluppo cerebrale, ovvero the growth spurt period, differisce per timing e durata nelle diverse specie animali. Lo sviluppo cerebrale, nell'uomo, è un fenomeno sia prenatale che postnatale, inizia l'ultimo trimestre di gravidanza e si completa nei primi due anni di vita postnatale; nei ratti e nei guinea pig il "the growth spurt period" è

breve, dura rispettivamente 2 e 10 settimane ed è un fenomeno postnatale nei ratti (le prime due settimane di vita) e prenatale nei guinea pig (10 settimane in utero); in fine nei piglet lo sviluppo cerebrale ha una durata superiore a quella dei ratti e dei guinea pig, dura 20 settimane ed è un fenomeno sia prenatale che postnatale, inizia nelle ultime cinque settimane di gestazione e continua per le prime quindici di vita.[17].

Nei guinea pig, una delle due specie animali usate per il nostro studio, la sinaptogenesis ovvero il periodo dello sviluppo delle sinapsi inizia a metà della vita in utero e raggiunge il culmine in 50° giornata di gestazione [37,43, 52]. Il numero di giunzioni sinaptiche e le caratteristiche delle sinapsi mature sono state ampiamente studiate ed è stato stabilito che alla fine della gestazione, tra il 59° e il 70° [60], il cervello del guinea pig è completamente sviluppato [37] e che il guinea pig appena nato è completo in tutte le sue funzioni e con gli occhi aperti [52].

Per una valutazione appropriata del rischio legato all'uso routinario di questi farmaci nella pratica clinica, è fondamentale comprendere la correlazione tra la durata della sinaptogenesis e il periodo più breve di esposizione all'anestesia in grado di innescare il fenomeno di suicidio neuronale poiché la specie animale, con un più lungo periodo di sviluppo cerebrale, potrebbe essere meno vulnerabile ad una breve esposizione all'anestesia. Lo studio che presentiamo ha dimostrato il contrario. Una breve esposizione all'anestesia nei guinea pig e piglet (4 ore rappresentano un brevissimo periodo in rapporto alla durata del loro sviluppo cerebrale, rispettivamente di 10 settimane nei guinea pig e 20 settimane nei piglet), durante il picco della loro sinaptogenesis, causa un significativo e diffuso danno neuronale apoptotico nel cervello immaturo di queste due specie animali, sovrapponibile per intensità e distribuzione a quello descritto precedentemente nel cervello immaturo di ratti [36,86,87] dopo 6 ore di esposizione ad anestesia, nonostante lo

sviluppo cerebrale dei guinea pig sia approssimativamente 5 volte più lungo di quello dei ratti e nei piglet sia approssimativamente 10 volte più lungo a quello dei ratti. Se da un lato è impossibile applicare in modo assoluto i dati estrapolati dagli studi animali alla pratica clinica, dall'altro è ragionevole pensare che quattro ore di anestesia non rappresenti un periodo eccessivamente lungo se si considerano i tempi medi di anestesia in ambito ostetrico e pediatrico soprattutto quando si parla delle terapie intensive pediatriche dove neonati prematuri o neonati malati vengono mantenuti sedati/ anestetizzati per giorni o settimane.

Dai risultati del nostro studio e da quelli precedentemente pubblicati da Yon [86] sembra che il momento in cui avviene l'esposizione sia molto più importante della durata dell'esposizione stessa, ovvero lo stesso protocollo anestetico, somministrato durante il periodo che corrisponde al picco della sinaptogenesis, causa un danno neuronale statisticamente significativo rispetto a quello provocato dallo stesso protocollo somministrato negli stadi tardivi dello sviluppo cerebrale. Questo è dovuto al fatto che durante il picco della sinaptogenesis i neuroni immaturi vanno incontro a processi di maturazione, differenziazione e migrazione cellulare e si assiste alla formazione delle sinapsi. Questi processi sono estremamente delicati, sono programmati in modo preciso e si basano su una coordinata comunicazione tra le cellule neuronali [88], qualsiasi evento, compresa l'esposizione ad anestetici, che turbi uno di questi processi rende il neurone immaturo vulnerabile al processo di apoptosis.

Nella quotidiana pratica clinica, lo stretto controllo dei parametri vitali emodinamici, ventilatori e metabolici è fondamentale per il mantenimento di un'adeguata omeostasi. Le maggiori dimensioni corporee delle guinea pig gravide e dei piglet, rispetto ai ratti, hanno permesso l'applicazione di un monitoraggio anestesiologicalo (invasivo e non), simile a quello utilizzato nella quotidiana pratica clinica, che ha

consentito un monitoraggio continuo dell'adeguatezza della ventilazione materna, dell'ossigenazione e della perfusione tissutale in entrambe le specie animali. Il nostro studio mostra che, nonostante uno stretto controllo dei parametri vitali cardio-respiratori e metabolici, il danno neuronale apoptotico, osservato nei cervelli immaturi degli animali esposti ad uno dei protocolli anestetici, è statisticamente significativo rispetto a quello descritto per gli animali "Sham" e "True" Controllo.

E' importante ricordare che nel progettare questo studio ci siamo basati sull'assunto comune che un attento e stretto monitoraggio delle funzioni vitali materne e il benessere materno durante l'anestesia dovrebbe assicurare un adeguato benessere fetale, visto che non è tecnicamente attuabile un diretto monitoraggio della ventilazione, della perfusione tissutale e della ossigenazione fetale. Questo assunto è stato testato in anestesia ostetrica e in numerosi studi animali dove è stato dimostrato che ogni alterazione cardio-polmonare materna può avere un impatto negativo sul feto [1,9,77] e qualsiasi intervento terapeutico volto a correggere i parametri vitali materni può essere benefico per il feto [19; 28]. Poiché tutti i farmaci anestetici, inclusi quelli usati nel presente studio, attraversano facilmente la barriera utero-placentare [18,30, 48,55,85], senza alterare in modo significativo il flusso sanguigno utero-placentare [12,19,64], siamo convinti che l'uso di guinea pig gravide rappresenti un modello adeguato per valutare la neurotossicità indotta dall'anestesia. Basandoci sul fatto che la neurodegenerazione apoptotico osservata nel cervello immaturo di guinea pig e piglet "trattati" è stata severa rispetto a quella descritta nei cervelli "Sham" e "True" controllo, nonostante un adeguato mantenimento dell'omeostasi dei parametri cardio-respiratori e metabolici, possiamo concludere che il principale responsabile del danno neuronale apoptotico, è l'anestesia generale, *per se*, e possiamo escludere altre potenziali cause di danno apoptotico quali di stress respiratori o metabolici [13].

Sebbene non sia stata studiata l'azione neurotossica del fentanyl sul cervello in via di sviluppo, ci sono alcuni lavori che suggeriscono che una cronica somministrazione di narcotici (morfina e buprenorfina), sia sul cervello immaturo che maturo, può modulare una varietà di markers dell'apoptosis (c-jun, caspase-3) [21,31] determinando cambiamenti della morfologia neuronale (riduzione delle arborizzazioni dendritiche) [71,75] che comporta anomalità nella formazione dei circuiti. Nel nostro studio l'utilizzo di fentanyl in infusione continua per 4 ore, mostra che una breve esposizione a questo oppiaceo endovenoso, diversamente dal gas anestetico isoflurano, non produce un incremento statisticamente significativo dell'apoptosis neuronale né una significativa delezione neuronale quando viene confrontato con gli animali "True" Controllo. Resta da valutare se prolungate esposizioni al fentanyl (giorni o settimane) durante il periodo critico dello sviluppo cerebrale possono indurre una severa apoptosis neuronale, soprattutto perché il fentanyl viene routinariamente utilizzato nei protocolli di analogo-sedazione utilizzati nelle ICU pediatriche.

Lo sviluppo dei circuiti neuronali nel cervello dei mammiferi è un fenomeno complesso e sebbene alcuni stadi siano tra loro indipendenti [79], la formazione della maggior parte delle sinapsi neuronali è regolata da segnali neuronali, mediati dai neurotrasmettitori eccitatori e inibitori, che fungono da fattori trofici. Il processo di perfezionamento e di messa a punto delle connessioni sinaptiche diventa impossibile quando il segnale trofico è severamente inibito [38]. Dai risultati del nostro studio, sembra che la pratica clinica anestesologica di combinare farmaci diversi per ottenere il desiderato piano di anestesia chirurgica aumenta la vulnerabilità del cervello immaturo a sviluppare un danno neuroapoptotico. Per esempio, basse concentrazioni, clinicamente rilevanti, di isoflurano da solo (0.55% è solo il 50% del MAC per i guinea pig e piglet - MAC è la concentrazione alveolare minima che previene movimenti volontari per stimolazioni dolorose sopramassimali

nel 50 % dei soggetti) [74] hanno avuto un effetto pro-apoptotico durante il picco della sinaptogenesi e la severità della neuroapoptosis è stata significativamente incrementata con l'aggiunta di basse concentrazioni di protossido d'azoto (75% di N₂O è solo 0.375-0.5 del MAC per i guinea pig e i piglet) [78] e midazolam (comunemente usato nei protocolli di sedazione) [66]. Rimane da verificare se l'alto potenziale tossico del triplice cocktail anestetico, comparato a quello dei singoli farmaci, sia dovuto ad una generica inibizione dell'attività neuronale causata dalla combinazioni di farmaci anestetici diversi o sia dovuta, almeno in parte, ad una azione modulatoria sui due principali neurotrasmettitori trofici cerebrali. Ricordiamo che il principale neurotrasmettitore eccitatorio è il glutammato (il protossido d'azoto ha un'azione antagonista sul NMDA) [35] mentre il principale neurotrasmettitore inibitorio è il GABA (l'isoflurano e il midazolam hanno un'azione agonista sul GABA) [22].

Lo sviluppo e il funzionamento dei sistemi recettoriali NMDA e GABA_A nei feti di guinea pig posso essere modulati dalla esposizione materna a diversi stimoli ambientali. Per esempio è noto che un'ipossia materna può causare modificazioni selettive e diverse a carico del recettore NMDA nella corteccia cerebrale fetali di guinea pig [57]. Inoltre è stato più volte dimostrato che l'esposizione materna all'etanolo altera l'espressione e le proprietà farmacologiche del recettore GABA_A nell'ippocampo fetale causando disordini neuropsichiatrici, sia di natura comportamentale che di apprendimento, nella progenie [32]. Sebbene studi sulle caratteristiche strutturali e funzionali di questi due recettori nelle diverse regioni cerebrali non siano disponibili, i risultati del nostro studio ,sulla sensibilità e la distribuzione del danno anestetici nelle diverse regioni cerebrali, ci spingono a pensare che il tutto sia mediato da un solo tipo di recettore uniformemente distribuito nel cervello fetale.

Il fenomeno dell'apoptosis secondario ad anestesia è un fenomeno complesso e può essere attivato attraverso tre vie: la via estrinseca (attivata da segnali di morte che giungono a specifici recettori di superficie) [86,87]; la via intrinseca (attivata da segnali di morte endogeni e regolata dal mitocondrio) [86,87]; la via del reticolo endoplasmatico (ancora poco conosciuto) [49]. Comune denominatore di queste tre vie è l'attivazione di specifiche proteasi dette caspasi, in particolare l'attivazione della caspase-3, che rappresenta lo stadio finale del processo di morte cellulare programmata, è alla base della tecnica colorimetrica immuno-istochimica più usata ed affidabile per l'individuazione delle cellule neuronali apoptotiche utilizzata nell'ultima decade [33,34,36,62,86,87].

L'apoptosis è un processo fisiologico attraverso il quale le cellule ridondanti o che hanno fallito la connessione con i rispettivi target vengono eliminate dall'organismo vivente. E' stato stimato che approssimativamente meno dell'1% del popolazione neuronale totale (con variazioni regionali) vada incontro all'apoptosis [33,34] suggerendo che la maggior parte dei neuroni sono destinati a sopravvivere durante il periodo di sviluppo cerebrale. I risultati del nostro studio, sugli animali "True" controllo, hanno confermato che solo una piccola percentuale di neuroni va fisiologicamente incontro a morte, mentre i dati ottenuti dagli animali "trattati" evidenziano che l'anestesia generale incrementa in modo significativo l'apoptosis neuronale determinando un'allarmante riduzione delle cellule neuronali, stimata intorno al 50% in tutte le regioni cerebrali vulnerabili. Un danno neuronale così severo (circa il 30% di perdita neuronale) è stato descritto nella regione CA1 dell'ippocampo di guinea pig neonati, esposti cronicamente all'alcool durante la vita *in utero* [25]. Inoltre studi comportamentali hanno evidenziato che l'esposizione all'alcool prenatale causa deficit cognitivi nei guinea pig adulti compatibili con la delezione neuronale descritta a livello dell'ippocampo [68]. Sebbene

rimanga da indagare l'importanza funzionale della perdita neuronale secondaria all'anestesia descritta nei guinea pig, precedenti studi sui ratti suggeriscono che una precoce esposizione all'anestesia generale causa deficit di apprendimento e memoria permanenti in età adulta. [36].