

# Učinak inhalacijske anestezije sevofluranom i izofluranom na dugoročnu facilitaciju freničkog živca u štakora

---

**Marinov, Vjera**

**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:171:914517>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Vjera Marinov, dr. med.**

**UČINAK INHALACIJSKE ANESTEZIJE**  
**SEVOFLURANOM I IZOFLURANOM NA DUGOROČNU**  
**FACILITACIJU FRENIČKOGA ŽIVCA U ŠTAKORA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2014.**

Istraživanje je provedeno u  
Laboratoriju za temeljnu neuroznanost pri Zavodu za neuroznanost  
Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditelj istraživanja je prof. dr. sc. Zoran Đogaš,  
predstojnik Zavoda za neuroznanost.

Mentori su:

doc. dr. sc. Nenad Karanović i prof. dr. sc. Maja Valić.

Za pomoć u istraživanju i izradi disertacije zahvaljujem se:

doc. N. Karanoviću, prof. M. Valić, doc. R. Pecotić, I. Pavlinac Dodig, dr. med., J. Baričević,  
prof. Z. Đogašu, doc. M. Carevu, prof. Z. Valiću i mojoj obitelji.

## SADRŽAJ

<b>1. Popis oznaka i kratica</b>	3
<b>2. Uvod</b>	6
2.1. Disanje i respiracijski kontrolni sustav	6
2.2. Aktivnost freničkoga živca i frenički neurogram	9
2.3. Ventilacijski odgovor na hipoksiju	10
2.3.1. Izlaganje kratkotrajnoj hipoksiji	11
2.3.2. Izlaganje višekratnim hipoksijskim epizodama	13
2.4. Respiracijska plastičnost i dugoročno pojačanje disanja	14
2.4.1. Predloženi mehanizam nastanka pLTF-a	17
2.4.2. Amplitudni i frekvencijski pLTF	21
2.4.3. LTF u humanim studijama	22
2.5. Inhalacijski anestetici	24
2.5.1. Opće postavke	24
2.5.2. Molekularni mehanizmi djelovanja inhalacijskih anestetika	25
2.5.3. Učinci inhalacijskih anestetika s osvrtom na kontrolu disanja	26
2.5.4. Utjecaj inhalacijskih anestetika na fenomen plastičnosti	29
2.6. Ostali anestetici	29
<b>3. Problematika istraživanja</b>	31
3.1. Ciljevi istraživanja i hipoteze	32
3.2. Ustroj i ishod istraživanja	33
<b>4. Metode istraživanja</b>	35
4.1. Pokusne životinje	35
4.2. Postupci	35
4.2.1. Anestezija, kanulacija traheje i ventilacija	35

4.2.2.	Kanulacija krvnih žila, uzorkovanje krvi i analiza plinova	37
4.2.3.	Prepariranje freničkoga živca i uzorkovanje živčanog signala	37
4.2.4.	Provođenje hipoksijskog protokola	39
4.3.	Statistička obrada rezultata	40
4.4.	Etička načela	41
<b>5.</b>	<b>Rezultati</b>	42
5.1.	Učinak inhalacijskih anestetika na dugoročnu facilitaciju freničkoga živca	42
5.2.	Hipoksijski ventilacijski odgovor	45
5.3.	Frekvencija freničkoga živca	45
5.4.	Respiracijski parametri	48
5.5.	Srednji arterijski tlak, PaO <sub>2</sub> , PaCO <sub>2</sub> , pH	50
<b>6.</b>	<b>Rasprava</b>	52
6.1.	Amplitudni i frekvencijski pLTF i anestezija	52
6.2.	pLTF i hipoksijski ventilacijski odgovor	57
6.3.	Mogući mehanizmi djelovanja inhalacijskih anestetika na pLTF	60
6.4.	Utjecaj inhalacijskih anestetika na respiracijske parametre	64
6.5.	Održavanje acidobazne i hemodinamske ravnoteže	65
<b>7.</b>	<b>Zaključci</b>	68
<b>8.</b>	<b>Znanstveni doprinos i klinička razmatranja</b>	70
<b>9.</b>	<b>Sažetak</b>	73
<b>10.</b>	<b>Summary</b>	74
<b>11.</b>	<b>Literatura</b>	75
<b>12.</b>	<b>Životopis</b>	90
<b>13.</b>	<b>Napomena</b>	94

## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA (po abecednom redu)

ABS - acido-bazni status

AIH - akutna intermitentna hipoksija (engl. *acute intermittent hypoxia*)

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionat (ionotropni glutamatni receptor)

ATP - adenzin-trifosfat

BDNF - neurotrofički faktor (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

BötC - Bötzinger kompleks

C4 - razina četvrtog vratnog kralješka

Ca<sup>2+</sup> - ion kalcija

CIH - kronična intermitentna hipoksija (engl. *chronic intermittent hypoxia*)

CSN - živac karotidnog sinusa (engl. *carotid sinus nerve*)

DRS - dorzalna respiracijska skupina

ETCO<sub>2</sub> - parcijalni tlak ugljičnog dioksida na kraju izdisaja (engl. *end-tidal*)

f - frekvencija freničkoga živca ili frekvencija disanja

FiO<sub>2</sub> - udio kisika u udahnutom zraku (engl. *inspiratory fraction*)

GABA -  $\gamma$ -amino-maslačna kiselina (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

GABA<sub>A</sub> - ionotropni GABA receptor, podskupina A

HVR - hipoksijski ventilacijski odgovor (engl. *hypoxic ventilatory response*)

5-HT - 5-hidroksitriptamin (serotonin)

5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> - vrste serotonininskih receptora

IH - intermitentna hipoksija (engl. *intermittent hypoxia*)

K<sup>+</sup><sub>2P</sub> - vrsta propusnog (nevoltažnog) kalijevog ionskog kanala (engl. *leak two-pore*)

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

LTF - dugoročna facilitacija (engl. *long-term facilitation*)

LTP - dugoročna potencijacija (engl. *long-term potentiation*)

MAC - minimalna alveolarna koncentracija (engl. *minimum alveolar concentration*)

MAP - srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*)

MK-801 - dizocilpin (antagonist NMDA glutamatnih receptora)

Na<sup>+</sup> - ion natrija

NADP - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphat*)

nAch receptor - nikotinski acetilkolinski receptor

NMDA - N-metil-D-aspartat (ionotropni glutamatni receptor)

non-REM - stadij spavanja bez brzih pokreta očiju (engl. *rapid eye movement*)

NTS - struktura u moždanom deblu (lat. *nucleus tractus solitarii*)

OSA - opstruktivna apneja tijekom spavanja (engl. *obstructive sleep apnea*)

PO<sub>2</sub> - parcijalni tlak kisika u određenom mediju (mmHg ili kPa)

P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> - parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi (mmHg ili kPa)

PCO<sub>2</sub> - parcijalni tlak ugljičnog dioksida u određenom mediju (mmHg ili kPa)

P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> - parcijalni tlak ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi (mmHg ili kPa)

pH - način izražavanja koncentracije vodikovih iona

pLTF - dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. *phrenic long-term facilitation*)

PNA - aktivnost freničkoga živca (engl. *phrenic nerve activity*)

PNG - frenički neurogram (engl. *phrenic neurogram*)

preBötC - preBötzinger kompleks

PRS - pontina respiracijska skupina

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

RPNA - neobrađena aktivnost freničkoga živca (engl. *raw phrenic nerve activity*)

RTN/pFRG - retrotrapezoidni nukleus s parafacijalnom respiracijskom skupinom ili grupom

S<sub>a</sub>O<sub>2</sub> - saturacija periferne arterijske krvi kisikom (%)

STD - kratkotrajna oslabiljenje ili depresija (engl. *short term depression*)

STP - kratkotrajno pojačanje ili potencijacija (engl. *short term potentiation*)

SŽS - središnji živčani sustav

T15, T30 i T60 - vremenske točke 15, 30 i 60 minuta nakon AIH protokola

TH1, TH2, TH3, TH4 i TH5 - pet hipoksijskih epizoda

Ti - vremensko trajanje udisaja (inspirija)

Te - vremensko trajanje izdisaja (ekspirija)

Ttot - vremensko trajanje cijelog respiracijskog ciklusa (od engl. *total*)

TrkB - tirozin-kinaza B

vLTF - ventilacijska dugoročna facilitacija (engl. *ventilatory long-term facilitation*)

VRS - ventralna respiracijska skupina



## 2. UVOD

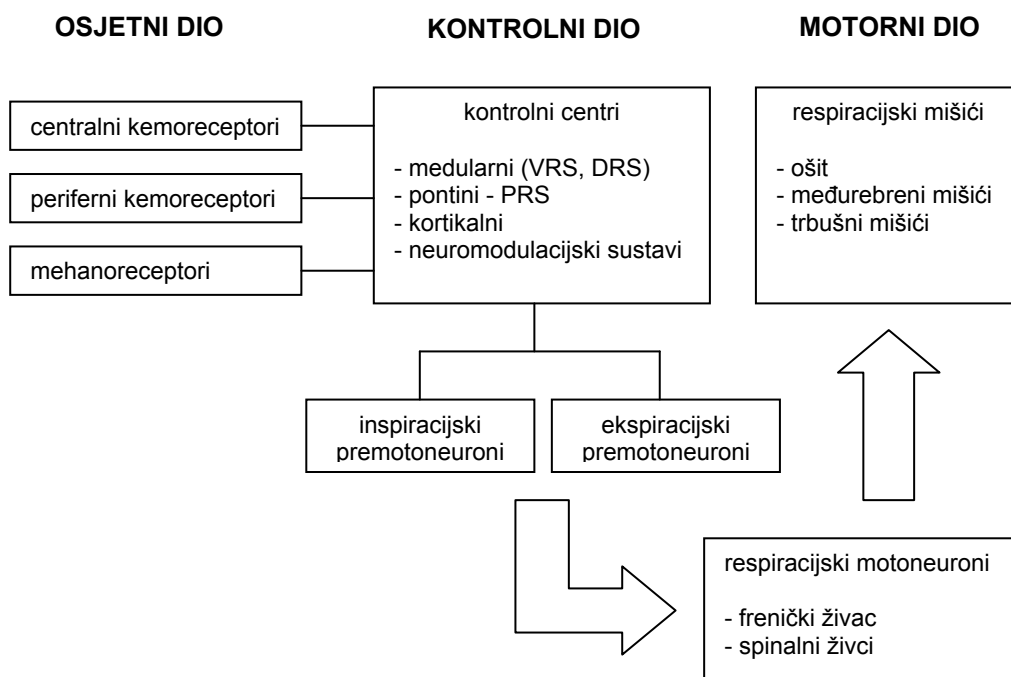
### 2.1. Disanje i respiracijski kontrolni sustav

Disanje je temeljna fiziološka funkcija organizma, pomoću koje se naizgled jednostavnim mehaničkim činom ulaska zraka u pluća (udisaj ili inspirij) i izlaska zraka iz pluća (izdisaj ili ekspirij), regulira sadržaj plinova kisika i ugljičnog dioksida u krvi i tkivima. Primarno se radi o složenom fiziološkom procesu ovisnom o brojnim perifernim i središnjim neuroregulacijskim mehanizmima, kojemu je cilj održavanje respiracijske homeostaze (1-2). Pokreće ga respiracijski kontrolni sustav, sastavljen od tri osnovna dijela: osjetnog, središnjeg ili kontrolnog i motornog (Slika 1). Osjetni dio dijeli se na kemijsku komponentu, koju čine periferni i centralni kemoreceptori i mehaničku komponentu, koju čine receptori za istežanje smješteni u dišnim putevima i mišićima. Središnji ili kontrolni dio respiracijskog sustava stvara temeljni ritam disanja i prikupljajući i integrirajući informacije prispjele iz perifernih i središnjih receptora i iz viših centara za svijest i ponašanje, temeljni ritam disanja pretvara u sinergistički obrazac aktivnosti respiracijskih motoneurona. Informacije se respiracijskim motoneuronima, prije svega freničkim živcem i spinalnim živcima, prenose do motornog dijela, kojeg čine ošit i ostali respiracijski mišići (2-5).

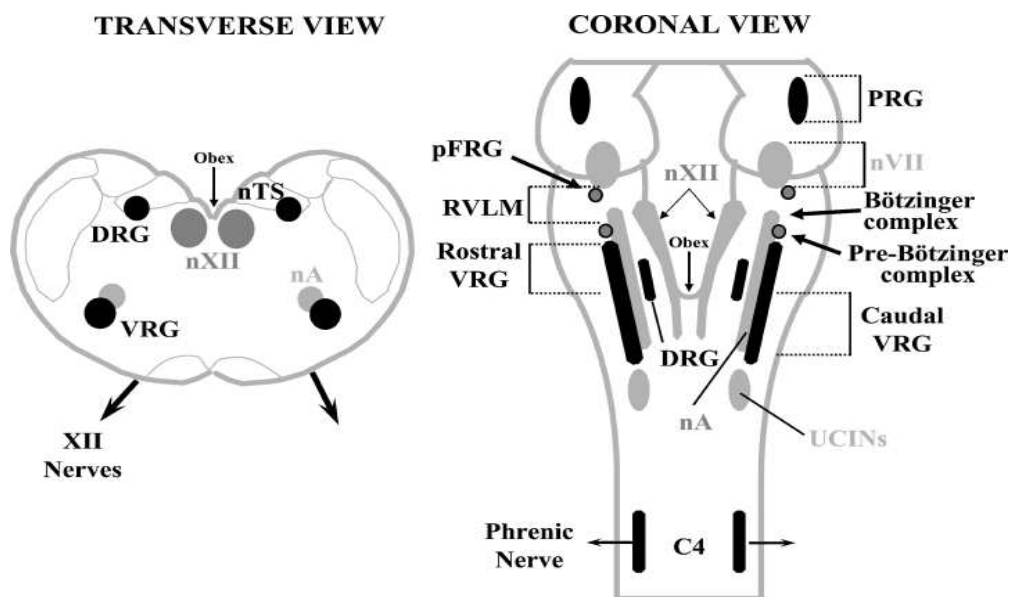
Precizna kontrola disanja odvija se preko različitih skupina respiracijskih neurona prostorno i funkcionalno organiziranih u složenu respiracijsku neuronsku mrežu (1-2, 6). Respiracijski neuroni, najvećim dijelom smješteni u donjem dijelu moždanog debla, raspoređeni su unutar tri specifične skupine: ventralnoj (VRS), dorzalnoj (DRS) i pontinoj respiracijskoj skupini (PRS) (1, 4, 7) (Slika 2). Najvažniji dio respiracijske neuronske mreže je ventralna respiracijska skupina koja se dijeli na 4 dijela: kaudalni i rostralni dio, preBötzinger (preBötC) i Bötzinger kompleks (BötC). Utvrđeno je da rostralni dio, preBötzinger i Bötzinger kompleks imaju važnu ulogu u stvaranju temeljnog ritma i obrasca disanja (2, 4, 6). Nedavna istraživanja ukazuju na mogućnost postojanja dva zasebna, ali

međusobno povezana respiracijska centra u tom dijelu moždanog debla, u obliku tzv. dualnog respiracijskog centra, a čine ga preBötzinger kompleks i retrotrapezoidni nukleus s parafacijalnom respiracijskom skupinom (RTN/pFRG) (8-9). Unutar VRS nalaze se i inspiracijski i ekspiracijski premotoneuroni koji svoje projekcije šalju dalje prema kranijalnim i spinalnim respiracijskim motoneuronima, a putem kojih se živčani impulsi prenose do odgovarajućih skupina respiracijskih mišića (1, 6).

## RESPIRACIJSKI KONTROLNI SUSTAV



**Slika 1. Dijelovi respiracijskog kontrolnog sustava.** (Modificirano prema slici iz Farber NE, Pagel PS, Warltier DC. Pulmonary Pharmacology. U: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. Miller's Anesthesia. Volume 1. Section III. 7 th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009, p. 561-94.).



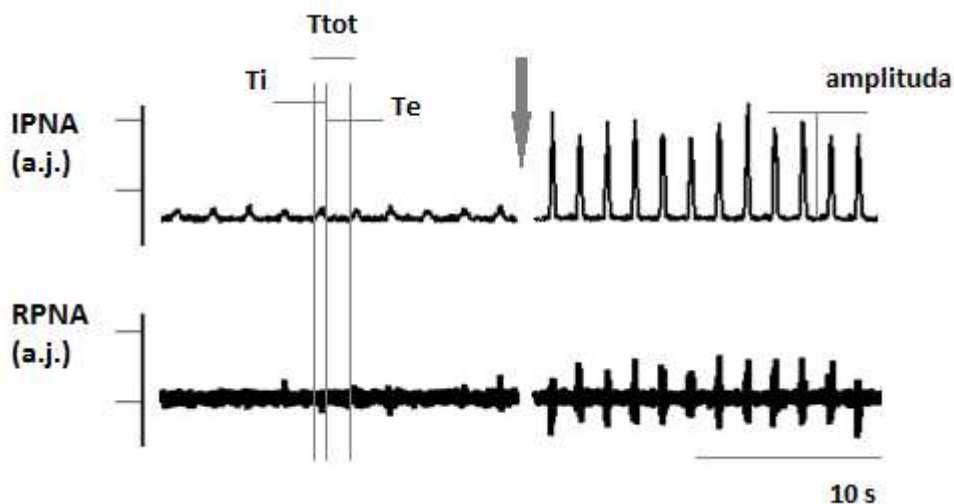
**Slika 2. Shematski prikaz lokalizacije glavnih skupina respiracijskih neurona u moždanom deblu i kralježničnoj moždini u sisavaca.** Poprečni presjek s lijeve strane je na razini vrška četvrte moždane komore (obex) u frontalnom presjeku s desne strane. VRG - ventralna respiracijska skupina, DRG - dorzalna respiracijska skupina, PRG - pontina respiracijska skupina, pFRG - parafacijalna respiracijska skupina, C4 - dio kralježničke moždine na razini četvrtog cervikalnog kralješka s jezgrom freničkoga živca. (Preuzeto iz Duffin J. *Exp Physiol* 2004;89:517-29. - slika kao u izvorniku).

Uzevši u obzir cjelokupnu građu respiracijskog kontrolnog sustava od periferije prema središnjim strukturama, može se istaknuti nekoliko njegovih temeljnih svojstava, kao što su automatizam i ritmičnost, senzitivnost, modulacija i plastičnost (1, 2, 6). Automatizam i ritmičnost proizlaze iz postojanja središnjeg respiracijskog centra i respiracijske neuronske mreže, dok se senzitivnost temelji na postojanju središnjih i perifernih kemoreceptora. Periferni kemoreceptori nalaze se u karotidnim i aortalnim tjelešcima i osjetljivi su prije svega na promjene parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi ( $P_aO_2$ ), a manje na promjene parcijalnog tlaka ugljičnog-dioksida ( $P_aCO_2$ ) i pH (10-11). Centralni kemoreceptori smješteni su u području moždanog debla, uglavnom na površinskim dijelovima rostralne ventralne medule i osjetljivi su prije svega na promjene  $PCO_2$  i pH unutar mozga (12-13). Modulacija

disanja i plastičnost respiracijskog sustava predstavljaju temeljna svojstva respiracijskog kontrolnog sustava pomoću kojih se disanje prilagođava različitim fiziološkim potrebama i patofiziološkim stanjima. U manifestaciji respiracijske plastičnosti uključeni su serotoniniski i noradrenaliniski sustav, kao i strukture središnjeg živčanog sustava iz područja ponsa i moždane kore (14-16).

## **2.2. Aktivnost freničkoga živca i frenički neurogram**

Aktivnost freničkoga živca (engl. *phrenic nerve activity*, PNA), smatra se zrcalnim pokazateljem zbivanja u središnjem generatoru disanja (1, 4-5, 17). Prema tome, amplituda i frekvencija PNA predstavljaju neuralne ekvivalente dišnog volumena i frekvencije disanja. Frenički neurogram je kontinuirani integrirani zapis električne aktivnosti freničkoga živca, iz kojeg se mogu uočiti promjene u ritmu i obrascu disanja (Slika 3) (5). Najvažnije varijable koje iščitavamo iz freničkoga neurograma su amplituda PNA, frekvencija disanja ( $f$ ) i vremenske faze respiracijskog ciklusa ( $T_i$  - vrijeme trajanja udisaja ili inspirija,  $T_e$  - vrijeme trajanja izdisaja ili ekspirija i  $T_{tot}$  - vrijeme trajanja cijelog respiracijskog ciklusa) (Slika 3).



**Slika 3. Prikaz aktivnosti freničkoga živca.** RPNA - neobrađena aktivnost freničkoga živca (engl. *raw phrenic nerve activity*); IPNA - integrirana aktivnost freničkoga živca (engl. *integrated phrenic nerve activity*); a.j. - arbitrarne jedinice;  $T_i$  - vrijeme trajanja udisaja ili inspirija,  $T_e$  - vrijeme trajanja izdisaja ili ekspirija,  $T_{tot}$  - vrijeme trajanja cijelog respiracijskog ciklusa. Okomita crta pokazuje početak hipoksijskog podražaja.

### 2.3. Ventilacijski odgovor na hipoksiju

Hipoksija, kao stanje smanjenog parcijalnog tlaka kisika ispod 60-65 mm Hg, prije svega u arterijskoj krvi, a posljedično u tkivima i stanicama, predstavlja snažan podražaj za disanje koji dovodi do nastanka hipoksijskog ventilacijskog odgovora (engl. *hypoxic ventilatory response*, HVR) (18-19). HVR se manifestira povećanjem dišnog volumena i frekvencije disanja (Slika 3), a posredovan je prije svega aktivacijom perifernih karotidnih kemoreceptora (18-19). Ventilacijski odgovor na hipoksiju predstavlja složen refleksi odgovor koji nastaje kao rezultat interakcije više različitih fizioloških mehanizama. Zbog toga se u analizi HVR-a uzima u obzir nekoliko važnih komponenti, kao što su obrazac i intenzitet hipoksijskog podražaja, vremenski tijek hipoksijskog odgovora (kratkoročan ili dugoročan učinak na disanje), parametri ventilacije pomoću kojih se odgovor manifestira (dišni volumen i frekvencija disanja), smjer učinka na disanje (pojačanje ili oslabljenje) i neurotransmiteri

potrebni za manifestaciju odgovora (19-20). Obrazac hipoksijskog podražaja (trajanje i kontinuitet), smatra se najvažnijim čimbenikom o kojem ovisi manifestacija hipoksijskog ventilacijskog odgovora. S obzirom na komponentu trajanja, izlaganje hipoksiji može biti kratkotrajno (akutno, 2-5 minuta) ili dugotrajno (kronično, više minuta do godina). S obzirom na komponentu kontinuiteta, izlaganje hipoksiji može biti jednokratno (kontinuirano) ili višekratno (intermitentno) (19, 21-22). Komponenta kontinuiteta hipoksijskog podražaja posebno je naglašena jer je pokazano da upravo izlaganje intermitentnim hipoksijskim epizodama, za razliku od izlaganja kontinuiranoj hipoksiji jednakog ukupnog trajanja, dovodi do pojave dugoročnog pojačanja disanja (14, 21-23).

### **2.3.1. Izlaganje kratkotrajnoj hipoksiji**

Jednokratno izlaganje kratkotrajnoj hipoksijskoj epizodi dovodi do hipoksijskog ventilacijskog odgovora koji se temelji na tri mehanizma: akutnom odgovoru, kratkotrajnom pojačanju (potenciranju) i kratkotrajnom oslabljenju (depresiji) (19, 24). Akutni odgovor (engl. *acute response*, AR), manifestira se trenutnim pojačanjem ventilacije nakon nastupa hipoksije i trenutnim prestankom odgovora nakon prestanka izlaganja hipoksiji. Ovako brz slijed događaja (brza komponenta, trajanja oko 2-6 s), posljedica je prije svega aktivacije perifernih karotidnih kemoreceptora. Kratkotrajno pojačanje (engl. *short term potentiation*, STP), podrazumijeva daljnje povećanje ventilacije nakon akutnog odgovora (sporija komponenta, trajanja oko 60-120 s) i smatra se posljedicom središnje neuromodulacije kemoreceptorskog odgovora. Kratkotrajno oslabljenje (engl. *short term depression*, STD), očituje se naglim i prolaznim povećanjem frekvencije disanja na početku izlaganja hipoksiji ili stimulaciji živca karotidnog sinusa i prolaznim kratkotrajnim smanjenjem frekvencije nakon završetka podražaja, a primjećena je uglavnom kod anesteziranih štakora (19, 24).

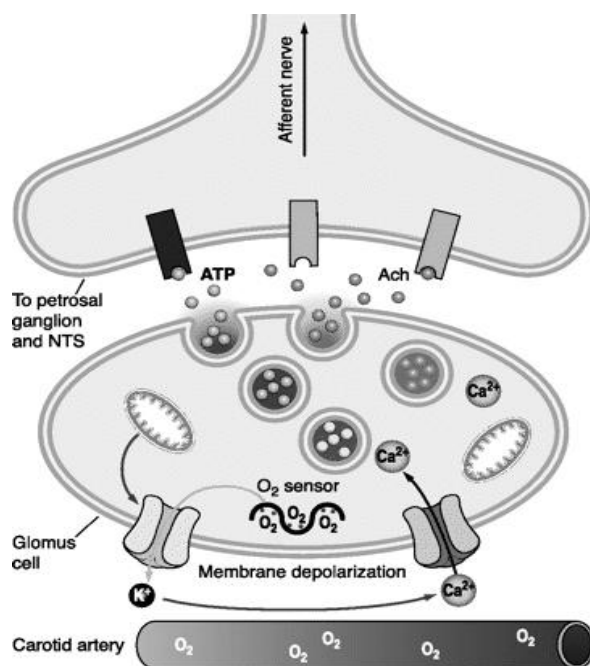
Karotidni kemoreceptori počinju reagirati kada se parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi snizi ispod 100 mmHg, a značajna aktivnost pojavljuje se prilikom smanjenja  $P_aO_2$  ispod 60-65 mmHg (11, 18). Karotidni kemoreceptori smješteni su na račvištima zajedničkih karotidnih arterija s ciljem brzog i učinkovitog zamjećivanja nedostatne opskrbe mozga kisikom. Građeni su od dva tipa stanica. *Stanice tipa I* nazivaju se glomus stanicama i prema dosadašnjim istraživanjima glavno su osjetilno mjesto za kisik (10). *Stanice tipa II* nazivaju se sustentakularnim ili potpornim stanicama i slične su glijalnim stanicama u moždanom tkivu. Način na koji karotidni kemoreceptori registriraju promjene u parcijalnom tlaku kisika u krvi kao i prijenos aferentnih signala još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoji više teorija o načinu kako se u karotidnim tjelešcima registrira niska razina  $P_aO_2$ . Dosadašnja saznanja upućuju na transdukcijsku aktivnost na nivou kemoreceptora u glomus stanicama tipa I. Smanjenje  $PaO_2$  zamjećuju tzv. primarni senzori za kisik, čija točna struktura i lokalizacija još uvijek nije poznata. Pretpostavlja se da bi za raspoznavanje manjka kisika mogli biti odgovorni membranski i/ili mitohondrijski proteini koji sadržavaju hem (11, 25). Informacije o smanjenoj razini kisika vrlo brzo se prenose do  $O_2$ -senzitivnih membranskih kalijevih kanala (Slika 4). Temeljni mehanizam podrazumijeva hipoksijom izazvano zatvaranje kalijevih kanala što dovodi do depolarizacije stanice s posljedičnim ulaskom kalcijevih iona i oslobađanjem odgovarajućih neurotransmitera (uglavnom acetilkolina i ATP-a) (10-11, 25). Podražaj se dalje prenosi kao živčani signal aferentnim završetcima živca karotidnog sinusa (CSN, engl. *carotid sinus nerve*), ogranaka IX. moždanog živca, čiji središnji aksoni završavaju u području *nucleus tractus solitarii* (NTS) unutar moždanog debla. Iz NTS odlaze brojne projekcije prema respiracijskoj kontrolnoj neuronskoj mreži (1, 25). Poznato je da hipoksijski podražaj djeluje i u određenim dijelovima središnjeg živčanog sustava (SŽS), gdje postoje centralna kemoreceptorska mjesta osjetljiva na promjene  $PO_2$ . Uglavnom se nalaze u talamusu, hipotalamusu i moždanom deblu, formirajući tzv. kemoreceptorsku mrežu za kisik

(engl. *oxygen-chemosensitive network*). Ova mjesta pobuđena hipoksijom dovode do pojačanja respiracijske i simpatičke aktivnosti (26-27).

### **2.3.2. Izlaganje višekratnim hipoksijskim epizodama**

Višekratno izlaganje hipoksiji sastoji se od slijeda ponavljanih hipoksijskih epizoda, međusobno odvojenih razdobljima normoksije ili hiperoksije. U literaturi se takva vrsta podražaja naziva intermitentna hipoksija (engl. *intermittent hypoxia*, IH) (19, 21-22, 28). U okviru različitih hipoksijskih protokola ponavljane hipoksijske epizode variraju po trajanju, broju i ukupnom vremenu izloženosti hipoksiji. Najčešća su dva tipa IH, akutna intermitentna hypoxia (engl. *acute intermittent hypoxia*, AIH) i kronična intermitentna hipoksija (engl. *chronic intermittent hypoxia*, CIH) (19, 21). Za razliku od trajne (kontinuirane) hipoksije jednakog ukupnog trajanja, izlaganje slijedu ponavljanih hipoksija može dovesti do nastanka dugoročnog pojačanja disanja ukazujući na razvoj fenomena plastičnosti u respiracijskom kontrolnom sustavu (14, 21-23). U ovoj studiji, za ispitivanje pojave dugoročne facilitacije freničkoga živca (engl. *phrenic long term facilitation*, pLTF), korišten je model akutne intermitentne hipoksije.

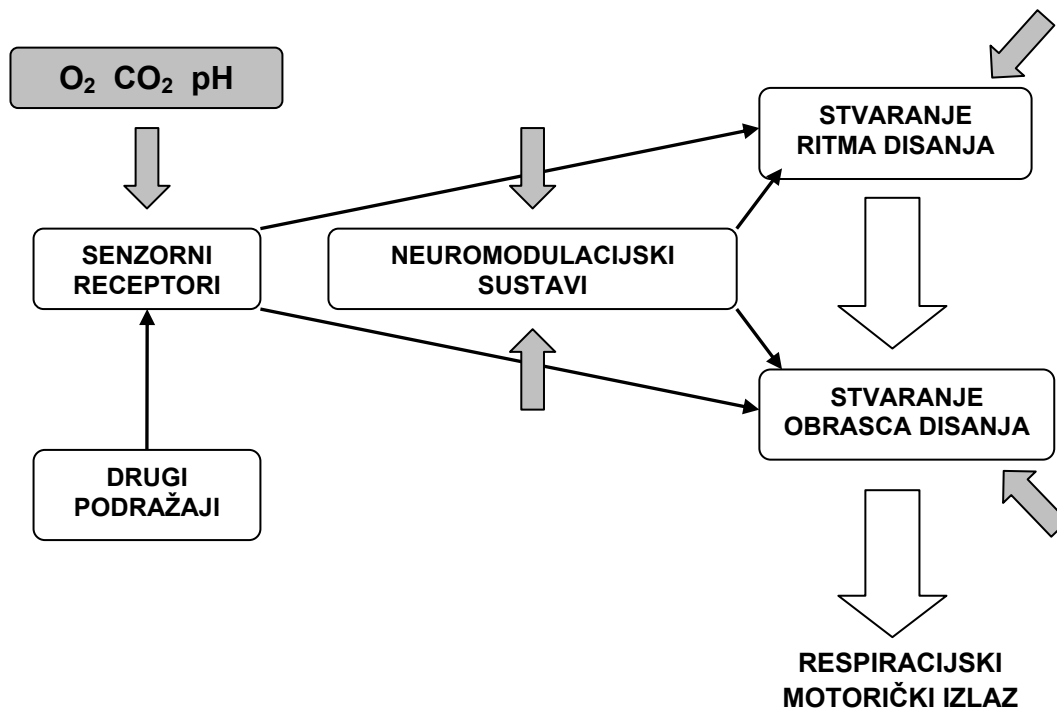




**Slika 4. Transdukcijska kaskada signala u glomus stanicama tipa I uzrokovana nastupom hipoksije.** Smanjenje PaO<sub>2</sub> registriraju tzv. primarni senzori za kisik koji vrlo brzo prenose informaciju do kalijevih kanala što dovodi do njihova zatvaranja. Zatvaranje kalijevih kanala rezultira depolarizacijom stanice, posljedičnim ulaskom kalcijevih iona i oslobađanjem odgovarajućih neurotransmitera, primarno acetilkolina i ATP-a. Podražaj se dalje prenosi kao živčani signal aferentnim završecima živca karotidnog sinusa do *nucleus tractus solitarii* (NTS) unutar moždanog debla. (Preuzeto iz Teppema LJ, Dahan A. *Physiol Rev* 2010;90:675-754. - slika kao u izvorniku).

#### 2.4. Respiracijska plastičnost i dugoročno pojačanje disanja

Respiracijski kontrolni sustav, kao dio središnjeg živčanog sustava, posjeduje temeljno svojstvo plastičnosti. Respiracijska plastičnost očituje se kao dugotrajna promjena ritma i obrasca disanja i nakon prestanka djelovanja određenog podražaja kao što je npr. hipoksija, a može ju potaknuti i hiperkapnija, stres ili ozljeda (14, 21). Temelji se na funkcionalnim i/ili strukturnim promjenama stanično-molekularnih i sinaptičkih mehanizama na različitim mjestima unutar respiracijskog kontrolnog sustava (Slika 5).



**Slika 5. Prikaz potencijalnih mjesta razvoja plastičnosti u respiracijskom kontrolnom sustavu.** Respiracijski ritam stvaraju respiracijski neuroni u ventralnoj meduli i prenose ga neuronima u moždanom deblu i leđnoj moždini koji su odgovorni za formiranje obrasca disanja. Stvaranje ritma i obrasca disanja usklađuje se s informacijama iz neuromodulacijskih sustava i s različitih receptora. Na respiracijski kontrolni sustav mogu utjecati informacije iz viših centara (korteksa) i direktni utjecaji kisika, ugljičnog dioksida i pH (sive strelice). Plastičnost se može pojaviti na jednom ili na više mjesta, a najčešće je potaknuta od strane senzornih receptora i neuromodulacijskih sustava. (Modificirano prema slici iz Mitchell GS, Johnson SM. J Appl Physiol 2003;94:358-74).

Jedan od najvažnijih primjera respiracijske plastičnosti je dugoročno pojačanje disanja (engl. *long term facillitation*, LTF), izazvano intermitentnom hipoksijom. LTF se može izazvati kod više različitih živaca, kao što su frenički, hipoglosalni ili interkostalni motoneuroni, koji inerviraju odgovarajuće respiracijske mišiće (29-30). Najčešće istraživani oblik respiracijskog LTF-a je dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. *phrenic long term facillitation*, pLTF), koja se očituje kao povećanje freničkoga motoričkog odgovora nakon višestrukog izlaganja kratkotrajnim ponavljanim hipoksijskim epizodama (14, 21-22, 29). LTF motornih neurona koji pokreću glavne inspiracijske mišiće (freničkoga živca koji

pokreće dijafragmu i interkostalnih živaca koji pokreću interkostalne mišiće), rezultira izravnim povećanjem ventilacije, tako da se može govoriti o ventilacijskom LTF-u (vLTF) (21, 31). LTF koji se očituje na motornim neuronima hipoglosalnog živca (XII. kranijalni živac), koji inervira mišiće jezika, dovodi do promjene otpora gornjeg dišnog puta, povećava inspiracijski protok i na taj način olakšava i povećava ventilaciju (32-34).

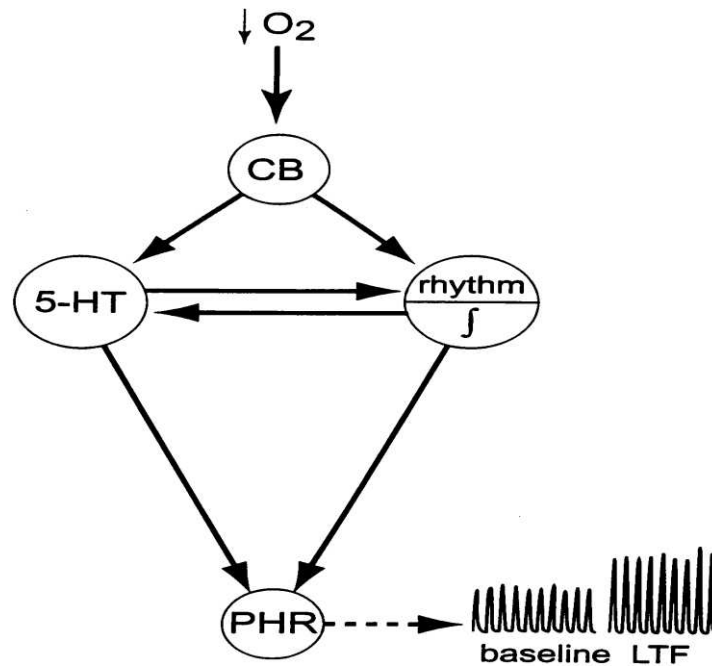
Poseban oblik respiracijske plastičnosti razvija se kod izlaganja kroničnoj intermitentnoj hipoksiji (CIH), tj. velikom broju epizoda intermitentne hipoksije s normoksijskim pauzama, kroz nekoliko sati dnevno, tijekom više dana, što dovodi do značajno dugotrajnijeg oblika respiracijske plastičnosti (35). Radi se o tzv. metaplastičnosti, fenomenu koji podrazumijeva pojačanje osnovnog svojstva plastičnosti nakon kondicioniranja, tj. prethodnog izlaganja dugotrajnijem kroničnom podražaju (14, 35-37). U skladu s tim pokazano je da izlaganje kroničnoj intermitentnoj hipoksiji značajno pojačava hipoksijski ventilacijski odgovor na akutnu hipoksiju i pLTF u štakora (35). Pretpostavlja se da ovi učinci nastaju zbog pojačane središnje živčane integracije karotidnih kemoafherentnih impulsa ili pojačanja temeljne karotidne kemoafherentne aktivnosti (35, 38).

### 2.4.1. Predloženi mehanizam nastanka pLTF-a

pLTF je složen, o tipu podražaja i o serotoninu ovisan, središnji neuralni mehanizam, izazvan ponavljanom hipoksijom ili ponavljanim podraživanjem živca karotidnog sinusa (14, 21, 39). Millhorn i sur. prvi su 1980. godine opisali fenomen pLTF-a, tada imenovan pojmom dugotrajne potencijacije (engl. *long-term potentiation*, LTP). Višekratno su električki podraživali živac karotidnog sinusa na anesteziranim i vagotomiziranim mačkama i primjetili povećanu inspiracijsku aktivnost freničkoga živca više od 90 min nakon zadnjeg podražaja u odnosu na bazalne vrijednosti. Povećana aktivnost manifestirala se povećanjem amplitude freničkoga živca, a u manjoj mjeri i povećanjem frekvencije (40). Sličan fenomen primjećen je i nakon izlaganja akutnim ponavljanim hipoksijskim epizodama, što je potvrđeno u brojnim studijama i to uglavnom na anesteziranim štakorima (23, 32, 39, 41). Izlaganje akutnoj ponavljanoj hipoksiji tako postaje temelj većine eksperimentalnih protokola za proučavanje fenomena pLTF-a, s varijacijama u broju i trajanju hipoksijskih epizoda (22, 42). Pokazano je da jedino ponavljana, a ne trajna hipoksija jednakog ukupnog trajanja, uspijeva izazvati pojavu pLTF-a (23). Nedugo nakon otkrića fenomena LTF-a, pokazano je da metisergid, antagonist 5-HT receptora širokog spektra, spriječava nastanak LTF-a u mačaka (43). Naknadno je ustanovljeno da ketanserin, selektivni antagonist 5-HT<sub>2</sub> serotoninskih receptora, spriječava nastanak LTF-a u štakora (41, 42, 44). Kako se u navedenim studijama primjenjivalo intravensko davanje antagonista pokušalo se s njihovom intratekalnom primjenom s ciljem razlučivanja točnog mjesta djelovanja serotonina (45). Intratekalna primjena 5-HT antagonista na razini korijena C4 značajno je oslabila ili čak ugasila pLTF, čime je pokazano da se 5-HT receptori, bitni za nastanak pLTF-a, nalaze na ili blizu jezgara freničkoga motoneurona (45). Nadalje, pokazano je da vrlo važnu ulogu u manifestaciji pLTF-a imaju i NMDA (N-metil-D-aspartat) glutamatni receptori, s obzirom da se pLTF ugasio nakon davanja NMDA antagonista (MK-801) kod anesteziranih i neanesteziranih

štakora (46). Slijedom navedenih istraživanja utvrđeno je da u nastanku pLTF-a ključnu ulogu ima neurotransmiter serotonin za kojega se pretpostavlja da neuromodulacijskim učincima djeluje na područje silazne bulbospinalne glutamatne sinapse između respiracijskih premotoneurona i freničkoga motoneurona (6, 21, 43). Također je zaključeno da je aktivacija 5-HT<sub>2</sub> vrste serotoninских receptora na spinalnoj razini ključna u započinjanju pLTF-a, dok je aktivacija glutamatnih receptora potrebna za njegovo održavanje (21, 44-46). Nedavno je pokazano da je aktivacija serotoninских receptora i na supraspinalnoj razini potrebna za započinjanje pLTF-a (47). Također, u nedavnom radu Pavlinac i sur. istaknuta je važnost, za sada barem jedne vrste serotoninских receptora (5-HT<sub>1A</sub>), ne samo u započinjanju nego i u održavanju pLTF-a (48). Ista skupina autora nedavno je dodatno naglasila važnost serotoninских 5-HT<sub>1A</sub> receptora u započinjanju pLTF-a na supraspinalnoj razini (49). Osim serotoninškog sustava, novija istraživanja pokazala su važnost aktivacije i noradrenalinskog neuromodulacijskog sustava ( $\alpha_1$ -adrenergičnih receptora) u manifestaciji respiracijskog LTF-a (u ovom slučaju hipoglosalnog živca), zbog čega je zaključeno da je aktivacija i integracija oba neuromodulacijska sustava (serotoninškog i noradrenalinskog), potrebna za manifestaciju respiracijskog LTF-a nakon izlaganja ponavljanoj hipoksiji (50).

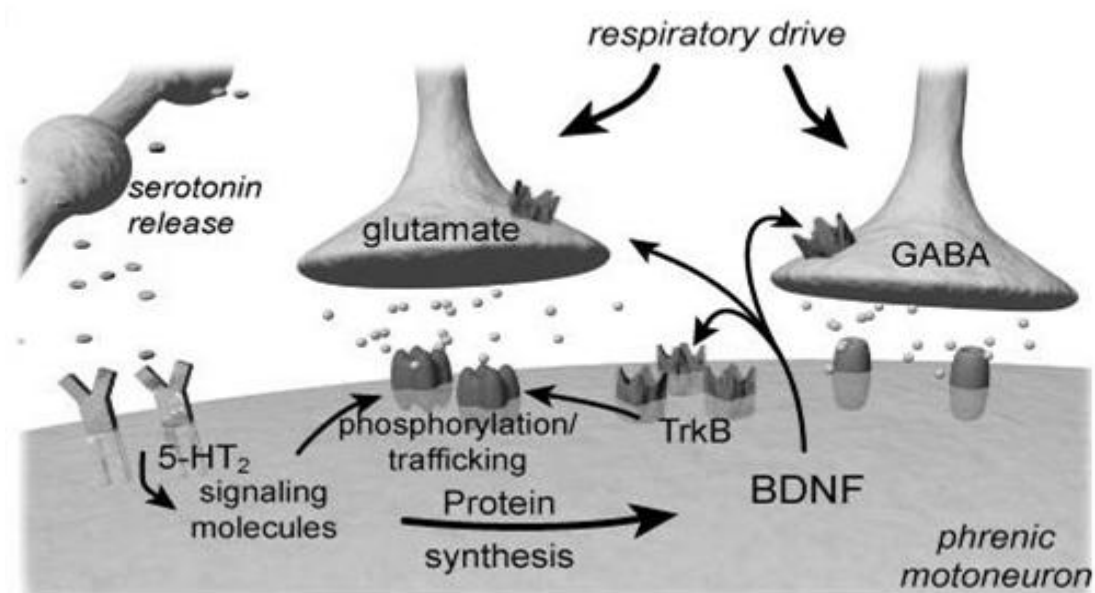
Na sinaptičkoj i stanično-molekularnoj razini, predloženim mehanizmom nastanka pLTF-a pokušava se objasniti složen slijed događaja koji u fiziološkim uvjetima započinje aktivacijom perifernih kemoreceptora u karotidnim tjelešcima ponavljanim hipoksijskim epizodama. Impulsi se dalje kemoferentnim neuronima prenose do medularnih respiracijskih neurona odgovornih za stvaranje temeljnog ritma i obrasca disanja i izravno ili neizravno (preko medularnih neurona) do raphe jezgara u moždanom deblu iz kojih se naposljetku oslobađa serotonin (28) (Slika 6).



**Slika 6. Predloženi mehanizam nastanka pLTF-a.** Kemoreceptori u karotidnim tjelešcima (CB) (engl. *carotid body*), su aktivirani ponavljanom hipoksijom. Impulsi se dalje prenose do respiracijskih neurona odgovornih za stvaranje temeljnog ritma disanja (*rhythm*) i do raphe jezgara (5-HT) u moždanom deblu. Iz raphe jezgara oslobađa se serotonin u blizini jezgara freničkog motoneurona u kralježničnoj moždini (PHR) (engl. *phrenic*) i pojačava frenički odgovor na glavni ekscitacijski neurotransmiter glutamat, oslobođen iz respiracijskih premotoneurona. Iz prikazanog modela vidi se da je za manifestaciju pLTF-a potrebno ponavljano oslobađanje serotonina i to u blizini freničkoga motoneurona na spinalnoj razini. Međutim, ne mogu se isključiti i dodatni neuromodulacijski učinci serotonina na supraspinalnoj razini. (Preuzeto iz Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. *Respir Physiol* 2000;121:135-46. - slika kao u izvorniku).

Serotonin vezanjem na 5-HT<sub>2</sub> serotoninске receptore smještene u blizini ili na freničkom motoneuronu, započinje kaskadu kompleksnih unutarstaničnih događaja (Slika 7). Dolazi do aktivacije protein-kinaze C (PKC) i posljedične sinteze novih proteina od kojih je najvažniji BDNF (engl. *brain derived neurothropic factor*). Pokazano je da je BDNF ključan čimbenik u manifestaciji serotoniniski-ovisnog pLTF-a, a poznato je da sudjeluje i u drugim oblicima sinaptičke plastičnosti. Primjećeno je da se tijekom izlaganja hipoksiji povećava

njegova koncentracija u kralježničnoj moždini, pogotovo u blizini jezgara freničkoga motoneurona. BDNF preko receptora tirozin-kinaza B (TrkB) dovodi do fosforilacije i posljedične aktivacije više različitih kinaza (51). Istodobno dolazi i do aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADP) oksidaze i produkcije slobodnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (52). Novija istraživanja pokazuju važnu ulogu ROS u freničkom i hipoglosalnom LTF-u, prije svega zbog inhibicije proteinskih fosfataza koje prirodno ograničavaju LTF, mada njihova uloga u fenomenu LTF-a nije u potpunosti razjašnjena (53-54). Konačni rezultat je prevaga kinaznih učinaka, tj. procesa fosforilacije i pojačavanje učinka ekscitacijske glutamatne NMDA sinapse između respiracijskih neurona u moždanom deblu i freničkoga motoneurona, uz smanjenje sinaptičke inhibicije posredovane  $\gamma$ -amino-maslačnom kiselinom (engl.  $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA). Krajnji ishod je povećanje freničkoga motoričkog odgovora i pojačanje disanja (6, 14, 28, 45, 51).



**Slika 7. Shematski prikaz stanično-molekularnog i sinaptičkog modela pLTF-a.** Hipoksija aktivira raphe neurone dovodeći do oslobađanja serotonina u blizini freničkoga motoneurona. Serotonin aktivira 5-HT<sub>2</sub> receptore i započinje kaskadu unutarstaničnih događaja. Konačna posljedica je fosforilacija i pojačanje funkcije glutamatnih receptora tj. glutamatne sinapse koja prenosi respiracijski ritam i smanjenje GABA-om posredovanih inhibicijskih učinaka. (Preuzeto iz Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:239-66. - slika kao u izvorniku).

#### 2.4.2. Amplitudni i frekvencijski pLTF

Postojanje LTF-a dokazano je u više životinjskih vrsta u različitim eksperimentalnim protokolima. U studijama na anestetiziranim životinjama LTF se prije svega očitovao povećanjem amplitude odgovarajućih perifernih živaca (frenički živac, hipoglosalni živac, interkostalni živci), s varijabilnim učincima na frekvenciju. Nasuprot tome, istraživanja u budnih životinja pokazala su da se LTF uglavnom manifestira povećanjem frekvencije disanja, uz male i varijabilne promjene dišnog volumena. Također, LTF u budnih životinja slabijeg je intenziteta i kraćeg trajanja nego u anestetiziranih (21-21, 55-56). LTF freničkoga živca također se manifestira uglavnom povećanjem amplitude (28). Na temelju rezultata mnogih dosadašnjih istraživanja Baker-Herman i Mitchell su u svojoj opširnoj meta analizi



potvrdili postojanje i amplitudnog i frekvencijskog pLTF-a nakon izlaganja AIH protokolu, u anestetiziranih i vagotomiziranih štakora, iako je frekvencijski LTF značajno manje izražen i varijabilan. Također su utvrdili jaku korelaciju između frekvencijskog LTF-a i bazalne frekvencije disanja prije izlaganja hipoksiji, a spomenuta korelacija može biti jedan od uzroka tolike varijabilnosti u pojavnosti frekvencijskog LTF-a (55). Spoznaja o postojanju frekvencijskog i amplitudnog pLTF-a važna je zbog toga što ukazuje na mogućnost postojanja više različitih neuralnih mehanizama u manifestaciji respiracijske plastičnosti u različitim eksperimentalnim uvjetima. Ispravno bi stoga bilo govoriti o amplitudnom i/ili frekvencijskom pLTF-u (55, 57). Bez obzira na varijabilnost izražaja pLTF-a, važno je naglasiti da respiracijski kontrolni sustav posjeduje učinkovite mehanizme prilagodbe disanja koji se mogu upotrijebiti i očitovati na više različitih načina, npr. povećanjem amplitude i/ili frekvencije, s konačnim ciljem pojačanja disanja i održanja respiracijske homeostaze.

### **2.4.3. LTF u humanim studijama**

Manifestacija LTF-a u ljudi uglavnom se odnosi na povećanje respiracijske motoričke aktivnosti, prije svega minutne ventilacije (ventilacijski LTF, vLTF), ali i motoričke aktivnosti mišića genioglosusa kojeg inervira hipoglosalni živac (hipoglosalni LTF, XII LTF) (22, 58). McEvoy i sur. prvi su 1996. godine pokušali izazvati LTF u ljudi u budnom stanju izlagajući ih uzastopnim hipoksijskim epizodama (10 hipoksijskih epizoda u trajanju od 2 min s normoksijskim pauzama istog trajanja). Međutim, pokušaji izazivanja LTF-a u ljudi u budnom stanju unatoč primjeni različitih AIH protokola uglavnom nisu bili uspješni (59-60). Poslije je utvrđeno da se vLTF može izazvati u budnih ljudi, ali uz prisutnost umjerene hiperkapnije (61). Vrlo važna spoznaja bila je da se vLTF može uspješno izazvati tijekom spavanja u non-REM stadiju u ljudi s povećanim otporom gornjeg dišnog puta, tj. opstruktivskom apnejom tijekom spavanja (engl. *obstructive sleep apnea*, OSA) (62). U ljudi

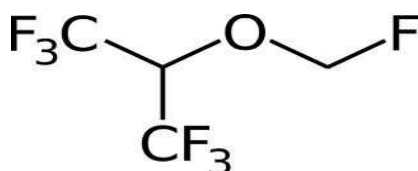
koji boluju od OSA-e, uslijed smanjenog tonusa mišića gornjeg dišnog puta (najčešće se misli na genioglosus - mišić jezika), dolazi do višekratne i uzastopne opstrukcije dišnog puta, što rezultira apnejom (potpuni zastoj disanja) i posljedičnim ponavljanim epizodama hipoksije i hiperkapnije (63-64). Duže vrijeme se mislilo da se fenomen vLTF-a tijekom spavanja u zdravih ljudi ne može izazvati (65). Međutim, istraživanja su pokazala da se i u zdravih ljudi, u kojih ne postoji ograničenje protoku zraka u gornjim dišnim putevima, uspio izazvati LTF mišića genioglosusa i vLTF u non-REM stadiju spavanja, dovodeći do značajnog porasta minutne ventilacije i smanjenog otpora gornjeg dišnog puta (58, 66). S obzirom na spoznaju da se LTF lakše izaziva u populaciji ljudi s OSA-om i to tijekom spavanja, smatra se da je njegova uloga zapravo održavanje odgovarajuće respiracije tijekom spavanja (63, 67). LTF hipoglosalnog živca rezultira povećanjem tonusa mišića genioglosusa i time olakšava održavanje dišnog puta otvorenim tijekom slijedećih apnejičkih epizoda (32). vLTF i hipoglosalni LTF prema tome predstavljaju primjer manifestacije temeljnog svojstva plastičnosti respiracijskog kontrolnog sustava u svrhu prilagođavanja određenim fiziološkim uvjetima i patofiziološkim stanjima, kao što je prilagodba disanja tijekom spavanja i sprječavanje napredovanja negativnih posljedica neprepoznate i neliječene OSA-e (63, 67).

## 2.5. Inhalacijski anestetici

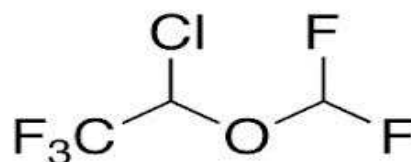
### 2.5.1. Opće postavke

Inhalacijski anestetici spadaju u skupinu općih anestetika koji se u organizam unose udisanjem. Dije se na hlapljive (halotan, enfluran, izofluran, sevofluran i desfluran) i plinovite (dušični oksidul i ksenon) (68-69). Hlapljivi (volatilni) anestetici su hlapljive tekućine, a primjenjuju se pomoću posebnih isparivača ugrađenih u anestezijske aparate. Uglavnom se koriste za uvod i održavanje opće anestezije.

Izofluran i sevofluran najčešće su primjenjivani inhalacijski anestetici u kliničkoj anesteziološkoj praksi (68). Slične su kemijske strukture (halogenirani eteri) i djelovanja. Sevofluran je potpuno fluorirani metil-izopropil eter ( $C_4H_3F_7O$ ), a izofluran halogenirani (atomima fluora i klora) metil-etil eter ( $C_3H_2ClF_5O$ ) (Slika 8).



**sevofluran**



**izofluran**

**Slika 8. Kemijska struktura sevoflurana i izoflurana.**

Zbog što vjerodostojnije usporedbe inhalacijskih anestetika, uvedena je mjera potencije ili snage anestetskog djelovanja, koja se izražava kao minimalna alveolarna koncentracija (engl. *minimal alveolar concentration*, MAC) (68, 70). Vrijednost 1 MAC definira se kao ona koncentracija inhalacijskog anestetika pri kojoj 50% anestetiziranih jedinki neće reagirati na bolni podražaj, kao što je kirurška incizija kože (68, 70). Vrijednost 1 MAC

različita je za različite inhalacijske anestetike. U ljudi 1 MAC sevoflurana iznosi oko 2.0%, a izoflurana oko 1.2% (68). MAC vrijednosti za inhalacijske anestetike korištene u ovoj studiji (sevofluran i izofluran), korigirane su, s obzirom da se istraživanje provodilo na pokusnim životinjama. Za štakore, uzeta vrijednost od 1 MAC za sevofluran iznosila je 2.40%, a za izofluran 1.46% (71-72). U istraživanju je najniža koncentracija inhalacijskih anestetika iznosila 1.4 MAC, što je bila najmanja doza kojom se postigla dovoljna dubina anestezije i postojana aktivnost freničkoga živca, kao najvažniji uvjet izvodljivosti istraživanja.

### **2.5.2. Molekularni mehanizmi djelovanja inhalacijskih anestetika**

Klinički učinci inhalacijskih anestetika na organizam dobro su poznati, međutim molekularni mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti jasni (69). Na stanično-molekularnoj razini djelovanje inhalacijskih anestetika ne može se objasniti jedinstvenim molekularnim mehanizmom, već učincima na više različitih ciljnih mjesta (69, 73). Danas je poznato da su najvažnija molekularna mjesta djelovanja inhalacijskih anestetika različiti stanični membranski receptori i ionski kanali. Među staničnim membranskim receptorima najistaknutiji su utjecaji na tzv. ligand-vezane ionotropne receptore, i to inhibicijske GABA<sub>A</sub> i glicinske receptore, te ekscitacijske glutamatne i nikotinske acetilkolinske (nACh) receptore (74-76). Djelujući prije svega na sinaptičku neuronsku transmisiju, inhalacijski anestetici pojačavaju prijenos inhibicijskih signala djelujući na neurotransmitterski sustav GABA-e i glicina (glavnih inhibicijskih neurotransmitera u SŽS-u) i smanjuju prijenos ekscitacijskih signala djelujući na glutamatnu neurotransmisiju (glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitter u SŽS-u) (69, 73, 77). Među ionskim kanalima najistaknutiji su utjecaji na voltažne Na<sup>+</sup> (natrijske) i Ca<sup>2+</sup> (kalcijske) i tzv. propusne (nevoltažne) K<sup>+</sup><sub>2P</sub> (engl. *leak two-pore*) (kalijske) kanale (74, 77-79). Pokazano je da inhalacijski anestetici djeluju i na tzv. metabotropne receptore, od kojih je najvažnija skupina metabotropnih serotoninskih

receptora, kao i na unutarstanične proteine uključene u sustav stanične signalizacije (74, 76, 80).

### **2.5.3. Učinci inhalacijskih anestetika s osvrtom na kontrolu disanja**

Poželjni učinci djelovanja inhalacijskih anestetika su oni koji nastaju kao posljedica djelovanja u SŽS-u i mogu se podijeliti na učinke na tzv. supraspinalnoj i spinalnoj razini. Supraspinalna razina podrazumijeva djelovanje u mozgu što rezultira različitim stupnjevima oduzimanja svijesti i amnezijom. Spinalna razina podrazumijeva djelovanje na razini leđne moždine što rezultira supresijom svrsishodnog refleksnog odgovora na bolni podražaj i imobilizacijskim učinkom. Također je pokazano da djelovanjem na spinalnoj razini inhalacijski anestetici smanjuju podražljivost neurona u stražnjim rogovima leđne moždine, što je mogući mehanizam njihovog antinocicepcijskog učinka (69, 73, 81-83).

Dodatni važni i uglavnom nepoželjni učinci inhalacijskih anestetika na organizam su oni na dišni i krvožilni sustav. Općenito anestezija, pa tako i inhalacijska, ima depresijski učinak na disanje (80, 84-86). Depresija disanja posljedica je sveobuhvatnog depresijskog učinka inhalacijskih anestetika na SŽS, središnju respiracijsku neuronsku mrežu, funkciju centralnih i perifernih kemoreceptora, aktivnost respiracijskih motoneurona i mišića odgovornih za disanje i održavanje stabilnosti gornjeg dišnog puta (80, 85, 87-88). U ljudi, inhalacijski anestetici smanjuju dišni volumen i povećavaju frekvenciju disanja, međutim konačni učinak je smanjenje ukupne minutne ventilacije i povećanje  $ETCO_2$  (parcijalni tlak ugljičnog dioksida na kraju izdisaja) (engl. *end-tidal*) (3, 84, 89-91). Učinak inhalacijskih anestetika na mehanizme kontrole disanja manifestira se promjenama u ritmu i obrascu disanja i ventilacijskom odgovoru na hipoksiju i hiperkapniju (3, 24, 84-85, 88, 92). Smatra se da su promjene u ritmu i obrascu disanja posljedica utjecaja inhalacijskih anestetika na respiracijske neurone u središnjem generatoru disanja, što rezultira promjenama u frekvenciji disanja i

respiracijskim parametrima, ovisno o vrsti anestetika i primjenjenoj dozi (1, 84-86, 88). U ljudi svi inhalacijski anestetici dovode do tahipneje, tj. ubrzanog disanja (čime se nadoknađuje smanjenje dišnog volumena), međutim s povećanjem koncentracije taj učinak postepeno izostaje što rezultira sve izraženijom respiracijskom depresijom. Takav učinak značajno je izražen i kod sevoflurana i kod izoflurana (89-90). Što se tiče utjecaja inhalacijskih anestetika na hipoksijski i hiperkapnijski ventilacijski odgovor, pokazano je da smanjuju oba odgovora, međutim bitna je primjenjena doza anestetika (3, 24, 91-92). Također pokazano je da inhalacijski anestetici imaju jači supresijski utjecaj na hipoksijski u odnosu na hiperkapnijski ventilacijski odgovor (1, 24, 93-95).

Većina anestetika koji se koriste u općoj anesteziji ima značajan utjecaj na kontrolu disanja. Zbog boljeg razumijevanja njihovog utjecaja, kontrola disanja dijeli se na dvije komponente, kemijsku i bihevioralnu (92, 95). Kemijska ili metabolička komponenta povezana je s kemijskim sastavom krvi i moždanog tkiva, prije svega pH,  $PCO_2$  i  $PO_2$ . Može se reći da je automatska (ne uključuje svijest) i prema tome je dominantna tijekom anestezije i non-REM stadija spavanja. Posredovana je središnjim i perifernim kemoreceptorima i testira se mjerenjem ventilacijskog odgovora na hipoksiju i/ili hiperkapniju. Bihevioralna komponenta važna je za prilagođavanje disanja različitim životnim situacijama i stanjima, kao što su budnost, govor, fizički napor, stres, bol i dr. (95). Adekvatna funkcija i međusobna složena interakcija dviju komponenti kontrole disanja temelj je održavanja respiracijske homeostaze. Pokazano je da inhalacijski anestetici mogu djelovati na obje komponente kontrole disanja, međutim primaran je njihov utjecaj na razini perifernih kemoreceptora (84, 91-92, 95-96).

U eksperimentalnih životinja inhalacijski anestetici imaju sličan depresijski učinak na bazalnu ventilaciju i ventilacijski odgovor na hipoksiju i hiperkapniju, s varijabilnim učincima

na frekvenciju disanja, ovisno o vrsti pokusnih životinja, eksperimentalnom protokolu i primjenjenoj dozi (24, 80, 86, 97-98).

Općenito depresija disanja izazvana inhalacijskim anestheticima najviše ovisi o dozi (koncentraciji), uključujući i ventilacijski odgovor na hipoksiju i hiperkapniju (84, 92-94, 96-98). Značajna depresija disanja javlja se pri koncentracijama većim od 1 MAC (84, 88, 91, 98). Akutni ventilacijski odgovor na hipoksiju osjetljiviji je od bazalnog disanja na učinak inhalacijskih anestetika, tako da može biti značajno deprimiran i pri subanestetskim koncentracijama (0.1-0.2 MAC), pogotovo u ljudi (u prosjeku oko 30-50%). Sjögren i sur. pokazali su da i pri anestetskim dozama inhalacijskih anestetika HVR može biti očuvan, mada također značajno deprimiran (99-100). Za razliku od ljudi pokazano je da je HVR u životinja manje osjetljiv na utjecaj inhalacijskih anestetika, tako da pri anestetskim koncentracijama od oko 0.7 MAC, depresija iznosi u prosjeku oko 24% (93, 101-102).

Možemo vidjeti da su dosadašnja brojna istraživanja pokazala promjenjiv utjecaj inhalacijskih anestetika na akutni hipoksijski ventilacijski odgovor u ljudi i životinja. Pokazano je da utjecaj inhalacijskih anestetika na akutni hipoksijski ventilacijski odgovor najviše ovisi o vrsti i dozi anestetika, a pri subanestetskim dozama i o prisutnosti određenih vanjskih podražaja čime se manifestira utjecaj i bihevioralne komponente u kontroli disanja. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja čini se da postoje kvantitativne i kvalitativne razlike između pojedinih inhalacijskih anestetika u odnosu na HVR (92-93, 95-96, 101, 103). Pandit i sur. ustanovili su da u ljudi sevofluran smanjuje HVR u manjoj mjeri u odnosu na halotan i izofluran, a slično je pokazano i za desfluran (104-105). Karanovic i sur. pokazali su sličan rezultat za halotan, izofluran i sevofluran u štakora (98). U svojim preglednim člancima Pandit upućuje na važnost uvjeta u kojima se HVR ispituje, pogotovo kod subanestetskih doza, kao što su razina  $PCO_2$ , stanje budnosti i audiovizualna ili bolna stimulacija (93, 96). Pokazano je da kod izoflurana, pri subanestetskim dozama, audiovizualna stimulacija dovodi

do oporavka suprimiranog HVR-a (106). Isti učinak nije se uspio postići kod subanestetskih doza sevoflurana, međutim radilo se o bolnoj stimulaciji, što upućuje na razlike između ova dva podražaja i/ili između dva anestetika (107). Dosadašnja istraživanja očito ukazuju na postojanje različitih utjecaja inhalacijskih anestetika na složenu interakciju između stanja budnosti i drugih vanjskih podražaja (bihevioralna komponenta) i funkcije perifernih i centralnih kemoreceptora (kemijska komponentna) u kontroli disanja (95, 101, 103).

#### **2.5.4. Utjecaj inhalacijskih anestetika na fenomen plastičnosti**

Iako do sada nije istraživani utjecaj inhalacijskih anestetika na razvoj respiracijske plastičnosti, zanimljivo je da je pokazan njihov supresijski utjecaj na manifestaciju drugih oblika neuralne plastičnosti, kao što je fenomen hipokampalnog LTP-a (engl. *long term plasticity*). LTP je posljedica trajnog povećanja neuralnog sinaptičkog prijenosa uslijed učestale aktivnosti određene sinapse i zapravo predstavlja stanični model učenja i pamćenja (108). Sevofluran i izofluran su, ovisno o primjenjenoj dozi, djelovali inhibirajuće na sinaptičku plastičnost, a u većim dozama blokirali hipokampalni LTP (80, 109-111).

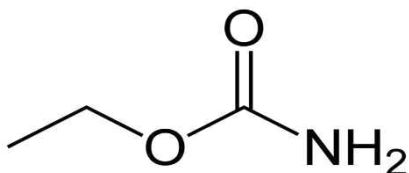
#### **2.6. Ostali anestetici**

Pokazano je da većina anestetika koji se koriste u općoj anesteziji značajno utječe na respiracijski sustav i mehanizme kontrole disanja. Većina intravenskih anestetika, kao što su barbiturati, propofol i opioidni analgetici, slično kao i inhalacijski anestetici, dovodi do respiracijske depresije i suprimira ventilacijski odgovor na hipoksiju i hiperkapniju (1, 84-85, 88, 95, 112-113). S obzirom na depresijski utjecaj i na SŽS i na respiraciju, pretpostavlja se da različiti anestetici i drugi lijekovi koji se koriste u svakodnevnoj anesteziološkoj praksi mogu imati utjecaj i na manifestaciju pLTF-a, međutim do sada je to dokazano jedino za intravenski opći anestetik propofol i opioidni analgetik remifentanil, koji sprječavaju nastanak



pLTF-a u modelu koji je istovjetan modelu upotrijebljenom u ovoj studiji (model uretanski anesteziranog, mehanički ventiliranog i obostrano vagotomiziranog štakora izloženog AIH protokolu) (22, 112-113).

Uretan (etil karbamat) se zbog potencijalne toksičnosti ne koristi kao anestetik u ljudi. Međutim, pogodan je opći anestetik za laboratorijske životinje zbog optimalnog i dugotrajnog učinka kirurške anestezije, širokog raspona sigurnosti, višestrukih puteva primjene i minimalnih utjecaja na cirkulaciju i disanje (Slika 9). Pouzdano se koristi kao anestetik za ispitivanje funkcije SŽS-a, respiracijske neuralne aktivnosti i mehanizama kontrole disanja u pokusnih životinja. Također u istraživanjima o potencijalnom utjecaju drugih anestetika na razvoj respiracijske plastičnosti, prikladan je za usporedbu, jer osim minimalnog utjecaja na disanje i kardiovaskularni sustav, nema interakcije sa serotoninimskim i GABA-ergičkim sustavom (80, 112, 114).



**uretana (etil-karbamat)**

**Slika 9. Kemijska struktura uretana.**

### 3. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

U okviru teme predložene doktorske disertacije istraživano je djelovanje monoanestezije inhalacijskim anestheticima sevofluranom i izofluranom na dugoročno pojačanje disanja u modelu akutnih ponavljanih hipoksija, praćeno promjenama aktivnosti freničkoga živca u štakora.

Sevofluran i izofluran najčešće su korišteni inhalacijski anestetici u svakodnevnoj anesteziološkoj praksi (68). Iako postoje brojna istraživanja o utjecaju inhalacijskih anestetika na disanje, akutni hipoksijski i hiperkapnijski odgovor, do sada nije istraživan njihov utjecaj na razvoj respiracijske plastičnosti i pojavu dugoročnog pojačanja disanja. U ovom istraživanju, osim utjecaja na manifestaciju respiracijske plastičnosti, pratili smo učinke sevoflurana i izoflurana i na druge važne komponente disanja, a to su ritam i obrazac disanja i hipoksijski ventilacijski odgovor. Poznato je da je očuvan HVR pouzdan prediktor razvoja pLTF-a (28, 55). U planiranju ovog istraživanja bilo je za pretpostaviti da će inhalacijski anestetici spriječiti pojavu pLTF-a, pogotovo zbog toga što je u nedavnom istraživanju naše istraživačke skupine pokazan njihov depresijski učinak na disanje i hipoksijski ventilacijski odgovor (98). Pretpostavci doprinosi i spoznaja o njihovom suprimirajućem učinku na fenomen LTP-a, jednog od oblika neuralne plastičnosti (111).

Istraživanje utjecaja inhalacijskih anestetika na disanje i izlaganje hipoksiji u animalnim i humanim studijama najčešće je izvođeno u subanestetskim dozama, dok su animalne studije često rađene kao *in vitro* studije (22). Karanović i sur. prvi su primjenili anestetske doze tri inhalacijska anestetika (halotan, izofluran i sevofluran) u istraživanju njihovog utjecaja na HVR i dokazali supresiju HVR-a u štakora (98). Naše istraživanje provedeno je na štakorima anesteziranim sevofluranom ili izofluranom. Primjenjena doza od 1.4 MAC određena je kao najniža moguća anestetska doza u štakora koja je omogućavala etičko i nesmetano provođenje kirurških postupaka i eksperimentalnog protokola, u skladu s prethodnim istraživanjima i spomenutom studijom Karanovića i sur. (71-72, 98). Životinje su

bile izložene podražaju akutnih ponavljanih hipoksija uz kontinuirano snimanje aktivnosti freničkoga živca. Najčešće korišten model za proučavanje respiracijske plastičnosti i pLTF-a je Sprague-Dawley štakor anesteziran uretanom, vagotomiziran, paraliziran i mehanički ventiliran (22, 112, 115). Poznato je da uporaba neuromišićnih relaksansa može rezultirati promjenom HVR-a blokadom nikotinskih acetilkolinskih receptora u karotidnim tjelešcima, zbog čega smo izbjegli uporabu mišićnih relaksansa u ovoj studiji (85, 116-117).

Zaključno, u ovoj studiji ispitivani inhalacijski anestetici (sevofluran i izofluran), primjenjeni su u anestetskoj dozi od 1.4 MAC, bez uporabe mišićnih relaksansa, u izokapniji, s ciljem istraživanja utjecaja samo pojedinog ispitivanog inhalacijskog anestetika na aktivnost freničkoga živca u istraživanju respiracijske plastičnosti.

### **3.1. Ciljevi istraživanja i hipoteze**

Ciljevi istraživanja bili su:

Utvrđiti utječe li inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom na pojavu dugoročne facilitacije freničkoga živca u štakora u modelu akutnih ponavljanih hipoksija.

Ispitati postoje li razlike u hipoksijskom ventilacijskom odgovoru i pLTF-u u životinja u kojih je primijenjena monoanestezija uretanom, sevofluranom ili izofluranom.

Ispitati postoje li razlike u ritmu i obrascu aktivnosti freničkoga živca u životinja anesteziranih uretanom, sevofluranom ili izofluranom u definiranim vremenskim točkama pokusa.

Na temelju navedenog formirane su očekivane spoznaje istraživanja izražene u obliku hipoteza koje glase:

Hipoteza 1.

Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom u koncentraciji od 1.4 MAC spriječit će nastanak pLTF-a u štakora u modelu akutnih ponavljanih hipoksija.

Hipoteza 2.

Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom smanjit će HVR u odnosu na uretansku (kontrolnu) monoanesteziju.

Hipoteza 3.

Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom uzrokovat će promjenu ritma i obrasca disanja u odnosu na uretansku (kontrolnu) monoanesteziju.

### **3.2. Ustroj i ishod istraživanja**

Istraživanje je bilo eksperimentalno, temeljno i intervencijsko. Provedeno je na pokusnim životinjama, štakorima soja Sprague-Dawley, koji su bili anestetizirani, obostrano vagotomizirani i mehanički ventilirani. Formirale su se dvije pokusne skupine, u kojima je primjenjena inhalacijska monoanestezija sevofluranom ili izofluranom i jedna kontrolna skupina, u kojoj je primjenjena uretanska monoanestezija. U sve tri skupine, pokusne životinje bile su izložene istom AIH protokolu od 5 hipoksijskih epizoda, nakon kojeg se nastavilo s praćenjem aktivnosti freničkoga živca (freničkoga neurograma) i srednjeg arterijskog tlaka u slijedećim vremenskim točkama - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

Analiza podataka izvršena je ukupno u 9 vremenskih točaka:

- bazalnoj (početnoj) vremenskoj točki - prije prve hipoksijske epizode (T0), tj. prije početka AIH protokola
- tijekom pet hipoksijskih epizoda (TH1-TH5)
- nakon završetka AIH protokola - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode (T15, T30 i T60)

U točki T60 procjenjivala se moguća pojava pLTF-a.

U svim skupinama u navedenim vremenskim točkama analizirana je:

- vršna amplituda aktivnosti freničkoga živca (pPNA, engl. *peak PNA*) - izražena kao postotak promjene u odnosu na bazalnu vrijednost
- frekvencija disanja (f) - izražena kao broj udisaja/min
- respiracijski parametri - izraženi u sekundama
  - vremensko trajanje udisaja ili inspirija (Ti)
  - vremensko trajanje izdisaja ili ekspirija (Te)
  - vremensko trajanje cijelog respiracijskog ciklusa (Ttot)
- vrijednost srednjeg arterijskog tlaka (engl. *mean arterial pressure*, MAP) - izražena u mmHg

U vremenskim točkama T0, T15, T30 i T60 dodatno su analizirane vrijednosti parcijalnih tlakova ugljičnog dioksida i kisika u arterijskoj krvi ( $\text{PaCO}_2$  i  $\text{PaO}_2$  izraženi u mmHg) i acidobazni status arterijske krvi (pH).

## **4. METODE ISTRAŽIVANJA**

### **4.1. Pokusne životinje**

Pokusi su provodeni na štakorima, odraslim mužjacima soja Sprague-Dawley, starosti 3 mjeseca, tjelesne mase 300-350 g, iz Nastambe za životinje Medicinskog fakulteta u Splitu. Usljed zahtjevnih kirurških postupaka tijekom istraživanja provedena je pilot studija u svrhu testiranja primjene sevofluranske i izofluranske monoanestezije, određivanja apnejičkog praga i izvedivosti unaprijed definiranog hipoksijskog protokola. U ovoj disertaciji analizirani su rezultati dobiveni iz pokusa na ukupno 25 životinja, razvrstanih u tri skupine, kontrolnu uretansku (N=6) i dvije pokusne, sevofluransku (N=9) i izofluransku (N=10). Kako bi se isključio negativan učinak inhalacijskih anestetika na stabilnost disanja u anestetiziranih životinja, za oba inhalacijska anestetika učinjene su i vremenske kontrole (engl. *time control*), koje su se od pokusne skupine razlikovale po tome što nisu bile izložene AIH protokolu. U adekvatnoj pripremi pomogla su nam prethodna istraživanja iz Laboratorija za temeljnu neuroznanost u kojima se koristio isti životinjski model i isti ili vrlo sličan eksperimentalni protokol (48, 98, 112).

### **4.2. Postupci**

Postupci su podrazumijevali uvod u anesteziju i održavanje iste, niz kirurških zahvata, uzorkovanje krvi, snimanje signala freničkoga živca, provođenje hipoksijskog protokola i obradu dobivenih rezultata. Shematski su prikazani u dijagramu tjeka istraživanja (Slika 10).

#### **4.2.1. Anestezija, kanulacija traheje i ventilacija**

U svim skupinama provodila se monoanestezija određenim anestetikom. Dubina anestezije provjeravala se testom izostanka reakcije na bolni podražaj stiskanja šapice životinje.

U kontrolnoj skupini životinje su bile anestezirane 20% uretanom primjenjenim intraperitonealno, injekcijom (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), u dozi od 1.2 g/kg, a po potrebi su primjenjene dodatne doze od 0.2 g/kg.

U pokusnim skupinama životinje su bile anestezirane sevofluranom ili izofluranom (Sevorane, Isoflurane, Abbott, Chicago, Illinois, SAD), u koncentracijama između 1.4-3 MAC (za sevofluran 3.4%-7.2%, za izofluran 2.1%-4.4%). Uvod u anesteziju započeo je stavljanjem životinje u staklenu komoru volumena 4 l. U komoru se uz protok od 3 l/min dostavljala mješavina plinova dušika i kisika u omjeru 50%:50%, dobivena iz posebnog spremnika povezanog sa standardnim isparivačem za sevofluran ili izofluran (Sevoflurane vaporiser 19.3, Isoflurane vaporiser 19.3, Dräger, Lübeck, Njemačka). Pomoću njih se u smjesu plinova dodavala odgovarajuća koncentracija inhalacijskog anestetika. Početna inspiracijska koncentracija anestetika bila je 3 MAC tijekom prve 3 minute (sevofluran 7.2%, izofluran 4.4%), uz postupno smanjivanje doze na 2 MAC (sevofluran 4.8%, izofluran 2.9%). Nakon postizanja odgovarajuće dubine anestezije (za sevofluran otprilike nakon 10 min, za izofluran otprilike nakon 20 min), životinja se izvadila iz staklene komore i postavila na operacijski stolić. Potom se ventilacija životinje nastavila pomoću posebne maske prilagođene njuški štakora uz protok svježih plinova od 1 l/min uz spontano udisanje zadane koncentracije anestetika.

U svim skupinama kod životinja se učinila traheotomija i postavljanje metalne cjevčice u traheju, nakon čega se ventilacija nastavila primjenom kontrolirane mehaničke ventilacije pomoću respiratora za male životinje (SAR 850, CWE, Ardmore, PA, SAD), uz pozitivni tlak na kraju inspirija (2-3 cm H<sub>2</sub>O). U pokusnim skupinama (sevofluranskoj i izofluranskoj) uz pomoć kontrolirane mehaničke ventilacije nastavilo se s dostavom odgovarajuće koncentracije inhalacijskog anestetika u mješavini svježih plinova, koja je

tijekom svih kirurških postupaka održavana na razini od 2 MAC (sevofluran 4.8%, izofluran 2.9%).

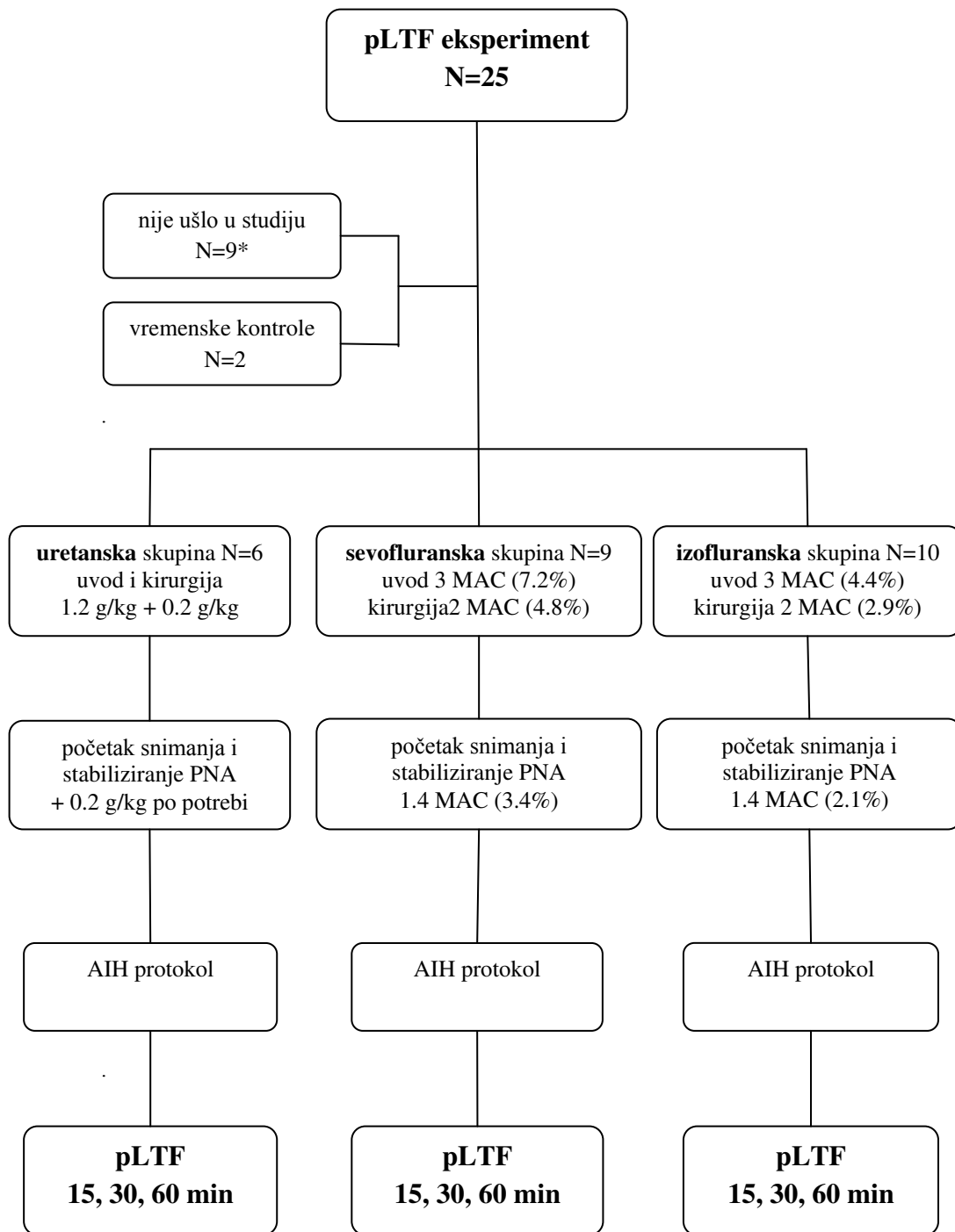
#### **4.2.2. Kanulacija krvnih žila, uzorkovanje krvi i analiza plinova**

Obostrano su se kanulirale femoralne arterije i vene zbog primjene intravenske infuzije 0.9% NaCl (1.5-2 ml/kg/h), kontinuiranog mjerenja arterijskog tlaka i uzimanja uzoraka arterijske krvi (0.2 ml) za analizu plinova ( $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$ ) i acido-baznog statusa (ABS). Bazalni respiracijski parametri (frekvencija disanja 50 udisaja/min, inspiracijsko vrijeme 0.9 s, protok 325 ml/min), prilagođavali su se prema vrijednostima koncentracije  $\text{CO}_2$  na kraju izdisaja ( $\text{ETCO}_2$ ) i prema nalazima iz uzoraka arterijske krvi.  $\text{ETCO}_2$  nadzirao se analizatorom plinova (Gemini Gas Analyzer, CWE Inc., Ardmore, SAD), a uzorci arterijske krvi analizirali su se uređajem za ABS (RapidLab 348, Bayer Diagnostics Sudbery, Velika Britanija). Nakon uzimanja uzorka krvi primjenio se bolus fiziološke otopine (0.5 ml). Kontinuirano se mjerila rektalna temperatura digitalnim toplomjerom i održavala između 37-38 °C pomoću vanjske grijajuće podloge (FST, Heidelberg, Njemačka).

#### **4.2.3. Prepariranje freničkoga živca i uzorkovanje živčanog signala**

U daljnjem tijeku pokusa životinja se postavila u pronacijski položaj u stereotaksijski okvir (Lab Standard, Stoelting, SAD). Desni frenički živac preparirao se dorzalnim pristupom (razina korijena C5), postavio bi se na bipolarne srebrne elektrode i pokrio silikonskim gelom. Potom bi se učinila obostrana vagotomija. Signal freničkoga živca usmjerio se preko pojačala (System 1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD) do računala s pomoću kojeg se uporabom Power-Lab sustava (ADI Instruments, Castle Hill, Velika Britanija) snimao neobrađen i integrirani signal PNA. Elektronski zapis analizirao se s pomoću programa Chart for Windows 5.4.2 (ADI Instruments, Castle Hill, Velika Britanija).





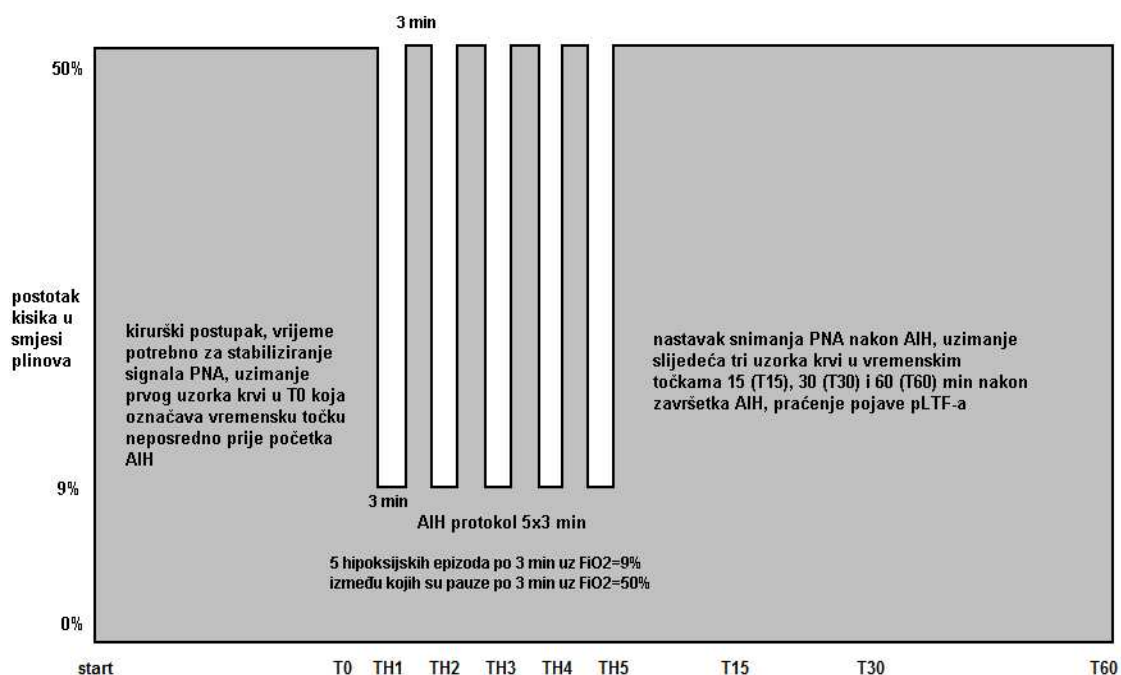
**Slika 10. Dijagram tijeka istraživanja.** \* U 9 životinja uslijed anestezije sevofluranom (N=3) i izofluranom (N=6), došlo je do nastanka apneje zbog čega nije učinjena analiza freničkoga neurograma.

#### 4.2.4. Provođenje hipoksijskog protokola

Nakon završetka kirurških postupaka, u pokusnim skupinama, koncentracija inhalacijskog anestetika smanjena je na 1.4 MAC (sevofluran 3.4%, izofluran 2.1%). Ostavljeno je vrijeme za stabiliziranje signala freničkoga živca (za sevofluran otprilike 15 minuta, za izofluran otprilike 30 minuta). Ista dubina anestezije održavana je do kraja pokusa. U svim skupinama kontroliranjem ventilacije i  $\text{ETCO}_2$  određen je apnejički prag ( $\text{ETCO}_2$  pri kojem nestaje PNA). Početna vrijednost  $\text{ETCO}_2$  postavljena je 2-4 mmHg iznad praga. Signal je na toj vrijednosti definiran kao bazalni, uz potvrdu dobivenu analizom plinova i ABS-a iz uzorka arterijske krvi. Nakon definiranja bazalnih parametara započelo se s AIH protokolom (Slika 11).

Protokol AIH (5x3 min) sastojao se od 5 hipoksijskih epizoda u trajanju od 3 minute ( $\text{FiO}_2=9\%$ ), između kojih je bilo 5 pauza također u trajanju od 3 minute ( $\text{FiO}_2=50\%$ ). Nakon zadnje hipoksijske epizode nastavilo se s kontinuiranim snimanjem PNA slijedećih 60 minuta. Uzorci arterijske krvi za analizu plinova i ABS-a uzeti su 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, s ciljem održavanja vrijednosti  $\text{PaCO}_2$  blizu početnih (održavanje izokapnije) i isključenja utjecaja  $\text{PaCO}_2$  na pLTF.

Na kraju pokusa životinje su bile eutanazirane otopinom 7.45% KCl u dubokom stupnju anestezije.



**Slika 11. Shematski prikaz vremenskog tijeka pokusa i akutnog hipoksijskog protokola.** Vrijednosti  $O_2$  izražene su kao postotak u udahutoj smjesi plinova (nelinearna skala). T0 - bazalna vrijednost amplitude prije početka prve hipoksijske epizode; TH1-TH5 - pet hipoksijskih epizoda; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

#### 4.3. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati podrazumijevali su uprosječivanje vrijednosti slijedećih ispitivanih varijabli: amplitude freničkoga živca, frekvencije disanja, vremenskog trajanja udisaja, vremenskog trajanja izdisaja i vremenskog trajanja cijelog respiracijskog ciklusa, u izabranim vremenskim intervalima od 20 sekundi, unutar unaprijed određenih devet vremenskih točaka. Na taj način snimao se i uzorkovao i MAP. pPNA bila je izražena kao relativna promjena u postotcima u odnosu na bazalne vrijednosti u vremenskoj točki T0. U četiri od devet vremenskih točaka (T0, T15, T30 i T60), izmjerene su i uprosječene vrijednosti  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$  i pH. Sve vrijednosti izrazile su se kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška (engl. *mean*  $\pm$  *SE*). Dobiveni podaci obrađeni su uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.; Tulsa,

USA), primjenom statističkog testa ANOVA s ponovljenim mjerenjima, za usporedbe unutar skupine (usporedba podataka u pojedinoj vremenskoj točki u odnosu na bazalne vrijednosti za svaki anestetik posebno) i između skupina (usporedba sva tri anestetika međusobno u istoj vremenskoj točki), uz Bonferroni *post hoc* korekciju. Statistička značajnost bila je postavljena na  $P < 0.05$ .

#### **4.4. Etička načela**

Pokusi provedeni u okviru ove disertacije odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta 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). Prikladan model za izvođenje ovih pokusa je štakor anesteziran otopinom uretana i s dvije vrste inhalacijskih (hlapljivih) anestetika (sevoflurana i izoflurana). Svi kirurški postupci na životinjama izvodili su se u anesteziji odgovarajuće dubine. Eutanazija životinja po završetku pokusa izvršena je predoziranje anestetika i intravenskom primjenom zasićene otopine kalijevog klorida, u skladu s naputcima *American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia* (118).

## 5. REZULTATI

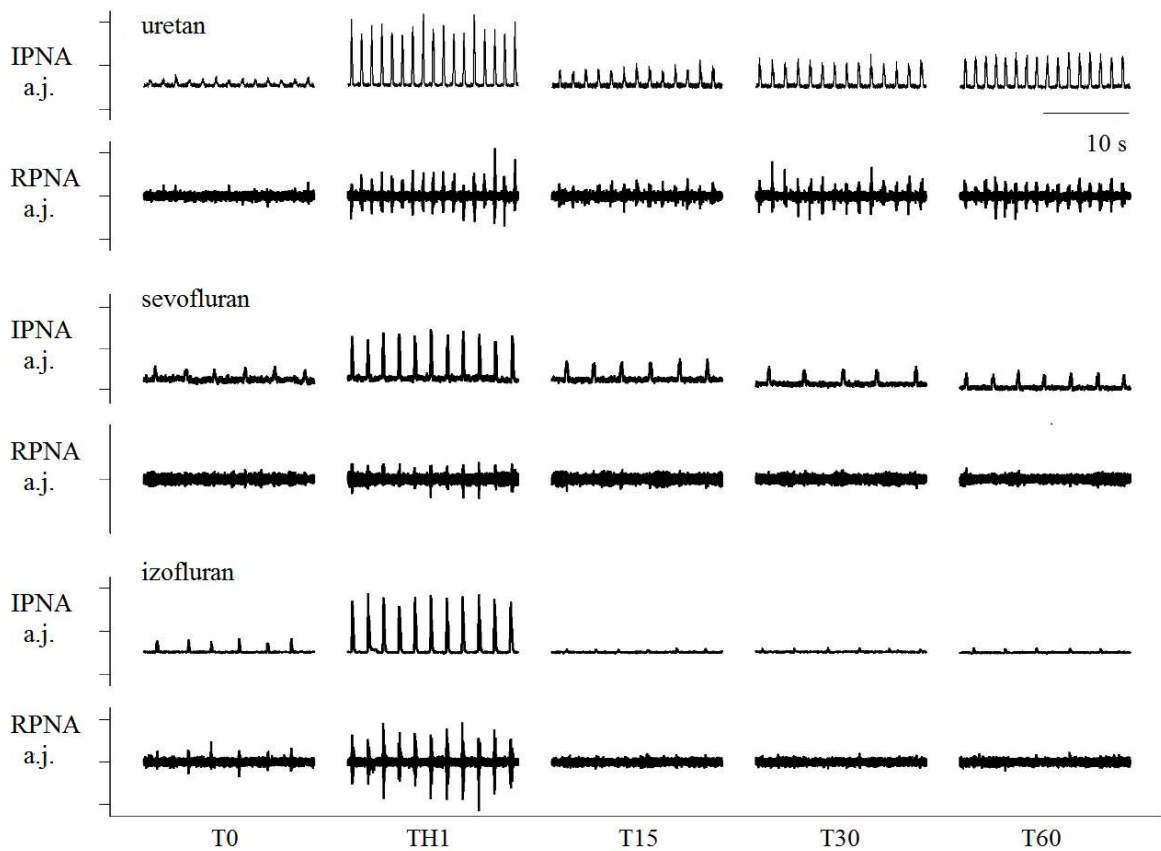
### 5.1. Učinak inhalacijskih anestetika na dugoročnu facilitaciju freničkoga živca

Inhalacijski anestetici, sevofluran i izofluran, sprječavaju nastanak dugoročne facilitacije freničkoga živca u štakora u modelu akutnih ponavljanih hipoksija (Slika 12).

U anestetskoj koncentraciji od 1.4 MAC, sevofluran i izofluran, spriječili su povećanje amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti, dok je u kontrolnoj (uretanskoj) skupini došlo do značajnog povećanja amplitude, ukazujući na razvoj pLTF-a (Slika 12).

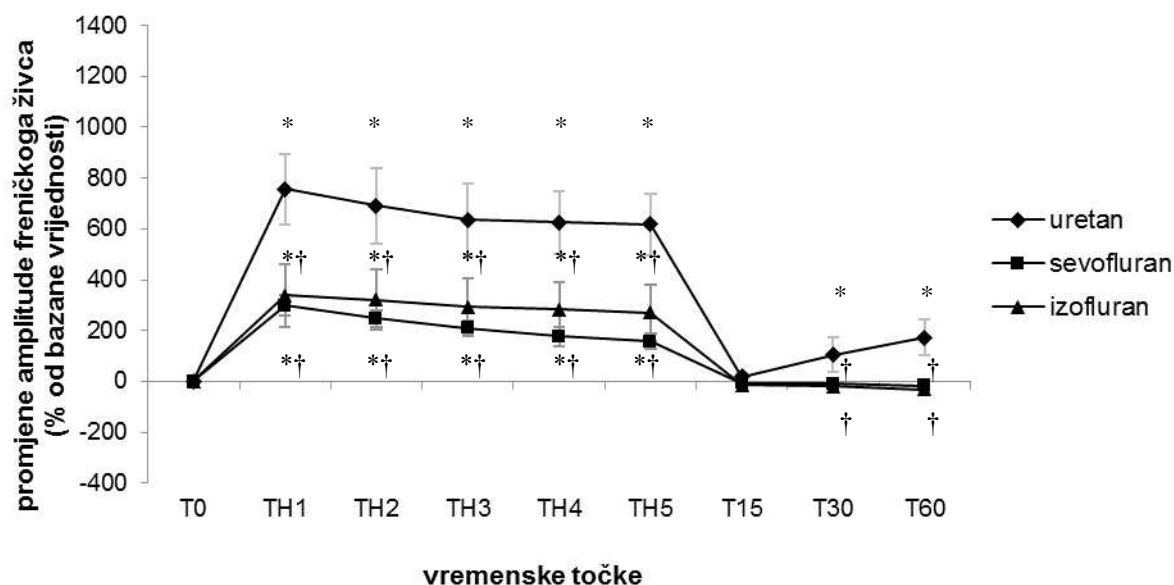
U kontrolnoj skupini životinja amplituda aktivnosti freničkoga živca značajno se povećala 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti (povećanje od  $104.42 \pm 66.50\%$  i  $173.03 \pm 70.16\%$ ,  $P < 0.001$ ), dok se 15 minuta nakon završetka AIH protokola amplituda nije značajno promijenila (povećanje od  $18.25 \pm 14.12\%$ ,  $P > 0.05$ ) (Slika 13).

U životinja anesteziranih sevofluranom amplituda aktivnosti freničkoga živca nije se značajno promijenila 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti, međutim uočen je trend snižavanja amplitude u navedenim vremenskim točkama (sniženje od  $7.73 \pm 14.92\%$ ,  $9.21 \pm 15.26\%$  i  $15.79 \pm 15.18\%$ ,  $P > 0.05$ ) (Slika 13). U životinja anesteziranih izofluranom amplituda aktivnosti freničkoga živca također se nije značajno promijenila 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti, međutim također je uočen trend snižavanja amplitude u navedenim vremenskim točkama (sniženje od  $13.62 \pm 9.08\%$ ,  $19.70 \pm 7.78\%$  i  $31.26 \pm 10.20\%$ ,  $P > 0.05$ ) (Slika 13). Između sevofluranske i izofluranske skupine, u navedenim vremenskim točkama, nije bilo razlika u promjenama PNA.



**Slika 12.** Elektrofiziološki zapis integrirane i neobrađene aktivnosti freničkoga živca (engl. *integrated phrenic nerve activity*, IPNA; *raw phrenic nerve activity*, RPNA), u primjerku štakora iz svake od tri ispitne skupine, izražen u arbitrarnim jedinicama (a.j.). T0 - bazalni uvjeti prije izlaganja hipoksiji, TH1 - hipoksijska epizoda, T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola. U štakora anestetiziranog uretanom vidljivo je povećanje PNA 60 minuta nakon izlaganja AIH u odnosu na bazalne vrijednosti, tj. došlo je do pojave pLTF-a. U štakora anestetiziranih sevofluranom i izofluranom povećanje PNA je izostalo, tj. spriječena je pojava pLTF-a.

### RELATIVNE PROMJENE AMPLITUDE FRENIČKOGA ŽIVCA



**Slika 13.** Relativne promjene amplitude freničkoga živca u uretanskoj, sevofluranskoj i izofluranskoj skupini u svim vremenskim točkama pokusa, izražene kao postotak promjene u odnosu na bazalne vrijednosti. T0 - bazalna vrijednost amplitude prije početka prve hipoksijske epizode; TH1-TH5 - pet hipoksijskih epizoda; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode. U uretanskoj (kontrolnoj) skupini PNA se povećala 60 minuta nakon izlaganja AIH u odnosu na bazalne vrijednosti (pojava pLTF-a), za razliku od pokusnih skupina (sevofluranske i izofluranske), gdje je povećanje PNA izostalo (spriječena pojava pLTF-a).

\* značajno različito u odnosu na bazalnu vrijednost (unutar iste skupine) ( $P < 0.05$ ).

† značajno različito u odnosu na kontrolnu (uretansku) skupinu ( $P < 0.05$ ).

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška (engl. *mean*  $\pm$  *SE*).

## 5.2. Hipoksijski ventilacijski odgovor

U obje pokusne skupine (sevofluranskoj i izofluranskoj), akutni hipoksijski ventilacijski odgovor bio je očuvan, uz manje izraženo povećanje amplitude freničkoga živca, u odnosu na kontrolnu (uretansku) skupinu (Slika 13).

U svim životinjskim skupinama amplituda aktivnosti freničkoga živca značajno se povećala tijekom svih pet hipoksijskih epizoda (TH1-TH5) u odnosu na bazalne vrijednosti (Slika 13). Međutim, povećanje amplitude bilo je značajno manje izraženo u sevofluranskoj i izofluranskoj skupini, u odnosu na kontrolnu (uretansku) skupinu (Slika 13). U prvoj hipoksijskoj epizodi PNA se u kontrolnoj skupini povećala za  $757.42 \pm 139.17\%$  ( $P < 0.05$ ), u sevofluranskoj za  $299.15 \pm 40.29\%$  ( $P < 0.05$ ) i u izofluranskoj za  $338.21 \pm 123.94\%$  ( $P < 0.05$ ). Između sevofluranske i izofluranske skupine nije bilo značajnih razlika u promjenama PNA tijekom hipoksijskih epizoda.

## 5.3. Frekvencija freničkoga živca

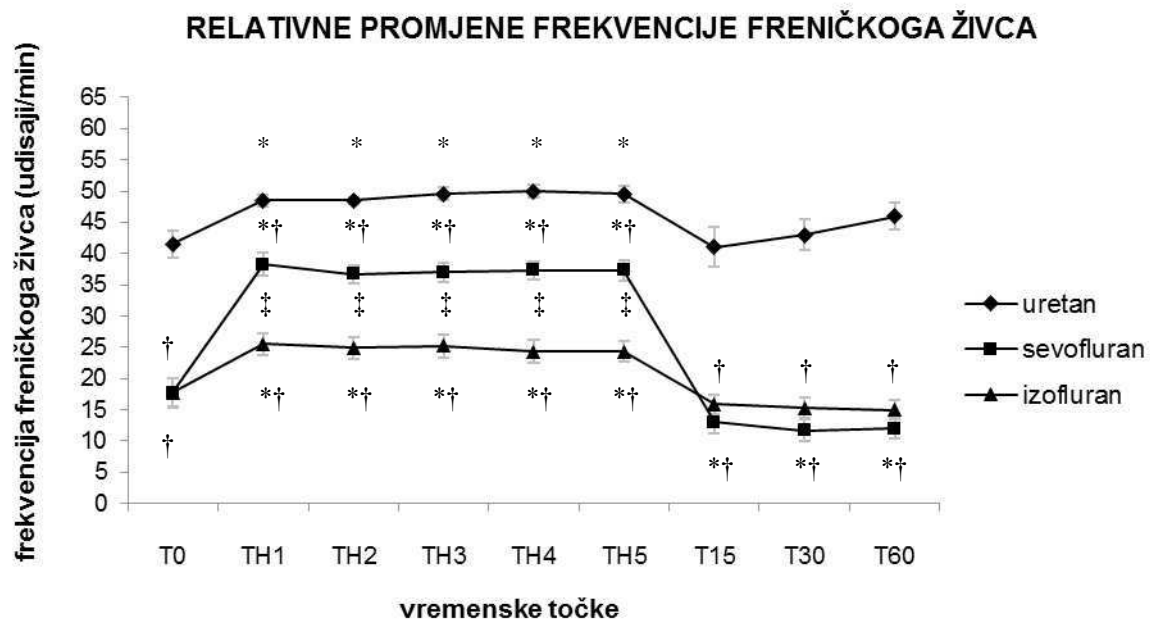
Bazalna frekvencija freničkoga živca u sevofluranskoj i izofluranskoj skupini bila je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $17.7 \pm 2.4$  i  $17.7 \pm 2.3$  prema  $41.5 \pm 2.1$  udisaja/min,  $P < 0.05$ ) (Slika 14).

Tijekom izlaganja hipoksiji, u svim skupinama životinja došlo je do značajnog povećanja frekvencije freničkoga živca tijekom svih pet hipoksijskih epizoda u odnosu na bazalne vrijednosti, međutim značajno više u kontrolnoj skupini u odnosu na sevofluransku i izofluransku. Prosječna frekvencija tijekom hipoksijskih epizoda u kontrolnoj skupini iznosila je  $49.2 \pm 0.3$ , u sevofluranskoj  $37.3 \pm 0.2$  i u izofluranskoj  $24.8 \pm 0.2$  udisaja/min (Slika 14). Također, tijekom hipoksijskih epizoda postojala je i značajna razlika u frekvenciji između sevofluranske i izofluranske skupine, kada je zabilježeno veće povećanje frekvencije u



sevofluranskoj skupini u odnosu na izofluransku ( $37.3 \pm 0.2$  prema  $24.8 \pm 0.2$  udisaja/min,  $P < 0.05$ ) (Slika 14).

U vremenskim točkama 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola, u kontrolnoj skupini, frekvencija freničkoga živca nije se značajno promijenila u odnosu na bazalne vrijednosti ( $41.0 \pm 3.2$ ,  $43.0 \pm 2.5$  i  $46.0 \pm 2.1$  prema  $41.5 \pm 2.1$  udisaja/min,  $P > 0.05$ ). U izofluranskoj skupini također nije došlo do značajne promjene frekvencije u navedenim vremenskim točkama ( $15.9 \pm 1.6$ ,  $15.3 \pm 1.6$  i  $15.0 \pm 1.5$  prema  $17.7 \pm 2.3$  udisaja/min,  $P > 0.05$ ). Međutim, u sevofluranskoj skupini došlo je do značajnog smanjenja frekvencije freničkoga živca 15, 30 i 60 min nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti ( $13.0 \pm 1.9$ ,  $11.7 \pm 1.7$  i  $12.0 \pm 1.7$  prema  $17.7 \pm 2.4$  udisaja/min,  $P < 0.05$ ) (Slika 14). Iako je unutar sevofluranske skupine frekvencija freničkoga živca 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola bila značajno manja u odnosu na bazalne vrijednosti, kada se sevofluran i izofluran usporede međusobno, u istim vremenskim točkama nije bilo značajnih razlika (Slika 14).



**Slika 14.** Promjena frekvencije freničkoga živca u uretanskoj, sevofluranskoj i izofluranskoj skupini u svim vremenskim točkama pokusa. T0 - bazalna vrijednost frekvencije prije početka prve hipoksijske epizode; TH1-TH5 - pet hipoksijskih epizoda; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

\* značajno različito u odnosu na bazalnu vrijednost (unutar iste skupine) ( $P < 0.05$ ).

† značajno različito u odnosu na kontrolnu (uretansku) skupinu ( $P < 0.05$ ).

‡ značajno različito između sevofluranske i izofluranske skupine ( $P < 0.05$ ).

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna greška.

#### 5.4. Respiracijski parametri

U kontrolnoj (uretanskoj) skupini životinja nije bilo značajnih promjena u trajanju udisaja ( $T_i$ ), izdisaja ( $T_e$ ) i cijelog respiracijskog ciklusa ( $T_{tot}$ ), 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti. Međutim, tijekom izlaganja hipoksiji, zabilježeno je značajno kraće trajanja udisaja ( $T_i$ ) ( $P < 0.001$ ) i cijelog respiracijskog ciklusa ( $T_{tot}$ ) ( $P < 0.05$ ) u odnosu na bazalne vrijednosti, dok se trajanje izdisaja ( $T_e$ ) nije značajno promijenilo (Tablica 1).

U sevofluranskoj skupini životinja trajanje udisaja ( $T_i$ ) nije se značajno promijenilo ni u jednoj vremenskoj točki pokusa u odnosu na bazalne vrijednosti. Međutim, trajanje izdisaja ( $T_e$ ) i cijelog respiracijskog ciklusa ( $T_{tot}$ ), bilo je značajno kraće tijekom hipoksijskih epizoda ( $P < 0.001$ ), dok se naprotiv tijekom 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola trajanje  $T_e$  i  $T_{tot}$  značajno produžilo u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P < 0.001$ ) i u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini ( $P < 0.05$ ) (Tablica 1).

U izofluranskoj skupini životinja trajanje udisaja ( $T_i$ ) nije se značajno promijenilo 15 i 30 minuta nakon završetka AIH protokola. 60 minuta nakon AIH protokola došlo je do njegovog skraćanja u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P < 0.05$ ). Međutim, tijekom hipoksijskih epizoda zabilježeno je značajno produženje  $T_i$  u odnosu na bazalne vrijednosti i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0.05$ ). Slično kao i u sevofluranskoj skupini, trajanje izdisaja ( $T_e$ ) i cijelog respiracijskog ciklusa ( $T_{tot}$ ), bilo je značajno kraće tijekom hipoksijskih epizoda ( $P < 0.05$ ), a 30 i 60 min nakon završetka AIH protokola trajanje  $T_e$  i  $T_{tot}$  također se značajno produžilo u odnosu na bazalne vrijednosti i u odnosu na vrijednosti u kontrolnoj skupini ( $P < 0.05$ ) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Promjene respiracijskih parametara (Ti, Te i Ttot) u uretanskoj, sevofluranskoj i izofluranskoj skupini u svim vremenskim točkama pokusa.

	T0	T15	T30	T60
<b>Uretan</b>				
Ti	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Te	1.05 ± 0.07	1.07 ± 0.12	1.00 ± 0.10	0.99 ± 0.10
Ttot	1.46 ± 0.08	1.48 ± 0.13	1.39 ± 0.10	1.31 ± 0.07
<b>Sevofluran</b>				
Ti	0.39 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Te	3.61 ± 0.49 <sup>†</sup>	4.99 ± 0.62 <sup>*†</sup>	5.49 ± 0.59 <sup>*†</sup>	4.99 ± 0.49 <sup>*†</sup>
Ttot	3.99 ± 0.07 <sup>†</sup>	5.42 ± 0.06 <sup>*†</sup>	5.91 ± 0.07 <sup>*†</sup>	5.44 ± 0.08 <sup>*†</sup>
<b>Izofluran</b>				
Ti	0.39 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.38 ± 0.02 <sup>*</sup>
Te	3.78 ± 0.68 <sup>†</sup>	4.03 ± 0.57 <sup>†</sup>	4.12 ± 0.57 <sup>*†</sup>	4.16 ± 0.52 <sup>*†</sup>
Ttot	4.17 ± 0.68 <sup>†</sup>	4.44 ± 0.58 <sup>*†</sup>	4.47 ± 0.60 <sup>*†</sup>	4.54 ± 0.53 <sup>*†</sup>

	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5
<b>Uretan</b>					
Ti	0.34 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>*</sup>
Te	0.91 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.84 ± 0.04
Ttot	1.25 ± 0.02	1.20 ± 0.02 <sup>*</sup>	1.19 ± 0.03	1.17 ± 0.03 <sup>*</sup>	1.17 ± 0.03 <sup>*</sup>
<b>Sevofluran</b>					
Ti	0.40 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.02
Te	1.16 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.25 ± 0.07 <sup>*</sup>	1.24 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.24 ± 0.07 <sup>*</sup>	1.25 ± 0.08 <sup>*</sup>
Ttot	1.56 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.64 ± 0.07 <sup>*</sup>	1.62 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.63 ± 0.07 <sup>*</sup>	1.62 ± 0.08 <sup>*</sup>
<b>Izofluran</b>					
Ti	0.42 ± 0.01 <sup>*†</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>*†</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>*†</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>*†</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>*†</sup>
Te	2.13 ± 0.21 <sup>*†</sup>	2.08 ± 0.21 <sup>*†</sup>	2.05 ± 0.20 <sup>*†</sup>	2.16 ± 0.21 <sup>*†‡</sup>	2.14 ± 0.19 <sup>*†</sup>
Ttot	2.45 ± 0.2 <sup>*†‡</sup>	2.50 ± 0.21 <sup>*†</sup>	2.46 ± 0.19 <sup>*†</sup>	2.57 ± 0.20 <sup>*†‡</sup>	2.56 ± 0.19 <sup>*†‡</sup>

Vrijednosti su izražene u sekundama (srednja vrijednost ± standardna greška). Ti - trajanje udisaja, Te - trajanje izdisaja, Ttot - trajanje cijelog respiracijskog ciklusa. T0 - bazalne vrijednosti prije početka prve hipoksijske epizode; TH1-TH5 - pet hipoksijskih epizoda; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

\* značajno različito u odnosu na bazalnu vrijednost (unutar iste skupine) ( $P < 0.05$ ).

† značajno različito u odnosu na kontrolnu (uretansku) skupinu ( $P < 0.05$ ).

‡ značajno različito između sevofluranske i izofluranske skupine ( $P < 0.05$ ).

## 5.5. Srednji arterijski tlak, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> i pH

Bazalne vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka (MAP), nisu se značajno razlikovale između skupina (Tablica 2). Potom je zabilježeno značajno sniženje MAP-a tijekom hipoksijskih epizoda unutar svake od tri skupine životinja u odnosu na bazalne vrijednosti (srednja vrijednost MAP-a svih hipoksijskih epizoda iznosila je 63.8±3.1 u uretanskoj, 81.5±1.1 u sevofluranskoj i 63.8±1.0 mmHg u izofluranskoj skupini,  $P<0.001$ ). U vremenskim točkama 15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola nije bilo značajnih promjena MAP-a unutar pojedine skupine (u odnosu na bazalnu vrijednost u toj skupini), kao ni između skupina (Tablica 2).

**Tablica 2.** Vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka (MAP) u kontrolnoj (uretanskoj) i obje pokusne skupine (sevofluranskoj i izofluranskoj), u svim vremenskim točkama pokusa.

	T0	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5	T15	T30	T60
MAP (mmHg)									
Uretan	120.5±8.3	73.3±9.4*	69.1±9.0*	58.8±6.4*	58.8±6.4*	58.8±5.7*	113.1±8.0	109.6±8.8	105.4±12.4
Sevofluran	114.4±5.3	83.8±5.7*	84.1±6.0*	80.5±5.0*	80.8±4.3*	78.5±4.6*	119.2±5.8	120.7±6.6	120.2±7.8
Izofluran	91.9±7.1	65.4±5.6*	65.3±6.1*	65.2±6.1*	62.4±5.5*	60.7±5.4*	95.6±8.6	86.4±7.2	80.2±7.8

Vrijednosti su izražene u mmHg (srednja vrijednost ± standardna greška). T0 - bazalne vrijednosti prije početka prve hipoksijske epizode; TH1-TH5 - pet hipoksijskih epizoda; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

\* Vrijednost MAP-a značajno različita u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P<0.001$ ).

Vrijednosti PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> i pH statistički se nisu značajno mijenjale unutar pojedine skupine (15, 30 i 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na bazalne vrijednosti u toj skupini), kao ni između skupina u četiri vremenske točke mjerenja (T0, T15, T30 i T60) (Tablica 3).

**Tablica 3.** Parcijalni tlakovi plinova ugljičnog dioksida (PaCO<sub>2</sub>) i kisika (PaO<sub>2</sub>) u arterijskoj krvi u kontrolnoj (uretanskoj) i obje pokusne skupine (sevofluranskoj i izofluranskoj), u svim vremenskim točkama pokusa.

	T0	T15	T30	T60	<i>P</i> <sup>*</sup>
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)					
Uretan	47.0±0.8	45.6±1.3	44.4±1.4	47.6±1.7	>0.05
Sevofluran	43.8±0.5	44.2±1.1	44.9±0.6	44.5±0.3	>0.05
Izofluran	46.8±0.9	47.8±1.2	47.0±1.6	47.7±1.4	>0.05
PaO <sub>2</sub> (mmHg)					
Uretan	248.9±5.4	265.8±4.5	264.3±6.7	275.4±4.1	>0.05
Sevofluran	223.5±14.1	242.5±5.9	251.5±7.9	245.4±7.7	>0.05
Izofluran	195.3±10.3	210.0±12.0	205.5±10.0	203.9±11.2	>0.05
pH					
Uretan	7.34±0.01	7.33±0.01	7.32±0.02	7.29±0.01	>0.05
Sevofluran	7.42±0.01	7.41±0.02	7.40±0.01	7.39±0.01	>0.05
Izofluran	7.31±0.01	7.29±0.02	7.28±0.01	7.27±0.01	>0.05

Vrijednosti su izražene u mmHg (srednja vrijednost ± standardna greška). T0 - bazalne vrijednosti prije početka prve hipoksijske epizode; T15, T30 i T60 - 15, 30 i 60 min nakon zadnje hipoksijske epizode.

\* ANOVA unutar skupine.

## 6. RASPRAVA

Monoanestezija sevofluranom i izofluranom u anestetskoj koncentraciji od 1.4 MAC, spriječila je pojavu dugoročne facilitacije freničkoga živca 60 minuta nakon završetka AIH protokola u štakora. Nasuprot tome, u kontrolnoj skupini životinja anesteziranih uretanom, došlo je do značajnog povećanja amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon završetka AIH protokola, ukazujući na razvoj pLTF-a.

### 6.1. Amplitudni i frekvencijski pLTF i anestezija

Dugoročna facilitacija freničkoga živca ispitivana je u različitim eksperimentalnim modelima i prema različitim eksperimentalnim protokolima (22). Poznato je da se u anesteziranih životinja pLTF prije svega očituje povećanjem amplitude freničkoga živca (28, 55). Nasuprot tome, u budnih životinja pLTF uglavnom se očituje povećanjem frekvencije disanja, uz male i varijabilne promjene dišnog volumena. Također, pLTF u budnih životinja slabijeg je intenziteta i kraćeg trajanja nego u anesteziranih (21-22, 55-56). Jedno od pretpostavljenih objašnjenja zašto se pLTF lakše izaziva tijekom spavanja, tj. anestezije, je da serotoninski neuroni (smješteni u raphe jezgrama) tada imaju znatno manju aktivnost. Prilikom izlaganja intermitentnoj hipoksiji, zbog smanjene bazalne aktivnosti, dolazi do naglog i pojačanog izbijanja serotoninskih neurona u raphe jezgrama, što je temelj za nastanak pLTF-a. U budnom stanju, pLTF se ne može uvijek izazvati, budući da je aktivnost serotoninskih neurona već pojačana, tako da i intermitentni hipoksijski podražaj nije uvijek dostatan za njihovu dodatnu aktivaciju (22, 31).

U svrhu naglaska učinka kojeg mogu imati pojedini anestetici na pojavu pLTF-a, studije o utjecaju pojedinačnih anestetika potencijalan su izvor vrijednih informacija. Zbog neznatnog utjecaja na respiracijski, kardiovaskularni i autonomni živčani sustav, uretan se u animalnim studijama koristi kao anestetik izbora za ispitivanje funkcije respiracijske neuralne aktivnosti i kontrole disanja (80, 112, 114). U brojnim dosadašnjim istraživanjima, kao

standard za ispitivanje fenomena pLTF-a koristi se model uretanom anesteziranog, vagotomiziranog, paraliziranog i mehanički ventiliranog štakora (22, 115). U nedavnoj opširnoj meta-analizi, Baker-Herman i Mitchell potvrdili su da se radi o vrlo pogodnom modelu za ispitivanje amplitudnog pLTF-a (55). Međutim, dosadašnja istraživanja pokazala su da nakon izlaganja AIH protokolu osim amplitudnog pLTF-a može nastati i frekvencijski pLTF. Pojava frekvencijskog pLTF-a u takvom modelu varijabilna je i slabo izražena. Spoznaja o postojanju frekvencijskog i amplitudnog pLTF-a važna je zbog toga što ukazuje na mogućnost postojanja više različitih neuralnih mehanizama u podlozi razvoja respiracijske plastičnosti (55, 57).

Pretpostavlja se da je frekvencijski pLTF, za razliku od amplitudnog, posljedica aktivacije drugačijih neuralnih mehanizama i postojanju drugačijih eksperimentalnih uvjeta (45, 55). Unatoč nerazjašnjenim neuralnim mehanizmima amplitudnog i frekvencijskog pLTF-a, rezultati spomenute meta-analize upućuju na to da je frekvencijski pLTF najvjerojatnije posljedica modulacije respiracijskih neurona unutar moždanog debla, odgovornih za stvaranje temeljnog ritma i obrasca disanja (55). S druge strane, amplitudni pLTF najvjerojatnije je posljedica modulacijskih utjecaja na razini freničkoga motoneurona (28, 45, 55). Također, uočena je negativna korelacija između frekvencijskog pLTF-a i bazalne frekvencije disanja, tj. bazalna frekvencija disanja pokazala se kao snažan prediktivni čimbenik veličine i smjera frekvencijskog pLTF-a (55). Frekvencijski pLTF bi se prema tome mogao razviti u štakora izloženih akutnom AIH protokolu s niskom bazalnom frekvencijom. Slično tome viša vrijednost bazalne frekvencije (oko ili više od 50 udisaja/min), mogla bi rezultirati u smanjenju frekvencije disanja nakon završenog AIH protokola (55). U našem modelu frekvencija disanja mjerena aktivnošću freničkoga živca u modelu uretanom anesteziranog štakora iznosila je 41.5 udisaja/min. Primjenom jednadžbe za procjenu frekvencijskog LTFa nije bilo izgledno da će nastati frekvencijski pLTF (55). Frekvencija



PNA u T60 nije se značajno povećala (46.0 udisaja/min, tj. za 10.8%). Baker-Herman i Mitchell su važnost bazalne frekvencije freničkoga živca, a također i frekvencije tijekom hipoksijskog ventilacijskog odgovora, izrazili u jednadžbi kojom su prezentirali mogućnost računanja potencijalnog (prediktivnog) frekvencijskog pLTF-a (autori u jednadžbi navode frekvencijski LTF, što se odnosi na frekvencijski pLTF, op.a.).

$$\text{frekvencijski pLTF} = 17.9 - (0.39 \times \text{bazalna frekvencija}) + (0.16 \times \text{promjena frekvencije tijekom hipoksije}) + (0.0237 \times \text{amplitudni pLTF})$$

Prema predloženoj jednadžbi, a s obzirom na nisku vrijednost bazalne frekvencije i značajan porast frekvencije tijekom HVR-a (pogotovo u sevofluranskoj skupini), izračunati frekvencijski pLTF u sevofluranskoj skupini trebao je iznositi 35.0% (povećanje s bazalnih 17.7 na 23.9 udisaja/min), a u izofluranskoj 18.8% (povećanje s bazalnih 17.7 na 21.1 udisaj/min). Međutim, frekvencija se u obje skupine, 60 minuta nakon završetka AIH protokola, dodatno snizila u odnosu na bazalne vrijednosti, tj. frekvencijski pLTF nije nastao. Frekvencija se zapravo smanjila, i to u sevofluranskoj skupini za 26.0% (iznosila je 12.0 udisaja/min), a u izofluranskoj za 11.8% (iznosila je 15.0 udisaja/min). Što se tiče kontrolne skupine, u uretanski anesteziranih štakora izračunati frekvencijski pLTF je prema predloženoj jednadžbi trebao iznositi 9.1%, tj. s bazalnih 41.5, frekvencija se, 60 minuta nakon završenog AIH protokola, trebala povećati na 45.3 udisaja/min. Izmjerena frekvencija je u navedenoj vremenskoj točki iznosila 46.0 udisaja/min (povećanje za 11.2%), približno prediktivnoj vrijednosti.

Pretpostavlja se da različiti anestetici i drugi lijekovi koji mogu izazvati supresiju SŽS-a, mogu imati utjecaj i na manifestaciju pLTF-a. Do sada je to dokazano jedino za intravenski opći anestetik propofol, a nedavno i za opioidni analgetik remifentanil (22, 112-

113). U nedavnoj studiji Careva i sur. koji su koristili sličan eksperimentalni model i potpuno isti AIH protokol, također je došlo do pojave amplitudnog pLTF-a u kontrolnoj skupini, dok je u propofolskoj skupini izostala pojava i amplitudnog i frekvencijskog pLTF-a (112). Prema rezultatima meta-analize Baker-Hermana i Mitchella to se moglo i očekivati. Naime bazalna frekvencija disanja uretanski anesteziranih štakora bila je slična frekvenciji u našoj kontrolnoj skupini (35.1 udisaj/min), što nije dovoljan preduvjet za pojavu frekvencijskog pLTF-a. Zanimljivo je da je bazalna frekvencija u štakora anesteziranih propofolom (42.4 udisaja/min), bila znatno veća nego u štakora anesteziranih inhalacijskim anestheticima, a uz navedenu vrijednost nije se mogao očekivati nastanak frekvencijskog pLTF-a. U našoj studiji niska vrijednost bazalne frekvencije freničkoga živca (17.7 udisaja/min) u obje pokusne skupine (sevofluranskoj i izofluranskoj), ukazuje na moguću, inhalacijskim anestheticima izazvanu naglašenu depresiju neurona u središnjem generatoru disanja u štakora, u usporedbi s uretanskom anestezijom. Unatoč prihipoksijskim nižim vrijednostima bazalne frekvencije kod oba inhalacijska anestetika, frekvencijski pLTF je izostao. Možemo pretpostaviti da su sevofluran i izofluran u našem modelu, spomenutim mogućim depresijskim utjecajem na neurone odgovorne za stvaranje temeljnog ritma i obrasca disanja, uzrokovali značajno sniženje frekvencije freničkoga živca tijekom cijelog pokusa (85-86).

Moguće je, da je pojava i amplitudnog pLTF-a u ovoj studiji bila spriječena depresijskim utjecajem inhalacijskih anestetika na neurone odgovorne za stvaranje temeljnog ritma i obrasca disanja (55). Međutim, Baker-Herman i Mitchell uočili su da bazalna frekvencija i frekvencija 60 minuta nakon AIH (frekvencijski pLTF), nemaju značajnu prediktivnu vrijednost za pojavu amplitudnog pLTF-a, za razliku od vrijednosti amplitude freničkoga živca tijekom hipoksije, koja je najvažniji prediktivni čimbenik. Autori su predložili još jednu jednadžbu kojom su pokazali mogućnost računanja potencijalnog

(prediktivnog) amplitudnog pLTF-a (autori u jednadžbi navode frenički LTF, što se odnosi na amplitudni pLTF, op.a.).

$$\text{amplitudni pLTF} = -61.595 + (1.8 \times \text{bazalna frekvencija}) + (2.27 \times \text{frekvencijski pLTF}) \\ + (0.31 \times \text{porast amplitude za vrijeme hipoksije})$$

U našoj studiji, prema predloženoj jednadžbi, amplitudni pLTF u sevofluranskoj skupini trebao je iznositi -21.3% (smanjenje amplitude freničkoga živca za 21.3%), što bi značilo da prema jednadžbi nije očekivan nastanak pLTF-a. Amplituda freničkoga živca je i bila smanjena, tj. izmjerena vrijednost sevofluranskog amplitudnog pLTF-a iznosila je -15.8% 60 minuta nakon završetka AIH protokola, u odnosu na bazalne vrijednosti. Prema parametrima navedenima u jednadžbi, sniženje amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon AIH protokola, moglo je biti posljedica niske bazalne frekvencije i/ili sniženja frekvencije 60 minuta nakon AIH protokola. Možemo vidjeti da i usprkos očuvanom HVR-u tijekom svih pet hipoksijskih epizoda, nije došlo do nastanka amplitudnog pLTF-a. Što se tiče izofluranske skupine, prema predloženoj jednadžbi, amplitudni pLTF trebao je iznositi +36.7%. Međutim izmjerena vrijednost izofluranskog amplitudnog pLTF-a iznosila je -31.3%, tj. amplituda aktivnosti freničkoga živca se 60 minuta nakon završetka AIH protokola snizila za 31.3%, u odnosu na bazalne vrijednosti. Prema parametrima navedenima u jednadžbi, pozitivna vrijednost predviđenog amplitudnog pLTF-a u izofluranskoj skupini mogla bi biti posljedica porasta amplitude freničkoga živca tijekom HVR-a s jedne strane u kombinaciji s manje izraženim smanjenjem frekvencije 60 minuta nakon AIH protokola, u odnosu na sevofluransku skupinu. Zanimljivo je da je pri propofolskoj anesteziji, prema predloženoj jednadžbi, amplitudni pLTF trebao iznositi 40%, međutim i tu je pojava amplitudnog pLTF-a izostala (112). U nedavnom istraživanju Ivancev i sur. pokazano je da primjena opioidnih

analgetika, koji se svakodnevno koriste u anesteziološkoj praksi i poznati su depresori disanja, također dovodi do supresije amplitudnog pLTF-a, tj. amplituda freničkoga živca također se nije povećala 60 minuta nakon završetka AIH protokola, usprkos održanom hipoksijskom ventilacijskom odgovoru (113). Što se tiče kontrolne skupine, u našoj studiji je u uretanom anesteziranih štakora amplitudni pLTF prema predloženoj jednadžbi trebao iznositi +244.7%. Usprkos tome što je izmjerena vrijednost amplitudnog pLTF-a bila nešto niža (+173.0%), ona pouzdano ukazuje na pojavu pLTF-a.

## **6.2. pLTF i hipoksijski ventilacijski odgovor**

Za adekvatan odgovor organizma na hipoksijski podražaj, potrebna je povezanost i pravilno funkcioniranje svih komponenti tzv. kemoreceptorske petlje, koja počinje od perifernih kemoreceptora, nastavlja se aferentnim putevima živca karotidnog sinusa do respiracijskih centara u moždanom deblu i naposljetku eferentnim putevima završava na neuromišićnoj sinapsi između respiracijskih motoneurona i respiracijskih mišića (101). U dosadašnjim istraživanjima utjecaja inhalacijskih anestetika na HVR, prevladavale su subanestetske koncentracije, prije svega zbog njihove važnosti u neposrednom poslijeoperacijskom periodu kada je moguće ostatno djelovanje anestetika (80, 101). U brojnim studijama potvrđeno je da inhalacijski anestetici već pri subanestetskim dozama djeluju suprimirajuće na HVR, a pri anestetskim dozama mogu ga u potpunosti ugasiti (96, 98). Karanović i sur. primjenili su anestetske doze (1.4-2.0 MAC) inhalacijskih anestetika halotana, izoflurana i sevoflurana u štakora i dokazali značajno smanjenje HVR-a, s potvrdom razlika u jačini djelovanja između ispitivanih anestetika (halotan > izofluran > sevofluran) (98).

U našoj studiji, razmatrajući bazalno disanje, postotak tzv. apneičnih štakora (onih kod kojih nije zabilježena nikakva aktivnost freničkoga živca u bazalnim uvjetima), tijekom

sevofluranske anestezije iznosio je 25% (kod 3 štakora od 12), a tijekom izofluranske 40% (kod 6 štakora od 16). Amplituda freničkoga živca i trajanje pojedinih faza respiracijskog ciklusa, u takvih štakora, nisu mogli biti analizirani uslijed nastale apneje. Međutim, tijekom sevofluranske i izofluranske monoanestezije u jednakim dozama (1.4 MAC), akutni HVR uglavnom je ostao očuvan. U sevofluranskoj skupini HVR se pojavio u svih životinja, a u dvije životinje anestezirane izofluranom HVR se nije pojavio. Također, akutni HVR je prilikom sevofluranske i izofluranske monoanestezije bio značajno oslabljen u odnosu na kontrolnu skupinu (prosječni porast pPNA tijekom svih pet hipoksijskih epizoda u uretanskoj skupini iznosio je 665.2%, u sevofluranskoj 217.7% i u izofluranskoj 300.8%). U našoj studiji, unatoč očuvanom HVR-u tijekom svih pet hipoksijskih epizoda u obje ispitne skupine (sevofluranskoj i izofluranskoj), amplitudni pLTF nije bio izazvan. Slično je pokazano i za intravenski opći anestetik propofol, gdje je također unatoč očuvanom HVR-u, pLTF izostao (112).

Pretpostavlja se da u okviru ventilacijskog odgovora na hipoksiju, inhalacijski anestetici mogu djelovati na sve dijelove kemoreceptorske petlje, a ponajviše na periferne kemoreceptore (102, 106). Oslabljeni HVR mogao bi biti posljedica suprimirane funkcije perifernih kemoreceptora uslijed djelovanja inhalacijskih anestetika. Pokazano je da karotidni kemoreceptori posjeduju znatan broj nevoltaznih kalijevih kanala važnih za održavanje membranskog potencijala, GABA<sub>A</sub> i nikotinskih acetilkolinskih receptora, koji su svi moguće mete inhalacijskih anestetika (80). Međutim, nije moguće isključiti ni središnje učinke, tako da se smatra da je oslabljeni HVR posljedica djelovanja inhalacijskih anestetika i na razini perifernih kemoreceptora, ali i na razini središnje modulacije kemoreptorskog odgovora (95, 101).

Neka istraživanja u zadnjem desetljeću pokazala su da primjena antioksidansa (vitamina C i E), može spriječiti depresijski utjecaj inhalacijskih anestetika na HVR (24, 119).

S obzirom da halotan i izofluran procesom metaboliziranja u organizmu mogu proizvesti dosta reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), a ujedno i snažno suprimiraju HVR, pretpostavlja se da ROS možda imaju bitnu ulogu u manifestaciji HVR-a, međutim to još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno (119). U postojeće spoznaje uklapa se i podatak da noviji inhalacijski anestetik desfluran, koji se minimalno metabolizira i zbog toga ne proizvodi ROS, neznatno ili uopće ne suprimira HVR (105). Pokazano je da membranski kalijски канали, koji su ključni u brzom prijenosu informacija o sniženoj razini kisika, posjeduju tzv. redoks osjetljivost (engl. *redox sensitivity*), tj. osjetljivost na različite oksidativne i reduktivne spojeve. Zbog toga se može pretpostaviti da su kalijски канали značajno osjetljivi na djelovanje inhalacijskih anestetika, koji uslijed procesa metaboliziranja mogu proizvesti određene količine ROS i tako modulirati redoks osjetljivost kalijских kanala (96, 119). Drugi predloženi mehanizam kojim inhalacijski anestetici smanjuju HVR je izravni učinak na kalijске kanale (na nivou karotidnih kemoreceptora) i ne mora imati veze s proizvodnjom ROS. Izravnim vezivanjem za kalijске kanale produžava se stanje otvorenosti kanala i mogućnost izlaska iona kalija izvan stanice, što dovodi do njene hipepolarizacije i smanjene podražljivosti. Nije sasvim poznato imaju li kalijски канали izraženo temeljno svojstvo osjetljivosti za kisik (senzori kisika), zbog npr. posjedovanja hema u svojoj strukturi ili su vezani uz druge strukture koje posjeduju to svojstvo. Membranski proteini koji sadržavaju hem, kao što je NADP oksidaza i/ili enzimi respiracijskog transportnog lanca unutar mitohondrija, kao što je citokrom c-oksidaza, mogli bi biti senzori kisika vezani uz kalijске kanale (119). Inhibicija elektronskog transportnog lanca u mitohondrijima može rezultirati promijenjenom, tj. povećanom proizvodnjom ROS (119).

Iako je HVR u ovom istraživanju i u istraživanju Careva i sur. bio očuvan, moguće je da je njegov oslabljeni intenzitet, nastao djelovanjem općih anestetika, rezultirao nedostatanim podražajem za nastanak pLTF-a (112). Pokazano je da akutni HVR snažno

pozitivno korelira s amplitudnim pLTF-om, što znači da će kod životinja kod kojih je HVR jače izražen doći i do intenzivnije aktivacije mehanizama na kojima se temelji manifestacija amplitudnog pLTF-a (28, 55). Smatra se da je veličina amplitude freničkoga živca tijekom akutnog hipoksijskog ventilacijskog odgovora najjači prediktivni čimbenik amplitudnog pLTF-a, što je prikazano i spomenutom jednadžbom za izračun amplitudnog pLTF-a (28, 55).

### **6.3. Mogući mehanizmi djelovanja inhalacijskih anestetika na pLTF**

Rezultati ove disertacije ne mogu ponuditi detaljan uvid u specifične mehanizme pomoću kojih inhalacijski anestetici utječu na respiracijsku plastičnost i pojavu pLTF-a. S obzirom na njihova višestruka mjesta djelovanja unutar respiracijskog kontrolnog sustava, mogući mehanizmi su brojni i još uvijek nedovoljno razjašnjeni (14, 80, 88). Poznato je da predloženi mehanizam nastanka pLTF-a podrazumijeva aktivaciju i integraciju nekoliko neurotransmiterskih i neuromodulacijskih sustava na spinalnom i supraspinalnom nivou (14, 21, 45-48). S obzirom da u razvoju respiracijske plastičnosti ključnu ulogu ima serotoninski neuromodulacijski sustav, možemo pretpostaviti da inhalacijski anestetici osim poznatih utjecaja na glavne inhibicijske i ekscitacijske neurotransmiterske sustave, utječu i na serotoninski neuromodulacijski sustav u kontroli disanja. Nedavno je pokazano da inhalacijski anestetici svoj hipnotski i imobilizacijski učinak dijelom postižu modulacijom serotoninske neuronske aktivnosti (120-121). Moglo bi se pretpostaviti da je modulacija serotoninskog sustava jedan od mehanizama pomoću kojeg inhalacijski anestetici sprječavaju nastanak pLTF-a (32, 80). Pokazano je da je i aktivacija noradrenalinskog sustava uključena u manifestaciju respiracijske plastičnosti i vjerojatno i serotoninski i noradrenalinski sustav sudjeluju u složenoj međusobnoj interakciji modulirajući krajnji respiracijski motorički izlaz (15-16, 50, 80). S obzirom da je za neke od kliničkih učinaka izoflurana pokazan mehanizam modulacije adrenergičnih receptora na spinalnom i supraspinalnom nivou, možemo

pretpostaviti da inhalacijski anestetici djelovanjem i na noradrenalinski sustav mogu modulirati respiracijsku plastičnost i pLTF (83). Također, već je pokazan njihov mogući učinak na razvoj neuralne plastičnosti u SŽS-u. Naime, sevofluran i izofluran su, ovisno o primjenjenoj dozi, inhibirajuće djelovali na sinaptičku plastičnost (stanični model učenja i pamćenja), a u višim dozama blokirali su hipokampalni LTP (80, 109-111). Predloženi mehanizam takvog učinka jest poticanje inhibicijske sinaptičke neurotransmisije posredovane GABA<sub>A</sub> receptorima i inhibicija oslobađanja glutamata iz presinaptičkih završetaka (109-111). Poznato je da su glutamatni NMDA receptori ključni u manifestaciji sinaptičke plastičnosti i pLTF-a (21, 57, 108). Također, respiracijski premotoneuroni koriste glutamatnu bulbospinalnu ekscitacijsku neurotransmisiju za prijenos respiracijskog podražaja do freničkoga motoneurona djelovanjem na glutamatne NMDA receptore (46, 57). Smatra se da je jedan od mogućih mehanizama depresijskog utjecaja inhalacijskih anestetika na razvoj respiracijske plastičnosti i pLTF-a, opća inhibicija glutamatne ekscitacijske neurotransmisije (85). Pokazano je da sevofluran i izofluran, reverzibilno i ovisno o dozi, suprimiraju ekscitacijsku neurotransmisiju posredovanu uglavnom NMDA, a u manjoj mjeri i AMPA glutamatnim receptorima i na taj način inhibiraju NMDA receptorima potaknutu depolarizaciju motornih neurona (81, 122).

U osnovi, inhalacijski anestetici svoje učinke postižu povećanjem inhibicijske GABA-ergičke i smanjenjem ekscitacijske glutamatne neurotransmisije (77, 85). Međutim inhalacijski anestetici dolaze u interakciju i s drugim receptorima i s više vrsta ionskih kanala. Pojačavaju inhibicijski učinak glicinskih receptora (posebice na spinalnoj razini), koji predstavljaju ligand-vezani kloridni ionski kanal čijom aktivacijom kloridni ioni ulaze u stanicu uzrokujući njenu hiperpolarizaciju i smanjenu podražljivost. Inhalacijski anestetici zatim inhibiraju ekscitacijske nikotinske acetilkolinske receptore (uglavnom neuronske) i višer vrsta ionskih kanala, voltažne kalcijске i natrijske i propusne (nevoltažne) kalijске



kanale (odgovorne za održavanje membranskog potencijala) (69, 80). U okviru djelovanja na respiracijsku funkciju, inhalacijski anestetici, kao i intravenski opći anestetici, uzrokuju izraženu globalnu depresiju respiracijskog sustava, koja je također primarno posredovana pojačanjem postsinaptičke GABA-ergičke inhibicije i redukcijom presinaptičke glutamatne ekscitacije (1, 69, 80, 85, 88).

Povećanje inhibicijske neurotransmisije uglavnom se postiže djelovanjem na sinaptičke i ekstrasinaptičke GABA<sub>A</sub> receptore izravnim vezivanjem za  $\alpha$ -podjedinicu GABA<sub>A</sub> receptora i/ili posrednim pojačanjem inhibicijskog učinka oslobođene GABA-e (123-124). Također je pokazan i presinaptički učinak povećanja oslobađanja GABA-e i/ili smanjenja njene ponovne pohrane u neuronske završetke (123). S obzirom da su GABA-ergički neuroni široko rasprostranjeni u SŽS-u i šalju svoje projekcije prema jezgrama feničkih motoneurona (na kojima je dokazano prisustvo GABA<sub>A</sub> receptora), moguće je da inhalacijski anestetici pojačavanjem inhibicijskog učinka GABA-ergičke sinaptičke transmisije ostvaruju svoj depresijski utjecaj na ritam i obrazac disanja i smanjenje feničkoga motoričkog odgovora (5, 69, 123, 125-126).

Smanjenje ekscitacijske neurotransmisije izazvano inhalacijskim anestheticima dovodi do globalne supresije neuronske funkcije na supraspinalnom i spinalnom nivou (69, 77, 88, 129). Pokazano je da je prevladavajući mehanizam djelovanja inhibicija oslobađanja glutamata iz presinaptičkih živčanih završetaka, a moguća je i izravna postsinaptička inhibicija glutamatnih receptora (77, 121, 128). Smatra se da je općenito inhibicija oslobađanja neurotransmitera jedan od važnijih mehanizama djelovanja inhalacijskih anestetika, a pokazano je da najvjerojatnije nastaje kao posljedica izravnih učinaka inhalacijskih anestetika na presinaptičke voltažne Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> ionske kanale, odgovorne za depolarizaciju stanice (Na<sup>+</sup> kanali) i posljedični ulazak kalcijevih iona u stanicu (Ca<sup>2+</sup> kanali), s konačnom posljedicom oslobađanja neurotransmitera iz presinaptičkih vezikula (77-78, 88).

Važnost djelovanja inhalacijskih anestetika na različite ionske kanale u objašnjenju njihovih kliničkih učinaka pogotovo je uočena u slučaju nevoltažnih (propusnih) kalijevih kanala. S obzirom da su kalijevski kanali ključni u održavanju neuronske (stanične) podražljivosti, bilo koji anestetik koji potiče njihovu pojačanu aktivaciju (koja rezultira povećanom provodljivošću za kalij, hiperpolarizacijom i smanjenom podražljivošću stanice), potencijalno može izazvati depresiju SŽS-a (88). Postoji više vrsta kalijevih kanala, a pokazano je da je vrsta tzv. propusnih (nevoltažnih)  $K^+_{2P}$  kanala, posebno osjetljiva na utjecaj inhalacijskih anestetika. Pokazano je da inhalacijski anestetici aktiviraju (otvaraju) nevoltažne  $K^+_{2P}$  ionske kanale na membrani kranijalnih i spinalnih motoneurona uzrokujući izlazak kalija iz stanice i posljedičnu hiperpolarizaciju i smanjenu podražljivost (79). Smanjena podražljivost doprinosi smanjenom odgovoru motoneurona na aktivaciju ekscitacijskih NMDA glutamatnih receptora, što može rezultirati imobilizacijskim učinkom. U slučaju freničkoga motoneurona, navedeni mehanizmi mogu dovesti do depresije ili potpunog prestanka temeljne neuralne aktivnosti freničkoga živca (pogotovo u višim dozama i produženom tijeku anestezije) (98, 129-130). I poslije izlaganja hipoksiji temeljna aktivnost freničkoga motoneurona može biti toliko suprimirana da se amplituda freničkoga živca ne može povećati bez obzira na adekvatan podražaj (86, 88). Upravo je utjecaj na neuronsku podražljivost jedan od mogućih mehanizama blokade pLTF-a. Osim spomenute inhibicije motoneuronske aktivnosti preko  $GABA_A$  receptora, smanjene podražljivosti motoneurona i posljedične inhibicije depolarizacije potaknute aktivacijom glutamatnih receptora, mogući mehanizmi uključuju i pojačanje inhibicijske funkcije spinalnih glicinskih receptora (81, 86, 122). Također, pokazano je da pri anestetskim koncentracijama inhalacijskih anestetika ( $MAC > 1.5$ ), globalna depresija respiracijskog sustava, osim slabljenja ili potpune blokade temeljne aktivnosti freničkoga živca, uključuje i depresiju centralnih i perifernih kemoreceptora i refleksnih puteva (87, 98, 129). Neovisno o mehanizmu nastanka globalno smanjene

neuronske aktivnosti, dosadašnje spoznaje pokazuju da inhalacijski anestetici mogu imati modulirajuće učinke na neuronsku funkciju i da na manifestaciju respiracijske plastičnosti i pLTF-a mogu utjecati smanjujući respiracijski motorički izlaz.

Kao što je već istaknuto, za nastanak pLTF-a, pogotovo amplitudnog, vrlo je važan očuvan i dovoljno izražen hipoksijski ventilacijski odgovor. Možemo pretpostaviti da inhalacijski anestetici, uzrokuju toliko izraženu depresiju cjelokupnog respiracijskog sustava, da ni očuvani ventilacijski odgovor na intermitentni hipoksijski podražaj (tj. porast amplitude PNA tijekom hipoksije), nije dostatan za odgovarajući podražaj potrebnih, a suprimiranih struktura uključenih u razvoj respiracijske plastičnosti, tj. pLTF-a. Osim toga inhalacijski anestetici mogu djelovati izravno na mehanizme nastanka i ekspresije samog hipoksijskog ventilacijskog odgovora, zbog čega on iako očuvan, može biti značajno oslabljen ili čak ugašen. Oslabljeni HVR rezultira nedovoljnim porastom amplitude PNA potrebnim za indukciju pLTF-a (28, 55).

#### **6.4. Utjecaji inhalacijskih anestetika na respiracijske parametre**

Što se tiče utjecaja na respiracijske parametre, u ovoj studiji pokazano je da sva tri ispitivana anestetika smanjuju temeljnu frekvenciju disanja u odnosu na neanestezirane Sprague-Dawley štakore (41.5 udisaj/min kod anesteziranih uretanom, odnosno 17.7 udisaja/min kod anesteziranih sevofluranom i izofluranom). Prosječna frekvencija disanja u budnih Sprague-Dawley štakora iznosi oko 70-90 udisaja/min (42, 131). Niža frekvencija u uretanskoj skupini u skladu je s većinom pLTF studija na istom modelu anesteziranog, vagotomiziranog, paraliziranog i mehanički ventiliranog štakora, koje uglavnom ne analiziraju bazalnu frekvenciju, već se baziraju na postojanju ili nepostojanju frekvencijskog pLTF-a (32, 44-45). Uglavnom, možemo zaključiti da je frekvencija disanja važan čimbenik u manifestaciji pLTF-a i da se ne bi trebala zanemariti u analizama. Evidentno je da su

sevofluran i izofluran pokazali značajan depresivni učinak na frekvenciju freničkoga živca u našem animalnom modelu. Nedavne *in vitro* studije učinjene na preparatima moždanog debla s kralježničnom moždinom u štakora, pokazale su da je preBötC kompleks potencijalno mjesto odgovorno za sevofluranom uvjetovano usporavanje respiracijske frekvencije, i to moguće preko učinaka na GABA<sub>A</sub> receptore (85-86, 131). Promjene u frekvenciji freničkoga živca i promjene u respiracijskim parametrima, vjerovatno su posljedica utjecaja na središnji generator disanja, tj. na središnje respiracijske neurone odgovorne za stvaranje temeljnog ritma disanja i na respiracijske premotoneurone odgovorne za stvaranje obrasca disanja, a mogući su i izravni utjecaji na respiracijske motoneurone (85-86, 88).

#### **6.5. Održavanje acidobazne i hemodinamske ravnoteže**

U respiracijskim studijama bazalna vrijednost PaCO<sub>2</sub> postavlja se 2-4 mmHg iznad apnejičkog praga s ciljem održavanja stabilnog signala freničkoga živca. Određivanje apnejičkog praga postupak je definiranja one razine PaCO<sub>2</sub> kod koje se gubi signal aktivnosti freničkoga živca, tj. javlja se apneja ili prestanak disanja. U prezentiranoj studiji u svim ispitnim skupinama održavana je izokapnija tijekom pokusa. Međutim, primjećeno je da se kod uretanski i sevofluranski anesteziranih štakora apnejički prag brže određivao, a nakon podizanja PaCO<sub>2</sub> za 2-4 mmHg, uglavnom se uspostavljao stabilan signal freničkoga živca. Za razliku od toga, kod izofluranski anesteziranih štakora bilo je potrebno više vremena za stabilizaciju signala i nešto više vrijednosti PaCO<sub>2</sub> za dobijanje bazalnog signala, a također i za održavanje signala stabilnim tijekom cijelog pokusa. Općenito bi to bilo u skladu s podacima iz literature prema kojima je izofluran jači depresor bazalnog disanja od sevoflurana (88, 98). U nekih štakora, i to više u onih anesteziranih izofluranom, bez obzira na manipulaciju vrijednosti PaCO<sub>2</sub>, nismo uspjeli dobiti bazalni signal, ni održati stabilnost signala tijekom pokusa, zbog čega u tih životinja nismo izvršili analizu freničkoga

neurograma. Zanimljivo je to što se u određenom broju životinja koje su razvile apneju ipak uspio izazvati HVR, što znači da se bez obzira na bazalnu apneju, uz dodatni hipoksijski podražaj pojavila aktivnost freničkoga živca, što je također u skladu s istraživanjem Karanovića i sur. (98).

Zbog poznate pojave sinergističkog učinka dva podražaja na disanje (hipoksije i hiperkapnije), nešto viša vrijednost  $\text{PaCO}_2$  u izofluranski anesteziranih štakora (statistički neznčajna), koja je bila potrebna za održavanje stabilnosti signala freničkoga živca tijekom pokusa, mogla je dijelom utjecati na manifestaciju HVR-a, te bi se moglo nagađati da je HVR u izofluranski anesteziranih štakora precijenjen (103). Za očekivati bi bilo da će izraženiji HVR, doprinjeti nastanku pLTF-a, međutim pLTF je izostao. Stoga se može zaključiti da tijekom pokusa nije bilo bitnijih utjecaja  $\text{PaCO}_2$  na disanje i da se izokapnija uspijevala održati u svim životinjskim skupinama. U izofluranskoj skupini se i nešto viša razina početnih vrijednosti  $\text{PaCO}_2$  također uspijevala održavati konstantnom do kraja pokusa (izokapnija).

Vrijednosti sistemskog arterijskog tlaka uspješno su održavane tijekom pokusa i nisu se smanjivale više od 15-20% u odnosu na bazalne vrijednosti. Jedino značajno sniženje primjećeno je tijekom hipoksijskih epizoda u svim ispitnim skupinama. Hipotenzija je vjerovatno uzrokovana učincima same hipoksije, potpomognuta dodatnim depresijskim utjecajem inhalacijskih anestetika na kontraktilnost miokarda i periferni vaskularni otpor (68). Zbog relativno dugog trajanja pokusa, moguće je da su produženi tijekom anestezije, gubici krvi, pomaci tekućina i hipotenzija, mogli utjecati na promjene u metaboličkom statusu i perfuziji tkiva i organa. Sama hipotenzija, blaga hiperkanija i eventualna acidoza zapravo su mogli potaknuti, a ne spriječiti pLTF. Nakon završetka AIH protokola prosječni srednji arterijski tlak vratio se na bazalne vrijednosti u svim skupinama. Zbog navedenog, smatramo da u životinja nije postojala neodgovarajuća tkivna perfuzija, pogotovo zato što slično sniženje

sistenskog arterijskog tlaka, koje je primjećeno i u drugim pLTF studijama, nije utjecalo na respiracijski motorički izlaz i ishod istraživanja (32, 44, 112).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom, u koncentraciji od 1.4 MAC, sprječava nastanak dugoročne facilitacije freničkoga živca u štakora u modelu akutnih ponavljanih hipoksija. Dobiveni rezultati pokazuju da specifična vrsta anestetika utječe na manifestaciju pLTF-a. U štakora anestetiziranih uretanom, 60 minuta nakon završetka AIH protokola, amplituda freničkoga živca značajno se povećala u odnosu na bazalne prijehipoksijske vrijednosti, tj. došlo je do manifestacije amplitudnog pLTF-a, dok se frekvencija nije značajno promijenila. U štakora anestetiziranih sevofluranom i izofluranom nije došlo do povećanja amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon završetka AIH protokola u odnosu na prijehipoksijske vrijednosti, tj. pojava amplitudnog pLTF-a je izostala. Unatoč sniženoj bazalnoj frekvenciji disanja, a prema čemu bi se mogao očekivati frekvencijski pLTF, nije došlo ni do pojave frekvencijskog pLTF-a.
2. Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom smanjuje hipoksijski ventilacijski odgovor u odnosu na uretansku monoanesteziju. Rezultati studije pokazali su značajno povećanje aktivnosti freničkoga živca tijekom svih pet hipoksijskih epizoda u sve tri ispitne skupine, međutim u štakora anestetiziranih sevofluranom i izofluranom, unatoč očuvanosti, HVR je bio značajno manje izražen u odnosu na HVR u štakora anestetiziranih uretanom. Također, unatoč očuvanom HVR-u, moguće je da je inhalacijskim anesticima uzrokovano smanjenje njegove ekspresije rezultiralo nedovoljnim početnim poticajem za razvoj pLTF-a.
3. Inhalacijska monoanestezija sevofluranom i izofluranom uzrokovala je promjenu ritma i obrasca disanja u odnosu na uretansku anesteziju. Rezultati studije pokazali su značajne promjene u frekvenciji disanja i respiracijskim parametrima u štakora

anesteziranih sevofluranom i izofluranom u odnosu na štakore iz kontrolne skupine. Navedene promjene upućuju na mogućnost značajnog depresijskog učinka inhalacijskih anestetika na respiracijske neurone u središnjem generatoru disanja.

4. Ova studija ne može ponuditi precizan odgovor o mehanizmu djelovanja inhalacijskih anestetika na pojavu pLTF-a, međutim zbog dokazane ključne uloge serotonina u mehanizmu njegovog nastanka, možemo pretpostaviti da inhalacijski anestetici utječu i na serotoninski neuromodulacijski sustav u kontroli disanja. Vjerojatno se radi o kombiniranim učincima inhalacijskih anestetika na neurone u središnjem generatoru disanja, glavne neurotransmitterske i neuromodulacijske sustave, sinaptičku plastičnost, kemoreceptorsku funkciju i ekspresiju hipoksijskog ventilacijskog odgovora.
5. S obzirom da je prikazani životinjski model prikladan za ispitivanje utjecaja općih anestetika na disanje, navedeni rezultati mogu imati i kliničkog značaja, posebice kod bolesnika ovisnih o respiracijskoj plastičnosti, a koji će biti podvrgnuti inhalacijskoj anesteziji.



## 8. ZNANSTVENI DOPRINOS I KLINIČKA RAZMATRANJA

Do sada nije ispitan utjecaj inhalacijskih anestetika na razvoj respiracijske plastičnosti. Ova studija otvorila je mogućnost dokazivanja inhibirajućeg učinka sevoflurana i izoflurana, inhalacijskih anestetika svakodnevno korištenih u anesteziološkoj praksi, na pojavu dugoročnog pojačanja disanja.

Dugoročna facilitacija freničkoga živca primjer je manifestacije temeljnog svojstva plastičnosti respiracijskog kontrolnog sustava koja se razvija kao oblik fiziološke prilagodbe na podražaj ponavljane akutne hipoksije (14, 21). Pokazalo se da može imati važnu ulogu u održavanju respiracijske homeostaze u nekim poremećajima disanja, kao što je opstruktivna apneja tijekom spavanja i u određenim patofiziološkim stanjima koja mogu biti praćena i poremećajima ventilacije, kao što su ozljede viših segmenata kralježnične moždine i teži stadiji kronične opstruktivne plućne bolesti i nekih neuroloških bolesti (63, 133-134).

Što se tiče OSA-e, u kliničkom smislu ona podrazumijeva skup simptoma koji se mogu povezati s pojavom intermitentne noćne hipoksemije (64). OSA se zadnjih godina sve više prepoznaje kao ozbiljan zdravstveni problem u populaciji, s obzirom da postoji velik broj dokaza da su različite kardiovaskularne bolesti, neurokognitivni i metabolički poremećaji povezani upravo s izlaganjem intermitentnoj hipoksiji (63). Također, kod kirurških bolesnika s OSA-om, primjećena je značajno veća učestalost različitih perioperacijskih komplikacija (64). Smatra se da bi razvoj respiracijskog LTF-a mogao ograničiti pojavu apnejičkih epizoda i spriječiti napredovanje OSA-e (63).

Cilj fizioloških i patofizioloških studija na animalnim modelima je uvid u mogućnosti istraživanja i dokazivanja određenog fenomena i kod ljudi (što je bio slučaj i s LTF-om), kao i kreiranja što detaljnijih i preciznijih standardnih protokola za daljnja istraživanja i u ljudi i u životinja (22, 115). Zbog toga su studije na animalnom modelu važne u dokazivanju stvarne uloge respiracijskog LTF-a. U anestetiziranih životinja, respiracijski LTF uglavnom se očituje pojačanom aktivnošću freničkoga živca, koji inervira ošit (pLTF) ili pojačanom aktivnošću

hipoglosalnog živca, koji inervira mišiće odgovorne za održavanje stabilnosti gornjeg dišnog puta (hipoglosalni ili XII LTF) (32, 55). Sve veći broj spoznaja o složenim mehanizmima nastanka pLTF-a i hipoglosalnog LTF-a (ispitivanih u animalnim studijama), pogotovo na sinaptičkom i stanično-molekularnom nivou, pružaju uvid i u mogućnosti razvoja terapijskih metoda u liječenju poremećaja ventilacije (54, 135).

U skladu s tim, ova disertacija pokazala je mogućnost uporabe animalnog modela u istraživanjima utjecaja različitih anestetika i drugih lijekova koji se koriste u svakodnevnoj anesteziološkoj praksi na kontrolu disanja. Nakon Karanovića i sur. ovo je druga studija u kojoj se na istom modelu uspoređivalo djelovanje anestetskih doza dva najčešće korištena inhalacijska anestetika (sevoflurana i izoflurana), na ritam i obrazac disanja, kako u bazalnim uvjetima, tako i tijekom izlaganja hipoksiji (98). Također, u ovoj studiji se prvi put uspoređivalo djelovanje spomenutih inhalacijskih anestetika na prilagodbu disanja uvjetima ponavljane akutne hipoksije, s ciljem otkrivanja njihovog mogućeg depresijskog utjecaja na razvoj respiracijske plastičnosti.

Pokazano je da različiti anestetici, a pogotovo oni koji se često koriste u svakodnevnoj anesteziološkoj praksi, uključujući i opioidne analgetike, mogu značajno utjecati na kontrolne mehanizme prilagodbe disanja i razvoj respiracijske plastičnosti. Rezultati studije Careva i sur., Ivančev i sur., kao i rezultati naše studije, naglašavaju spoznaju da izbor anestetika, uključujući i opioidne analgetike, može biti važan i zbunjujući čimbenik u interpretaciji pLTF-a (112-113). Istraživanje modulacijskih utjecaja općih anestetika i opioidnih analgetika na respiracijsku plastičnost može povećati svjesnost o važnosti respiracijskog LTF-a u očuvanju zadovoljavajuće respiracijske funkcije u bolesnika koji će biti podvrgnuti operaciji, općoj anesteziji i opioidnoj analgeziji, a posebice kod predisponiranih (63-64, 112-113, 133). Spoznaja da primjena različitih anestetika u bolesnika s nekim od navedenih poremećaja disanja može dodatno ugroziti takve bolesnike i povećati im perioperacijske rizike, ukazuje na

potrebu za odgovarajućom prijeoperacijskom pripremom, pojačanim perioperacijskim nadzorom i oprezom pri izboru anestetika (64, 112, 136). Poznato je da bolesnici s OSA-om imaju povećani rizik od poslijeoperacijskih komplikacija, povećanu učestalost prijema u JIL (jedinica intenzivnog liječenja) i produženo trajanje hospitalizacije (64, 136).

Rezultati ove studije potiču na promišljanje o kreiranju ciljanih istraživanja, kao što je primjena različitih agonista i antagonista ključnih neurotransmiterskih i neuromodulacijskih sustava vezanih uz kontrolu disanja, npr. na razini karotidnih tjelešaca ili centralne primjene lijekova. Zanimljivo je da su Teppema i sur. pokazali da primjena supstanci s antioksidativnim svojstvima prije izlaganja inhalacijskim anestheticima sprječava suprimirajući učinak inhalacijskih anestetika na HVR (119). U skladu s tim rezultati ove studije mogli bi daljnja istraživanja usmjeriti prema otkrivanju potencijalno zaštitne uloge antioksidansa (primjenjenih prije izlaganja inhalacijskoj anesteziji), na razvoj respiracijske plastičnosti (95).

## 9. SAŽETAK

Dugoročna facilitacija freničkoga živca (pLTF, engl. *phrenic long-term facilitation*), predstavlja oblik respiracijske plastičnosti koji se očituje povećanjem amplitudne aktivnosti freničkoga živca (PNA, engl. *phrenic nerve activity*), nakon izlaganja epizodama akutne intermitente hipoksije (AIH, engl. *acute intermittent hypoxia*). Cilj je bio istražiti djelovanje sevofluranske i izofluranske monoanestezije, u jednakoj anestetskoj dozi, na pojavu amplitudnog pLTF-a. Pokusi su provedeni na anesteziranim, vagotomiziranim i mehanički ventiliranim Sprague-Dawley štakorima. Formirane su dvije pokusne skupine (sevofluranska i izofluranska) i kontrolna skupina (anestezirana uretanom). Analizirani su amplituda i frekvencija freničkoga živca i respiracijski parametri ( $T_i$  - trajanje inspirija,  $T_e$  - trajanje ekspirija i  $T_{tot}$  - trajanje cijelog respiracijskog ciklusa), tijekom pet hipoksijskih epizoda i 15, 30 i 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, uspoređeni s bazalnim vrijednostima parametara. U kontrolnoj skupini prosječna amplituda freničkoga živca povećala se za  $173.03 \pm 70.16\%$  ( $P < 0.001$ ), 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode u usporedbi s bazalnim vrijednostima, tj. došlo je do pojave amplitudnog pLTF-a. U sevofluranskoj i izofluranskoj skupini nije došlo do povećanja amplitude, već naprotiv do njenog sniženja za  $15.79 \pm 15.18\%$  u sevofluranskoj i  $31.00 \pm 11.00\%$  u izofluranskoj skupini ( $P > 0.05$ ). Sevofluranska i izofluranska monoanestezija spriječile su pojavu amplitudnog pLTF-a.

Ključne riječi: intermitentna hipoksija, izofluran, frenički živac, štakor, respiracijska plastičnost, sevofluran.

## 10. SUMMARY

Phrenic long-term facilitation (pLTF) is a form of respiratory plasticity, manifested by prolonged increase in peak amplitude of phrenic nerve activity (PNA) after episodes of acute intermittent hypoxia (AIH). The aim was to investigate the effects of sevoflurane and isoflurane monoanesthesia at equipotent anesthetic doses on the expression of amplitude pLTF. Experiments were performed on Sprague-Dawley anesthetized, vagotomized, and mechanically ventilated rats. Two experimental groups, sevoflurane and isoflurane, and a control group (urethane-anesthetized) were formed. Peak amplitude of phrenic nerve activity, respiratory frequency and breathing rhythm parameters ( $T_i$ , inspiratory duration;  $T_e$ , expiratory duration; and  $T_{tot}$ , total respiratory time duration) were analyzed during hypoxic episodes, and at 15, 30, and 60 min after the last hypoxic episode. In the control group average PNA increased by  $173.03 \pm 70.16\%$  ( $p < 0.001$ ), at 60 min after the last hypoxic episode compared to baseline values. Therefore amplitude pLTF was induced. In the sevoflurane and isoflurane groups PNA failed to increase, and in fact decreased by  $15.79 \pm 15.18\%$  and  $31.00 \pm 11.00\%$ , respectively ( $p > 0.05$ ). Amplitude pLTF was abolished during sevoflurane and isoflurane monoanesthesia.

Keywords: intermittent hypoxia, isoflurane, phrenic nerve, rat, respiratory plasticity, sevoflurane.

## 11. LITERATURA

1. Haji A, Takeda R, Okazaki M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 2000;86:277-304.
2. Smith JC, Abdala AP, Rybak IA, Paton JF. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:2577-87.
3. Farber NE, Pagel PS, Warltier DC. Pulmonary Pharmacology. U: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. *Miller's Anesthesia*. Volume 1. Section III. 7 th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009, p. 561-94.
4. McCrimmon DR, Monnier A, Hayashi F, Zuperku EJ. Pattern formation and rhythm generation in the ventral respiratory group. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:126-31.
5. Pecotić R. Učinak GABA-e i serotonina na disanje praćen promjenama aktivnosti freničkog živca (disertacija). Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2008.
6. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:239-66.
7. Duffin J. Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol* 2004;89:517-29.
8. Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:232-42.
9. Hilaire G, Dutschmann M. Foreword: Respiratory rhythmogenesis. *Respir Physiol Neurobiol* 2009;168:1-3.
10. Prabhakar NR. O<sub>2</sub> sensing at the mammalian carotid body: why multiple O<sub>2</sub> sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* 2006;91:17-23.

11. Nurse CA. Peripheral chemoreceptors: sensors of metabolic status. U: Ward DS, Dahan A, Teppema LJ. *Pharmacology and Pathophysiology of the Control of Breathing*. New York: Taylor & Francis; 2005, p. 3-19.
12. Okada Y, Kuwana S, Chen Z, Ishiguro M, Oku Y. The central respiratory chemoreceptor: Where is it located? *Adv Exp Med Biol* 2009;648:377-85.
13. Teppema LJ, Dahan A. Central chemoreceptors. U: Ward DS, Dahan A, Teppema LJ. (Eds.). *Pharmacology and Pathophysiology of the Control of Breathing*. New York: Taylor & Francis; 2005, p. 21-70.
14. Mitchell GS, Johnson SM. Invited Review: Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 2003;94:358-74.
15. Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS. Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130:207-18.
16. Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS. Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol* 2001;29:25-35.
17. Richter DW. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J Exp Biol* 1982;100:93-107.
18. Ault ML, Stock MC. Respiratory function. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan M, Stock MC. *Clinical Anesthesia*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009, p. 233-55.
19. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 1998;112:123-34.

20. Powell FL, Bickler PE. High Altitude. U: Ward DS, Dahan A, Teppema LJ. Pharmacology and Pathophysiology of the Control of Breathing. New York: Taylor & Francis; 2005, p. 571-652.
21. Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA et al. Invited Review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol* 2001;90:2466-75.
22. Mateika JH, Sandhu KS. Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;176:1-11.
23. Baker TL, Mitchell GS. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 2000;520:215-19.
24. Dahan A, Romberg R, Sarton E, Teppema LJ. The influence of inhalational anesthetics on carotid body mediated ventilatory responses. U: Ward DS, Dahan A, Teppema LJ. Pharmacology and Pathophysiology of the Control of Breathing. New York: Taylor & Francis; 2005, p. 571-652.
25. Teppema LJ, Dahan A. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev* 2010;90:675-754.
26. Neubauer JA, Sunderram J. Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol* 2004;96:367-74.
27. Neubauer JA. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2001;90:1593-9.
28. Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol* 2000;121:135-46.
29. Baker-Herman TL, Strey KA. Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;179:48-56.



30. Fregosi RF, Mitchell GS. Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol* 1994;477:469-79.
31. Mateika JH, 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.
32. Bach KB, Mitchell GS. Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol* 1996;104:251-60.
33. McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL. Episodic hypoxia evokes long-term facilitation of genioglossus muscle activity in neonatal rats. *J Physiol* 2004;557:13-18.
34. Fuller DD. Episodic hypoxia induces long-term facilitation of neural drive to tongue protruder and retractor muscles. *J Appl Physiol* 2005;98:1761-7.
35. Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB Jr, Mitchell GS. Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J Neurosci* 2001;21:5381-8.
36. McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 2003;95:1499-508.
37. Peng YJ, Prabhakar NR. Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2003;94:2342-9.
38. Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10073-8.

39. Hayashi F, Coles SK, Bach KB, Mitchel GS, McCrimmon DR. Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am J Physiol* 1993;265:811-19.
40. Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by a new central neural mechanism. *Respir Physiol* 1980;42:87-103.
41. Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS. Selected Contribution: Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *J Appl Physiol* 2001;90:2001-6.
42. McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 2002;93:2155-61.
43. Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir Physiol* 1980;42:171-88.
44. Kinkead R, Mitchell GS. Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. *Am J Physiol* 1999;277:658-66.
45. Baker-Herman TL, Mitchell GS. Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci* 2002;22:6239-46.
46. McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats. *J Physiol* 2005;567:599-611.
47. 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.

48. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. Role of 5-HT<sub>1</sub>(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;175:146-52.
49. Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Valic M, Dogas Z. Acute intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation which is modulated by 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the caudal raphe region of the rat. *J Sleep Res* 2012;21:195-203.
50. Neverova NV, Saywell SA, Nashold LJ, Mitchell GS, Feldman JL. Episodic stimulation of alpha<sub>1</sub>-adrenoreceptors induces protein kinase C-dependent persistent changes in motoneuronal excitability. *J Neurosci* 2007;27:4435-42.
51. Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, et al. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci* 2004;7:48-55.
52. MacFarlane PM, Satriotomo I, Windelborn JA, Mitchell GS. NADPH oxidase activity is necessary for acute intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. *Physiol* 2009;587:1931-42.
53. MacFarlane PM, Wilkerson JER, Lovett-Barr MR, Mitchell GS. Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164:263-7.
54. Wilkerson JER, MacFarlane PM, Hoffman MS, Mitchell GS. Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1269-72.
55. Baker-Herman TL, Mitchell GS. Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;162:8-17.

56. Olson EB Jr, Bohne CJ, Dwinell MR, Podolsky A, Vidruk EH, Fuller DD, Powell FL, Mitchell GS. Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. *J Appl Physiol* 2001;91:709-16.
57. Ling L. Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164:233-41.
58. Chowdhuri S, Pierchala L, Aboubakr SE, Shkoukani M, Badr MS. Long-term facilitation of genioglossus activity is present in normal humans during NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160:65-75.
59. McEvoy RD, Popovic RM, Saunders NA, White DP. Effects of sustained and repetitive isocapnic hypoxia on ventilation and genioglossal and diaphragmatic EMGs. *J Appl Physiol* 1996;81:866-75.
60. Jordan AS, Catcheside PG, O'Donoghue JF, McEvoy RD. Long-term facilitation of ventilation is not present during wakefulness in healthy men or women. *J Appl Physiol* 2002;93:2129-36.
61. Harris DP, Balasubramaniam A, Badr MS, Mateika JH. Long-term facilitation of ventilation and genioglossus muscle activity is evident in the presence of elevated levels of carbon dioxide in awake humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:1111-9.
62. Aboubakr AE, Taylor A, Ford R, Siddiqi S, Badr SM. Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. *J Appl Physiol* 2001;91:2751-7.
63. Mahamed S, Mitchell GS. Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp Physiol* 2007;92:27-37.
64. Chung SA, Yuan H, Chung F. A systemic review of obstructive sleep apnea and its implications for anesthesiologists. *Anesth Analg* 2008;107:1543-63.

65. Babcock M, Shkoukani M, Aboubakr SE, Badr MS. Determinants of long-term facilitation in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* 2003;94:53-9.
66. Pierchala LA, Mohammed AS, Grullon K, Mateika JH, Badr MS. Ventilatory long-term facilitation in non-snoring subjects during non-REM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160:259-66.
67. White DP. Long-term facilitation (LTF) and obstructive sleep apnea (commentary to short communication). *Respir Physiol Neurobiol* 2007;158:112-3.
68. Ebert TJ, Schmid PG. Inhaled Anesthetics. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan M, Stock MC. *Clinical Anesthesia*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009, p. 413-43.
69. Perouansky M, Pearce RA, Hemmings HC Jr. Inhaled Anesthetics: Mechanisms of Action. U: Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. *Miller's Anesthesia*. Volume 1. Section III. 7 th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009, p. 515-38.
70. Eger EI: A brief history of the origin of minimum alveolar concentration (MAC). *Anesthesiology* 2002;96:238-239.
71. Mazze RI, Rice SA, Baden JM. Halothane, isoflurane, and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats. *Anesthesiology* 1985;62:339-41.
72. Kashimoto S, Furuya A, Nonaka A, Oguchi T, Koshimizu M, Kumazawa T. The minimum alveolar concentration of sevoflurane in rats. *Eur J Anaesthesiol* 1997;14:359-61.
73. Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003;348:2110-24.

74. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994;367:607-14.
75. Franks NP. Molecular targets underlying general anaesthesia. *Br J Pharmacol* 2006;147:72-81.
76. Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:709-20.
77. Hemmings HC Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth* 2009;103:61-9.
78. Orestes P, Todorovic SM. Are neuronal voltage-gated calcium channels valid cellular targets for general anesthetics? *Channels* 2010;4:518-22.
79. Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C 3rd, Bayliss DA. The TASK-1 two-pore domain K<sup>+</sup> channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci* 2000;20:6347-54.
80. Teppema LJ, Baby S. Anesthetics and control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;177:80-92.
81. Matute E, Lopez-Garcia JA. Characterisation of sevoflurane effects on spinal somato-motor nociceptive and non-nociceptive transmission in neonatal rat spinal cord: an electrophysiological study in vitro. *Neuropharmacology* 2003;44:811-6.
82. Wakai A, Kohno T, Yamakura T, Okamoto M, Ataka T, Baba H. Action of isoflurane on the substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *Anesthesiology* 2005;102:379-86.
83. Kingery WS, Agashe GS, Guo TZ, Sawamura S, Davies MF, Clark JD, Kobilka BK, Maze M. Isoflurane and nociception: spinal alpha<sub>2</sub>A adrenoceptors mediate antinociception while supraspinal alpha<sub>1</sub> adrenoceptors mediate pronociception. *Anesthesiology* 2002;96:367-74.

84. Dahan A. General anesthesia and control of respiration. *Semin Anesth* 1996;15:328-34.
85. Stuth EA, Stucke AG, Brandes IF, Zuperku EJ. Anesthetic effects on synaptic transmission and gain control in respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164:151-9.
86. Kuribayashi J, Sakuraba S, Kashiwagi M, Hatori E, Tsujita M, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana Shu-ichi. Neural mechanisms of sevoflurane-induced respiratory depression in newborn rats. *Anesthesiology* 2008;109:233-42.
87. Dahan A, Olofsen E, Teppema L, Sarton E, Olievier C. Speed of onset and offset and mechanisms of ventilatory depression from sevoflurane: an experimental study in the cat. *Anesthesiology* 1999;90:1119-28.
88. Stuth EA, Zuperku EJ, Stucke AG. Central effects of general anesthesia. U: Ward DS, Dahan A, Teppema LJ. *Pharmacology and Pathophysiology of the Control of Breathing*. New York: Taylor & Francis; 2005, p. 571-652.
89. Doi M, Ikeda K. Respiratory effects of sevoflurane. *Anesth Analg* 1987;66:241-4.
90. Fourcade HE, Stevens WC, Larson CPJ, et al: The ventilatory effects of Forane, a new inhaled anesthetic. *Anesthesiology* 1971;35:26-31.
91. Knill RL, Kieraszewicz HT, Dodgson BG, Clement JL. Chemical regulation of ventilation during isoflurane sedation and anaesthesia in humans. *Can Anaesth Soc J* 1983;30:607-14.
92. Ward DS. Inhalational anesthetics and control of breathing during hypoxia. *Anesthesiology Clinics of North America* 1998;16:77-88.
93. Pandit JJ. The variable effect of low-dose volatile anaesthetics on the acute ventilatory response to hypoxia in humans: a quantitative review. *Anaesthesia* 2002;57:632-43.

94. Pandit JJ. Effect of low dose inhaled anaesthetic agents on the ventilatory response to carbon dioxide in humans: a quantitative review. *Anaesthesia* 2005;60:461-9.
95. Dahan A, Teppema LJ. Influence of anaesthesia and analgesia on the control of breathing. *Br J Anaesth* 2003;91:40-9.
96. Pandit JJ. Volatile anesthetics and the hypoxic ventilatory response: effects, clinical implications, and future research. *Semin Anesth Perioperat Med Pain* 2007;26:49-57.
97. Groeben H, Meier S, Tankersley CG, Mitzner W, Brown RH. Influence of volatile anaesthetics on hypercapnoeic ventilatory responses in mice with blunted respiratory drive. *Br J Anaesthesiol* 2004;92:697-703.
98. Karanovic N, Pecotic R, Valic M, Jeroncic A, Carev M, Karanovic S, et al. The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia in rats. *Anaesthesia* 2010;65:227-34.
99. Sjögren D, Lindahl SG, Sollevi A. Ventilatory responses to acute and sustained hypoxia during isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 1998;86:403-9.
100. Sjögren D, Lindahl SG, Gottlieb C, Sollevi A. Ventilatory responses to acute and sustained hypoxia during sevoflurane anesthesia in women. *Anesth Analg* 1999;89:209-14.
101. Dahan A, Tepema L. Editorial I. Influence of low-dose anaesthetic agents on ventilatory control: where do we stand? *Br J Anaesth* 1999;83:199-201.
102. Pandit JJ, O'Gallagher K. Effects of volatile anesthetics on carotid body response to hypoxia in animals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008;605:46-50.



103. Robotham JL. Do low dose inhalational anesthetic agents alter ventilatory control? *Anesthesiology* 1994;80:723-6.
104. Pandit JJ, Manning-Fox J, Dorrington KL, Robins PA. Effects of subanesthetic sevoflurane on ventilation. 2: Response to acute and sustained hypoxia in humans. *Br J Anaesthesiol* 1999;83:210-16.
105. Dahan A, Sarton E, van den Elsen, van Kleef J, Teppema L, Berkenbosch A. Ventilatory responses to hypoxia in humans. Influence of subanesthetic desflurane. *Anesthesiology* 1996;85:60-8.
106. Van den Elsen M, Dahan A, DeGoede J, Berkenbosch A, van Kleef J. Influences of subanesthetic isoflurane on ventilatory control in humans. *Anesthesiology* 1995;83:478-90.
107. Sarton E, Dahan A, Teppema L, et al. Acute pain and central nervous system arousal do not restore impaired hypoxic ventilatory response during sevoflurane sedation. *Anesthesiology* 1996;85:295-303.
108. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.
109. Simon W, Hapfelmeier G, Kochs E, Zieglgänsberger W, Rammes G. Isoflurane blocks synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Anesthesiology* 2001;94:1058-65.
110. Ishizeki J, Nishikawa K, Kubo K, Saito S, Goto F. Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through gamma-aminobutyric acid-mediated mechanisms. *Anesthesiology* 2008;108:447-56.

111. Haseneder R, Kratzer S, von Meyer L, Eder M, Kochs E, Rammes G. Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 2009;623:47-51.
112. 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.
113. 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.
114. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia* 1986;42:531-7.
115. Mitchell GS, Terada J. Should we standardize protocols and preparations used to study respiratory plasticity? *Respir Physiol Neurobiol* 2011;177:93-7.
116. Eriksson LI. The effects of residual neuromuscular blockade and volatile anesthetics on the control of ventilation. *Anesth Analg* 1999;89:243-51.
117. Jonsson M, Wyon N, Lindahl SGE, Fredholm BB, Eriksson LI. Neuromuscular blocking agents block carotid body neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 2004;497:173-80.
118. AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:669-96.
119. Teppema LJ, Romberg RR, Dahan A. Antioxidants reverse reduction of the human hypoxic ventilatory response by subanesthetic isoflurane. *Anesthesiology* 2005;102:747-53.

120. Mukaida K, Shichino T, Koyanagi S, Himukashi S, Fukuda K. Activity of the serotonergic system during isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 2007;104:836-9.
121. Zhang Y, Laster MJ, Eger EI 2nd, Stabernack CR, Sonner JM. Blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors may mediate or modulate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003;97:475-9.
122. Nishikawa K, MacIver MB. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* 2000;92:228-36.
123. Kotani N, Akaike N. The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Res Bull* 2013;90:10-8.
124. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 1997;389:385-9.
125. Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y, Aoki M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neurosci Res* 2006;56:322-31.
126. Chitravanshi VC, Sapru HN. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat. *Brain Res* 1999;821:443-60.
127. Takeda R, Haji A. Cellular effects of isoflurane on bulbar respiratory neurons in decerebrate cats. *Jpn J Pharmacol* 1993;62:57-65.
128. MacIver MB, Mikulec AA, Amagasu SM, Monroe FA. Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 1996;85:823-34.

129. Masuda A, Haji A, Kiriya M, Ito Y, Takeda R. Effects of sevoflurane on respiratory activities in the phrenic nerve of decerebrate cats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;39:774-81.
130. Stucke AG, Stuth EA, Tonkovic-Capin V, Tonkovic-Capin M, Hopp FA, Kampine JP, i sur. Effects of sevoflurane on excitatory neurotransmission to medullary expiratory neurons and on phrenic nerve activity in a decerebrate dog model. *Anesthesiology* 2001;95:485-91.
131. Strohl KP, Thomas AJ, St. Jean P, Schlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 1997;82:317-23.
132. Takita K, Morimoto Y. Effects of sevoflurane on respiratory rhythm oscillators in the medulla oblongata. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;173:86-94.
133. Golder FJ, Mitchell GS. Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 2005;25:2925-32.
134. Serebrovskaya T, Karaban I, Mankovskaya I, Bernardi L, Passino C, Appenzeller O. Hypoxic ventilatory responses and gas exchange in patients with Parkinson's disease. *Respiration* 1998;65:28-33.
135. Wilkerson JE, Mitchell GS. Daily intermittent hypoxia augments spinal BDNF levels, ERK phosphorylation and respiratory long-term facilitation. *Exp Neurol* 2009;217:116-23.
136. Vasu TS, Grewal R, Doghramji K. Obstructive sleep apnea syndrome and perioperative complications: a systematic review of the literature. *J Clin Sleep Med* 2012;8:199-207.

## **12. ŽIVOTOPIS**

### **Osobni podatci**

Datum i mjesto rođenja: 19.02.1974., Sisak, Republika Hrvatska

Adresa: Ruđera Boškovića 15, 21000 Split

Telefon: 021/470-420

Mobitel: 098/870-200

Elektronička pošta: vmarinov@net.hr

### **Školovanje**

Osnovna škola: Sisak, Split (1980. - 1988.).

Srednja škola: Matematičko-informatički obrazovni centar, Split (1988. - 1992.).

Fakultet: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Split (1993. - 1995.); Zagreb (1995. - 2000.).

Poslijediplomski doktorski studij: Klinička medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split (2004. - 2007.).

### **Radno iskustvo**

Pripravnički staž: KBC Split; Ordinacija obiteljske medicine dr. Mirjana Opačak (studeni, 2000. - studeni, 2001.).

Liječnik na zamjeni: DZ Korenica, Ambulanta Donji Lapac; Ordinacija opće medicine dr. Anita Jančić, Lastovo; HMP Split; Ordinacija opće medicine dr. Vedrana Šitum, Split; Ordinacija opće medicine dr. Maja Lacić Draganja, Split (svibanj, 2003. - studeni, 2006.).

Liječnik na specijalizaciji: Specijalizant anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, KBC Split, Split (27.01.2007. - 27.04.2011.).

Radni odnos: Liječnik specijalista anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, KBC Split, Split (28.04.2011. - i dalje).

### **Usavršavanja i tečajevi**

Tečaj oživljavanja HLK, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu i KBC Split, Split (prosinac, 2003.).

Škola manualne medicine - osnovni tečaj, Thalassotherapia Crikvenica, Crikvenica (travanj, 2004.).

Tečaj iz akupunkture prema programu *Beijing Academy for Traditional Chinese Medicine*, Međunarodno društvo za tradicionalnu medicinu Belladona, Split (lipanj, 2007.).

Poslijediplomski tečaj: Mehanička respiracijska potpora, KB Dubrovnik, Dubrovnik (listopad, 2007.).

Poslijediplomsko usavršavanje iz anesteziologije, regionalni C.E.E.A. centar u Hrvatskoj, Opatija (svibanj, 2008. - studeni, 2010.).

Tečaj iz regionalne anestezije: 8. *ESRA workshop, Anatomy for regional anesthesia*, Sveučilišna bolnički centar Ljubljana i Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, Ljubljana (listopad, 2010.).

Poslijediplomski tečaj: Autotransfuzija, tromboprofilaksa i perioperacijsko krvarenje, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (ožujak, 2011.).

Poslijediplomski tečaj: Temeljne i opće kliničke vještine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (svibanj, 2011.).

Tečaj iz hemodinamike: *Hemodynamic Workshop, St. George's Hospital*, London (lipanj, 2011.).

Tečaj iz transtorakalnog ultrazvuka srca: *Basic FATE*, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (prosinac, 2012.).

Tečaj iz transezofagijskog ultrazvuka srca: *Basic TEE Course*, *Herzzentrum Leipzig - Universitätsklinik*, Leipzig, Germany (svibanj, 2014.).

### **Kongresi**

Tjedan mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split (ožujak, 2003.; ožujak, 2010.; ožujak, 2013.).

Europsko-američka anesteziološka konferencija, Dubrovnik (travanj, 2009.), Rovinj (svibanj, 2013.).

Europski kongres anesteziologa - *Euroanaesthesia 2011.*, Amsterdam, Nizozemska (lipanj, 2011.).

23. Svjetski kongres Svjetskog udruženja kardiotorakalnih kirurga, Split (rujan, 2013.).

EACTA ECHO 2014., Leipzig, Germany, (svibanj, 2014.).

### **Akademski i znanstveni rad**

Demonstrator na vježbama iz patologije, Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (šk. god. 1995/96 i 1997/98).

Suradnik u nastavi, Katedra za anesteziologiju i intenzivnu medicinu, Medicinski fakultet u Sveučilišta u Splitu, Split (2008. - i dalje).

Znanstveno-kliničko istraživanje: Bolesnikov doživljaj boravka u Jedinici intenzivnog liječenja, Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC-a Zagreb i KBC-a Split, Split (2008. - 2009.).

Znanstveno istraživanje: Znanstveni rad o utjecaju inhalacijskih anestetika na respiracijski sustav na animalnom modelu, u okviru projekata: Neuralna kontrola disanja u budnosti i

spavanju, Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava-uloга serotoninа i Promjene disanja i simpatičke živčane aktivnosti prilikom ponavljanih hipoksija-uloга serotoninа, Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split (2009. - 2012.).

Poster i sažetak znanstvenog rada: *Sevoflurane and isoflurane abolished the phrenic long term facilitation in rats*, Europski kongres anesteziologa - *Euroanaesthesia* 2011., Amsterdam, Nizozemska (lipanj, 2011.).

Autor znanstvenog članka: *Sevoflurane and isoflurane monoanesthesia abolished the phrenic long term facilitation in rats*, u *Respiratory Physiology and Neurobiology* (prosinac, 2013.).

Koautor poglavlja u knjizi: Rizik anestezije; Farmakologija za anesteziologe i autonomni živčani sustav; Pregled bolesnika prije anestezije, priprema i premedikacija, udžbenik Klinička anesteziologija, Medicinska naklada, Zagreb (2013.).

### **Strani jezici**

Engleski aktivno, njemački pasivno.

### **Članstvo u strukovnim i stručnim organizacijama**

Hrvatska liječnička komora (HLK), Hrvatski liječnički zbor (HLZ), Hrvatski liječnički sindikat (HLS), Hrvatsko društvo za anesteziju i intenzivno liječenje (HDAIL), European Society of Anaesthesiology (ESA), European Association of Cardiothoracic Anaesthesiologists (EACTA).



### 13. NAPOMENA

Rezultati pilot studije prikazani su u obliku postera na Europskom kongresu anesteziologa održanom u lipnju 2011. godine u Amsterdamu, Nizozemska, pod nazivom: *Sevoflurane and isoflurane abolished the phrenic long term facilitation in rats*, autora V. Marinov, N. Karanovića, I. Pavlinac-Dodig, M. Valić, R. Pecotić i Z. Đogaša. Rezultati istraživanja objavljeni su u obliku znanstvenog članka: *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.*