

# Utjecaj remifentanila na dugoročnu facilitaciju freničkog živca u štakora u modelu akutne ponavljane hipoksije

---

Ivančev, Božena

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:171:748483>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Božena Ivančev**

**UTJECAJ REMIFENTANILA NA DUGOROČNU FACILITACIJU  
FRENIČKOG ŽIVCA U ŠTAKORA U MODELU AKUTNE PONAVLJANE  
HIPOKSIJE**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, listopad 2014.**

Istraživanje je u potpunosti provedeno u Zavodu za neuroznanost Medicinskog fakulteta  
Sveučilišta u Splitu

**VODITELJI RADA:**

Doc. dr. sc. Mladen Carev, dr. med.

Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBCSplit

Doc. dr. sc. Renata Pecotić, dr. med.

Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet u Splitu

**ZAHVALA:**

Veliko hvala svima koji su sudjelovali u izradi ove disertacije: prije svega mojim mentorima, Mladenu i Renati, te djelatnicama Zavoda za neuroznanost: Maji, Ivani i Jeleni. Hvala vam na strpljenju i podršci!

<b>1. SADRŽAJ</b>		<b>str.</b>
<b>1. SADRŽAJ</b>		3
<b>2. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU</b>		5
<b>3. UVOD</b>		7
3.1. Središnja kontrola disanja		7
3.2. Središnji i periferni kemoreceptori		8
3.3. Kliničke metode nadzora funkcije disanja		9
3.4. Hipoksijski ventilacijski odgovor (HVR)		12
3.5. Akutna ponavljana hipoksija (AIH)		14
3.6. Dugoročna facilitacija disanja (LTF)		15
3.7. Opijati i opiodi		19
3.7.1. Remifentanil		24
3.7.2. Nalokson		26
3.8. Klinički značaj LTF-a		27
3.8.1. Opstruktivska apneja tijekom spavanja (OSA)		27
3.8.2. Povezanost OSA i LTF		28
3.8.3. Lijekovi u anesteziji i OSA		29
<b>4. CILJEVI I HIPOTEZE</b>		30
4.1. Cilj istraživanja		30
4.2. Hipoteze		31
<b>5. TVORIVA I POSTUPCI</b>		33
5.1. Ustroj istraživanja		33
5.2. Pokusne životinje		33
5.3. Postupci		33
5.4. Tvoriva		36
5.5. Protokol		37
5.5.1. Remifentanilska skupina životinja		37
5.5.2. Naloksonska skupina životinja		37
5.5.3. Kontrolna skupina životinja		38
5.6. Ishod istraživanja i njegova mjera		39
5.7. Vremenske kontrole		40

5.8. Statistički postupci	41
5.9. Etička načela	42
<b>6. REZULTATI</b>	<b>43</b>
6.1. Učinak remifentanila na disanje	43
6.2. Remifentanil i respiracijski odgovor na hipoksiju	44
6.3. Učinak remifentanila na dugoročnu facilitaciju freničkog živca	45
6.4. Učinak antagonista $\mu$ -opioidnih receptora naloksona na dugoročnu facilitaciju freničkog živca	50
<b>7. RASPRAVA</b>	<b>52</b>
7.1. Znanstveni doprinos	60
<b>8. ZAKLJUČCI</b>	<b>62</b>
<b>9. SAŽETAK</b>	<b>64</b>
<b>10. SUMMARY</b>	<b>66</b>
<b>11. LITERATURA</b>	<b>67</b>
<b>12. ŽIVOTOPIS</b>	<b>78</b>

## 2. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU

5-HT - 5- hidroksitriptamin – serotonin

5-HT<sub>1A</sub> receptor - receptor za serotonin, podskupina 1A

ABS - acidobazni status

AIH – engl. *Acute Intermittent Hypoxia*, akutna ponavljana hipoksija

AMP - adenzin monofosfat

BDNF - engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (neurotropin)

C<sub>5</sub> – C<sub>6</sub> - 5. i 6. vratni kralježak

DRS - dorzalna respiracijska skupina

ETCO<sub>2</sub> - engl. *end - tidal CO<sub>2</sub>* – ugljikov dioksid na kraju izdisaja

f - frekvencija

FiO<sub>2</sub> - udio kisika u smjesi

H<sup>+</sup> ioni - vodikovi ioni

HVR - engl. *Hypoxic Ventilatory Response*, hipoksijski ventilacijski odgovor

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

LTF - engl. *Long Term Facilitation*, dugoročna facilitacija

LTP - engl. *Long Term Potentiation*, dugoročna potencijacija

MAP - engl. *Mean Arterial Preassure*, srednji arterijski tlak

NaCl - natrijev klorid

NMDA - N-metil-D-aspartat, agonist glutamatnih receptora

OSA - engl. *Obstructive Sleep Apnea*, opstruktivska apneja tijekom spavanja

PaCO<sub>2</sub> - parcijalni tlak ugljikovog dioksida u arterijskoj krvi

PaO<sub>2</sub> - parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi

PEEP - engl. *Positive End Expiratory Pressure*, pozitivni tlak na kraju izdaha

PKC – protein kinaza C

pLTF- engl. *phrenic LTF*, dugoročna facilitacija freničkog živca

PNA - engl. *Phrenic Nerve Activity*, aktivnost freničkog živca

PNG - frenički neurogram

pPNA - engl. *peak PNA*, vršna aktivnost freničkoga živca

PRS - pontina respiracijska skupina

SEM – engl. *Standard Error of The Mean* – standardna pogreška srednje vrijednosti

STD - engl. *Short Term Depression*, kratkotrajna depresija

STP - engl. *Short Term Potentiation*, kratkotrajna potencijacija

Te - trajanje izdisaja (ekspirija)

Ti - trajanje udisaja (inspirija)

TIVA - engl. *Total Intravenous Anesthesia*, potpuna intravenska anestezija

TrkB - tropomiozin-receptor-kinaza B

Ttot - ukupno trajanje respiracijskog ciklusa

VRS - ventralna respiracijska skupina

Vt - engl. *Tidal Volume*, respiracijski volumen

### 3. UVOD

Disanje je fiziološki proces nužan za održavanje života. Dišni sustav omogućuje izmjenu respiracijskih plinova, kisika i ugljikova dioksida, između atmosfere i krvi i obrnuto. Uloga disanja je osigurati dopremu kisika u tkiva i otpremu ugljikovog dioksida iz tkiva [1]. Proces disanja može se podijeliti u četiri glavna funkcijska dijela:

- a) regulacija disanja,
- b) plućna ventilacija,
- c) difuzija kisika i ugljikova dioksida između alveola i krvi te,
- d) prijenos kisika i ugljikova dioksida krvlju i tjelesnim tekućinama do stanica i od njih [2].

Parcijalni tlakovi kisika ( $\text{PaO}_2$ ) i ugljikovog dioksida ( $\text{PaCO}_2$ ) u arterijskoj krvi vrlo malo se mijenjaju bez obzira na opterećenje dišnog sustava zahvaljujući prilagodbi alveolarne ventilacije. Takva sposobnost moguća je uslijed dobre razvijenosti i usklađenosti središnje i periferne regulacije disanja [1].

#### 3.1. SREDIŠNJA KONTROLA DISANJA

Središnja kontrola disanja odvija se u tri glavne skupine respiracijskih neurona:

- A) dorzalna respiracijska skupina (DRS) – smještena u dorzalnom dijelu produljene moždine,
- B) ventralna respiracijska skupina (VRS) – smještena u ventralnom dijelu produljene moždine,
- C) pontina respiracijska skupina (PRS) – smještena u gornjem dijelu ponsa [3].



U VRS postoji specifična skupina respiracijskih neurona tzv. PreBötzingera. To područje smatra se odgovornim za stvaranje temeljnog ritma disanja (tzv. primarno ritmogeno područje) [1]. Međutim, novija istraživanja [4] pokazuju kako bi i PRS mogla imati veliku ulogu u održavanju frekvencije disanja, s obzirom da injiciranje opioida u to područje uzrokuje bradipneju koja se prekida ubrizgavanjem opioidnog antagonista u isto područje.

### 3.2. SREDIŠNJI I PERIFERNI KEMORECEPTORI

Osim središnje regulacije disanja koja se odvija u specifičnim područjima produljene moždine, respiracijsku aktivnost nadziru još dva izuzetno važna mehanizma: sustavi središnjih i perifernih kemoreceptora.

*Središnji kemoreceptori* (nazvani i kemosenzitivnim područjem respiracijskog centra) imaju važnu ulogu u regulaciji disanja. Nalaze se ispod prednje površine produljene moždine vrlo blizu ili u dodiru s cerebrospinalnom tekućinom i s donje strane moždanog debla u blizini izlazišta IX. i X. moždanog živca [2]. Reagiraju na promjene  $\text{PaCO}_2$  te koncentraciju vodikovih iona u krvi [1]. Koncentracija kisika u arterijskoj krvi ( $\text{PaO}_2$ ) nema izravan učinak na središnje kemoreceptore [1].

Većina *perifernih kemoreceptora* smještena je u karotidnim tjelešcima i važni su za otkrivanje promjena u koncentraciji kisika u arterijskoj krvi [1]. Periferni kemoreceptori slabije reagiraju na promjene koncentracije vodikovih iona i ugljikovog dioksida. U određenim situacijama kada dođe do pojave hipoksije organizam reagira vrlo brzim povećanjem respiracijske aktivnosti uslijed aktivacije perifernih kemoreceptora [1].

Karotidna tjelešca smještena su na račvištu zajedničke karotidne arterije, a njihova aferentna vlakna idu Heringovim živcima do nervus glosofaringeusa, te zatim do dorzalnog respiracijskog područja produljene moždine. Svako od tih tjelešaca prima posebnu opskrbu krvlju kroz malu arteriju izravno iz susjednog arterijskog stabla. Protok kroz tjelešce iznimno je velik tako da je postotak odstranjenja kisika iz krvi gotovo jednak nuli. To znači da su kemoreceptori cijelo vrijeme izloženi arterijskoj krvi i reagiraju na promjene  $\text{PaO}_2$  [1].

Prema dostupnim podacima, izgleda da postoji intereakcija između perifernih i središnjih kemoreceptora. Naime, oni nisu funkcionalno odijeljeni, nego su međusobno ovisni, tako da se osjetljivost središnjih kemoreceptora mijenja pod utjecajem perifernih kemoreceptora, te vjerojatno i informacija iz nekih drugih, s disanjem povezanih, refleksa [5, 6].

### 3.3. KLINIČKE METODE NADZORA FUNKCIJE DISANJA

U svakodnevnoj kliničkoj praksi nadzor disanja obavlja se na nekoliko načina:

- 1) praćenje izmjene plinova (plinske analize arterijske, venske i kapilarne krvi, pulsna oksimetrija, kapnometrija, transkutano mjerenje plinova u krvi)
- 2) praćenje funkcije pluća - mimotok (*engl.shunt*), mrtvi prostor
- 3) nadzor plućne mehanike - strojna respiracijska potpora (parametri koji se vrednuju su vršni tlak, tlak platoa, auto PEEP, ezofagealni tlak, gastrički tlak, popustljivost pluća, otpor dišnih puteva, dišni rad itd.) [2].

*Plinska analiza arterijske krvi* (acidobazni status, ABS) osnovna je metoda procjene sposobnosti dišnog sustava za izmjenu plinova.

*Pulsna oksimetrija (SpO<sub>2</sub>)* je neinvazivna metoda koja se koristi u svakodnevnom anesteziološkom nadzoru bolesnika. Radi se o spektrofotometrijskoj metodi koja koristi dvije valne duljine svjetala u određivanju saturacije (zasićenja) hemoglobina kisikom. Ne pruža nikakve informacije o koncentraciji ugljikovog dioksida, a pomicanje senzora ili nepravilan položaj senzora mogu remetiti rad pulsnog oksimetra. Postoji i oksimetrija miješane venske krvi, kontinuirana metoda koja zahtjeva postavljenje plućnog arterijskog katetera.

*Kapnometrijom* se naziva mjerenje CO<sub>2</sub> u dišnim putevima (obično spektroskopskom metodom) dok se kapnografijom naziva prikaz kapnometrijskih podataka na ekranu monitora. CO<sub>2</sub> se obično mjeri na kraju ekspirija (engl. *End Tidal CO<sub>2</sub>*; ETCO<sub>2</sub>) jer je njegova količina na početku ekspirija malena zbog toga što dišni sustav prvo napušta zrak iz gornjih dišnih puteva gdje se ne odvija izmjena plinova. Vrijednost ETCO<sub>2</sub> ovisi o odnosu ventilacije i perfuzije u plućima, o stvaranju CO<sub>2</sub> u organizmu i njegovoj dostavi u pluća, te njegova interpretacija u anesteziološkoj praksi zna biti teška i često vrijednost ETCO<sub>2</sub> nije bliska vrijednosti PaCO<sub>2</sub> iako bi ta razlika trebala biti manja od 5 mmHg.

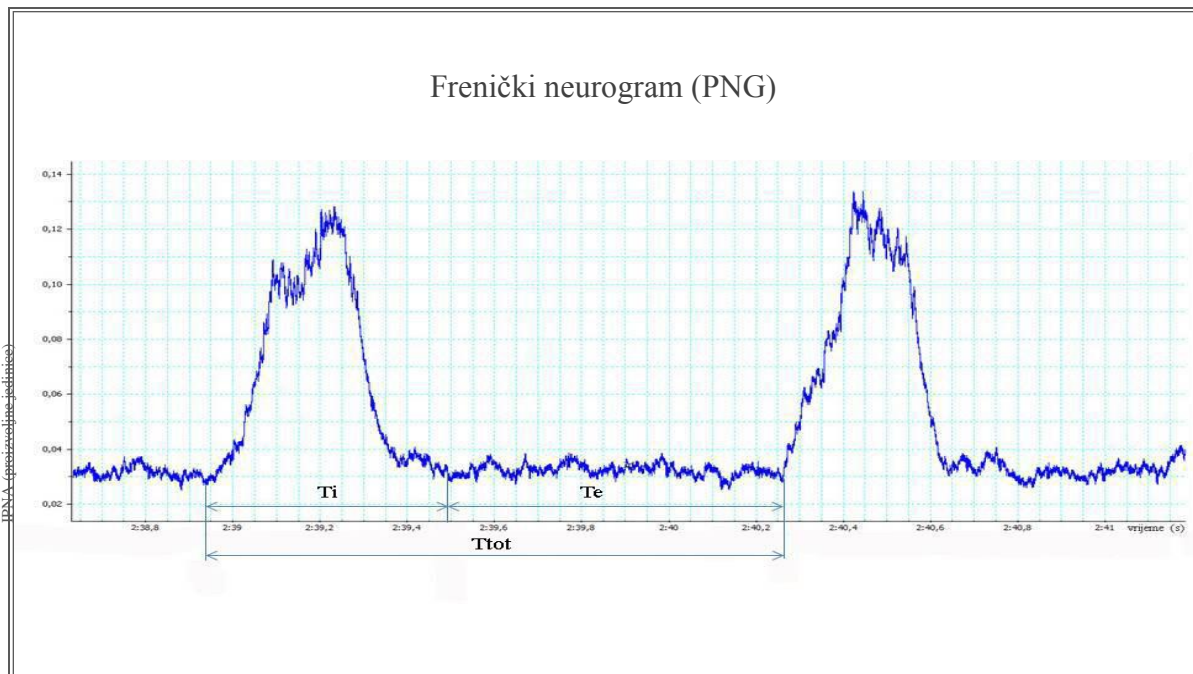
*Nadzor plućne mehanike* vrši se tijekom strojne ventilacije bolesnika. Četiri osnovna parametra opisuju strojnu ventilaciju: tlak, volumen, protok i vrijeme. Na ekranima ventilatora obično se slikovno, u obliku krivulja, pokazuju kombinacije parametara: protok/vrijeme, volumen/vrijeme, tlak/vrijeme. Promjene tih krivulja tijekom praćenja respiracijske funkcije upućuju na promjene patologije pluća ili učinkovitost primijenjene terapije [3].

Zlatni standard za praćenje središnje kontrole disanja u *životinjskom in vivo modelu* je bilježenje freničkog neurograma (engl. *Phrenic Neurogram*, PNG) koji nastaje snimanjem električne aktivnosti freničkog živca (engl. *Phrenic Nerve Activity*, PNA). U istraživanjima je općenito

prihvaćen stav kako upravo snimanje aktivnosti freničkog živca predstavlja zrcalni model zbivanja u respiracijskim područjima mozga koja obavljaju neuralnu kontrolu disanja. Primarni ritam disanja koji nastaje u ritmogenim respiracijskim područjima mozga prenosi se silaznim projekcijama na respiracijske motoneurone mišića koji sudjeluju u disanju pa tako i prema motoričkoj jezgri freničkog živca koji inervira najvažniji inspiracijski mišić sisavaca, dijafragmu ili ošit.

Minutni volumen disanja predstavlja ukupnu količinu novog zraka koji svake minute dospije u dišne puteve, a jednak je umnošku respiracijskog volumena (engl. *Tidal Volume*,  $V_t$ ) i frekvencije disanja (u minuti,  $f$ ) [1]. Promjene u ritmu i obrascu disanja mjere se promjenama u PNA, pri čemu vršna amplituda PNA (engl. *Peak PNA* ili  $pPNA$ ) odgovara respiracijskom volumenu ( $V_t$ ), dok frekvencija izbijanja freničkog živca predstavlja neuralni ekvivalent frekvencije disanja ( $f$ ).

Respiracijski ciklus sastoji se od udaha (inspirij) i izdaha (ekspirij) [1]. Proučavanjem krivulje freničkog neurograma može se odrediti trajanje pojedinih faza respiracijskog ciklusa (trajanje inspirija -  $T_i$ , trajanje ekspirija -  $T_e$ , ukupno trajanje respiracijskog ciklusa -  $T_{tot}$ , Slika 1) [4].



**Slika 1.** Krivulja freničkog neurograma (PNG).  $T_i$  - trajanje inspirija (udisaja);  $T_e$  - trajanje ekspirija (izdisaja);  $T_{tot}$  - ukupno trajanje respiracijskog ciklusa.

### 3.4. HIPOKSIJSKI VENTILACIJSKI ODGOVOR

Hipoksija predstavlja smanjenjenu količinu kisika u udahnutom zraku, arterijskoj krvi, ili tkivu.

Hipoksijom u arterijskoj krvi smatramo vrijednost  $PaO_2$  ispod 60 mmHg [7].

Uzroci hipoksije mogu biti različiti:

- a) nedostatna oksigenacija krvi u plućima zbog vanjskih razloga (nedostatak kisika u atmosferi, hipoventilacija zbog npr. neuromišićnih poremećaja),
- b) plućne bolesti (npr. KOPB),
- c) vensko-arterijski šuntovi,

d) nedostatan prijenos kisika krvlju do tkiva (anemija, patološki izmijenjen hemoglobin, opća ili lokalna insuficijencija cirkulacijskog sustava, tkivni edem),

e) smanjena sposobnost iskorištenja kisika u tkivima (otrovanje staničnih oksidacijskih enzima, smanjenje stanične metaboličke sposobnosti zbog otrovanja, manjka vitamina i drugih čimbenika) [1].

Hipoksija može biti akutna ili kronična. Akutna hipoksija snažan je podražaj za disanje u sisavaca te dovodi do hipoksijskog ventilacijskog odgovora.

Hipoksijski ventilacijski odgovor (engl. *Hypoxic Ventilatory Response*, HVR) predstavlja mehanizam prilagodbe organizma u akutnoj hipoksiji koji se očituje povećanjem frekvencije disanja (f) i respiracijskog volumena ( $V_t$ ) [8]. HVR ima tri komponente:

A) *Akutni odgovor* - trenutno povećanje ventilacije koje započinje nakon nastupa hipoksije i prestaje nakon prekida hipoksičnog podražaja - nastaje zbog podražaja karotidnih tjelešaca,

B) *Kratkotrajna potencijacija* (engl. *Short Term Potentiation*, STP) - progresivno pojačanje ventilacije nakon akutnog odgovora. Nastaje zbog središnje prilagodbe kemoreceptorskog odgovora, te

C) *Kratkotrajna depresija* (engl. *Short Term Depression*, STD) - prolazno sniženje frekvencije disanja na kraju kemoafherentne stimulacije. Naziva se i posthipoksijsko smanjenje frekvencije [9].

Poznato je kako na HVR utječu različiti čimbenici, među ostalim i inhalacijski i intravenski anestetici [10, 11], kao i opiodi [12, 13]. U prethodnim istraživanjima u Laboratoriju za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu, a u modelu izlaganja životinja hipoksiji, proučavani su utjecaji inhalacijskih anestetika (halotana, sevoflurana i izoflurana) na HVR, a također i intravenskog anestetika propofola, u odnosu na kontrolne životinje anestezirane uretanom [10, 11]. Rezultati tih istraživanja pokazali su kako svi proučavani anestetici smanjuju HVR, ali ne u istom opsegu. Naime, najveći utjecaj na HVR imao je halotan [10]. Utjecaj opioda na HVR do sada je ispitan tehnikama centralnog ubrizgavanja i sistemske primjene opioda u štakora, kojima je pokazano kako centralno injiciranje opioda u područje rafe jezgara smanjuje HVR kao i njihova sistemska primjena [12, 13].

### 3.5. AKUTNA PONAVALJANA HIPOKSIJA (AIH)

Akutna ponavljana hipoksija (engl. *Acute Intermittent Hypoxia*, AIH) predstavlja jak respiracijski podražaj koji se koristi kao podražaj za izazivanje jednog oblika respiracijske plastičnosti, tzv. dugoročne facilitacije disanja (engl. *Long Term Facilitation*, LTF) [14, 15]. Definira se kao slijed od 3 do 12 relativno kratkih (2-10 minuta) hipoksijskih podražaja između kojih su epizode normoksije ili hiperoksije trajanja od 2 do 20 minuta [16]. AIH protokoli razlikuju se prema broju hipoksija i duljinama trajanja normoksije između pojedinih hipoksijskih podražaja, primjerice 3 hipoksijska podražaja trajanja 5 minuta, 5 hipoksijskih podražaja trajanja 2 minute, ili pak 5 hipoksijskih podražaja trajanja 1 minutu [17, 18]. Radi se o izuzetno osjetljivom protokolu koji ovisi o spolu, dobi, soju i vrsti životinja, te su različiti laboratoriji prilagođavali i mijenjali protokol u skladu s tim. Nema dokaza da je jedan od protokola više vrijedan, te se u

jednom od preglednih članaka ustvrdilo kako za sada nema valjanog razloga standardizirati AIH protokol [18]. U laboratoriju Zavoda za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu postoji višegodišnje iskustvo rada u životinjskom štakorskom *in vivo* modelu u kojem je upotrijebljen protokol AIH koji se sastoji od 5 trominutnih hipoksija ( $FiO_2=0,09$ ) između kojih su epizode trominutnih hiperoksija ( $FiO_2=0,5$ ), koji rezultira pojavom dugoročne facilitacije disanja mjeren promjenama aktivnosti freničkoga živca 60 minuta nakon prestanka posljednje hipoksijske epizode [11, 15].

### 3.6. DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA

Plastičnost živčanog sustava osnova je mnogih fizioloških funkcija (učenje, pamćenje) i jedno je od njegovih temeljnih svojstava. Definira se kao dugotrajna promjena u živčanom sustavu koja se zasniva na prijašnjem ponavljanom iskustvu [19].

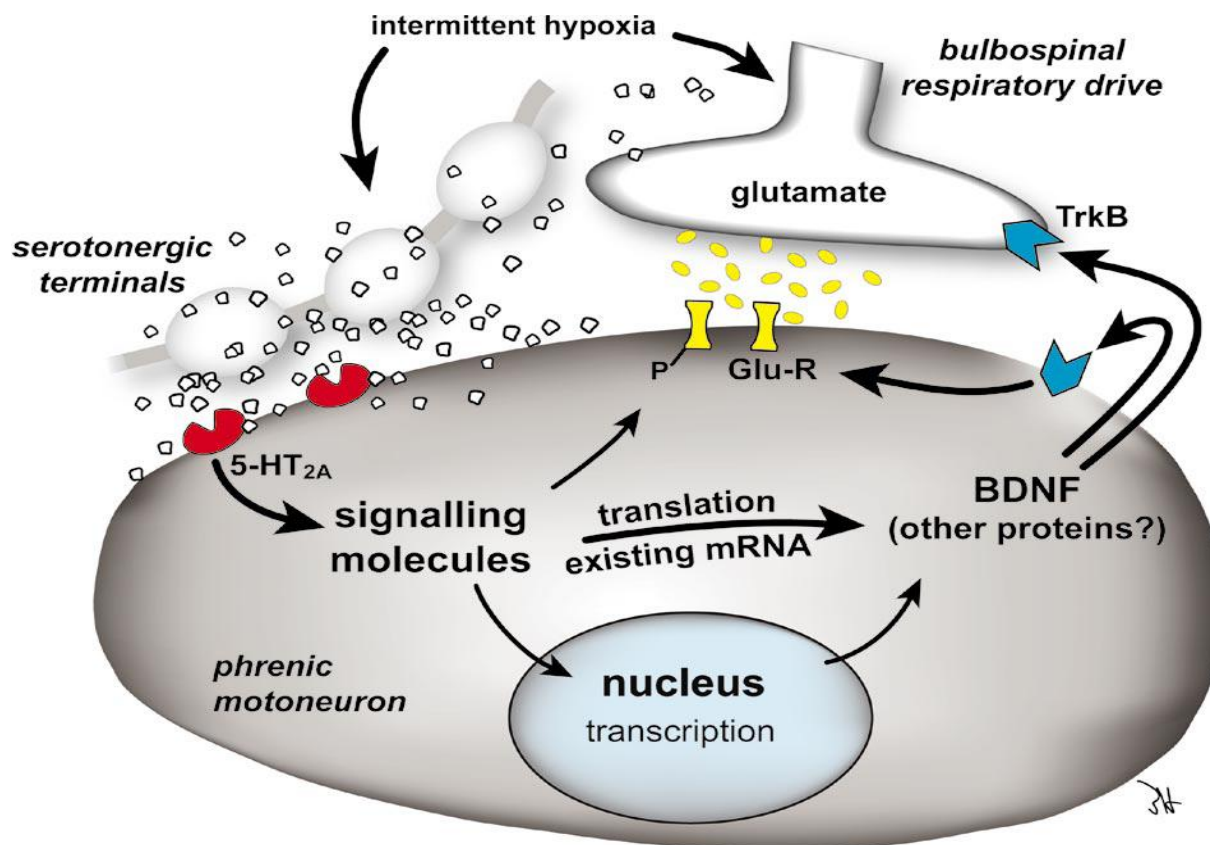
Respiracijski sustav također posjeduje impresivnu plastičnost. Respiracijska plastičnost predstavlja mehanizam prilagodbe respiracijskog sustava na određeni podražaj i javlja se kao dugotrajna promjena obrasca disanja i nakon što neposredni podražaj nije prisutan. Može uključivati strukturne i/ili funkcijske promjene a nastaje djelovanjem brojnih staničnih i/ili sinaptičkih mehanizama na raznim mjestima u sustavu koji kontrolira disanje. Dugoročna facilitacija disanja (LTF) jedan je od oblika plastičnosti respiracijskog sustava koja se očituje povećanjem respiracijskoga motoričkog odgovora nakon višestrukog izlaganja kratkotrajnim ponavljanim hipoksijskim epizodama (AIH protokol) [20]. Respiracijska plastičnost može se osim ponavljanom hipoksijom, potaknuti i hiperkapnijom, vježbanjem, ozljedom leđne moždine, stresom, a događa se, kako za vrijeme razvoja, tako i u odraslih [21-24]. U eksperimentalnim



istraživanjima LTF se najčešće očituje povećanjem aktivnosti freničkog (engl. *phrenic LTF*, pLTF) i hipoglosalnog živca 60 minuta nakon prestanka izlaganja ponavljanim hipoksijama [18, 25].

Frenički LTF predstavlja središnji neuralni mehanizam, u čijem nastanku ključnu ulogu ima signalna molekula serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), odnosno podraživanje serotoninских receptora smještenih u neposrednoj blizini freničkog motoneurona na spinalnoj razini. U novije vrijeme dokazana je i važna uloga tih receptora na supraspinalnoj razini u području rafe jezgara (Slika 2.) [14, 20]. Međutim, u nastanku pLTF-a ne može se isključiti djelovanje ostalih neuroprijenosnika. Iako aktivacijom 5-HT receptora započinje pLTF, za njegovo održavanje potrebna je spinalna sinteza proteina, posebice neurotrofina BDNF (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) u ventralnim spinalnim područjima koji je u međudjelovanju s 5-HT receptorima [26]. Rezultat složene interakcije na spinalnoj razini dovodi do toga da se otpušteni serotonin veže za 5-HT<sub>2</sub> receptore koji djelovanjem protein kinaze C (PKC) povećavaju sintezu BDNF-a, koji potom aktivira visoko-afinitetni TrkB receptor, koji potom aktivira izvanstanične kinaze 1 i 2 (ERK1/2). Posljedica tih aktivnosti je fosforilacija i povećana gustoća glutamatnih NMDA receptora smještenih na postsinaptičkoj membrani freničkoga motoneurona što dovodi do povećane osjetljivosti na glutamat i naposljetku do pojave pLTF-a.

Jedan od predloženih mehanizama nastanka LTF-a prikazan je na Slici 2.



**Slika 2.** AIH podražuje karotidna tjelešca koji šalju informacije u rafe jezgre. Oslobodeni serotonin iz rafe jezgara aktivira 5-HT<sub>2</sub> receptor na freničkom motoneuronu u vratnom dijelu leđne moždine. Nakon toga slijede mnogobrojni unutarstanični događaji, kao što je aktivacija raznih protein kinaza, dolazi do stimulacije glutamatnih NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora i nastaje pojačanje silaznog respiracijskog puta i veći frenički motorički odgovor, za istu razinu presinaptičkog oslobađanja glutamata.

BDNF - Brain-derived neurotrophic factor; TrkB - tropomiozin-receptor-kinaza B. Preuzeto iz MacFarlane, P.M., et al., Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008. 164(1-2): p. 263-71. Slika kao u izvorniku [26].

Frenički LTF prvi put je opisan 1980. godine od strane Milhorna i suradnika [27] na anesteziranim ili decerebriranim, vagotomiranim i paraliziranim mačkama. Od tada je pLTF ispitivan u mnogih životinja: anesteziranih, neanesteziranih ili decerebriranih (kunići, miševi, mačke, psi, koze, patke, štakori) [28-31]. Rijetki su radovi koji proučavaju pLTF u ljudi [32].

Danas je opće prihvaćen model za proučavanje pLTF-a mehanički ventiliran, paraliziran, vagotomiran Sprague-Dawley mužjak štakor anesteziran uretanom [11, 15, 17, 18]. Anestezija uretanom uobičajena je u istraživanjima dugoročne facilitacije disanja zbog minimalnog utjecaja uretana na dišni i krvožilni sustav [18]. Nadalje u usporedbi s drugim anestheticima, uretan nema učinka na serotoninergički i GABAergički sustav što je bilo iznimno značajno za ustroj ovog istraživanja. U preglednom članku Mateika i sur. ukazuju na mogućnost da na nastanak pLTF-a utječu brojni čimbenici poput primjerice dobi i spola životinja, jačina podražaja, stanje budnosti, način disanja - spontano disanje ili mehanička ventilacija. Pri tom valja istaknuti da i izbor anestetika posebice anestetika koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi može utjecati na pojavu pLTF-a [33]. Do sada je dokazano da anestezija propofolom te inhalacijskim anestheticima poput sevoflurana i izoflurana, sprječava razvoj pLTF-a [11, 34]. Utjecaj opioida na nastanak pLTF-a do sada nije istražen. S obzirom da se radi o lijekovima koji se često koriste u kliničkoj praksi, najčešće zajedno s prethodno spomenutim anestheticima, postavlja se pitanje kliničkog značaja utjecaja opioida na respiracijski sustav osobito u ranom poslijeoperacijskom razdoblju.

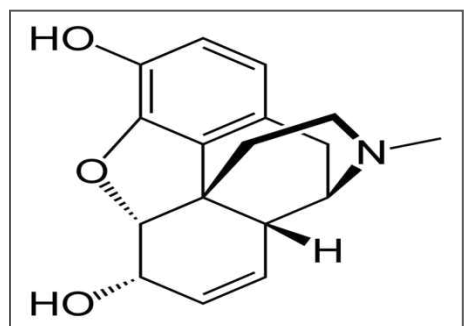
## 3.7. OPIJATI I OPIOIDI

Naziv opijati odnosi se na spojeve povezane s opijumom. Riječ opijum potječe od grčke riječi *opos* koja znači sok, jer se opijum dobiva od soka maka - *Papaver somniferum* (Slika 3).



**Slika 3.** Dobivanje soka iz maka *Papaver somniferum* (preuzeto iz Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ (2006). "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail". Br. J. Pharmacol. 147 Suppl 1 (Suppl 1): S153–62 ) [35].

Opijati su lijekovi dobiveni iz opijuma koji sadrži više od 20 različitih alkaloida. Prvo spominjanje opijuma nalazimo u pisanjima Teofrasta u trećem stoljeću prije Krista. Tijekom srednjeg vijeka upotreba opijuma bila je vrlo raširena. No tek 1806. godine Sertürner je izolirao čisti alkaloid iz opijuma i nazvao ga morfin po Morfeusu, grčkom bogu snova (Slika 4). Sredinom 19. stoljeća počela se širiti uporaba čistih alkaloida umjesto opijuma. Iako su analgetska svojstva i sposobnost izazivanja euforije opijuma bila poznata i korištena stoljećima, tek je u 20.-om stoljeću postignut napredak u shvaćanju na koji način opijati, kao što je morfin, izazivaju svoj jak i selektivan učinak na ljudsko tijelo [35].



**Slika 4.** Kemijska struktura morfina

U opijate spada prije svega morfin i njegovi derivati (papaverin, kodein, tebain) (Tablica 1, Slika 4) [36]. Opijati

se vežu na opioidne receptore koji su smješteni na staničnoj membrani neurona za prijenos boli, središnjem živčanom sustavu (moždana kora, talamus, inzula), produljenoj moždini i mnogim drugim mjestima u tijelu [36, 37]. Imaju jak analgetski učinak.

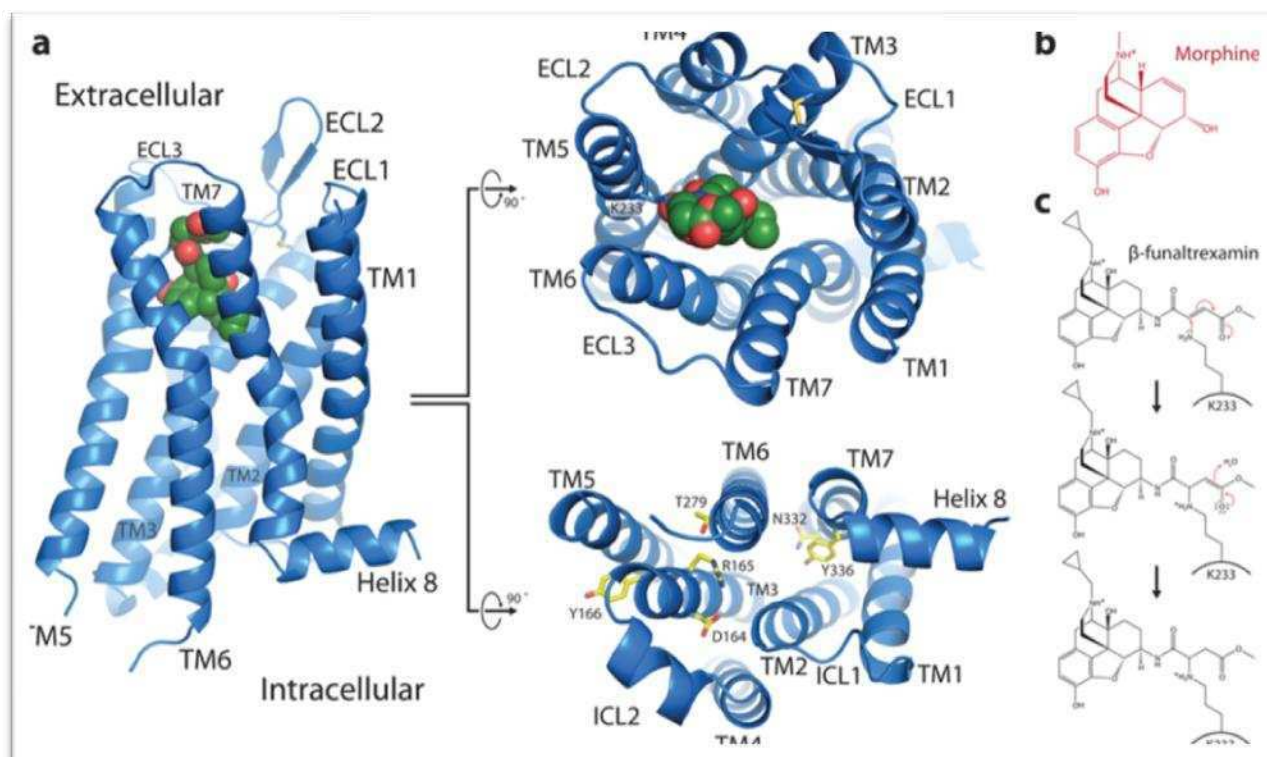
*Opioidi* su umjetno dobiveni spojevi (petidin, pentazocin, tramadol, metadon, fentanil, sufentanil, alfentanil, remifentanil) koji djeluju istim mehanizmom kao i opijati tj. vežu se također na opioidne receptore na staničnoj membrani (Tablica 1) [38].

**Tablica 1.** Klasifikacija opioida s obzirom na način dobivanja

PRIRODNI	SEMISINTETSKI	SINTETSKI
Morfin	Heroin	Levorfanol
Papaverin	Hidromorfon	Butorfanol
Kodein	Hidrokodeon	Metadon
Tebain	Buprenorfin	Pentazocin
	Oksikodon	Meperidin
		Fentanil
		Sufentanil
		Alfentanil

Postoje četiri vrste opioidnih receptora:  $\mu$  (mi, MOP),  $\kappa$  (kapa, KOP),  $\delta$  (delta, DOP) i nociceptivni (NOP) receptori [35]. Vrste opioidnih receptora, njihov smještaj i djelovanje prikazani su u Tablici 2. Sve četiri vrste opioidnih receptora su G-proteinski receptori koji dijele sličnu sedmodjelnu transmembransku strukturu (Slika 5). Predložene su i druge dodatne vrste opioidnih receptora npr. sigma receptori, ali nisu prihvaćeni zbog nedostatka osjetljivosti na

nalokson [35]. Aktivacija opioidnog receptora dovodi do započinjanja intracelularnih transdukcijskih puteva koji uključuju inhibiciju adenil ciklaze (što ima za posljedicu smanjivanje količine staničnog adenzin monofosfata (AMP)), inhibiciju naponskih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala i aktivaciju  $\text{K}^{+}$  kanala, što dovodi do smanjivanja neuralne podražljivosti [37].



**Slika 5.** Građa  $\mu$ -opioidnog receptora. Preuzeto iz Manglik A1, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature. 2012 Mar 21;485(7398):321-6. doi: 10.1038/nature10954.Slika kao u izvorniku [39].

**a**, Pogled s membranske strane (lijevo), izvanstanične strane (vrh, sredina) i unutarstanične strane (dno, sredina) pokazuju sedmodjelnu transmembransku strukturu  $\mu$ -opioidnog receptora. Ligand,  $\beta$ -funaltreksamin je prikazan u obliku zelenih kuglica. **b** - Kemijska struktura morfina. **c** - kemijska struktura  $\beta$ -funaltreksamina i kemijska reakcija sa postraničnim lancem K233<sup>5,39</sup> receptora.  $\beta$ -funaltreksamin je semisintetski opioidni antagonist dobiven od morfina.

**Tablica 2.** Vrste opioidnih receptora, njihov smještaj i djelovanje. Korištena tablica iz Corbett AD, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ (2006). Br. J. Pharmacol. 147 Suppl 1 S153–62 [35].

RECEPTOR	PODTIPOVI	SMJEŠTAJ	DJELOVANJE
Delta ( $\delta$ ) DOR OP <sub>1</sub>	$\delta_1, \delta_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veliki mozak               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pontine jezgre</li> <li>• Amigdala</li> <li>• Olfaktorni bulbusi</li> <li>• Duboka područja moždane kore</li> </ul> </li> <li>- Periferni senzorni neuroni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analgezija</li> <li>- Antidepresivni učinak</li> <li>- Konvulzivno djelovanje</li> <li>- Psihička ovisnost</li> <li>- <math>\mu</math>-opioidnim receptorom posredovana respiracijska depresija (možda!)</li> </ul>
Kappa ( $\kappa$ ) KOR OP <sub>2</sub> <sup>(1)</sup>	$\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veliki mozak               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotalamus</li> <li>• Periakveduktalna siva tvar</li> <li>• Klastrum</li> </ul> </li> <li>- Leđna moždina:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Želatinozna supstancija</li> </ul> </li> <li>- Periferni senzorni neuroni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analgezija</li> <li>- Antikonvulzivni učinak</li> <li>- Disocijacija i delirij</li> <li>- Diureza</li> <li>- Disforija</li> <li>- Mioza</li> <li>- Neuroprotekcija, sedacija</li> </ul>
Mi ( $\mu$ ) MOR OP <sub>3</sub>	$\mu_2, \mu_3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veliki mozak:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kora (lamina III i IV)</li> <li>• talamus</li> <li>• periakveduktalna siva tvar</li> </ul> </li> <li>- Leđna moždina               <ul style="list-style-type: none"> <li>• želatinozna supstancija</li> </ul> </li> <li>- Periferni senzorni neuroni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b><math>\mu_1</math></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• analgezija</li> <li>• psihička ovisnost</li> </ul> </li> <li><b><math>\mu_2</math>:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• depresija disanja</li> <li>• mioza</li> </ul> </li> </ul>

		- Probavni trakt	<b>μ3</b> • moguća vazodilatacija
<b>Nociceptivni receptori</b>  NOP  OP <sub>4</sub>	ORL 1	- Veliki mozak • kora • amigdala • hipokampus • septalne jezgre • habenula • hipotalamus  - Leđna moždina	• anksioznost • depresija • pojačan apetit  • Razvoj tolerancije na μ - agoniste

Opioidi se, prema načinu djelovanja na opioidne receptore, mogu podijeliti na:

- a) *agoniste* - morfin, diamorfin, diacetilmorfin, kodein, petidin, fentanil, metadon, oksikodon, hidromorfon.
- b) *parcijalne agoniste* – buprenorfin
- c) *miješane agoniste* – antagonist - nalbufin, pentazocin, butorfanol
- d) *antagoniste* - nalokson, naltrekson, nalmefen [2].

Opijati i opioidi učinkoviti su analgetici koji se svakodnevno koriste u kliničkoj praksi za liječenje akutne i kronične boli, osobito tijekom anestezije te u ranom poslijeoperacijskom razdoblju. Analgezija koja nastaje djelovanjem opioida većinom je posredovana μ-opioidnim receptorima. Mogu se primjenjivati oralnim, intravenskim, intramuskularnim, subkutanim i transdermalnim putem, a nerijetko se primjenjuju i intratekalno i epiduralno [37]. Depresija

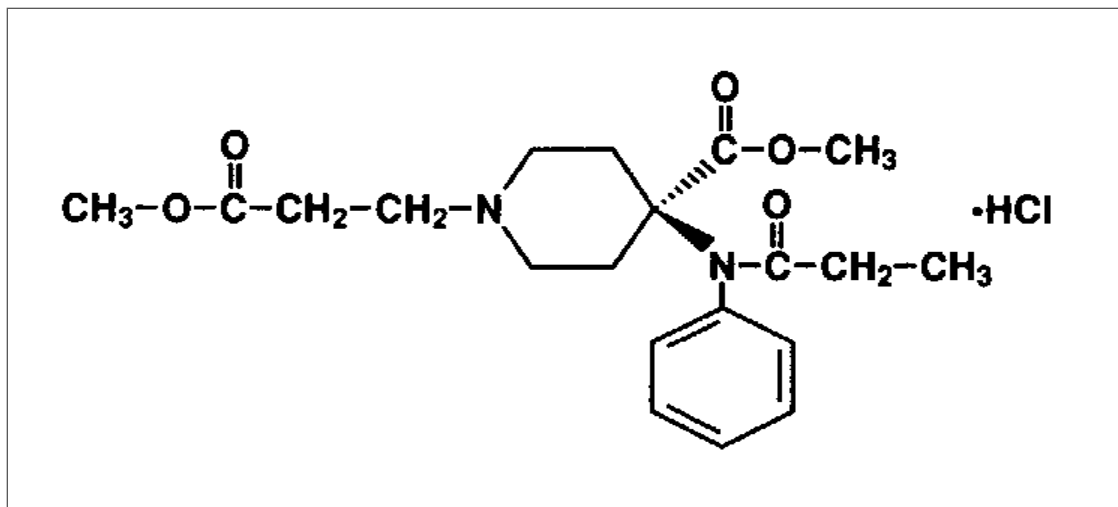


disanja, koja se može javiti primjenom terapijskih doza opijata i opioida, glavni je ograničavajući čimbenik njihove kliničke uporabe [38]. Procijenjena incidencija poslijoperacijske respiracijske depresije uzrokovane opioidima je između 0,1% i 1% bez obzira na način primjene [39]. S obzirom na vrstu opioidnih receptora,  $\mu$ -opioidni receptori prepoznati su kao ključni kod respiracijske depresije izazvane opioidima. Pokušaj da se u miševa kojima nedostaju  $\mu$ -opioidni receptori opioidima izazove respiracijska depresija do sada nije bio uspješan [40].

Između ostalog, opioidi vjerojatno imaju utjecaj u jednoj vrsti sinaptičke plastičnosti mozga poznatoj kao dugoročna potencijacija (engl. *Long Term Potentiation*, LTP) [41, 42]. Stoga je moguće očekivati da će primjena opioida koji izazivaju depresiju disanja imati snažan utjecaj i na nastanak jednog oblika respiracijske plastičnosti tj. pLTF-a u modelu uretanom anesteziiranog, mehanički ventiliranog Sprague-Dawley štakora izloženog akutnim ponavljanim hipoksijama.

### 3.7.1. Remifentanil

Remifentanil je noviji opioidni analgetik uveden u kliničku praksu 1996. godine. Učinak ostvaruje izravnim agonističkim djelovanjem na  $\mu$ -opioidne receptore. Ima iznimno povoljna farmakokinetička svojstva: početak djelovanja im je brz (1-2 minute nakon intravenske primjene), a nakon prekida kontinuirane infuzije koncentracija mu se snižava na 50% nakon 3 do 6 minuta zahvaljujući procesu distribucije i eliminacije koji je neovisan o duljini trajanja infuzije. Potpuni oporavak je brz, unutar 5 do 10 minuta, zbog brze razgradnje nespecifičnim krvnim i tkivnim esterazama (Slika 6) [43, 44]. Na djelovanje i razgradnju remifentanila ne utječu dob, spol, bolesti jetre ili bubrega što predstavlja veliku prednost u odnosu na ostale opioidne analgetike [2].



**Slika 6.** Kemijska struktura remifentanila

Takva svojstva omogućuju laku titraciju učinkovite doze remifentanila te korištenje vrlo visokih doza bez opasnosti produljenog djelovanja koje bi utjecalo na brzinu oporavka bolesnika [43]. Sastavni je dio tzv. potpune intravenske anestezije (engl. *Total Intravenous Anesthesia*, TIVA), moderne anesteziološke tehnike, koja se posljednjih godina sve više koristi [7]. Remifentanil se zbog svog kratkog djelovanja primjenjuje u obliku trajne intravenske infuzije. U ljudi se primjenjuju doze od 0,25 do 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  [36]. Često se koristi u anesteziji pri kardiokirurškim operativnim zahvatima gdje, u kombinaciji s propofolom, omogućuje brzo buđenje iz anestezije [45]. U istraživanjima na štakorima korištene su doze od 0,2 pa čak i do 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  [46]. Poznato je da remifentanil uzrokuje depresiju disanja u ljudi [38, 47], a i u drugih vrsta poput štakora [48], prvenstveno djelujući na  $\mu$ -opiodne receptore u produljenoj moždini koja sadrži respiracijske neurone odgovorne za stvaranje temeljnog ritma i obrasca disanja [12].

S obzirom da u ovom istraživanju po prvi put ispituje utjecaj remifentanila na pLTF, izbor odgovarajuće doze bio je veliki izazov. Pregledom dostupne literature primjećen je vrlo veliki raspon korištenih doza remifentanila u štakorskom modelu, kako je gore navedeno, te je

provedeno pilot istraživanje (n = 16), temeljem kojeg je odabrana doza od 0,5 µg/kg/min koja se u daljnjem tijeku istraživanja pokazala opravdanom i učinkovitom.

### 3.7.2. Nalokson

Nalokson je tzv. čisti opioidni antagonist koji može zauzeti sve opioidne receptore. Ipak, najveći afinitet ima za µ-opioidne receptore. Vrijeme polueliminacije mu je 60 do 90 minuta, a djelovanje od 1 do 4 sata. Nakon intravenske injekcije djelovanje započinje nakon 1 do 2 minute. Nalokson i njegovi metaboliti izlučuju se putem urina [2]. U kliničkoj praksi koristi se već više od 60 godina. Preporučena doza naloksona u ljudi je 0,4 do 2 mg [38]. U anesteziološkoj praksi najčešće se koristi za povrat spontanog disanja u bolesnika koji nedostatno dišu nakon predoziranja opioidima ili nakon prevelike količine opioida primjenjenih tijekom anestezije. Međutim, nalokson se koristi i za liječenje opioidima uzrokovane mučnine, povraćanja, svrbeža, retencije urina i bilijarnog spazma [37].

Iako se nalokson smatra čistim opioidnim antagonistom, in vitro istraživanjima utvrdilo se kako visoke doze naloksona mogu imati parcijalno agonističko djelovanje na µ- receptore [49].

U literaturi nalazimo kako je najčešće korištena doza u štakora za antagoniziranje opioidnog učinka 0,1 mg/kg [50]. U ovoj disertaciji odabrana je najčešće korištena doza na štakorima kod koje očekujemo da djelovanjem na µ-opioidne receptore antagonizira učinak remifentanila.

### 3.8. KLINIČKI ZNAČAJ LTF-a

Važan klinički entitet koji se dovodi u svezu s respiracijskom plastičnošću tj. LTF-om je opstruktivna apneja tijekom spavanja (engl. *Obstructive Sleep Apnea, OSA*) [51].

#### 3.8.1. Opstruktivna apneja tijekom spavanja (OSA)

Opstruktivna apneja tijekom spavanja najčešći je poremećaj disanja tijekom spavanja [52]. Karakterizirana je ponavljanim epizodama djelomičnog (hipopneja) ili potpunog prestanka disanja (apneja) tijekom spavanja koje traju dulje od 10 sekunda [52]. Neke epidemiološke studije pokazuju da gotovo 9% žena i 24% muškaraca u SAD-u boluje od tog poremećaja disanja tijekom spavanja, ali isto tako značajan broj oboljelih ostaje neprepoznat i neliječen [53]. Istraživanja su pokazala kako osobe s OSA-om češće oboljevanju od srčanožilnih bolesti [54], šećerne bolesti tip 2, te su sklonije prometnim nesrećama zahvaljujući prekomjernoj pospanosti tijekom dana [55], što OSA-u dovodi u sam vrh javnozdravstvenih problema. Nažalost još uvijek nema epidemioloških podataka o učestalosti tog poremećaja disanja tijekom spavanja u Republici Hrvatskoj.

Zlatni standard za postavljanje dijagnoze OSA-e je snimanje cjelonoćne polisomnografije. Za procjenu težine OSA-e iz zapisa cjelonoćne polisomnografije moguće je odrediti apneja-hipopneja indeks (AHI), koji se temelji na ukupnom zbroju apneja i hipopneja koje se pojavljuju tijekom jednog sata spavanja. Zastoji u disanju moraju trajati dulje od 10 sekunda i moraju biti povezani sa snižavanjem saturacije kisika u krvi. Ako je AHI između 5 i 15, radi se o blagom obliku OSA-e. U srednje teške OSA-e AHI se kreće između 15 i 30, a u teškog oblika OSA-e AHI je iznad 30. Činjenica je da se u oboljelih od OSA-e tijekom spavanja i po nekoliko stotina

puta događaju ponavljane hipoksijske epizode. Pa ipak, još uvijek ne postoji jednoznačan stav o tome ima li LTF zaštitni ili proaktivni učinak na disanje u ljudi oboljelih od OSA-e.

### 3.8.2. Povezanost OSA i LTF

LTF bi mogao predstavljati oblik fiziološke kompenzacije koji pridonosi stabilnosti disanja i posljedičnom smanjivanju broja hipopneja i/ili apneja tijekom spavanja u bolesnika s OSA-om [51]. Pokazano je kako LTF može povećati tonus mišića gornjih dišnih puteva, kojima se regulira otpor u gornjem dišnom putu promjenom aktivnosti n.hypoglossusa [56]. Moguća fiziološka uloga takvog LTF-a bi bila povećanje tonusa genioglosalnog mišića tijekom ponavljanih epizoda apneje u bolesnika s OSA-om [56]. Međutim, ukoliko bi u ljudi oboljelih od OSA-e tijekom spavanja nastajao pLTF, to bi moglo imati za posljedicu hipokapniju i izostanak mogućnosti nastanka LTF-a u živcima koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta. Poznato je da je LTF smanjen u ljudi koji boluju od teškoga oblika apneje tijekom spavanja, koji traje godinama, a nisu prepoznati i ne liječe se. Upravo ponavljane hipoksijske epizode tijekom spavanja dovode do povećane osjetljivosti središnjih i perifernih kemoreceptora što uz smanjenu rezervu CO<sub>2</sub>, doprinosi nestabilnom disanju u oboljelih od OSA. Ukoliko se uzme u razmatranje činjenica da LTF ima zaštitnu ulogu, te da služi kao obrambeni mehanizam od štetnog učinka ponavljanih hipoksija na napredovanje bolesti, tada je potrebno još dodatnih istraživanja koja bi mogla objasniti točne fiziološke mehanizme kojima LTF doprinosi stabilnosti disanja. Nadalje, novija istraživanja pokazuju da razumijevanje mehanizama nastanka LTF-a i mogućeg povoljnog učinka na stabilnost dišnog puta može pomoći u iznalasku novih terapijskih smjernica u liječenju OSA-e, ali i drugih poremećaja disanja u sklopu primjerice ozljeda leđne moždine [57].

### 3.8.3. Lijekovi u anesteziji i OSA

Nedavna istraživanja ukazala su na važnost prepoznavanja tog entiteta u svakodnevnoj anesteziološkoj praksi uslijed dokazanog povećanog perioperacijskog rizika u bolesnika s OSA [58, 59]. Godine 2006. Američko udruženje anesteziologa objavilo je smjernice za perioperacijsku skrb bolesnika s OSA-om u kojima se posebno naglašava sklonost postoperacijskom prestanku disanja i oprez pri korištenju opioida i sedativa u tih bolesnika [60]. Nije poznato u kolikoj mjeri analgezija opioidima utječe na poremećaj disanja u OSA bolesnika. U svakodnevnom kliničkom radu primjećeno je kako su u bolesnika s poremećajem gornjih dišnih puteva češće perioperacijske komplikacije, kao što su hipoksemija, atelektaze, upala pluća, otežana intubacija, akutni infarkt miokarda, plućna embolija, srčane aritmije i veća vjerojatnost prijema u Jedinicu intenzivnog liječenja [58, 59].

U nedavnom istraživanju Bernardsa i suradnika infuzija remifentanila u bolesnika sa srednje teškim oblikom OSA-e povećala je broj središnjih apneja, ali je smanjila broj opstruktivskih apneja u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je primala infuziju fiziološke otopine [61]. Postoji vrlo mali broj znanstvenih istraživanja koja proučavaju učinak opioida na disanje u OSA bolesnika, premda službene smjernice navode da bi opioide trebalo izbjegavati ili primjenjivati uz stanovite mjere opreza u oboljelih od OSA [60]. Težina OSA-e razlikuje se među bolesnicima stoga se može očekivati da će pojavnost perioperacijskih komplikacija ovisiti o interakciji stupnja bolesti i stupnja depresije disanja izazvane uporabom opioida.

## 4. CILJEVI I HIPOTEZE

### 4.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ova disertacija bavi se istraživanjem učinka opioida remifentanila na nastanak dugoročne facilitacije disanja mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca u vagotomiziranoga, paraliziranoga i mehanički ventiliranoga štakora anesteziranoga uretanom. Protokol se sastoji od 5 trominutnih hipoksija, međusobno razdvojenih trominutnim hiperoksijama. Model je do sada korišten u splitskom Laboratoriju za neuroznanost i opisan je u nekoliko publikacija, te se pokazao pouzdanim i uspješnim u izazivanju pLTF-a čiji se nastanak očituje porastom vršne aktivnosti freničkoga živca 60 minuta nakon prestanka izlaganja ponavljanim hipoksijama [11, 15, 34].

Ciljevi istraživanja su slijedeći:

- 1) utvrditi kakav utjecaj ima trajna infuzija remifentanila na nastanak dugoročne facilitacije freničkoga živca u modelu ponavljanih akutnih hipoksija 60 minuta nakon prestanka posljednje hipoksijske epizode,
- 2) ispitati postoje li razlike u ritmu i obrascu disanja mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca između kontrolne skupine životinja i remifentanilske skupine,
- 3) istražiti kakve će promjene aktivnosti freničkog živca mjerene promjenama ritma i obrasca aktivnosti nastati nakon prestanka primjene infuzije remifentanila, a nakon završetka protokola izlaganja ponavljanim akutnim hipoksijskim epizodama,

4) ispitati kako će intravenska primjena bolusa naloksona (antagonista opioidnih receptora) utjecati na aktivnost ritma i obrasca aktivnosti freničkoga živca 60 minuta nakon izlaganja akutnim ponavljanim hipoksijama.

## 4.2 HIPOTEZE

### **Hipoteza 1.**

Infuzija remifentanila u dozi od 0,5 µg/kg/min spriječit će pojavu LTF-a u eksperimentalnih životinja u modelu akutnih ponavljanih hipoksija.

### **Hipoteza 2**

Remifentanil će djelovanjem na µ-receptore u produljenoj moždini uzrokovati promjene ritma i obrasca disanja u odnosu na kontrolnu skupinu, promjenom aktivnosti freničkog živca nakon uključenja kontinuirane infuzije remifentanila. Remifentanil će također uzrokovati promjenu u odgovoru na akutnu hipoksiju (HVR) u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Hipoteza 3.**

Nastanak LTFa očekuje se 60 minuta nakon izlaganja protokolu akutnih ponavljanih hipoksija. Kako se temeljem prve hipoteze u ovoj disertaciji očekuje izostanak pLTF zbog depresije disanja izazvane infuzijom remifentanila očekujem da će prestankom infuzije remifentanila doći do povećanja aktivnosti freničkoga živca. Naime, 15 minuta nakon prekida kontinuirane infuzije remifentanila (što predstavlja vrijeme eliminacije lijeka nakon intravenske primjene), doći će do



prestanka klinički značajnog djelovanja remifentanila na  $\mu$ -receptore uslijed brze razgradnje nespecifičnim tkivnim esterazama [43].

#### **Hipoteza 4.**

Ukoliko  $\mu$ -opioidni receptori imaju utjecaj na sprječavanje pojave pLTF-a u modelu akutnih ponavljanih hipoksija u štakora, tad će primjena naloksona u 60-toj minuti nakon prestanka izlaganja protokolu akutnih ponavljanih hipoksija dovesti do povećanja aktivnosti feničkog živca.

## 5. TVORIVA I POSTUPCI

### 5.1. USTROJ ISTRAŽIVANJA

Radi se o eksperimentalnom, temeljnom prospektivnom istraživanju, u modelu anesteziiranog, obostrano vagotomiranog, paraliziranog i mehanički ventiliranog odraslog Sprague-Dawley mužjaka (tjelesne mase 300-340 g, starosti 2-3 mjeseca). Protokol za ovu studiju odobrilo je Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskoga fakulteta u Splitu.

### 5.2. POKUSNE ŽIVOTINJE

Istraživanje je provedeno na ukupno 22 Sprague-Dawley štakora (mužjaci, tjelesne mase 300-340 g, starosti 2-3 mjeseca) iz Nastambe za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu. Porijeklo soja je kolonija Harlan-Italy. Životinje međusobno nisu bile srodne.

Temeljem rezultata pilot istraživanja (n=16) i rezultata prethodnih istraživanja u Laboratoriju za neuroznanost [11, 14, 15] određena je optimalna veličina uzorka od najmanje 17 životinja (snaga istraživanja 80%, uz graničnu vrijednost  $p < 0,05$ ).

### 5.3. POSTUPCI

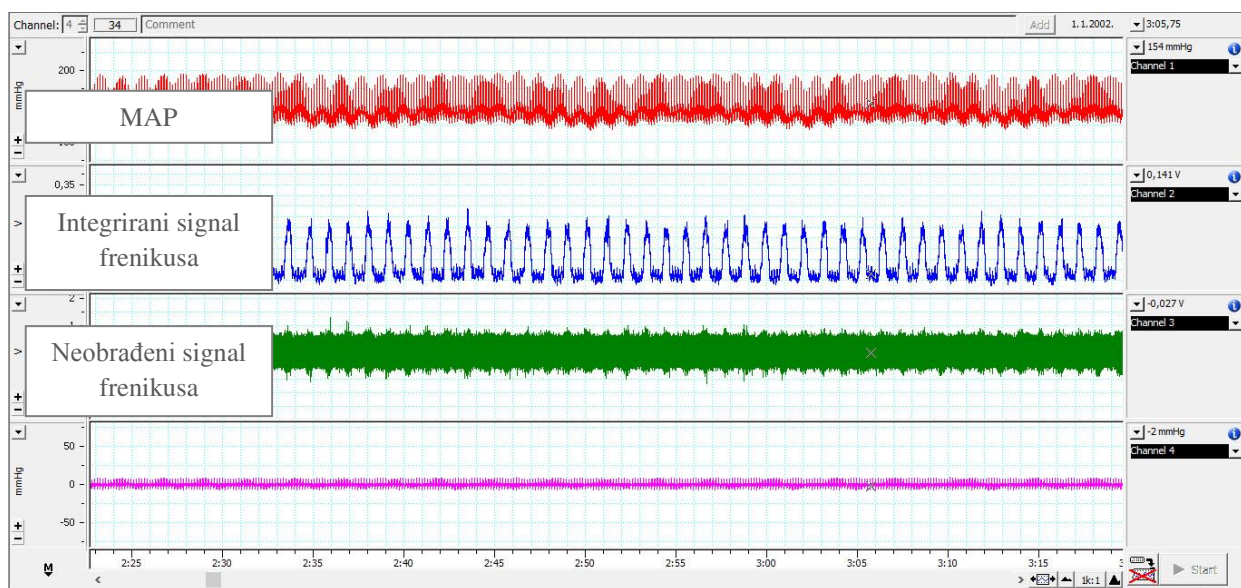
Štakori su anesteziirani intraperitonealnom injekcijom uretana (Sigma Aldrich, SAD, 1.2 g/kg). Uretan je anestetik izbora u istraživanjima neuralne kontrole disanja uslijed minimalnog ili gotovo zanemarivog učinka na disanje, te očuvane hemodinamske stabilnosti životinje tijekom provođenja eksperimentalnog protokola [18]. Dubina anestezije procjenjivala se reakcijom na

bolni podražaj šapice, prisutnošću kornealnog refleksa te prisutnošću promjena arterijskog tlaka i disanja tijekom kirurškog rada. U slučaju nedovoljne dubine anestezije dodavala se dodatna doza anestetika (0,2 g/kg uretana i.v. ili i.p.). S obzirom na dugotrajnost djelovanja uretana kao anestetika, upotreba dodatnih doza uretana bila je vrlo rijetka.

Životinjama su kateterizirane obje femoralne arterije zbog potrebe kontinuiranog praćenja srednjeg arterijskog tlaka (MAP), te uzorkovanja arterijske krvi za analizu acidobaznog statusa (ABS). Također je izvršena kateterizacija obje femoralne vene. Kroz venski kateter provodila se nadoknada cirkulirajućeg volumena infuzijom 0,9% otopine NaCl brzinom od 1,7 ml/kg/h. Na isti način provodila se kontinuirana infuzija remifentanila, te primjena naloksona.

Životinje su potom traheotomirane i intubirane metalnim tubusom, te su mehanički ventilirane respiratorom za male životinje (SAR 830-P, CWE, SAD). Koristila se smjesa kisika (50%) i dušika (50%). Početna frekvencija disanja bila je 50 udisaja u minuti uz  $T_i$  od 0,6 sekunda i protok 300 ml/ min, čime je postignut volumen od oko 3 ml. Tijekom eksperimenta parametri ventilatora prilagođavani su nalazu ABS-a i vrijednostima  $ETCO_2$  u izdahnutom zraku. Nakon toga su pristupom s ventralne strane u neposrednoj blizini karotidnih arterija obostrano izolirani i prekinuti vagalni živci kako bi se izbjegao utjecaj plućnih receptora osjetljivih na istezanje na više moždane centre koji sudjeluju u neuralnoj kontroli disanja. Potom su štakori postavljeni u stereotaksijski okvir u pronacijskom položaju (Lab Standard, Stoelting, SAD) te je dorzalnim putem na razini vratne kralježnice u području C5-C6 pristupljeno desnom freničkom živcu kako bi na njega postavili bipolarnu srebrnu elektrodu koja je putem pojačala (Super Z & System 1000 Modular Instrumentation, CWE Inc, SAD) bila spojena s računalom. Na računalu se, uz uporabu programa PowerLab i Chart for Windows (ADInstruments, Australija), snimao zapis srednjeg arterijskog tlaka (engl. *Mean Arterial Pressure*, MAP), te neobrađeni i integrirani signal

freničkog živca (Slika 7). Kako bi se osigurala stabilnost signala freničkoga živca nakon što se dobio odgovarajući zapis, na elektrodu na kojoj je bio postavljen živac ulio se tekući silikonski gel zagrijan na temperaturu od 70°C. Ujedno su štakori bili paralizirani intravenskom primjenom pankuronij-bromida (1 mg/kg; Pavulon, Organon, Nizozemska) kako bi se spriječilo spontano disanje i pokreti prsnog koša u odgovoru na mehaničku ventilaciju.



**Slika 7.** Prikaz kontinuiranog praćenja srednjeg arterijskog tlaka (MAP), te neobrađenog i integriranog signala freničkoga živca uz pomoć programa Chart for Windows (ADInstruments, Australija).

Ugljikov dioksid na kraju izdisaja (ETCO<sub>2</sub>) mjereno je kontinuirano (Gemini Gas Analyzer, CWE, SAD). Uzorci krvi za ABS uzorkovani su iz femoralne arterije (0,2 ml) i analizirani uređajem za ABS (RapidLab 348, Bayer Diagnostics, Velika Britanija). Svi izmjereni parametri, pH, te vrijednosti plinova (PaCO<sub>2</sub> i PaO<sub>2</sub>) održavani su unutar fizioloških vrijednosti, te su u slučaju potrebe popravljani mijenjanjem respiracijskih parametara na ventilatoru ili pak infuzijom bikarbonata (1 mmol/ml). Tjelesna temperatura održavana je na 37 do 38°C s pomoću tople podloge (*Fine Science Tool*, Njemačka).

U kontrolnoj skupini životinja, nakon uzimanja uzorka arterijske krvi za ABS analizu i moguće prilagodbe ventilacijskih parametara u namjeri održavanja normokapnije, uključena je trajna infuzija 0,9% NaCl (fiziološka otopina), i započet protokol primjene ponavljanih akutnih hipoksijskih epizoda (AIH protokol).

U remifentanilskoj i naloksonskoj skupini nakon postizanja normokapnijskih uvjeta, započelo se s trajnom intravenskom infuzijom remifentanila (Ultiva, Glaxo Wellcome, Velika Britanija) u dozi 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . Za primjenu infuzijskih otopina, 0,9% NaCl (kontrolna skupina) i remifentanila (remifentanilska i naloksonska skupina) korištena je infuzijska pumpa za male životinje (SP 200iZ Syringe Pump, World Precision Instruments, SAD).

Doza remifentanila određena je pilot studijom ( $n=16$ ) koja je provedena zbog velikog raspona doza koje smo pronašli u literaturi (1-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) [46], te činjenice da se u ovoj disertaciji prvi put istražuje učinak opioida na nastanak i održavanje LTF-a. Doza remifentanila koja je odabrana u ovoj disertaciji iznosila je 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .

Trideset minuta nakon uvođenja remifentanila, a nakon provjere ABS-a, i eventualne promjene ventilacijskih parametara, mogli smo započeti s provođenjem AIH protokola koji se sastojao od pet trominutnih hipoksija ( $\text{FiO}_2=0,09$ ), odvojenih trominutnim hiperoksijama ( $\text{FiO}_2=0,5$ ).

#### 5.4. TVORIVA

*Remifentanil* (Ultiva, Glaxo Wellcome, Velika Britanija): bijeli prašak (1 mg) razrijedio se u 200 ml 0,9% NaCl. Remifentanil je primijenjen u dozi od 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  u obliku trajne infuzije s pomoću infuzijske pumpe za male životinje.

*Nalokson* (Naloxon, Inresa, Francuska) ampula nalokson hidroklorida, 1 ml, koja sadrži 0,4 mg naloksona, razrijeđena je s 0,9% NaCl u omjeru 1:8 i injicirana intravenski u obliku bolusa.

## 5.5. PROTOKOL

Životinje su bile podijeljene u tri skupine:

### 5.5.1. *Remifentanilska skupina životinja (n=12)*

U toj skupini životinja na početku eksperimenta primjenjena je trajna infuzija remifentanila u dozi 0,5 µg/kg/min. Trideset minuta nakon uvođenja remifentanila, a nakon stabilizacije signala freničkog živca, provjere ABS-a, i eventualne promjene ventilacijskih parametara životinje su podvrgavane AIH protokolu. 60 minuta nakon posljednje hipoksije istražio se utjecaj remifentanila na nastanak pLTF mjerenjem promjena aktivnosti freničkog živca u odnosu na aktivnost freničkog živca prije provođenja AIH protokola. Infuzija remifentanila isključena je 60 minuta nakon posljednje hipoksije, nakon uzimanja uzoraka krvi. Petnaest minuta nakon isključivanja remifentanila, tj. vremena potrebnog za razgradnju remifentanila nespecifičnim tkivnim esterazama i prestanka djelovanja na µ-opioidne receptore, analiziran je signal freničkog živca i ponovljen uzorak krvi za analizu (Slika 8).

### 5.5.2. *Naloksonska skupina životinja (n=4)*

Životinje iz ove skupine također su primale remifentanil u dozi od 0,5 µg/kg/min u obliku trajne infuzije, te su bile podvrgavane AIH protokolu uz iste uvjete kao i remifentanilska skupina životinja s tom razlikom da je u naloksonskoj skupini 60- minuta nakon posljednje

hipoksije primjenjen nalokson u dozi 0,1 mg/kg u obliku bolusa kako bi se istražio učinak primjene antagoniste opioidnih receptora na pLTF.

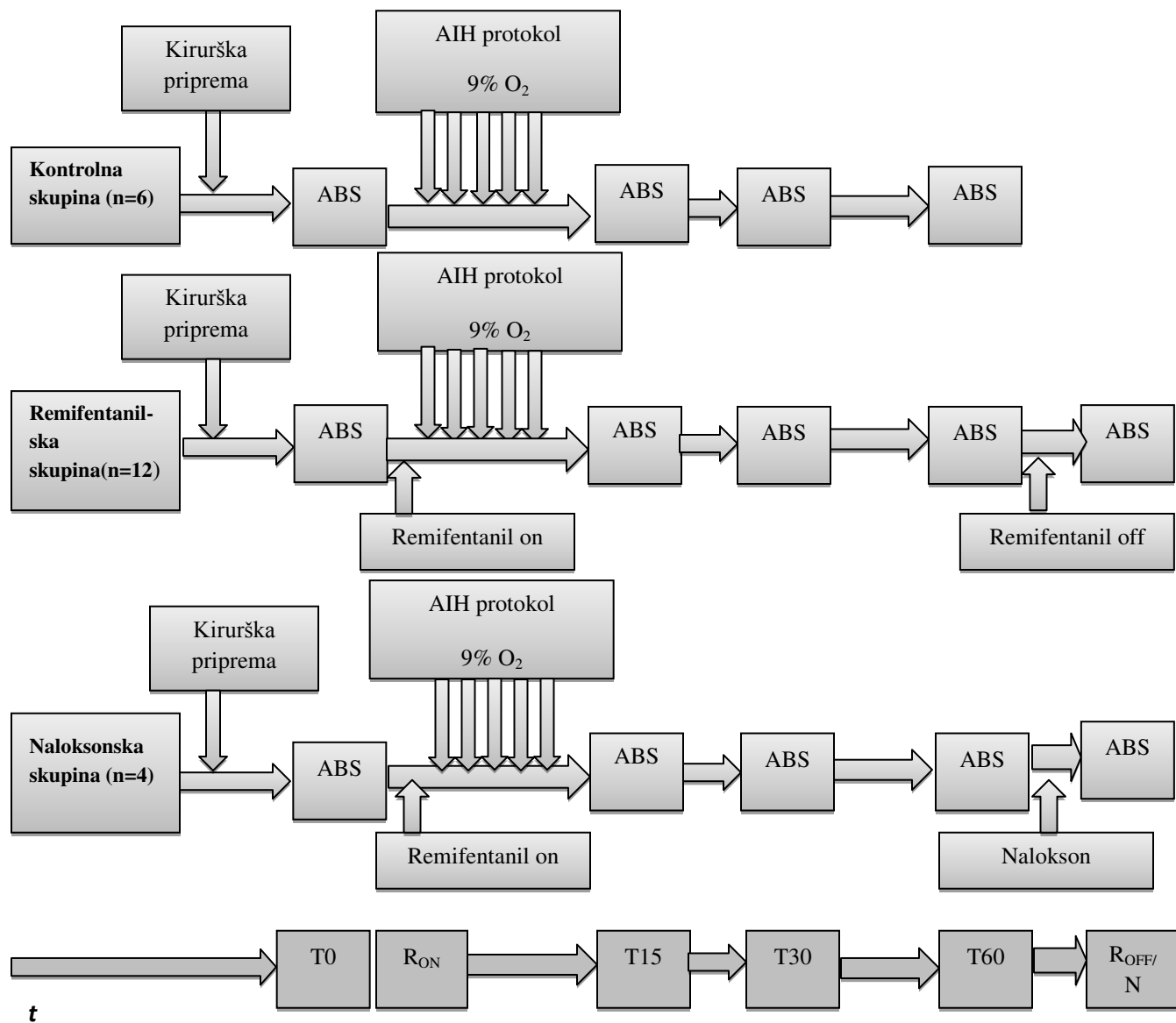
### 5.5.3. Kontrolna skupina životinja ( $n=6$ )

U kontrolnoj skupini životinje su primale trajnu infuziju 0,9% NaCl tijekom cijelog protokola, te su životinje također bile izložene akutnim ponavljanim hipoksijama prema protokolu.

Sve skupine životinja izlagane su istovjetnom AIH protokolu koji se sastojao od pet trominutnih hipoksijskih epizoda razdvojenih trominutnim hiperoksijama, te su 15, 30 i 60 minuta nakon posljednje hipoksije praćene promjene aktivnosti freničkog živca, a iz uzoraka arterijske krvi u istim vremenskim točkama mjerene su promjene acidobaznog statusa (ABS).

Na kraju pokusa, duboko anestetizirane životinje eutanazirane su u dubokoj anesteziji primjenom zasićene otopine kalijeva klorida. Dijagram tjeka istraživanja prikazan je na Slici 8.

Slika 8. Dijagram tijeka istraživanja



## 5.6. ISHOD ISTRAŽIVANJA I NJEGOVA MJERA

Analizirala se vršna aktivnost freničkog živca (pPNA), frekvencija disanja ( $f$ ), trajanje inspiriraja ( $T_i$ ), ekspiriraja ( $T_e$ ), ukupno trajanje respiracijskog ciklusa ( $T_{tot}$ ) i srednji arterijski tlak (MAP). Analiza navedenih parametara kod kontrolne skupine vršila se prije prve hipoksije ( $T_0$ ), za vrijeme pet hipoksijskih epizoda ( $TH_{1-5}$ ), te 15 ( $T_{15}$ ), 30 ( $T_{30}$ ) i 60 ( $T_{60}$ ) minuta nakon



posljednje hipoksije. Uzorci arterijske krvi za acidobazni status nisu bili uzimani tijekom hipoksija kako bi se smanjio sveukupni gubitak krvi svake pojedine životinje, već samo 15, 30 i 60 minuta nakon posljednje hipoksijske epizode.

U odnosu na kontrolnu skupinu životinja u remifentanilskoj skupini, analizirale su se dodatne točke: 30 minuta nakon uključivanja infuzije remifentanila ( $R_{ON}$ ) te 15 minuta nakon isključivanja infuzije ( $R_{OFF}$ ).

U naloksonskoj skupini analizirala se još jedna dodatna točka (N), nekoliko minuta nakon primjene intravenskog bolusa naloksona.

Vrijednost vršne aktivnosti freničkoga živca (pPNA) uspoređena je kao postotna promjena u odnosu na početne vrijednosti u svakoj pojedinoj skupini životinja i to u kontrolnoj skupini spram vrijednosti pPNA u vremenu T0 dok je u remifentanilskoj skupini životinja uspoređena spram vrijednosti u vremenu  $R_{ON}$ .

## 5.7. VREMENSKE KONTROLE

S obzirom na dugo trajanje eksperimenata (4 do 5 sati) odlučili smo u istraživanje uvrstiti još dvije dodatne skupine životinja, kako bismo bili sigurni da promjene aktivnosti freničkog živca nisu povezane s duljinom trajanja ekperimenta.

Skupina 1: n=5. Životinje su primale infuziju remifentanila u istoj dozi kao i eksperimentalna remifentanilska skupina (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), s tom razlikom da životinje nisu bile izložene AIH protokolu. Uzorkovanje krvi rađeno je u istim vremenskim razdobljima kao i u eksperimentalnoj skupini životinja.

Kako u 60 minuti nije došlo do nastanka pLTF uz stabilne respiracijske i hemodinamske parametre zaključili smo da bez izlaganja AIH protokolu ne dolazi do nastanka respiracijske plastičnosti, niti bilo kakvih drugih promjena u ritmu i obrascu disanja uslijed primjene remifentanila što je ukazalo na stabilnost i pouzdanost eksperimentalnog protokola.

Skupina 2: n=3. Životinje su primale infuziju 0,9% NaCl u istoj dozi kao i životinje kontrolne skupine (1,7 ml/h), ali nisu bile podvrgnute AIH protokolu, a uzorkovanje krvi rađeno je u istim vremenskim razdobljima kao i u kontrolnoj skupini životinja. Kako u 60 minuta nije došlo do nastanka pLTF uz stabilne respiracijske i hemodinamske parametre zaključili smo da bez izlaganja AIH protokolu ne dolazi do nastanka respiracijske plastičnosti, niti bilo kakvih drugih promjena u ritmu i obrascu disanja uslijed primjene 0,9% NaCl što je ukazalo na stabilnost i pouzdanost eksperimentalnog protokola.

## 5.8. STATISTIČKI POSTUPCI

Dobiveni podatci obrađivani su MedCalc statističkim programom (MedCalc Software, Belgija). Od testova je korišten ANOVA test za ponovljena mjerenja (za usporedbe unutar skupina i među skupinama u istim vremenskim točkama tijekom pokusa), uz upotrebu Bonferroni post-hoc korekcije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM (engl. *Standard Error of the Mean*- standardna pogreška srednje vrijednosti). Statistički značajnom smatrana je  $p < 0,05$ .

## 5.9. ETIČKA NAČELA

Prethodno navedeni pokusi odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u okviru znanstveno istraživačkih projekata: „Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju“, br.216-2163166-6513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš) i „Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava - uloga serotonina“ br.216-2163166-3342 MZOŠ RH (voditeljica izv. prof. dr. sc. Maja Valić). Svi kirurški postupci izvedeni su u anesteziji odgovarajućeg stupnja. Eutanazija životinja po završetku protokola vršila se u dubokoj anesteziji intravenskom primjenom zasićene otopine kalijevog klorida, prema naputcima Američkog veterinarskog udruženja o eutanaziranju pokusnih životinja.

## 6. REZULTATI

Infuzija agonista  $\mu$ -opioidnih receptora remifentanila reverzibilno je spriječila pojavu pLTF-a 60 minuta nakon izlaganja AIH protokolu. Nakon prestanka primjene infuzije remifentanila, došlo je do nastanka pLTF.

### 6.1. UČINAK REMIFENTANILA NA DISANJE

Remifentanil je uzrokovao promjene u ritmu disanja primarno djelujući na trajanje inspirija, koje se produžilo s  $0,51 \pm 0,04$  s na  $0,84 \pm 0,06$  s nakon primjene remifentanila ( $p < 0,05$ ). Međutim, trajanje ekspirija skratilo se s  $0,90 \pm 0,09$  s na  $0,71 \pm 0,08$  s dok se ukupno trajanje respiracijskog ciklusa nije statistički značajno promijenilo ( $1,41 \pm 0,06$  s vs  $1,55 \pm 0,06$  s, Tablica 3,  $p > 0,05$ ). Nakon početnih promjena, signal freničkog živca stabilizirao se uslijed postizanja očekivane doze remifentanila u infuziji ( $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), te je određen vremenski okvir od 30 minuta u svih životinja u eksperimentalnim skupinama (remifentanilska i naloksonska skupina životinja).

**Tablica 3.** Relativne promjene  $T_i$ ,  $T_e$  and  $T_{tot}$  tijekom pokusa u kontrolnoj i remifentanilskoj skupini životinja. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM.

	T0	R <sub>ON</sub>	T15	T30	T60	R <sub>OFF</sub>
Kontrola						
T <sub>i</sub>	$0,45 \pm 0,05$		$0,48 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,01$	
T <sub>e</sub>	$1,13 \pm 0,06$		$1,07 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,11$	$0,96 \pm 0,03$	
T <sub>tot</sub>	$1,56 \pm 0,09$		$1,55 \pm 0,10$	$1,44 \pm 0,09$	$1,36 \pm 0,04^*$	
Remifentanil						
T <sub>i</sub>	$0,51 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,06$	$0,76 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,12^\ddagger$	$0,51 \pm 0,04^\dagger$
T <sub>e</sub>	$0,90 \pm 0,09$	$0,71 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,10$	$0,76 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,09$	$1,10 \pm 0,09^\#$
T <sub>tot</sub>	$1,41 \pm 0,06$	$1,55 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,07$	$1,52 \pm 0,06$	$1,71 \pm 0,12^\yen$	$1,61 \pm 0,07$

Ti: trajanje inspirija; Te: trajanje ekspirija; Ttot: trajanje respiracijskog ciklusa; T0: početna vrijednost; R<sub>ON</sub>: 30 minuta nakon uključivanja infuzije remifentanila; TH1-5: hipoksije 1-5; T15: 15 minuta nakon posljednje hipoksije; T30: 30 min nakon posljednje hipoksije; T60: 60 minuta nakon posljednje hipoksije; R<sub>OFF</sub>: 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila.

\* statistički značajna razlika u odnosu na početne vrijednosti;  $p=0,032$ ; † statistički značajna razlika u odnosu na vrijednost u točki T60,  $p=0,009$ ; ‡ statistički značajna razlika u odnosu na početnu vrijednost prije prve hipoksije,  $p=0,013$ ; # statistički značajna razlika u odnosu na vrijednost u točki T60,  $p=0,028$ ; ¥ statistički značajna razlika u odnosu na početnu vrijednost,  $p=0,008$ .

## 6.2. REMIFENTANIL I RESPIRACIJSKI ODGOVOR NA HIPOKSIJU

Respiracijski odgovor na hipoksiju (HVR) ostao je sačuvan tijekom infuzije remifentanila i to u svih pet hipoksijskih epizoda (TH1 do TH5) koji se očitovao statistički značajnim povećanjem vršne aktivnosti freničkoga živca (pPNA) u usporedbi s početnim vrijednostima pPNA prije (točka T0) i nakon primjene remifentanilske infuzije (točka R<sub>ON</sub>) ( $p<0,001$ , Slika 9). Međutim, kada se usporedio HVR životinja koje su primale infuziju remifentanila i kontrolne skupine životinja mjerenjem pPNA, HVR remifentanilske skupine bio je značajno manji u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja ( $p<0,05$ ; Slika 9).

U remifentanilskoj skupini životinja zapaženo je blago, ali ne statistički značajno povećanje frekvencije disanja mjerene promjenom aktivnosti freničkoga živca tijekom svih 5 hipoksijskih epizoda (Slika 10). U kontrolnoj skupini životinja povećanje frekvencije disanja mjereno promjenama aktivnosti freničkoga živca bilo je statistički značajno veće tijekom svih pet ponavljanih hipoksija u odnosu na početne vrijednosti prije izlaganja akutnim ponavljanim hipoksijskim podražajima (Slika 10). U točkama T15 i T30 nakon izlaganja životinja akutnim ponavljanim hipoksijskim epizodama nije dovelo do statistički značajne promjene frekvencije

disanja mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca i parametrima respiracijskog ciklusa ( $T_i, T_e$  i  $T_{tot}$ ) niti u kontrolnoj niti u remifentanilskoj skupini životinja (Tablica 3 i Slika 10).

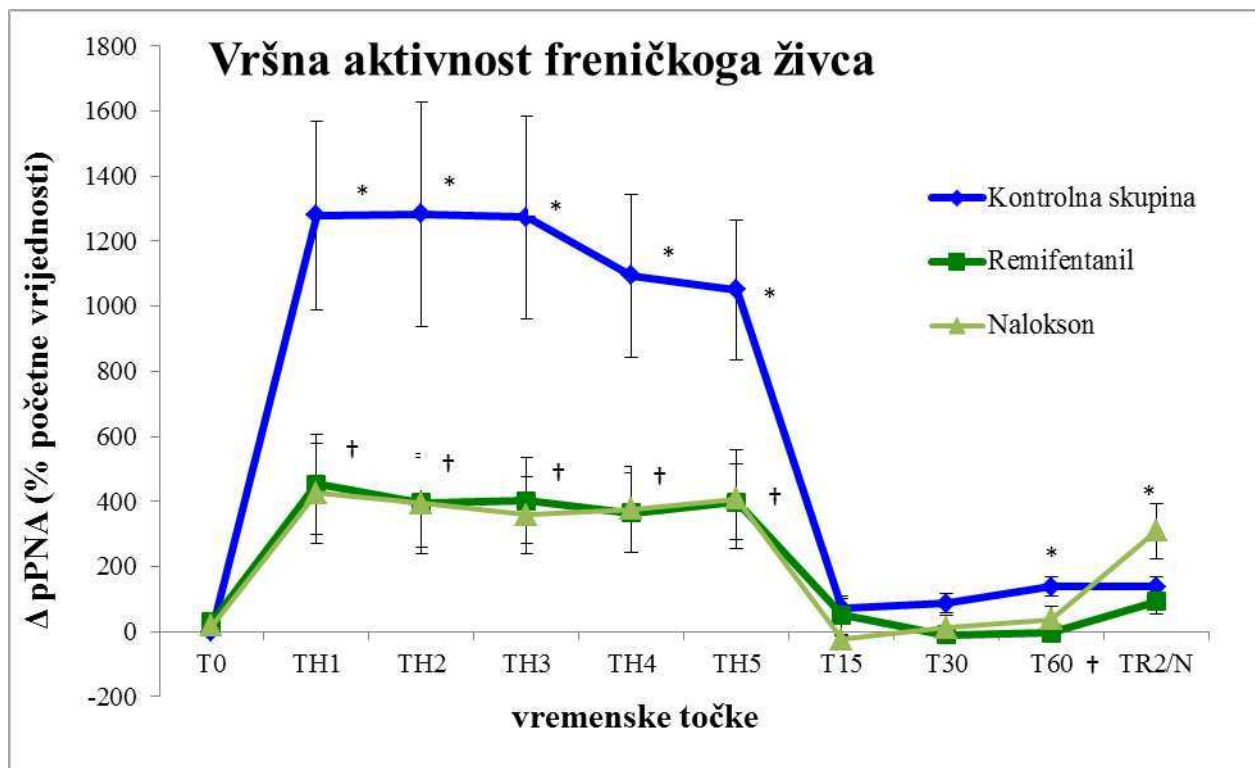
### 6.3. UČINAK REMIFNTANILA NA DUGOROČNU FACILITACIJU FRENIČKOGA ŽIVCA

U kontrolnoj skupini životinja došlo je do statistički značajnog povećanja pPNA 60 minuta nakon posljednje hipoksije ( $T_{60}$ ; povećanje od  $138,8 \pm 33,5\%$ ,  $p=0,006$ ), u usporedbi s početnim vrijednostima prije prve hipoksijske epizode (Slike 9 i 12), što znači da je došlo do nastanka pLTF-a. Ipak, 15 i 30 minuta nakon posljednje hipoksije ( $T_{15}$  i  $T_{30}$ ) vršna aktivnost freničkog živca kontinuirano se povećavala premda ne statistički značajno u usporedbi s vršnom aktivnosti freničkoga živca prije izlaganja hipoksijama (povećanje od  $73,4 \pm 35,4\%$  i  $86,8 \pm 35,3\%$ ,  $p>0,05$ , Slike 9 i 12).

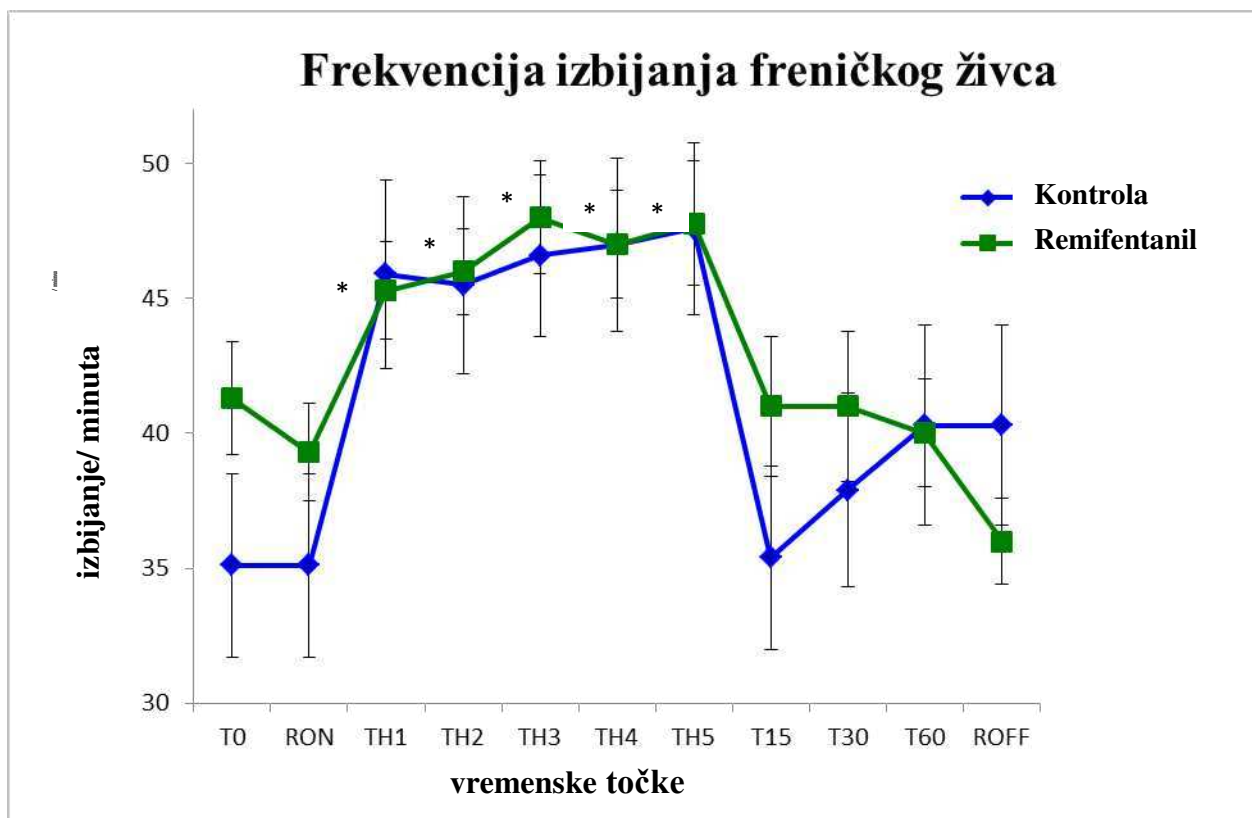
U remifentanilskoj skupini životinja nije bilo statistički značajnog povećanja vršne aktivnosti freničkoga živca u točkama  $T_{15}$  i  $T_{30}$  u odnosu na početne vrijednosti (povećanje od  $40,9 \pm 56,0\%$ , i smanjenje od  $11,3 \pm 12,4\%$ ;  $p>0,05$ ; Slike 9 i 11). U remifentanilskoj skupini nije uočen pLTF 60 minuta nakon posljednje hipoksije (Slika 9). Vršna aktivnost freničkog živca jedan sat nakon posljednje hipoksije povećala se  $11,8 \pm 23,8\%$  u odnosu na početne vrijednosti prije prve hipoksije ( $p>0,05$ ) i bila je statistički značajno manja u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine životinja (Slike 9 i 11;  $p<0,001$ ).

Ipak, 15 minuta nakon prekida remifentanilske infuzije, zabilježeno je povećanje pPNA od  $93,2 \pm 40,2\%$  ( $p<0,05$ ) u odnosu na početne vrijednosti. Takve vrijednosti zadržale su se sljedećih 30 minuta, u odnosu na vrijednosti vršne amplitude freničkoga živca prije početka infuzije

remifentanila, što znači da je s prekidom infuzije remifentanila došlo do pojave pLTF-a (Slike 9 i 11).

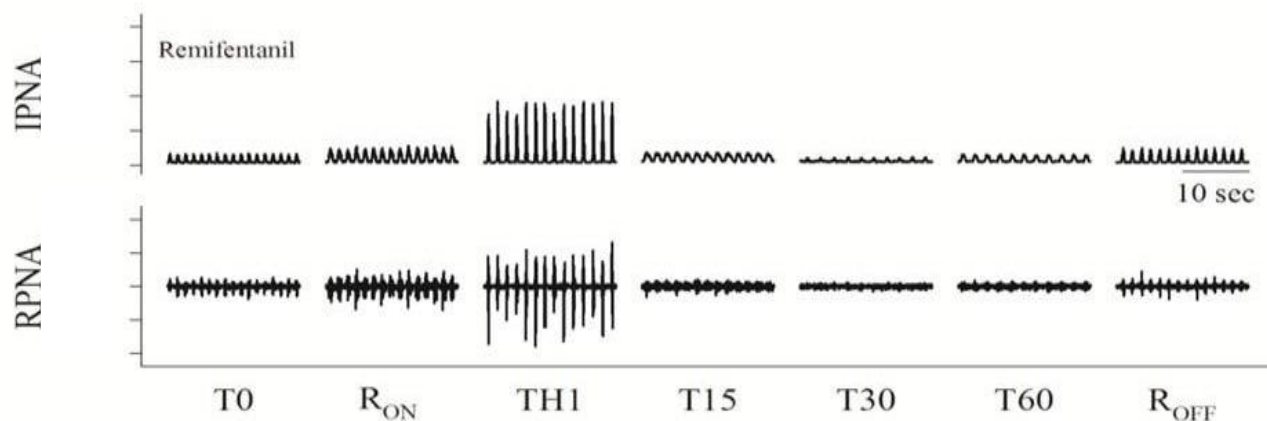


**Slika 9.** Promjene u vršnoj aktivnosti freničkog živca u kontrolnoj, remifentanilskoj i naloksonskoj skupini životinja. T0: početna vrijednost; TH1-5: hipoksije 1-5; T15: 15 minuta nakon posljednje hipoksije; T30: 30 min nakon posljednje hipoksije; T60: 60 minuta nakon posljednje hipoksije; TR2/N: 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila/ 5 minuta nakon primjene bolusa naloksona. Riječ je o relativnim promjenama u vršnoj aktivnosti freničkoga živca u usporedbi s početnim vrijednostima (\* statistički značajna razlika od početne vrijednosti,  $p < 0,01$ ; † statistički značajna razlika u odnosu na početnu vrijednost,  $p = 0,04$ ).

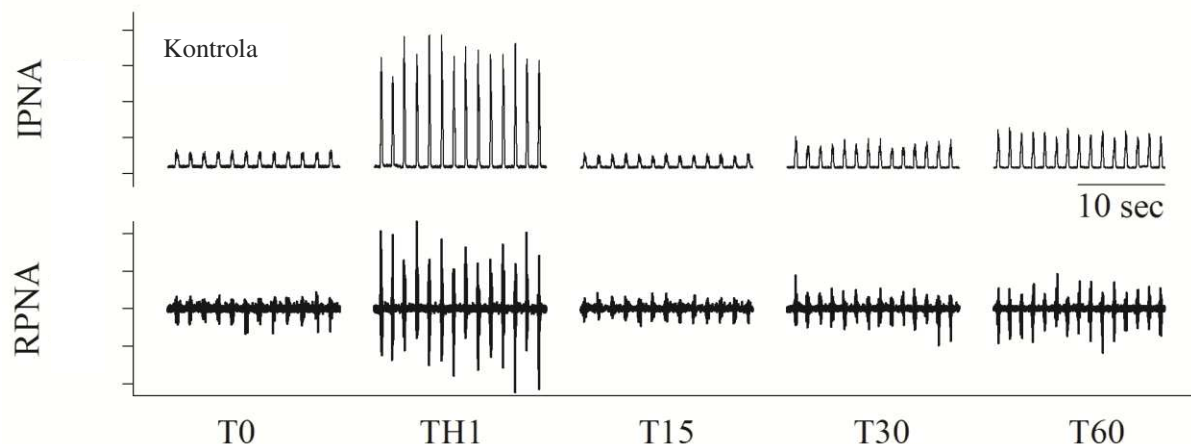


**Slika 10.** Promjene u frekvenciji disanja mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca u kontrolnoj i remifentanilskoj skupini životinja. T0: početna vrijednost; RON: 30 minuta nakon uključivanja infuzije remifentanila; TH1-5: hipoksije 1-5; T15: 15 minuta nakon posljednje hipoksije; T30: 30 min nakon posljednje hipoksije; T60: 60 minuta nakon posljednje hipoksije; ROFF: 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila. Relativne promjene u frekvenciji izbijanja freničkog živca (izbijanje/minuta) u kontrolnoj i remifentanilskoj skupini životinja (\*statistički značajna razlika u odnosu na početne vrijednosti,  $p < 0,01$ ).





**Slika 11.** Promjene u aktivnosti feničkog živca u jedne životinje kojoj je primjenjena infuzija remifentanila. Vidi se kako u T60 nema povećanja pPNA, odnosno nije došlo do nastanka pLTF-a. Petnaest minuta nakon prestanka infuzije remifentanila u točki R<sub>OFF</sub> dolazi do povećanja pPNA tj. do nastanka pLTF-a. IPNA - integrirani signal feničkog živca; RPNA – neobrađeni signal feničkoga živca.; T0 – početna vrijednost; R<sub>ON</sub> – 30 minuta nakon početka infuzije remifentanila; TH1 – prva hipoksija; T15, T30, – 15, 30, 60 minuta nakon posljednje hipoksije; R<sub>OFF</sub> – 15 minuta nakon prestanka infuzije remifentanila.



**Slika 12.** Promjene u aktivnosti feničkog živca u jedne životinje iz kontrolne skupine. Primjećuje se povećanje pPNA u T60 u odnosu na početnu vrijednost (T0) prije izlaganja akutnim ponavljanim hipoksijama koja ukazuje na nastanak pLTF-a. IPNA - integrirani signal feničkog živca; RPNA – neobrađeni signal feničkoga živca.; T0 – početna vrijednost; TH1 – prva hipoksija; T15, T30, T60 – 15, 30, 60 minuta nakon posljednje hipoksije.

***Promjene parcijalnih tlakova kisika i ugljikova dioksida, te srednjeg arterijskog tlaka (MAP) u modelu akutne ponavljane hipoksije***

U kontrolnoj i remifentanilskoj skupini životinja nisu zabilježene statistički značajne razlike u vrijednostima PaCO<sub>2</sub> i PaO<sub>2</sub> prije i poslije izlaganja ponavljanim hipoksijskim epizodama (Tablica 4).

**Tablica 4.** Parcijalni tlakovi ugljikovog dioksida (PaCO<sub>2</sub>) i kisika (PaO<sub>2</sub>) u arterijskoj krvi zabilježeni u kontrolnoj i remifentanilskoj skupini životinja u različitim vremenskim točkama tijekom pokusa. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost±SEM.

	T0	R <sub>ON</sub>	T15	T30	T60	R <sub>OFF</sub>
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)						
Kontrola	44,35±0,8		41,63±2,1	41,75±1,8	42,81±1,6	
Remifentanil	46,55±1,1	45,80±1,1	43,81±1,2	45,28±0,8	43,40±1,5	40,57±1,5
PaO <sub>2</sub> (mmHg)						
Kontrola	237,20±9,6		255,85±9,5	257,53±10,0	252,88±10,2	
Remifentanil	229,83±13,0	230,05±12,2	238,19±13,5	231,41±10,8	207,30±13,7	219,98±17,9

T0: početna vrijednost; R<sub>ON</sub>: 30 minuta nakon uključivanja infuzije remifentanila; TH1-5: hipoksije 1-5; T15: 15 minuta nakon posljednje hipoksije; T30: 30 min nakon posljednje hipoksije; T60: 60 minuta nakon posljednje hipoksije; R<sub>OFF</sub>: 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila.

Zapaženo je statistički značajno smanjenje srednjeg arterijskog tlaka (MAP) tijekom izlaganja akutnim ponavljanim hipoksijama i u kontrolnoj i u remifentanilskoj skupini životinja u usporedbi s početnim vrijednostima (Tablica 5). Rezultati istraživanja pokazuju da između ispitivanih skupina nisu postojale statistički značajne razlike u vrijednostima srednjeg arterijskog tlaka tijekom svih promatranih točaka za vrijeme trajanja pokusa (Tablica 5).

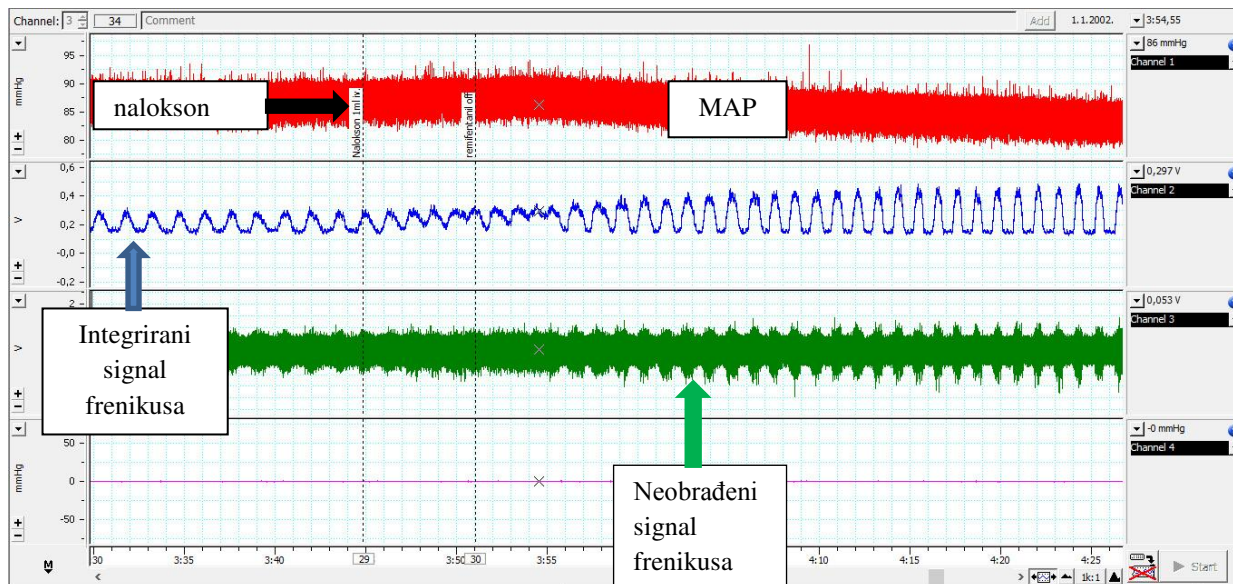
**Tablica 5.** Vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka (MAP) u obje skupine životinja u različitim vremenskim točkama tijekom pokusa. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM.

	T0	R <sub>ON</sub>	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5	T15	T30	T60	R <sub>OFF</sub>
<b>MAP</b>											
<b>mmHg</b>											
Kontrola	110,67 $\pm$ 6,3		63,20 $\pm$ 9,7*	58,02 $\pm$ 10,5*	55,12 $\pm$ 7,3*	53,84 $\pm$ 9,6*	57,62 $\pm$ 9,6*	106,49 $\pm$ 9,5	90,96 $\pm$ 12,5	91,8 4 $\pm$ 9, 8	
Remifentanil	96,59 $\pm$ 1 0,2	106,57 $\pm$ 8,0	76,84 $\pm$ 9,9 <sup>†</sup>	70,14 $\pm$ 8,4*	66,26 $\pm$ 8,1*	62,69 $\pm$ 7,4*	62,65 $\pm$ 6,9*	93,56 $\pm$ 10,8	95,12 $\pm$ 8,2	74,8 3 $\pm$ 6, 5	73,77 $\pm$ 6,9

T0: početna vrijednost; R<sub>ON</sub> vrijednost 30 minuta nakon početka infuzije remifentanila; TH1-5: hipoksije 1-5; T15: 15 minuta nakon posljednje hipoksije; T30: 30 min nakon posljednje hipoksije; T60: 60 minuta nakon posljednje hipoksije; R<sub>OFF</sub>: 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila (\* statistički značajna razlika u odnosu na početne vrijednosti,  $p < 0,001$ ; † statistički značajna razlika u odnosu na početne vrijednosti,  $p = 0,021$ ).

#### 6.4. UČINAK ANTAGONISTA $\mu$ -OPIOIDNIH RECEPTORA NALOKSONA NA DUGOROČNU FACILITACIJU FRENIČKOGA ŽIVCA

Primjena  $\mu$ -opioidnog agonista naloksona u točki T60 u naloksonskoj skupini životinja dovela je do statistički značajnog povećanja pPNA (povećanje od  $309 \pm 21,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) u odnosu na početne vrijednosti, tj. zabilježen je pLTF nakon antagonističkog učinka naloksona na  $\mu$ -opioidne receptore (Slika 9 i Slika 13).



**Slika 13.** Promjena aktivnosti freničkog živca nakon intravenske primjene bolusa naloksona. U T60 (60 minuta nakon posljednje hipoksije) primijenjen je bolus naloksona u dozi 0,1 mg/kg i.v. Dvije minute nakon primjene dolazi do statistički značajnog povećanja vršne aktivnosti freničkog živca (pPNA) u odnosu na početne vrijednosti (povećanje od  $309 \pm 21,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) te do pojave pLTF-a. MAP- srednji aterijski tlak; zelena linija prikazuje neobrađeni signal freničkoga živca, a plava integrirani (obrađeni) signal freničkog živca.

## 7. RASPRAVA

U ovom istraživanju dokazano je da se dugoročna facilitacija disanja može spriječiti intravenskom primjenom agonista  $\mu$ -opioidnih recetora, remifentanila, u modelu akutnih ponavljanih hipoksija. U kontrolnoj skupini životinja koja nije zaprimila infuziju remifentanila, dugoročna facilitacija disanja očitovala se povećanjem amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon izlaganja životinja ponavljanim akutnim hipoksijama. Međutim, 15 minuta nakon prestanka infuzije remifentanila došlo je do pojave pLTF-a. Ujedno je dokazano da će intravenska primjena selektivnog antagonista  $\mu$ -opioidnih receptora naloksona u 60-toj minuti nakon prestanka izlaganja životinja AIH protokolu, dovesti do pojave pLTF-a,

Poznato je kako opiodi mogu imati utjecaj na neke oblike sinaptičke plastičnosti kao što su dugoročna potencijacija (engl. *Long Term Potentiation*, LTP) i dugoročna depresija (engl. *Long Term Depression*, LTD [41, 42, 62]. Istraživanja su pokazala da nagli prekid primjene opiodnih agonista inducira LTP na prvoj sinapsi puteva koji sudjeluju u prijenosu boli [63]. Snimanjem postsinaptičkih potencijala u području štakorskog hipokampusa pri akutnom izlaganju opiodima pokazao je nastanak LTD [62]. Istraživanja su pokazala da je u dugogodišnjih ovisnika o opijatima smanjena sinaptička plastičnost koja se očituje u smanjenoj sposobnosti nastanka kako LTP tako i LTD [41]. Međutim, ovo je prvo istraživanje koje proučava mogući utjecaj opioda na specifičan oblik plastičnosti respiracijskog sustava, kojeg je moguće izmjeriti praćenjem promjena aktivnosti freničkoga živca u modelu akutnih ponavljanih hipoksija u obliku pLTF-a.

Remifentanil je odabran za istraživanje zbog svojih specifičnih farmakokinetičkih osobina: brzi početak djelovanja, kratko vrijeme potrebno za postizanje maksimalnog kliničkog učinka, te brza

razgradnja nespecifičnim krvnim i tkivnim esterazama što mu iznimno skraćuje vrijeme djelovanja [43, 44]. Remifentanil u plazmi dostiže stabilnu koncentraciju u manje od 10 minuta od početka primjene, a poluvrijeme eliminacije mu je kraće od 4 minute nakon prestanka kontinuirane infuzije bez obzira na duljinu trajanja infuzije i upotrijebljenu dozu [43]. Dakle, možemo zaključiti da je 15 minuta nakon prestanka kontinuirane infuzije remifentanila djelovanje zanemarivo, što smo i dokazali u ovoj disertaciji. Naime, kada smo petnaest minuta nakon prestanka kontinuirane infuzije snimali aktivnost freničkoga živca, zamijetili smo pojavu pLTFa, čija je pojava izostala za vrijeme trajanja infuzije remifentanila.

Proučavanjem literature primjećene su velike razlike u dozama remifentanila u životinjskim modelima, a kretale su se od 0,03 do 4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  što je ovisilo o vrsti životinje, primjenjenom anestetiku i vrsti eksperimenta [46]. Stoga je u ovoj disertaciji provedeno pilot istraživanje ( $n=16$ ) kojemu je bio cilj ustanoviti najvišu dozu remifentanila kod koje još uvijek postoji stabilna aktivnost freničkog živca iz koje je moguće očitati respiracijske parametre. Drugi važan uvjet kojeg je bilo potrebno zadovoljiti je očuvana reakcija na akutni hipoksijski podražaj. Ukoliko je primjenjena doza bila veća od 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  prethodni uvjeti nisu bili zadovoljeni tako da je doza od 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  odabrana kao prikladna doza remifentanila za istraživanje dugoročne facilitacije disanja u modelu akutnih ponavljanih hipoksijskih podražaja.

Dobro je poznato da različiti anestetici mogu utjecati na pojavu freničkog LTF- a. U ovom istraživanju odabrana je anestezija uretanom (etil karbamat) kao naprikladnija za ovakvu vrstu istraživanja zbog gotovo zanemarivog učinka na respiracijski i kardiovaskularni sustav [18, 64]. Nadalje u Laboratoriju za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu taj je anestetik upotrijebljen u nekoliko prethodnih istraživanja u istovjetnom modelu, te se pokazao kao vrlo pouzdan u istraživanju respiracijske plastičnosti mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca

[11, 15]. Uretan se u istraživanjima počeo se koristiti još 1885. godine, no u kliničke svrhe se ne upotrebljava. Uobičajeno se primjenjuje intraperitonealno ili intravenski u dozi od 1,2 g/kg. Zbog svega prethodno navedenog upravo je anestezija uretanom najčešće korištena anestezija u životinjskim modelima dugoročne facilitacije disanja [11, 14, 15, 34]. Do sada nije utvrđeno točno mjesto djelovanja uretana, ali čini se da nema utjecaja na GABA ( $\gamma$ - amino maslačna kiselina) kao niti na serotoninske receptore što ga čini pogodnim za proučavanje neuralne kontrole disanja [65].

### ***Remifentanil i HVR***

Poznato je da opiodi imaju značajan učinak na disanje koji se uglavnom očituje depresijom disanja [36, 66]. Predloženi mehanizam djelovanja opioda je putem  $\mu$ -receptora u respiracijskim područjima produljene moždine [36]. Primjena opioda jednako tako smanjuje i HVR [12], te u klinički značajnim dozama dovodi do bradipneje [4, 36]. Dokazano je kako intravenska primjena selektivnog agoniste opiodnih receptora, DAMGO [(D-Ala<sup>2</sup>-N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly-ol)- enkephalin] također smanjuje HVR, većinom smanjujući respiracijski volumen ( $V_t$ ) [67].

Za nastanak HVR-a bitna je stimulacija perifernih kemoreceptora [68], ali Bailey i suradnici su pokazali kako se ne može isključiti ni uloga središnjih kemoreceptora u području produljene moždine [69]. Naime odgovor na hipoksiju vjerojatno započinje u perifernim kemoreceptorima, primarno karotidnim tjelešcima, ali ostaje za pretpostaviti da opiodi središnjim djelovanjem utječu na odgovor na hipoksiju [69]. U dosadašnjim istraživanjima uglavnom se od opioda/opijata koristio morfin. Primjenjivao se intratekalno ili pak intravenski pa su takva istraživanja pomogla u proučavanju djelovanja opioda/opijata na HVR. Upravo u istraživanju Bailey i suradnika jasno je pokazano da središnja primjena opioda dovodi do smanjenog

odgovora na hipoksiju slično kao i nakon intravenske primjene opioida, samo što je učinak nakon središnje primjene znatno dugotrajniji. U našem istraživanju remifentanil je doveo do smanjenog odgovora na hipoksiju i to u svih pet hipoksijskih epizoda u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Budući da je u ovom istraživanju remifentanil primijenjen u obliku kontinuirane infuzije, te da brzim prolaskom remifentanila kroz krvno-moždanu barijeru djeluje i centralno, nije moguće zaključiti na osnovu ustroja ovog istraživanja kojim je od dva moguća puta, putem središnjih ili perifernih kemoreceptora, remifentanil u ovoj studiji doveo do smanjenog odgovora na hipoksiju.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je HVR bio očuvan tijekom svih pet hipoksija što je bilo važno za proučavanje respiracijske plastičnosti, premda je još jednom važno istaknuti da je u životinja koje su primale infuziju remifentanila HVR bio smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu životinja

### ***Remifentanil i frenički LTF***

Ponavljana akutna hipoksija najčešći je i najbolje poznat podražaj koji se koristi u proučavanju LTF-a [22, 57, 70]. U prethodnim istraživanjima korišteni su AIH protokoli koji su se sastojali od različitoga broja hipoksijskih epizoda, pri različitim vrijednostima kisika, u različitim životinjskim vrstama [57, 71-73]. U laboratoriju Zavoda za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu, AIH protokol sastojao se od pet trominutnih epizoda hipoksije ( $FiO_2=0,09$ ), međusobno razdijeljenih trominutnim razdobljima hiperoksije ( $FiO_2=0,5$ ), pri čemu se parcijalni tlak  $CO_2$  tijekom cijeloga pokusa nalazio unutar fizioloških granica (od 40,57 do 46,56 mmHg). Upravo je odgovor na akutnu ponavljanu hipoksiju i to prvu hipoksijsku epizodu u dosadašnjim istraživanjima istican kao posebice važan. Razlog tome je što se upravo na temelju odgovora na



prvu akutnu hipoksiju može pretpostaviti tj. predvidjeti veličina odgovora freničkog živca nakon provedenog AIH protokola u 60-toj minuti [11]. Naime, smatra se da bi postignuta amplituda aktivnosti freničkoga živca za vrijeme prve hipoksije mogla biti najjači predskazivajući čimbenik za amplitudni pLTF te se može izraziti jednadžbom:

$$\text{Frenički LTF} = -61,595 + (1,8 \times \text{bazalna frekvencija disanja}) + (2,27 \times \text{frekvencijski LTF}) + (0,31 \times \text{porast amplitude u hipoksiji})$$

U skupini životinja koja je primila kontinuiranu infuziju remifentanila odgovor na hipoksiju, premda slabiji u odnosu na kontrolnu skupinu, bio je očuvan. Uzimajući u obzir prethodnu jednadžbu, obzirom na povećanje amplitude od 452,4% u odgovoru na prvu hipoksiju, povećanje amplitude freničkoga živca trebalo bi u 60-oj minuti nakon posljednje hipoksije iznositi približno 152,9% [74]. Međutim, usprkos očuvanom hipoksijskom odgovoru i predviđenoj pojavi pLTF-a u remifentanilskoj skupini, pLTF ipak nije nastao.

### ***Mehanizam djelovanja remifentanila***

Obzirom da je u ovoj disertaciji remifentanil primijenjen sistemski, točan mehanizam djelovanja remifentanila koji bi bio odgovoran izostanak pLTF-a nakon AIH protokola nije moguće jednoznačno utvrditi. Prethodna istraživanja istražila su posljedice sistemske i lokalne modulacije  $\mu$ -opioidnih receptora u području medularnih rafe jezgara nakon izlaganja hipoksijama [67, 75]. Temeljem rezultata ovog istraživanja možemo samo pretpostaviti da je i nakon sistemske primjene remifentanila u obliku kontinuirane infuzije bilo moguće postići učinak na razini medularnih rafe jezgara budući da upravo to područje u produljenoj moždini sadrži brojne  $\mu$ -opioidne receptore koji sudjeluju u HVR [76]. Remifentanil dovodi do depresije

disanja djelujući na  $\mu$ -opioidne receptore koji se nalaze u respiracijskim područjima mozga, poput VRS gdje se nalaze smješteni respiracijski premotoneuroni [4]. Naime,  $\mu$ -opioidni receptori čiji je remifentanil agonist prisutni su ne samo u respiracijskim područjima produljene moždine, već i u brojnim drugim mjestima u SŽS-u, uključujući više moždane centre (insula, talamus, i neki djelovi moždane kore) [36]. Opioidne receptore nalazimo i u karotidnim tjelešcima [36]. Poznato je kako opioidnih receptora ima i u vagalnim živcima. Mehanosenzorički receptori koji se nalaze u epitelijalnim, submukoznim i mišićnim slojevima dišnih puteva te sudjeluju u prenošenju mehaničkih i osjetnih informacija iz pluća u SŽS također imaju opioidne receptore. Presjecanjem vagalnih živaca na početku eksperimenta sprječen je utjecaj mehanoreceptora na aktivnost freničkog živca.

Osjetljivost neurona na niske koncentracije opioda nakon sistemske primjene mogla bi biti povezana s brojem, gustoćom i smještajem  $\mu$ -opioidnih receptora, pretpostavljajući da zahvaćeni receptori, prvenstveno smješteni na aksonskim krajevima živca, mijenjaju egzocitozu neuroprijenosnika [4]. U posljednje vrijeme sve više se naglašava povezanost opioidnog i serotoninskog sustava u mehanizmima neuralne kontrole disanja. Poznato je da serotonin ima važnu ulogu u različitim oblicima sinaptičke plastičnosti [77], naročito respiracijskoj plastičnosti djelujući putem 5-HT<sub>2</sub> i 5-HT<sub>1A</sub> receptora [14, 15, 78, 79] smještenih na serotoninergičkim neuronima na spinalnoj [20, 80] i supraspinalnoj razini te u području rafe jezgara [14, 15].

Povezanost serotoninskog i opioidnog sustava istraživao je Wang sa suradnicima [81] koji je pokazao kako aktivacija specifičnih serotoninergičkih 5HT<sub>1A/7</sub> i 5HT<sub>4 $\alpha$</sub>  receptora može spriječiti depresiju respiracijskog i kardiovaskularnog sustava uzrokovanu opioidima. Izgleda kako opioidi imaju složenu ulogu u regulaciji sinaptičke plastičnosti, što otvara mogućnost dodatnim istraživanjima. U istraživanju u kojem se koristilo preparate slabinskog dijela leđne moždine

štakora pokazano je da akutno ustezanje opioidnih agonista potiče druge oblike sinaptičke plastičnosti, poput dugoročne potencijacije (LTP). LTP na prvoj sinapsi puteva za prijenos boli djeluje na način da dolazi do aktivacije postsinaptičkog G proteina i ionotropnih glutamatnih NMDA receptora te posljedičnog aktiviranja o kalciju ovisnog signalnog puta [42]. Ostaje otvoreno pitanje u kojoj mjeri prestanak primjene kratkodjelujućeg opioda kao što je remifentanil može sličnim mehanizmom uzrokovati drugu vrstu plastičnosti, poznatu kao pLTF u modelu uretanom anesteziiranog mehanički ventiliranog, obostrano vagotomiziranog i AIH protokolu izloženog štakora.

### ***Frenički LTF u ljudi***

Na kraju, postoji mogućnost da dugoročna facilitacija disanja u ljudi može imati izuzetno kliničko značenje čemu se u posljednje vrijeme pridaje velika pozornost, premda u humanoj respiracijskoj fiziologiji tek treba dokazati potencijalni značaj tog važnog mehanizma neuralne plastičnosti.

U ljudi je proučavan tzv. ventilacijski LTF (vLTF) koji predstavlja kombinaciju freničkog LTF-a i LTF-a interkostalnih živaca [82]. Međutim, pokušaji da se istim protokolima kao u životinjskih modela izazove vLTF nisu bili odviše uspješni [32]. Postoje istraživanja u kojima se uz umjerenu hiperkapniju uspjelo postići vLTF [83]. Značajno je da je vLTF primjećen i dokazan tijekom non-REM spavanja samo na mišićima gornjeg dišnog puta, ali ne i na respiracijskim mišićima [84]. Ipak, većina istraživanja u svezi pLTF-a koristi životinjske modele u strogo kontroliranim eksperimentalnim uvjetima. Ta su istraživanja dovela do otkrića različitih neuromodulatora i signalnih puteva koji reguliraju fenomen respiracijske plastičnosti. Temeljna, pretklinička istraživanja respiracijske plastičnosti iznimno su važna jer dovode do određenih saznanja o

prirodnim mehanizmima prilagodbe respiracijskih područja mozga i spoznaja kako ti fenomeni utječu na stabilnost disanja u bolesnika koji imaju povećan otpor gornjih dišnih puteva. Za neke lijekove koji se redovito koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi dokazano je da utječu na nastanak pLTF-a. Posebna pozornost istraživačkog tima Laboratorija za neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu usmjerena je na istraživanje učinka najčešće klinički korištenih anestetika na dugoročnu facilitaciju disanja. U istraživanjima provedenim na istovjetnom životinjskom modelu Carev i suradnici pokazali su da intravenski anestetik propofol spječava nastanak pLTF-a [11]. Jednako tako nedavno objavljeno istraživanje Marinov i suradnika pokazalo je da najčešće korišteni inhalacijski anestetici, sevofluran i izofluran sprječavaju nastanak pLTF-a [34]. Rezultati ovog istraživanja po prvi puta ukazuju na važnu ulogu opioida u nastanku pLTF-a, te je jasno pokazano kako sistemska primjena agonista  $\mu$ -opioidnih receptora remifentanila, također sprječava nastanak pLTF-a. Američko udruženje anesteziologa dalo je preporuke o oprezu pri primjeni opioida i drugih lijekova koji imaju sedativno djelovanje na središnji živčani sustav u bolesnika s opstrukcijskom apnejom tijekom spavanja u perioperacijskom razdoblju [60]. Naime, u svakodnevnom kliničkom radu primjećeno je kako su u bolesnika s OSA-om češće perioperacijske komplikacije, kao što su hipoksemija, atelektaze, upala pluća, otežana intubacija, akutni infarkt miokarda, plućna embolija, srčane aritmije i veća vjerojatnost prijema u Jedinicu intenzivnog liječenja [52, 53].

Iako se u istraživanju respiracijske plastičnosti kao podražaj najčešće koristi akutna ponavljana hipoksija, interes istraživača zaokupila je i mogućnost utjecaja hiperkapnije na respiracijsku plastičnost. Neke studije pokazuju kako je kontinuirana hiperkapnija učinkovitija u izazivanju LTD nego ponavljana hiperkapnija [22]. Postoje istraživanja koja ukazuju da hiperkapnija reverzibilno povećava frekvenciju disanja mjerenu promjenom aktivnosti freničkoga živca [85].

U istraživanjima u ljudi pokazano je da hiperkapnija i hipoksija, imaju združeni, sinergistički učinak na ventilaciju i simpatičku živčanu aktivnost [86, 87].

## 7.1. ZNANSTVENI DOPRINOS

Dugoročna facilitacija disanja, kao specifični oblik respiracijske plastičnosti, predstavlja fiziološki kompenzacijski mehanizam koji doprinosi održavanju respiracijske homeostaze. Održavanje respiracijske homeostaze tijekom svakodnevne prakse u radu anesteziologa od najvećeg je mogućeg značaja, posebice u bolesnika koji boluju od kroničnih bolesti koje zahvaćaju gornji dišni put. Respiracijski podražaj koji je upotrijebljen u ovoj disertaciji sastojao se od pet kratkotrajnih ponavljanih hipoksija koje upravo oponašaju zbivanja u disanju tijekom spavanja u osoba koje imaju OSA. Iako su u dosadašnjim istraživanjima znanstvenici pokušali oponašati ustroj istraživanja iz životinjskih modela istraživanja za sada nisu dala jednoznačan odgovor o ulozi LTF-a u stabiliziranju disanja u ljudi oboljelih od OSA-e. Stoga i nije iznenađujuće pitanje koje je nedavno postavljeno u jednom preglednom članku o tome ima li LTF protektivnu ili pak propagirajuću ulogu u nekim od kroničnih bolesti SŽS-a kao što je primjerice OSA. Jedna od teorija je da LTF može ublažavati OSA-u facilitacijom aktivnosti živaca primjerice hipoglosusa koji inerviraju mišiće gornjega dišnog puta [25, 57]. Prema drugoj teoriji, LTF može pogoršati apneju složenim mehanizmima u kojima se isprepleću mehanizmi neuralne kontrole disanja, kemoreceptije posredovane središnjim i/ili perifernim kemoreceptorima. Jedna od ozbiljnih posljedica narušene respiracijske homeostaze tijekom ponavljanih zastoja disanja u oboljelih od OSA je ukoliko se dogodi da minutna ventilacija premašuje metaboličke potrebe. Tada bi LTF uslijed hiperventilacije mogao dovesti do hipokapnije, a hipokapnija bi mogla narušiti mogućnost održavanja dugoročne facilitacije

disanja. Ujedno, u ljudi oboljelih od OSA-e dugoročno dolazi do povećane aktivnosti simpatičkog živačanog sustava, potom do povećane osjetljivosti perifernih i središnjih kemoreceptora, što za posljedicu ima pojačanje disanja. Međutim, ukoliko se OSA ne prepozna na vrijeme i ukoliko se pravovremeno ne započne s liječenjem događa se da opstruktivske apneje postaju središnje apneje uslijed povećane osjetljivost kemoreceptora na hipoksiju. Takav slijed promjena može imati za posljedicu pojavu prekomjernog ventilacijskog odgovora i posljedične hiperventilacije, koja dovodi do smanjenja vrijednosti CO<sub>2</sub> ispod vrijednosti apnejičkoga praga. U slučaju potrebe podvrgavanja operativnom zahvatu i anesteziji takvih bolesnika koji imaju narušen sustav respiracijske homeostaze i izmijenjen sustav neuralne kontrole disanja, zasigurno može utjecati na izbor lijekova kako u anesteziji tako i posebice u poslijeoperacijskom razdoblju.

Znanstveni doprinos ove doktorske disertacije jest istraživanje uloge remifentanila, agonista  $\mu$ -opioidnih receptora u mehanizmu nastanka pLTF-a. Poznato je da opiodi imaju snažan, primarno deprimirajući učinak na disanje i prijenos osjeta boli. Ovo istraživanje pridonijelo je temeljnim spoznajama o regulaciji disanja prilikom izlaganja akutnim stresnim podražajima, poput akutnih ponavljanih hipoksija, koje su česte u ljudi s OSA-om.

Zaključno, ova doktorska disertacija upotpunila je dosadašnje znanstvene spoznaje o obilježjima opioidne neuromodulacije disanja u neurofiziologiji disanja i respiracijskoj plastičnosti.

## 8. ZAKLJUČCI

1. Potvrđena je hipoteza kako će intravenska infuzija agonista  $\mu$ -opioidnih receptora, remifentanila u dozi od 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  spriječiti pojavu pLTF-a u modelu akutne ponavljane hipoksije.
2. Trajna infuzija remifentanila uzrokovala je promjene ritma disanja mjerene promjenama aktivnosti freničkoga živca. U freničkom neurogramu trajanje inspirija bilo je produljeno, dok je trajanje ekspirija bilo skraćeno. Ukupno trajanje respiracijskog ciklusa stoga se nije značajno promijenilo. Respiracijski odgovor na hipoksiju (HVR) ostao je sačuvan tijekom infuzije remifentanila i to u svih pet hipoksijskih epizoda. Međutim, kada se usporedio HVR životinja koje su primale infuziju remifentanila i kontrolne skupine životinja mjerenjem pPNA, HVR remifentanilske skupine bio je značajno manji u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja.
3. Potvrđena je hipoteza kako će prestankom infuzije remifentanila doći do povećanja aktivnosti freničkoga živca. Naime, vršna aktivnost freničkoga živca 15 minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila povećana je u odnosu na početne vrijednosti. Zaključak je da prestankom stimulacije  $\mu$ -opioidnih receptora agonistom remifentanilom ima za posljedicu nastanak dugoročne stimulacije disanja nakon izlaganja mehanički ventiliranog, uretanom anesteziiranog, obostrano vagotomiziranog štakora izloženog protokolu akutnih ponavljanih hipoksija.
4. Potvrđena je hipoteza kako će primjenom antagonista  $\mu$ -opioidnih receptora naloksone dovesti do povećanja vršne aktivnosti freničkog živca. Zaključak je da modulacija

aktivnosti  $\mu$ -opioidnih receptora imaju važnu ulogu u nastanku pLTF-a u modelu akutne ponavljane hipoksije u štakora.



## 9. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi hoće li intravenska infuzija agonista  $\mu$ -opioidnih receptora remifentanila spriječiti pojavu dugoročne facilitacije freničkoga živca (pLTF) u modelu ponavljanih hipoksija u odraslih mužjaka štakora vrste Sprague-Dawley, koji su obostrano vagotomizirani, paralizirani i mehanički ventilirani te anestezirani uretanom. Remifentanilska (n=12) i naloksonska skupina životinja (n=4) primale su trajnu infuziju remifentanila u dozi 0,5  $\mu$ g/kg/min, dok je kontrolna skupina životinja (n=6) primala infuziju 0,9% NaCl. Sve životinje bile su podvrgnute protokolu akutne ponavljane hipoksije (AIH protokol).

Vršna aktivnost freničkog živca (pPNA), frekvencija disanja (f), trajanje inspirija (Ti), ekspirija (Te) te ukupno trajanje respiracijskog ciklusa (Ttot) mjereni su tijekom svih pet hipoksijskih epizoda, te 15, 30 i 60 minuta nakon posljednje hipoksije. Dobivene vrijednosti uspoređivane su s početnim vrijednostima prije izlaganja životinja protokolu akutne ponavljane hipoksije. U remifentanilskoj skupini određena još jedna točka mjerenja u kojoj se nakon zaustavljanja infuzije remifentanila, nakon 15 minuta mjerila vršna aktivnost freničkoga živca kao i trajanje pojedinih faza u ciklusu disanja koje su uspoređene s aktivnošću freničkoga živca prije početka primjene infuzije remifentanila. U naloksonskoj skupini primjenjena je jednokratna doza anatagonista  $\mu$ -opioidnih receptora naloksona u dozi 0,1 mg/kg.

U kontrolnoj skupini životinja, vršna aktivnost freničkog živca (pPNA) bila je statistički značajno veća 60 minuta nakon posljednje hipoksije (T60, povećanje od  $138,8 \pm 28,3$  %,  $p=0,006$ ) u odnosu na početne vrijednosti, tj. primjećena je pojava pLTF-a. U remifentanilskoj skupini životinja, nije primjećena statistički značajna razlika vrijednostima pPNA u vremenskoj točki T60 u usporedbi s početnim vrijednostima (smanjenje od  $5,3 \pm 16,5$  %,  $p>0,05$ ), tj. nije došlo

do nastanka pLTF-a. Vršna aktivnost feničkog živca petnaest minuta nakon zaustavljanja infuzije remifentanila povećala se u odnosu na početne vrijednosti za  $93,2 \pm 40,2\%$  ( $p < 0,05$ ), te je ostala povećana tijekom slijedećih 30 minuta. To je značilo da nakon prestanka infuzije remifentanila a nakon izlaganja životinja AIH protokolu dolazi do nastanka pLTF-a. Primjena antagonista  $\mu$ -opioidnih receptora naloksona 60 minuta nakon posljednje hipoksije dovela je do statistički značajnog povećanja vrijednosti pPNA (povećanje od  $309 \pm 21,3\%$ ,  $p < 0,05$ ), odnosno došlo je do nastanka pLTF-a-

Možemo zaključiti kako je primjena remifentanila, kratkodjelujućeg agonista  $\mu$ -opioidnih receptora, reverzibilno spriječila pojavu feničkog LTF-a.

## 10. SUMMARY

The aim was to investigate whether intravenous infusion of remifentanil would depress phrenic long term facilitation (pLTF) evoked by acute intermittent hypoxia (AIH) in adult, male, urethane anaesthetized Sprague-Dawley rats, bilaterally vagotomized, paralyzed and mechanically ventilated. The remifentanil (n=12) and naloxone group (n=4) received a remifentanil infusion (0,5 µg/kg/min i.v., n=12), whereas the control group (n=6) received saline. Rats were exposed to AIH protocol. Phrenic nerve amplitude (PNA), burst frequency (f) and breathing rhythm parameters (Ti, Te, Ttot) were analyzed during 5 hypoxias and at 15, 30, and 60 minutes after the final hypoxia, and compared to baseline values. At the end of the experiment, the infusion of remifentanil was stopped and phrenic nerve activity was compared to baseline values prior to remifentanil infusion, whereas in the naloxone group opioid antagonist naloxone was applied (0,1 mg/kg). In the control group, peak phrenic nerve activity (pPNA) significantly increased at 60 min (T60, increase by  $138,8 \pm 28,3\%$ ,  $p=0,006$ ) after the last hypoxic episode compared to baseline values, i.e. pLTF was induced. In remifentanil treated rats, there were no significant changes in peak phrenic nerve activity at T60 compared to baseline values (decrease by  $5,3 \pm 16,5\%$ ,  $p>0,05$ ), i.e. pLTF was abolished. Fifteen minutes following cessation of remifentanil infusion, pPNA increased by  $93,2 \pm 40,2\%$  ( $p<0,05$ ) and remained increased compared to pre-remifentanil-infusion values for more than 30 minutes, i.e. pLTF could be observed after cessation of the remifentanil infusion. Naloxone reversed remifentanil action, and few minutes after iv. injection, i.e. pPNA increased by  $309 \pm 21,3\%$  ( $p<0,05$ ) and pLTF was observed. In conclusion, the short acting  $\mu$ -opioid receptor agonist, remifentanil, reversibly abolished phrenic long term facilitation in urethane anesthetized rats.

**11. LITERATURA**

1. Guyton, A.C., Hall, J.E., Textbook of medical physiology. 11th ed2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. xxxv, 1116.
2. Marko Jukić, Ino Husedžinović, Slavica Kvolik, Visnja Majerić Kogler, Mladen Perić i Josip Zunić (urednici), Klinička anesteziologija. Vol. 1. 2013, Zagreb: Medicinska Naklada.
3. Haji, A., Takeda, R., Okazaki, M, Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther*, 2000. 86(3): 277-304.
4. Mustapic, S., Radocaj, T. Sanchez, A. Dogas, Z. Stucke, A. G. Hopp, F. A., Stuth, E., A.Zuperku, E. J.et al., Clinically relevant infusion rates of mu-opioid agonist remifentanyl cause bradypnea in decerebrate dogs but not via direct effects in the pre-Botzinger complex region. *J Neurophysiol*, 2010. 103(1):409-18.
5. Forster, H.V.,Smith, C.A., Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. *J Appl Physiol* (1985), 2010. 108(4) 989-94.
6. Dempsey, J.A., Smith, C. A., Blain, G. M., Xie, A., Gong, Y., Teodorescu, M., Role of central/peripheral chemoreceptors and their interdependence in the pathophysiology of sleep apnea. *Adv Exp Med Biol*, 2012. 758: 343-9.
7. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan M, Stock MC, in *Clinical Anesthesia*2009, Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia. 413-43.
8. Duffin, J., Measuring the ventilatory response to hypoxia. *J Physiol*, 2007. 584(Pt 1): 285-93.

9. Powell, F.L., Milsom, W.K. Mitchell, G.S., Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol*, 1998. 112(2): 123-34.
10. Karanovic, N., Pecotic, R., Valic, M., Jeroncic, A., Carev, M., Karanovic, S., Ujevic, A., Dogas, Z., The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia in rats. *Anaesthesia*, 2010. 65(3): 227-34.
11. Carev, M., Valic, M., Pecotic, R., Karanovic, N., Valic, Z., Pavlinac, I., Dogas, Z., Propofol abolished the phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 2010. 170(1): 83-90.
12. Zhang, Z., Zhuang, J., Zhang, C., Xu, F., Activation of opioid mu-receptors in the commissural subdivision of the nucleus tractus solitarius abolishes the ventilatory response to hypoxia in anesthetized rats. *Anesthesiology*, 2011. 115(2): 353-63.
13. Berner, J., Shvarev, Y., Zimmer, A., Wickstrom, R., Hypoxic ventilatory response in Tac1<sup>-/-</sup> neonatal mice following exposure to opioids. *J Appl Physiol* (1985), 2012. 113(11): 1718-26.
14. 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(3): 583-9.
15. Pavlinac, I., Pecotic, R., Dogas, Z., Valic, M., Role of 5-HT(1)(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011. 175(1): 146-52.
16. Neubauer, J.A., Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 90(4): 1593-9.

17. Mitchell, G.S., Terada J., Should we standardize protocols and preparations used to study respiratory plasticity? *Respir Physiol Neurobiol*, 2011. 177(2): 93-7.
18. Mateika, J.H., Sandhu, K.S., Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011. 176(1-2): 1-11.
19. Bliss, T.V. and Collingridge, G.L., A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993. 361(6407): 31-9.
20. Mitchell, G.S., Baker, T. L., Nanda, S. A., Fuller, D. D., Zabka, A. G., Hodgeman, B. A., Bavis, R. W., Mack, K. J., Olson, E. B., Jr., Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol*, 2001. 90(6): 2466-75.
21. Mitchell, G.S., Johnson, S.M., Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol*, 2003. 94(1): 358-74.
22. Baker, T.L., Fuller, D. D., Zabka, A. G., Mitchell, G. S., Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol*, 2001. 129(1-2): 25-35.
23. Martin, P.A., Mitchell, G.S., Long-term modulation of the exercise ventilatory response in goats. *J Physiol*, 1993. 470: 601-17.
24. Goshgarian, H.G., The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* (1985), 2003. 94(2): 795-810.
25. Baker-Herman, T.L., Strey, K.A., Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011. 179(1): 48-56.

26. MacFarlane, P.M., Wilkerson, J. E., Lovett-Barr, M. R., Mitchell, G. S., Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008. 164(1-2): 263-71.
27. Millhorn, D.E., Eldridge, F.L., Waldrop, T.G., Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir Physiol*, 1980. 42(3): 171-88.
28. Sokolowska, B. Pokorski, M., Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit. *J Physiol Pharmacol*, 2006. 57 Suppl 4: 341-7.
29. Toyama, S., Sakurai, T., Tatsumi, K., Kuwaki, T., Attenuated phrenic long-term facilitation in orexin neuron-ablated mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009. 168(3): 295-302.
30. Turner, D.L., Mitchell, G.S., Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. *J Physiol*, 1997. 499 ( Pt 2): 543-50.
31. Mitchell, G.S., Powell, F. L., Hopkins, S. R., Milsom, W. K., Time domains of the hypoxic ventilatory response in awake ducks: episodic and continuous hypoxia. *Respir Physiol*, 2001. 124(2): 117-28.
32. Jordan, A.S., Catcheside, P. G., O'Donoghue, F. J., McEvoy, R. D., Long-term facilitation of ventilation is not present during wakefulness in healthy men or women. *J Appl Physiol* (1985), 2002. 93(6): 2129-36.
33. Mateika, J.H., Syed, Z., Intermittent hypoxia, respiratory plasticity and sleep apnea in humans: Present knowledge and future investigations. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013. 188(3): 289-300.

34. Marinov, V., Valic, M., Pecotic, R., Karanovic, N., Dodig, I. P., Carev, M., Valic, Z., Dogas, Z., Sevoflurane and isoflurane monoanesthesia abolished the phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013.
35. Corbett, A.D., Henderson, G., McKnight, A. T., Paterson, S. J., 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol*, 2006. 147 Suppl 1: S153-62.
36. Pattinson, K.T., Opioids and the control of respiration. *Br J Anaesth*, 2008. 100(6): p. 747-58.
37. Miller, R.D., *Miller's Anesthesia*. Vol. 1. 2010, Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier
38. Coda, B.A., Opioids, in *Clinical Anesthesia*, C.B. Barash PG, Stoelting RK, Cahalan M, Stock MC, Editor 2009, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 465-97.
39. Etches, R.C., Respiratory depression associated with patient-controlled analgesia: a review of eight cases. *Can J Anaesth*, 1994. 41(2): 125-32.
40. Romberg, R., Sarton, E., Teppema, L., Matthes, H. W., Kieffer, B. L., Dahan, A, Comparison of morphine-6-glucuronide and morphine on respiratory depressant and antinociceptive responses in wild type and mu-opioid receptor deficient mice. *Br J Anaesth*, 2003. 91(6): 862-70.
41. Shen, H., Kalivas, P.W., Reduced LTP and LTD in prefrontal cortex synapses in the nucleus accumbens after heroin self-administration. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013. 16(5): 1165-7.
42. Drdla, R., Gassner, M., Gingl, E., Sandkuhler, J., Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. *Science*, 2009. 325(5937): 207-10.



43. Michelsen, L.G. Hug, C.C. Jr., The pharmacokinetics of remifentanil. *J Clin Anesth*, 1996. 8(8): 679-82.
44. Cascone, S., Lamberti, G., Titomanlio, G., Piazza, O., Pharmacokinetics of Remifentanil: a three-compartmental modeling approach. *Transl Med UniSa*, 2013. 7: 18-22.
45. Ahonen, J., Olkkola, K. T., Verkkala, K., Heikkinen, L., Jarvinen, A., Salmenpera, M., A comparison of remifentanil and alfentanil for use with propofol in patients undergoing minimally invasive coronary artery bypass surgery. *Anesth Analg*, 2000. 90(6): 1269-74.
46. Yu, C.K., Remifentanil preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat. *Br J Anaesth*, 2007. 99(5): 632-8.
47. Smith, I., Avramov, M.N., White, P.F., A comparison of propofol and remifentanil during monitored anesthesia care. *J Clin Anesth*, 1997. 9(2): 148-54.
48. Authier, S., Legaspi, M., Gauvin, D., Troncy, E., Respiratory safety pharmacology: positive control drug responses in Sprague-Dawley rats, Beagle dogs and cynomolgus monkeys. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009. 55(2): 229-35.
49. Fukuda, K., Kato, S., Shoda, T., Morikawa, H., Mima, H., Mori, K., Partial agonistic activity of naloxone on the opioid receptors expressed from complementary deoxyribonucleic acids in Chinese hamster ovary cells. *Anesth Analg*, 1998. 87(2): 450-5.
50. Verborgh, C., Meert, T.F., Antagonistic effects of naloxone and naloxonazine on sufentanil-induced antinociception and respiratory depression in rats. *Pain*, 1999. 83(1): 17-24.

51. Mahamed, S., Mitchell, G.S., Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp Physiol*, 2007. 92(1): 27-37.
52. Kryger, M.H., Diagnosis and management of sleep apnea syndrome. *Clin Cornerstone*, 2000. 2(5): 39-47.
53. Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., Badr, S., The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med*, 1993. 328(17): 1230-5.
54. Shahar, E., Whitney, C. W., Redline, S., Lee, E. T., Newman, A. B., Nieto, F. J., O'Connor, G. T., Boland, L. L., Schwartz, J. E., Samet, J. M., Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163(1): 19-25.
55. Turkington, P.M., Sircar, M., Allgar, V., Elliott, M., Relationship between obstructive sleep apnoea, driving simulator performance, and risk of road traffic accidents. *Thorax*, 2001. 56(10): 800-5.
56. Bach, K.B. Mitchell, G.S., Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol*, 1996. 104(2-3): 251-60.
57. Dale-Nagle, E.A., Hoffman, M. S., MacFarlane, P. M., Mitchell, G. S., Multiple pathways to long-lasting phrenic motor facilitation. *Adv Exp Med Biol*, 2010. 669: 225-30.
58. Chung, S.A., Yuan, H., Chung, F., A systemic review of obstructive sleep apnea and its implications for anesthesiologists. *Anesth Analg*, 2008. 107(5): 1543-63.

59. Vasu, T.S., Grewal, R., Doghramji, K., Obstructive sleep apnea syndrome and perioperative complications: a systematic review of the literature. *J Clin Sleep Med*, 2012. 8(2): 199-207.
60. Gross, J.B., Bachenberg, K. L., Benumof, J. L., Caplan, R. A., Connis, R. T., Cote, C. J., Nickinovich, D. G., Prachand, V., Ward, D. S., Weaver, E. M., Ydens, L., Yu, S., Practice guidelines for the perioperative management of patients with obstructive sleep apnea: a report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Perioperative Management of patients with obstructive sleep apnea. *Anesthesiology*, 2006. 104(5): 1081-93; quiz 1117-8.
61. Bernards, C.M., Knowlton, S. L., Schmidt, D. F., DePaso, W. J., Lee, M. K., McDonald, S. B., Bains, O. S., Respiratory and sleep effects of remifentanyl in volunteers with moderate obstructive sleep apnea. *Anesthesiology*, 2009. 110(1): 41-9.
62. Wagner, J.J., Etemad, L. R. Thompson, A.D., Opioid-mediated facilitation of long-term depression in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 296(3): 776-81.
64. Maggi, C.A. Meli, A., Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experientia*, 1986. 42(3): 292-7.
65. Hara, K. Harris, R. A., The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg*, 2002. 94(2): 313-8.
66. Pattinson, K.T., Knowlton, S. L., Schmidt, D. F., DePaso, W. J., Lee, M. K., McDonald, S. B., Bains, O. S., Opioids depress cortical centers responsible for the volitional control of respiration. *J Neurosci*, 2009. 29(25): 8177-86.

67. Zhang, Z., Xu, F., Zhang, C., Liang, X., Opioid mu-receptors in medullary raphe region affect the hypoxic ventilation in anesthetized rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009. 168(3): 281-8.
68. Wang, W.J., Cheng, G. F., Dinger, B. G., Fidone, S. J., Effects of hypoxia on cyclic nucleotide formation in rabbit carotid body in vitro. *Neurosci Lett*, 1989. 105(1-2): 164-8.
69. Bailey, P.L., Lu, J. K., Pace, N. L., Orr, J. A., White, J. L., Hamber, E. A., Slawson, M. H., Crouch, D. J., Rollins, D. E., Effects of intrathecal morphine on the ventilatory response to hypoxia. *N Engl J Med*, 2000. 343(17): 1228-34.
70. Mateika, J.H., 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(3): 279-96.
71. Fregosi, R.F., Mitchell, G. S., Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol*, 1994. 477 ( Pt 3): 469-79.
72. Fuller, D.D., Bach, K. B., Baker, T. L., Kinkead, R., Mitchell, G. S., Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol*, 2000. 121(2-3): 135-46.
73. Dick, T.E., Hsieh, Y. H., Wang, N., Prabhakar, N., Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol*, 2007. 92(1): 87-97.
74. Baker-Herman, T.L., Mitchell, G.S., Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008. 162(1): 8-17.

75. Dias, M.B., Nucci, T. B., Branco, L. G., Gargaglioni, L. H., Opioid mu-receptors in the rostral medullary raphe modulate hypoxia-induced hyperpnea in unanesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012. 204(3): 435-42.
76. Wang, X., Dergacheva, O., Kamendi, H., Gorini, C., Mendelowitz, D., 5-Hydroxytryptamine 1A/7 and 4alpha receptors differentially prevent opioid-induced inhibition of brain stem cardiorespiratory function. *Hypertension*, 2007. 50(2): 368-76.
77. Tokarski, K., Bobula, B., Kusek, M., Hess, G., The 5-HT(7) receptor antagonist SB 269970 counteracts restraint stress-induced attenuation of long-term potentiation in rat frontal cortex. *J Physiol Pharmacol*, 2011. 62(6): 663-7.
78. Kinkead, R., Mitchell, G. S., Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. *Am J Physiol*, 1999. 277(3 Pt 2): R658-66.
79. Fuller, D.D., Zabka, A. G., Baker, T. L., Mitchell, G. S. et al., Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *J Appl Physiol*, 2001. 90(5): p. 2001-6; discussion 2000.
80. Pecotic, R., et al., Blockade of 5-HT(1A) receptors in the phrenic nucleus of the rat attenuated raphe induced activation of the phrenic nerve activity. *J Physiol Pharmacol*, 2009. 60(3): 167-72.
81. Wang, Y. and A.G. Ramage, The role of central 5-HT(1A) receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats. *J Physiol*, 2001. 536(Pt 3): 753-67.
82. Lee, D.S., M.S. Badr, and J.H. Mateika, Progressive augmentation and ventilatory long-term facilitation are enhanced in sleep apnoea patients and are mitigated by antioxidant administration. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 22): 5451-67.

83. Harris, D.P., Balasubramaniam, A., Badr, M. S., Mateika, J. H., 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(4): R1111-9.
84. Shkroukani, M., Babcock, M.A., Badr, M. S., Effect of episodic hypoxia on upper airway mechanics in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* (1985), 2002. 92(6): 2565-70.
85. Wiemann, M., Piechatzek, L., Gopelt, K., Kiwull-Schone, H., Kiwull, P., Bingmann, D., The NHE3 inhibitor AVE1599 stimulates phrenic nerve activity in the rat. *J Physiol Pharmacol*, 2008. 59(1): 27-36.
86. Somers, V.K., Mark, A. L., Zavala, D. C., Abboud, F. M., Influence of ventilation and hypocapnia on sympathetic nerve responses to hypoxia in normal humans. *J Appl Physiol* (1985), 1989. 67(5): 2095-100.
87. Somers, V.K., Mark, A. L., Zavala, D. C., Abboud, F. M., Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. *J Appl Physiol* (1985), 1989. 67(5): 2101-6.

### 13. ŽIVOTOPIS

#### Osobni podaci:

Ime i prezime: **Božena Ivančev**

Datum i mjesto rođenja: 03. lipnja 1973., Split

Adresa: A.B. Šimića 17, 21 000 Split

Telefon: 091 9564 534

E - pošta: bozena.ivancev@gmail.com

Bračno stanje: udata, majka 2 djece

#### Obrazovanje:

1979. -1987. Osnovna škola „Veljko Vlahović“ Split

1987. - 1991. Zdravstveni Obrazovni Centar Split, laboratorijski tehničar

1992. -1998. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, doktor medicine

2001. - 2003. Poslijediplomski znanstveni studij „Klinička medicina“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

#### Zaposlenja:

1991. - 1992. Hrvatska vojska, IV. Brigada, Sanitetska služba

1998. - 1999. Dom zdravlja Split, pripravnički staž

2000. - 2005. Roche Diagnostics, stručni suradnik

2005. - 2006. Bayer Pharma Hrvatska, stručni suradnik

2006. - 2012. KBC Split, specijalizant anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja

2012. - danas KBC Split, Klinika za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, specijalist

**Članstva u profesionalnim udruženjima:**

Hrvatska liječnička komora

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za anesteziologiju i intenzivno liječenje (HDAIL)

Europsko udruženje anesteziologa (ESA)

Europsko društvo za regionalnu anesteziju i terapiju boli (ESRA)

**Znanstvene publikacije:**

Poglavlje u knjizi: Intravenski anestetici, u knjizi Klinička anesteziologija. Vol. 1. 2013, Zagreb: Medicinska Naklada. Urednici: Marko Jukić, Ino Husedžinović, Slavica Kvolik, Visnja Majerić Kogler, Mladen Perić i Josip Zunić

Rad u CC časopisu Ivancev, B., Carev, M., Pecotic, R., Valic, M., Pavlinac Dodig, I., Karanovic, N., Dogas, Z. Remifentanil reversibly abolished phrenic long term facilitation in rats subjected to acute intermittent hypoxia J Physiol Pharmacol 2013;64(4): 485-92.

Sažetak na međunarodnom kongresu:

Europski anesteziološki kongres, Amsterdam 2011. European Journal of Anaesthesiology, Volume 28, Supplement 48, 2011.