

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivona Stipica Safić, dr. med.

**RESPIRACIJSKA PLASTIČNOST IZAZVANA AKUTNIM
PONAVLJANIM HIPERKAPNIJAMA I HIPOKSIJAMA U
ŠTAKORA - ULOGA SEROTONINSKIH I ADRENERGIČNIH
RECEPTORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2019.

Ova doktorska disertacija obuhvaća istraživanje koje je započelo 2012. godine u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Promjene disanja i simpatičke živčane aktivnosti prilikom ponavljanih hipoksija-uloga serotonina“ profesorice Maje Valić pod brojem 09/165 kojem sam se pridružila 2014. godine. Završetkom navedenog projekta, daljnje financiranje istraživanja nastavljeno je uz pomoć projekta Hrvatske zaklade za znanost „Translacijska istraživanja neuroplastičnosti disanja i učinak intermitentne hipoksije na anesteziju i spavanje“, pod brojem 5935, profesora Zorana Đogaša.

VODITELJICA RADA:**Prof. dr. sc. Maja Valić, dr. med.**

Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

ZAHVALA

Sve zahvale upućujem divnoj mentorici prof. Maji Valić i kolegama sa Zavoda za neuroznanost, koji su pomogli da izrada ove doktorske disertacije bude pravo zadovoljstvo. Svojim predanim radom pokazali su koliko je važno voljeti posao koji radiš. Drage Ivana, Jelena, Katarina, Linda, Majo, Renata i Zorane veliko hvala na svemu!

Veliko hvala mojim požrtvovnim i nadasve skromnim roditeljima, majci Ivi i ocu Frani te bratu Danteu, koji su toplinom obiteljskog doma uljepšali moje odrastanje. Svojim savjetima, toplim riječima i podrškom ohrabivali su me da nikad ne odustajem od mojih snova. Dragi mama, tata i Dante hvala na pruženoj ljubavi, strpljenu i potpori!

Najveća zahvala mom suprugu Orhanu i sinu Noi koji su mi bezrezervna podrška i inspiracija u svemu što radim. Hvala najdraži moji!

SADRŽAJ

1. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU	3
2. UVOD	6
2.1. DISANJE	6
2.2.1. Središnja kontrola disanja	6
2.2.2. Periferna kontrola disanja	9
2.3. RESPIRACIJSKA PLASTIČNOST	9
2.3.1. Frenički neurogram	10
2.3.2. Utjecaj različitih podražaja na razvoj respiracijske plastičnosti	11
2.4. SEROTONIN I DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA	12
2.5. NORADREANALIN I DUGOROČNA DEPRESIJA FRENIČKOGA ŽIVCA	14
3. CILJEVI I HIPOTEZE	16
3.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3.1.1. Glavni cilj istraživanja	16
3.1.2. Sporedni ciljevi istraživanja	16
3.2. HIPOTEZE	17
3.2.1. Hipoteza 1	17
3.2.2. Hipoteza 2	17
3.2.3. Hipoteza 3	17
4. POKUSNE ŽIVOTINJE I METODE	18
4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA	18
4.1.1. Anestezija	18
4.1.2. Kateterizacija krvnih žila	18
4.1.3. Traheotomija i mehanička ventilacija	19
4.1.4. Kirurgija freničkoga živca	19
4.1.5. Mikroubrizgavanje u područje rafe jezgara	20
4.1.6. Eksperimentalni protokoli	21
4.2. HISTOLOŠKA POTVRDA MJESTA UBRIZGAVANJA	25
4.3. UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA	26
4.3.1. Aktivnost freničkoga živca	26
4.3.2. Statistička obrada	27

4.4. ETIČKA NAČELA	27
5. REZULTATI	29
5.1. STUDIJA 1-UTJECAJ RAZLIČITIH PROTOKOLA NA RAZVOJ RESPIRACIJSKE PLASTIČNOSTI	29
5.1.1. Utjecaj hiperkapnijskog protokola	29
5.1.2. Utjecaj hipoksijskog protokola	33
5.2. STUDIJA 2 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT _{1A} I α2-ADRENERGIČNIH RECEPTORA U PODRUČJU KAUDALNIH RAJE JEZGARA U RAZVOJU DUGOROČNE DEPRESIJE FRENIČKOG ŽIVCA.....	39
6. RASPRAVA	51
6.1. pLTD KAO POSLJEDICA PONAVLJANOG HIPERKAPNIJSKOG PODRAŽAJA	51
6.2. POVEZANOST 5-HT i α2-ADRENERGIČNIH RECEPTORA U RAZVOJU pLTD-a	53
6.3. KLINIČKI ZNAČAJ pLTD-a i pLTF-a.....	55
7. ZAKLJUČCI	58
8. KRATKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	59
9. SUMMARY	61
10. POPIS LITERATURE.....	63
11. BIOGRAFIJA	75

1. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU

AIH – akutni ponavljani hipoksijski podražaj

AIHc – akutni ponavljani hiperkapnijski podražaj

AIHc_{O₂} - skupina životinja izložena protokolu 5 trominutnih hiperkapnijskih podražaja između kojih su bile ventilirane 50% O₂ u N₂

AIHc_{zrak} - skupina životinja izložena protokolu 5 trominutnih hiperkapnijskih podražaja između kojih su bile ventilirane sobnim zrakom

AIHcH – akutni ponavljani hiperkapnijsko-hipoksijski podražaj

AMPA receptor - α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline, vrsta glutamatnog receptora

ATP – adenzin 3 fosfat

BDNF – neutrofin (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CH – kontinuirani hipoksijski podražaj

CHc - kontinuirani hiperkapnijski podražaj

CPAP – uređaj za potpomognuto disanje koji kontinuirano upuhuje pozitivan tlak zraka (engl. *Continuos Positive Air Pressure*)

DLH - d, l-homocistična kiselina, agonist glutamatnih receptora

DRS – dorzalna respiracijska skupina neurona

f – frekvencija aktivnosti freničkoga živca

FiCO₂ – frakcija udahnutoga ugljičnog dioksida

FiO₂ – frakcija udahnutoga kisika

IPNA - integrirani signal freničkoga živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*)

LC – locus coeruleus

MAP - srednji arterijski tlak (engl. *Mean Arterial Pressure*)

NA – noradrenalin

NMDA – N-metil-D-aspartat, vrsta glutamatnih receptora

OSA – opstruktivna apneja tijekom spavanja (engl. *Obstructive Sleep Apnea*)

PACAP - hipofizni protein koji aktivira protein kinazu (engl. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*)

PaCO₂ – parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi

PaO₂ – parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi

pAkt – protein kinaza B

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

pERK2 - prolinom bogata vanstanične kinaze (engl. *proline Rich Receptor like Protein Kinase*)

PKA – protein kinaza A

pLTD – dugoročna depresija freničkoga živca (engl. *phrenic Long Term Depression*)

pLTF – dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. *phrenic Long Term Facilitation*)

PNG – neurogram freničkoga živca (engl. *Phrenic NeuroGram*)

pPNA – vršna aktivnost freničkoga živca (engl. *phrenic Peak Nerve Activity*)

PRS – pontina respiracijska skupina

ROS – reaktivni metaboliti kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

RPNA – neobrađeni signal freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*)

SIDS – sindrom iznenadne smrti dojenčeta (engl. *Sudden Infant Death Syndrome*)

T0 – vrijeme prije početka prve hiperkapnije/hipoksije

T15 - 15 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije/hipoksije

T30 - 30 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije/hipoksije

T60 – 60 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije/hipoksije

TH1-5 – vrijeme izloženosti od prvog do petog hiperkapnijskoga ili hipoksijskoga podražaja

Te – trajanje ekspirija

Ti – trajanje inspirija

Ttot – trajanje respiracijskog ciklusa

VRS – ventralna respiracijska skupina

5-HT- 5-hidroksi triptamin - serotonin

5-HT_{1A} – 5-hidroksi triptamin 1A - vrsta serotoniniskog receptora

8-OH-DPAT - 8-hidroksi-2-(dipropilamino) tetralin hidrobromid - agonist 5-HT_{1A} receptora

2. UVOD

2.1. DISANJE

Disanje (respiracija) je fiziološki proces u kojem organizam ili tkivo apsorbira kisik (O_2), a izlučuje ugljični dioksid (CO_2). U ljudi i ostalih kralježnjaka postoje tri faze disanja. 1. vanjsko disanje: u posebnom organu (škrge, pluća) se izmjenjuju plinovi između atmosferskog zraka i krvi; 2. dišna funkcija krvi tj., prenošenje kisika krvlju od dišnih organa do svih drugih tkiva, te prenošenje ugljičnoga dioksida u suprotnom smjeru; te 3. unutarnje disanje odnosno prijelaz kisika iz krvi u tkivne stanice, u kojima se hranjive tvari metaboliziraju pri čemu se oslobađa energija i stvara CO_2 (1).

Ako govorimo o mehanici disanja, tada se disanje sastoji od dviju faza: udisaj (*inspirija*) i izdisaj (*ekspirija*). Pri udisanju obujam se prsnoga koša povećava, tlak zraka u plućima postaje niži od atmosferskoga te zrak ulazi u pluća. Obujam prsnoga koša se povećava zahvaljujući djelovanju inspiracijskih mišića, među kojima je najvažniji ošit (dijafragma). Pri izdisanju dolazi do smanjenja obujma prsnoga koša zbog pasivnoga stezanja elastičnih tvorbi u stijenci prsnoga koša i u plućima. Međutim pri dubokom izdisaju sudjeluju i ekspiracijski mišići (2).

Čovjek u mirovanju udahne i izdahne oko 12 puta u minuti što predstavlja frekvenciju disanja. Svaki put udahne oko 500 ml zraka, no pri napornom radu te vrijednosti mogu se višestruko povećati (3).

Frekvencija disanja različitih kralježnjaka uvelike se razlikuje tako npr. u konja iznosi 10 do 14, goveda 10 do 30, mačke 20 do 30, kunića 50 do 60, peradi 45 do 50, štakora od 60 do 100, miša 200 puta u minuti (4, 5). U mostu (lat. *pons*) i produljenoj moždini (lat. *medulla oblongata*) nalazi se respiracijski centar koji upravlja radom dišnih mišića nadzirući frekvenciju i dubinu disanja uz neprestano prilagođavanje potrebama organizma (6).

2.2. KONTROLA DISANJA

2.2.1. Središnja kontrola disanja

Središnja kontrola disanja može biti spontana i voljna. Voljna kontrola disanja pod utjecajem je moždanog korteksa, te šalje projekcije kortikospinalnim putem do motornih

jezgara respiracijskih neurona (7). Nastaje kao odgovor na različite emocije ili bolne podražaje (8, 9).

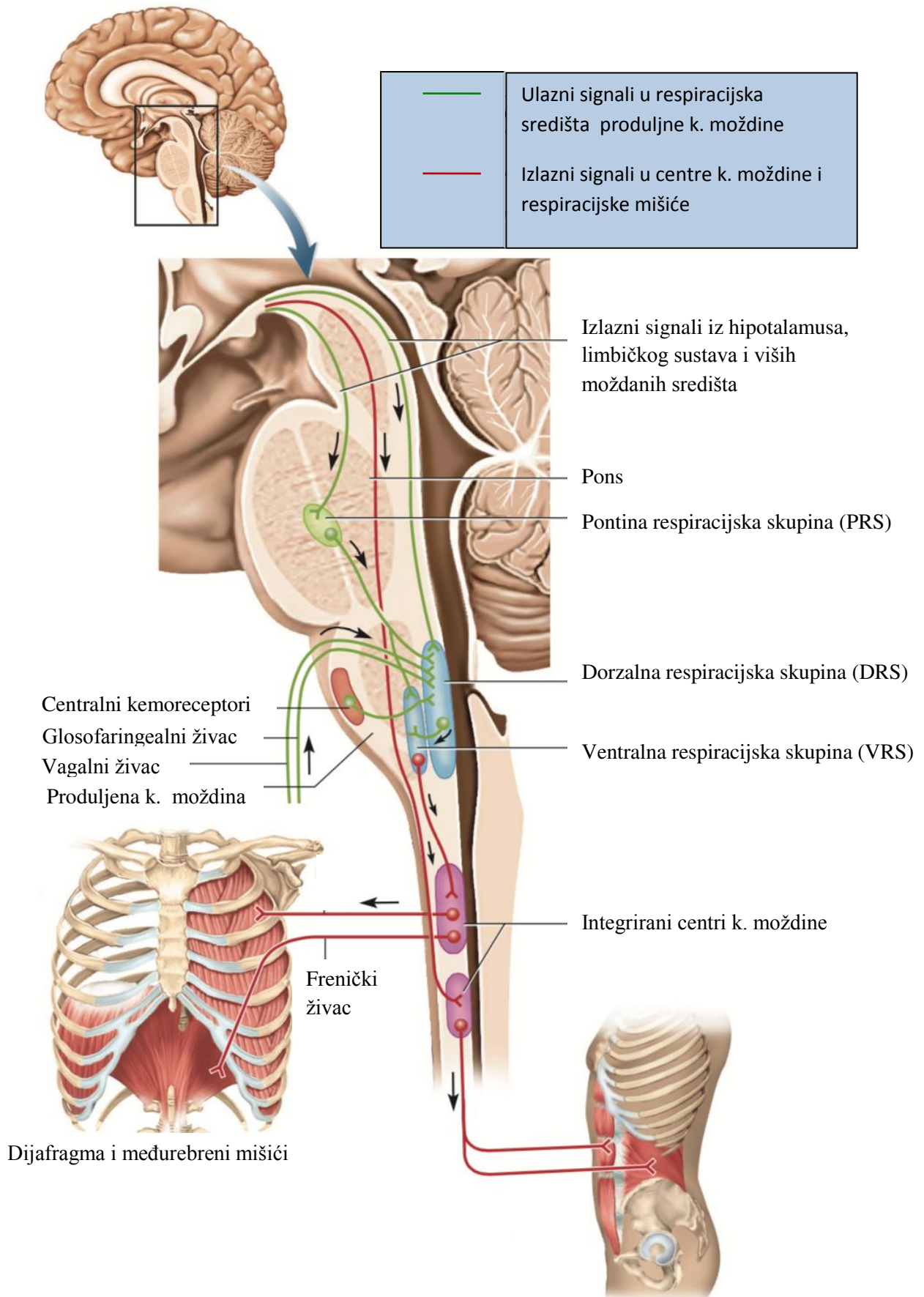
Spontano disanje pod utjecajem je respiracijskoga centra u produljenoj moždini i mostu koji je podijeljen u tri glavne skupine neurona:

1. dorzalna respiracijska skupina neurona (DRS - nadzire udisaj);
2. ventralna respiracijska skupina neurona (VRS - utječe na udisaj, izdisaj i ritam disanja);
3. pontina respiracijska skupina neurona (PRS - ograničava trajanje udisaja i povećava frekvenciju disanja).

DRS nalazi se u produljenoj moždini te ju čini jezgra solitarnog trakta. VRS je smještena u produljenoj moždini te obuhvaća kaudalni, rostralni dio, pre-Bötzingerov i Bötzingerov kompleks. PRS koja je smještena u mostu čini medijalna parabrahijalna jezgra i Kölliker-Fuse-ova jezgra (10).

Pre-Bötzingerov kompleks sudjeluje u stvaranju temeljnog ritma disanja te prima mnogobrojne signale iz različitih struktura moždanog debla kao što su rafe jezgre, locus coeruleus (LC), jezgra ambiguus, dorzalna motorna jezgra vagalnog živca i jezgra hipoglosalnog živca (11, 12).

Kemoosjetljivo područje dišnog centra osjetljivo je na promjene parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida i koncentracije vodikovih iona u krvi. Nalazi se u retrotrapezoidnoj jezgri, LC-u, središnjim rafe jezgrama, pre Bötzingerovu kompleksu, jezgri fastigi i jezgri solitanog trakta (45). Uslijed povećanja parcijalnog tlaka CO_2 (PaCO_2) dolazi dio otpuštanja ATP-a iz glija stanica kemoosjetljivog područja ventralne površine produljene moždine (13).



Slika 1 . Središnja kontrola disanja. (Preuzeto iz K.S. Saladin, *Anatomy & Physiology - The Unity of Form and Function*, 8th ed. (McGraw-Hill, 2018)- slika kao u izvorniku).

2.2.2. Periferna kontrola disanja

Periferni kemoreceptori nadziru respiracijsku aktivnost tako što reagiraju na promjene parcijalnog tlaka kisika u krvi (PaO_2). Nalaze se u području račvišta karotidne arterije unutar karotidnih tjelešaca te su građeni od dviju vrsta stanica. Glomusne ili tip I stanice su bogate neurotransmiterima kao što su acetilkolin, dopamin, noradrenalin, serotonin, tvar P, ATP, GABA, histamin i angiotenzin II te zamjećuju koncentraciju kisika u krvi dok tip II stanice predstavljaju potporne stanice. Uslijed djelovanja hipoksije glomusne stanice otpuštaju acetilkolin i tvar P te dopamin pri čemu sprječavanju jaki ekscitacijski odgovor respiracijskoga centra (14, 15, 16).

2.3. RESPIRACIJSKA PLASTIČNOST

Mogućnost mozga da se promijeni i adaptira kao rezultat nekog novog iskustva naziva se plastičnost mozga ili neuroplastičnost. Respiracijska plastičnost predstavlja mogućnost prilagodbe respiracijskoga sustava na različita fiziološka i patološka stanja, a posebice uključuje dugoročnu sposobnost prilagodbe na različita fiziološka stanja i promjene kao što su rođenje, rast, razvoj, trudnoća, promjena tjelesne mase, starenje, bolesti i ozljede mozga i kralježničke moždine te dišnog i krvožilnog sustava (17, 18, 19, 20, 21, 22).

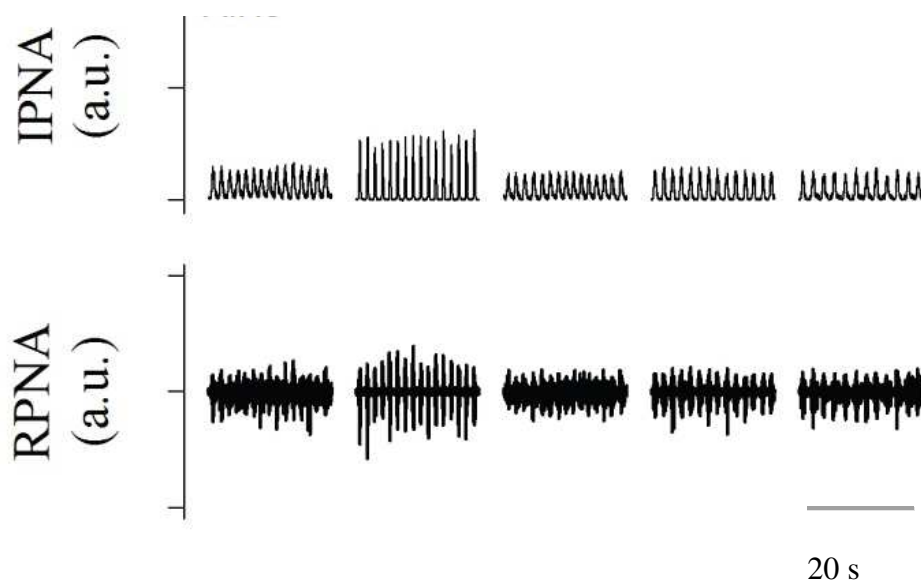
Prva objašnjenja neuralne plastičnosti u kontroli disanja pojavila su se prije više od 100 godina (23, 24), no tek 1990.-te počinju se detaljnije istraživati i prepoznavati kao važna istraživačka tema. Prvo se istraživalo podraživanje karotidnog sinusa te njegovo djelovanje na aktivnost freničkoga živca (25) potom Millhorn sa suradnicima uvodi pojam dugoročnog pojačanja aktivnosti freničkoga živca koji će poslije postati poznat pod terminom dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. *phrenic Long Term Facilitation*, pLTF) (25, 26) te sada predstavlja najbolje proučen model plastičnosti u kontroli disanja (13, 26, 27). Proučavajući model respiracijske plastičnosti učimo o kontroli disanja i različitim kompenzacijskim mehanizmima koji produljuju život oboljelima od opstruktivne apneje tijekom spavanja (28,

29), amiotrofične lateralne skleroze (30), Pompejeve bolesti (31), Duchennove mišićne distrofije (32) i ozljeda kralježničke moždine (33).

Ponavljana hipoksija (34), ponavljana hiperkapnija (35), ponavljano električno podraživanje karotidnoga sinusa (36, 25), povećanje ili smanjenje razine kisika tijekom razvoja (37), vježbanje (38), ozljeda živčanoga tkiva (39) dovode do nastanka respiracijske plastičnosti (40). Postupno slabljenje respiracijske aktivnosti nakon izloženosti akutnim ponavljanim hiperkapnijama (engl. *Acute Intermittent Hypercapnia*, AIHc) poznato je kao dugoročna depresija disanja (engl. *Long Term Depression*, LTD) (41). Nasuprot tome, progresivno pojačanje respiracijske aktivnosti nakon izloženosti akutnim ponavljanim hipoksijama (engl. *Acute Intermittent Hypoxia*, AIH) poznato je kao dugoročna facilitacija disanja (engl. *Long Term Facilitation*, LTF) (35). Mehanizmi nastanka i manifestacije respiracijske plastičnosti najčešće su istraživani na modelu anestetiziranog, vagotomiziranog, paraliziranog i mehanički ventiliranog štakora, izloženog protokolu akutnih ponavljanih hipoksija ili hiperkapnija snimanjem aktivnosti freničkoga živca (frenički LTD, engl. *pLTD* ili frenički LTF, engl. *pLTF*) (42, 43, 44, 45).

2.3.1. Frenički neurogram

Najčešća metoda praćenja središnje kontrole disanja je snimanje freničkoga neurograma (engl. *Phrenic NeuroGram*, PNG) (slika 2). Snimanjem aktivnosti freničkoga živca (engl. *Phrenic Nerve Activity*, PNA) analiziraju se faze respiracijskog ciklusa, amplitude vršne aktivnosti freničkog živca (engl. *peak Phrenic Nerve Activity*, pPNA) i frekvencije izbijanja pri čemu pPNA predstavlja neuralni ekvivalent respiracijskom volumenu, a frekvencija izbijanja je ekvivalent frekvenciji disanja. Različiti čimbenici, kao što su vrsta i duljina trajanja podražaja, te razina kisika i ugljičnog dioksida u udahnutoj smjesi, utječu na nastanak depresije i facilitacije freničkoga živca (27, 46, 47).



Slika 2. Frenički neurogram. Integrirana aktivnost freničkog živca (IPNA, u mikrovoltima) i aktivnost neobrađenog signala freničkog živca (RPNA, u mikrovoltima).

2.3.2. Utjecaj različitih podražaja na razvoj respiracijske plastičnosti

2.3.2.1. Ponavljani i kontinuirani hipoksijski podražaj

Prethodna istraživanja pokazala su da različita vrsta hipoksijskih podražaja može izazvati različite oblike respiracijske plastičnosti (48, 49). Akutni ponavljani hipoksijski podražaj uzrokuje nastanak dugoročne facilitacije freničkog živca (engl. *phrenic Long Term Facilitation*, pLTF) (50, 51) koja se najčešće očituje povećanjem amplitude freničkoga živca (41). Promjene frekvencije freničkoga živca variraju te su pod utjecajem pre Bötzingerova kompleksa (42). Najvažniju ulogu u nastanku LTF-a imaju periodičnost, intenzitet i frekvencija hipoksijskog podražaja (52, 53). Naime kontinuirana izloženost hipoksijskom podražaju ne uzrokuje nastanak respiracijskog LTF-a (48, 53). LTF je proučavan na različitim eksperimentalnim skupinama životinja kao što su anestetizirani štakori (54, 55, 56), anestetizirane mačke (57), budne patke (58), budni psi (59) i budne koze (49). Pri istraživanju na ljudima, u budnih ljudi nije zabilježena pojava LTF-a (60) međutim u oboljelih od opstruktivne apneje tijekom spavanja dolazi do razvoja LTF-a (61, 29, 52).

2.3.2.2. Ponavljani i kontinuirani hiperkapnijski podražaj

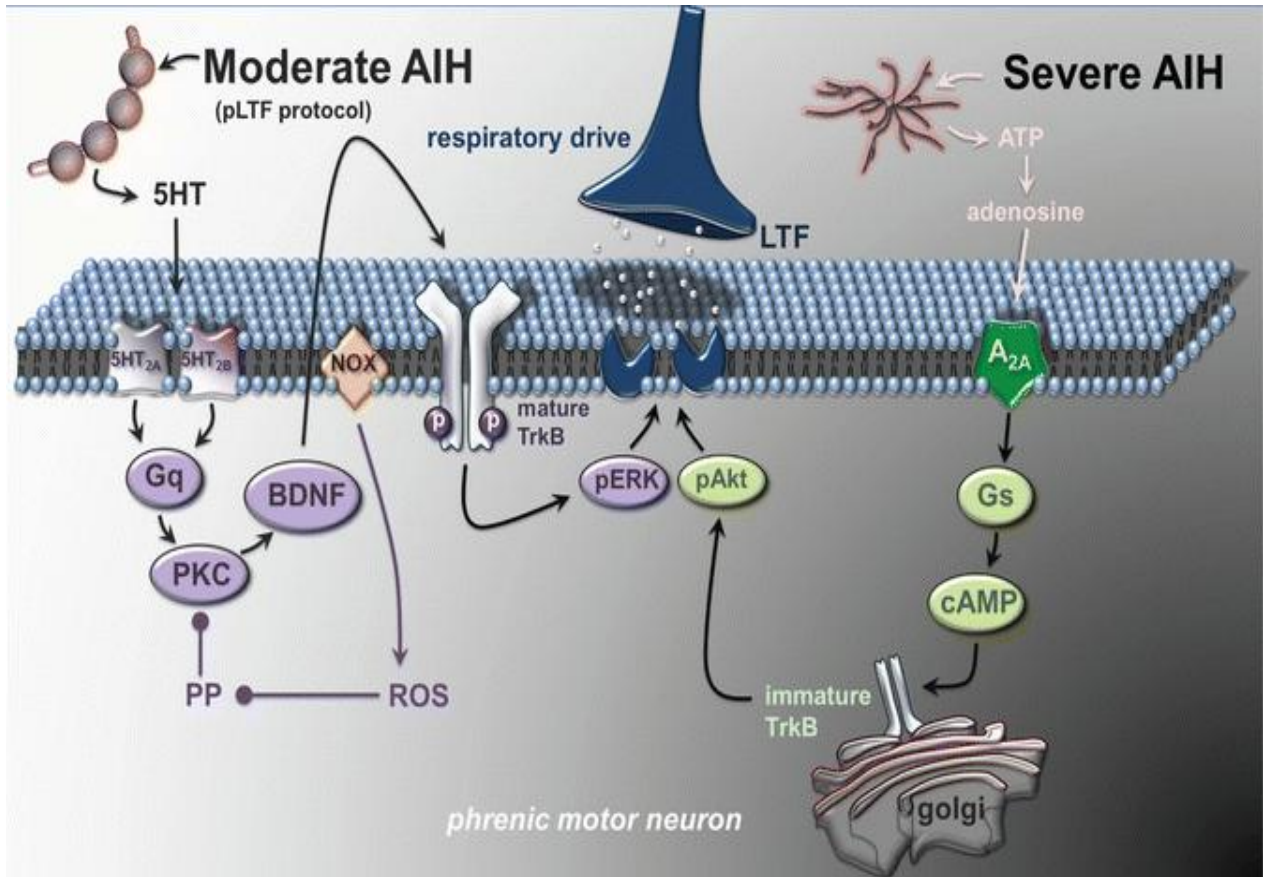
Utjecaj hiperkapnijskog podražaja na respiracijsku plastičnost slabije je istraživana, te su u nekim od prethodnih istraživanja dobiveni oprečni rezultati. Podraživanjem karotidnog tjelešca ponavljanim hiperkapnijskim podražajem došlo je do nastanka pLTF-a (62), dok je djelovanjem sistemske kratkotrajne ponavljane hiperkapnije nastao pLTD (41). Proučavanjem utjecaja različitih protokola na nastanak pLTD-a utvrđeno je da kontinuirani hiperkapnijski podražaj ne uzrokuje nastanak pLTD-a (53, 35) dok ponavljani hiperkapnijski podražaj uzrokuje nastanak pLTD-a. pLTD je pod utjecajem noaradrenalinskog i serotoninskog neurotransmiterskog sustava koji se ponašaju po principu „povuci-potegni“ (engl. „*push-pull*“). Ukoliko dođe do prevage serotoninskog sustava nastaje pLTF dok blokiranjem serotoninskog sustava prevlada noradrenalinski sustav te nastaje pLTD (51).

2.4. SEROTONIN I DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA

U središnjem živčanom sustavu, serotonin se sintetizira u području rafe jezgara koje se nalaze u moždanom deblu. Rafe jezgre čini devet grupa neurona, tj. skupine B1-B9. Većina ovih neurona su serotoninergični neuroni. Grupe B1-B5 čine tzv. kaudalni sustav serotoninskih neurona, koji odašilje projekcije u kralježničnu moždinu, dok grupe B6-B9 čine rostralni serotoninski sustav koji šalje projekcije u veliki mozak. Među njima, najveće su grupe B6 i B7, koje se nazivaju i dorzalne jezgre rafe te B8, tzv. medijane jezgre. Kaudalna skupina serotoninskih neurona šalje brojne projekcije u produljenu moždinu točnije u respiracijske motoneurone kao što su frenički, hipoglosalni, laringealni i interkostalni motoneuroni (63, 64). Aktivnost kaudalnih rafe jezgara je i pod utjecajem osjetnog sustava odnosno podraživanje karotidnog sinusa pojačava otpuštanje serotonina iz kaudalnih rafe jezgara (36), dok stimuliranje vagalnog živca smanjuje otpuštanje serotonina iz rafe jezgara (65). Respiracijski podražaji, kako hipoksijski tako i hiperkapnijski, mijenjaju aktivnost neurona smještenih u rafe jezgara (62, 66). Aktivacija rafe jezgara rezultira pojačanim otpuštanjem serotonina u blizini respiracijske skupine neurona čija će aktivnost ovisiti o vrsti serotoninskih receptora koji su smješteni presinaptički i postsinaptički. Ukupno postoji 15

različitih podvrsta serotoninских receptora, no oni su prema farmakološkim i signalnim značajkama podijeljeni u 7 skupina receptora od 5-HT₁ – 5-HT₇ (67). U kontroli disanja najvažnije su skupine 5-HT₁ i 5-HT₂ receptora (68, 69). U različitim istraživanjima respiracijske plastičnosti upotrebom metizergida, koji je nespecifični antagonist serotoninских receptora i ketanserina, koji je visoko specifični antagonist 5-HT₂ receptora utvrđena je važnost serotoninских 5-HT_{2A} receptora u razvoju dugoročne facilitacije freničkoga živca (51, 54). Za nastanak pLTF-a ključan je kratkotrajni ponavljani hipoksijski podražaj koji utječe na kemoreceptore. Putem kemoafherentnih projekcija potiču otpušanje serotonina (5-HT) iz rafe jezgara u područje respiracijskih neurona, točnije motorne jezgre freničkoga živca. Potom se aktiviraju 5-HT_{2A} receptori koji putem G proteina, fosfolipaze C i protein kinaze C (PKC) potiču sintezu neurotrofina (engl. *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) (70, 71, 50, 72). BDNF protein se potom veže na zreli oblik visokoafinitetnog receptora za tirozin kinazu (engl. *Tyrosin kynase receptor*, TrkB) pri čemu dolazi do aktivacije protein kinaze B (pAkt) i/ili prolinom bogate vanstanične kinaze (engl. *proline Rich Receptor like Protein Kinase*, pERK2) što rezultira fosforilacijom glutamatnih receptora. Naime, AMPA i NMDA receptori, koji su vrsta ionotropnih glutamatnih receptora, ugrađuju se u postsinaptičku membranu čime pojačavaju sinaptičku vezu i nastanak pLTF-a što je prikazano na Slici 3. Navedeni put nastanka pLTF-a često se naziva *Q put* pLTF-a u čijoj regulaciji je važno nastajanje reaktivnih metabolita kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koji nastaju uz pomoć NADPH oksidaze koje inhibiraju serin treonin fosfataze koje inhibiraju nastanak pLTF-a. Nedavna istraživanja pokazala su da umjerene hipoksije potiču nastanak *Q puta* dok jake hipoksije potiču nastanak *S puta* pLTF-a. *S put* pLTF-a pod utjecajem je aktivacije 5-HT₇ i adenozijskih A_{2A} receptora koji djelovanjem protein kinaze A (PKA) aktiviraju nezreli oblik TrkB što rezultira aktivacijom pAkt. PKA inhibira NADPH te time blokira aktivaciju *Q puta* pLTF-a (73).

Smatra se da je stvaranje ROS-a, koji inhibicijski djeluju na protein fosfataze, značajno u razlikovanju ponavljane i kontinuirane hipoksije za nastanak pLTF-a. ROS većinom nastaju za vrijeme reoksigenacije koja je češća u ponavljanim hipoksijma u odnosu na kontinuiranu hipoksiju (70, 71).



Slika 3. Model nastanka pLTF-a.

(Preuzeto iz Navarrete-Opazo A, Dale EA, Mitchell GS. *Therapeutic Potential of Intermittent Hypoxia: Lessons from Respiratory Motor Plasticity. Translational Research in Environmental and Occupational Stress* - slika kao u izvorniku).

2.5. NORADREANALIN I DUGOROČNA DEPRESIJA FRENIČKOGA ŽIVCA

Locus coeruleus (LC) glavna je noradrenergična jezgra mozga koja ima središnju ulogu u upravljanju brojnim fiziološkim funkcijama kao što je kontrola budnosti i autonomne aktivnosti. LC je glavna jezgra u kontroli budnosti pri čemu šalje projekcije u većinu moždanog korteksa, kolinergičke neurone bazalnih ganglija, neurone talamusa, serotoninske

neurone dorzalne rafe jezgre te značajne inhibicijske projekcije za GABAergičke neurone koji stimuliraju spavanje (74). Važnost LC-a u kontroli autonomne funkcije proizlazi iz izravnih projekcija u dorzalnu motornu jezgru vagusa, jezgru ambiguus, rostroventrolateralnu medulu, jezgre Edinger-Westphal, kaudalne rafe, salivatorne jezgre, paraventrikularne jezgre i amigdale. Promjena LC aktivnosti dovodi do mijenjanja neuronske aktivnosti koja se očituje kao pojačanje aktivnosti simpatikusa i autonomnih funkcija.

Važne projekcije u kontroli disanja su inhibicijske serotoninske projekcije iz rafe jezgara (75, 76) prema LC i noradrenergične iz LC prema rafe jezgrama (77, 78). Utvrđeno je da kratkotrajna ponavljana hiperkapnija aktivira noradrenergičke neurone koji šalju povratne inhibicijske projekcije u rafe serotoninske jezgre, respiracijske motoneurone i motornu jezgru freničkoga živca (51) izazivajući depresiju disanja. Naime, AIHc izaziva pojačano otpuštanje noradrenalina (NA) iz LC koji djeluje na α_2 receptore na rafe jezgrama te tako smanjuje izlučivanje serotonina i ne dopušta nastanak pLTF-a (79, 80). Imajući na umu da lezijom serotoninskih neurona dolazi do izrazitog pojačanja NA neurona (81) jasno je da je „povuci - potegni“ mehanizam ključan u kontroli ritma disanja.

3. CILJEVI I HIPOTEZE

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih protokola i neurotransmiterskih sustava, posebno serotoninskog i noradrenalinskog, na razvoj respiracijske plastičnosti. Prethodna istraživanja pokazala su da serotoninski receptori sudjeluju u nastanku dugoročne facilitacije aktivnosti freničkog živca, dok noradrenalinski sustav sudjeluje u nastanku dugoročne depresije aktivnosti freničkog živca. Ipak točno mjesto djelovanja i mehanizam nastanka nisu u potpunosti razjašnjeni.

U prvom dijelu ovog istraživanja proučeni su protokoli koji izazivaju različite oblike respiracijske plastičnosti.

U drugom dijelu istražena je uloga specifičnih vrsta receptora (5-HT_{1A} i α₂-adrenergički) u nastanku dugoročne depresije aktivnosti freničkog živca nakon kemijske modulacije receptora na supraspinalnoj razini u području rafe jezgre.

3.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1.1. Glavni cilj istraživanja

Glavni cilj istraživanja bio je istražiti utjecaj kemijske modulacije 5-HT_{1A} i α₂-adrenergičnih receptora u kaudalnim rafe jezgrama na nastanak respiracijske plastičnosti uzrokovane ponavljanim hiperkapnijama. Kemijska modulacija receptora izvedena je tehnikom tlačnog mikroubrizgavanja agonista i antagonista serotoninskih i adrenergičkih receptora u rafe jezgre prema stereotaksijskim koordinatama.

3.1.2. Sporedni ciljevi istraživanja

Sporedni ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

Istražiti utjecaj različitih protokola na razvoj respiracijske plastičnosti te usporediti ulogu ponavljano i kontinuirano hiperkapnijskog i hipoksijskog podražaja u nastanku respiracijske plastičnosti.

Istražiti ulogu akutne ponavljane hiperkapnije u nastanku dugoročne depresije freničkog živca (engl. *pLTD*) te akutne ponavljane hipoksije u izazivanju dugoročne facilitacije freničkoga živca (engl. *pLTF*).

Nadalje, cilj ovoga rada bio je istražiti učinak kombiniranoga hiperkapnijsko-hipoksijskog podražaja na respiracijsku plastičnost što bi moglo doprinjeti boljem razumijevanju mehanizama koji su u podlozi respiracijske plastičnosti različitih bolesti dišnog sustava kao što je npr. opstruktivna apneja tijekom spavanja.

3.2. HIPOTEZE

3.2.1. Hipoteza 1

Hipoteza 1: Epizode akutnih ponavljanih hiperkapnija (engl. *AIHc*) izazivaju dugoročnu depresiju freničkog živca dok akutne ponavljane hipoksije (engl. *AIH*) izazivaju dugoročnu facilitaciju freničkog živca. Kontinuirani hiperkapnijski (engl. *CHc*) ili hipoksijski podražaj (engl. *CH*) ne izaziva respiracijsku plastičnost.

3.2.2. Hipoteza 2

Hipoteza 2: Kombinacija ponavljana hiperkapnijsko-hipoksijskog podražaja (engl. *AIHcH*) potpomaže održavanju stabilnosti disanja.

3.2.3. Hipoteza 3

Hipoteza 3: Aktivacija serotoninskih receptora u rafe jezgrama važna je za nastanak dugoročne facilitacije aktivnosti freničkog živca, dok je aktivacija serotoninskih i adrenergičkih receptora ključna za nastanak dugoročne depresije aktivnosti freničkog živca.

4. POKUSNE ŽIVOTINJE I METODE

4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA

Navedeno istraživanje provedeno je na mladim odraslim Sprague-Dawley štakorima (mužjaci, tjelesne mase 270-340 g, starosti 2-3 mjeseca). Porijeklo soja je kolonija Harlan Italy, životinje međusobno nisu srodne. U nastambi žive po dvije životinje zajedno i održavaju se na konvencionalan način. Za izvođenje cjelokupnog istraživanja iskorišteno je ukupno 77 životinja. Životinje su hranjene hranom koja sadrži 27% proteina, 9% masnoća i 64% ugljikohidrata (4RF21 GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Italija).

4.1.1. Anestezija

Sve životinje su prije početka kirurške pripreme za pokusni protokol anestezirane intraperitonealnom injekcijom uretana (1,2 g/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Učinkovitost anestezije provjerena je štipanjem stražnjih šapica životinja, što štakorima predstavlja bolni podražaj, te ispitivanjem postojanja kornealnoga refleksa laganim podraživanjem rožnice vatenim štapićem. U slučaju da je anestezija bila nedovoljno duboka, pokusne životinje reagirale su povlačenjem stražnjih šapica ili zatvaranjem vjeđa nakon kornealnoga podražaja. U tim slučajevima, životinjama je dana dodatna doza uretana (0,2 g/kg intravenski), sve do postizanja željenoga stupnja anestezije (gubitak refleksa povlačenja šapica nakon štipanja i gubitak kornealnoga refleksa). Kako je uretan anestetik vrlo dugoga djelovanja, životinjama nije bilo potrebno davati dodatne doze uretana nakon postizanja željenoga stupnja anestezije u daljnjem tijeku pokusnoga protokola.

4.1.2. Kateterizacija krvnih žila

Nakon postizanja željenoga stupnja anestezije, životinje su postavljene leđima na grijaću podlogu (FST, Heidelberg, Njemačka) kako bi se izbjeglo pothlađivanje tijekom trajanja pokusa. Napravljena je incizija kože (oko 1,5 cm) u preponskom području, razmaknu se tanki slojevi mišića i fascija, te se omogućiti pristup femoralnim krvnim žilama. Svim

štakorima postavljeni su kateteri u obje femoralne arterije (radi kontinuiranoga praćenja arterijskoga tlaka i uzimanja uzoraka arterijske krvi za određivanje acidobaznoga statusa (RapidLab348, Bayer Diagnostics, Sudbery, UK) i femoralne vene (radi nadoknade cirkulirajućega volumena fiziološkom otopinom i intravenskoga davanja lijekova). Plinovi (PaO_2 i PaCO_2) u arterijskoj krvi i pH održavani su unutar fizioloških granica te u slučaju potrebe dodavanja infuzije otopine bikarbonata (1 mmol/ml).

4.1.3. Traheotomija i mehanička ventilacija

Nakon kateteriziranja femoralnih krvnih žila štakorima je u središnjoj cervikalnoj liniji napravljena incizija kože duljine 1,5 cm te je razmicanjem mišića omogućen pristup traheji i vagalnim živcima. Zatim je napravljena traheotomija i intubacija traheje metalnim tubusom. Životinje su mehanički ventilirane respiratorom za male životinje (SAR830-P, CWE, Ardmore, SAD) smjesom kisika (50%) i dušika (50%) ili sobnim zrakom. Početne postavke respiratora bile su kontrolirane volumenom od 250 do 350 ml/min, a frekvencija je iznosila 50 udisaja/min, uz pozitivni tlak na kraju izdisaja od 2 do 3 cm H_2O . Kasnije tijekom pokusa postavke respiratora mijenjane su prema nalazima plinova u krvi. Potom su svakoj pokusnoj životinji izolirana oba vagalna živca te su podvezana koncem. Kako bi se spriječio utjecaj plućnih receptora osjetljivih na istezanje na viša moždana središta prije početka pokusnoga protokola vagalni živci prekinuti su povlačenjem konaca.

4.1.4. Kirurgija freničkoga živca

Životinje su postavljene u stereotaksijski okvir u pronacijskom položaju (Lab Standard, Stoelting, SAD). Dorzalnim se putem, nakon incizije kože duljine 2 cm i razmicanja mišića, pristupilo desnom freničkom živcu na razini C5-C6 korijena. Živac je izoliran od okolnoga tkiva, postavljen na bipolarnu srebrnu elektrodu te pokriven silikonskim gelom (Elastosil RT 601 A+B, Wacker Silicones, Riemerling, Njemačka) kako bi se spriječilo njegovo isušivanje. Elektroda je putem pojačala (SuperZ & System1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD) bila spojena s računalom. Na računalu se tijekom eksperimenta kontinuirano pratio središnji arterijski tlak te neobrađeni i integrirani signal freničkoga živca s pomoću programa PowerLab i Chart for Windows verzija 5.4.2

(ADInstruments, Castle Hill, Australija). Nakon prikaza signala freničkoga živca životinje su paralizirane rokuronij-bromidom (1.33 mg/kg intravenski; Esmeron, Organon, Nizozemska) kako bi se spriječili spontani pokreti disanja i pozadinska mioelektrična aktivnost.

4.1.5. Mikroubrizgavanje u područje rafe jezgara

U drugom dijelu istraživanja, životinje su postavljene u stereotaksijski okvir, učinjena je okcipitalna kraniotomija kako bi se omogućio pristup kaudalnom rafe području u koje je vršeno mikroubrizgavanje s pomoću mikropipete sastavljene od 4 mikrocjevčice izrađene u našem laboratoriju s pomoću uređaja za izradu mikrocjevčica (engl. *Vertical pipette puller* model No. 51210, Stoelting, Wood Dale, SAD). Četiri mikrocjevčice sadržavale su:

1. fiziološku otopinu (0,9% NaCl)
2. D, L - homocistat (DLH; 10 mM, otopljen u fiziološkoj otopini; Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
3. 8-OH-DPAT ili johimbin ili metizergid (1 mM, otopljen u fiziološkoj otopini; Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
4. India Ink (otopljen u fiziološkoj otopini).

Prije mikroubrizgavanja, na svaku mikrocjevčicu postavljena je polietilenska cjevčica spojena na injekcijsku štrcaljku. S pomoću pozitivnoga tlaka koji je postignut pomicanjem klipa injekcijske štrcaljke, mikroubrizgavan je volumen od 20 ± 5 nL. Mikroubrizgani volumeni mjereni su promatranjem pomaka meniska tekućine u svakoj pojedinoj mikrocjevčici, s pomoću mikroskopa s mjernom ljestvicom na okularu. Nakon uklanjanja kostiju glave i probijanja moždanih ovojnica, mali mozak je lagano podignut i odgurnut rostralno kako bi se jasno prikazao obex (vršak četvrte moždane komore), koji je bio polazna orijentacijska točka. Uz korištenje atlasa štakorskoga mozga (82) određene su koordinate na kojima se nalazi kaudalno rafe područje, te je staklena mikropipeta s promjerom vrška 30 - 50 μm uvedena u ciljano područje moždanog debla. Kaudalno rafe područje u koje je vršeno mikroubrizgavanje smješteno je u središnjoj crti 0,2 - 0,3 mm rostralno i 2,5 - 2,7 mm ventralno od obexa. Dodatna potvrda da se mikropipeta s pomoću koje je vršeno mikroubrizgavanje nalazila upravo u rafe jezgrama provedena je elektrofiziološkim mapiranjem. Glutamatni agonist DLH (20 ± 5 nl) bio je mikroubrizgan prema navedenim koordinatama. Položaj mikropipete po potrebi je prilagođavan dok se nije pronašlo mjesto s kojega je bilo moguće izazvati povećanje pPNA. Učinci mikroubrizgavanja DLH bili su

prolazni, reproducibilni i specifični za mjesto mikroubrizgavanja. Postupak mikroubrizgavanja selektivnoga agonista 5-HT_{1A} receptora (8-OH-DPAT), neselektivnog antagonista serotoninskih receptora (metizergid) i selektivnog antagonista α₂ receptora (johimbin) primijenjen je na mjestu s kojega je bilo moguće izazvati ekscitacijski odgovor. Nakon elektrofiziološke potvrde, cjevčica mikropipete isprana je fiziološkom otopinom iz druge cjevčice. Za povratak pPNA na vrijednosti prije mikroubrizgavanja bilo je potrebno otprilike 10 minuta, te se tek tada pristupalo mikroubrizgavanju navedenih neuromodulatora. Po završetku pokusa u isto je područje mikroubrizgavana mala količina boje (India Ink; 20 ± 5 nl) koja je kasnije služila za histološku potvrdu mjesta ubrizgavanja.

4.1.6. Eksperimentalni protokoli

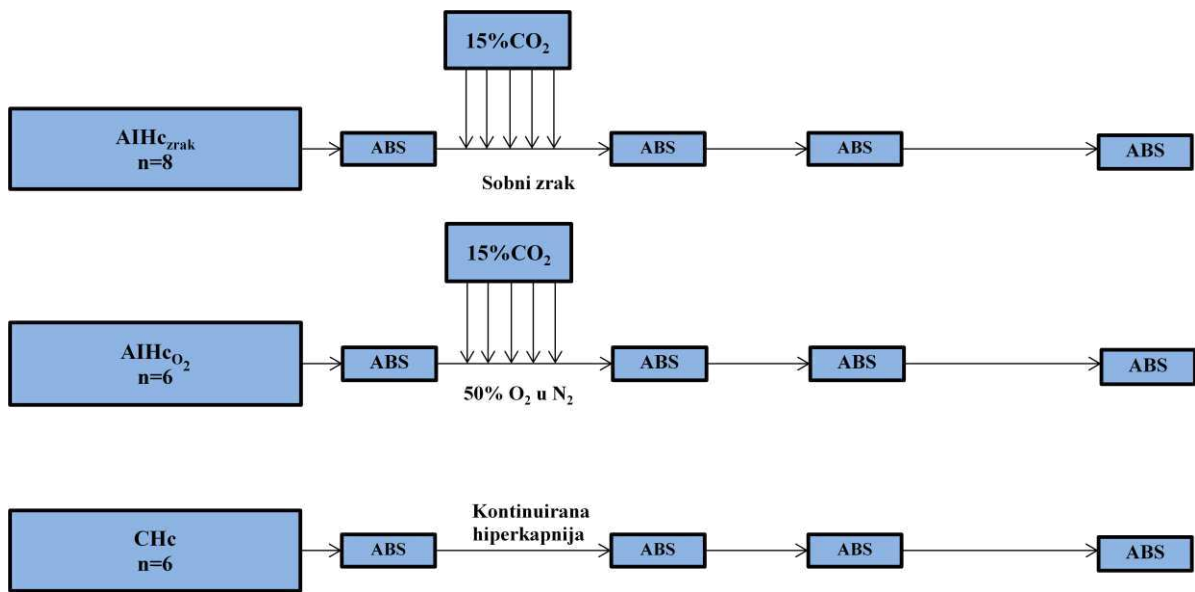
Nakon kirurške obrade pokusnih životinja, životinje su izložene eksperimentalnim protokolima u kojima je aktivnost freničkoga živca pri vrijednosti PaCO₂ 2-3 mmHg iznad apnejičkoga praga smatrana osnovnom aktivnošću, a postignuta je mijenjanjem postavki respiratora. U pokusnih životinja u studiji apnejički prag prosječno je iznosio 39–40 mmHg.

U prvom dijelu istraživanja životinje su podvrgnute hiperkapnijskom, hipoksijskom ili hiperkapnijsko-hipoksijskom protokolu.

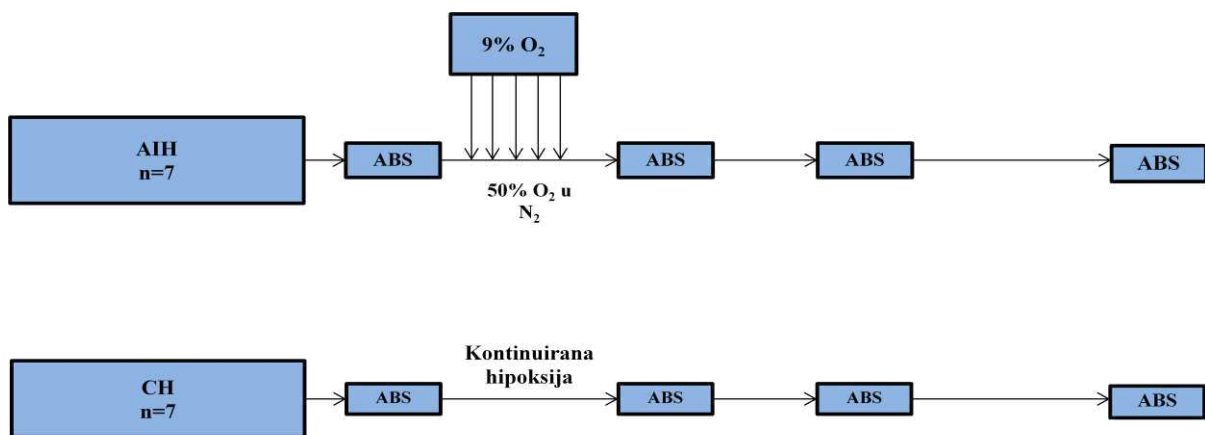
Hiperkapnijski protokol obuhvaća ponavljani podražaj u vidu 5 trominutnih akutnih hiperkapnija (15% CO₂) između kojih su životinje ventilirane sobnim zrakom ili mješavinom 50% O₂/N₂ ili kontinuirani hiperkapnijski podražaj koji traje neprekinuto 30 min (15% CO₂) nakon čega su životinje ventilirane smjesom 50% O₂/N₂.

U protokolu ponavljanih hipoksija životinje su pet puta izložene trominutnim hipoksijama (9% O₂) između kojih su ventilirane mješavinom 50% O₂/N₂ tijekom 3 minute, dok su u kontinuiranom podražaju izložene hipoksiji (9% O₂) u trajanju od 30 min. U hiperkapnijsko-hipoksijskom protokolu životinje su pet puta izložene trominutnim hiperkapnijsko-hipoksijskim (15% CO₂, 9% O₂) akutnim podražajima između kojih su 3 minute ventilirane smjesom 50% O₂/N₂.

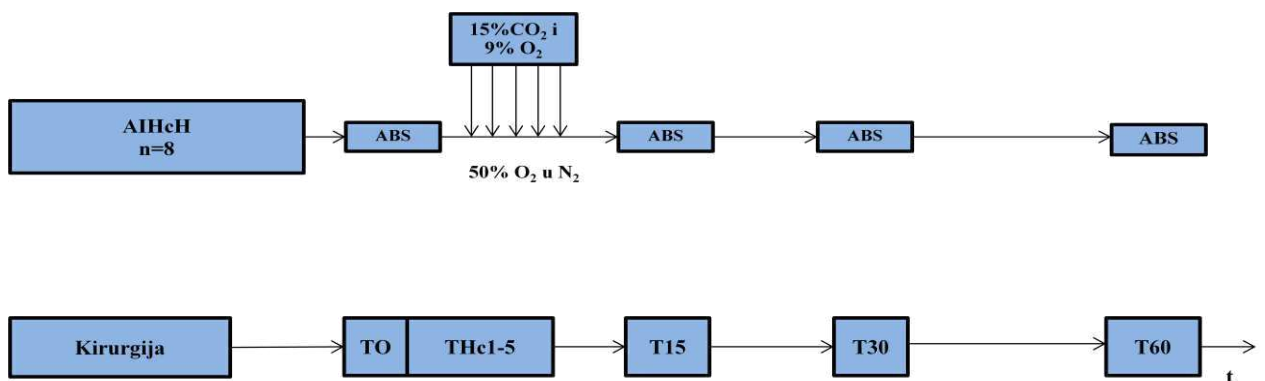
Hiperkapnijska skupina



Hipoksijska skupina

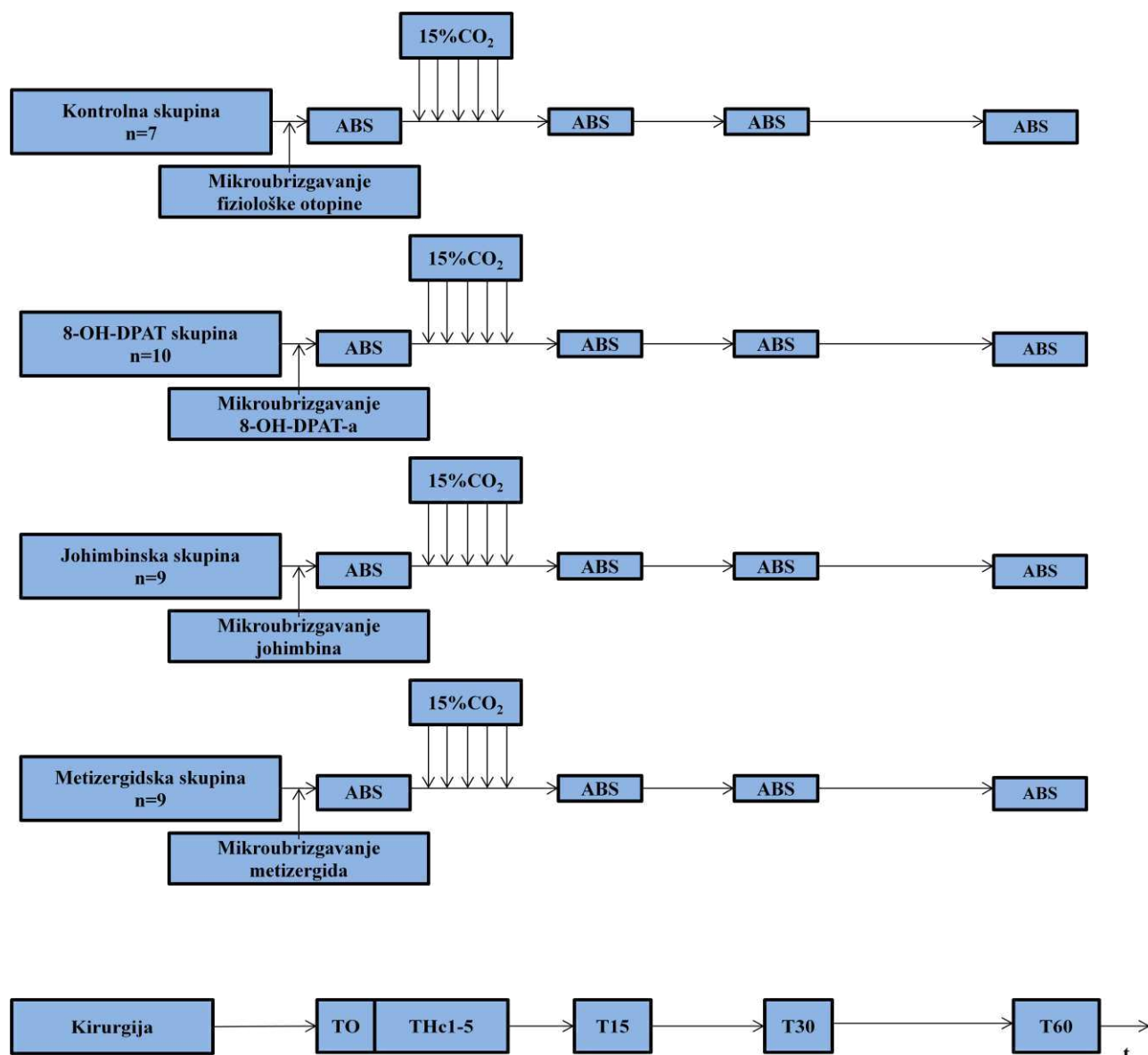


Kombinirana akutna hiperkapnijsko-hipoksijska skupina



Slika 4 . Prikaz hiperkapnijskih (AIHc_{zrak}, AIHc_{O₂} i CHc), hipoksijskih (AIH, CH) i ponavljano hiperkapnijsko-hipoksijskog protokola (AIHcH). Vrijeme uzimanja uzoraka arterijske krvi za acidobazni status (ABS).

U drugom dijelu istraživanja životinje su bile podijeljene u četiri skupine, skupinu 8-OH-DPAT, metizergidsku, johimbinsku i kontrolnu skupinu (Slika 5). Nakon identifikacije rafe jezgara mikroubrizgavanjem sinaptičkoga ekscitanta DLH, skupini 8-OH-DPAT (n=10) mikroubrizgan je agonist 5-HT_{1A} receptora u isto područje; metizergidskoj skupini (n=9) neselektivni antagonist serotoninskih receptora, a johimbinskoj skupini (n=9) antagonist α 2-adrenergičkih receptora. Dvije minute nakon mikroubrizgavanja započeo bi AIHc protokol koji obuhvaća ponavljani podražaj 5 trominutnih akutnih hiperkapnija (15% CO₂) između kojih su životinje ventilirane mješavinom 50% O₂/N₂. Kontrolnoj skupini životinja (n=7) umjesto navedenih neuromodulatora ubrizgana je jednaka količina fiziološke otopine (20 ± 5 nL) nakon prethodnoga identificiranja područja s pomoću DLH. Dvije minute nakon mikroubrizgavanja fiziološke otopine, započeo bi AIHc protokol.

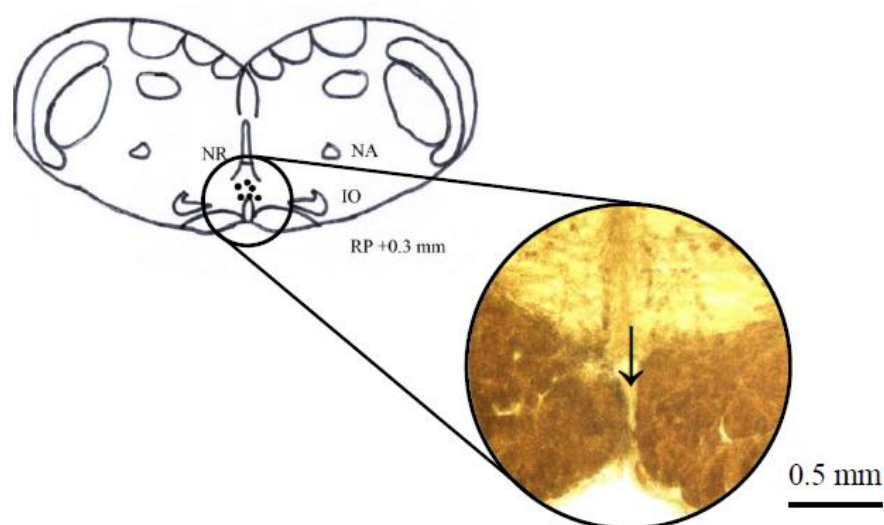


Slika 5. Protokol drugog dijela istraživanja u kojem su 8-OH-DPAT, johimbin i metizergid mikroubrizgavani u kaudalno rafe područje dok je kontrolnoj skupini mikroubrizgana fiziološka otopina. Vrijeme prije početka prve hiperkapnije (T0); pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-5), te 15, 30 i 60 minuta (T15, T30, T60) nakon posljednje hiperkapnije; vrijeme uzimanja uzoraka arterijske krvi za acidobazni status (ABS).

4.2. HISTOLOŠKA POTVRDA MJESTA UBRIZGAVANJA

Po završetku pokusa štakori u kojih je vršeno mikroubrizgavanje u rafe područje su transkardijalno perfundirani Zambonijevim fiksativom (2% formalin i 15% zasićena pikrična kiselina u 0,1 M fosfatnom puferu, PBS-u). Perfuzijskom fiksacijom uz pomoć krvožilnog sustava doboko anestezirane životinje fiksativ se raspodjeli kroz cijelo tijelo, pa tako i u tkivo koje planiramo kasnije koristiti u istraživanju. Postupak perfuzijske fiksacije obuhvaća uspavljivanje životinje, perfuziju fosfatnim puferom, perfuziju fiksativom, te izolaciju tkiva za daljnje pokuse uz naknadnu postfiksaciju tkiva. Anesteziranom štakoru škaricama su otvorene abdominalna i torakalna šupljina, te se prikažu jetra i srce. U lijevu klijetku umetnuta je igla debljine 23G, a desna pretklijetka bila je presječena škaricama kako bi se omogućilo otjecanje krvi iz krvožilnog sustava. Najprije je provedena fiksacija sa 30 mL hladnog fosfatnog pufera (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), sastava 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM KH₂PO₄, pH=7,4, +4°C. Pred kraj perfuzije fosfatnim puferom iz desne pretklijetke otjecala je prozirna tekućina, a jetra je bila blijede, žućkaste boje što nam je ukazivalo da smo adekvatno isprali krvožilni sustav puferom. Potom je uslijedila perfuzija hladnim fiksativom volumena 30 ml. Na kraju fiksacije tijelo miša bilo je tvrdo i rigidno, što je bio znak dobro provedene fiksacije.

Potom su im mozgovci izvađeni i pohranjeni u Zambonijevom fiksativu 24 sata na 4° C te zatim isprani PBS-om. Izvađeni i fiksirani mozgovci rezani su vibratomom (Vibratome Series 1000, Pelco® 101; Vibratome, St. Louis, MO, SAD) na poprečne rezove debljine 50 µm, koji su služili za histološku rekonstrukciju mjesta mikroubrizgavanja. Nativni rezovi promatrani su s pomoću mikroskopa te je mjesto mikroubrizgavanja određeno na temelju udaljenosti od poznatih anatomskih struktura (Slika 6). Na taj način određena je podudarnost mjesta mikroubrizgavanja s elektrofiziološkim odgovorom nakon mikroubrizgavanja u područje kaudalnih rafe jezgara.



Slika 6. Fotomikrografski poprečni presjek kroz kaudalno rafe područje, ilustrirajući mjesto ubrizgavanja (strelica) u kojem je provedeno mikroinjiciranje.

Nucleus Raphe - **NR**; Nucleus Ambiguus - **NA**; Inferior Olivary Nucleus - **IO**; Raphe Pallidus – **RP** udaljena 0,3 mm od obexa.

4.3. UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA

4.3.1. Aktivnost freničkoga živca

Signal freničkoga živca je pojačan (Super Z & System 1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD), filtriran (pojasni filter 300 Hz – 10 kHz) i pročišćen. Prosječne vrijednosti aktivnosti freničkoga živca tijekom vremena praćene su s pomoću MA-1000 Moving Averager, System 1000 Modular Instrumentation (CWE Inc., Ardmore, SAD) s vremenskom konstantom 50 ms. Dobiveni signal – frenički neurogram (PNG) sniman je s pomoću PowerLab sustava (ADInstruments, Castle Hill, Australija) i analiziran u PowerLab softveru, Chart for Windows verzija 5.4.2 i Scope for Windows verzija 3.8 (ADI Instruments, Castle Hill, Australija).

U istraživanju analizirana je vršna aktivnost freničkoga živca (pPNA), frekvencija disanja (f), trajanje inspirija (T_i), ekspirija (T_e) i ukupno trajanje respiracijskog ciklusa (T_{tot} ; $T_i+T_e=T_{tot}$), te srednji arterijski tlak (engl. *Mean Arterial Pressure*, MAP). Navedeni parametri analizirani su usrednjavanjem vrijednosti u vremenskom intervalu od 20 sekunda u određenim vremenskim točkama: prije prve hipoksije/hiperkapnije (T_0), za vrijeme pet hipoksijskih/hiperkapnijskih epizoda (T_{H1-5}), te 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) i 60 (T_{60}) minuta nakon kraja posljednje hipoksije/hiperkapnije. Vrijednosti pPNA uspoređene su kao postotne promjene od početne vrijednosti u svake pojedine životinje.

4.3.2. Statistička obrada

Sve vrijednosti navedene su kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška. Dobiveni rezultati obrađeni su u statističkom paketu MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgija). Od testova je korištena ANOVA za ponavljana mjerenja (za usporedbe unutar skupina i među skupinama u istim vremenskim točkama tijekom pokusa), uz Bonferroni post-hoc korekciju. Statistički značajnom smatrana je P vrijednost $<0,05$.

4.4. ETIČKA NAČELA

Pokusi navedeni u prijavi prethodno su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u okviru znanstveno istraživačkih projekata „Promjene disanja i simpatičke živčane aktivnosti prilikom ponavljanih hipoksija-uloga serotonina“ (voditeljica prof. dr. sc. Maja Valić) te „Translacijska istraživanja neuroplastičnosti disanja i učinak intermitentne hipoksije na anesteziju i spavanje“ (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš). Prikladni model za izvođenje ovih pokusa je štakor anesteziran uretanom. Svi kirurški postupci izvode se na životinjama u anesteziji odgovarajućeg stupnja prema etičkim načelima. Eutanazija životinja po završetku protokola vrši se predoziranjem anestetikom te intravenskom primjenom zasićene otopine kalijevog klorida u životinja u kojih se ispitivani lijek primjeni intravenski, prema naputcima American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia. U štakora u kojih se vrši mikroubrizgavanje i histološka

potvrda mjesta mikroubrizgavanja, eutanazija se izvodi transkardijalnom perfuzijom Zambonijevim fiksativom pri dubokoj anesteziji.

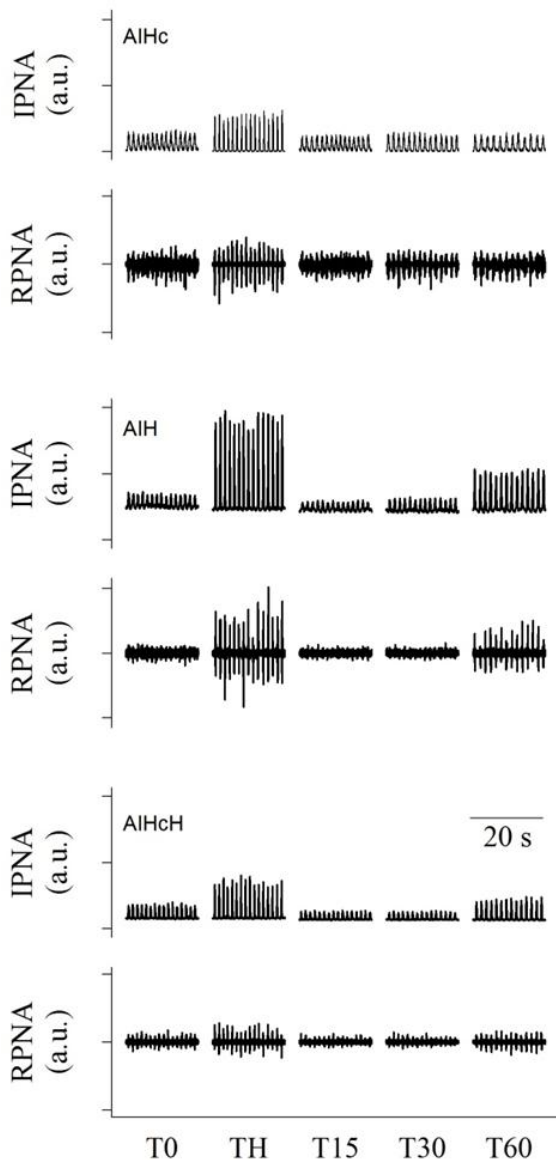
5. REZULTATI

5.1. STUDIJA 1-UTJECAJ RAZLIČITIH PROTOKOLA NA RAZVOJ RESPIRACIJSKE PLASTIČNOSTI

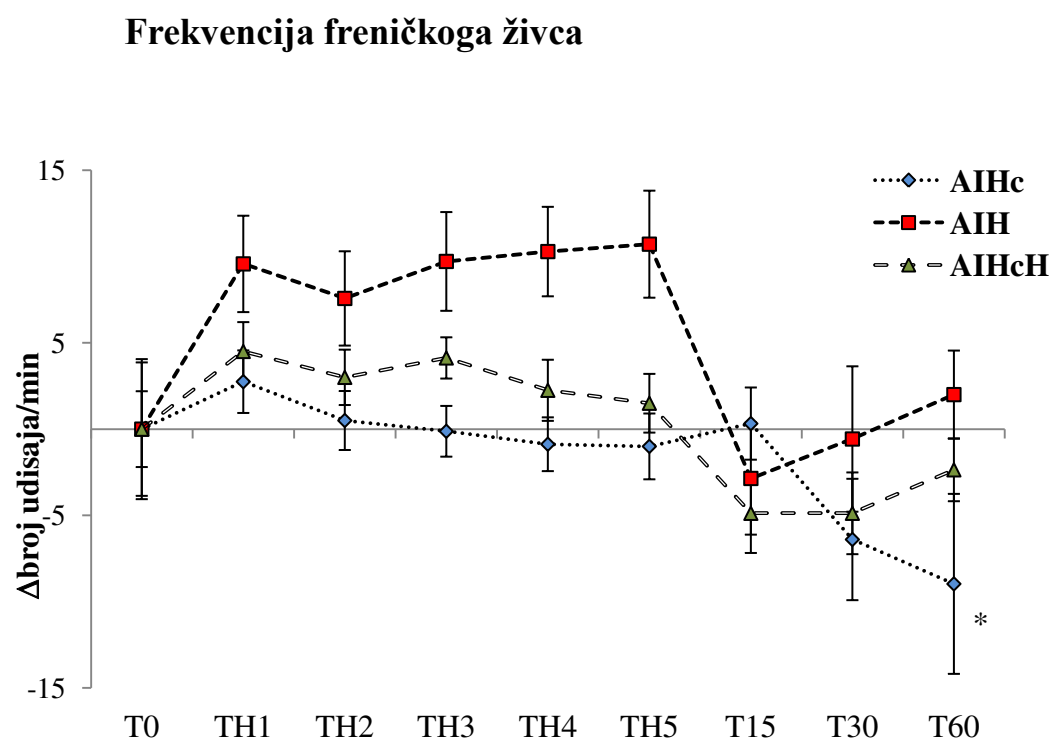
5.1.1. Utjecaj hiperkapnijskog protokola

Akutna ponavljana hiperkapnija izazvala je smanjenje frekvencije freničkoga živca 60 minuta nakon kraja posljednjeg hiperkapnijskog podražaja, odnosno frekvencija freničkoga živca smanjila se sa 44.25 ± 4.06 udisaja/min u vremenu T0 na 35.29 ± 5.21 udisaja/min u vremenu T60 u AIHc_{zrak} skupini životinja ($P=0.04$, Slika 7 i 8) dok se u AIHc_{O₂} skupini životinja smanjila sa 45.0 ± 2.62 udisaja /min u vremenu T0 na 37.17 ± 3.68 udisaja/min u vremenu T60 ($P=0.05$), pokazujući da je došlo do nastanka pLTD-a. Izloženost akutnom ponavljanom hiperkapnijskom podražaju nije izazvala statistički značajni pad pPNA 60 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije u odnosu na početne vrijednosti pPNA u T0 (smanjenje pPNA za $4.8 \pm 21.6\%$ u AIHc_{zrak} skupini, $P=1.00$; te smanjenje pPNA za $22.3 \pm 11.6\%$ u AIHc_{O₂} skupini, $P=0.67$) (Slike 7 i 9).

Izloženost protkolu kontinuirane hiperkapnije nije uzrokovala statistički značajne promjene frekvencije freničkoga živca 60 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije, odnosno frekvencija disanja u vremenu T0 bila je 40.29 ± 2.69 udisaja/min dok je u vremenu T60 bila 38.14 ± 2.04 ($P=1.00$). Također nije izazvala ni statistički značajne promjene pPNA 60 minuta nakon kraja hiperkapnijskog podražaja (povećanje pPNA za $39.3 \pm 30.2\%$, $P=1.00$).



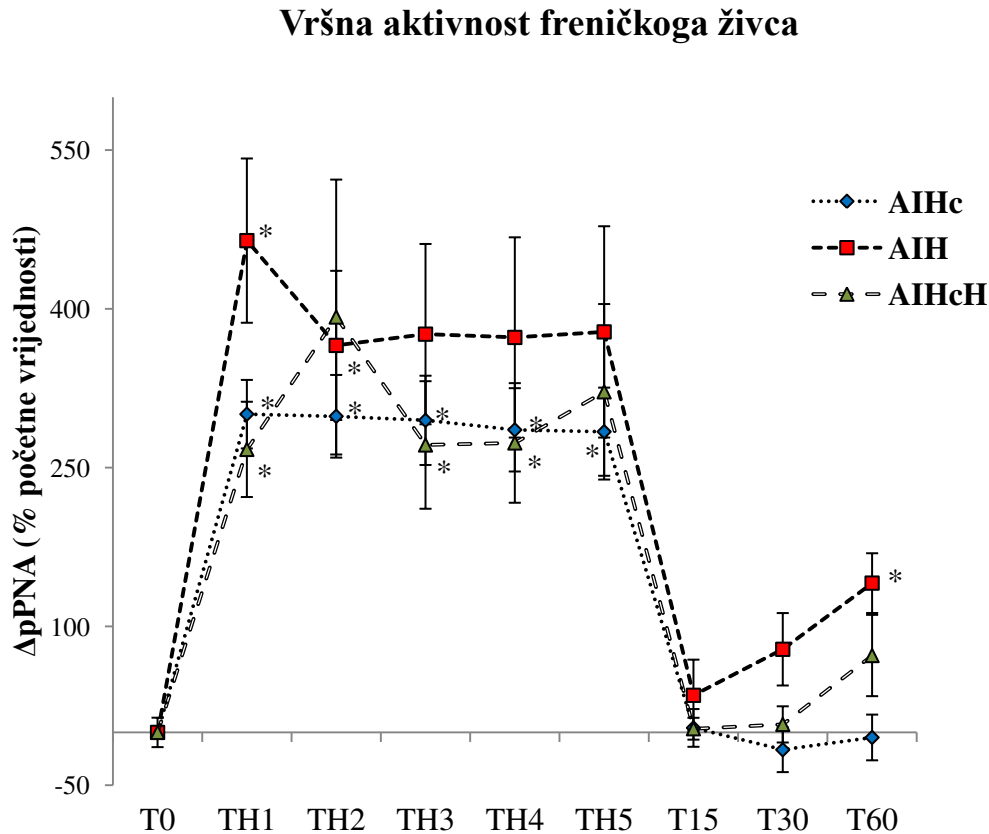
Slika 7. Integrirani signal freničkog živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA, arbitrarne jedinice, a.j) i neobrađeni signal aktivnosti freničkog živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*, RPNA, mikrovolti, μV) tijekom hiperkapnijskog (AIHc), hipoksijskog (AIH) i kombiniranog hiperkapnijsko-hipoksijskog podražaja (AIHcH). Štakor iz AIHc skupine bili je izložen akutnom ponavljanom hiperkapnijskom podražaju pri čemu je došlo do smanjenja frekvencije freničkoga živca u vremenu T60 (frekvencijski pLTD). Štakor iz AIH skupine bio je izložen akutnoj ponavljanoj hipoksiji pri čemu je nastao pLTF. Kombinirani hiperkapnijsko hipoksijski podražaj nije izazvao značajne promjene pPNA u T60. Aktivnost freničkog živca je prikazana u početnom vremenu (T0), za vrijeme hiperkapnijskog, hipoksijskog ili kombiniranog podražaja (TH) te 15 (T15), 30 (T30) i 60 (T60) minuta nakon kraja zadnjeg hiperkapnijskog, hipoksijskog ili kombiniranog podražaja.



Slika 8. Vremenski slijed pomjena frekvencije disanja u skupini životinja izloženoj hiperkapnijskom (AIHc), hipoksijskom (AIH) i kombiniranom hiperkapnijsko-hipoksijskom podražaju (AIHcH).

Akutna ponavljana hiperkapnija izazvala je nastanak depresije freničkog živca (pLTD) koja se manifestirala kao pad frekvencije 60 minuta nakon kraja posljednjeg hiperkapnijskog podražaja. T0 označava vrijeme prije hiperkapnijskog, hipoksijskog ili kombiniranog podražaja, TH1-5 vrijeme izloženosti hiperkapnijskom, hipoksijskom ili kombiniranom podražaju dok su T15, T30 i T60 vremena 15, 30 i 60 minuta nakon kraja posljednjeg hiperkapnijskoga, hipoksijskoga ili kombiniranog podražaja.

*Statistički značajno u odnosu na početne vrijednosti, $P < 0.05$.



Slika 9. Vremenski slijed promjena pPNA u skupinama izloženima hiperkapnijskom podražaju (AIHc), hipoksijskom podražaju (AIH) i kombiniranom hiperkapnijsko-hipoksijskom podražaju (AIHcH).

Izloženost AIH podražaju uzrokuje nastanak dugoročne facilitacije freničkog živca (pLTF). T0 označava vrijeme prije hiperkapnijskog, hipoksijskog ili kombiniranog podražaja, TH1-5 vrijeme izloženosti hiperkapnijskom, hipoksijskom ili kombiniranom podražaju dok su T15, T30 i T60 vremena 15, 30 i 60 minuta nakon kraja posljednjeg hiperkapnijskog, hipoksijskog ili kombiniranog podražaja.

*Statistički značajno u odnosu na početne vrijednosti, $P < 0.05$.

5.1.2. Utjecaj hipoksijskog protokola

Akutna ponavljana hipoksija nije izazvala statistički značajne promjene frekvencije freničkoga živca 60 minuta nakon kraja posljedne hipoksije, odnosno frekvencija u vremenu T0 bila je 37.71 ± 3.87 udisaja/min i 39.71 ± 2.55 udisaja/min u T60 ($P=1.00$; Slika 7 i 8). Ipak, akutna ponavljana hipoksija izazvala je povećanje pPNA u T60, odnosno pPNA se povećala za 141.0 ± 28.2 % u odnosu na početnu vrijednost ($P=0.02$; Slika 9), tj. nastao je pLTF.

Kontinuirana hipoksija nije izazvala statistički značajne promjene ni frekvencije freničkoga živca (43.71 ± 2.36 udisaja/min u T0 i 38.86 ± 2.73 udisaja/min u T60, $P=1.00$) ni pPNA (povećanje pPNA za 22.8 ± 47.4 %, $P=1.00$) 60 minuta nakon kraja hipoksijskoga podražaja.

5.1.3. Utjecaj kombiniranog hiperkapnijsko-hipoksijskog protokola

Kombinirani ponavljani hiperkapnijsko-hipoksijski podražaj nije izazvao statistički značajne promjene frekvencije freničkoga živca 60 minuta nakon kraja posljednjeg podražaja. Frekvencija freničkoga živca u AIHcH skupini bila je 40.5 ± 2.2 udisaja/min u vremenu T0 i 38.14 ± 1.82 udisaja/min u vremenu T60 ($P=1.00$; Slika 7 i 8). Kombinirani hiperkapnijsko-hipoksijski podražaj također nije izazvao statistički značajne promjene pPNA 60 minuta nakon kraja posljednjeg podražaja (povećanje pPNA za 72.6 ± 38.4 %, $P=1.00$; Slika 7 i 9).

5.1.4. Opći parametri

Promjena u parametrima ritma disanja (T_i , T_e i T_{tot}) izazvanih navedenim protokolima u vremenu T15, T30 i T60 minuta nakon kraja posljednjeg hiperkapnijskog, hipoksijskoga ili kombiniranog hiperkapnijsko-hipoksijskoga podražaja nije bilo ni u jednoj skupini životinja (Tablica 1).

Promjene parametara pPNA tijekom akutnih ponavljanih hiperkapnijskih (THc 1-5), hipoksijskih i kombiniranih hiperkapnijsko-hipoksijskih epizoda su prikazane u Slikama 7 i 9. Statistički značajnih promjena u frekvenciji freničkoga živca nije bilo (Slika 7 i 8).

Statistički značajnih promjena u parcijalnim tlakovima kisika i ugljičnog dioksida (PaO_2 i $PaCO_2$) te pH nije bilo ni u jednoj eksperimentalnoj skupini životinja što je prikazano u Tablici 2.

Srednji arterijski tlak (MAP) imao je tendenciju povećanja tijekom izloženosti hiperkapnijskom i kombiniranom hiperkapnijskom-hipoksijskom protokolu, dok se tijekom izloženosti hipoksijskom protokolu smanjivao. Prestankom djelovanja navedenih podražaja uspješno je održavan stabilnim u svim pokusnim skupinama životinja.

Tablica 1. Promjene u trajanju inspirija (Ti), ekspirija (Te) i cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot) u T0, T15, T30 i T60 u pokusnim skupinama.

	T0	T15	T30	T60
AIHc _{zrak} (n=8)				
Ti	0.487 ± 0.033	0.490 ± 0.037	0.507 ± 0.047	0.487 ± 0.038
Te	0.994 ± 0.198	0.867 ± 0,078	1.171 ± 0.160	1.630 ± 0.477
Ttot	1.481 ± 0.208	1.357 ± 0.067	1.678 ± 0.151	2.117 ± 0.500
AIHc _{O₂} (n=6)				
Ti	0.547 ± 0.039	0.588 ± 0.030	0.607 ± 0.052	0.562 ± 0.024
Te	0.800 ± 0.063	1.049 ± 0.099	0.906 ± 0.162	1.135 ± 0.171
Ttot	1.347 ± 0.065	1.637 ± 0.110	1.513 ± 0.130	1.697 ± 0.166
AIH (n=7)				
Ti	0.478 ± 0.032	0.527 ± 0.029	0.506 ± 0.035	0.466 ± 0.034
Te	1.292 ± 0.277	1.364 ± 0.294	1.343 ± 0.345	1.121 ± 0.130
Ttot	1.759 ± 0.288	1.883 ± 0.299	1.855 ± 0.355	1.589 ± 0.147
AIHcH (n=8)				
Ti	0.598 ± 0.042	0.593 ± 0.034	0.657 ± 0.035	0.513 ± 0.030
Te	0.860 ± 0.071	1.073 ± 0.106	1.050 ± 0.120	1.034 ± 0.075
Ttot	1.458 ± 0.073	1.657 ± 0.103	1.704 ± 0.133	1.548 ± 0.062

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot). Točka prije prve hiperkapnije ili hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30) i 60 min (T60) nakon kraja posljednje hiperkapnije ili hipoksije.

*Statistički značajno u odnosu na početnu vrijednost (P<0.05)

Tablica 1. Promjene u trajanju inspirija (Ti), ekspirija (Te) i cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot) tijekom pet respiracijskih podražaja (hiperkapnijski, hipoksijski ili hiperkapnijsko-hipoksijski) u eksperimentalnim skupinama.

	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
AIHc _{zrak} (n=8)					
Ti	0.347 ± 0.010	0.333 ± 0.008	0.328 ± 0.008	0.332 ± 0.009	0.332 ± 0.010
Te	0.947 ± 0.058	1.022 ± 0.053	1.044 ± 0.047	1.050 ± 0.046	1.073 ± 0.052
Ttot	1.294 ± 0.054	1.355 ± 0.051	1.372 ± 0.045	1.382 ± 0.046	1.405 ± 0.054
AIHc _{O₂} (n=6)					
Ti	0.350 ± 0.006	0.341 ± 0.011	0.347 ± 0.009	0.345 ± 0.007	0.354 ± 0.010
Te	0.878 ± 0.037	0.956 ± 0.045	0.958 ± 0.047	0.969 ± 0.044	0.972 ± 0.047
Ttot	1.228 ± 0.031	1.297 ± 0.038	1.305 ± 0.039	1.314 ± 0.038	1.326 ± 0.043
AIH (n=7)					
Ti	0.347 ± 0.020*	0.378 ± 0.023*	0.378 ± 0.018*	0.384 ± 0.017*	0.386 ± 0.017
Te	0.948 ± 0.093	0.925 ± 0.105	0.917 ± 0.085	0.881 ± 0.082	0.864 ± 0.085
Ttot	1.296 ± 0.087	1.302 ± 0.089	1.296 ± 0.072	1.267 ± 0.070	1.250 ± 0.074
AIHcH (n=8)					
Ti	0.371 ± 0.012*	0.354 ± 0.011	0.366 ± 0.015	0.381 ± 0.016	0.368 ± 0.009
Te	0.958 ± 0.049	1.042 ± 0.074	0.979 ± 0.054	1.047 ± 0.058	1.023 ± 0.058
Ttot	1.328 ± 0.042	1.395 ± 0.067	1.347 ± 0.045	1.428 ± 0.061	1.391 ± 0.058

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot). Prikazano je po 5 hiperkapnijskih, hipoksijskih epizoda ili hiperkapnijsko-hipoksijskih epizoda (TH1-TH5).

*Statistički značajno u odnosu na početnu vrijednost (P<0.05).

Tablica 1. Promjene u trajanju inspirija (Ti), ekspirija (Te) i cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot) tijekom trajanja kontinuiranog podražaja (hiperkapnijski ili hipoksijski) u eksperimentalnim skupinama.

	T0	TH	T15	T30	T60
CHc (n=7)					
Ti	0.578 ± 0.054	0.401 ± 0.024*	0.569 ± 0.051	0.731 ± 0.167	0.593 ± 0.060
Te	0.958 ± 0.115	0.886 ± 0.058	1.035 ± 0.066	1.151 ± 0.176	1.007 ± 0.132
Ttot	1.536 ± 0.122	1.287 ± 0.046	1.604 ± 0.101	1.882 ± U	1.600 ± 0.136
CH (n=7)					
Ti	0.470 ± 0.057	0.400 ± 0.021	0.567 ± 0.041	0.567 ± 0.039	0.565 ± 0.039
Te	0.888 ± 0.063	0.799 ± 0.068	0.960 ± 0.073	0.895 ± 0.042	0.927 ± 0.054
Ttot	1.358 ± 0.063	1.199 ± 0.054	1.527 ± 0.084	1.462 ± 0.032	1.492 ± 0.084

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot). Točka prije kontinuiranog podražaja (T0), tijekom podražaja (TH), te 15 min (T15), 30 min (T30) i 60 min (T60) nakon kraja kontinuiranog podražaja.

*Statistički značajno u odnosu na početnu vrijednost (P<0.05).

Tablica 2. Parcijalni tlakovi ugljičnog dioksida (PaCO₂), kisika (PaO₂), and pH u arterijskoj krvi u svim eksperimentalnim skupinama životinja.

	T0			T15		
	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH
AIHc _{zrak} (n=8)	42.9 ± 0.8	73.2 ± 6.0	7.3 ± 0.02	47.1 ± 2.3	83.7 ± 8.2	7.3 ± 0.03
AIHc _{O₂} (n=6)	41.7 ± 1.3	258.9 ± 11.7	7.3 ± 0.02	44.5 ± 2.0	258.1 ± 20.0	7.3 ± 0.03
CHc (n=7)	44.1 ± 0.9	80.7 ± 5.9	7.3 ± 0.03	44.1 ± 1.6	92.7 ± 8.7	7.3 ± 0.03
AIH (n=7)	42.0 ± 0.5	226.2 ± 17.0	7.3 ± 0.03	41.7 ± 1.3	251.2 ± 10.0	7.3 ± 0.03
CH (n=7)	43.6 ± 1.8	254.7 ± 5.1	7.3 ± 0.01	41.8 ± 1.6	275.9 ± 3.6	7.2 ± 0.02
AIHcH(n=8)	44.7 ± 0.7	262.6 ± 7.5	7.3 ± 0.01	45.3 ± 0.9	270.9 ± 7.1	7.2 ± 0.01

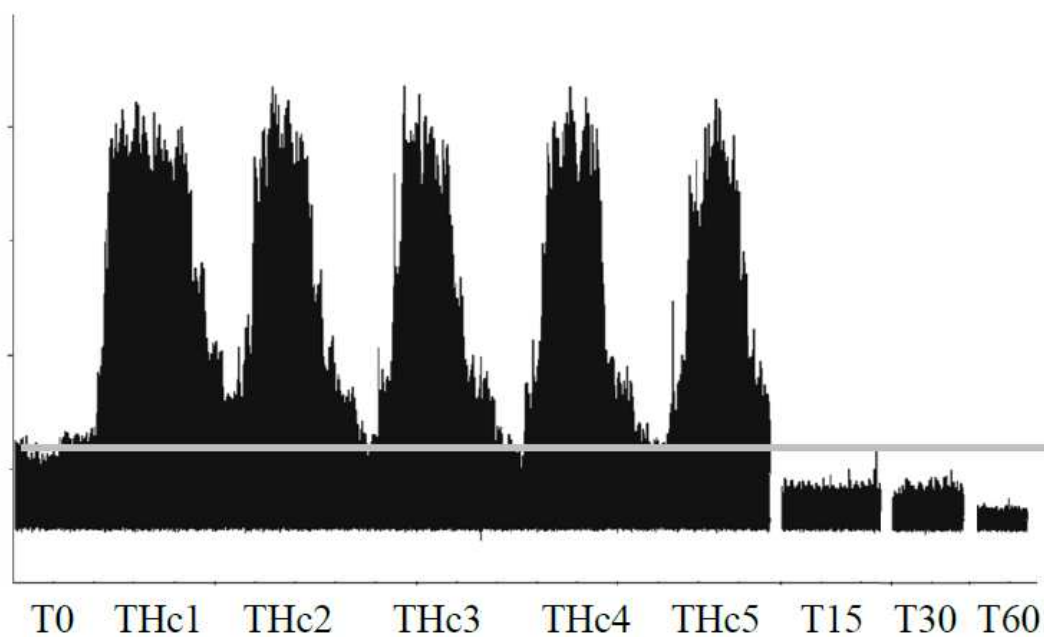
	T30			T60		
	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH
AIHc _{zrak} (n=8)	40.6 ± 2.0	89.2 ± 8.7	7.2 ± 0.1	42.6 ± 1.6	81.9 ± 10.1	7.3 ± 0.02
AIHc _{O₂} (n=6)	42.1 ± 1.6	278.0 ± 8.7	7.3 ± 0.02	40.4 ± 1.1	263.4 ± 12.9	7.3 ± 0.04
CHc (n=7)	43.5 ± 1.2	92.0 ± 8.5	7.3 ± 0.03	41.8 ± 1.2	92.8 ± 8.9	7.3 ± 0.03
AIH (n=7)	40.3 ± 1.3	253.2 ± 9.0	7.2 ± 0.03	41.7 ± 1.4	238.5 ± 13.5	7.2 ± 0.04
CH (n=7)	39.9 ± 1.0	270.0 ± 3.6	7.3 ± 0.03	40.3 ± 1.3	274.1 ± 4.9	7.2 ± 0.04
AIHcH(n=8)	43.1 ± 0.8	276.4 ± 6.6	7.2 ± 0.02	43.9 ± 0.9	252.2 ± 18.8	7.2 ± 0.02

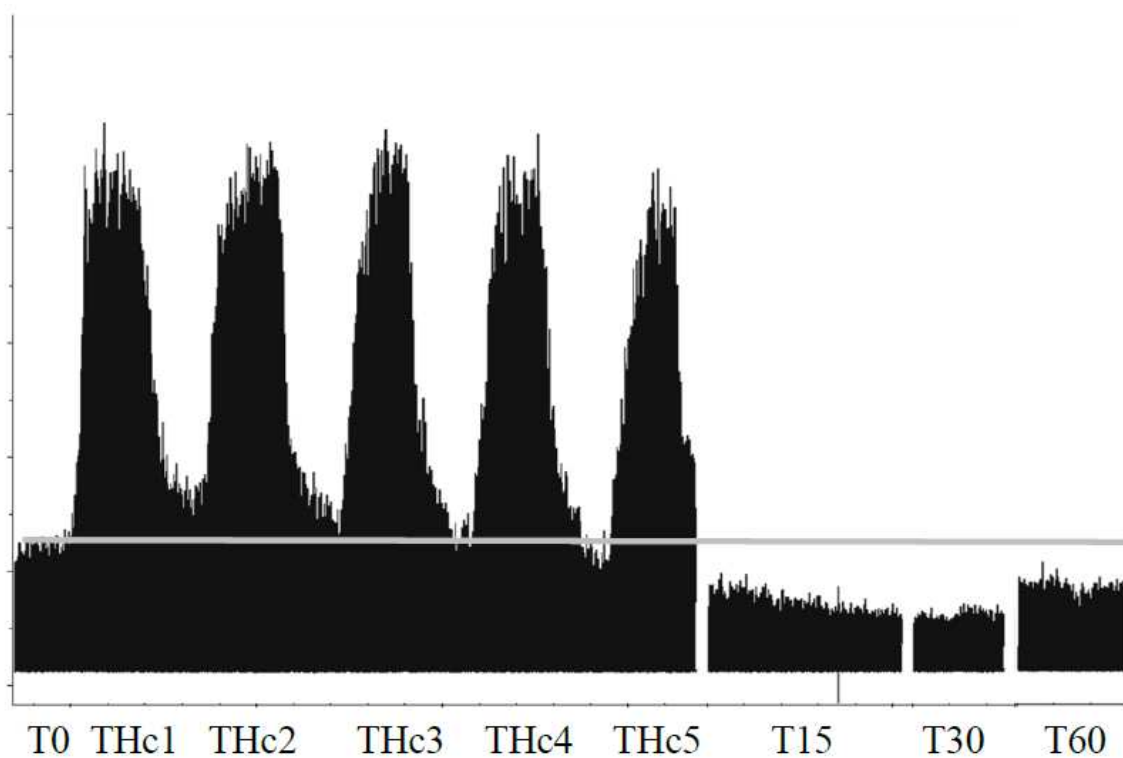
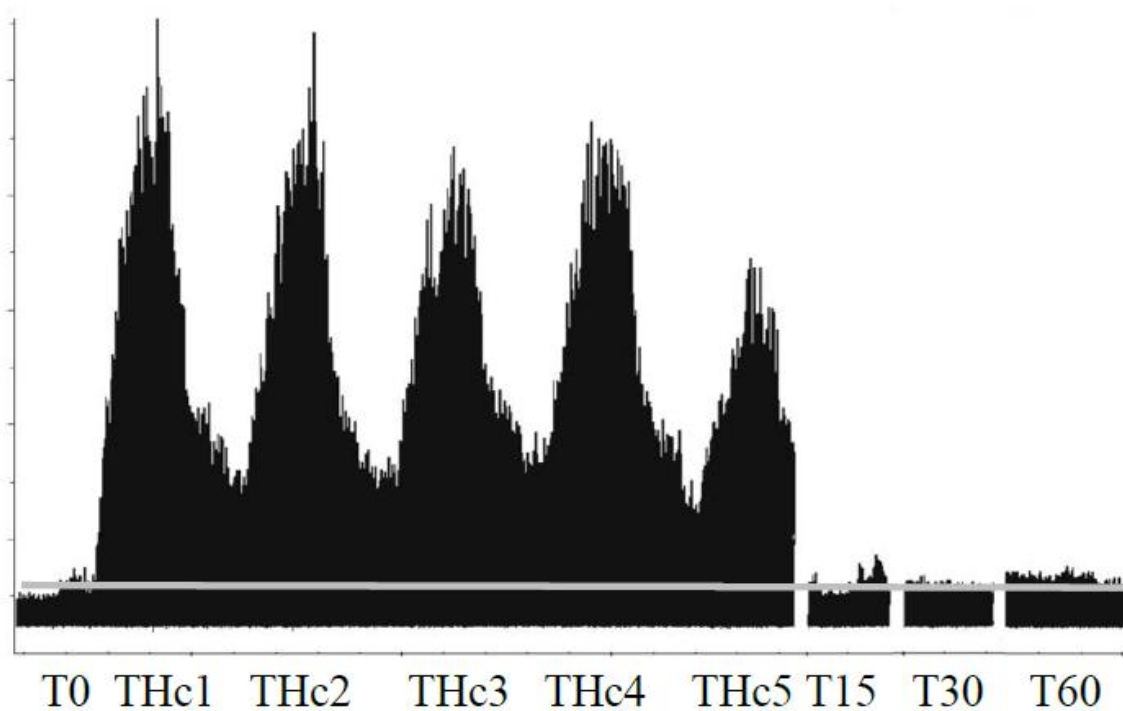
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. T0: točka prije prve hiperkapnije; T15, T30, i T60: 15, 30 i 60 minuta nakon kraja posljednjeg podražaja.

5.2. STUDIJA 2 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} I α 2-ADRENERGIČNIH RECEPTORA U PODRUČJU KAUDALNIH RAJE JEZGARA U RAZVOJU DUGOROČNE DEPRESIJE FRENIČKOG ŽIVCA

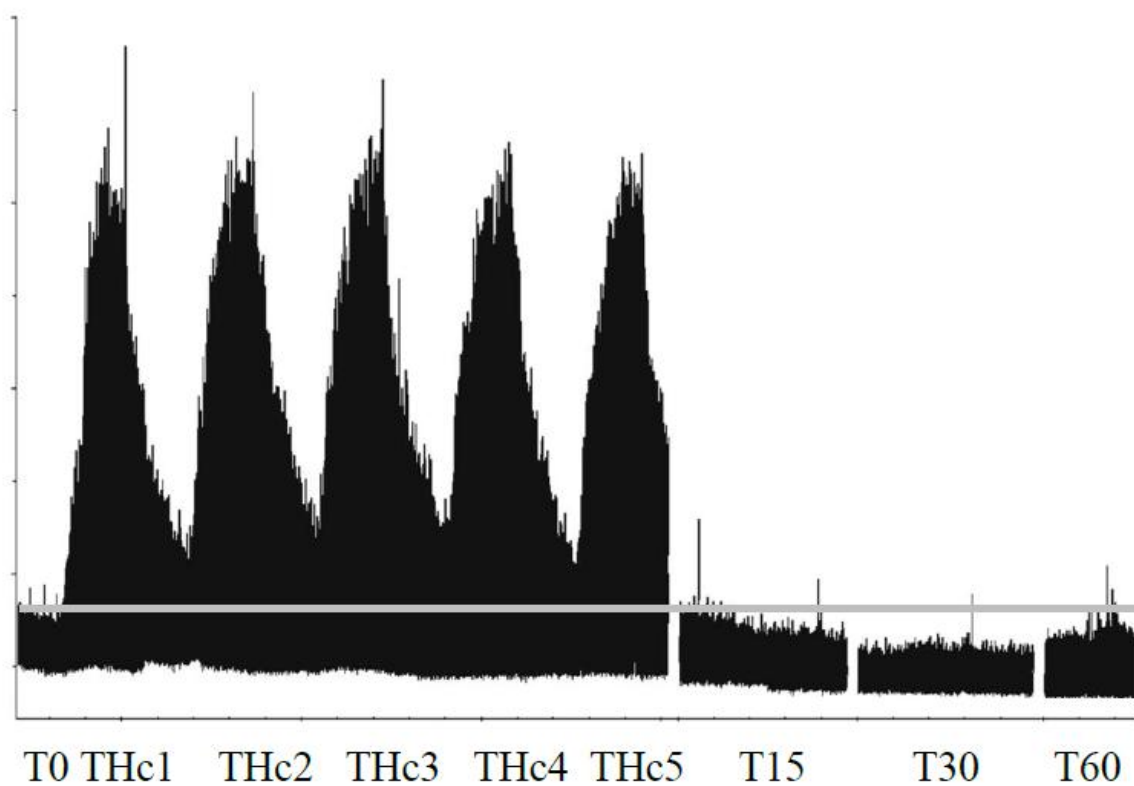
Mikroubrizgavanjem selektivnog 5-HT_{1A} agonista u područje kaudalnih rafe jezgara, nakon izloženosti protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, došlo je do nastanka pLTD-a (Slika 10 B, E; Slika 11 A, B).

A) Kontrolna skupina

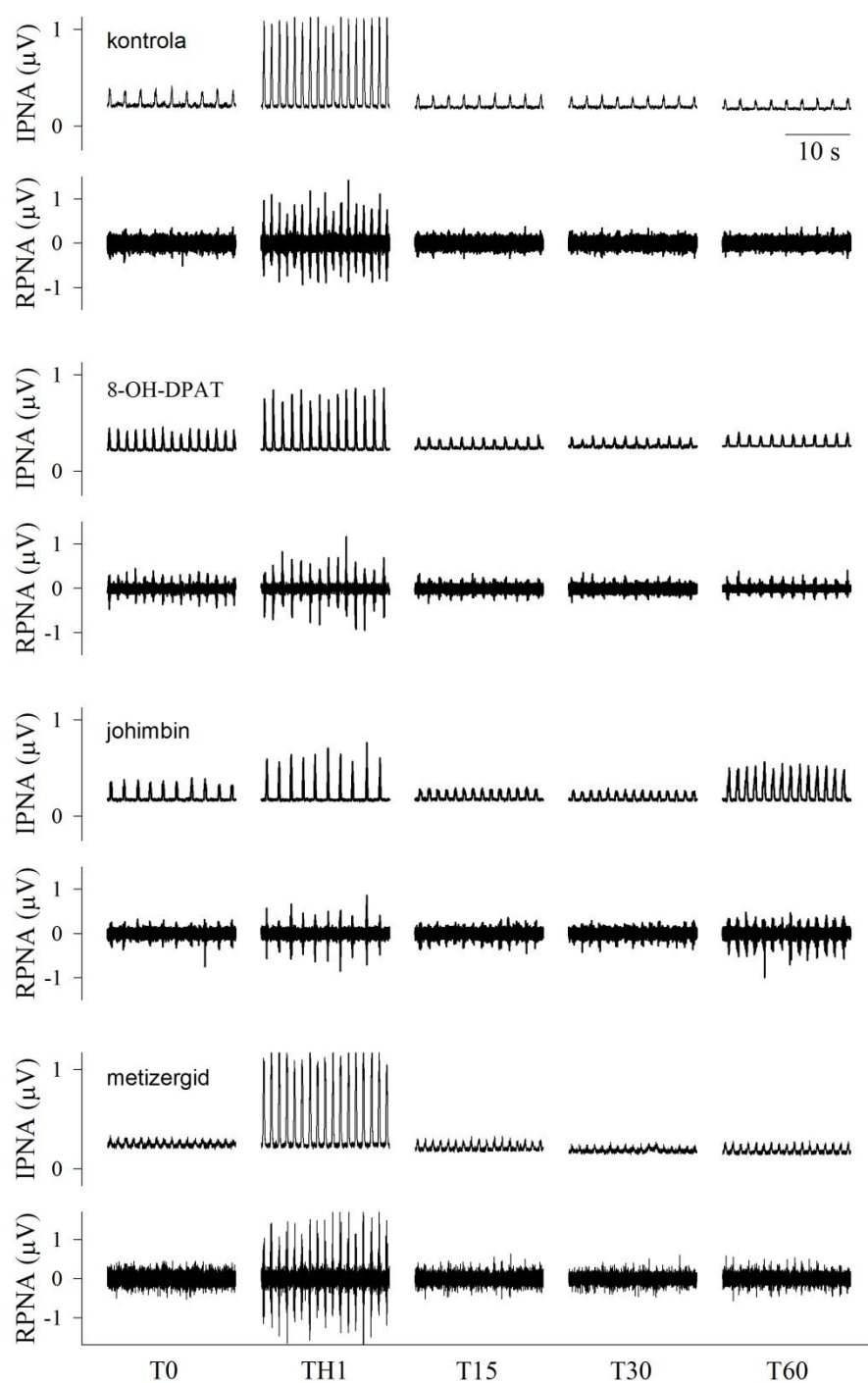


B) 8-OH-DPAT skupina**C) Johimbinska skupina**

D) Metizergidska skupina



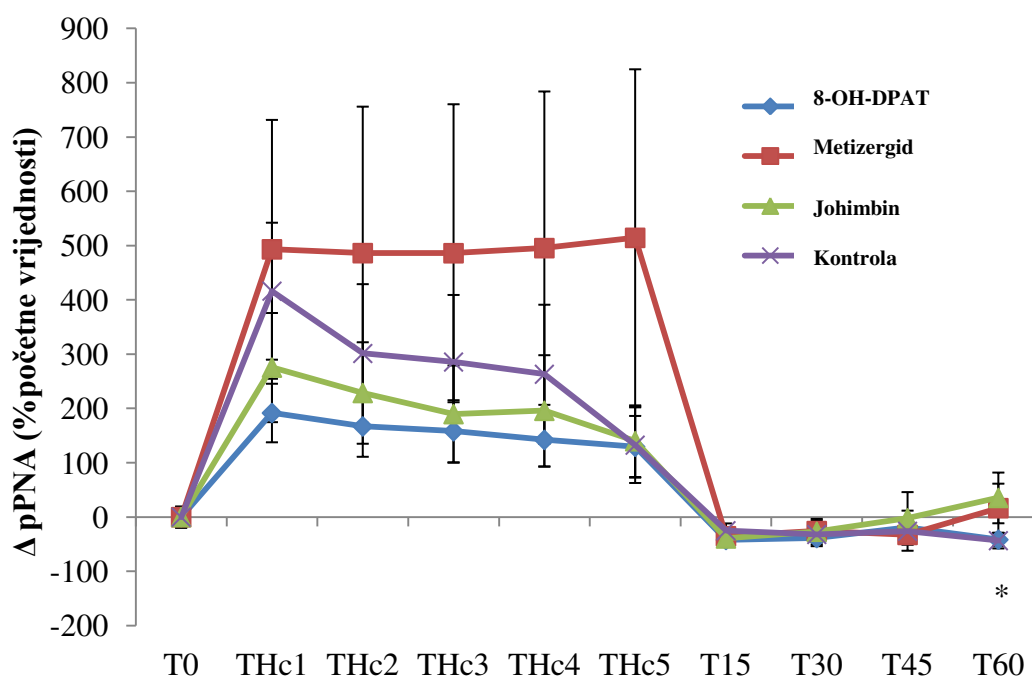
Slika 10 A, B, C, D: Komprimirani neurogram freničnog živca tijekom trajanja pokusa u kontrolnoj, 8-OH-DPAT-skoj, johimbinskoj i metizergidskoj skupini životinja.



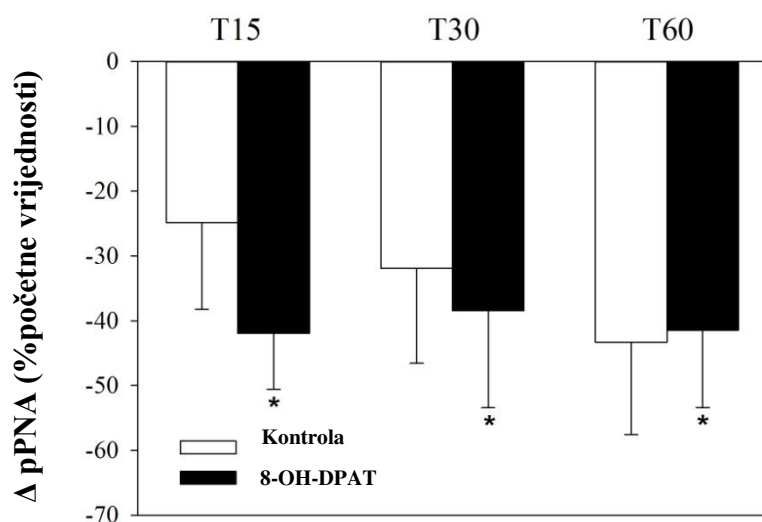
Slika 10 E: Integrirani signal freničkog živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA, mikrovolti, μV) i neobrađeni signal aktivnosti freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve activity*, RPNA, mikrovolti, μV) u jednoj pokusnoj životinji iz svake skupine. U životinja kontrolne i 8-OH-DPAT skupine vidljiv je nastanak pLTD-a, odnosno smanjenje pPNA. U životinja kojima je mikroubrizgavan johimbin i metizergid nije se razvio pLTD.

A

Vršna aktivnost freničkoga živca

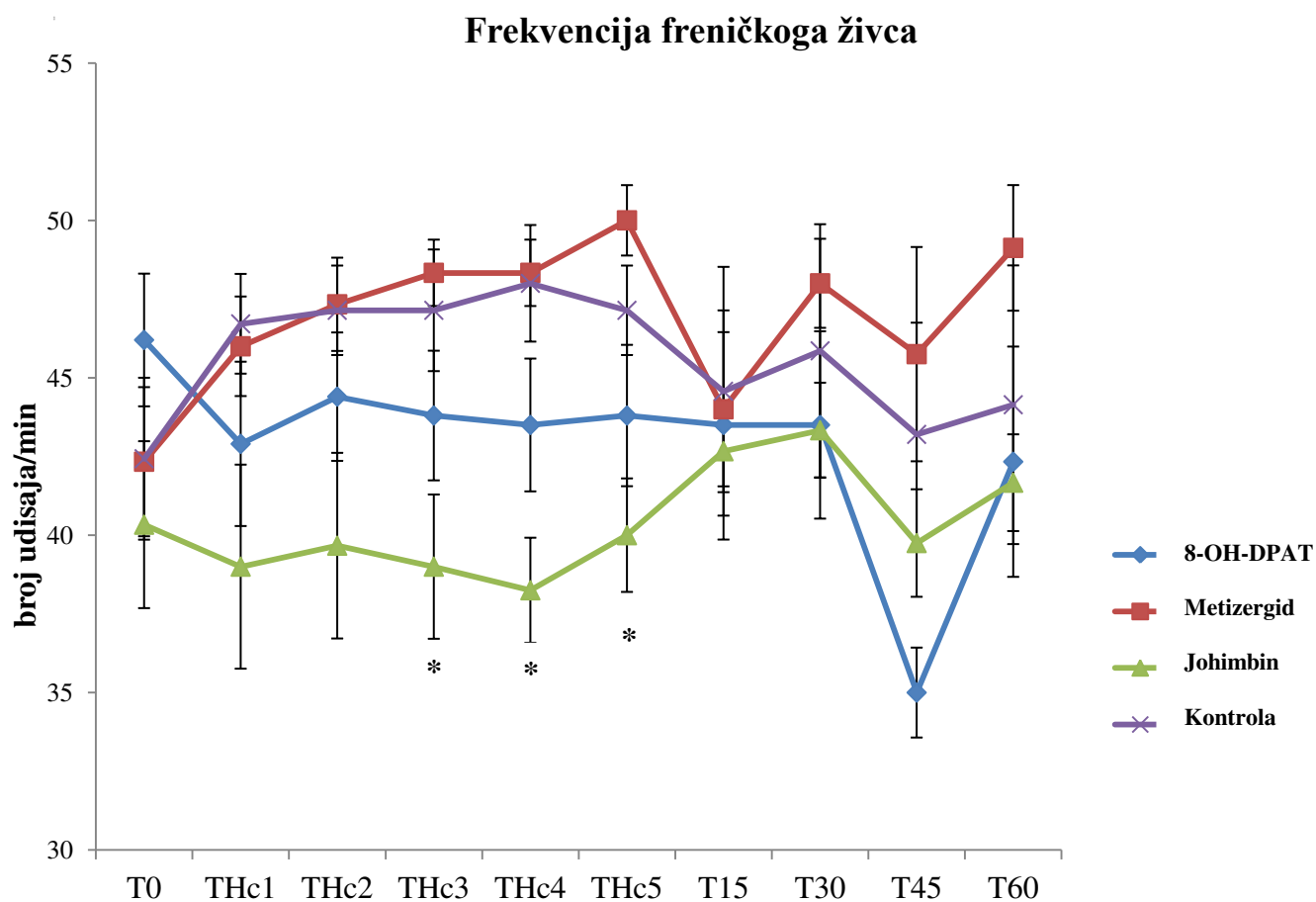


B



Slika 11: Vremenski slijed promjena pPNA u kontrolnoj i pokusnim skupinama.

Podsljka A: Vremenski slijed promjena pPNA u kontrolnoj i 8-OH-DPAT skupini prikazuje nastanak pLTD-a u T60 ($P=0.013$) dok u metizergidskoj i johimbinskoj skupini nije došlo do nastanka pLTD-a. **Podsljka B:** Grafički prikaz promjena pPNA u kontrolnoj i 8-OH-DPAT skupini u vremenu 15 (T15), 30 (T30), i 60 (T60) minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije. (*statistički značajna razlika od početnih uvjeta, $P<0.05$).



Slika 12. Vremenski slijed pomjena frekvencije disanja u kontrolnoj i pokusnim skupinama. Nije bilo statistički značajnih promjena u frekvenciji disanja (*statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu, $P < 0.05$).

Kontrolna skupina

U kontrolnoj skupini, akutna ponavljana hiperkapnija izazvala je pLTD 60 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije (Slika 10 A, E i 11 A, B), smanjenje pPNA za $43.31 \pm 14.28 \%$, ($P=0.02$) u usporedbi s početnim vrijednostima. Aktivnost freničkog živca nije se statistički značajno mijenjala 15 i 30 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnijske epizode (Slika 10 A, B i 11 A, B), pPNA se smanjio za $24.86 \pm 13.36 \%$ ($P=0.11$) i za $31.91 \pm 14.66 \%$ ($P=0.07$). Statistički značajnih promjena u frekvenciji freničkog živca nije bilo u vremenu 15 (44.57 ± 3.95 udisaja/min), 30 (45.86 ± 4.02 udisaja/min), i 60 (44.14 ± 4.43 udisaja/min) minuta nakon kraja posljednje hiperkapnijske epizode (42.43 ± 2.57 udisaja/min) (Slika 12; $P=1.00$).

8-OH-DPAT skupina

U skupini životinja kojoj je mikroubrizgavan 8-OH-DPAT u područje kaudalnih rafe jezgara, razvio se statistički značajan pLTD 15 ($41.95 \pm 8.62\%$, $P=0.01$), 30 ($38.45 \pm 14.96\%$, $P=0.03$), i 60 ($41.47 \pm 11.9\%$, $P=0.01$) minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije u usporedbi sa početnom vrijednošću pPNA (Slika 10 B, E i 11 A, B). Značajnih promjena u frekvenciji disanja u T15 (43.50 ± 3.64 udisaja/min), T30 (43.50 ± 2.97 udisaja/min), i T60 (42.33 ± 3.66 udisaja/min) nakon kraja posljednje hiperkapnije (46.20 ± 2.11 udisaja/min) nije bilo ($P=1.00$) (Slika 12).

Johimbinska skupina

U skupini kojoj je bio mikroubrizgavan antagonist α_2 -adrenergičnih receptora johimbin, akutna ponavljana hiperkapnija izazvala je prolazno smanjenje aktivnosti freničkog živca u vremenu T15 (pPNA smanjenje za $39.2 \pm 14.6\%$, $P=0.03$), ali nije bilo statistički značajnih promjena pPNA u vremenu T30 (smanjenje za $26.85 \pm 23.68\%$) i T60 (povećanje za $35.47 \pm 46.7\%$) ($P=1.00$) u usporedbi s početnim vrijednostima, odnosno bio je spriječen nastanak pLTD-a (Slika 10 C, E i 11 A). Statistički značajnih promjena u frekvenciji freničkoga živca u odnosu na početne vrijednosti nije bilo u T15 (42.67 ± 1.30 udisaja/min),

T30 (43.33 ± 1.51 udisaja/min), i T60 ($41.67 \pm 1,54$ udisaja/min) nakon posljednje hiperkapnije (40.33 ± 2.65 udisaja/min), ($P=1.00$) (Slika12).

Metizergidska skupina

U skupini životinja kojima je bio mikroubrizgavan neselektivni 5-HT antagonist metizergid, protokol akutne ponavljane hiperkapnije nije izazvao statistički značajne promjene pPNA u vremenu T15 (smanjenje za $35.12 \pm 14.92\%$), T30 (smanjenje za $25.64 \pm 19.92\%$), i T60 (povećanje za $16.55 \pm 45.17\%$) u usporedbi s početnim vrijednostima ($P=1.00$) (Slika 10 D, E i 11 A). Statistički značajnih promjena u frekvenciji freničkoga živca u odnosu na početne vrijednosti nije bilo u T15 (44.00 ± 2.45 udisaj/min), T30 (48.00 ± 1.41 udisaj/min), i T60 (49.13 ± 1.99 udisaj/min) nakon posljednje hiperkapnije (42.33 ± 2.37 udisaj/min), ($P=1.00$) (Slika 12).

Opći parametri

Pomjene pPNA tijekom akutnih ponavljanih hiperkapnijskih epizoda (THc 1-5) prikazane su u Slikama 10 A, B, C, D, E te 12. Ponavljani hiperkapnijski podražaj nije izazvao statistički značajne promjene u frekvenciji freničkoga živca ($P=1.00$) (Slika 12).

AIHc protokol nije izazvao promjene u parametrima ritma disanja (T_i , T_e i T_{tot}) vremenu T15, T30 i T60 minuta nakon kraja posljednje hiperkapnije ni u jednoj skupni životinja (Tablica 3).

Tablica 3. Promjene u trajanju inspirija (Ti), ekspirija (Te) i cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot) tijekom eksperimentalnog protokola u pokusnim skupinama.

	T0	T15	T30	T60
Kontrola (n=7)				
Ti	0.550 ± 0.055	0.579 ± 0.041	0.612 ± 0.057	0.569 ± 0.038
Te	0.793 ± 0.103	0.851 ± 0.176	0.758 ± 0.158	0.942 ± 0.174
Ttot	1.351 ± 0.098	1.440 ± 0.168	1.374 ± 0.131	1.515 ± 0.179
8-OH-DPAT (n=10)				
Ti	0.506 ± 0.025	0.537 ± 0.019	0.559 ± 0.027	0.571 ± 0.054
Te	0.847 ± 0.072	0.905 ± 0.103	0.875 ± 0.098	1.113 ± 0.173
Ttot	1.365 ± 0.065	1.419 ± 0.092	1.420 ± 0.102	1.666 ± 0.214
Johimbin (n=9)				
Ti	0.526 ± 0.031	0.552 ± 0.036	0.570 ± 0.033	0.584 ± 0.042
Te	1.013 ± 0.101	0.804 ± 0.032	0.799 ± 0.061	0.832 ± 0.069
Ttot	1.541 ± 0.098	1.360 ± 0.052	1.376 ± 0.065	1.419 ± 0.070
Metizergid (n=9)				
Ti	0.560 ± 0.034	0.512 ± 0.049	0.456 ± 0.046	0.456 ± 0.036
Te	0.778 ± 0.078	0.882 ± 0.068	0.849 ± 0.066	0.817 ± 0.071
Ttot	1.345 ± 0.090	1.369 ± 0.075	1.293 ± 0.039	1.266 ± 0.069

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot). Točka prije prve hiperkapnije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30) i 60 min (T60) nakon kraja posljednje hiperkapnije.

Tablica 3. Promjene u trajanju inspirija (Ti), ekspirija (Te) i cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot) tijekom 5 hiperkapnijskih epizoda u eksperimentalnim skupinama.

	THc1	THc2	THc3	THc4	THc5
Kontrola (n=7)					
Ti	0.380 ± 0.027	0.405 ± 0.047	0.423 ± 0.048	0.435 ± 0.050	0.429 ± 0.052
Te	0.930 ± 0.047	0.840 ± 0.068	0.813 ± 0.056	0.801 ± 0.059	0.798 ± 0.057
Ttot	1.307 ± 0.049	1.249 ± 0.045	1.243 ± 0.049	1.236 ± 0.055	1.229 ± 0.044
8-OH-DPAT (n=10)					
Ti	0.425 ± 0.022	0.395 ± 0.018	0.369 ± 0.019	0.384 ± 0.019	0.376 ± 0.023
Te	0.910 ± 0.067	0.990 ± 0.064	1.018 ± 0.071	1.001 ± 0.075	1.002 ± 0.078
Ttot	1.361 ± 0.096	1.434 ± 0.117	1.421 ± 0.091	1.411 ± 0.079	1.404 ± 0.082
Johimbin (n=9)					
Ti	0.378 ± 0.019	0.389 ± 0.021	0.385 ± 0.023	0.402 ± 0.023	0.392 ± 0.020
Te	1.227 ± 0.119	1.200 ± 0.117	1.116 ± 0.077	1.080 ± 0.075	1.073 ± 0.066
Ttot	1.606 ± 0.125	1.591 ± 0.124	1.500 ± 0.083	1.483 ± 0.080	1.466 ± 0.067
Metizergid (n=9)					
Ti	0.330 ± 0.022	0.319 ± 0.023	0.310 ± 0.034	0.304 ± 0.030	0.312 ± 0.042
Te	0.941 ± 0.043	0.962 ± 0.033	0.920 ± 0.025	0.923 ± 0.025	0.919 ± 0.064
Ttot	1.250 ± 0.042	1.260 ± 0.040	1.219 ± 0.029	1.218 ± 0.026	1.221 ± 0.028

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (Ttot). Prikazano je 5 hiperkapnijskih epizoda (THc1-5) u kontrolnoj i eksperimentalnim skupinama.

Srednji arterijski tlak imao je tendenciju smanjenja tijekom izloženosti hiperkapnijskom protokolu, no prestankom hiperkapnija povećavao se na početne vrijednosti i bio je uspješno održavan stabilnim u svim eksperimentalnim skupinama životinja kao što je prikazano u Tablici 4.

Tablica 4. Srednji arterijski tlak (MAP) u kontrolnoj i eksperimentalnim skupinama životinja tijekom eksperimentalnog protokola.

	MAP (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrola	129.8 ± 8.3	123.0 ± 8.4	124.0 ± 7.3	113.4 ± 10.2
8-OH-DPAT	124.0 ± 6.9	123.4 ± 10.9	123.7 ± 13.7	118.7 ± 11.4
Metizergid	117.1 ± 6.7	95.9 ± 9.0	105.1 ± 8.7	93.3 ± 7.9
Johimbin	129.3 ± 5.3	132.7 ± 3.9	128.8 ± 4.9	131.0 ± 6.3

	MAP (mmHg)				
	THc1	THc2	THc3	THc4	THc5
Kontrola	128.4 ± 13.8	122.7 ± 9.4	117.1 ± 10.3	116.2 ± 9.1	106.4 ± 11.2
8-OH-DPAT	117.5 ± 10.2	117.2 ± 13.6	114.8 ± 14.9	110.8 ± 15.7	113.0 ± 14.3
Metizergid	113.8 ± 4.9	114.1 ± 6.3	113.9 ± 5.7	111.2 ± 7.7	110.8 ± 8.1
Johimbin	119.4 ± 5.4	124.8 ± 7.0	127.2 ± 4.6	124.9 ± 6.2	124.4 ± 6.1

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM srednjeg arterijskog tlaka u kontrolnoj skupini (N=7) i u eksperimentalnim skupinama u kojima je mikroubrizgavan 8-OH-DPAT (N=10), metizergid (N=9) ili johimbin (N=9). Točka prije prve hiperkapnije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hiperkapnije, pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-5).

*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (P<0.05).

Vrijednosti PH su bile održavane u fiziološkim granicama (7.2-7.3) u svim skupinama tijekom čitavog eksperimenta. Statistički značajnih promjena u parcijalnim tlakovima kisika i ugljičnog dioksida (PaO_2 i PaCO_2) nije bilo ni u jednoj pokusnoj skupini životinja što je prikazano u Tablici 5.

Tablica 5. Parcijalni tlakovi ugljičnog dioksida (PaCO_2), kisika (PaO_2) i pH u arterijskoj krvi u svim eksperimentalnim skupinama tijekom hiperkapnijskog protokola.

	T0			T15			T30			T60		
	PaCO_2	PaO_2	pH	PaCO_2	PaO_2	pH	PaCO_2	PaO_2	Ph	PaCO_2	PaO_2	pH
Kontrola	45.2 ± 2.3	235.5 ± 16.0	7.3 ± 0.1	46.4 ± 2.7	212.3 ± 34.2	7.2 ± 0.02	46.5 ± 2.7	224.6 ± 17.1	7.3 ± 0.02	41.9 ± 2.3	194.7 ± 20.3	7.2 ± 0.03
8-OH-DPAT	43.3 ± 1.2	278.3 ± 7.7	7.3 ± 0.02	45.6 ± 2.2	272.3 ± 11.5	7.2 ± 0.02	41.7 ± 1.4	285.6 ± 9.2	7.2 ± 0.03	42.8 ± 2.1	262.8 ± 11.8*	7.2 ± 0.02
Metizergid	42.4 ± 2.0	281.9 ± 8.4	7.3 ± 0.02	45.0 ± 1.5	275.3 ± 6.9	7.3 ± 0.02	42.4 ± 1.4	268.5 ± 8.3	7.3 ± 0.02	41.1 ± 1.8	278.5 ± 20.3*	7.3 ± 0.03
Johimbin	43.0 ± 1.4	235.5 ± 20.6	7.3 ± 0.01	45.7 ± 2.5	236.5 ± 20.1	7.2 ± 0.01	42.2 ± 1.1	236.1 ± 20.6	7.2 ± 0.02	40.2 ± 2.1	221.3 ± 27.1	7.2 ± 0.03

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM parcijalnih tlakova CO_2 , O_2 i pH u kontrolnoj skupini (N=7) i u eksperimentalnim skupinama u kojima je mikroubrizgavan 8-OH-DPAT (N=10), metizergid (N=9) ili johimbin (N=9). Točka prije prve hiperkapnije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hiperkapnije, pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-5).

*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0.05$).

6. RASPRAVA

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da akutna ponavljana hiperkapnija u anestetiziranih štakora izaziva frekvencijski pLTD dok akutna ponavljana hipoksija izaziva amplitudni pLTF 60 minuta nakon izloženosti posljednjem hiperkapnijskom odnosno hipoksijskom podražaju. Kombinirani hiperkapnijsko-hipoksijski podražaj, kontinuirani hiperkapnijski i kontinuirani hipoksijski podražaj ne utječu na razvoj respiracijske plastičnosti što potvrđuje da je za nastanak respiracijske plastičnosti nužan ponavljani hiperkapnijski ili hipoksijski podražaj.

Također je utvrđeno da je pLTD očuvan ukoliko se prije početka ponavljanoj hiperkapnijskog protokola mikroubrizga selektivni 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT u područje kaudalne rafe jezgre. Mikroubrizgavanjem neselektivnog antagonista 5-HT receptora metizergida i selektivnog antagonista α 2-adrenergičnih receptora johimbina u područje rafe jezgara, nakon izloženosti hiperkapnijskom protokolu spriječen je nastanak pLTD-a. Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti da su za nastanak pLTD-a u anestetiziranih štakora bitni i 5-HT i α 2-adrenergični receptori.

6.1. pLTD KAO POSLJEDICA PONA VLJANOG HIPERKAPNIJSKOG PODRAŽAJA

U našem istraživanju protokol ponavljane hiperkapnije izaziva dugoročnu depresiju frekvencije freničkoga živca, no ne utječe na amplitudu. Morris i suradnici su u svojim radovima također potvrdili da sistemski izloženost ponavljanoj hiperkapniji izaziva nastanak pLTD-a međutim ponavljano mikroubrizgavanje kisele otopine u područje karotidnog sinusa izazvalo je nastanak pLTF-a (41, 83, 62). Ubrizgavanjem prezasićene otopine u karotidni sinus potiču se samo periferni kemoreceptori dok pri sistemskom izlaganju hiperkapnijskom protokolu dolazi do međusobnog djelovanja i perifernih i središnjih receptora koji doprinose nastanku depresije disanja. Naime, hiperkapnija povećava koncentraciju izvanstaničnih HCO₃⁻ iona te tako može utjecati na depresiju aktivnosti freničkoga živca (5). U našem istraživanju pH krvi štakora bio je održavan unutar fizioloških granica i svejedno je izazvan frekvencijski pLTD, tako da smatramo da povišene vrijednosti HCO₃⁻ iona nisu ključne za nastanak depresije disanja. Dodatno ovu činjenicu potkrepljuju i rezultati izloženosti

kontinuiranom hiperkapnijskom i hipoksijskom protokolu koji nisu izazvali promjenu pPNA 60 min nakon prestanka podražaja (53).

Jedan od razloga može biti taj što ponavljani, a ne kontinuirani, podražaji utječu na ekspresiju gena važnih za nastanak respiracijske plastičnosti (84). Upravo zadnjih se godina dalo na važnosti istraživanjima ponavljano hipoksijskog podražaja koji uvjetuje nastanak pLTF-a pod utjecajem serotoninskog neurotransmiterskog sustava (85, 55, 56, 4). Poznato je kako je najveća zastupljenost 5-HT_{1A} receptora najveća u limbičkom području, hipokampusu, lateralnom septumu, cingularnom korteksu, rafe jezgrama (nucl. raphe centralis i nucl. raphe dorsalis) i jezgri hipoglosalnog živca (86). Serotoninski 5-HT_{1A} receptor najzastupljeniji je serotoninski receptor u središtima moždane kontrole disanja čijom aktivacijom se smanjuje podražljivost respiracijskih neurona što se je i potvrđeno u našem istraživanju mikroinjiciranjem agonista 5-HT_{1A} receptora 8-OH-DPAT-a u rafe jezgre. Nasuprot tome, intravensko davanje 8-OH-DPAT-a iskoristilo u liječenju apneuzi tijekom ranih stadija ishemije na modelu mačke čime je potvrđeno njegovo postsinaptičko djelovanje na 5-HT receptore (87). Buspiron je također agonist 5-HT_{1A} receptora te se uz kliničku učinkovitost u liječenju anksioznosti pokazao kao učinkovita terapija apneuzi u ljudi (86).

U nastanku pLTF-a važnu ulogu imaju i 5-HT₂ receptori što su potvrdila istraživanja u kojima je životinjama prije izlaganja hipoksijskom protokolu bio dan ketanserin (selektivni antagonist 5-HT₂ receptora). Ponavljani hipoksijski podražaj aktivira 5-HT neurone smještene u kaudalnim rafe jezgrama tako što vjerovatno uzrokuje povećano otpuštanje serotonina u blizini motoneurona freničkog živca te time izaziva pojačanje respiracijske aktivnosti u štakora (44). Hipoksija izaziva i jaku simpatičku stimulaciju pri čemu je razina hipoksije ključna za hemodinamski odgovor (88, 89, 90). Odnosno hipoksija sa 8, 10 ili 15 % O₂ izaziva hipotenziju neovisno o karotidnim receptorima tako što povećava nastanak adenzina koji se veže na endotelne A1 receptore koji potiču sintezu i otpuštaju jakog vazodilatatora NO pri čemu nastaje vazodilatacija, a time i hipotenzija (91, 92).

U našem istraživanju korišten je i poseban protokol koji je uključivao mješavinu 9% O₂ i 15 % CO₂ u dušiku kako bi se istražio istodobni utjecaj jake hipoksije i hiperkapnije na razvoj respiracijske plastičnosti. Također neki protokoli bili su izvedeni u pozadinskoj normoksiji (mješavina zraka, 21% O₂) zbog toga što velika količina udahnutog kisika inhibira aktivnost CO₂ i perifernih kemoreceptora (93), dok su neki od protokola izvedeni u hiperoksiji (50%

O₂) kako bi se izbjegao dodatni utjecaj hipoksijskog podražaja između epizoda hipoksije ili hiperkapnije (41).

Danas je već dobro poznato da ponavljane hipoksije imaju važnu ulogu u mnogim patološkim stanjima (94). Iako je ponavljana hiperkapnija obilježje brojnih poremećaja disanja, regulacija respiracijske plastičnosti nakon ponavljanog hiperkapnijskog podražaja još uvijek nije dovoljno istražena. Stoga su istraživanja koja se bave nastankom depresije disanja izazvanom ponavljanim hiperkapnijama od posebnog značaja jer su u podlozi različitih bolesti (53, 95).

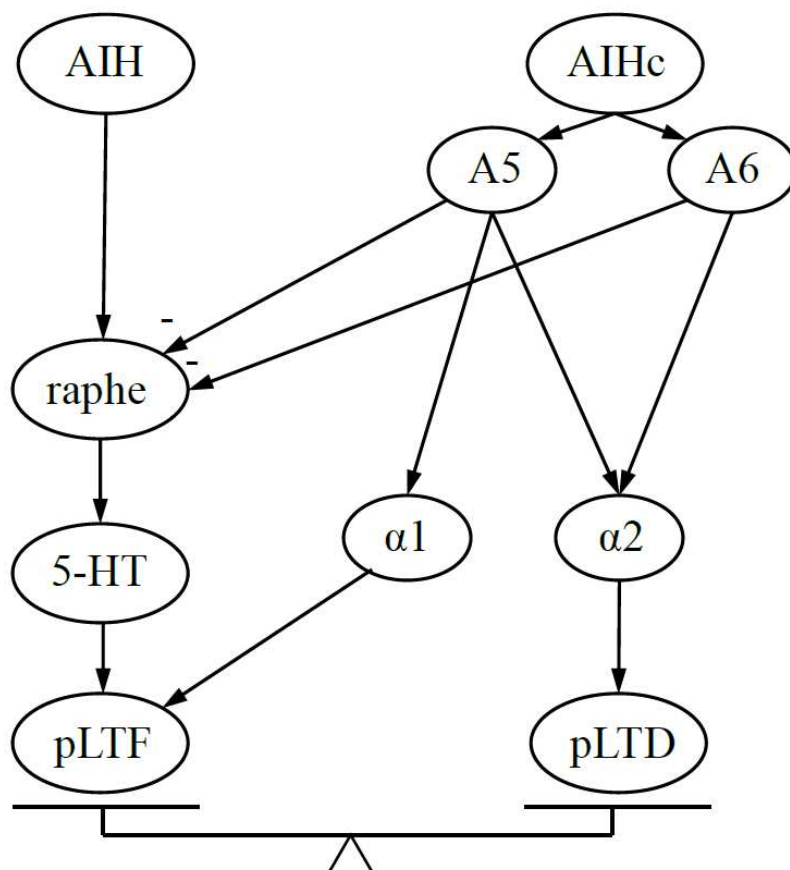
6.2. POVEZANOST 5-HT i α 2-ADRENERGIČNIH RECEPTORA U RAZVOJU pLTD-a

Poznato je da hiperkapnija potiče otpuštanje noradrenalina iz LC (96, 97, 98) te on svojim djelovanjem smanjuje aktivnosti respiracijskih motoneurona vežući se na α 2-adrenergične receptore na rafe jezgama (99, 100, 101, 51) što nam daje mogućnost pretpostaviti da je noradrenalinska modulacija u podlozi nastanka dugoročne depresije disanja nakon izloženosti ponavljajućoj hiperkapniji (41, 99).

U dosadašnjim radovima potvrđeno je da hiperkapnijski uvjetovan pLTD ovisi o međusobnom djelovanju 5-HT i α 2 receptora koji se ponašaju po principu „povuci-potegni“ (44, 95, 51). Intravenskim injiciranjem nespecifičnog 5-HT antagonista metizergida bilo je važno utvrditi koji od receptora na spinalnoj ili supraspinalnoj razini imaju ulogu u razvoju depresije disanja (45). Upravo zbog toga je u našem istraživanju rađeno mikroinjiciranje u rafe jezgre specifičnog 5-HT_{1A} agonista 8-OH-DPAT-a koji je pojačao hiperkapnijom izazvan pLTD. Mikroinjiciranjem metizergida spriječilo je nastanak pLTD-a, možda zbog njegovog antagonističkog učinka na 5-HT_{1, 2, 4, 5, 6 i 7} receptore i istodobnog agonističkog učinka na 5-HT_{1A} receptore. Upravo agonističko djelovanje na 5HT_{1A} receptore u rafe jezgama važno je za nastanak pLTD-a. Slično tome aktivacijom α 2- adrenergičnih receptora dolazi do nastanka pLTDa jer oni svojim djelovanjem spriječavaju otpuštanje serotonina (41). Imunohistokemijskim metodama potvrđene su veze između A5 regije ventrolateralnog ponsa i A6 regije (LC) te njihove povezanosti sa respiracijskim centrom i respiracijskim motoneuronima (102, 103, 104, 105, 106, 107, 108). Možemo zaključiti da zbog toga što je

spriječen nastanak serotonin ovisnog pLTF-a nastaje pLTD. Radni model nastanka depresije i facilitacije disanja prikazan je na Slici 13.

U sadašnjem istraživanju pLTD kao posljedica AIHc očuvan je nakon mikroinjiciranja 8-OH-DPAT-a u područje rafe jezgara (95). Mogući mehanizam djelovanja je aktivacija $5HT_{1A}$ autoreceptora koji smanjuju otpuštanje serotonina iz rafe jezgara (109) i time doprinose nastanku pLTD-a.



Slika 13. Model nastanka pLTD-a. Akutna ponavljana hipoksija (AIH) aktivira rafe neurone koji povećanim oslobađanjem serotonina potiču razvoj pLTF-a. Akutna ponavljana hiperkapnija (AIHc) aktivira noradrenergičke neurone u locus coeruleusu (LC, A6) i kaudalnom ventralnom ponsu (A5) pri čemu se oslobađa noradrenalin. Noradrenalin djeluje na α_2 - receptore te dovodi do razvoja pLTD, bilo izravno kroz projekcije na motoneurone freničkog živca ili posredno preko α_2 - receptora smještenih na rafe serotoniniskim neuronima koji inhibiraju otpuštanje serotonina i nastanak pLTF-a.

6.3. KLINIČKI ZNAČAJ pLTD-a i pLTF-a

Respiracijska plastičnost je fiziološki kompenzacijski mehanizam smanjenja ili pojačavanja disanja uslijed djelovanja različitih podražaja. Jednako tako poremećaj respiracijske plastičnosti može biti u podlozi nastanka određenih patoloških stanja (110, 111), kao što su OSA, kronična opstruktivska plućna bolest, amiotrofična lateralna skleroza, ozljede kralježnične moždine i sindrom iznenadne dojenačke smrti (112). U podlozi ovih bolesti je zatajenje disanja koje je posljedica smanjene sinaptičke aktivnosti respiracijskih neurona (113). Respiracijska plastičnost ovisna o serotoninimskim 5-HT₂ receptorima koja nastaje kao posljedica djelovanja ponavljanih hipoksija, dobro je proučena pri ozljedama kralježnične moždine (114). Potencijalni terapijski učinak ponavljanih hipoksija pažljivo je proučavan i predložen u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što je amiotrofična lateralna skleroza (115).

Suprotno hipoksijskom podražaju, izgleda da izlaganje povećanoj količini kisika u udahnutom zraku ima važnu negativnu ulogu tijekom razvojnog ciklusa respiracijskog sustava. Naime, zamjećena je hipoplastičnost karotidnih tjelešaca sa smanjenim brojem hipoksijski aktivnih kemoafherentnih neurona ukoliko su štakori u prvim tjednima svog života boravili i bili izloženi isključivo hiperoksijskom okolišu (116, 117, 118, 119). Razvojna hiperoksija narušava kemosenzitivnost karotidnog tjelešca na hiperkapniju, a to može ugroziti zaštitne ventilacijske reflekse tijekom dinamičkih respiracijskih izazova kod novorođenčadi (120). Ove rezultate potvrđuju i studije prerano rođene djece koja su prvotno bila izložena hiperoksiji kao dijelu kliničke intervencije te su posljedično razvila respiracijsku insuficijenciju koja se dijelom mogla objasniti razvojem bronhopulmonalne displazije (121, 122). S druge strane, izlaganje ponavljanoj hiperkapniji koja je dio respiracijskih poremećaja može se uspostaviti maladaptivna respiracijska plastičnost koja dovodi do pogoršanja disanja te nemogućnosti njegove pravilne kontrole (123). Tako na primjer, kroničnu opstruktivsku plućnu bolest (KOPB) obilježava opstrukcija dišnih putova koja dovodi do hipoksemije i hiperkapnije. S vremenom, prilagodba respiracijskog sustava na ovu bolest uključuje promjene u intrinzičkoj pokretljivosti respiracijskih mišića te kemoreceptorskoj signalizaciji koja povećava aktivnost respiracijskih motoneurona. Nasuprot tome, sindrom akutnog respiracijskog distresa (ARDS) rezultat je teške ozljede pluća, koji karakteriziraju plućni infiltrati, brzo progresivna respiracijska insuficijencija i moguća progresija plućne fibroze. Promjene u načinu disanja rezultat su tih funkcionalnih promjena, kao i izmijenjene obrade

aferentnih povratnih informacija respiracijskih središta disanja. Uzeti zajedno, ovi modeli bolesti naglašavaju plastičnost respiracijskog sustava kontrole kao odgovor na razvoj i progresiju plućne bolesti (124).

Proučavanjem OSA-a, kao jedne od široko rasprostranjenih bolesti, utvrđena je sličnost s LTF-om koji utječe na stabilizaciju disanja i održavanje otvorenosti gornjih dišnih puteva (29). OSA se definira kao odsutnost protoka zraka kroz gornje dišne putove dulje od 10s uz pad arterijske saturacije kisikom za najmanje 4% (125) te predstavlja složeni poremećaj spavanja povezan s autonomnom i simpatičkom disregulacijom (126). Ona je pod utjecajem neuralnog mehanizma jer nastaje isključivo tijekom spavanja te upravo proučavanjem molekularnog mehanizma LTF i LTD nastoje se otkriti nove strategije u liječenju navedene bolesti (29, 127). Apneja je često praćena i hipoksijama i hiperkapnijama koje mogu djelovati samostalno ili se isprepletati (128, 123). Naime, dnevno izlaganje ponavljanim hipoksijama može pojačati respiracijsku plastičnost te smanjiti epizode noćne OSA-e pojačavajući RNA transkripciju koja regulira ekscitabilnost motoneurona te time pojačava tonus gornjih dišnih mišića čiji je kolaps značajka OSA-e (129, 130). Glavne okosnice nastanka LTF-a su BDNF i TrkB čiji se signalni put pojačava djelovanjem adenozijskih 2A receptora i hipofiznog peptida koji aktivira adenilat ciklazu (engl. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*, PACAP) (129, 131, 132). Zaobilaznjem krvno moždane barijere upotrebom agonista ovih receptora može se pojačati održavanje tonusa gornjih dišnih puteva (133). Razvoj novih terapijskih smjernica u liječenju OSA-e mogao bi imati važnu ulogu u poboljšanju suradljivosti bolesnika koriste CPAP uređaj (engl. *Continuous Positive Air Pressure*, CPAP) (134, 135)

Znanstveni doprinos doktorske disertacije

Respiracijska plastičnost koja se manifestira kao dugoročna facilitacija ili depresija freničkog živca predstavlja jedan od kompenzacijskih mehanizama stabilizacije disanja. Oba fenomena vidljiva su u patološkim stanjima kao što su opstruktivska apneja tijekom spavanja (OSA), kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB), sindrom iznenadne smrti dojenčeta (engl. *Sudden Infant Death Syndrome*, SIDS) ili ozljede kralježnične moždine.

Znanstveni doprinos ove doktorske disertacije je razjašnjavanje uloge serotoninskog i adrenergičkog neurotransmiterskog sustava koji sudjeluju u regulaciji disanja. Naša prijašnja istraživanja pokazala su da serotonin sudjeluje u regulaciji pLTF-a, dok je ovim istraživanjem proučen utjecaj serotoninskog i noradrenalinuskog sustava na pLTD. Naime, poznato je da je

područje kaudalnih rafe jezgara bogato serotoninskim neuronima i 5-HT_{1A} receptorima te predstavlja ishodište mnogih serotoninskih projekcija u različite dijelove mozga kao što su LC, jezgre freničkoga živca i respiracijskih motoneurona. Ova disertacija upotpunjava dosadašnje znanstvene spoznaje o serotoninskoj i noradrenalinskoj modulaciji disanja, mjestu djelovanja i značenju 5-HT_{1A} i α 2 receptora u neurofiziologiji disanja i respiracijskoj plastičnosti.

7. ZAKLJUČCI

1. Respiracijska plastičnost nastaje kao posljedica djelovanja ponavljano hipoksijskog ili hiperkapnijskog podražaja.
2. Kontinuirani hiperkapnijski ili hipoksijski podražaj ne utječu na razvoj respiracijske plastičnosti.
3. Izlaganje pokusnih životinja protokolu akutnih ponavljanih hiperkapnija uzrokuje nastanak pLTD-a.
4. Kombinirani hiperkapnijsko-hipoksijski podražaj koji je u podlozi različitih bolesti dišnog sustava doprinosi stabilizaciji disanja.
5. Mikroubrizgavanje selektivnog 5-HT_{1A} agonista 8-OH-DPAT-a u područje kaudalnih rafe jezgara doprinosi očuvanju hiperkapnijom potaknutog pLTD-a, iz čega proizlazi da je uloga serotoninskih receptora važna za nastanak pLTD-a.
6. Mikroubrizgavanje neselektivnog antagonista 5-HT receptora metizergida i selektivnog antagonista α 2-adrenergičnih receptora johimbina u područje kaudalnih rafe jezgara sprječava nastanak pLTD-a, iz čega proizlazi da su u kontroli depresije disanja uključeni i 5-HT i α 2-adrenergični receptori.

8. KRATKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Ova disertacija napravljena je kako bi se istražio utjecaj različitih podražaja, ali i uloge 5-HT i α 2-adrenergičnih receptora u razvoju respiracijske plastičnosti.

Istraživanje je podijeljeno u dva dijela. U prvom dijelu, uspoređeni su dugoročni učinci ponavljanih i kontinuiranih hiperkapnijskih i hipoksijskih podražaja te ponavljano kombiniranog hiperkapnijsko-hipoksijskog podražaja na plastičnost freničnog živca. U drugom dijelu, različiti agonisti i antagonisti 5-HT i α 2 receptora su mikroinjicirani u kaudalno rafe područje kako bi se ispitala uloga receptora važnih u nastanku i održavanju pLTD-a.

Odrasli, muški, uretanom anestetizirani, vagotomizirani, paralizirani, mehanički ventilirani Sprague-Dawley štakori bili su izloženi: akutnoj ponavljanoj hiperkapniji (AIHc_{zrak} ili AIHc_{O₂}), akutnoj ponavljanoj hipoksiji (AIH), kombiniranoj ponavljanoj hiperkapniji i hipoksiji (AIHcH), kontinuiranoj hiperkapniji (CHc), ili kontinuiranoj hipoksiji (CH). U drugom dijelu studije štakori su bili izloženi protokolu akutne ponavljane hiperkapnije (5 epizoda 15% CO₂ u zraku, svaka epizoda trajala je 3 minute). Eksperimentalnoj skupini mikroinjiciran je ili selektivni agonist 5-HT_{1A} receptora 8-OH-DPAT ili nespecifični antagonist 5-HT receptora metizergid ili α 2-adrenergični antagonisti johimbin, dok je kontrolnoj skupini mikroinjicirana fiziološka otopina u kaudalno rafe područje.

U AIHc skupini, frekvencija freničnog živca smanjena je s 44.25 ± 4.06 u T0 na 35.29 ± 5.21 udisaja / min u T60, ($P = 0.04$, AIHc_{zrak}) i sa 45.5 ± 2.62 na 37.17 ± 3.68 udisaja/min ($P=0.05$, AIHc_{O₂}). tj. izazvana je dugoročna depresija frekvencije freničkog živca. Izloženost AIH izazvala je povećanje pPNA u T60 za $143.7 \pm 30.1\%$ u usporedbi s početnim vrijednostima, ($P=0.02$), tj. izazvana je dugoročna facilitacija freničkog živca. Kombinirana ponavljana hiperkapnija i hipoksija ili kontinuirana hiperkapnija ili hipoksija nisu izazvale dugoročnu plastičnost freničnog živca. U drugom dijelu istraživanja, u kontrolnoj skupini, pPNA se smanjila 60 minuta nakon završetka posljednjeg hiperkapnijskog podražaja u usporedbi s osnovnim vrijednostima, tj. razvio se pLTD ($P=0.02$). U 8-OH-DPAT skupini, pPNA je značajno smanjen u T15, T30 i T60 u usporedbi s početnim vrijednostima, tj. nastao je pLTD ($P=0.01$). U skupini koja je primala metizergid, akutna ponavljana hiperkapnija nije izazvala značajne promjene u pPNA u T15, T30 i T60 u usporedbi s osnovnim vrijednostima. U skupini s johimbinom, akutna ponavljana hiperkapnija nije izazvala značajne promjene vršne aktivnosti freničkog

živca u T15, T30 i T60 u usporedbi s osnovnim vrijednostima nakon kraja posljednje hiperkapnijske epizode.

Zaključno, ponavljani hiperkapnijski ili hipoksijski podražaji potrebni su za izazivanje plastičnosti freničnog živca. Aktivacija 5-HT_{1A} receptora važna je za nastanak pLTD, dok blokiranje α 2-adrenergičkih receptora sprječava razvoj pLTD-a nakon akutne ponavljane hiperkapnije. Ovi rezultati sugeriraju da kemijska modulacija 5-HT i α 2-adrenergičkih receptora u rafe jezgri utječe na hiperkapnijom izazvan pLTD, nudeći važan uvid u razumijevanje mehanizama uključenih u razvoj respiratorne plastičnosti.

9. SUMMARY

This study was undertaken to determine pattern sensitivity of phrenic nerve plasticity in respect to different respiratory challenges and to investigate the role of 5-HT and α 2-adrenergic receptors in the initiation of pLTD.

Study was divided into two parts. In the first, we compared long-term effects of intermittent and continuous hypercapnic and hypoxic stimuli, and combined intermittent hypoxia and hypercapnia on phrenic nerve plasticity. In the second part, different drugs were microinjected in the raphe region to investigate which receptors are important for pLTD induction and maintenance.

Adult, male, urethane-anesthetized, vagotomized, paralyzed, mechanically ventilated Sprague-Dawley rats were exposed to: acute intermittent hypercapnia (AIHc_{air} or AIHc_{O₂}), acute intermittent hypoxia (AIH), combined intermittent hypercapnia and hypoxia (AIHcH), continuous hypercapnia (CHc), or continuous hypoxia (CH). In the second part of the study rats were exposed to the protocol of acute intermittent hypercapnia (5 episodes of 15% CO₂ in air, each episode lasting 3 minutes). Experimental group received microinjection of selective 5-HT_{1A} receptors agonist 8-OH-DPAT, broad spectrum 5-HT antagonist methysergide or α 2-adrenergic antagonist yohimbine, whereas control group received microinjection of 0.9% saline into the caudal raphe region.

Peak phrenic nerve activity (pPNA) and burst frequency were analyzed during baseline (T0), hypercapnia or hypoxia exposures, at 15, 30, and 60 minutes (T60) after the end of the stimulus.

In the AIHc groups phrenic nerve frequency decreased from 44.25 ± 4.06 at T0 to 35.29 ± 5.21 breaths/min at T60, ($P=0.04$, AIHc_{air}) and from 45.5 ± 2.62 to 37.17 ± 3.68 breaths/min ($P=0.05$, AIHc_{O₂}), i.e. frequency phrenic long term depression was induced. Exposure to AIH elicited increase of pPNA at T60 by 143.7 ± 30.1 % compared to baseline ($P=0.02$), i.e. phrenic long-term facilitation was induced. Combined intermittent hypercapnia and hypoxia or continuous hypercapnia or hypoxia failed to induce long-term plasticity of the phrenic nerve.

In the second part of the study, in the control group, pPNA decreased 60 minutes after the end of the last hypercapnic episode compared to baseline values, i.e. pLTD developed ($P=0.02$). In the 8-OH-DPAT group pPNA significantly decreased at T15, T30 and T60 compared to baseline, i.e. pLTD developed ($P=0.01$). In the methysergide-treated group, acute intermittent hypercapnia did not evoke significant changes in pPNA at T15, T30, and T60 compared to baseline values. In the yohimbine group acute intermittent hypercapnia did not evoke significant changes of the peak phrenic nerve activity at T15, T30, and T60 compared to baseline values after the end of the last hypercapnic episode.

In conclusion, intermittency of the hypercapnic or hypoxic stimuli is needed to evoke phrenic nerve plasticity. Activation of 5-HT_{1A} receptors accentuated induction of pLTD, whereas blockade of α 2-adrenergic receptors prevented development of pLTD following acute intermittent hypercapnia in anesthetized rats. These results suggest that chemical modulation of 5-HT and α 2-adrenergic receptors in raphe nuclei affects hypercapnia induced pLTD, offering the important insights in understanding the mechanisms involved in development of respiratory plasticity.

10. POPIS LITERATURE

1. Guyton & Hall, Medicinska fiziologija, deveto izdanje, Medicinska naklada Zagreb, 1999.
2. Noakes TD, Peltonen JE, Rusko HK. *Evidence that a central governor regulates exercise performance during acute hypoxia and hyperoxia*. J Exp Biol. 2001; 204: 3225-34.
3. Tschakovsky ME, and Hughson RL. *Interaction of factors determining oxygen uptake at the onset of exercise*. J Appl. Physiol. 1999; 86: 1101-13.
4. Forster H, Bonis J, Krause K, Wenninger J, Neumueller S, Hodges M, Pan L. *Contributions of the pre-Bötzinger complex and the Kölliker-fuse nuclei to respiratory rhythm and pattern generation in awake and sleeping goats*. Prog Brain Res. 2014; 209: 73-89.
5. Mortola JP, Lanthier C. *Breathing frequency in ruminants: a comparative analysis with non-ruminant mammals*. Respir Physiol Neurobiol. 2005; 145: 265-77.
6. Krause KL, Forster HV, Kiner T, Davis SE, Bonis JM, Qian B, Pan LG. *Normal breathing pattern and arterial blood gases in awake and sleeping goats after near total destruction of the presumed pre-Botzinger complex and the surrounding region*. J Appl Physiol (1985). 2009; 106: 605-19.
7. Pouget P, Allard E, Poitou T, Raux M, Wattiez N, Similowski T. *Slower Is Higher: Threshold Modulation of Cortical Activity in Voluntary Control of Breathing Initiation*. Front Neurosci. 2018; 12: 663.
8. Beblo T, Pelster S, Schilling C, Kleinke K, Iffland B, Driessen M, Fernando S. *Breath Versus Emotions: The Impact of Different Foci of Attention During Mindfulness Meditation on the Experience of Negative and Positive Emotions*. Behav Ther. 2018; 49: 702-14.
9. Zaccaro A, Piarulli A, Laurino M, Garbella E, Menicucci D, Neri B, Gemignani A. *How Breath-Control Can Change Your Life: A Systematic Review on Psycho-Physiological Correlates of Slow Breathing*. Front Hum Neurosci. 2018; 12: 353.

10. Morinaga R, Nakamuta N, Yamamoto Y. *Serotonergic projections to the ventral respiratory column from raphe nuclei in rats*. Neurosci Res. 2018. doi: 10.1016/j.neures.2018.05.004.
11. Del Negro CA, Wilson CG, Butera RJ, Koshiya N, Johnson SM, Smith JC. *Unstable breathing rhythms and quasiperiodicity in the pre-Bötzinger complex*. Adv Exp Med Biol. 2001; 499: 133-8.
12. Kuwaki T. *Hypothalamic modulation of breathing*. Adv Exp Med Biol. 2010; 669: 243-7.
13. Erlichman JS, Leiter JC, Gourine AV. *ATP, glia and central respiratory control*. Respir Physiol Neurobiol. 2010; 173: 305-11.
14. Gourine AV. *On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP*. J Physiol. 2005; 568: 715-24.
15. Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. *Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response*. J Neurosci. 2005; 25: 1211-8.
16. Prabhakar NR, Dick TE, Nanduri J, Kumar GK. *Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia*. Exp Physiol. 2007; 92: 39-44.
17. Dougherty BJ, Terada J, Springborn SR, Vinit S, MacFarlane PM, Mitchell GS. *Daily acute intermittent hypoxia improves breathing function with acute and chronic spinal injury via distinct mechanisms*. Respir Physiol Neurobiol. 2018; 256: 50-7.
18. Lee KZ, Huang YJ, Tsai IL. *Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat*. J Appl Physiol (1985). 2014; 116: 395-405.
19. Peyronnet J, Roux JC, Mamet J, Perrin D, Lachuer J, Pequignot JM, Dalmaz Y. *Developmental plasticity of the carotid chemoafferent pathway in rats that are hypoxic during the prenatal period*. Eur J Neurosci. 2007; 26: 2865-72.
20. Reeves SR, Gozal D. *Respiratory and metabolic responses to early postnatal chronic intermittent hypoxia and sustained hypoxia in the developing rat*. Pediatr Res. 2006; 60: 680-6.

21. Rosenzweig I, Williams SC, Morrell MJ. *The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea.* Curr Opin Pulm Med. 2014; 20: 565-71.
22. Zabka AG, Mitchell GS, Behan M. *Ageing and gonadectomy have similar effects on hypoglossal long-term facilitation in male Fischer rats.* J Physiol. 2005; 563: 557-68.
23. Pitts RF. *The respiratory center and its descending pathways.* J Comp Neuro. 1940; 72: 605-25.
24. Porter WT. *The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei.* J Physiol. 1895; 17: 455-85.
25. Millhorn DE, Eldridge FL. *Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems.* J Appl Physiol (1985). 1986; 61: 1249-63.
26. Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ, Olson EB Jr. *Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity.* J Appl Physiol. 2001; 90: 2466-75.
27. Devinney MJ, Huxtable AG, Nichols NL, Mitchell GS. *Hypoxia-induced phrenic long-term facilitation: emergent properties.* Ann NY Acad Sci. 2013; 1279 :143-53.
28. Đogaš Z, Valić M, Pecotić R, Pupić MC, Carev M, Bojić L, Racić G. *Sleep disordered breathing.* Lijec Vjesn. 2008; 130: 69-77.
29. Mahamed S, Mitchell GS. *Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea?* Exp Physiol. 2007; 92: 27-37.
30. Nichols NL, Van Dyke J, Nashold L, Satriotomo I, Suzuki M, Mitchell GS. *Ventilatory control in ALS.* Respir Physiol Neurobiol. 2013; 189: 429-37.
31. Fuller DD, ElMallah MK, Smith BK, Corti M, Lawson LA, Falk DJ, Byrne BJ. *The respiratory neuromuscular system in Pompe disease.* Respir Physiol Neurobiol. 2013; 189: 241-9.
32. Lessa TB, de Abreu DK, Bertassoli BM, Ambrósio CE. *Diaphragm: A vital respiratory muscle in mammals.* Ann Anat. 2016; 205: 122-7.
33. Lane MA, Fuller DD, White TE, Reier PJ. *Respiratory neuroplasticity and cervical spinal cord injury: translational perspectives.* Trends Neurosci. 2008; 31: 538-47.

34. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. *Time domains of the hypoxic ventilatory response*. *Respir Physiol*. 1998; 112: 123-34.
35. Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS. *Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia*. *Respir Physiol*. 2001; 129: 25-35.
36. Erickson JT, Millhorn DE. *Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem*. *J Comp Neurol*. 1994; 348: 161-82.
37. Bairam A, Carroll JL, Labelle Y, Khandjian EW. *Differential changes in dopamine D2- and D1-receptor mRNA levels induced by hypoxia in the arterial chemoreflex pathway organs in one-day-old and adult rabbits*. *Biol Neonate*. 2003; 84: 222-31.
38. Turner DL, Bach KB, Martin PA, Olsen EB, Brownfield M, Foley KT, Mitchell GS. *Modulation of ventilatory control during exercise*. *Respir Physiol*. 1997; 110: 277-85.
39. Golder FJ, Reier PJ, Davenport PW, Bolser DC. *Cervical spinal cord injury alters the pattern of breathing in anesthetized rats*. *J Appl Physiol* (1985). 2001; 91: 2451-8.
40. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. *Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity*. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:239-66.
41. Bach KB, Mitchell GS. *Hypercapnia-induced long-term depression of respiratory activity requires alpha2-adrenergic receptors*. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 2099-105.
42. Baker-Herman TL, Mitchell GS. *Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; 162: 8-17.
43. Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS. *Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia*. *J Appl Physiol*. 2001; 90: 2001-6.
44. Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Valic Z, Peros K, Dogas Z. *Microinjection of methysergide into the raphe nucleus attenuated phrenic long-term facilitation in rats*. *Exp Brain Res*. 2010; 202: 583-9.
45. Valic M, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Valic Z, Stipica I, Dogas Z. *Intermittent hypercapnia-induced phrenic long-term depression is revealed after serotonin*

- receptor blockade with methysergide in anaesthetized rats. Exp Physiol. 2016; 101: 319-331.*
46. Dick TE, Shannon R, Lindsey BG, Nuding SC, Segers LS, Baekey DM, Morris KF. *Arterial pulse modulated activity is expressed in respiratory neural output. J Appl Physiol (1985). 2005; 99: 691-8.*
47. Mateika JH, Sandhu KS. *Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation. Respir Physiol Neurobiol. 2011; 176: 1-11.*
48. Baker TL, Mitchell GS. *Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. J Physiol. 2000; 529: 215-9.*
49. Turner DL, Mitchell GS. *Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. J Physiol. 1997; 499: 543-50.*
50. Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. *Long term facilitation of phrenic motor output. Respir Physiol. 2000; 121: 135-46.*
51. Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS. *Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001; 130: 207-18.*
52. Mateika JH, Komnenov D. *Intermittent hypoxia initiated plasticity in humans: A multipronged therapeutic approach to treat sleep apnea and overlapping comorbidities. Exp Neurol. 2017; 287: 113-129.*
53. Stipica I, Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Dogas Z, Valic Z, Valic M. *Periodicity during hypercapnic and hypoxic stimulus is crucial in distinct aspects of phrenic nerve plasticity. Physiol Res. 2016; 65: 133-43.*
54. Kinkead R, Mitchell GS. *Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. Am J Physiol. 1999; 277: 658-66.*
55. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. *Role of 5-HT₁(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. Respir Physiol Neurobiol. 2011; 175: 146-52.*
56. Pecotic R, Dogas Z, Valic Z, Valic M. *Blockade of 5-HT(1A) receptors in the phrenic nucleus of the rat attenuated raphe induced activation of the phrenic nerve activity. J Physiol Pharmacol. 2009; 60: 167-72.*
57. Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. *Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. Respir Physiol. 1980; 42: 171-88.*

58. Mitchell GS, Powell FL, Hopkins SR, Milsom WK. *Time domains of the hypoxic ventilatory response in awake ducks: episodic and continuous hypoxia.* Respir Physiol. 2001; 124: 117-28.
59. Cao KY, Zwillich CW, Berthon-Jones M, Sullivan CE. *Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs.* J Appl Physiol(1985). 1992; 73: 2083-8.
60. McEvoy RD, Popovic RM, Saunders NA, White DP. *Effects of sustained and repetitive isocapnic hypoxia on ventilation and genioglossal and diaphragmatic EMGs.* J Appl Physiol (1985). 1996; 81: 866-75.
61. Babcock MA, Badr MS. *Long-term facilitation of ventilation in humans during NREM sleep.* Sleep. 1998; 21: 709-16.
62. Morris KF, Arata A, Shannon R, Lindsey BG. *Long-term facilitation of phrenic nerve activity in cats: responses and short time scale correlations of medullary neurones.* J Physiol. 1996; 490: 463-80.
63. Barker JR, Thomas CF, Behan M. *Serotonergic projections from the caudal raphe nuclei to the hypoglossal nucleus in male and female rats.* Respir Physiol Neurobiol. 2009; 165: 175-84.
64. Holtman JR Jr, Marion LJ, Speck DF. *Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat.* JNeuroscience. 1990; 37: 541-52.
65. Gang S, Mizuguchi A, Aoki M. *Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats.* Respir Physiol. 1991; 85: 329-39.
66. Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olievier C. *Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia.* J Comp Neuro. 1997; 388: 169-90.
67. Hoyer D, Martin G. *5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome.*J Neurosci Neuropharmacol. 1997; 36: 419-28.
68. Ballanyi K, Onimaru H, Homma I. *Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats.* Prog Neurobiol. 1999; 59: 583-634.

69. Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. *Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters.* *Physiol Rev.* 1995 ; 75: 1-45.
70. Alberini CM. *Genes to remember.* *J Exp Biol.* 1999; 202: 2887-91.
71. Emptage NJ, Carew TJ. *Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons.* *Science.* 1993; 262: 253-6.
72. Mackey SL, Kandel ER, Hawkins RD. *Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of Aplysia produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons.* *J Neurosci.* 1989; 9: 4227-35.
73. McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. *Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats.* *J Physiol.* 2005; 567: 599-611.
74. Samuels ER, Szabadi E. *Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation.* *Curr Neuropharmacol.* 2008; 6: 235-53.
75. Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B, et al. *Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology.* *Prog Brain Res.* 1991; 88: 47-75.
76. Bobker DH, Williams JT. *Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat locus ceruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine1B receptors.* *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 250: 37-43.
77. Sanghera MK, Coke JA., Williams HL, McMillen BA. *Ipsapirone and 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine increase rat locus coeruleus noradrenergic activity.* *Brain research bulletin.* 1990; 24: 17-22.
78. Sanghera MK, Mcmillen BA, German DC. *Buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic, increases locus coeruleus noradrenergic neuronal activity.* *Eur J Pharmacol.* 1982;86: 107-10.
79. Bach KB, Mitchell GS. *Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent.* *Respir Physiol.* 1996; 104: 251-60.
80. Sagen J, Proudfit HK. *Release of endogenous monoamines into spinal cord superfusates following the microinjection of phentolamine into the nucleus raphe magnus.* *Brain Res.* 1987; 406: 246-54.

81. Haddjeri N, De Montigny C, Blier P. *Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system.* Br J of Pharmacol. 1997; 120: 865-75.
82. Paxinos GWC. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego, USA, Academic Press, 2005.
83. Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB, Mitchell GS. *Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing.* J Neurosci. 2001; 21: 5381-8.
84. Fu C, Xue J, Wang R, Chen J, Ma L, Liu Y, Wang X, Guo F, Zhang Y, Zhang X, Wang S. *Chemosensitive Phox2b-expressing neurons are crucial for hypercapnic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius.* J Physiol. 2017; 595: 4973-89.
85. Dick TE, Hsieh YH, Wang N, Prabhakar N. *Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat.* Exp Physiol. 2007; 92: 87-97.
86. Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E. *Serotonin receptors: guardians of stable breathing.* Trends Mol Med. 2003; 9: 542-8.
87. Lalley PM, Bischoff AM, Richter DW. *Serotonin 1A-receptor activation suppresses respiratory apneusis in the cat.* Neurosci Lett. 1994; 172: 59-62.
88. Moraes DJ, Bonagamba LG, Costa KM, Costa-Silva JH, Zoccal DB, Machado B. *Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats.* J Physiol. 2014; 592: 2013-33.
89. Sabino JPJ, da Silva CAA, de Mel RF, Fazan Jr R, Salgado HC. *The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure.* J. Auto. Nerv. Syst. 2013; 173: 58-64.
90. Zoccal DB, Furuya WI, Bassi M, Colombar DS, Colombari E. *The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities.* Front Physiol. 2014; 5: 238.
91. Ray CJ, Marshall JM. *Measurement of nitric oxide release evoked by systemic hypoxia and adenosine from rat skeletal muscle in vivo.* J Physiol. 2005; 568: 967-78.
92. Ray CJ, Marshall JM. *The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium.* J Physiol. 2006; 570: 85-96.

93. Fitzgerald RS, Parks DC. *Effect of hypoxia on carotid chemoreceptor response to carbon dioxide in cats*. *Resp Physiol*. 1970; 12: 218-29.
94. Dale EA, Ben Mabrouk F, Mitchell GS. *Unexpected benefits of intermittent hypoxia: enhanced respiratory and nonrespiratory motor function*. *Physiol*. 2014; 29: 39-48.
95. Stipica Safic I, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Dogas Z, Valic Z, Valic M. *Phrenic long-term depression evoked by intermittent hypercapnia is modulated by serotonergic and adrenergic receptors in raphe nuclei*. *J Neurophysiol*. 2018;120: 321-29.
96. Elam M, Yao T, Thore P, Svensson TH. *Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves*. *Brain Res*. 1981; 222: 373-81.
97. Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJ, Riley TA. *Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1993; 264: 1035-44.
98. Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS. *CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons*. *Respir Physiol*. 1996; 105: 35-45.
99. Errchidi S, Hilaire G, Monteau R. *Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study*. *J Physiol*. 1990; 429: 497-510.
100. Hedrick MS, Dwinell MR, Janssen PL, Pizarro J, Bisgard GE. *Differential respiratory muscle recruitment induced by clonidine in awake goats*. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 1198-207.
101. Hedrick MS, Ryan ML, Pizarro J, Bisgard GE. *Modulation of respiratory rhythm by alpha 2-adrenoceptors in awake and anesthetized goats*. *J Appl Physiol*. 1994; 77: 742-50.
102. Anderson CD, Pasquier DA, Forbes WB, Morgane PJ. *Locus coeruleus-to-dorsal raphe input examined by electrophysiological and morphological methods*. *Brain Res Bull*. 1977; 2: 209-21.
103. Baraban JM, Aghajanian GK. *Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography*. *Brain Res*. 1981; 204: 1-11.
104. Dobbins EG, Feldman JL. *Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat*. *J Comp Neurol*. 1994; 347: 64-86.

105. Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvét M. *Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars α demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b)*. J Chem Neuroanat. 1997;13: 1-21.
106. Jones BE, Yang TZ. *The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat*. J Comp Neurol. 1985; 242: 56-92.
107. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvét M. *Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*. J Neurosci Neuropharmacol. 1995; 65: 119-60.
108. Loizou LA. *Projections of the nucleus locus coeruleus in the albino rat*. Brain Res. 1969; 15: 563-66.
109. Baker-Herman TL, Mitchell GS. *Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis*. J Neurosci. 2002; 22: 6239-46.
110. Bavis RW. *Developmental plasticity of the hypoxic ventilatory response after perinatal hyperoxia and hypoxia*. Resp Physiol Neurobiol. 2005; 149: 287-99.
111. Kinkead R, Guertin PA, Gulemetova R. *Sex, stress and their influence on respiratory regulation*. Curr Pharm Des. 2013; 19: 4471-84.
112. Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Kinney H C. *Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome*. Jama. 2006; 296: 2124-132.
113. Gaultier C, Gallego J. *Neural control of breathing: insights from genetic mouse models*. J App Physiol. 2008; 04: 1522-30.
114. Hayes HB, Jayaraman A, Herrman M, Mitchell GS, Rymer WZ, Trumbower RD. *Daily intermittent hypoxia enhances walking after chronic spinal cord injury: a randomized trial*. J Neurol Pharmacol. 2014;82: 104-13.
115. Nichols NL, Satriotomo I, Harrigan DJ, Mitchell GS. *Acute intermittent hypoxia induced phrenic long-term facilitation despite increased SOD1 expression in a rat model of ALS*. J Exp Neurol. 2015; 273: 138-50.
116. Bavis RW, Kim I, Pradhan N, Nawreen N, Dmitrieff EF, Carroll JL, Donnelly DF. *Recovery of carotid body O₂ sensitivity following chronic postnatal hyperoxia in rats*. Resp Physiol Neurobiol. 2011;177: 47-55.

117. Choi CW, Kim BI, Mason SN, Potts-Kant EN, Brahmajothi MV, Auten RL. *Intra-amniotic LPS amplifies hyperoxia-induced airway hyperreactivity in neonatal rats*. *Pediatr Res*. 2013;74: 11-8.
118. Erickson JT, Mayer C, Jawa A, Ling L, Olson Jr EB, Vidruk EH, Katz DM. *Chemoafferent degeneration and carotid body hypoplasia following chronic hyperoxia in newborn rats*. *J Physiol*. 1998; 509: 519-526.
119. Ling L, Olson Jr EB, Vidruk EH, Mitchell GS. *Phrenic responses to isocapnic hypoxia in adult rats following perinatal hyperoxia*. *Resp Physiol*. 1997;109: 107-16.
120. Bavis RW, MacFarlane PM. *Developmental plasticity in the neural control of breathing*. *Exp Neurol*. 2017; 287: 176-91.
121. Bates M., Farrell ET, Eldridge MW. *Abnormal ventilatory responses in adults born prematurely*. *N Engl J Med*. 2014; 370: 584-85.
122. Bates ML, Pillers DAM., PaltaM, Farrell ET, Eldridge MW. *Ventilatory control in infants, children, and adults with bronchopulmonary dysplasia*. *Resp Physiol Neurobiol*. 2013; 189: 329-37.
123. O'halloran KD. *Blast from the past! Phrenic motor memory of antecedent episodic hypercapnia is serotonin dependent: relevance to respiratory rehabilitation and sleep-disordered breathing?*. *Exp Physiol*. 2016; 101: 258-59.
124. Jacono FJ. *Control of ventilation in COPD and lung injury*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;189:371-6.
125. Kales A, Rechtschaffen A. *A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Neurological Information Network.1968. 2001; 55: 305-10.
126. Borovac JA, Dogas Z, Supe-Domic D, Galic T, Bozic J. *Catestatin serum levels are increased in male patients with obstructive sleep apnea*. *Sleep Breath*. 2018; doi: 10.1007/s11325-018-1703-x.
127. Fuller DD, Mitchell GS. *Respiratory neuroplasticity - Overview, significance and future directions*. *Exp Neurol*. 2017 ;287: 144-52.
128. Mateika JH, Narwani G. *Intermittent hypoxia and respiratory plasticity in humans and other animals: does exposure to intermittent hypoxia promote or mitigate sleep apnoea?*. *Exper. Physiol*. 2009; 94: 279-96.

129. Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Mitchell GS. *BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia*. Nat Neurosci, 2004; 7: 48.
130. Wilkerson JE, Mitchell GS. *Daily intermittent hypoxia augments spinal BDNF levels, ERK phosphorylation and respiratory long-term facilitation*. Exper Neurol. 2009; 217: 116-23.
131. Lee FS, Chao MV. *Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins*. Proceeding National Academy of Sciences. 2010; 98: 3555-60.
132. Lee J, Duan W, Mattson MP. *Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice*. J Neurochem. 2002; 82: 1367-75.
133. Hoffman MS, Golder FJ, Mahamed S, Mitchell GS. *Spinal adenosine A2A receptor inhibition enhances phrenic long term facilitation following acute intermittent hypoxia*. J Physiol. 2010;588: 255-66.
134. Loubé DI, Gay PC, Strohl KP, Pack AI, White DP, Collop NA. *Indications for positive airway pressure treatment of adult obstructive sleep apnea patients: a consensus statement*. Chest. 1999; 115: 863-66.
135. Smith IE, Quinnell TG. *Pharmacotherapies for Obstructive Sleep Apnoea*. Glob Drugs Ther. 2004; 64: 1385-99.

11.BIOGRAFIJA

Osobni podaci

Ime i prezime: **Ivona Stipica Safić, dr.med.**

Adresa: Domovinskog rata 95 F, Podstrana

Mobilni telefon: +385 95 91 804 27

E-pošta: istipica@gmail.com

Datum rođenja: 22.12.1988.

Državljanstvo: hrvatsko

Školovanje

2016. - upisan specijalistički poslijediplomski studij iz obiteljske medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2014. - upisan poslijediplomski studij Medicina utemeljena na dokazima Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

2014. - položen liječnički stručni ispit

2007. - 2013. - školovanje na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2003. – 2007. – školovanje u 1. gimnaziji Split, jezični smjer

1995. - 2003. – školovanje u OŠ Marjan Split

Radno iskustvo

Od 9.ožujka.2015 – do sada

Dom zdravlja SDŽ; specijalizantica obiteljske medicine

14. travnja 2014. - 28.veljače.2015.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; asistentica za područje Biomedicine i zdravstva, polje Temeljne medicinske znanosti, grana Neuroznanosti.

13.studenog 2013. - 11. travnja 2014.

Zavod za hitnu medicinu splitsko - dalmatinske županije; stažistica

Profesionalno usavršavanje

27.04.2019. XXVI. Kongres obiteljske medicine

07.04.2019. Kongres: Praktična znanja za studente (eng. Practical Knowledge for Students)

13.03.2019. Dijabetes u praksi

01.04.2017. KMAT u praksi obiteljskog liječnika

21.01.2017. EKG u praksi obiteljskog liječnika

24.11.2016. Prijeoperacijski pregled bolesnika i uloga obiteljskog liječnika

18.09.2016. 8. hrvatski kongres farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem

21.06.2016. Prvi splitski kardiološki đir: abeceda atrijske fibrilacije

14.12.2015. Simpozij: Rano otkrivanje i prevencija kardiovaskularnih bolesti u obiteljskoj medicini

17.09.2015. Split Sleep Symposium

20.12.2014. Organizacija trajne izobrazbe liječnika nakon ulaska Republike Hrvatske u Europsku uniju

15.12.2014. Alzheimerova bolest i demencije

26.11.2014. Simpozij iz područja suzbijanja zlouporabe droga „ Znanja i prevencije nikad dosta!“

31.10.2014. Bol

31.10.2014. Peptična ulkusna bolest, GERB

Strani jezici

Engleski – B2

Talijanski –B1

Znanja i vještine

Rad na računalu i programski jezici (Microsoft Office, Adobe Photoshop, Image J, EndNote)

Vozačka dozvola B kategorije

Nastavne aktivnosti

2016 . – do danas

Voditeljica vježbi OSKI, Katedra za obiteljsku medicinu, Medicinski fakultet u Splitu.

Dodiplomska nastava obvezni predmet Obiteljska medicina

- Studij medicine
- Studij medicine na engleskom jeziku (Medical Studies in English)

2014. – 2015.

Asistentica na Katedri za nuroznanost, Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet

Sveučilišta u Splitu.

Dodiplomska nastava obvezni predmet: Temelji neuroznanosti

- Studij medicine
- Studij dentalne medicine
- Studij medicine na engleskom jeziku (Medical Studies in English)

2010.- 2013.

Demonstratorica vježbi na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Znanstveni interesi

Respiracijska plastičnosti izazvana ponavljanim hiperkapnijama i hipoksijama

Opstruktivna apneja tijekom spavanja

Povezanost OSA-e sa kroničnim bolestima u ordinaciji LOM-a

Atrijska fibrilacija i tromboprofilaksa

KMAT u ordinaciji LOM-a

Genomska nestabilnost Hodgkinova limfoma

Članstva u stručnim udruženjima

Hrvatski liječnička komora, HLK

Hrvatsko društvo za Neuroznanost, HIIM

Hrvatska udružba obiteljske medicine, HUOM

Publikacije

Stipica Safić, Ivona; Pecotic, Renata; Pavlinac Dodig, Ivana; Dogas, Zoran; Valic, Zoran; Valic, Maja. *Phrenic long-term depression evoked by intermittent hypercapnia is modulated by serotonergic and adrenergic receptors in raphe nuclei*. Journal of neurophysiology. 2018; 120: 321-29.

Valic, Maja; Pecotic, Renata; Pavlinac Dodig, Ivana; Valic, Zoran; **Stipica, Ivona**; Dogas, Zoran. *Intermittent hypercapnia-induced phrenic long-term depression is revealed after serotonin receptor blockade with methysergide in anaesthetized rats*. Experimental physiology. 2016; 2: 319-31.

Stipica, Ivona; Pavlinac Dodig, Ivana; Pecotić, Renata; Đogaš, Zoran; Valić, Zoran; Valić, Maja. *Periodicity during hypercapnic and hypoxic stimulus is crucial in distinct aspects of phrenic nerve plasticity.* *Physiological research.* 2016; 1: 133-43.

Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima

Stipica Safić, Ivona; Pavlinac Dodig, Ivana; Pecotić, Renata; Đogaš, Zoran; Valić, Maja. *The role of alpha-2 adrenergic receptors in caudal raphe region on pLTD in rats.* 8. *Hrvatski kongres farmakologije* Split, Hrvatska, 2016.

Stipica, Ivona; Pavlinac Dodig, Ivana; Pecotić, Renata; Đogaš, Zoran; Valić, Maja. *Role of raphe 5-HT_{1A} receptors in phrenic long-term depression in anesthetized rats.* 5. *Croatian Neuroscience Congress* Split, Hrvatska, 2015.

Nagrade i priznanja

2016. Nagrada za najbolju poster prezentaciju na 8. Hrvatskom kongresu farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem. (*The role of alpha-2 adrenergic receptors in caudal raphe region on pLTD in rats*)

2015. Nagrada za najbolju poster prezentaciju na 5. Kongresu neuroznanosti sa međunarodnim sudjelovanjem. (*Role of raphe 5-HT_{1A} receptors in phrenic long-term depression in anesthetized rats*)

2007.- 2008. Stipendija Republike Hrvatske za akademsku izvrsnost (10 % najboljih redovnih studenata Medicinskog fakulteta u Zagrebu).

2008.- 2013. Stipendija grada Splita za najbolje studente.

2013. Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu za rad „Genomska nestabilnost klasičnoga Hodgkinova limfoma“.

2007. nagrada za najbolju učenicu generacije 1.gimnazije Split.

2005. priznanje za 2. mjesto na Županijskom natjecanju iz Biologije.

2005.- priznanje za sudjelovanje na gradskom natjecanju iz talijanskog jezika.

2003. nagrada za najbolju učenicu OŠ „Marjan“.

2002. priznanje za 2. mjesto na Županijskom natjecanju iz Biologije.

2001. priznanje za sudjelovanje na Međuzupanijskom natjecanju iz povijesti.

2001. priznanje za 2. mjesto na Županijskom natjecanju iz povijesti

