

Uloga serotoninskih 5-HT1A receptora u dugoročnoj facilitaciji freničkoga živca izazvanoj akutnim ponavljanim hipoksijama u štakora

Pavlinac Dodig, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:383044>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Pavlinac Dodig, dr. med.

**ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} RECEPTORA U
DUGOROČNOJ FACILITACIJI FRENIČKOGA ŽIVCA
IZAZVANOJ AKUTNIM PONAVLJANIM HIPOKSIJAMA U
ŠTAKORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2014.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za neuroznanost Zavoda za neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u sklopu znanstveno istraživačkih projekata „Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju“, br. 216-2163166-0513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš), „Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava – uloga serotonina“, br. 216-2163166-3342 MZOŠ RH (voditeljica prof. dr. sc. Maja Valić) i „Promjene disanja i simpatičke živčane aktivnosti prilikom ponavljanih hipoksija - uloga serotonina“ HRZZ br. 09/165 (voditeljica prof. dr. sc. Maja Valić).

VODITELJICA RADA:

Prof. dr. sc. Maja Valić, dr. med.

Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

ZAHVALA:

Zahvaljujem mentorici i kolegama sa Zavoda za neuroznanost na uloženom trudu i pomoći tijekom izrade i pisanja ovoga rada, te mojoj obitelji na podršci.

1. SADRŽAJ

	str.
1. SADRŽAJ	1
2. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU	4
3. UVOD	6
3.1. SREDIŠNJA KONTROLA DISANJA I FRENIČKI NEUROGRAM	6
3.2. HIPOKSIJA I DISANJE	9
3.2.1. Periferni i središnji kemoreceptori	9
3.2.2. Hipoksijski ventilacijski odgovor	11
3.3. PLASTIČNOST RESPIRACIJSKOGA SUSTAVA I DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA	12
3.4. DUGOROČNA FACILITACIJA FRENIČKOGA ŽIVCA	16
3.4.1. Mehanizam nastanka dugoročne facilitacije freničkoga živca	16
3.5. NEUROTRANSMITERI U KONTROLI DISANJA	19
3.5.1. Serotonin	20
3.5.1.1. Serotoninski 5-HT _{1A} receptor	21
3.5.2. Serotonin i dugoročna facilitacija disanja	23
3.6. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA	24
3.7. HIPOTEZE	25
3.7.1. Hipoteza 1	25
3.7.2. Hipoteza 2	26
4. TVORIVA I POSTUPCI	27

4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA	27
4.1.1. Anestezija	27
4.1.2. Kateteriziranje krvnih žila	28
4.1.3. Traheotomija i mehanička ventilacija	28
4.1.4. Kirurgija freničkoga živca	29
4.1.5. Primjena 5-HT _{1A} antagonista WAY-100635	30
4.1.5.1. Intravensko ubrizgavanje	30
4.1.5.2. Mikroubrizgavanje u rafe područje	32
4.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL	35
4.3. HISTOLOŠKA POTVRDA MJESTA UBRIZGAVANJA	37
4.4. UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA	38
4.4.5. Aktivnost freničkoga živca	38
4.4.6. Statistička obrada	39
4.5. ETIČKA NAČELA	39
5. REZULTATI	40
5.1. STUDIJA 1 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT _{1A} RECEPTORA U NASTANKU I ODRŽAVANJU DUGOROČNE FACILITACIJE FRENIČKOGA ŽIVCA	40
5.2. STUDIJA 2 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT _{1A} RECEPTORA U KAUDALNOM RAFE PODRUČJU U DUGOROČNOJ FACILITACIJI FRENIČKOGA ŽIVCA	50
6. RASPRAVA	58
6.1. ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT _{1A} RECEPTORA U NASTANKU I ODRŽAVANJU DUGOROČNE FACILITACIJE FRENIČKOGA ŽIVCA	58

6.2. ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT _{1A} RECEPTORA U KAUDALNOM RAJE PODRUČJU U DUGOROČNOJ FACILITACIJI FRENČKOGA ŽIVCA	62
6.3. RAZMATRANJE METODOLOGIJE RADA	64
6.4. ZNANSTVENI DOPRINOS	69
7. ZAKLJUČCI	72
8. SAŽETAK	73
9. SUMMARY	75
10. LITERATURA	77
11. ŽIVOTOPIS	89

2. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU

5-HT – serotonin (5-hidroksitriptamin)

5-HT_{1A} – receptor za serotonin, podskupina 1A, itd.

8-OH-DPAT – 8 hidroksi-2-(di-n-propilamino) tetralin, agonist 5-HT_{1A} receptora

AC – adenilil ciklaza

AIH – akutna ponavljana hipoksija (engl. *Acute Intermittent Hypoxia*)

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

C5–C6 – razina 5.–6. vratnoga kralješka

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

DLH – D, L-homocisteat, agonist glutamatnih receptora

DRS – dorzalna respiracijska skupina

ERK1/2 – izvanstanične kinaze 1 i 2

GABA – γ -amino-maslačna kiselina

HVR – hipoksijski ventilacijski odgovor (engl. *Hypoxic Ventilatory Response*)

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

LC – locus coeruleus

LTF – dugoročna facilitacija disanja (engl. *Long Term Facilitacion*)

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

NMDA – N-metil-D-aspartat (vrsta glutamatnih receptora)

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

PaO₂, i PaCO₂ – parcijalni tlak kisika i ugljikova dioksida u arterijskoj krvi (mmHg)

PBS – fosfatni pufer

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

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

PMN – motorna jezgra freničkoga živca (engl. *Phrenic Motor Nucleus*)

PNA – aktivnost freničkoga živca (engl. *Phrenic Nerve Activity*)

PNG – frenički neurogram (engl. *Phrenic NeuroGram*)

pPNA – vršna aktivnost freničkoga živca (engl. *peak Phrenic Nerve Activity*)

PRS – pontina respiracijska skupina

ROS – reaktivni kisikovi metaboliti

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

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

SŽS – središnji živčani sustav

Ti – trajanje udisaja

Te – trajanje izdisaja

TrkB – tirozin-kinaza B

Ttot – ukupno trajanje respiracijskoga ciklusa

VRS – ventralna respiracijska skupina

WAY-100635 – *N*-{2-[4-(2-metoksifenil)-1-piperazinil]etil}-*N*-(2-piridil)cikloheksan

karboksamid, antagonist serotoninskih 5-HT_{1A} receptora

3. UVOD

3.1. SREDIŠNJA KONTROLA DISANJA I FRENIČKI NEUROGRAM

Disanje omogućava izmjenu plinova i održavanje njihove stabilnosti u krvi, te održavanje acidobazne ravnoteže, koji su ključni za održavanje života. Stoga je disanje automatski i nesvjesni proces, nadziran uz pomoć mnogih sustava povratne sprege, kao što su respiracijski kemorefleksi, te receptori u dišnim putovima i plućima [1]. Upravo je fina kontrola disanja važna u izvođenju svakodnevnih aktivnosti kao što su gutanje, zijevanje, trčanje, skakanje, ali i pri promjenama tjelesnog stanja kao što su trudnoća, bolesti, promjene tjelesne mase, uslijed kojih dolazi do velike varijabilnosti metabolizma i potrebe tijela za disanjem. Uloga moždanih središta koja sudjeluju u kontroli disanja je stvaranje temeljnoga ritma disanja, te prevođenje toga ritma u obrazac aktivnosti respiracijskih motoneurona [2].

Temeljni ritam disanja čine tri neuralne faze:

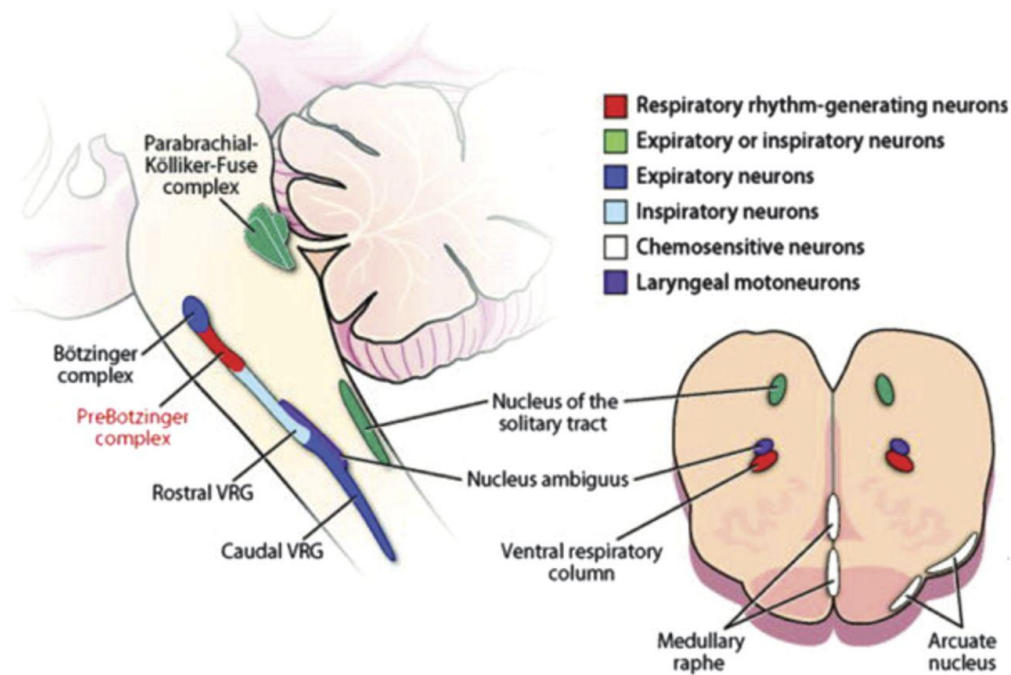
- 1) Faza udisaja, tijekom koje dolazi do kontrakcije inspiracijskih mišića
- 2) Faza postinspirija ili pasivna, prva faza izdisanja, tijekom koje dolazi do prestanka kontrakcije inspiracijskih mišića
- 3) Druga, kasna faza izdisanja, tijekom koje dolazi do aktivnoga izdisanja, uz kontrakciju ekspiracijskih mišića [1, 3-5].

Tijekom svake neuralne faze disanja aktivni su odgovarajući neuroni smješteni u moždanim središtima koja kontroliraju disanje te zajedno čine središnju respiracijsku mrežu [3]. Na temelju stanične analize aktivnosti i potencijala respiracijskih neurona, zaključeno je da temeljni ritam disanja nastaje kao posljedica združene aktivnosti dviju komponenti, stvaranja temeljnoga ritma i obrasca disanja. Pri tome moždana središta koja stvaraju ritam disanja omogućuju prijelaz između pojedinih respiracijskih faza, a ona koja stvaraju obrazac disanja oblikuju obrazac neuronske aktivnosti [2, 3].

Stvaranje temeljnoga ritma disanja može se objasniti s pomoću tri modela:

- 1) Mrežni model (engl. *network model*), prema kojem je međudjelovanje inhibicijskih sinapsi ključno za stvaranje ritma disanja
- 2) Model stvaranja ritma (engl. *pacemaker model*), prema kojem su neuroni s podražujućim svojstvima temelj ritmične aktivnosti
- 3) Hibridni model (engl. *hybrid model*), kombinacija mrežnoga modela i modela stvaranja ritma [1, 3].

Moždana središta koja tvore središnju respiracijsku mrežu obostrano su smještena u području moždanoga debla, poglavito u području produljene moždine i dijelom u mostu (Slika 1). Ventralna respiracijska skupina (VRS) i dorzalna respiracijska skupina (DRS) smještene su u produljenoj moždini, a pontina respiracijska skupina (PRS) u mostu [4, 6-8]. VRS čine kaudalni i rostralni dio, te pre-Bötzinger i Bötzinger kompleks. DRS čini ventrolateralna jezgra solitarnog trakta, a PRS (prije zvanu središte pneumotaksije i apneustičko središte) medijalna parabrahijalna jezgra, te Kölliker-Fuse jezgra [1, 4]. Nadalje, poznato je da moždana središta koja kontroliraju disanje i stvaraju temeljni ritam disanja (kao npr. pre-Bötzinger kompleks) primaju mnoštvo modulacijskih signala iz struktura razasutih po moždanome deblu. Među tim strukturama koje su povezane sa središtima koja kontroliraju disanje često se spominju rafe jezgre, locus coeruleus (LC), nucleus ambiguus, dorzalna motorna jezgra vagalnoga živca, te jezgra hipoglosalnoga živca [7, 9].



Slika 1. Moždana središta važna u kontroli disanja

(Preuzeto iz Benarroch EE. Brainstem respiratory chemosensitivity: new insights and clinical implications. *Neurology*. 2007;68:2140-3. - slika kao u izvorniku.)

Također, osim poznatih središta u mostu i produljenoj moždini, pokazano je da strukture smještene rostralno od mosta, kao što su moždana kora, kaudalni dio hipotalamusa i pojedine strukture srednjega mozga imaju modulacijsku ulogu u kontroli disanja. Ipak, za razliku od struktura moždanoga debla koje su neophodne u stvaranju ritma disanja, u slučaju ozljeda struktura smještenih rostralno od mosta ne dolazi do velikih promjena disanja [10].

Snimanje freničkoga neurograma (engl. *Phrenic NeuroGram*, PNG), električnoga zapisa aktivnosti freničkoga živca (engl. *Phrenic Nerve Activity*, PNA), uobičajena je metoda praćenja središnje kontrole disanja. Aktivnost PNG zrcalni je pokazatelj aktivnosti u središnjim strukturama zaduženima za stvaranje i održavanje temeljnoga ritma disanja, te kao takav omogućuje mjerenje promjena u ritmu i obrascu disanja. Krivulja zapisa PNG ima karakterističan oblik te je pri analizi moguće mjerenje amplitude vršne aktivnosti freničkoga živca (engl. *peak Phrenic Nerve Activity*, pPNA), frekvencije izbijanja, te trajanja pojedinih

faza respiracijskog ciklusa. Pri tome je pPNA neuralni ekvivalent respiracijskog volumena, a frekvencija izbijanja neuralni ekvivalent frekvencije disanja [3, 11, 12].

3.2. HIPOKSIJA I DISANJE

Disanje osigurava odgovarajuću količinu kisika kako bi omogućilo oksigenaciju tkiva i organa u različitim fiziološkim stanjima. Ukoliko se potreba tijela za kisikom ne može zadovoljiti, dolazi do razvoja hipoksije koja se definira kao sniženje parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi ispod 60 mmHg. Hipoksija uzrokuje brzo povišenje arterijskoga tlaka i povećanje minutne ventilacije disanja unutar nekoliko sekunda od početka hipoksije, koji zajedno pokušavaju kompenzirati štetni učinak hipoksije na tkiva i stanice [13]. Osim relativnim manjkom kisika, nedovoljno disanje rezultira i nakupljanjem ugljikova dioksida u krvi, te poremećajem acidobazne ravnoteže. Stoga je važno da moždana središta koja upravljaju disanjem imaju mogućnost zamijetiti količine O₂, CO₂ i pH u arterijskoj krvi kako bi mogla prilagoditi disanje nastalim promjenama [14].

3.2.1. Periferni i središnji kemoreceptori

Periferni i središnji kemoreceptori zaduženi su za održavanje razine O₂, CO₂ i pH u krvi, štiteći tkiva od hipoksije i održavajući disanje u skladu s metaboličkim potrebama organizma [8, 15]. Periferni kemoreceptori osjetljivi su na promjene parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi (PaO₂), a smješteni su u karotidnim tjelešcima, na račvištu zajedničke karotidne arterije [14, 16]. Tako smješteni, periferni kemoreceptori mogu zamijetiti hipoksiju prije negoli zahvati središnji živčani sustav (SŽS) [13]. Karotidna tjelešca par su malenih, izrazito dobro prokrvljenih struktura, sačinjenih od dvije vrste stanica. Tip I stanice, koje se nazivaju i glomusnim stanicama, potječu od tkiva neuralnoga grebena, bogate su

neurotransmitterima i predstavljaju stanice koje zamjećuju razinu kisika. Tip II stanice potporne su stanice slične glija stanicama [13, 15, 17].

Tri su hipoteze koje pokušavaju objasniti kako glomusne stanice zamjećuju količinu kisika u krvi. Prva je metabolička hipoteza, koja tumači kako bi senzori za zamjećivanje smanjene količine kisika mogli biti proteini koji sadrže hem. Druga hipoteza je membranska, prema kojoj su ionski kanali senzori razine O₂. Prema trećoj, kemosomalnoj hipotezi, dolazi do međudjelovanja različitih senzora PaO₂ [13]. U tkivu karotidnih tjelešaca pronađen je čitav niz neurotransmitera/neuromodulatora, kao što su acetilkolin, dopamin, noradrenalin, serotonin, enkefalini, tvar P, endotelini, ATP, GABA, histamin, angiotenzin II. Nadalje, osim nabrojanih, uobičajenih neurotransmitera, smještenih u sinaptičkim mjehurićima, u karotidnim tjelešcima pronađeni su i neuobičajeni neurotransmiteri/neuromodulatori (primjerice NO i CO) koji se spontano stvaraju s pomoću enzima i iskazuju svoje djelovanje interakcijom s citosolnim enzimima ili izravnim modificiranjem proteina. Nakon hipoksijskoga podražaja glomusne stanice karotidnoga tjelešca otpuštaju ekscitacijske (tvar P i acetilkolin) i inhibicijske neurotransmitere/neuromodulatore (dopamin) koji zajedno djeluju kako bi se spriječila pretjerana ekscitacija tijekom dugotrajne hipoksije [13]. Poznato je da pri odgovoru na hipoksiju glomusne stanice otpuštaju i ATP koji ekscitira aferentna vlakna živca karotidnoga sinusa (Heringov živac). Živčani signal putuje živcem karotidnoga sinusa do petroznoga ganglija, te nakon prekapčanja završava u jezgri solitarnoga trakta u produljenoj moždini [13, 15].

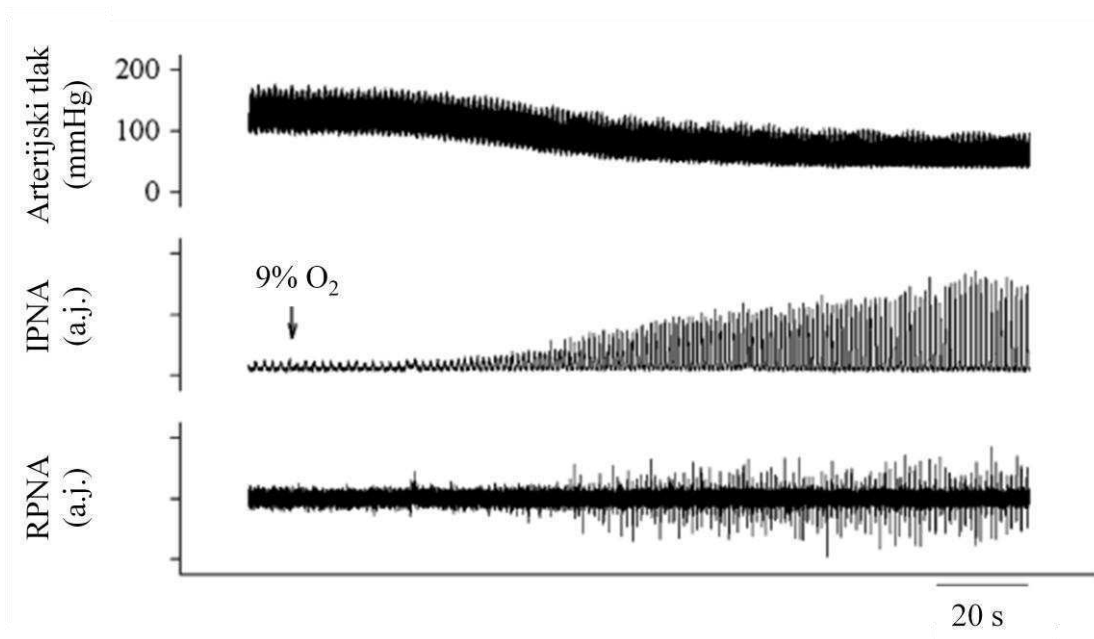
Središnji kemoreceptori u SŽS-u osjetljivi su na promjene CO₂ i pH u krvi [15, 18]. Smješteni su u području uz samu ventralnu površinu produljene moždine (posebice u retrotrapezoidnoj jezgri), ali i u jezgri solitarnoga trakta, LC-u, središnjim rafe jezgrama produljene moždine, preBötzinger kompleksu i u nucleus fastigii [14, 19]. U ljudi kemoosjetljivi neuroni ventralne površine produljene moždine smješteni su u nucleus arcuatus

[20]. Prema ujedinjujućoj hipotezi, periferna i središnja kemoosjetljivost dijele zajednički medijator – molekulu ATP-a [16]. Tako povećanje parcijalnoga tlaka CO₂ u arterijskoj krvi (PaCO₂) dovodi do gotovo trenutnoga otpuštanja ATP-a iz kemoosjetljivih područja ventralne površine produljene moždine [21]. Smatra se kako su granične glija stanice izvor otpuštenoga ATP-a u odgovoru na povećanje razine PaCO₂ i pH [16].

3.2.2. Hipoksijski ventilacijski odgovor

Hipoksija je stanje smanjenoga parcijalnog tlaka kisika u krvi ispod 60 mmHg, uz posljedično smanjenje oksigenacije stanica, tkiva i organa. Uslijed aktivacije perifernih, no ne i centralnih kemoreceptora, prilikom izloženosti hipoksiji dolazi do brzoga povećanja disanja (Slika 2). Hipoksijski ventilacijski odgovor (engl. *Hypoxic Ventilatory Response*, HVR) sisavaca posljedica je međudjelovanja više različitih fizioloških mehanizama, čiji ukupni učinak može varirati ovisno o obrascu i jačini hipoksijskoga podražaja [22]. Fiziološki mehanizmi pri odgovoru na hipoksiju razlikuju se po svojem učinku (povećavaju ili smanjuju disanje), po učinku na različite komponente disanja (minutni volumen ili frekvenciju) ili po vremenskom tijeku (sekunde do godine). Štoviše, neki mehanizmi traju dovoljno dugo te tako utječu na buduće odgovore na hipoksiju, pokazujući svojstvo funkcionalne plastičnosti u središnjoj kontroli disanja [23].

Odgovor na kratku akutnu hipoksiju (do 5 min) sastoji se od tri stadija: akutni odgovor, kratkoročna potencijacija i kratkoročna depresija disanja [12]. Početni akutni odgovor posljedica je pojačane aktivnosti perifernih kemoreceptora, a kratkoročna potencijacija i depresija disanja posljedica su aktivnosti različitih neurotransmitera u središtima za kontrolu disanja. Kratkoročna depresija disanja, nazivana još i posthipoksijsko smanjenje frekvencije nakon akutne ponavljane hipoksije, očituje se kao smanjenje frekvencije disanja i pokazana je na modelu anesteziranoga štakora [23, 24].



Slika 2. Zapis arterijskoga tlaka, integriranoga signala freničkoga živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) i neobrađenoga signala freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*, RPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) prilikom izlaganja hipoksiji (9% O₂)

(Preuzeto i prilagođeno iz 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.)

3.3. PLASTIČNOST RESPIRACIJSKOGA SUSTAVA I DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA

Plastičnost je svojstvo SŽS-a koje se manifestira nastankom strukturnih i funkcionalnih promjena neurona i stvaranjem novih sinapsi, što dovodi do trajnih promjena u neuralnim krugovima [25]. U odraslome mozgu postoje različiti oblici plastičnosti koji uzrokuju trajne promjene učinkovitosti sinapse i na kojima se temelje fiziološki procesi sinaptičke facilitacije i depresije [25, 26]. Kako je disanje uglavnom automatska, nesvjesna, motorička aktivnost, središnja kontrola disanja prije je smatrana prilično rigidnom i

nepromjenjivom, a mislilo se da je kontrolirana jedino sustavnom negativne povratne sprege koja je kretala iz osjetnih receptora [27]. Međutim, takav sustav bio bi izrazito nestabilan te izložen poteškoćama prilikom bilo kakve promjene tjelesnoga stanja ili aktivnosti [28]. Stoga se posljednjih godina naglašava važnost plastičnosti respiracijskoga sustava, te se od kraja 1980.-ih godina intenzivno proučava [27, 29, 30]. Danas je poznato da respiracijski sustav posjeduje iznimnu plastičnost, koja se očituje kao dugotrajna funkcionalna promjena djelovanja moždanih središta za kontrolu disanja s posljedičnom promjenom obrasca disanja na temelju prethodnoga iskustva, nakon što neposredni podražaj više nije prisutan [27, 31]. Plastičnost respiracijskoga sustava pomaže usklađivanju disanja s potrebama organizma tijekom različitih fizioloških i okolišnih stanja i promjena, kao što su rođenje, rast i razvoj, promjene tjelesne mase, trudnoća, starenje, promjene okolišnih uvjeta, bolesti i ozljede mozga te dišnoga i krvožilnog sustava [14, 31]. Nadalje, plastičnost respiracijskoga sustava otkrivena je na više razina: na neuromišićnoj spojnici [32], na razini kemoreceptora [33], na spinalnoj razini [34, 35], te na supraspinalnoj razini moždanoga debla [36]. Podražaji koji dovode do plastičnosti respiracijskoga sustava su:

- ponavljana hipoksija,
- ponavljano električno podraživanje živca karotidnoga sinusa,
- snižene ili povišene vrijednosti kisika ili stres tijekom razvoja,
- vježba,
- hiperkapnija,
- osjetna denervacija,
- ozljeda živčanoga tkiva,
- uvjetovanje [14].

Jedan od oblika plastičnosti respiracijskoga sustava jest dugoročna facilitacija disanja (engl. *Long Term Facilitation*, LTF), koja se očituje kao progresivno, dugoročno pojačanje

disanja ili aktivnosti respiracijskih motoneurona izazvano električnim podraživanjem živca karotidnoga sinusa [37], ili odgovarajućim fiziološkim podražajem – akutnom ponavljanom hipoksijom (engl. *Acute Intermittent Hypoxia*, AIH) [38]. Tako izazvano pojačanje disanja traje dulje od 60 minuta nakon izlaganja posljednjem hipoksijskom podražaju. Prvi put opisan 1980. godine, LTF kao oblik plastičnosti središnjega živčanog sustava izazvan je ponavljanim električnim podraživanjem živca karotidnoga sinusa [39]. Sljedeće studije koristile su AIH protokole koji su se sastojali od različitoga broja (3-72) hipoksijskih epizoda, različite duljine trajanja (15 sekunda - 10 minuta), pri različitim postotnim udjelima kisika (7-12%) u udahnutoj smjesi [12, 40, 41]. Osim različitih protokola, korištene su i različite vrste anestezija [42], kao i pokusne životinje raznolike dobi, spola, vrste i soja [43-51]. LTF kao jedan od najviše proučavanih oblika respiracijske plastičnosti, pronađen je u mnogih životinjskih vrsta, kao što su pas, štakor, mačka, miš, koza [37, 43, 44, 46, 50], ali i u ljudi [52]. Tako je pokazano da je odgovarajući podražaj za nastanak LTF-a akutna ponavljana, a ne dugotrajna hipoksija [53], a različiti AIH protokoli rezultirali su nastankom LTF raznolike jakosti i trajanja [40, 51]. Nadalje, LTF je pokazan na freničkom živcu, ali i na hipoglosalnom, glosofaringealnom i međurebrenim živcima [38, 54, 55]. Ipak, iako je dugoročna facilitacija različitih živaca u osnovi slična, postoje važne razlike iz kojih bi mogle slijediti različite fiziološke uloge LTF-a. Tako LTF živaca koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta (npr. hipoglosalni) utječe na otpor i otvorenost dišnoga puta, dok LTF freničkoga i međurebrenih živaca koji inerviraju respiracijske mišiće povećava snagu disanja [56].

Tijekom spavanja dolazi do značajnih promjena u mehanizmima središnje kontrole disanja, kako u životinja, tako i u ljudi. Jedna od najvažnijih kroničnih bolesti koja je u ljudi najčešće neprepoznata i nedijagnosticirana, a obilježena je ponavljanim epizodama potpunoga (*apneja*) ili djelomičnoga (*hipopneja*) prekida disanja uslijed zatvaranja gornjega dišnog puta i posljedičnim ponavljanim hipoksijama tijekom spavanja je opstruktivna apneja tijekom

spavanja (engl. *Obstructive Sleep Apnea*, OSA). Postoji puno spekulacija o tome ima li LTF zaštitni ili proaktivni učinak na disanje u ljudi oboljelih od OSA-e s obzirom da je taj poremećaj obilježen ponavljanim hipoksijama tijekom spavanja. Sinaptička plastičnost koja se manifestira LTF-om predstavlja oblik fiziološkoga kompenzacijskog mehanizma koji bi mogao doprinosti stabilnom disanju te smanjivati mogućnost nastanka apneja tijekom spavanja. Poznato je da se osim freničkoga u anestetiziranih štakora može izazvati i LTF aktivnosti mišića gornjega dišnog puta koji sudjeluju u regulaciji otpora dišnog puta [39]. Međutim, ukoliko bi se i u ljudi oboljelih od OSA-e svake noći razvijao pLTF, mogao bi rezultirati hipokapnijom i posljedičnom nemogućnošću razvijanja LTF-a u živcima koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta. Štoviše, poznato je da se LTF može izazvati u zdravih ljudi, kao i u onih oboljelih od blage ili umjerene apneje tijekom spavanja, nakon izloženosti ponavljanim hipoksijama. Tako izazvan LTF ovisi o trajno povišenim vrijednostima CO_2 u krvi iznad normokapnijskih vrijednosti. Poznato je da je LTF smanjen u ljudi koji dugo boluju od teškoga oblika apneje tijekom spavanja, a ne liječe se. Također se zna da ponavljana hipoksija povećava osjetljivost kemoreceptora i smanjuje rezervu CO_2 , što zajedno doprinosi nestabilnosti disanja. Upravo to događa se u oboljelih od teškoga oblika OSA-e: ponavljane hipoksije povećavaju nestabilnost disanja ukoliko se ne održava vrijednost CO_2 , a sve kao posljedica povećane osjetljivosti kemoreceptora [52]. Nadalje, ukoliko je LTF stabilizirajući kompenzacijski mehanizam koji štiti od ponavljanih hipoksija, tada bi čimbenici koji slabe LTF trebali ubrzati nastanak OSA-e, ali i drugih patoloških stanja koja ovise o sinaptičkoj plastičnosti dišnog sustava (sindrom iznenadne smrti dojenčeta, kronična opstruktivska plućna bolest, ozljede kralježničke moždine). Stoga, može se pretpostaviti da bi LTF u ljudi mogao imati veliki funkcionalni značaj, no tek je potrebno detaljno razjasniti mehanizme nastanka te doprinos LTF-a homeostazi disanja.

3.4. DUGOROČNA FACILITACIJA FRENICKOGA ŽIVCA

Do sada su mehanizmi nastanka i manifestacije freničkoga LTF-a (engl. *phrenic Long Term Facilitation*, pLTF) najčešće proučavani na modelu anesteziranoga, vagotomiziranoga, paraliziranoga i mehanički ventiliranoga štakora, izloženoga AIH protokolu [51]. Prethodne studije koristile su različite AIH protokole koji su bili više ili manje uspješni u izazivanju pLTF-a. Protokol koji se koristi u splitskom Laboratoriju za neuroznanost sastoji se od pet trominutnih epizoda hipoksije ($FiO_2=0,09$) međusobno razdijeljenih trominutnim razdobljima hiperoksije ($FiO_2=0,5$). Parcijalni tlak CO_2 tijekom cijeloga pokusa održava se unutar fizioloških granica. Navedeni protokol pouzdan je i uspješan u izazivanju pLTF [36, 42]. Koristeći različite AIH protokole, i/ili različite sojeve štakora, u pojedinim radovima opisana je i pojava frekvencijskoga LTF-a, koja se očituje povećanjem frekvencije freničkoga živca 60 minuta nakon izloženosti AIH protokolu [57].

Na PNG-u se pLTF očituje povećanjem amplitude inspirija, te se počinje razvijati oko 30 minuta nakon izlaganja pokusne životinje AIH protokolu. Svoj vrhunac LTF dostiže 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije te amplituda inspirija na PNG-u ostaje povećana još barem 30 minuta nakon postizanja vršne vrijednosti.

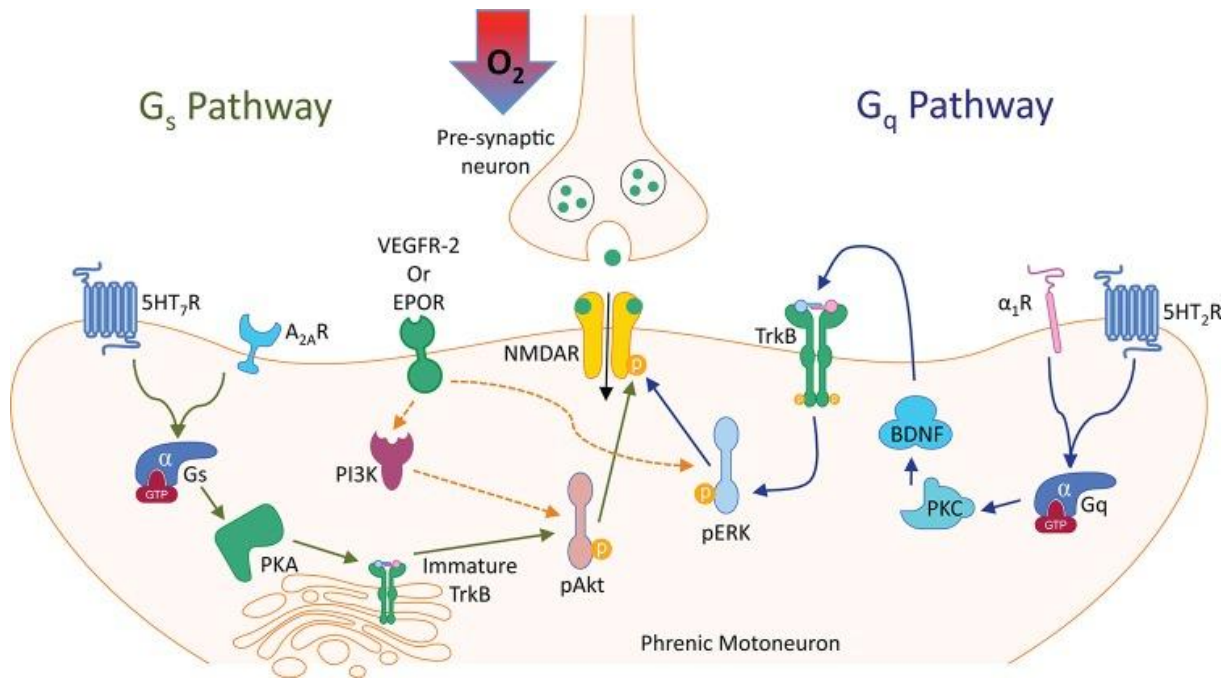
3.4.1. Mehanizam nastanka dugoročne facilitacije freničkoga živca

Osim izlaganja AIH protokolu, za razvoj pLTF-a potrebna je aktivacija spinalnih 5-HT₂ receptora, sinteza proteina neurotrofina (engl. *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), aktivacija visoko-afinitetnoga receptora za tirozin kinazu B (TrkB) i aktivacija ERK MAP signalnoga puta [28, 58-60]. Radni model PLTF-a je sljedeći: ponavljana hipoksija podražuje kemoreceptore koji podražuju serotoninske neurone u rafe jezgrama na otpuštanje serotonina u blizinu motorne jezgre freničkoga živca (engl. *Phrenic Motor Nuclues*, PMN). Zatim otpušteni serotonin potiče čitav niz unutarstaničnih zbivanja u freničkom motoneuronu

koja aktiviraju protein kinaze kako bi započele sintezu proteina BDNF-a. Otpušteni serotonin veže se za 5-HT₂ receptore koji djelovanjem protein kinaze C (PKC) dovode do sinteze BDNF-a u blizini feničkih motoneurona. Zatim BDNF aktivira visoko-afinitetni TrkB receptor, koji potom aktivira izvanstanične kinaze 1 i 2 (ERK1/2). One potom reguliraju fosforilaciju i gustoću glutamatnih NMDA receptora na postsinaptičkoj membrani što dovodi do povećane osjetljivosti na glutamat i na posljetku do pLTF-a. S obzirom da serotoniniski 5-HT₂ receptor spada u skupinu receptora vezanih uz G_q protein, navedeni put često se u literaturi naziva *Q putem* pLTF-a [28, 61]. Štoviše, do razvoja pLTF-a dolazi i uslijed aktivacije adrenergičkih α1 receptora, neovisno o 5-HT₂ receptorima, ali uz aktivaciju protein kinaze B (Akt), umjesto aktivacije ERK1/2. S obzirom da su i adrenergički α1 receptori vezani uz G_q protein, ovaj način nastanka pLTF-a također se smatra dijelom *Q puta* [61, 62]. U regulaciji *Q puta* pLTF-a, važno je nastajanje reaktivnih metabolita kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) uz pomoć NADPH oksidaze, koji inhibiraju serin-treonin fosfataze (kao npr. PP2A/5), koje same inače priječe nastanak pLTF-a [63, 64].

Međutim, nedavno je otkriven alternativni put nastanka pLTF-a, nazvan *S put*. Receptori uključeni u *S put* pLTF-a su serotoniniski 5-HT₇ i adenzinski A_{2A} receptori, oba vezana uz G_s protein [65, 66]. Nadalje *S put* uključuje također i aktivaciju nezreloga oblika TrkB receptora djelovanjem protein kinaze A (PKA), ali neovisno o sintezi i djelovanju BDNF, rezultirajući aktivacijom PI3K/pAkt [67]. Smatra se da *S put* priječi *Q put* pLTF-a tako što uz pomoć aktivacije PKA inhibira NADPH [60] (Slika 3).

Ponavljana hipoksija potiče oba puta pLTF-a, *Q* i *S put*, ali se ta dva puta međusobno inhibiraju. Ako se u područje vratne kralježničke moždine primjene antagonisti adenzinskih A_{2A} receptora ili serotoniniskih 5-HT₇ receptora, dolazi do pojačanja pLTF-a [65, 66]. Nedavna istraživanja pokazala su da teže hipoksije potiču *S put* pLTF-a, a umjerene hipoksije *Q put* [62, 68].



Slika 3. Model dugoročne facilitacije freničkoga živca

(Preuzeto iz Pamerter ME, Powell FL. Signalling mechanisms of long term facilitation of breathing with intermittent hypoxia. F1000Prime Rep. 2013;5:23. - slika kao u izvorniku.)

Nadalje, pLTF pokazuje izrazitu osjetljivost na obrazac podražaja koji ga izaziva. Odgovarajući podražaj za izazivanje pLTF-a je ponavljana, a ne kontinuirana hipoksija jednako dugoga trajanja [53]. Pretpostavlja se kako bi pravi podražaj koji izaziva nastanak pLTF-a zapravo moglo biti upravo akutno ponavljanje podražaja jer je pokazano da pLTF izaziva i ponavljano podraživanje vagalnoga živca [69], kao i kratke epizode simulirane apneje [70, 71], te ponavljana primjena negativnoga tlaka u gornjim dišnim putovima [72]. Također, Bach i sur. su 1999. godine pokazali kako je za nastanak pLTF-a važno da vremena oporavka između ponavljanih podražaja budu kratka, npr. 5 min, jer u slučajevima dugotrajnijega oporavka (30 min) pLTF nije nastajao [24]. Kako je primijećeno da se pLTF može izazvati i ponavljanim intraspinalnim injekcijama [73], može se zaključiti da je osjetljivost na obrazac izazivajućega podražaja smještena na spinalnoj razini. Štoviše, smatra

se da je upravo stvaranje ROS-a i njihovo inhibicijsko djelovanje na protein fosfataze na razini PMN-a ključno u razlikovanju ponavljane i kontinuirane hipoksije u mogućnosti za nastanak pLTF-a [66]. Poznato je da ROS većinom nastaju za vrijeme reoksigenacije, pa ponavljana hipoksija rezultira većom proizvodnjom ROS-a nego kontinuirana hipoksija uslijed višestrukih reoksigenacija [28, 63, 64]. Drugi mehanizmi koji bi također mogli biti u podlozi osjetljivosti na izazivajući podražaj su:

- Desenzitizacija serotoninskih receptora uslijed internalizacije ili funkcionalnih promjena.
- Interakcija između *Q* i *S puta*.

Zanimljivo je da pLTF pokazuje i svojstvo metaplastičnosti, tj. mogućnost da prethodno iskustvo utječe i mijenja razvoj plastičnosti [31]. U pLTF-u, metaplastičnost se očituje pojačanjem pLTF prethodnim izlaganjem pokusnih životinja kroničnoj ponavljanoj hipoksiji ili osjetnoj denervaciji na razini vratne kralježničke moždine [29, 74]. Upravo svojstvo metaplastičnosti povećava fleksibilnost središnje kontrole disanja i olakšava prilagodbu različitim izazovima tijekom života.

3.5. NEUROTRANSMITERI U KONTROLI DISANJA

Disanje je pod nadzorom složenoga međudjelovanja mnogih neurotransmitera i neuromodulatora u respiracijskim područjima mozga na razini produljene moždine sisavaca [4, 75]. Dobro je poznato kako je stvaranje temeljnoga ritma i obrasca disanja pod izravnim nadzorom neurotransmitera glutamata, GABA-e i glicina, te pri tome ekscitacijski neurotransmiter glutamat potiče disanje, dok ga inhibicijski neurotransmiteri GABA i glicin smanjuju i usporavaju. Međutim u novije vrijeme sve se više ističe uloga modulatorskih neurotransmitera poput serotonina, acetilkolina, dopamina, adenozina i tvari P u središnjoj

kontroli disanja [75-77]. Štoviše, poznato je kako su upravo modulacijski neurotransmiteri, i to serotonin [12, 34, 78] i dopamin [79, 80], te noradrenalin [81] važni u izazivanju i održavanju respiracijske plastičnosti [27]. Ipak, najveći napredak u razumijevanju staničnih i sinaptičkih mehanizama nastanka respiracijske plastičnosti postignut je u plastičnosti posredovanoj aktivacijom serotoninских receptora [14].

3.5.1. Serotonin

Međudjelovanje različitih neurotransmitera presudno je za razvoj pLTF-a, jednog od fenomena središnje kontrole disanja. Međutim, u zadnje vrijeme postoji sve više dokaza da LTF-om izravno upravlja serotoninски sustav [26, 70]. Upravo se aktivacija serotoninских receptora povezanih s respiracijskim motoneuronima smatra važnom za nastanak LTF-a [34, 82].

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je modulacijski neurotransmiter koji nastaje iz aminokiseline triptofana djelovanjem enzima triptofan-hidroksilaze, te se nakon sinteze u neuronima skladišti u malim i srednje velikim mjehurićima guste srži. Poslije egzocitoze i djelovanja na receptore serotonin se iz sinaptičke pukotine uklanja mehanizmom ponovnoga unosa (engl. *reuptake*) i metaboličkom razgradnjom. Osim važne uloge u modulaciji disanja, u SŽS-u serotonin ima i mnoštvo drugih uloga, kao što su kontrola osjeta boli, održavanje cirkadijanih ritmova, termoregulacija, učenje i pamćenje, te kontrola ponašanja i afektivnih procesa, primjerice agresivnosti i uzbuđenja. Također, metabolizam serotoninа povezan je s etiologijom nekolicine bolesti, kao što su depresija, anksioznost, migrena, shizofrenija, autizam, Alzheimerova bolest i opsesivno-kompulzivni poremećaj [76, 83].

Najviše neurona koji sadrže serotonin pronađeno je u rafe jezgrama moždanoga debla. Rafe jezgre nalaze se u središnjem dijelu produljene moždine (nucl. raphe obscurus, nucl. raphe magnus, nucl. raphe pallidus), mosta (nucl. raphe pontis, nucl. centralis inferior) i

srednjega mozga (nucl. centralis superior, nucl. raphe dorsalis) unutar retikularne formacije [25, 84]. Aksoni serotoninskih neurona iz rafe jezgara projiciraju se u mnoga područja mozga i kralježničke moždine, uključujući i područja gdje su smještena respiracijska središta. Djelovanje serotonina ovisi o vrsti receptora na koji se veže nakon egzocitoze iz presinaptičkoga završetka. Za sada je otkriveno 7 vrsta i 15 podvrsta serotoninskih receptora [83, 85]. Od svih poznatih serotoninskih receptora, jedino su 5-HT₃ receptori ionotropni, što znači da u svom sastavu imaju ionski kanal koji se aktivira, tj. otvara vezanjem liganda (serotonina). Stoga je aktivacija ionotropnih receptora brza (u milisekundama), iako imaju mali afinitet za vezanje serotonina. Ostali serotoninski receptori su metabotropni jer nakon vezanja serotonina za receptor dolazi do aktivacije G proteina pa se sporo aktiviraju (sekunde), ali imaju visoki afinitet vezanja serotonina [25, 83].

3.5.1.1. Serotoninski 5-HT_{1A} receptor

Nakon otkrivanja, jako je brzo raslo znanje i zanimanje za 5-HT_{1A} receptor. Jedan od razloga rano je otkrivanje 8-OH-DPAT (selektivnoga agonista 5-HT_{1A} receptora, dok se za njegovo agonističko djelovanje na 5-HT₇ receptor tada nije znalo) i njegovoga [3H]-8-OH-DPAT oblika koji su omogućili detaljno farmakološko proučavanje 5-HT_{1A} receptora. Pronalazak da buspiron, koji je također agonist 5-HT_{1A} receptora, ima pozitivni klinički učinak kao anksiolitik i antidepresiv, još je više pobudilo zanimanje za 5-HT_{1A} receptor [85].

Serotoninski 5-HT_{1A} receptor prvi je serotoninski receptor sekvencioniran u cijelosti. Ljudski gen za 5-HT_{1A} receptor smješten je na petom kromosomu (5q11.2–q13). Štakorski 5-HT_{1A} receptor sastoji se od 422 aminokiseline i ima 89% homologije s ljudskim 5-HT_{1A} receptorom. Gen koji ga kodira ne sadrži introne, a tercijska struktura sadrži sedam transmembranskih dijelova s područjima glikozilacije i fosforilacije [85]. U sinapsi je dio serotoninskih 5-HT_{1A} receptora smješten postsinaptički, a dio presinaptički na somi i

dendritima samih 5-HT neurona [85]. Na presinaptičkoj membrani, 5-HT_{1A} receptor predstavlja klasični autoreceptor koji inhibira presinaptičko otpuštanje neurotransmitera i smanjuje sinaptičku transmisiju. Na postsinaptičkoj membrani, aktivacija 5-HT_{1A} receptora dovodi do hiperpolarizacije otvaranjem K⁺ kanala ili inhibicijom Ca²⁺ kanala [76]. Uslijed aktivacije metabotropnoga 5-HT_{1A} receptora dolazi do aktivacije G proteina, i to G_{oi} podjedinice, što rezultira inhibicijom adenilil ciklaze (AC) i posljedičnim smanjenjem količine cikličkoga AMP (cAMP), što zatim inhibira PKA [76]. Aktivacija 5-HT_{1A} receptora dovodi i do djelovanja G $\beta\gamma$ dimerne podjedinice što također uzrokuje otvaranje K⁺ kanala i zatvaranje Ca²⁺ kanala. No, u stanicama koje sadrže AC podtip II i IV, učinak podraživanja 5-HT_{1A} receptora jest povećano stvaranje cAMP-a [86], te aktivacija PKC [76].

Prethodna istraživanja pokazala su kako je u SŽS-u najveća gustoća 5-HT_{1A} receptora u limbičkom području, posebice u hipokampusu, lateralnom septumu, kortikalnim područjima (prvenstveno u entorinalnom i cingulatnom korteksu), moždanom deblu u rafe jezgrama (nucl. centralis superior, nucl. raphe dorsalis), jezgri hipoglosalnoga živca i moždanim područjima koja sudjeluju u kontroli disanja [76, 85]. S druge strane, u bazalnim ganglijima i malom mozgu količina 5-HT_{1A} receptora jedva je zamjetna. U moždanim središtima koja sudjeluju u kontroli disanja upravo je 5-HT_{1A} receptor najzastupljeniji serotoninski receptor, te njegova aktivacija smanjuje podražljivost respiracijskih neurona [76]. Davanje agonista 5-HT_{1A} receptora 8-OH-DPAT-a pokazalo se učinkovitim u liječenju poremećaja disanja kao što je apneuzna (zastoj disanja tijekom inspirija) tijekom ranih stadija ishemije ili hipoksije nakon blokiranja glutamatnih NMDA receptora ili nakon visokih doza barbiturata u mačke [87, 88]. Sličan anti-apneustički učinak imao je i buspiron, klinički korišten anksiolitik, također agonist 5-HT_{1A} receptora kako je već navedeno [76].

3.5.2. Serotonin i dugoročna facilitacija disanja

Dugoročna facilitacija disanja središnji je neuralni mehanizam ovisan o serotoninu, te je pokazano kako smanjenje količine serotonina s pomoću *p*-klorofenilalanina, kao i primjena serotoninškoga neurotoksina (5,7-dihidroksitriptamin), onemogućuju razvoj LTF-a [12, 43]. Nadalje, električno podraživanje rafe jezgara, područja bogatoga serotoninškim neuronima, dovodi do nastanka LTF-a [30]. Bach i Mitchell su 1996. godine pokazali da je za nastanak pLTF-a izazvanog ponavljanim hipoksijama potrebna aktivacija serotoninških receptora, te da se pLTF može spriječiti blokiranjem 5-HT receptora intravenskom primjenom metisergida [38]. Međutim, metisergid djeluje kao neselektivni antagonist i parcijalni agonist serotoninških 5-HT_{1,2,5,6,7} receptora [29, 38, 85], te stoga nije moguće točno odrediti koja podvrsta serotoninških receptora sudjeluje u nastanku pLTF-a. Upotreba drugih neselektivnih serotoninških agonista, kao npr. 5-karboksamidotriptamina (5-CT; agonist 5-HT_{1A/B} receptora) prije izlaganja pokusnih životinja AIH protokolu uzrokuje dugoročno smanjenje aktivnosti freničkoga živca, upućujući na važnu ulogu 5-HT_{1A} i 5-HT_{1B} receptora u modulaciji respiracijske plastičnosti [35]. Na važnost 5-HT_{1A} receptora u središnjoj kontroli i stabilizaciji disanja uputio je klinički nalaz korisnosti buspirona (5-HT_{1A} agonist) u liječenju apneustičkih poremećaja u ljudi [76].

Nadalje, proučavajući mehanizam nastanka i manifestacije pLTF-a, pokazano je kako pri nastanku, ali ne i održavanju pLTF-a, bitnu ulogu imaju 5-HT₂ receptori. Naime, pLTF nije bilo moguće izazvati u životinja koje su prije AIH protokola primile selektivni antagonist 5-HT₂ receptora, ketanserin [35, 82]. Ipak, uslijed korištenja nedovoljno specifičnih agonista i antagonista 5-HT receptora pri istraživanju pLTF-a, pitanje točne podvrste serotoninških receptora koja je važna u nastanku, manifestaciji i održavanju pLTF-a i dalje je ostalo bez odgovora [35, 82].

Postoje dokazi da je aktivacija 5-HT receptora na različitim razinama SŽS-a važna u modulaciji pLTF-a [36, 65]. Pokazano je kako intratekalna primjena metisergida u područje vratne kralježničke moždine priječi nastanak pLTF-a, ali ne i hipoglosalnoga LTF-a, što znači da su serotoninski receptori važni za nastanak pLTF-a smješteni ili u samom PMN-u, ili u njegovoj neposrednoj blizini [12, 58]. Rafe jezgre ishodište su mnogih serotoninskih projekcija u različite dijelove SŽS uključujući i dijelove mozga koji upravljaju disanjem [89]. Aktivacija serotoninskih neurona u kaudalnom dijelu rafe jezgara dovodi do pojačanja respiracije [90-92]. Prethodna istraživanja predložila su model prema kojem serotoninski receptori osim na spinalnoj, vrlo vjerojatno mogu utjecati na oblikovanje respiracijske plastičnosti i na supraspinalnoj razini [38]. Istraživanje iz našega laboratorija dalo je prvi izravni dokaz o sudjelovanju serotoninskih receptora na supraspinalnoj razini u modulaciji pLTF-a [36].

3.6. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija istražuje pojavu i razvoj pLTF-a, jednoga od oblika respiracijske plastičnosti, u odgovoru na AIH. Poznato je da LTF doprinosi razumijevanju procesa prilagodbe disanja pri različitim uvjetima, kao što su primjerice hipoksija ili hiperkapnija. Usprkos brojnim istraživanjima, LTF predstavlja nedovoljno istraženo područje neuralne kontrole disanja. Ova disertacija istražuje ulogu serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u mehanizmu nastanka i održavanja pLTF-a, te ulogu navedenih receptora smještenih u rafe jezgrama u kontroli disanja.

U disertaciji je korišten model vagotomiziranoga, paraliziranoga i mehanički ventiliranoga štakora anesteziranoga uretanom. Sve kvalitativne i kvantitativne promjene disanja praćene su promjenama aktivnosti freničkoga živca. U temeljnim istraživanjima koja

se bave kontrolom disanja, aktivnost freničkoga živca smatra se zrcalnim pokazateljem zbivanja u neuronskim krugovima zaduženim za kontrolu disanja. Kao podražaj za izazivanje pLTF-a korišten je AIH protokol. Slijed od 5 trominutnih hipoksija, međusobno razdvojenih trominutnim hiperoksijama do sada je korišten u splitskom Laboratoriju za neuroznanost i opisan je u nekoliko publikacija, te se pokazao pouzdanim i uspješnim u izazivanju pLTF-a [42, 93, 94].

Temeljem gore navedene problematike, ciljevi disertacije su sljedeći:

- Istražiti ulogu 5-HT_{1A} receptora u pLTF-u nakon intravenske primjene selektivnoga antagonista serotoninskoga 5-HT_{1A} receptora WAY-100635, te zaključiti jesu li 5-HT_{1A} receptori važni za nastanak i/ili održavanje pLTF.
- Utvrditi imaju li 5-HT_{1A} receptori na supraspinalnoj razini ulogu u mehanizmu nastanka pLTF-a nakon kemijske modulacije aktivnosti serotoninskih 5-HT_{1A} receptora tehnikom tlačnoga mikroubrizgavanja u područje kaudalnih rafe jezgara.

3.7. HIPOTEZE

3.7.1. Hipoteza 1

S obzirom da intravensko apliciranje agonista 5-HT_{1A} receptora pojačava aktivnost freničkoga živca, pretpostavljam da će intravenska primjena selektivnog antagonista serotoninskoga 5-HT_{1A} receptora, WAY-100635 prije izlaganja pokusnih životinja AIH protokolu spriječiti nastanak pLTF-a. Nadalje, s obzirom da nije isključena mogućnost da je za nastanak i održavanje pLTF-a aktivacija 5-HT_{1A} receptora važna i nakon prestanka hipoksijskoga podražaja, pretpostavljam da će doći do slabljenja fenomena pLTF-a ako se selektivni 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635 primijeni nakon što se pLTF razvio.

3.7.2. Hipoteza 2

S obzirom da postoje imunohistokemijski dokazi o smještaju 5-HT_{1A} receptora u kaudalnim rafe jezgrama, pretpostavljam da će blokiranje serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom rafe području tehnikom tlačnoga mikroubrizgavanja selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 imati negativan učinak na nastanak i manifestaciju pLTF-a.

4. TVORIVA I POSTUPCI

Protokol za ovu studiju odobrilo je Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskoga fakulteta u Splitu.

4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA

Istraživanje je provedeno na ukupno 51 mladom odraslom Sprague-Dawley štakoru (mužjaci, tjelesne mase 285-330 g, starosti 2-3 mjeseca). Porijeklo soja je kolonija Harlan Italy, a životinje međusobno nisu bile srodne. U životinjskoj nastambi živjele su po dvije životinje zajedno i održavale su se na konvencionalan način. Životinje su hranjene hranom 4RF21 GLP.

4.1.1. Anestezija

Sve su životinje prije početka kirurške pripreme za pokusni protokol anestezirane intraperitonealnom injekcijom uretana (20% otopina uretana u 0,9% fiziološkoj otopini; 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 snažna, 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 vremena djelovanja, životinjama nije bilo potrebno davati

dodatne doze uretana nakon postizanja željenoga stupnja anestezije u daljnjem tijeku pokusnoga protokola.

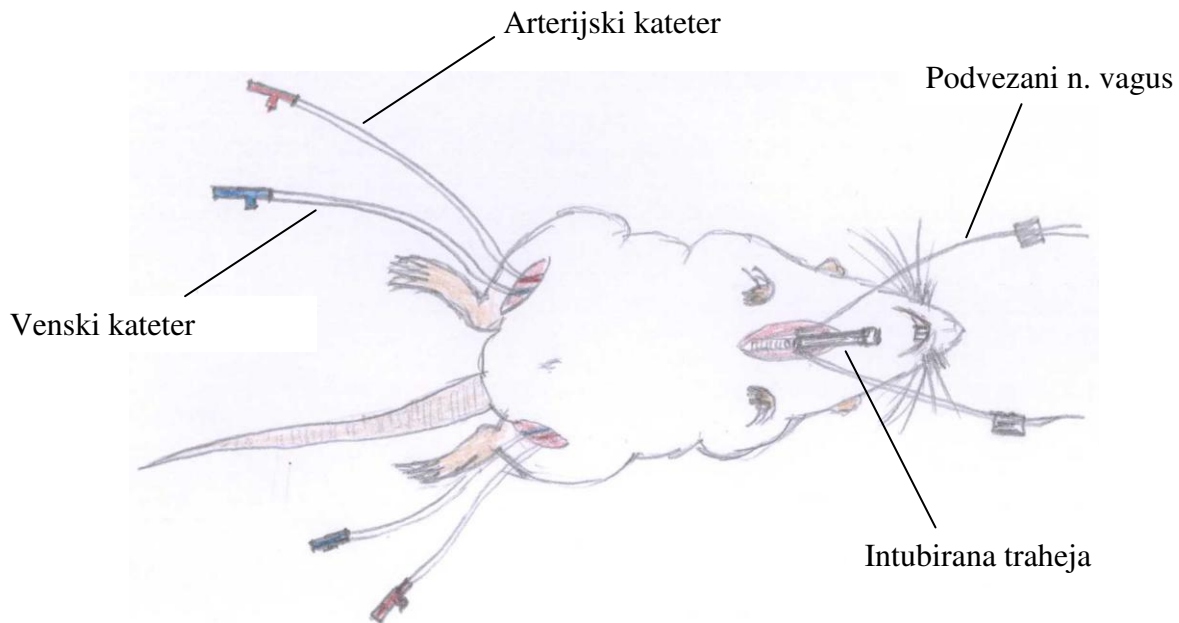
4.1.2. Kateteriziranje krvnih žila

Nakon postizanja željenoga stupnja anestezije, životinje su postavljene u položaj na leđima na grijajuću podlogu (FST, Heidelberg, Njemačka) kako bi se izbjeglo pothlađivanje tijekom trajanja pokusa. Načinjene su kratke incizije kože (oko 1,5 cm) u preponskom području, razmaknuti su tanki slojevi mišića i fascija, te je tako omogućen 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; Slika 4). Plinovi (PaO_2 i PaCO_2) u arterijskoj krvi i pH održavani su unutar fizioloških granica mijenjanjem parametara disanja i infuzijom otopine bikarbonata (1 mmol/ml) u slučaju potrebe.

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 nakon razmicanja mišića omogućen pristup traheji i vagalnim živcima. Zatim je napravljena traheotomija i intubacija traheje metalnim tubusom (Slika 4). Životinje su mehanički ventilirane respiratorom za male životinje (SAR830-P, CWE, Ardmore, SAD) smjesom kisika (50%) i dušika (50%). 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. Kasnije, prije početka pokusnoga protokola, vagalni živci prekinuti su jednostavnim povlačenjem konaca kako bi se spriječio utjecaj plućnih receptora osjetljivih na istezanje na viša moždana središta.



Slika 4. Svakom pokusnom štakoru kateterizirane su obje femoralne arterije i vene, intubirana traheja, te podvezani vagalni živci.

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 računalo se tijekom

pokusa kontinuirano pratio središnji arterijski tlak te neobrađeni i integrirani signal freničkoga živca s pomoću programa PowerLab (ADInstruments, Castle Hill, Australija) i Chart for Windows verzija 5.4.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australija).

Nakon prikaza signala freničkoga živca životinje su paralizirane pankuronij-bromidom (1 mg/kg intravenski; Pavulon, Organon, Nizozemska) kako bi se spriječili spontani pokreti disanja i pozadinska mioelektrična aktivnost.

4.1.5. Primjena 5-HT_{1A} antagonista WAY-100635

Nakon završetka kirurške pripreme životinje su mehanički ventilirane smjesom kisika (50%) i dušika (50%) 30-ak minuta. Aktivnost freničkoga živca pri vrijednosti PaCO₂ 2-3 mmHg iznad apnejičkoga praga smatrana je osnovnom aktivnošću, a postignuta je mijenjanjem postavki respiratora. U pokusnih životinja u studiji apnejički prag prosječno je iznosio 39–40 mmHg.

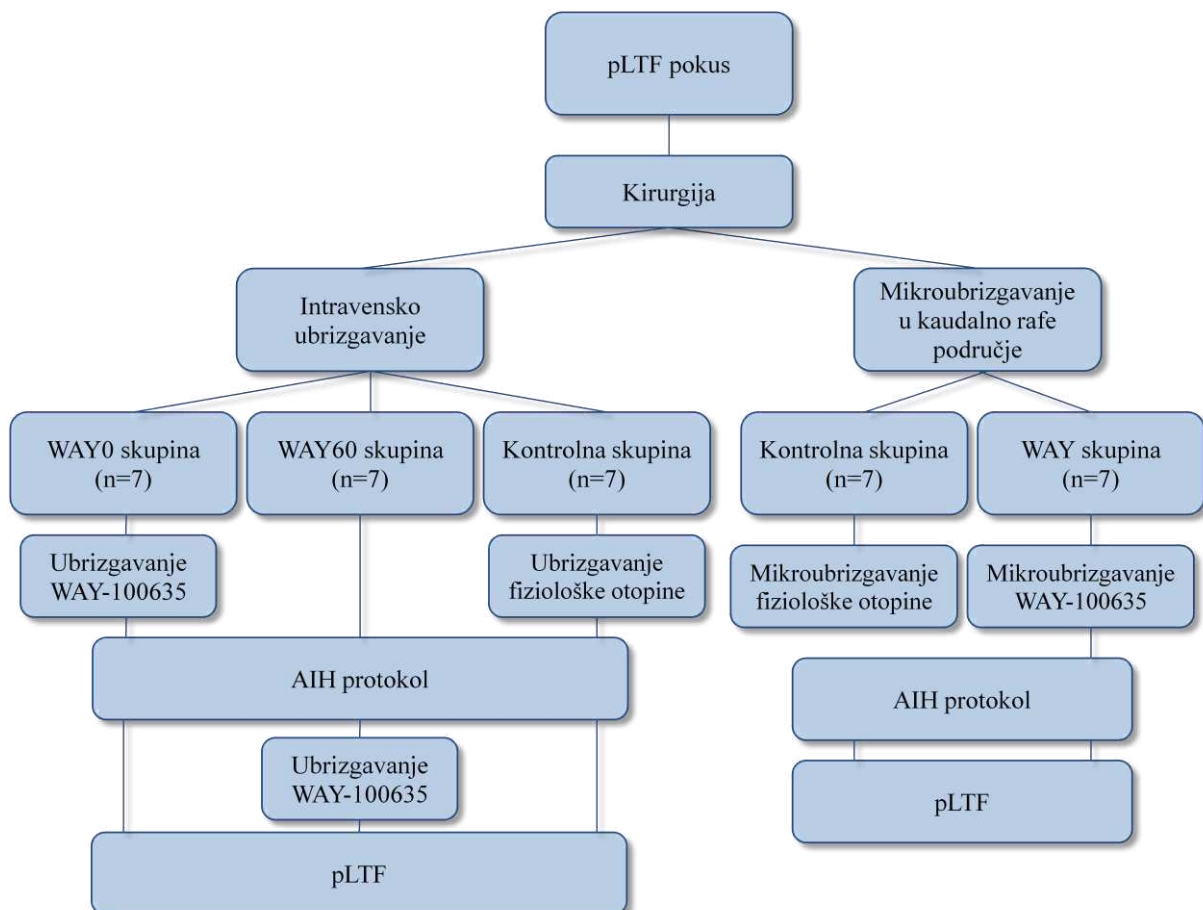
U prvom dijelu istraživanja životinjama je intravenski ubrizgan antagonist serotoninских 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 (1 mM, otopljen u fiziološkoj otopini; Sigma Aldrich, St Louis, SAD) u prethodno kateteriziranu femoralnu venu. U drugom dijelu istraživanja, tehnikom preciznoga tlačnoga mikroubrizgavanja ubrizgan je selektivni antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 u područje kaudalnih rafe jezgara.

4.1.5.1. Intravensko ubrizgavanje

U prvom dijelu istraživanja životinje su bile podijeljene u tri skupine (Slika 5). Prvoj skupini životinja (WAY0, n=7) po završetku kirurške pripreme i stabilizacije signala freničkoga živca (30-ak min), intravenski je ubrizgan selektivni antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 (0,3 mg/kg/min) te su životinje potom izložene AIH protokolu. Primjena WAY-100635 izazvala je prolazne statistički neznčajne promjene arterijskoga tlaka i obrasca

disanja koje su trajale 10 do 15 minuta. Nakon stabilizacije vrijednosti arterijskoga tlaka i povratka obrasca disanja na početne vrijednosti (prije ubrizgavanja WAY-100635), životinje su izložene AIH protokolu.

Druga skupina životinja (WAY60, n=7) po završetku kirurške pripreme i nakon stabilizacije signala freničkoga živca izložena je AIH protokolu. Životinjama iz skupine WAY60 intravenski je ubrizgan WAY-100635 (0,3 mg/kg/min) 60 minuta nakon posljednjega hipoksijskog podražaja, te je aktivnost freničkoga živca snimana tijekom narednih 30 minuta kako bi se otkrio utjecaj WAY-100635 na disanje. U to vrijeme također je uzet dodatni uzorak arterijske krvi za određivanje acidobaznoga statusa.



Slika 5. Dijagram tijeka istraživanja

U prvom je dijelu istraživanja WAY-100635 primijenjen intravenski, a u drugom dijelu istraživanja mikroubrizgan je u područje kaudalnih rafe jezgara.

Treća skupina životinja (kontrolna, n=7) izložena je istom AIH protokolu, ali je životinjama prije početka pokusnoga protokola intravenski ubrizgana odgovarajuća doza fiziološke otopine (0,63 ml/kg/min) umjesto WAY-100635 (Slika 5).

Dodatnih 7 životinja podvrgnuto je istoj anesteziji i kirurškoj obradi, ali potom nisu izložene AIH protokolu (skupina za vremensku kontrolu). Ta skupina životinja služila je kao kontrola koja je dokazala nepostojanje utjecaja anestezije i protekloga vremena na stabilnost pokusnih životinja i signal freničkoga živca u razdoblju od 120 minuta.

Također, kako bi isključili mogući nespecifični utjecaj WAY-100635 na manifestaciju PLTF-a, dodatne 3 životinje primile su WAY-100635 intravenski (0,3 mg/kg/min), ali potom nisu izložene AIH protokolu. Ta skupina nije pokazala nikakve razlike u PNG-u u usporedbi sa skupinom vremenske kontrole.

4.1.5.2. Mikroubrizgavanje u rafe područje

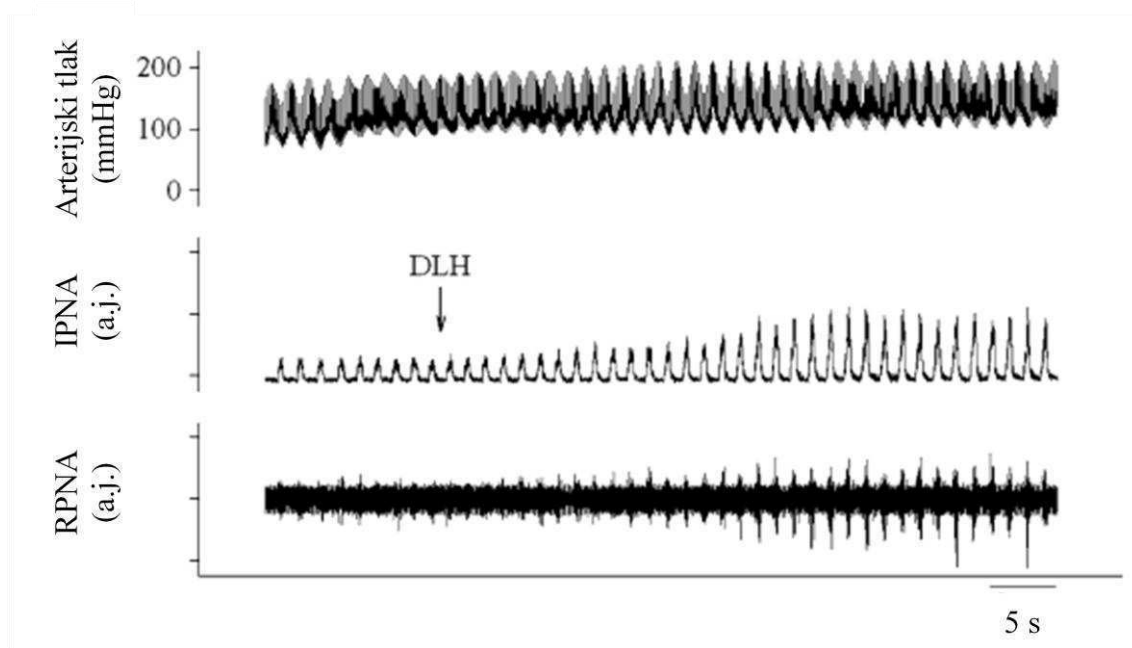
U drugom dijelu istraživanja, životinjama postavljenima u stereotaksijski okvir, načinjena je okcipitalna kraniotomija kako bi se omogućio pristup kaudalnom rafe području u koje je vršeno mikroubrizgavanje s pomoću mikropipete sastavljene od 4 mikrocevčice izrađene u našem laboratoriju s pomoću uređaja Vertical pipette puller model No. 51210 (Stoelting, Wood Dale, SAD). Četiri mikrocevčice sadržavale su:

1. fiziološku otopinu (0,9% NaCl)
2. D, L - homocisteat (DLH; 10 mM, otopljen u fiziološkoj otopini; Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
3. WAY-100635 (1 mM, otopljen u fiziološkoj otopini; Sigma Aldrich, St Louis, SAD)
4. India Ink (otopljen u fiziološkoj otopini).

Prije mikroubrizgavanja, na svaku mikrocevčicu postavljena je polietilenska cjevčica spojena na injekcijsku špricu. S pomoću pozitivnoga tlaka koji je postignut pomicanjem klipa

injekcijske šprice, mikroubrizgavan je volumen od 20 ± 5 nL. Mikroubrizgani volumeni mjereni su promatranjem pomaka meniska tekućine u svakoj pojedinoj mikrocevčici, s pomoću mikroskopa s mjernom ljestvicom na okularu.

Nakon uklanjanja kostiju glave i probijanja moždanih ovojnica, mali mozak je lagano podignut i odgurnut kranijalno kako bi se jasno prikazao obex (vršak četvrte moždane komore), koji je bio polazna orijentacijska točka. Uz korištenje atlasa štakorskoga mozga [95] 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 (slika 6). Učinci mikroubrizgavanja DLH bili su prolazni, reproducibilni i specifični za mjesto mikroubrizgavanja. Postupak mikroubrizgavanja selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora 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 WAY-100635. Po završetku pokusa u isto je područje mikroubrizgana mala količina boje (India Ink; 20 ± 5 nl) koja je kasnije služila za histološku potvrdu mjesta mikroubrizgavanja.



Slika 6. Zapis arterijskoga tlaka, integriranoga signala freničkoga živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) i neobrađenoga signala freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*, RPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) prilikom mikroubrizgavanja glutamatnoga agonista DLH (10 mM; 20 ± 5 nl) u kaudalni dio rafe jezgara uslijed kojega dolazi do povećanja IPNA i RPNA.

(Preuzeto i prilagođeno iz 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.)

Životinje su bile podijeljene u dvije skupine, skupinu WAY i kontrolnu skupinu (Slika 5). Nakon identifikacije rafe jezgara mikroubrizgavanjem sinaptičkoga ekscitanta DLH, skupini WAY ($n=7$) mikroubrizgan je antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 (20 ± 5 nL) u isto područje. Dvije minute nakon mikroubrizgavanja WAY-100635 započeo bi AIH protokol. Kontrolnoj skupini životinja ($n=7$) umjesto ispitivanoga serotoniniskog 5-HT_{1A} antagonista WAY-100635 ubrizgana je jednaka količina fiziološke otopine (20 ± 5 nL) nakon prethodnoga identificiranja područja s pomoću DLH. Dvije minute nakon mikroubrizgavanja fiziološke otopine, započeo bi AIH protokol.

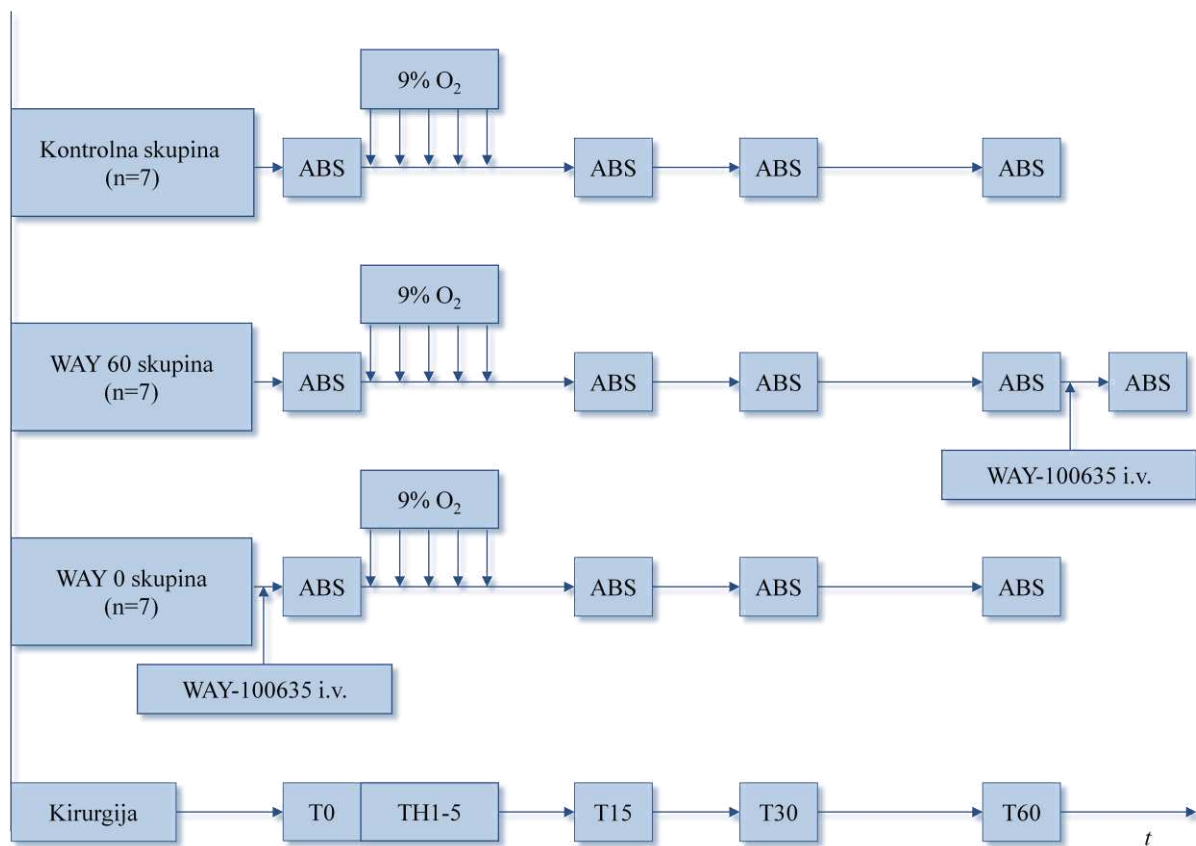
Kako bi se potvrdilo da mikroubrizgavanje WAY-100635 u kaudalno rafe područje nije imalo dugotrajne nespecifične učinke na aktivnost freničkoga živca, dvjema dodatnim životinjama je mikroubrizgan WAY-100635, ali životinje nisu izložene AIH protokolu. Tijekom 90 minuta snimanja pPNA tih životinja nije se mijenjao.

4.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

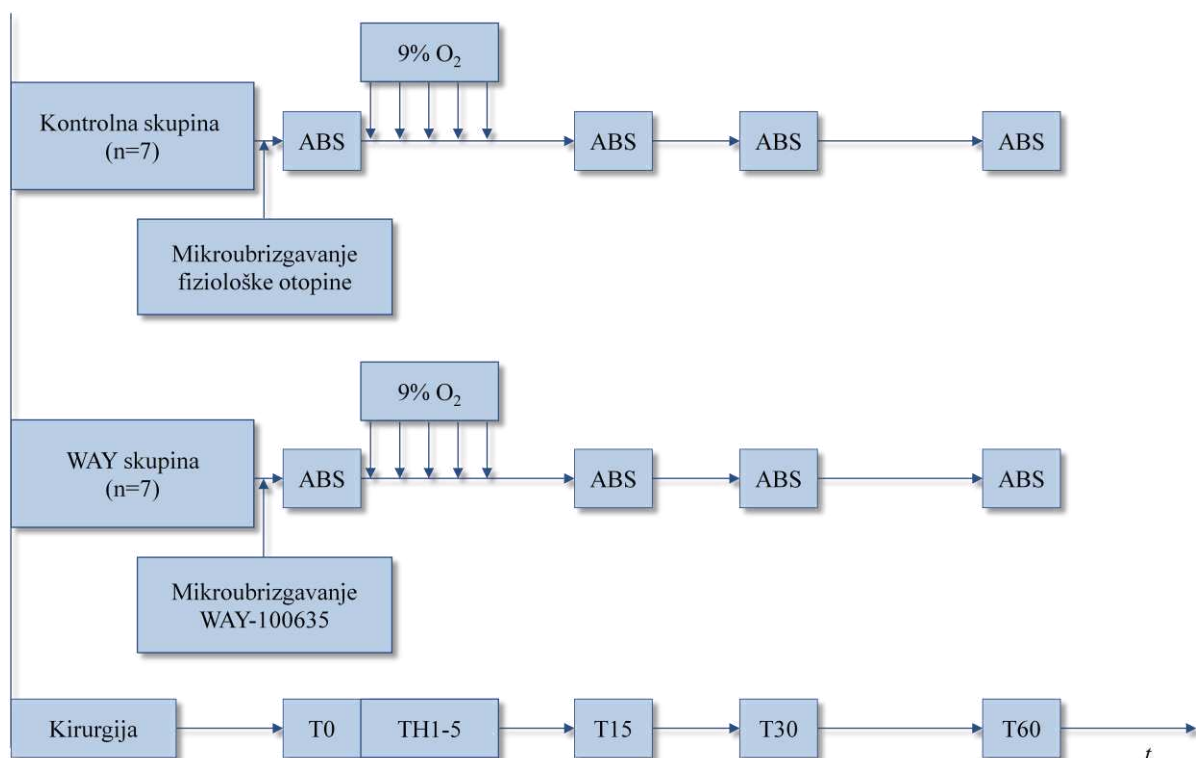
Nakon pripreme životinja i stabilizacije signala freničkoga živca uzet je početni uzorak krvi za acidobazni status (0,2 ml u hepariniziranu staklenu kapilaru; neiskorištena krv je vraćena u životinju) te snimljen signal freničkoga živca i srednjega arterijskog tlaka. Snimljene vrijednosti smatrane su početnim uvjetima s kojima su kasnije uspoređivane nastale promjene. Zatim je po provedbi intravenskoga ubrizgavanja ili središnjega mikroubrizgavanja proveden AIH protokol: pokusne životinje izložene su slijedu od 5 trominutnih hipoksija ($FiO_2=0,09$), odvojenih trominutnim hiperoksijama ($FiO_2=0,5$).

Točke u kojima je analiziran signal freničkoga živca i srednjega arterijskog tlaka bile su 5 hipoksijskih epizoda, te 15, 30 i 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije. Uzorci arterijske krvi za acidobazni status nisu uzimani tijekom hipoksija kako bi se smanjio sveukupni gubitak krvi svake pojedine životinje, već samo 15, 30 i 60 minuta nakon posljednjega hipoksijskog podražaja (Slika 7 i 8).

Dodatne četiri životinje podvrgnute su istoj anesteziološkoj i kirurškoj pripremi, međutim nisu izložene slijedu AIH-a, već jednoj kontinuiranoj hipoksiji u trajanju od 15 minuta. Podaci dobiveni analizom tih pokusa trebali su pokazati da akutna kontinuirana hipoksija, za razliku od AIH ne dovodi do nastanka pLTFa.



Slika 7. Protokol prvoga dijela istraživanja u kojemu je WAY-100635 primijenjen intravenski. Skupina WAY60 primila je WAY-100635 60 minuta nakon posljednje hipoksije, a skupina WAY0 prije prve hipoksije.



Slika 8. Protokol drugoga dijela istraživanja u kojemu je WAY-100635 mikroubrizgavan u kaudalni dio rafe jezgara

Kontrolnoj skupini u kaudalno rafe područje mikroubrizgana je fiziološka otopina, a skupini WAY mikroubrizgan je WAY-100635.

4.3. 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). Potom su im mozgovi izvađeni i pohranjeni u Zambonijevom fiksativu 24 sata na 4° C te zatim isprani PBS-om. Izvađeni i fiksirani mozgovi su rezani 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. Na taj je način određena podudarnost mjesta mikroubrizgavanja s elektrofiziološkim odgovorom nakon mikroubrizgavanja u područje kaudalnih rafe jezgara.

4.4. UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA

4.4.1. 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 Averages, 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 je analizirana 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 su analizirani usrednjavanjem vrijednosti u vremenskom intervalu od 20 sekunda u određenim vremenskim točkama: prije prve hipoksije (T_0), za vrijeme pet hipoksijskih epizoda (TH_1-5), te 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) i 60 (T_{60}) minuta nakon kraja posljednje hipoksije. Vrijednosti pPNA uspoređene su kao postotne promjene od početne vrijednosti u svake pojedine životinje.

4.4.2. 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 $<0,05$.

4.5. ETIČKA NAČELA

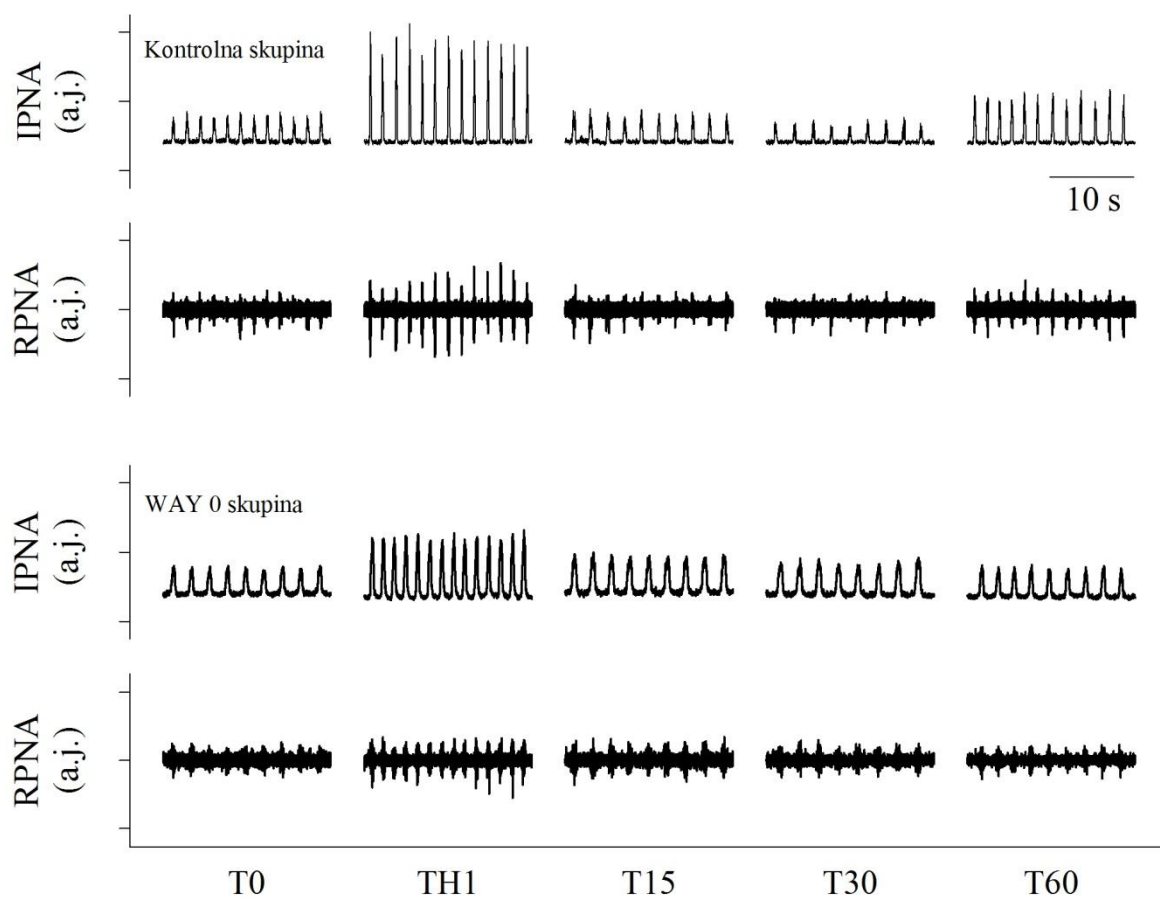
Svi navedeni pokusi prethodno su odobreni od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Splitu u okviru znanstveno istraživačkih projekata „Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju“, br. 216-2163166-6513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš), „Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava – uloga serotonina“, br. 216-2163166-3342 MZOŠ RH (voditeljica prof. dr. sc. Maja Valić) i „Promjene disanja i simpatičke živčane aktivnosti prilikom ponavljanih hipoksija - uloga serotonina“ HRZZ br. 09/165 (voditeljica prof. dr. sc. Maja Valić). Prikladni model za izvođenje ovih pokusa je štakor anesteziran uretanom. Svi kirurški postupci izvedeni su na životinjama u anesteziji odgovarajućega stupnja prema etičkim načelima. Eutanazija životinja po završetku protokola vršena je predoziranje anestetikom te intravenskom primjenom zasićene otopine kalijeva klorida u životinja u kojih se ispitivani lijek primjenjivao intravenski, prema naputcima American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia. U životinja u kojih je vršeno mikroubrizgavanje i histološka potvrda mjesta mikroubrizgavanja eutanazija se izvodila transkardijalnom perfuzijom Zambonijevim fiksativom pri dubokoj anesteziji.

5. REZULTATI

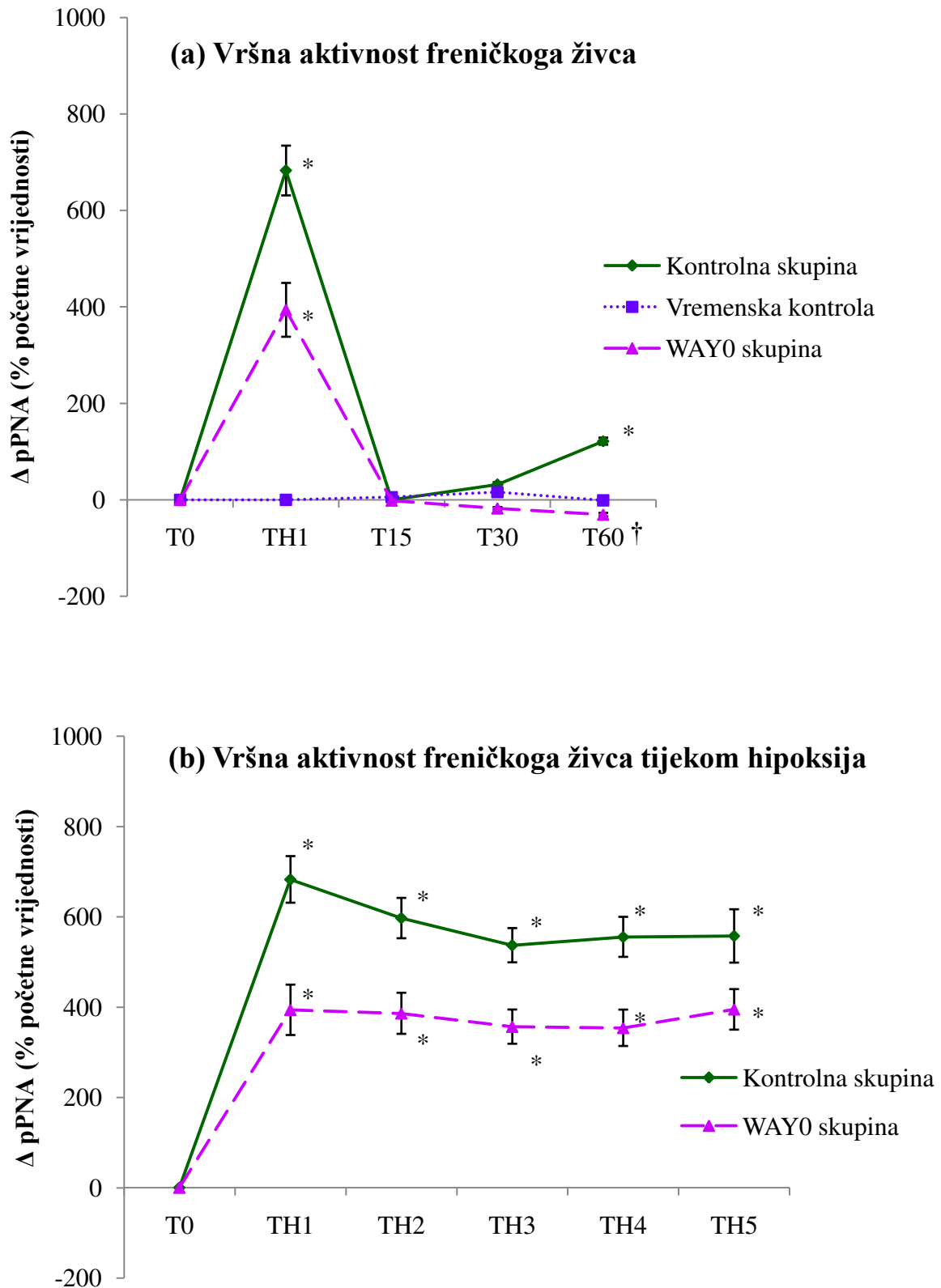
5.1. STUDIJA 1 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} RECEPTORA U NASTANKU I ODRŽAVANJU DUGOROČNE FACILITACIJE FRENIČKOGA ŽIVCA

Intravensko ubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 prije izlaganja životinja AIH protokolu spriječilo je nastanak pLTF-a. Nadalje, intravensko ubrizgavanje WAY-100635 nakon što se pLTF već razvio spriječilo je očuvanje pLTF-a. U kontrolnoj skupini životinja, nakon izlaganja AIH protokolu, izazvan je pLTF koji se očitovao statistički značajnim povećanjem pPNA 60 minuta nakon kraja posljednjega hipoksijskog podražaja (povećanje pPNA za 121,6±7,3%, $P<0,001$; Slika 9, kontrolna skupina, Slika 10a), u usporedbi s početnim vrijednostima. Vrijednost pPNA nije bila statistički značajno različita 15 i 30 minuta nakon kraja posljednje hipoksije u usporedbi s početnim vrijednostima (smanjenje pPNA za 0,1±5,0% u T15 i povećanje pPNA za 31,5±5,2% u T30, $P>0,05$; Slika 9, kontrolna skupina, Slika 10a).

U životinja skupine WAY0 kojima je WAY-100635 ubrizgan prije početka AIH protokola pLTF nije se razvio. Vrijednost pPNA u životinja iz WAY0 skupine 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije bila je statistički značajno manja nego prije početka AIH protokola (smanjenje pPNA za 30,7±3,6%, $P=0,013$; Slika 9, WAY0 skupina, Slika 10a), kao i u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja ($P<0,001$; Slika 10a). U usporedbi s vrijednostima u početnim uvjetima, nije bilo statistički značajne promjene vrijednosti pPNA 15 i 30 minuta nakon kraja posljednje hipoksije (smanjenje pPNA za 1,4±3,7% u T15 i za 17,9±2,9% u T30, $P>0,05$; Slika 9, WAY0 skupina, Slika 10a).



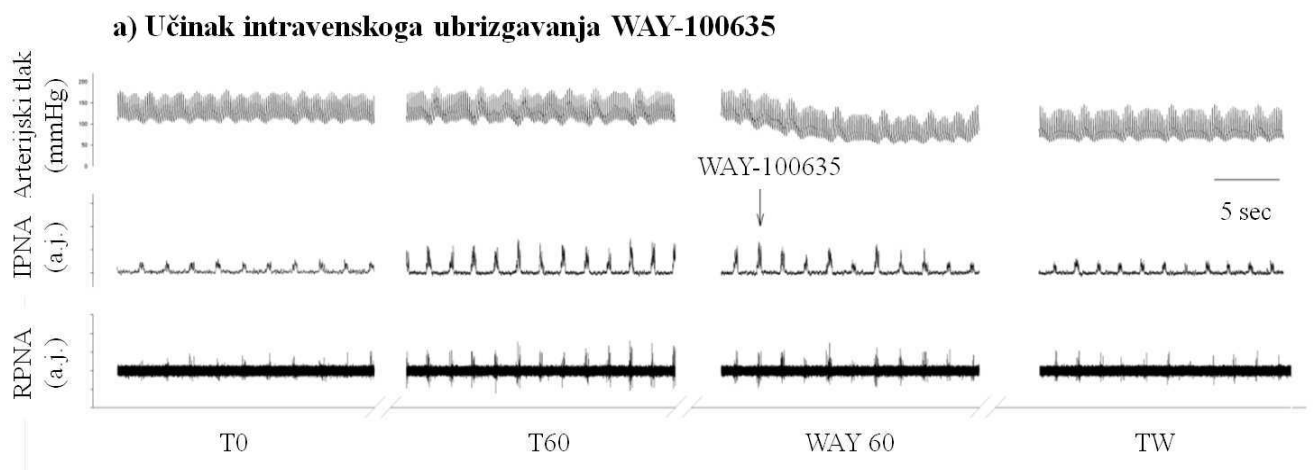
Slika 9. Integrirani signal freničkoga živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) i neobrađeni signal freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*, RPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) nakon ponavljane hipoksije u štakora kontrolne skupine i štakora kojemu je WAY-100635 ubrizgan intravenski prije izlaganja hipoksijama. U štakora kontrolne skupine vidljiv je pLTF, tj. povećanje pPNA u T60. Štakor koji je dobio WAY-100635 nije razvio pLTF. Signal freničkoga živca prikazan je prije prve hipoksije (T0), za vrijeme prve hipoksije (TH1) i 15 (T15), 30 (T30) i 60 (T60) minuta nakon kraja posljednje hipoksije.

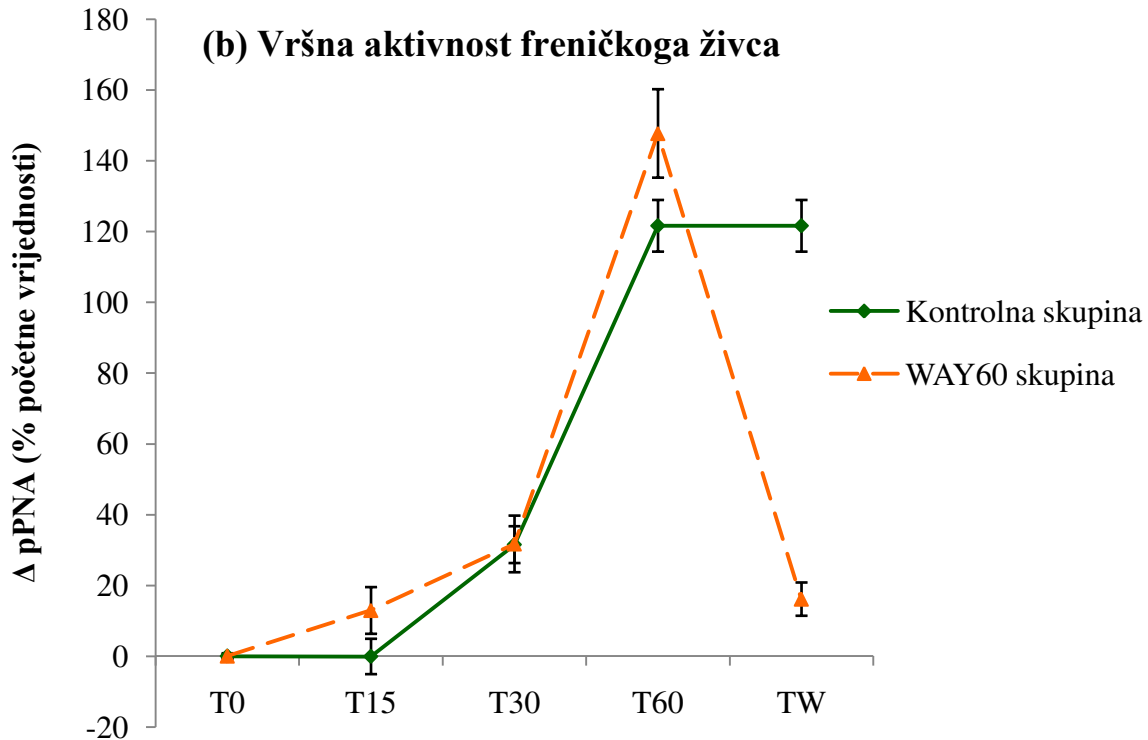


Slika 10. Vremenski slijed promjena pPNA (podslika a) u kontrolnoj (♦) i skupini koja je prije hipoksija dobila WAY-100635 (WAY0, ▲), nakon AIH protokola. U kontrolnoj skupini u T60 razvio se pLTF, dok u WAY0 skupini nije. Skupina vremenske kontrole (■) nije bila

izložena AIH protokolu, niti je dobila WAY-100635. Utjecaj blokiranja 5-HT_{1A} receptora na aktivnost freničkoga živca tijekom svih ponavljanih hipoksija prikazan je na podslici b (*statistički značajna razlika od početne vrijednosti u T0, $P < 0.001$; †statistički značajna razlika od kontrolne skupine, $P < 0.001$). Točka prije prve hipoksije (T0), pet hipoksijskih epizoda (TH1-5), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije.

Kako bi se ispitala uloga 5-HT_{1A} receptora u očuvanju pLTF-a, životinjama WAY60 skupine ubrizgan je WAY-100635 nakon što se pLTF već razvio. Prije ubrizgavanja WAY-100635, ni u jednoj vremenskoj točki nije bilo statistički značajne razlike u pPNA između kontrolne i WAY60 skupine ($P > 0,05$). U WAY60 skupini postojalo je povećanje pPNA u T60 za $147,7 \pm 12,5\%$ u usporedbi s početnim vrijednostima. U svih sedam životinja WAY60 skupine, nakon ubrizgavanja WAY-100635, došlo je do statistički značajnoga smanjenja pPNA i njezinoga približavanja početnim vrijednostima (pPNA je bila za $16,1 \pm 4,7\%$ veća od početnih vrijednosti; Slika 11a i 11b). Tijekom cijeloga daljnjeg vremena praćenja (duže od 30 minuta), pPNA ostala je na postignutoj vrijednosti.



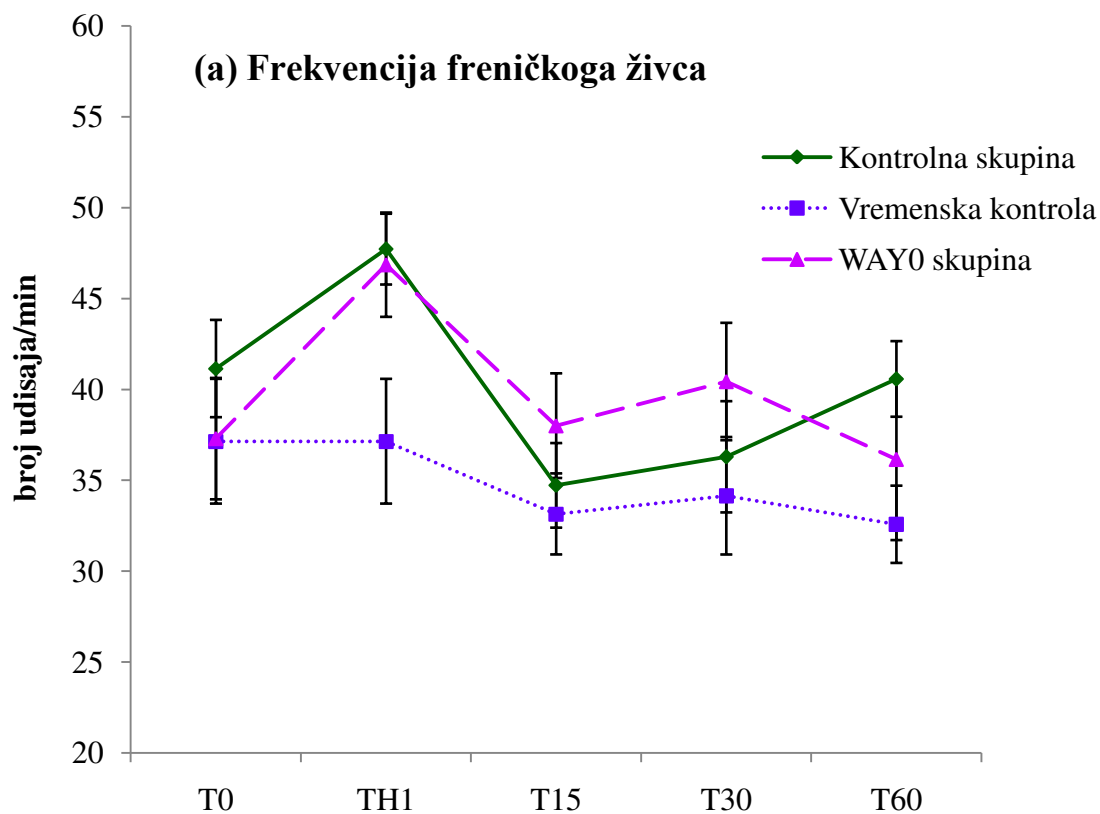


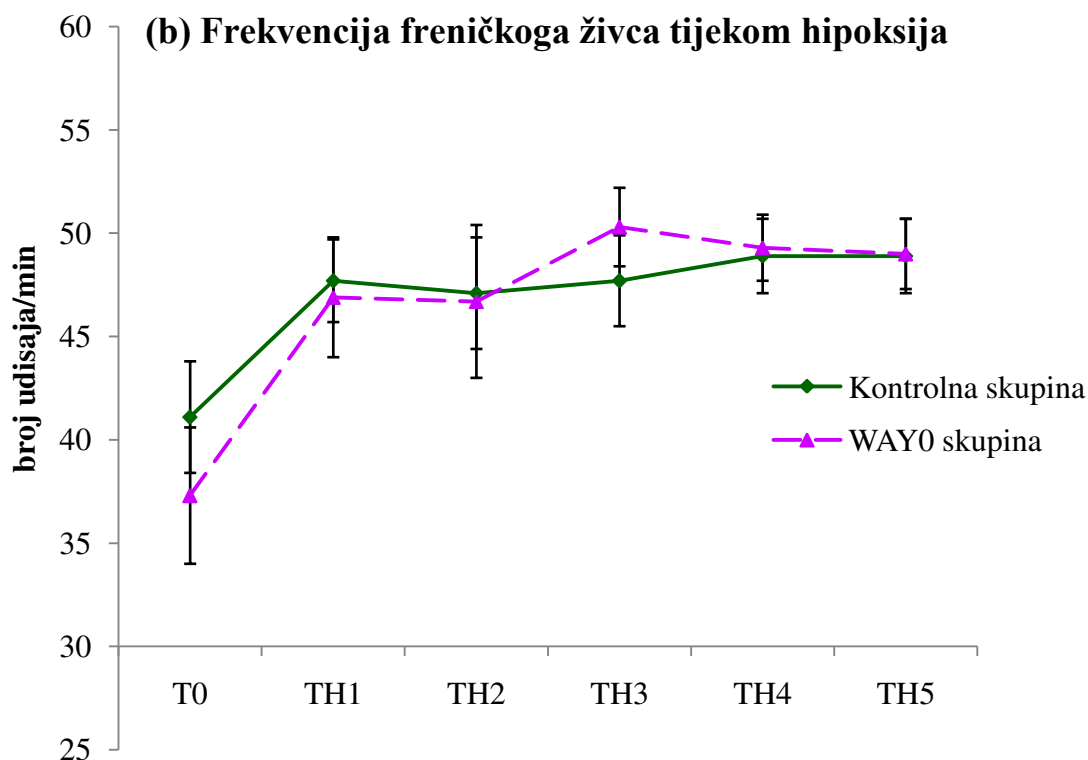
Slika 11. Učinak intravenskoga ubrizgavanja WAY-100635 u T60 nakon što se pLTF već razvio. Nakon ubrizgavanja WAY-100635, došlo je do statistički značajnoga smanjenja pPNA. Na podslici a prikazani su arterijski tlak (MAP), integrirani signal freničkoga živca (IPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) i neobrađeni signal freničkoga živca (RPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) tijekom početnih uvjeta (T0), 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije (T60), tijekom intravenskoga ubrizgavanja WAY-100635 (WAY60), te 10 minuta kasnije (završna kontrola). Vremenski slijed promjena pPNA (podslika b) u kontrolnoj (◆) i skupini koja je dobila WAY-100635 u T60 (WAY60, ▲). U obje skupine razvio se pLTF 60 minuta nakon posljednje hipoksije, ali u WAY60 skupini, nakon davanja WAY-100635 došlo je do smanjenja pPNA. Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije, 10 minuta nakon davanja WAY-100635 (TW).

Tijekom hipoksijskih epizoda, pPNA bila je povećana u svim skupinama životinja. Međutim, nije postojala statistički značajna razlika u pPNA tijekom hipoksija između kontrolne i WAY0 skupine ($P > 0,05$; Slika 10b).

Frekvencija disanja kao pokazatelj aktivnosti freničkoga živca nije se statistički značajno razlikovala između kontrolne, WAY0 i WAY60 skupine u bilo kojoj vremenskoj

toći tijekom cijeloga trajanja pokusa ($P>0,05$; Slika 12a). Ni u jednoj pokusnoj skupini nije bilo statistički značajne razlike u frekvenciji disanja tijekom pet hipoksijskih epizoda i 15, 30 i 60 minuta nakon posljednje hipoksije, u usporedbi s početnim vrijednostima frekvencije disanja odgovarajuće pokusne skupine (Slika 12b).





Slika 12. Vremenski slijed promjena frekvencije freničkoga živca (broj udisaja/min, podslika a) u kontrolnoj (◆) i skupini koja je dobila WAY-100635 prije AIH protokola (WAY0, ▲), nakon AIH protokola. Skupina vremenske kontrole (■) nije bila izložena AIH protokolu, niti je dobila WAY-100635. Utjecaj blokiranja 5-HT_{1A} receptora na frekvenciju freničkoga živca tijekom svih pet hipoksijskih epizoda je prikazano na podslici b. Točka prije prve hipoksije (T0), pet hipoksijskih epizoda (TH1-5), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije.

Nadalje, nije bilo statistički značajnih razlika u trajanju T_i , T_e i T_{tot} između kontrolne i WAY0 i WAY60 skupine u bilo kojoj vremenskoj točki tijekom trajanja pokusa (Tablica 1).

Tablica 1. Promjene u trajanju vremena inspirija (T_i), ekspirija (T_e) i cjelokupnoga ciklusa disanja (T_{tot}) tijekom pokusa u kontrolnoj, WAY0 i WAY60 skupini životinja.

	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina ($n=7$)				
Ti	0,46±0,01	0,53±0,01	0,50±0,01	0,49±0,01
Te	0,98±0,03	1,19±0,04	1,15±0,04	1,01±0,02
Ttot	1,43±0,03	1,70±0,04	1,65±0,04	1,49±0,02
WAY0 skupina ($n=7$)				
Ti	0,57±0,02	0,64±0,03	0,62±0,01	0,58±0,01
Te	1,02±0,03	0,92±0,04	0,88±0,04	1,04±0,07
Ttot	1,60±0,04	1,56±0,04	1,50±0,04	1,64±0,07
WAY60 skupina ($n=7$)				
Ti	0,49±0,01	0,51±0,01	0,53±0,01	0,51±0,01
Te	0,95±0,04	1,06±0,05	0,98±0,04	0,95±0,03
Ttot	1,45±0,03	1,58±0,03	1,50±0,03	1,46±0,03

	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Kontrolna skupina ($n=7$)					
Ti	0,34±0,01	0,37±0,01	0,36±0,004	0,38±0,004	0,45±0,08
Te	0,91±0,02	0,88±0,02	0,89±0,02	0,85±0,02	0,77±0,09
Ttot	1,25±0,01	1,26±0,02	1,26±0,02	1,23±0,01	1,22±0,01
WAY0 skupina ($n=7$)					
Ti	0,46±0,01	0,44±0,01	0,44±0,01	0,46±0,01	0,47±0,01
Te	0,83±0,01	0,83±0,02	0,78±0,01	0,75±0,01	0,75±0,01
Ttot	1,29±0,02	1,27±0,03	1,22±0,01	1,21±0,01	1,22±0,01
WAY60 skupina ($n=7$)					
Ti	0,40±0,01	0,39±0,01	0,40±0,01	0,40±0,01	0,42±0,01
Te	0,83±0,02	0,81±0,02	0,80±0,01	0,77±0,01	0,78±0,01
Ttot	1,24±0,02	1,20±0,01	1,21±0,01	1,18±0,01	1,19±0,01

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost \pm SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnoga ciklusa disanja (Ttot). Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije, pet hipoksijskih epizoda (TH1-5).

Srednji arterijski tlak nije se statistički značajno razlikovao između kontrolne, WAY0 i WAY60 skupine tijekom cijeloga trajanja pokusa. Srednji arterijski tlak smanjivao se tijekom hipoksijskih epizoda u svih životinja (Tablica 2). Po završetku hipoksija, vrijednost srednjega arterijskog tlaka vraćala se na vrijednosti slične početnima u svim promatranim skupinama životinja (Tablica 2).

Tablica 2. Srednji arterijski tlak (MAP) tijekom pokusnoga protokola u kontrolnoj (n=7), WAY0 (n=7) i WAY60 skupini životinja (n=7).

	MAP (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	127,1 \pm 6,1	124,3 \pm 8,2	122,6 \pm 8,3	99,7 \pm 6,8
WAY0 skupina	129,0 \pm 8,8	100,3 \pm 13,0	99,9 \pm 16,3	94,2 \pm 16,8
WAY60 skupina	124,0 \pm 5,8	130,0 \pm 9,8	121,1 \pm 10,5	118,1 \pm 13,1

	MAP (mmHg)				
	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Kontrolna skupina	99,4 \pm 7,1	95,6 \pm 8,5	90,9 \pm 10,0	88,8 \pm 9,7	86,8 \pm 10,2
WAY0 skupina	54,7 \pm 6,4	50,9 \pm 8,0	44,7 \pm 5,9	44,8 \pm 4,5	41,7 \pm 6,7
WAY60 skupina	84,6 \pm 13,5	75,6 \pm 9,6	62,2 \pm 7,4	63,5 \pm 5,7	66,9 \pm 7,0

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SEM. Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije, pet hipoksijskih epizoda (TH1-5).

Intravensko ubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije dovelo je do statistički značajnoga sniženja vrijednosti srednjega arterijskog tlaka sa 118,1±13,1 mmHg na 92,8±14,8 mmHg ($P<0,001$). Taj učinak WAY-100635 na srednji arterijski tlak trajao je otprilike 2-10 minuta.

Nije bilo statistički značajnih razlika u vrijednostima PaCO₂ i PaO₂ unutar i između pokusnih skupina tijekom cijeloga vremena trajanja pokusa (Tablica 3).

Tablica 3. Parcijalni tlak kisika (PaO₂) i ugljikova dioksida (PaCO₂) u arterijskoj krvi tijekom pokusa u kontrolnoj (n=7), WAY0 (n=7) i WAY60 skupini životinja (n=7).

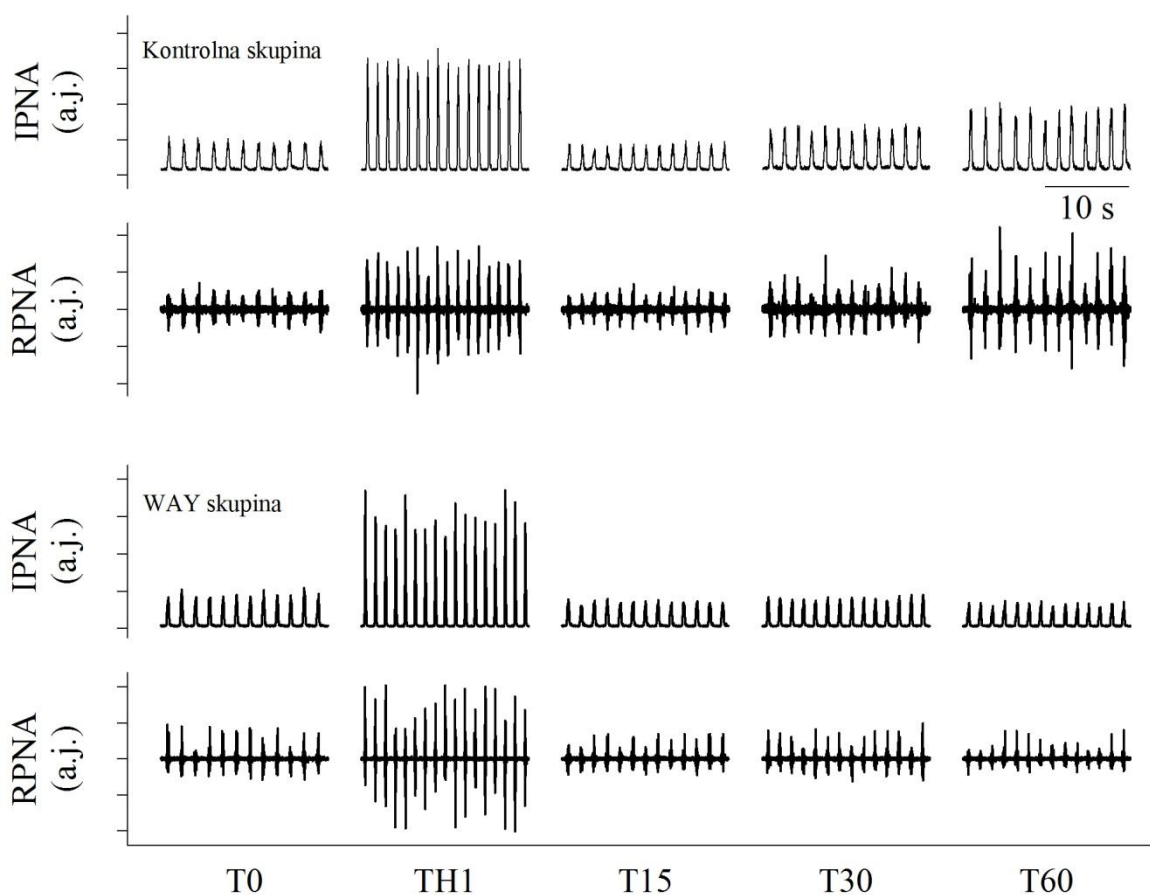
	PaO ₂ (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	216,6±15,1	251,3±8,8	252,4±11,3	235,5±17,9
WAY0 skupina	215,3±16,1	233,1±20,1	244,9±11,8	245,7±23,1
WAY60 skupina	248,2±11,8	254,0±9,9	261,2±11,1	237,6±15,8

	PaCO ₂ (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	42,4±0,4	42,9±0,7	43,6±2,2	43,2±1,0
WAY0 skupina	42,5±1,0	42,1±1,4	43,0±1,8	42,3±1,5
WAY60 skupina	43,1±1,0	42,6±1,2	42,0±1,1	42,7±1,0

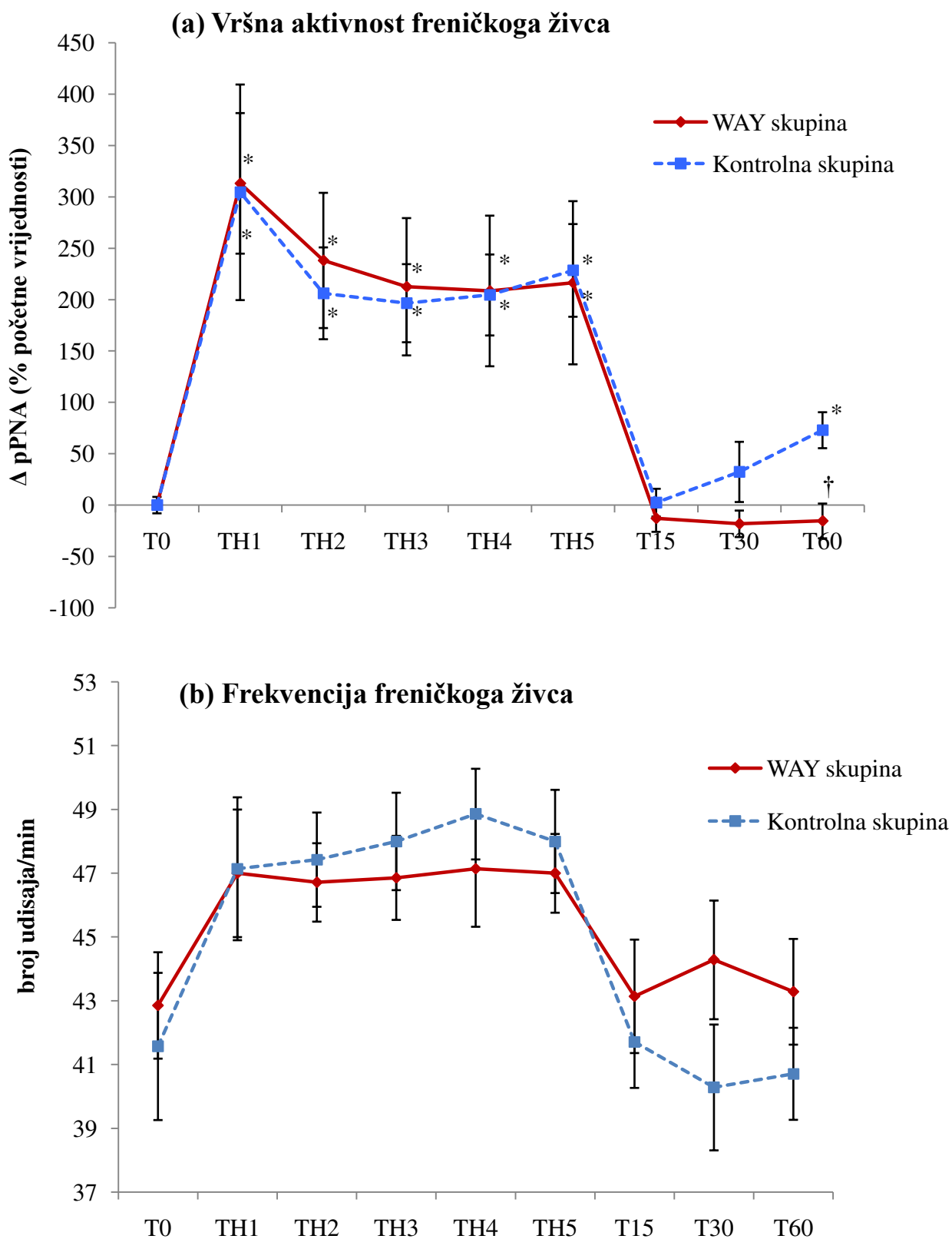
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije.

5.2. STUDIJA 2 - ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} RECEPTORA U KAUDALNOM RAJE PODRUČJU U DUGOROČNOJ FACILITACIJI FRENIČKOGA ŽIVCA

Blokiranje serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom rafe području mikroubrizgavanjem selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora, WAY-100635 spriječilo je nastanak pLTF-a izazvanoga AIH protokolom na pokusnom modelu štakora (Slika 13 i 14a).



Slika 13. Integrirani signal freničkoga živca (engl. *Integrated Phrenic Nerve Activity*, IPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) i neobrađeni signal freničkoga živca (engl. *Raw Phrenic Nerve Activity*, RPNA; arbitrarne jedinice, a.j.) nakon AIH protokola u jedne životinje iz kontrolne skupine (Kontrolna skupina na slici) i jedne životinje kojoj je mikroubrizgan WAY-100635 prije izlaganja hipoksijama (WAY skupina na slici). U životinje kontrolne skupine vidljiv je pLTF, tj. povećanje pPNA u T60. Životinja kojoj je mikroubrizgan WAY-100635 nije razvila pLTF. Signal freničkoga živca prikazan je prije prve hipoksije (T0), za vrijeme prve hipoksije (TH1) i 15 (T15), 30 (T30) i 60 (T60) minuta nakon kraja posljednje hipoksije.



Slika 14. Vremenski slijed promjena pPNA (podslika a) i frekvencije freničkoga živca (broj udisaja/min, podslika b) u kontrolnoj (■) i skupini kojoj je mikroubrizgan WAY-100635 (WAY, ◆). U kontrolnoj skupini u T60 razvio se pLTF, dok se u WAY skupini nije razvio

pLTF (*statistički značajna razlika od početnih uvjeta, $P < 0,05$; †statistički značajna razlika od kontrolne skupine, $P = 0,003$). Točka prije prve hipoksije (T0), pet hipoksijskih epizoda (TH1-5), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije.

U svih kontrolnih životinja izazvan je pLTF, s najvećim povećanjem pPNA 60 minuta nakon kraja posljednjega hipoksijskog podražaja (povećanje od $72,9 \pm 17,5\%$, $P = 0,008$), u usporedbi s početnim vrijednostima (Slika 13 i 14a). U kontrolnoj skupini aktivnost freničkoga živca nije se statistički značajno mijenjala 15 i 30 minuta nakon kraja posljednje hipoksijske epizode (pPNA povećana za $2,4 \pm 13,5$ u T15 i za $32,3 \pm 29,3\%$ u T30, $P > 0,05$; Slika 14a) u usporedbi s početnim vrijednostima.

Mikroubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 u kaudalno rafe područje prije izlaganja AIH protokolu nije mijenjalo osnovnu pPNA tijekom početnih uvjeta. Nadalje, HVR bio je očuvan u skupini životinja kojoj je mikroubrizgan WAY-100635. Tijekom svih pet hipoksijskih podražaja pPNA značajno je bila povećana u usporedbi s vrijednostima tijekom početnih uvjeta i u kontrolnoj (prosječno povećanje pPNA tijekom svih hipoksijskih epizoda od $228,0 \pm 19,8\%$, $P < 0,05$; Slika 14a) i u WAY skupini (prosječno povećanje pPNA tijekom svih hipoksijskih epizoda od $227,7 \pm 19,5\%$, $P < 0,05$; Slika 14a). Nije bilo statistički značajnih razlika u pPNA tijekom hipoksijskih epizoda između kontrolne i WAY skupine ($P > 0,05$; Slika 14a).

U skupini životinja kojoj je WAY-100635 mikroubrizgan u kaudalno rafe područje, pLTF nije se razvio 60 minuta nakon kraja posljednjega hipoksijskog podražaja. Štoviše, pPNA 1 sat po završetku AIH protokola bila je smanjena za $15,4 \pm 16,9\%$, u usporedbi s početnom vrijednošću ($P > 0,05$; Slika 14a) i u usporedbi s kontrolnom skupinom ($P = 0,003$; Slika 14a). Slično kao i u kontrolnoj skupini, nije bilo statistički značajnih promjena u pPNA 15 (smanjenje pPNA za $12,9 \pm 13,1\%$, $P > 0,05$; Slika 14a) i 30 minuta (smanjenje pPNA za

18,2±12,9%, $P>0,05$; Slika 14a) nakon kraja posljednje hipoksije u usporedbi s početnom vrijednošću pPNA.

Mikroubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 u kaudalno rafe područje štakora nije značajno mijenjalo osnovnu frekvenciju disanja. Nakon AIH protokola, frekvencija disanja vraćala se na početne vrijednosti u svim promatranim točkama (T15, T30 i T60) i nije se značajno razlikovala od vrijednosti izmjerenih u kontrolnoj skupini ($P>0,05$; Slika 14b).

Promjene u parametrima ritma disanja (Ti, Te i Ttot) izazvane AIH protokolom nisu bile statistički značajno različite između kontrolne i WAY skupine u prethodno definiranim vremenskim točkama mjerenja (Tablica 4).

Tablica 4. Promjene u trajanju vremena inspirija (Ti), ekspirija (Te), i cjelokupnoga ciklusa disanja (Ttot) tijekom eksperimentalnoga protokola u kontrolnoj i pokusnoj skupini životinja.

	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina ($n=7$)				
Ti	0,57±0,03	0,58±0,02	0,58±0,03	0,56±0,04
Te	0,90±0,07	0,88±0,05	0,92±0,05	0,91±0,06
Ttot	1,46±0,07	1,46±0,05	1,50±0,07	1,47±0,05
WAY skupina ($n=7$)				
Ti	0,54±0,05	0,59±0,05	0,52±0,04	0,51±0,03
Te	0,90±0,07	0,83±0,05	0,85±0,04	0,90±0,04
Ttot	1,44±0,05	1,42±0,06	1,37±0,05	1,40±0,05

	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Kontrolna skupina (n=7)					
Ti	0,42*±0,02	0,43*±0,03	0,42*±0,02	0,42*±0,03	0,42*±0,02
Te	0,87±0,06	0,84±0,04	0,83±0,03	0,82±0,04	0,82±0,04
Ttot	1,29±0,05	1,27±0,03	1,26*±0,03	1,24*±0,04	1,24*±0,03
WAY skupina (n=7)					
Ti	0,42*±0,04	0,42*±0,04	0,41*±0,03	0,41*±0,04	0,40*±0,03
Te	0,90±0,05	0,87±0,04	0,87±0,05	0,87±0,05	0,85±0,04
Ttot	1,32±0,06	1,29±0,03	1,29±0,03	1,29±0,03	1,25±0,03

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± SEM). Prikazane vrijednosti su: trajanje inspirija (Ti), trajanje ekspirija (Te), trajanje cjelokupnoga ciklusa disanja (Ttot). Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije, pet hipoksijskih epizoda (TH1-5). *Statistički značajna razlika od početnih vrijednosti u T0 ($P < 0,05$)

Početna vrijednost srednjega arterijskog tlaka bila je 100,0±8,5 mmHg u kontrolnoj skupini te 94,3±6,5 mmHg u WAY skupini, što nije bilo statistički značajno različito ($P > 0,05$). Tijekom hipoksija vrijednost srednjega arterijskoga tlaka pala je u obje skupine: u kontrolnoj u prosjeku za 31,4±1,5 mmHg ($P > 0,05$) i u WAY skupini za 36,8±2,4 mmHg ($P < 0,05$) u usporedbi s početnim vrijednostima. Nakon hipoksijskih podražaja, srednji arterijski tlak u obje se skupine vratio na vrijednosti slične početnim vrijednostima, što je prikazano u Tablici 5. Nije bilo statistički značajnih razlika u srednjem arterijskom tlaku između kontrolne i WAY skupine tijekom svih promatranih točaka za vrijeme trajanja pokusa.

Tablica 5. Srednji arterijski tlak (MAP) tijekom pokusnoga protokola u kontrolnoj (n=7) i WAY skupini životinja (n=7).

	MAP (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	100,0±8,5	102,7±8,0	105,9±9,4	100,2±13,4
WAY skupina	94,3±6,5	91,6±8,0	92,2±11,2	88,3±7,2

	MAP (mmHg)				
	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
Kontrolna skupina	73,8±9,9	65,8*±9,9	65,9*±10,5	68,9*±12,8	68,7*±12,8
WAY skupina	65,9*±8,1	56,0*±5,3	57,5*±10,1	57,3*±8,6	51,0*±10,4

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije, pet hipoksijskih epizoda (TH1-5). *Statistički značajna razlika od početnih vrijednosti, prije prve hipoksije u T0 ($P < 0.05$)

Početne vrijednosti PaCO₂ bile su 42,6±1,2 mmHg u kontrolnoj skupini i 42,8±1,8 mmHg u WAY skupini. Početne vrijednosti PaO₂ bile su 243,3±15,2 mmHg u kontrolnoj i 241,7±9,3 mmHg u WAY skupini. Nisu pronađene statistički značajne razlike u vrijednostima PaCO₂ i PaO₂ unutar i između skupina tijekom svih promatranih točaka za vrijeme trajanja pokusa (Tablica 6).

Tablica 6. Parcijalni tlak kisika (PaO₂) i ugljikova dioksida (PaCO₂) u arterijskoj krvi tijekom eksperimentalnoga protokola u kontrolnoj (n=7) i WAY skupini životinja (n=7).

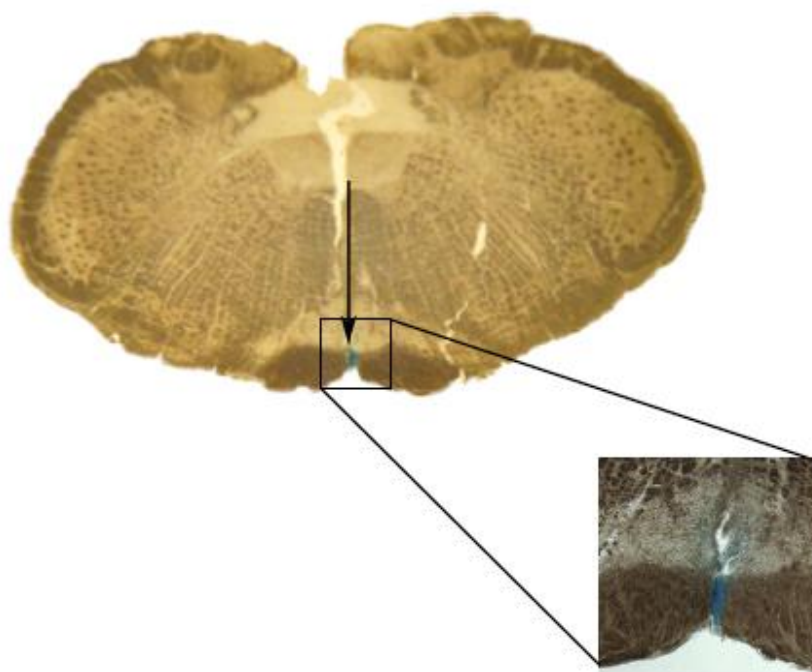
	PaO ₂ (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	243,3±15,2	241,8±15,6	241,4±19,9	255,4±13,4
WAY skupina	241,7±9,3	248,6±12,4	245,1±10,3	235,4±11,4

	PaCO ₂ (mmHg)			
	T0	T15	T30	T60
Kontrolna skupina	42,6±1,2	42,0±2,1	42,3±2,0	42,0±0,8
WAY skupina	42,8±1,8	41,5±1,4	42,1±1,6	41,9±1,9

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Točka prije prve hipoksije (T0), 15 min (T15), 30 min (T30), 60 min (T60) nakon kraja posljednje hipoksije.

Mjesto mikroubrizgavanja WAY-100635 u kaudalno rafe područje histološki je potvrđeno, što je prikazano na Slici 15.

Izlaganje pokusnih životinja akutnoj kontinuiranoj hipoksiji u trajanju od 15 minuta nije uzrokovalo nastanak pLTF-a. Vrijednost pPNA nije bila statistički značajno različita u vremenskim točkama 15, 30 i 60 minuta nakon kontinuirane hipoksije u usporedbi s početnim vrijednostima (povećanje pPNA za 21,9±21,7% u T15, povećanje za 10,7±27,1% u T30 i smanjenje za 9,7±21,5% u T60, $P>0,05$).



Slika 15. Mikroskopska fotografija poprečnoga presjeka kroz kaudalno rafe područje. Strelica pokazuje mjesto mikroubrizgavanja WAY-100635 koje je u izdvojenom prikazu dodatno povećano kako bi se jasnije vidjelo.

6. RASPRAVA

U dijelu disertacije koji se bavi istraživanjem uloge serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u nastanku i održavanju pLTF-a dokazano je da sistemsko ubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 prije izlaganja životinja AIH protokolu sprječava nastanak pLTF-a. Nadalje, intravensko ubrizgavanje WAY-100635 nakon što se pLTF već razvio, dovodi do smanjenja pPNA gotovo do početnih vrijednosti prije AIH protokola. Navedeni rezultati pokazuju kako je aktivacija serotoninskih 5-HT_{1A} receptora važna za nastanak, ali i za održavanje pLTF-a u vagotomiziranih, mehanički ventiliranih i paraliziranih Sprague-Dawley štakora anesteziranih uretanom.

U dijelu disertacije koji se bavi istraživanjem uloge serotoninskih 5-HT_{1A} receptora smještenih na supraspinalnoj razini u kaudalnom rafe području u mehanizmu nastanka pLTF-a, dokazano je kako mikroubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 u kaudalno rafe područje štakora, prije izlaganja AIH protokolu, sprječava razvoj pLTF-a. Može se zaključiti kako su serotoninski 5-HT_{1A} receptori na supraspinalnoj razini u području kaudalnih rafe jezgara važni za nastanak pLTF-a u vagotomiziranih, mehanički ventiliranih i paraliziranih Sprague-Dawley štakora anesteziranih uretanom.

6.1. ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} RECEPTORA U NASTANKU I ODRŽAVANJU DUGOROČNE FACILITACIJE FRENIČKOGA ŽIVCA

Dugoročna facilitacija disanja središnji je neuralni mehanizam ovisan o serotoninu te je pokazano da se nastanak pLTF-a može spriječiti blokiranjem 5-HT receptora intravenskom primjenom metisergida [12, 38]. Pri nastanku i održavanju pLTF-a važno je točno vrijeme aktivacije serotoninskih receptora. Prethodna istraživanja pokazala su da je aktivacija

serotoninskih receptora tijekom hipoksijskih podražaja potrebna za nastanak pLTF-a [34, 82]. Fuller i sur. pokazali su da blokiranje serotoninskih 5-HT₂ receptora ketanserinom prije izlaganja pokusnih životinja hipoksijama sprječava nastanak pLTF-a. Međutim blokiranje serotoninskih 5-HT₂ receptora po završetku hipoksija nije imalo učinka na nastanak pLTF-a [82]. Ipak, ostalo je nejasno je li za očuvanje već razvijenoga pLTF-a potrebna kontinuirana aktivacija serotoninskih receptora dugo nakon kraja hipoksijskih podražaja [34].

U ovoj studiji, intravensko ubrizgavanje selektivnoga antagonista serotoninskih 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 prije izlaganja životinja AIH protokolu spriječilo je nastanak pLTF-a, potvrđujući važnost 5-HT_{1A} receptora u razvoju respiracijske plastičnosti. Nadalje, ukoliko je selektivni antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 primijenjen nakon nastanka pLTF-a, došlo je do značajnoga smanjenja pPNA, tj. do nestanka pLTF-a. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti kako je kontinuirana aktivacija serotoninskih 5-HT_{1A} receptora potrebna za održavanje pLTF-a izazvanoga ponavljanim hipoksijama.

Sistemske davanje WAY-100635 nije omogućilo identifikaciju točnoga mehanizma i preciznoga mjesta djelovanja WAY-100635 (na supraspinalnoj ili spinalnoj razini). WAY-100635 je selektivan antagonist 5-HT_{1A} receptora, bez ikakve agonističke ili djelomične agonističke aktivnosti. Nadalje, WAY-100635 je pokazao više nego sto puta veću selektivnost za 5-HT_{1A} receptore nego za druge serotoninske receptore, ili receptore drugih neurotransmitera, što ga čini prikladnim antagonistom za istraživanje 5-HT_{1A} receptora [96].

Nekoliko studija pokazalo je korelaciju između jačine odgovora na prvi hipoksijski podražaj i amplitude pPNA 60 minuta nakon posljednjega hipoksijskog podražaja, na taj način da životinje s jačim odgovorom na hipoksiju imaju veći pLTF [34, 57]. Baker-Herman i sur. [57] na temelju višestruke regresijske analize došli su do jednadžbe kojom su mogli predvidjeti iznos promjene pLTF-a:

$$\begin{aligned} pLTF = & -61,595 + (1,8 \times \text{početna frekvencija disanja}) + (2,27 \times \text{frekvencijski LTF}) \\ & + (0,31 \times \text{pPNA tijekom hipoksije}) \end{aligned}$$

U kontrolnoj i WAY0 skupini životinja koja je WAY-100635 primila prije izlaganja AIH protokolu, bio je očuvan odgovor na hipoksiju. Koristeći gore navedenu jednadžbu u kontrolnoj skupini životinja očekivani pLTF iznosio bi 220%, a u WAY0 skupini 120%. Međutim, usprkos očuvanom hipoksijskom odgovoru i očekivanom nastanku pLTF-a u WAY0 skupini, pLTF ipak nije nastao.

Općenito, smatra se kako izlaganje AIH-u dovodi do razvoja frekvencijskoga pLTF-a u budnih i decerebriranih životinja, ali ne i u anestetiziranih i vagotomiziranih štakora [42, 57, 97]. U ovoj studiji nije zabilježen frekvencijski već samo amplitudni pLTF izražen povećanjem amplitude pPNA. Postoje dokazi kako su frekvencijski i amplitudni LTF posljedice različitih događaja u moždanom deblu [23]. Izgleda da su za nastanak frekvencijskoga LTF-a odgovorna područja moždanoga debla koja stvaraju ritam disanja, a za nastanak amplitudnoga LTF-a respiracijski motoneuroni u produljenoj moždini. Ipak, bez obzira na različito mjesto nastanka, čini se da su za amplitudni i frekvencijski pLTF važni slični stanični i sinaptički mehanizmi [57]. Pokazano je da osim serotonina i drugi neurotransmiteri i neuromodulatori imaju važnu ulogu u nastanku frekvencijskoga LTF-a, između ostalih oreksin i tvar P [98, 99].

Snažan hipoksijski podražaj može dovesti do aktivacije serotoninskih rafe neurona [100] koja je neophodna za nastanak pLTF-a. Kinkead i sur. pokazali su da serotoninski 5-HT₁ i 5-HT₂ receptori imaju utjecaj na razvoj respiracijske plastičnosti pridonoseći ravnoteži između inhibicijske i facilitacijske serotoninske neuromodulacije [35]. Pri tome serotoninski 5-HT₁ receptori imaju važnu ulogu koju barem djelomično ostvaruju autoinhibicijskim djelovanjem na neuronima smještenima u rafe jezgrama nadzirući otpuštanje serotonina.

U rafe jezgrama u produljenoj moždini 5-HT_{1A} receptori smješteni su na presinaptičkim membranama, kao klasični autoreceptori [76, 85]. Jasno je kako blokiranje autoreceptora pojačava otpuštanje serotonina iz rafe jezgara i potpomaže sinaptički prijenos na frenički živac [38]. S druge strane, pokazano je da modulacija disanja posredovana agonistima i antagonistima serotoninskih 5-HT_{1A} receptora [89] svoj učinak ostvaruje djelovanjem na autoreceptore, ali i moduliranjem aktivnosti različitih vrsta neurona. Stoga postoji mogućnost da agonisti i antagonisti poništavaju međusobni učinak, što rezultira nekonzistentnim ukupnim učinkom na disanje. U ovoj studiji, sistemska primjena WAY-100635 imala je kratkotrajni i beznačajni učinak na osnovnu freničku aktivnost i arterijski tlak, sugerirajući da serotoninski 5-HT_{1A} receptori nemaju ulogu u toničkoj kontroli respiracijske aktivnosti, već su aktivirani samo tijekom odgovora na specifični podražaj.

Iako je pokazano kako je u modulaciji pLTF-a važna aktivacija serotoninskih receptora smještenih u kralježničkoj moždini [97], rezultati nedavne studije pokazali su kako aktivacija serotoninskih receptora na supraspinalnoj razini također ima važnu ulogu u manifestaciji pLTF-a [36]. Štoviše, poznato je da aktivacija serotoninskih neurona u kaudalnom rafe području ima ekscitacijske učinke na disanje [90-92]. Također, mikroubrizgavanje metisergida u kaudalno rafe područje spriječilo je nastanak pLTF-a nakon izlaganja AIH protokolu [36], čime je dokazana važna uloga supraspinalnih mehanizama u modulaciji pLTF-a. Stoga, bilo je zanimljivo ispitati imaju li serotoninski 5-HT_{1A} receptori na supraspinalnoj razini u području kaudalnih rafe jezgara ulogu u mehanizmu nastanka pLTF-a.

6.2. ULOGA SEROTONINSKIH 5-HT_{1A} RECEPTORA U KAUDALNOM RAJE PODRUČJU U DUGOROČNOJ FACILITACIJI FRENIČKOGA ŽIVCA

U većini dosadašnjih studija o neuralnoj kontroli disanja istraženi su učinci modulacije postsinaptičkih 5-HT receptora na razini spinalnih motoneurona na razvoj respiracijske plastičnosti izazvane AIH-om [12]. Pa ipak, učinak modulacije specifičnih serotoninskih receptora na supraspinalnoj razini, uključujući područje kaudalnih rafe jezgara na pLTF do sada nije bio istražen. U prethodnom istraživanju iz laboratorija Zavoda za neuroznanost Medicinskoga fakulteta u Splitu, mikroubrizgavanje neselektivnoga antagonista serotoninskih receptora metisergida u područje rafe jezgara spriječilo je nastanak pLTF-a [36]. Sličan rezultat inhibicije nastanka pLTF dobiven je nakon intratekalnoga ubrizgavanja metisergida [58]. Ipak, zbog djelomičnoga agonističkog učinka metisergida na 5-HT receptore i afiniteta za 5-HT_{1,2,5,6,7} receptore [29, 38], nije bilo moguće odrediti točnu podvrstu serotoninskih receptora i mehanizam djelovanja na pLTF [36]. U ovoj disertaciji po prvi je puta pokazana važnost serotoninskih 5-HT_{1A} receptora na supraspinalnoj razini, u području kaudalnih rafe jezgara, u modulaciji pLTF-a nakon središnjega mikroubrizgavanja selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635.

Imunohistokemijske studije pokazale su da hipoksijski podražaj aktivira serotoninske 5-HT imunopozitivne neurone smještene u kaudalnom dijelu rafe jezgara [101, 102], vjerojatno uzrokujući otpuštanje veće količine serotonina u blizinu freničkih motoneurona [34]. Dio neurona iz kaudalnog dijela rafe jezgara projicira se izravno u PMN, dok se dio tih neurona projicira u PMN neizravno preko GABA-ergičkih neurona smještenih u području VRS-a [92, 103-105]. Štoviše, pokazano je da električno podraživanje kaudalnoga rafe područja izaziva pojačanje respiracijske aktivnosti u štakora koje se može spriječiti sistemskom primjenom metisergida [91]. Spomenute studije bile su temelj ideji da modulacija serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u području kaudalnih rafe jezgara može utjecati na nastanak

pLTF-a. Rezultati ovoga istraživanja jasno su pokazali da blokiranje 5-HT_{1A} receptora u području kaudalnih rafe jezgara sprječava nastanak pLTF-a, uz očuvan odgovor na AIH.

Poznato je da su 5-HT_{1A} receptori smješteni postsinaptički, ali i presinaptički (kao autoreceptori), te modulacija 5-HT_{1A} receptora na supraspinalnoj razini često dovodi do sličnih učinaka na disanje neovisno o tome je li korišten agonist ili antagonist [106]. Objašnjenje za takav nalaz je mogućnost djelovanja agonista i antagonista na receptore smještene presinaptički (autoreceptori) i postsinaptički. Budući da je u ovoj studiji primijenjena tehnika tlačnoga mikroubrizgavanja kojom se kemijski modulira aktivnost skupine neurona, nije bilo moguće jednoznačno zaključiti jesu li podraženi postsinaptički ili presinaptički receptori. Može se pretpostaviti kako je u ovoj studiji selektivni antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 djelovao na serotoninske receptore smještene na postsinaptičkoj membrani neurona u kaudalnom rafe području, iako se ne može isključiti i mogućnost djelovanja na presinaptičke autoreceptore. Isto tako, zbog postojanja izravnih neuronskih projekcija iz kaudalnoga rafe područja prema PMN, ali i neizravnih putem VRS, nije bilo moguće utvrditi jesu li učinci inhibicije serotoninskih receptora posredovani izravnim ili neizravnim projekcijama, imajući na umu složenost navedene neuronske mreže.

Rezultati ove studije pokazali su da blokiranje 5-HT_{1A} receptora smještenih u kaudalnom rafe području inhibira nastanak pLTF-a izazvanoga AIH-om. Tako ova studija podupire ideju da modulacija respiracijske plastičnosti izazvane AIH-om proizlazi iz jedinstvenoga neuralnog mehanizma, ovisnoga o vremenu aktivacije, podvrsti 5-HT receptora i mjestu djelovanja.

Većina studija na životinjama pokazala je kako pLTF ovisi o modulaciji serotoninskih receptora na spinalnoj razini [12]. U ovoj studiji po prvi puta pokazana je važnost 5-HT_{1A} receptora na supraspinalnoj razini smještenih u kaudalnom rafe području u modulaciji pLTF.

6.3. RAZMATRANJE METODOLOGIJE RADA

Mnogi parametri, primjerice vrsta i obrazac podražaja, vrsta, dob i spol korištenih životinja, anestezija, vagotomija, budnost životinje i kemijska neuromodulacija imaju utjecaj na nastanak, manifestaciju i održavanje pLTF-a [12, 38, 42, 46, 51, 55, 70, 78, 93, 94, 97, 107, 108]. Većina dosadašnjih studija koja je istraživala pLTF izvedena je na modelu anesteziranoga, vagotomiziranoga i mehanički ventiliranoga štakora [12, 36, 57, 109]. Iako je po prvi put LTF pokazan nakon električnog podraživanja živca karotidnoga sinusa, otkriveno je kako se i nakon denervacije karotidnoga tjelešca može izazvati LTF, što znači da karotidno tjelešce nije neophodno u nastanku LTF-a [110]. Nadalje, pokazano je da uslijed ponavljano podraživanja vagalnoga živca, kratkih epizoda apneje, kao i ponavljane primjene negativnoga tlaka u gornjem dišnom putu također dolazi do razvoja LTF-a [69, 70, 72]. Međutim, iako ponavljana hipoksija nije jedini podražaj koji dovodi do razvoja LTF-a, ipak ostaje najbolje poznat i najčešće korišten [12, 51]. U prethodnim istraživanjima korišteni su AIH protokoli koji su se sastojali od različitoga broja hipoksijskih epizoda, pri različitim razinama kisika, u različitim životinjskim vrstama [12, 30]. U laboratoriju Zavoda za neuroznanost MF Split, AIH protokol koji se sastoji od pet trominutnih epizoda hipoksije ($FiO_2=0,09$), međusobno razdijeljenih trominutnim razdobljima hiperoksije ($FiO_2=0,5$), pri čemu se parcijalni tlak CO_2 tijekom cijeloga pokusa nalazi unutar fizioloških granica, pokazao se pouzdanim i uspješnim u izazivanju pLTF-a. Mijenjanje obrasca podražaja (primjerice 5 trominutnih ili 3 petominutne hipoksije), ili jačine hipoksije između 28 i 60 mmHg ima samo mali utjecaj na jačinu izazvanoga LTF-a u anesteziranih, paraliziranih i vagotomiziranih životinja [34]. Nadalje, na budnim štakorima pokazano je kako korištenje AIH protokola od čak 72 ponavljane hipoksijske epizode ne dovodi do značajno većega LTF-a, od onoga izazvanog uobičajenim kraćim protokolima, potvrđujući mogućnost zasićenja respiracijske plastičnosti [40]. Dakle, neovisno o razlikama među protokolima, AIH dovodi do razvoja plastičnosti

obilježene povećanjem pPNA dugo nakon kraja hipoksijskih podražaja u središnjoj kontroli disanja [51]. S druge strane, rezultati ove disertacije potvrdili su da za razliku od AIH protokola, akutna kontinuirana hipoksija ne može izazivati pLTF. U pokusima u kojima su životinje bile izlagane akutnoj kontinuiranoj hipoksiji, pPNA bila je približno jednaka tijekom cijeloga trajanja pokusa izuzev razdoblja izlaganja hipoksiji.

Iako je LTF pronađen u mnogih životinjskih vrsta, primjerice psa, mačke, miša, koze [37, 43, 44, 46, 50], ipak najčešće korištena životinjska vrsta pri proučavanju LTF-a jest štakor [51]. Međutim, usprkos genetskoj sličnosti, primijećeno je kako manifestacija LTF-a uvelike varira među različitim sojevima štakora, čak i među štakorima istoga soja od različitih dobavljača. Pokazano je da slični AIH protokoli rezultiraju najvećim pLTF-om u Lewis štakora, zatim manjim u Sprague-Dawley, zatim Fischer 344 i najmanjim u Brown Norway štakora [58, 111]. Stoga, moguće je da pri uzgoju laboratorijskih životinja, uslijed godina izolacije dolazi do genetskoga pomaka štakora rezultirajući promjenama u anatomiji i fiziologiji sustava monoaminskih neurona [12]. Zato bi pri proučavanju respiracijske plastičnosti trebalo uzeti u obzir genetski utjecaj korištenih životinja.

Dob i spol korištenih životinja također utječu na manifestaciju LTF-a. Smatra se da je u mužjaka jačina LTF-a povezana s razinom testosterona u tijelu te je pokazano da mladi mužjaci štakora imaju veći LTF nego stari mužjaci [107, 112]. Štoviše, ukoliko se gonadektomiziranim mužjacima daju nadomjesci testosterona, dolazi do povećanja LTF-a. Stoga, moguće je da smanjena proizvodnja testosterona utječe na jačinu LTF-a mijenjajući proizvodnju serotonina [113, 114]. U usporedbi s mužjacima, mlade ženke štakora imaju manji LTF. S druge strane, u ženki srednje dobi LTF je veći nego u mužjaka iste dobi [107, 113, 114]. Nadalje, u ženki je LTF pod utjecajem estrus ciklusa, te je najveći tijekom diestrus faze kada je također visoka i razina serotonina [115]. Pokazano je da jačina pLTF-a također ovisi i o omjeru progesterona i estrogena [108]. Stoga ne treba čuditi da je LTF u ženki

najveći tijekom srednje dobi, kada dolazi do stabilizacije količine cirkulirajućih spolnih hormona koji utječu na manifestaciju LTF-a [51, 115].

Poznato je da vrsta anestezije utječe na manifestaciju pLTF-a. Tako je pokazano da u životinja anesteziranih propofolom, sevofluranom, izofluranom i remifentanilom nije moguće izazvati pLTF [42, 93, 94]. Pokusi ove disertacije provedeni su na štakorima anesteziranim uretanom (etil-karbamat), jer u usporedbi s drugim anestezijama koje uglavnom imaju deprimirajući učinak na disanje, uretanska anestezija ima minimalan ili pak nikakav utjecaj na spinalne reflekse, disanje, kardiovaskularni i autonomni živčani sustav, te na neurotransmisiju u subkortikalnim područjima [116, 117]. Anestetici uglavnom djeluju tako da slabe učinke glutamata ili pojačavaju učinke GABA-e u procesu neurotransmisije. Uretan vjerojatno zahvaća podjednako i ekscitacijske i inhibicijske sustave, ali u puno manjoj mjeri negoli ostali anestetici [118]. Stoga je uretanska anestezija preporučena kao metoda izbora za sva fiziološka i farmakološka istraživanja sinaptičkoga prijenosa posredovanoga GABA-om [119]. Nadalje, pokazano je kako uretanska anestezija nema učinak na serotoninski sustav, frenički i hipoglosalni živac [120]. Dakle, može se zaključiti da je životinjski model anesteziran uretanom prikladan za istraživanje središnje kontrole disanja i plastičnosti respiracijskoga sustava [51].

Tradicionalno se vjerovalo da izvođenje vagotomije na pokusnom životinjskom modelu pojačava razvoj respiracijske plastičnosti, tj. olakšava nastanak LTF-a. Tako je pokazano da se dugoročna facilitacija živaca koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta i hipoglosalnoga živca može lakše izazvati u vagotomiziranih životinja [45, 97]. Objašnjenje koje je stajalo u pozadini jest da ponavljano podraživanje plućnih receptora osjetljivih na istezanje dovodi do nastanka dugotrajnoga pamćenja koje ima inhibicijski učinak na nastanak LTF-a. U slučaju prekidanja vagalnih živaca, viša moždana središta gube vezu s plućnim receptorima osjetljivima na istezanje, te nestaje mogućnost inhibicijskoga djelovanja na

nastanak respiracijske plastičnosti. Nadalje, kako je pokazano da je u životinja s intaktnim vagalnim živcima LTF živaca koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta smanjen, a pLTF sličan, ili čak i povećan, zaključeno je da je dugotrajno pamćenje s inhibicijskim učinkom na manifestaciju LTF-a usmjereno na pojedine skupine motoneurona [45, 51, 97]. Međutim, s druge strane pokazano je da ponavljano električno podraživanje vagalnoga živca dovodi do nastanka LTF-a u živcima koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta [69]. Nadalje, kratke apneje u spontano dišućih životinja izazivale su LTF genioglosalnoga živca samo u onih životinja kojima su vagalni živci bili intaktni [71]. Stoga, iako je jasno da vagalni živac ima veliki utjecaj na manifestaciju LTF-a, za potpuno rasvjetljavanje ovoga pitanja potrebna su dodatna istraživanja [51].

Mitchell i sur. pokazali su da se LTF može lakše izazvati u anestetiziranih ili decerebriranih životinja, nego u budnih životinja, te su pretpostavili da budnost pokusnoga modela ima važnu ulogu u manifestaciji LTF [12]. Moguće objašnjenje njihovoga nalaza jest aktivnost serotoninskoga sustava, za koji je poznato da ima važnu ulogu u mehanizmu nastanka LTF-a. Naime, tijekom spavanja, aktivnost serotoninskih neurona u rafe jezgrama značajno je manja nego tijekom budnosti, kada dostižu svoju skoro najveću moguću aktivnost. S obzirom da je tijekom budnosti aktivnost tih neurona blizu najveće moguće, smanjena je mogućnost dodatnoga povećanja aktivnosti uslijed izloženosti ponavljanoj hipoksiji. Stoga, mogućnost nastanka LTF-a smanjena je tijekom budnosti. Međutim, u pokusima na ljudima pokazano je da tijekom budnosti nastaje veći LTF nego tijekom spavanja [121]. Kako je poznato da postoje dva puta izazivanja LTF, *S* i *Q* put, može se zaključiti da i drugi neuromodulatori, osim serotonina, imaju važnu ulogu u nastanku LTF-a. Objašnjenje nalaza većega LTF-a tijekom budnosti u ljudi moglo bi ležati upravo u aktivaciji *S* puta LTF-a [68]. Naime, poznato je da se razina adenzina, neuromodulatora *S* puta,

prolazno povećava tijekom budnosti i upravo bi nakupljeni adenzin mogao aktivirati *S put* LTF-a [121, 122].

Sukladno nalazima koji pokazuju važnost različitih neurotransmitera/neuromodulatora u respiracijskoj plastičnosti, pokazano je također da hipoksija dovodi do otpuštanja različitih neurotransmitera/neuromodulatora koji djeluju na različite receptore i pokreću čitav niz unutarstaničnih zbivanja, rezultirajući razvojem plastičnosti [7, 27, 123]. Osim opće prihvaćene važnosti serotoniniskoga sustava u oba puta nastanka pLTF-a (*Q* i *S put*), na manifestaciju pLTF-a mogao bi utjecati i noradrenalinski sustav. Noradrenalinski sustav može modulirati manifestaciju respiracijske plastičnosti, uslijed aktivacije kemoreceptora ili izravnih učinaka CO₂ na noradrenalinski sustav. Stoga serotoniniski i noradrenalinski sustavi zajedničkim međudjelovanjem moduliraju disanje i respiracijsku plastičnost [78, 81].

U pokusima prikazanima u disertaciji, arterijski tlak pokazivao je sklonost smanjivanju tijekom trajanja pokusa u svim životinjskim skupinama. Hipotenzija može dovesti do povećane neuralne aktivnosti uslijed smanjenja aktivnosti baroreceptora, te neizravno dovesti do razvoja pLTF-a nakon AIH protokola [38]. Promjene vrijednosti arterijskoga tlaka u ovoj disertaciji imale su neznatan učinak na aktivnost freničkoga živca u vagotomiziranih štakora anesteziranih uretanom [120]. Ukoliko hipotenzija izazvana hipoksijama doprinosi razvoju pLTF-a, tada se u obje skupine životinja koje su WAY-100635 primile prije izlaganja AIH protokolu (intravenski ili centralno) mogao očekivati nastanak pLTF-a. Pa ipak, do razvoja pLTF-a nije došlo, čime se u obje studije ove disertacije hipotenzija može isključiti kao čimbenik koji pogoduje nastanku pLTF-a. Može se zaključiti kako je u pokusnom modelu korištenom pri izradi ove disertacije izostanak nastanka pLTF-a isključivo rezultat blokiranja serotoniniskih 5-HT_{1A} receptora.

Nadalje, u pokusima prikazanima u disertaciji održavana je normokapnija tijekom cijeloga pokusnog protokola. Stoga nije vjerojatno da su promjene vrijednosti PaCO₂

djelovanjem na kemoreceptore mogle doprinijeti manifestaciji pLTF-a. Uzorci arterijske krvi uzimani su u svim vremenskim točkama (T15, T30 i T60) nakon kraja posljednje hipoksije, kako bi se provjerilo jesu li vrijednosti PaCO₂ unutar 1 mmHg od početnih vrijednosti ($P > 0.05$), što je potvrdilo da na pPNA i pLTF nisu utjecale promjene u vrijednostima PaCO₂.

6.4. ZNANSTVENI DOPRINOS

Sinaptička plastičnost koja se očituje pLTF-om nakon izlaganja pokusnih životinja AIH protokolu, predstavlja oblik fiziološkoga kompenzacijskog mehanizma koji doprinosi održavanju respiracijske homeostaze. Respiracijski podražaj koji se sastoji od kratkotrajnih ponavljanih hipoksija nalik je povremenim zastojima disanja koji se javljaju tijekom spavanja u osoba oboljelih od OSA-e. Poznato je kako se LTF može izazvati u ljudi u budnom stanju, kao i tijekom spavanja [52]. Iako postoje brojne studije koje istražuju mehanizme nastanka i održavanja LTF-a, uloga LTF-a u ljudi oboljelih od OSA-e nije do kraja razjašnjena. Temeljno pitanje koje se postavlja glasi ublažava li LTF OSA-u ili je pogoršava [39]? Jedna od teorija je da LTF može ublažavati OSA-u facilitacijom aktivnosti živaca koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta [39, 52]. Prema drugoj teoriji, LTF može pogoršati apneju složenim mehanizmima u kojima se isprepleću središnja kontrola disanja, te središnja i periferna kemoosjetljivost. Ukoliko minutna ventilacija premašuje metaboličke potrebe, LTF uslijed hiperventilacije može dovesti do hipokapnije, koja potom sprječava održavanje dugoročne facilitacije disanja. U ljudi oboljelih od OSA-e nakon svake epizode opstruktivske apneje dolazi do povećane osjetljivosti perifernih i središnjih kemoreceptora, što za posljedicu ima pojačanje disanja. Međutim, povećana osjetljivost kemoreceptora na hipoksiju može rezultirati prekomjernim ventilacijskim odgovorom i posljedičnom hiperventilacijom, koja dovodi do sniženih vrijednosti CO₂ ispod vrijednosti apnejičkoga praga, nestabilnost disanja i

razvoja centralnih apneja. Stoga, da bi LTF imao protektivan učinak na OSA-u, trebala bi se razviti dugoročna facilitacija živaca koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta u odsutnosti hipokapnije [39]. Zaključno, pri rasvjetljavanju uloge LTF-a u OSA-i potrebno je provesti istraživanja koja kombiniraju AIH i druge čimbenike iz kliničkih i temeljnih istraživanja, s ciljem što boljega oponašanja OSA-e.

Osim važnosti u OSA-i, LTF bi mogao imati važnu ulogu i u poremećajima serotoninskoga sustava, primjerice pri sindromu iznenadne smrti dojenčadi (engl. *Sudden Infant Death Syndrome*, SIDS), ali i drugim bolestima kao što su kronična opstruktivna plućna bolest, ozljede kralježničke moždine, razne neurodegenerativne bolesti kao primjerice amiotrofična lateralna skleroza [8, 124]. Svim tim bolestima zajedničko je nedostatno disanje te potreba za povećanjem sinaptičke neurotransmisije do razine respiracijskih motoneurona. Stoga bi upravo pLTF mogao biti model kompenzacije respiracijskih motoneurona, kao i cilj novih terapijskih mogućnosti [31]. S druge strane, postoje neuropatološki dokazi o važnosti serotoninskih neurona smještenih u produljenoj moždini u SIDS-u.

Znanstveni doprinos ove doktorske disertacije jest rasvjetljavanje uloge serotoninskih 5-HT_{1A} receptora u mehanizmu nastanka i održavanja pLTF-a. Poznato je da modulacijski neurotransmiter serotonin ima važnu ulogu u središnjoj kontroli mnogih fizioloških funkcija, primjerice disanja, arterijskoga tlaka, prijenosa osjeta boli, ponašanja. Ipak, precizna uloga serotoninske neuromodulacije u respiracijskoj plastičnosti i LTF-u još nije u potpunosti poznata.

Kaudalni dio rafe jezgara područje je bogato serotoninskim neuronima i 5-HT_{1A} receptorima te predstavlja ishodište mnogih serotoninskih projekcija u različite dijelove mozga koji upravljaju disanjem [89]. Ova doktorska disertacija po prvi puta pokazala je važnost serotoninskih 5-HT_{1A} receptora smještenih u kaudalnom dijelu rafe jezgara u mehanizmu nastanka pLTF-a.

Nadalje, opisana istraživanja pridonijela su temeljnim spoznajama o regulaciji disanja prilikom izlaganja akutnim stresnim podražajima, poput ponavljanih hipoksija, koje su česte u ljudi s OSA-om. Štoviše, LTF izazvan AIH protokolom važan je model neuroplastičnosti u studijama na životinjama.

Zaključno, ova doktorska disertacija upotpunila je dosadašnje znanstvene spoznaje o obilježjima serotoninske neuromodulacije disanja te mjestu djelovanja i značenju 5-HT_{1A} receptora u neurofiziologiji disanja i respiracijskoj plastičnosti.

7. ZAKLJUČCI

1. Razvoj plastičnosti respiracijskoga kontrolnog sustava ovisi o vrsti i trajanju hipoksijskoga podražaja.
2. Izlaganje pokusnih životinja akutnim ponavljanim kratkotrajnim hipoksijskim podražajima uzrokuje dugoročnu facilitaciju freničkoga živca (pLTF) koja se manifestira dugoročnim pojačanjem disanja.
3. Intravensko ubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 prije izlaganja pokusnih životinja akutnim ponavljanim hipoksijama spriječilo je nastanak pLTF-a, iz čega se može zaključiti da je aktivacija 5-HT_{1A} receptora važna za nastanak pLTF-a.
4. Intravensko ubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 nakon što se već razvio pLTF uzrokovalo je slabljenje fenomena pLTF-a, iz čega se može zaključiti da je aktivacija 5-HT_{1A} receptora važna za održavanje pLTF-a.
5. Blokiranje 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom rafe području mikroubrizgavanjem selektivnoga antagonista WAY-100635 spriječilo je nastanak pLTF-a izazvanoga akutnim ponavljanim hipoksijama, iz čega se može zaključiti da je aktivacija 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom dijelu rafe jezgara važna za nastanak pLTF-a.

8. SAŽETAK

Opstruktivna apneja tijekom spavanja (OSA) obilježena je razdobljima kolapsa gornjih dišnih putova praćenih ponavljanim epizodama hipoksije. U pokusnih životinja akutne ponavljane hipoksije (AIH) mogu dovesti do dugotrajne pojačane aktivnosti freničkoga živca, poznate kao dugoročna facilitacija freničkoga živca (pLTF). Taj oblik fiziološke kompenzacije mogao bi doprinosti stabilizaciji disanja, smanjujući pojavnost apneja i/ili hipopneja u pacijenata oboljelih od OSA-e. Pokazano je da serotonin modulira neuralnu kontrolu disanja, vjerojatno putem projekcija koje kreću iz rafe jezgara.

Cilj disertacije bio je istražiti važnost pravovremene aktivacije 5-HT_{1A} receptora u nastanku i očuvanju pLTF-a. Uloga aktivacije 5-HT_{1A} receptora ispitana je u dvije različite vremenske točke, prije izlaganja AIH protokolu i nakon što je pLTF nastao. Nadalje, cilj disertacija bio je i proučiti učinke blokiranja 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom rafe području na pLTF izazvan AIH protokolom.

Kako bi se istražila važnost pravovremene aktivacije 5-HT_{1A} receptora u nastanku i očuvanju pLTF-a, odrasli mužjaci Sprague–Dawley štakora, anestetizirani uretanom, vagotomizirani, paralizirani i mehanički ventilirani izloženi su AIH protokolu. Jedna skupina životinja je intravenski primila selektivni antagonist 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 prije početka AIH protokola (skupina WAY0, n=7), a druga skupina nakon što se pLTF razvio (skupina WAY60, n=7). Kontrolna skupina (n=7) nije primila WAY-100635, nego je samo bila izložena AIH protokolu. Vršna aktivnost freničkoga živca (pPNA), frekvencija disanja i parametri ritma disanja analizirani su tijekom pet hipoksijskih epizoda, te 15, 30 i 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije.

U kontrolnoj skupini 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije razvio se pLTF, koji se manifestirao kao povećanje pPNA (povećanje za 121,6±7,3%, $P<0.001$). Davanje WAY-

100635 prije izlaganja životinja AIH protokolu spriječilo je nastanak pLTF-a. Nadalje, davanje WAY-100635 nakon što se pLTF već razvio uzrokovalo je njegovo slabljenje.

Kako bi se istražila važnost 5-HT_{1A} receptora u kaudalnom rafe području u mehanizmu nastanka pLTF-a, odrasli mužjaci Sprague–Dawley štakora, anestetizirani uretanom, vagotomizirani, paralizirani i mehanički ventilirani izloženi su AIH protokolu. Jednoj skupini životinja u kaudalno rafe područje mikroubrizgan je WAY-100635 (WAY skupina, n=7), a kontrolnoj skupini (n=7) je u isto mjesto mikroubrizgana fiziološka otopina.

U kontrolnoj skupini 60 minuta nakon kraja posljednje hipoksije razvio se pLTF. Mikroubrizgavanje selektivnoga antagonista 5-HT_{1A} receptora WAY-100635 u kaudalno rafe područje prije AIH protokola spriječilo je nastanak pLTF-a.

Zaključno, aktivacija 5-HT_{1A} receptora važna je i za nastanak, ali i za održavanje pLTF-a u štakora anestetiziranih uretanom. Štoviše, aktivacija 5-HT_{1A} receptora na supraspinalnoj razini važna je za nastanak pLTF-a. Smatra se da je u studijama na životinjama pLTF važan mehanizam respiracijske neuroplastičnosti, koji bi mogao biti povezan s OSA-om u ljudi.

9. SUMMARY

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by periods of upper airway collapse accompanied by repeated episodes of hypoxia. In experimental animals acute repeated bouts of hypoxia (AIH) may evoke sustained augmentation of phrenic nerve activity, known as phrenic long-term facilitation (pLTF). This form of physiological compensation might contribute to stable breathing, minimizing the occurrence of apneas and/or hypopneas during sleep in patients with OSA. Serotonin has been shown to modulate respiratory neuronal activity, possibly via projections originating in the raphe nuclei.

The aim of this dissertation was to investigate the role of 5-HT_{1A} receptor activation in induction and preservation of pLTF at two different time points, before exposures to AIH and after pLTF was induced. Moreover, the focus was set on the effects of 5-HT_{1A} receptors blockade by selective antagonist WAY-100635 into the caudal raphe region on pLTF after exposure to AIH episodes.

To investigate the role of 5-HT_{1A} receptor activation in induction and preservation of pLTF, adult, male, urethane anesthetized, vagotomized, paralyzed, and mechanically ventilated Sprague–Dawley rats were exposed to an AIH protocol. Experimental groups of animals received an intravenous injection of WAY-100635, before the onset of the first hypoxic stimulus (WAY0, n=7), and after pLTF was induced (WAY60, n=7). Control group of animals (n=7) did not received WAY-100635, but was exposed to AIH protocol. Peak phrenic nerve activity (pPNA), burst frequency, and respiratory rhythm parameters were analyzed during the five hypoxic exposures, as well as at 15, 30, and 60 min after the end of the last hypoxic episode.

In the control group, pPNA was elevated from baseline ($121.6 \pm 7.3\%$, $P < 0.001$) at 60 min after episodic hypoxia indicating pLTF. Administration of WAY-100635 prior to hypoxic

stimulation prevented the induction of pLTF. Additionally, administration of WAY-100635 after pLTF developed impaired preservation of pLTF.

To investigate the effects of 5-HT_{1A} receptors in the caudal raphe region on pLTF, adult, male, urethane anesthetized, vagotomized, paralyzed and mechanically ventilated Sprague–Dawley rats were exposed to AIH protocol. Experimental group (WAY group, n=7) received microinjection of WAY-100635 into the caudal raphe nucleus, whereas the control group (n=7) received saline into the same site.

In the control group, 1 h post-hypoxia pLTF was developed. Microinjections of selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 into the raphe nuclei prior to the AIH protocol prevented induction of pLTF.

In conclusion, there is an important role for 5-HT_{1A} receptors in induction as well as in preservation of pLTF in urethane anesthetized rats. Moreover, the obtained results suggest that 5-HT_{1A} receptor activation at supraspinal level is important for induction of pLTF, which is suggested to be an important respiratory neuroplasticity model in animal studies that possibly correlates with OSA in humans.

10. LITERATURA

1. Duffin J. *Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations*. Exp Physiol. 2004;89:517-29.
2. Morris KF, et al. *Invited review: Neural network plasticity in respiratory control*. J Appl Physiol (1985). 2003;94:1242-52.
3. Haji A, Takeda R, and Okazaki M. *Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals*. Pharmacol Ther. 2000;86:277-304.
4. Bonham AC. *Neurotransmitters in the CNS control of breathing*. Respir Physiol. 1995;101:219-30.
5. Smith JC, et al.. *Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364:2577-87.
6. McCrimmon DR, Mitchell GS, and Alheid GF. *Overview: the neurochemistry of respiratory control*. Respir Physiol Neurobiol. 2008;164:1-2.
7. Doi A, and Ramirez JM. *Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm*. Respir Physiol Neurobiol. 2008;164:96-104.
8. Benarroch EE. *Brainstem respiratory chemosensitivity: new insights and clinical implications*. Neurology. 2007;68:2140-3.
9. Kuwaki T. *Hypothalamic modulation of breathing*. Adv Exp Med Biol. 2010;669:243-7.
10. Horn EM, and Waldrop TG. *Suprapontine control of respiration*. Respir Physiol. 1998;114:201-11.
11. McCrimmon DR, et al. *Pattern formation and rhythm generation in the ventral respiratory group*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27:126-31.

12. Mitchell GS, et al. *Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity*. J Appl Physiol. 2001;90:2466-75.
13. Prabhakar NR. *O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters?* Exp Physiol. 2006;91:17-23.
14. Feldman JL, Mitchell GS, and Nattie EE. *Breathing: rhythmicity. plasticity. chemosensitivity*. Annu Rev Neurosci. 2003;26:239-66.
15. Gourine AV. *On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP*. J Physiol. 2005;568:715-24.
16. Spyer KM, Dale N, and Gourine AV. *ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction*. Exp Physiol. 2004;89:53-9.
17. Lahiri S, et al. *Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors*. Int J Biochem Cell Biol. 2001;33:755-74.
18. Milsom WK. *Adaptive trends in respiratory control: a comparative perspective*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010;299:R1-10.
19. Gargaglioni LH, Hartzler LK, and Putnam RW. *The locus coeruleus and central chemosensitivity*. Respir Physiol Neurobiol. 2010;173:264-73.
20. Paterson DS, Thompson EG, and Kinney HC. *Serotonergic and glutamatergic neurons at the ventral medullary surface of the human infant: Observations relevant to central chemosensitivity in early human life*. Auton Neurosci. 2006;124:112-24.
21. Erlichman JS, Leiter JC, and Gourine AV. *ATP. glia and central respiratory control*. Respir Physiol Neurobiol. 2010;173:305-11.
22. Duffin J. *Measuring the ventilatory response to hypoxia*. J Physiol. 2007;584:285-93.
23. Powell FL, Milsom WK, and Mitchell GS. *Time domains of the hypoxic ventilatory response*. Respir Physiol. 1998;112:123-34.

24. Bach KB, Kinkead R, and Mitchell GS. *Post-hypoxia frequency decline in rats: sensitivity to repeated hypoxia and alpha2-adrenoreceptor antagonism*. Brain Res. 1999;817:25-33.
25. Judaš M, and Kostović I. *Temelji neuroznanosti*. Zagreb 1997.
26. Ling L. *Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation*. Respir Physiol Neurobiol. 2008;164:233-41.
27. Mitchell GS, and Johnson SM. *Neuroplasticity in respiratory motor control*. J Appl Physiol. 2003;94:358-74.
28. Devinney MJ, et al. *Hypoxia-induced phrenic long-term facilitation: emergent properties*. Ann N Y Acad Sci. 2013;1279:143-53.
29. Ling L, et al. *Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing*. J Neurosci. 2001;21:5381-8.
30. Millhorn DE. *Stimulation of raphe (obscurus) nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat*. J Physiol. 1986;381:169-79.
31. Gaultier C. *Genetic basis for respiratory control disorders* 2008. New York. NY 10013. USA: Springer Science+Business Media. LLC.
32. Rowley KL, Mantilla CB, and Sieck GC. *Respiratory muscle plasticity*. Respir Physiol Neurobiol. 2005;147:235-51.
33. Prabhakar NR. *Sensory plasticity of the carotid body: role of reactive oxygen species and physiological significance*. Respir Physiol Neurobiol. 2011;178:375-80.
34. Fuller DD, et al. *Long term facilitation of phrenic motor output*. Respir Physiol. 2000;121:135-46.
35. Kinkead R, and Mitchell GS. *Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine*. Am J Physiol. 1999;277:R658-66.

-
36. Valic M, et al. *Microinjection of methysergide into the raphe nucleus attenuated phrenic long-term facilitation in rats.* Exp Brain Res. 2010;202:583-9.
 37. Hayashi F, et al. *Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats.* Am J Physiol. 1993;265:R811-9.
 38. Bach KB, and Mitchell GS. *Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent.* Respir Physiol. 1996;104:251-60.
 39. Mateika JH, and Narwani G. *Intermittent hypoxia and respiratory plasticity in humans and other animals: does exposure to intermittent hypoxia promote or mitigate sleep apnoea?* Exp Physiol. 2009;94:279-96.
 40. McGuire M, et al. *Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats.* J Appl Physiol. 2002;93:2155-61.
 41. Dick TE, et al. *Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat.* Exp Physiol. 2007;92:87-97.
 42. Carev M, et al. *Propofol abolished the phrenic long-term facilitation in rats.* Respir Physiol Neurobiol. 2010;170:83-90.
 43. Millhorn DE, Eldridge FL, and Waldrop TG. *Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin.* Respir Physiol. 1980;42:171-88.
 44. Cao KY, et al. *Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs.* Journal of applied physiology (Bethesda, Md :1985). 1992;73:2083-8.
 45. Mateika JH and Fregosi RF. *Long-term facilitation of upper airway muscle activities in vagotomized and vagally intact cats.* Journal of applied physiology (Bethesda, Md :1985). 1997;82:419-25.
 46. Turner DL, and Mitchell GS. *Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats.* J Physiol. 1997;499:543-50.

-
47. Behan M, et al. *Sex steroid hormones and the neural control of breathing*. Respiratory physiology & neurobiology. 2003;136:249-63.
 48. Sokolowska B, and Pokorski M. *Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit*. J Physiol Pharmacol. 2006;57 Suppl 4:341-7.
 49. Mitchell GS, et al. *Time domains of the hypoxic ventilatory response in awake ducks: episodic and continuous hypoxia*. Respir Physiol. 2001;124:117-28.
 50. Peng YJ, et al. *Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia*. J Physiol. 2006;577:705-16.
 51. Mateika JH, and Sandhu KS. *Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation*. Respir Physiol Neurobiol. 2011;176:1-11.
 52. Mateika JH, and Syed Z. *Intermittent hypoxia. respiratory plasticity and sleep apnea in humans: Present knowledge and future investigations*. Respir Physiol Neurobiol. 2013;188:289-300.
 53. Baker TL, and Mitchell GS. *Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats*. J Physiol. 2000;529:215-9.
 54. Cao Y, Liu C, and Ling L. *Glossopharyngeal long-term facilitation requires serotonin 5-HT2 and NMDA receptors in rats*. Respir Physiol Neurobiol. 2010;170:164-72.
 55. Fregosi RF, and Mitchell GS. *Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats*. J Physiol. 1994;477:469-79.
 56. Baker-Herman TL, and Strey KA. *Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation*. Respir Physiol Neurobiol. 2011;179:48-56.

-
57. Baker-Herman TL, and Mitchell GS. *Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats*. Respir Physiol Neurobiol. 2008;162:8-17.
 58. Baker-Herman TL, and Mitchell GS. *Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis*. J Neurosci. 2002;22:6239-46.
 59. Baker-Herman TL, et al. *BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia*. Nat Neurosci. 2004;7:48-55.
 60. Hoffman MS, et al. *Phrenic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia requires spinal ERK activation but not TrkB synthesis*. J Appl Physiol (1985). 2012;113:1184-93.
 61. Dale-Nagle EA, et al. *Multiple pathways to long-lasting phrenic motor facilitation*. Adv Exp Med Biol. 2010;669:225-30.
 62. Pamenter ME, and Powell FL. *Signalling mechanisms of long term facilitation of breathing with intermittent hypoxia*. F1000Prime Rep. 2013;5:23.
 63. MacFarlane PM, and Mitchell GS. *Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation*. Neuroscience. 2008;152:189-97.
 64. Wilkerson JE, et al. *Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species*. Biochem Soc Trans. 2007;35:1269-72.
 65. Hoffman MS, et al. *Spinal adenosine A2(A) receptor inhibition enhances phrenic long term facilitation following acute intermittent hypoxia*. J Physiol. 2010;588:255-66.
 66. Hoffman MS, and Mitchell GS. *Spinal 5-HT7 receptor activation induces long-lasting phrenic motor facilitation*. J Physiol. 2011;589:1397-407.

-
67. Golder FJ, et al. *Spinal adenosine A2a receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation*. J Neurosci. 2008;28:2033-42.
 68. Nichols NL, Dale EA, and Mitchell GS. *Severe acute intermittent hypoxia elicits phrenic long-term facilitation by a novel adenosine-dependent mechanism*. J Appl Physiol (1985). 2012;112:1678-88.
 69. Zhang Y, et al. *Episodic phrenic-inhibitory vagus nerve stimulation paradoxically induces phrenic long-term facilitation in rats*. J Physiol. 2003;551:981-91.
 70. Mahamed S, and Mitchell GS. *Simulated apnoeas induce serotonin-dependent respiratory long-term facilitation in rats*. J Physiol. 2008;586:2171-81.
 71. Tadjalli A, Duffin J, and Peever J. *Repeated obstructive apneas induce long-term facilitation of genioglossus muscle tone*. Adv Exp Med Biol. 2010;669:297-301.
 72. Ryan S, and Nolan P. *Long-term facilitation of upper airway muscle activity induced by episodic upper airway negative pressure and hypoxia in spontaneously breathing anaesthetized rats*. J Physiol. 2009;587:3343-53.
 73. MacFarlane PM, and Mitchell GS. *Episodic spinal serotonin receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation by an NADPH oxidase-dependent mechanism*. J Physiol. 2009;587:5469-81.
 74. Kinkead R, et al. *Cervical dorsal rhizotomy enhances serotonergic innervation of phrenic motoneurons and serotonin-dependent long-term facilitation of respiratory motor output in rats*. J Neurosci. 1998;18:8436-43.
 75. Burton MD, and Kazemi H. *Neurotransmitters in central respiratory control*. Respir Physiol. 2000;122:111-21.
 76. Richter DW, et al. *Serotonin receptors: guardians of stable breathing*. Trends Mol Med. 2003;9:542-8.

-
77. Dutschmann M, et al. *The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked cardiorespiratory disturbances*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364:2611-23.
78. Baker TL, et al. *Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia*. Respir Physiol. 2001;129:25-35.
79. Huey KA, et al. *Changes in dopamine D(2)-receptor modulation of the hypoxic ventilatory response with chronic hypoxia*. Respir Physiol. 2000;123:177-87.
80. Huey KA, et al. *Ventilatory responses to acute and chronic hypoxia in mice: effects of dopamine D(2) receptors*. J Appl Physiol (1985). 2000;89:1142-50.
81. Kinkead R, et al. *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.
82. Fuller DD, et al. *Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia*. J Appl Physiol. 2001;90:2001-6; discussion 2000.
83. Hodges MR, and Richerson GB. *Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects*. Respir Physiol Neurobiol. 2008;164:222-32.
84. Siegel A, and Sapru HN. *Essential neuroscience*. Second edition 2011. Philadelphia. PA. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer business.
85. Barnes NM, and Sharp T. *A review of central 5-HT receptors and their function*. Neuropharmacology. 1999;38:1083-152.
86. Liu YF, et al. *Stimulation of cAMP synthesis by Gi-coupled receptors upon ablation of distinct Galphai protein expression. Gi subtype specificity of the 5-HT1A receptor*. J Biol Chem. 1999;274:16444-50.

-
87. Feldman JL, et al. *Synaptic interaction between medullary respiratory neurones during apneusis induced by NMDA-receptor blockade in cat.* J Physiol. 1992;450:303-23.
 88. Lalley PM, Bischoff AM, and Richter DW. *Serotonin 1A-receptor activation suppresses respiratory apneusis in the cat.* Neurosci Lett. 1994;172:59-62.
 89. Manzke T, et al. *Serotonin targets inhibitory synapses to induce modulation of network functions.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009;364:2589-602.
 90. Lalley PM. *Serotonergic and non-serotonergic responses of phrenic motoneurons to raphe stimulation in the cat.* J Physiol. 1986;380:373-85.
 91. Cao Y, et al. *Effects of electrical stimulation of the medullary raphe nuclei on respiratory movement in rats.* J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2006;192:497-505.
 92. Cao Y, et al. *Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats.* Neurosci Res. 2006;56:322-31.
 93. Ivancev B, et al. *Remifentanyl reversibly abolished phrenic long term facilitation in rats subjected to acute intermittent hypoxia.* J Physiol Pharmacol. 2013;64:485-92.
 94. Marinov V, et al. *Sevoflurane and isoflurane monoanesthesia abolished the phrenic long-term facilitation in rats.* Respir Physiol Neurobiol. 2013;189:607-13.
 95. Paxinos G. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Fourth edition 2005. San Diego. USA:Academic Press.
 96. Forster EA, et al. *A pharmacological profile of the selective silent 5-HT1A receptor antagonist. WAY-100635.* Eur J Pharmacol. 1995;281:81-8.

-
97. Golder FJ, and Martinez SD. *Bilateral vagotomy differentially alters the magnitude of hypoglossal and phrenic long-term facilitation in anesthetized mechanically ventilated rats.* Neurosci Lett. 2008;442:213-8.
 98. Terada J, et al. *Ventilatory long-term facilitation in mice can be observed during both sleep and wake periods and depends on orexin.* J Appl Physiol (1985). 2008;104:499-507.
 99. Berner J, et al. *Altered respiratory pattern and hypoxic response in transgenic newborn mice lacking the tachykinin-1 gene.* J Appl Physiol (1985). 2007;103:552-9.
 100. Morris KF, Shannon R, and Lindsey BG. *Changes in cat medullary neurone firing rates and synchrony following induction of respiratory long-term facilitation.* J Physiol. 2001;532:483-97.
 101. Erickson JT, and 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.
 102. Teppema LJ, et al. *Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia.* J Comp Neurol. 1997;388:169-90.
 103. Gaytan S, and Pasaro R. *Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat.* Brain Res Bull. 1998;47:625-42.
 104. Holtman JR Jr, Marion LJ, and Speck DF. *Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat.* Neuroscience. 1990;37:541-52.
 105. Connelly CA, Ellenberger HH, and Feldman JL. *Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat?* Neurosci Lett. 1989;105:34-40.

-
106. Nucci TB, Branco LG, and Gargaglioni LH. *5-HT_{1A}. but not 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors in the nucleus raphe magnus modulate hypoxia-induced hyperpnoea*. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;193:403-14.
107. Zabka AG, Behan M, and Mitchell GS. *Long term facilitation of respiratory motor output decreases with age in male rats*. *J Physiol*. 2001;531:509-14.
108. Zabka AG, et al. *Selected contribution: chronic intermittent hypoxia enhances respiratory long-term facilitation in geriatric female rats*. *J Appl Physiol*. 2003;95:2614-23; discussion 2604.
109. Pavlinac I, et al. *Role of 5-HT(1)(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;175:146-52.
110. Bavis RW, and Mitchell GS. *Intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation in carotid-denervated rats*. *J Appl Physiol*. 2003;94:399-409.
111. Baker-Herman TL, et al. *Differential expression of respiratory long-term facilitation among inbred rat strains*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;170:260-7.
112. Behan M, Zabka AG, and Mitchell GS. *Age and gender effects on serotonin-dependent plasticity in respiratory motor control*. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2002;131:65-77.
113. Zabka AG, Mitchell GS, and Behan M. *Ageing and gonadectomy have similar effects on hypoglossal long-term facilitation in male Fischer rats*. *J Physiol*. 2005;563:557-68.
114. Zabka AG, Mitchell GS, and Behan M. *Conversion from testosterone to oestradiol is required to modulate respiratory long-term facilitation in male rats*. *J Physiol*. 2006;576:903-12.

-
115. Zabka AG, Behan M, and Mitchell GS. *Selected contribution: Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are influenced by age and by the estrus cycle.* J Appl Physiol (1985). 2001;91:2831-8.
116. Maggi CA, and Meli A. *Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system.* Experientia. 1986;42:292-7.
117. Cao Y, and Ling L. *Urethane inhibits genioglossal long-term facilitation in unparalyzed anesthetized rats.* Neurosci Lett. 2010;477:124-8.
118. Hara K, and Harris RA. *The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels.* Anesth Analg. 2002;94:313-8. Table of contents.
119. Maggi CA, and Meli A. *Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations.* Experientia. 1986;42:109-14.
120. Richmonds CR, and Hudgel DW. *Hypoglossal and phrenic motoneuron responses to serotonergic active agents in rats.* Respir Physiol. 1996;106:153-60.
121. Syed Z, Lin HS, and Mateika JH. *The impact of arousal state, sex, and sleep apnea on the magnitude of progressive augmentation and ventilatory long-term facilitation.* J Appl Physiol (1985). 2013;114:52-65.
122. Huang ZL, Urade Y, and Hayaishi O. *The role of adenosine in the regulation of sleep.* Curr Top Med Chem. 2011;11:1047-57.
123. Hoffman MS, and Mitchell GS. *Spinal 5-HT₇ receptors and protein kinase A constrain intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation.* Neuroscience. 2013;250:632-43.
124. Paterson DS, et al. *Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome.* JAMA. 2006;296:2124-32.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Pavlinac Dodig, dr. med.

Zavod za neuroznanost

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Šoltanska 2, 21 000 Split

Tel: +385 21 557 862, mobitel: +385 95 900 6364

e-mail: ivana.pavlinac@mefst.hr

OSOBNİ PODACI

- Datum rođenja: 19. travnja 1984.
- Mjesto i država rođenja: Split, Hrvatska

OBRAZOVANJE

- 1990. – 1998. Osnovna škola “Sućidar”, Split, prosjek ocjena 5,0
- 1998. – 2002. Prirodoslovno–matematička gimnazija, Split, prosjek ocjena 5,0
- 2002. – 2008. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, prosjek ocjena 4,83
- 2009. – Poslijediplomski doktorski studijski program “Klinička medicina utemeljena na dokazima”
- 2009. – 2010. Sleep research and sleep medicine, u sklopu ESRS EU „Marie Curie“ projekta, Bertinoro (Italija), Bologna (Italija), Kloster Seeon (Njemačka)
- 2009. Ljetna škola znanstvene komunikacije, Trilj, Medicinski fakultet Split

AKADEMSKI NASLOVI

- 2008.: doktor medicine (Diplomski rad: “Varijante gena za glukoza – 6 – fosfat dehidrogenazu u južnoj Hrvatskoj: opis nove varijante – G6PD Split”)

RADNO ISKUSTVO

- 2008. – znanstveni novak/asistent na Zavodu za neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

STRANI JEZICI

- Aktivno se koristim engleskim i njemačkim jezikom u govoru i pismu.

NAGRADE

- 1995. Diploma za postignuto 2. mjesto na Gradskom natjecanju Mladih geografa
- 1995. Diploma za postignuto 3. mjesto na Županijskom natjecanju Mladih geografa
- 1995. Priznanje za sudjelovanje na Regionalnom natjecanju iz matematike
- 1997. Priznanje za sudjelovanje na Županijskom natjecanju iz kemije
- 1998. Priznanje za sudjelovanje na Županijskom natjecanju iz kemije
- 1998. Diploma za postignuto 1. mjesto na Regionalnom natjecanju iz hrvatskog jezika
- 1998. Diploma za postignuto 5. mjesto na Državnom natjecanju iz hrvatskog jezika
- 1999. Priznanje za sudjelovanje na Županijskom natjecanju iz kemije
- 1999. Stipendija Grada Splita za nadarene učenike
- 2001. Diploma za postignuto 2. mjesto na Gradskom natjecanju iz povijesti
- 2001. Diploma za postignuto 3. mjesto na Regionalnom natjecanju iz povijesti
- 2001. Priznanje za sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike
- 2002. Diploma za postignuto 1. mjesto na Regionalnom natjecanju iz logike

2002. Priznanje za sudjelovanje na Državnom natjecanju iz logike

2003. Stipendija Grada Splita za nadarene studente

2004. Rektorova nagrada za izvanredne rezultate

2005. Top Stipendija za Top Studente

2009. Pohvalnica Dekana za izvrsne rezultate postignute tijekom studija

ČLANSTVO

- 2003. – 2008. Međunarodna udruga studenata medicine Hrvatska (CroMSIC)
- 2005. – 2007. Nacionalni dužnosnik za medicinsku edukaciju udruge CroMSIC
- 2006. – 2008. Povjerenstvo za nagrade i priznanja, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- 2008. – Hrvatsko društvo fiziologa
- 2009. – Hrvatsko društvo za neuroznanost
- 2009. – 2011. – Povjerenstvo za nagrade i priznanja, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
- 2010. – Hrvatsko somnološko društvo - Društvo za medicinu spavanja Hrvatskog liječničkog zbora

NASTAVNE AKTIVNOSTI

- Dodiplomska nastava:
- Predmet: Temelji neuroznanosti
 - Studij medicine
 - Studij dentalne medicine
 - Studij medicine na engleskom jeziku (Medical Studies in English)
 - Medicinski fakultet u Mostaru

OSTALE AKTIVNOSTI

- 2000.-2002.: voditeljica grupe koja je izrađivala službenu web stranicu Prirodoslovno-matematičke gimnazije u Splitu
- 2003.-2006.: demonstratorica na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- 2004.-2006.: demonstratorica na Zavodu za Biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- 2004.-2005.: demonstratorica na Zavodu za Fiziologiju s biofizikom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- 2005.-2006.: demonstratorica na Zavodu za Neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Članica Organizacijskog odbora “The First Seminar on Organ Donation and Transplantation for medical students Split, 27th-30th April 2006, Split, Croatia”

POPIS PUBLIKACIJA

1. Barisić M, Korać J, Pavlinac I, Krzelj V, Marusić E, Vulliamy T, et al. Characterization of G6PD deficiency in southern Croatia: description of a new variant, G6PD Split. *J Hum Genet.* 2005;50:547-9.
2. Pavlinac I, Marin A, Valic M, Marusic J, Roje D, Pecotic R, et al. Influence of the wars in Croatia and Bosnia and Herzegovina on the incidence and outcome of singleton premature births in the Split University Hospital. *CEJM* 2008;3:187-93.
3. Carev M, Valic M, Pecotic R, Karanovic N, Valic Z, Pavlinac I, et al. Propofol abolished the phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;170:83-90.

4. 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.
5. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. Role of 5-HT(1A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;175:146-52.
6. Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Valic M, Ivkovic N, Dogas Z. The evaluation of the Croatian version of the Epworth sleepiness scale and STOP questionnaire as screening tools for obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 2011;16:793-802.
7. Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Valic M, Dogas Z. Acute intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation which is modulated by 5-HT(1A) receptor in the caudal raphe region of the rat. *J Sleep Res.* 2012;21:195-203.
8. Marinov V, Valic M, Pecotic R, Karanovic N, Pavlinac Dodig I, Carev M, Valic Z, Dogas Z. Sevoflurane and isoflurane monoanesthesia abolished the phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;189:607-13.
9. Ivancev B, Carev M, Pecotic R, Valic M, Pavlinac Dodig I, Karanovic N, Dogas Z. Remifentanyl reversibly abolished phrenic long term facilitation in rats subjected to acute intermittent hypoxia. *J Physiol Pharmacol.* 2013;64:485-92.
10. Zemunik V, Pavlinac Dodig I, Valić M, Tičinović Kurir T, Đogaš Z, Pecotić R. Procjena rizika za opstruktivnu apneju tijekom spavanja u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 2. *Med Jad.* 2013;43:179-87.

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. Carev M, Valić M, Pecotić R, Karanović N, Valić Z, Pavlinac I and Đogaš Z. Propofol attenuates the phrenic long term facilitation in rats subjected to acute intermittent

- hypoxia. 3rd Croatian Congress of Neuroscience. Zadar, Croatia, 24-26 September 2009. Abstract book.
2. Valić M, Pecotić R, Pavlinac I, Valić Z and Đogaš Z. Different experimental protocols and phrenic long-term facilitation. 3rd Croatian Congress of Neuroscience. Zadar, Croatia, 24-26 September 2009. Abstract book.
 3. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. WAY-100635 attenuates phrenic long-term facilitation in rats. Neuroscience 2010. San Diego, USA 13-17 November 2010. Abstract book.
 4. Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Dogas Z. Brain and senses – activities inspiring neuroscience in pre-school children. Neuroscience 2010. San Diego, USA 13-17 November 2010. Abstract book.
 5. Dogas Z, Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Carev M, Karanovic N. Long-term facilitation of the phrenic nerve activity in rats following intermittent hypoxia. Sleep and breathing, Prague 2011. Abstract book.
 6. Marinov V, Karanovic N, Pavlinac I, Valic M, Pecotic R, Dogas Z. Sevoflurane and isoflurane abolished the phrenic long term facilitation in rats. Euroanaesthesia 2011, The European Anaesthesiology Congress, Amsterdam, The Netherlands, June 11-14, 2011. Abstract book.
 7. Ivancev B, Carev M, Pavlinac I, Pecotic R, Valic M, Dogas Z. Remifentanil attenuates the phrenic long term facilitation in rats subjected to acute intermittent hypoxia. Euroanaesthesia 2011, The European Anaesthesiology Congress, Amsterdam, The Netherlands, June 11-14, 2011. Abstract book.
 8. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. Blockade of phrenic long term facilitation by microinjections of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 into the raphe nucleus of

- the rat. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 14-18, 2011. Abstract book.
9. Pecotic R, Pavlinac I, Valic M, Ivkovic N, Dogas Z. The evaluation of the Croatian version of the Epworth Sleepiness Scale and STOP questionnaire as screening tools for obstructive sleep apnea syndrome. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 14-18, 2011. Abstract book.
 10. M. Valic, Z. Valic, I. Pavlinac, R. Pecotic and Z. Dogas. Heart rate variability during and after acute intermittent hypoxia in rats. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 14-18, 2011. Abstract book.
 11. Pecotić R, Valić M, Pavlinac Dodig I, Carev M, Karanović N, Valić Z, Đogaš Z. The role of anesthetics in the phrenic long term facilitation in rats. 4th Croatian Neuroscience Congress. Zagreb, Croatia, September 20-21 2013. Abstract book.