

# Učinak propofolske i uretanske anestezije na dugoročnu facilitaciju freničkoga živca - interakcija sa serotoninimskim sustavom

---

Carev, Mladen

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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:171:763991>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**Mr. sc. Mladen Carev, dr. med.**

**UČINAK PROPOFOLSKE I URETANSKE ANESTEZIJE NA  
DUGOROČNU FACILITACIJU FRENIČKOGA ŽIVCA –  
INTERAKCIJA SA SEROTONINSKIM SUSTAVOM**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, ožujak 2010.**

**LABORATORIJ ZAVODA ZA NEUROZNANOST**  
**MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U SPLITU**

**VODITELJ RADA:**

**Prof. dr. sc. Zoran Đogaš, dr. med.**

Predstojnik Zavoda za neuroznanost, Medicinski fakultet u Splitu

*ZAHVALA: Za pomoć u izradi ove disertacije od srca zahvaljujem svim dobrim ljudima sa Zavoda za neuroznanost - svom mentoru, Maji, Renati, Ivani i Jeleni.*

<b><u>1. SADRŽAJ</u></b>	
	str.
<b>1. <u>SADRŽAJ</u></b>	1
<b>2. <u>POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU</u></b>	4
<b>3. <u>UVOD</u></b>	6
<b>3.1. SREDIŠNJA KONTROLA DISANJA I FRENIČKI NEUROGRAM</b>	6
<b>3.2. HIPOKSIJA I DISANJE</b>	8
<i>3.2.1. Periferni kemoreceptori</i>	8
<i>3.2.2. Hipoksijski ventilacijski odgovor</i>	9
3.2.2.1. KRATKA (NEPREKIDNA) HIPOKSIJSKA EPIZODA (2-5 MINUTA)	10
3.2.2.2. INTERMITENTNA (EPIZODNA) HIPOKSIJA	11
3.2.2.2.1. Definicija i važnost intermitentne hipoksije	11
3.2.2.2.2. Fiziološki mehanizmi za vrijeme ili nakon intermitentne hipoksije	11
3.2.2.3. PROLONGIRANE HIPOKSIJSKE EPIZODE (>5 minuta)	12
<b>3.3. DUGOROČNA FACILITACIJA FRENIČKOGA ŽIVCA</b>	14
<i>3.3.1. LTF u ljudi</i>	17
<i>3.3.2. Neuromodulacija pri LTF – ključna uloga serotonina</i>	19
<b>3.4. DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA I PLASTIČNOST RESPIRACIJSKOG SUSTAVA</b>	23
<b>3.5. PROPOFOL</b>	26
<i>3.5.1. Propofol – opće postavke</i>	26
<i>3.5.2. Anestetici i kontrola disanja s posebnim osvrtom na propofol</i>	28
<b>3.6. URETAN</b>	30
<b>3.7. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	32

<b>3.8. HIPOTEZE</b>	35
3.8.1. <i>Hipoteza 1</i>	35
3.8.2. <i>Hipoteza 2</i>	35
<b>4. <u>TVORIVA I POSTUPCI</u></b>	36
<b>4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA</b>	36
4.1.1. <i>Traheotomija i mehanička ventilacija</i>	36
4.1.2. <i>Kanulacija krvnih žila</i>	37
4.1.3. <i>Kirurgija freničkoga živca</i>	38
4.1.4. <i>Monitoring tijekom anestezije</i>	38
4.1.5. <i>Anestezija</i>	38
4.1.5.1. ANESTEZIJA U SKUPINI U	39
4.1.5.2. ANESTEZIJA U SKUPINI P	39
<b>4.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL</b>	40
4.2.1. <i>Prvi dio eksperimenta</i>	40
4.2.2. <i>Drugi dio eksperimenta</i>	43
<b>4.3. UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA</b>	44
4.3.1. <i>Aktivnost freničkoga živca</i>	45
4.3.2. <i>Statistička obrada</i>	45
<b>4.4. ETIČKA NAČELA</b>	45
<b>5. <u>REZULTATI</u></b>	47
<b>5.1. STUDIJA I</b>	47
<b>5.2. STUDIJA 2</b>	55
<b>6. <u>RASPRAVA</u></b>	57
<b>6.1. STUDIJA I</b>	57
6.1.1. <i>Dugoročna facilitacija freničkoga živca i anestezija</i>	57

6.1.2. Dugoročna facilitacija freničkoga živca i hipoksijski ventilacijski odgovor	64
6.1.3. Tehnička razmatranja	68
6.1.3.1. PROTOKOL AKUTNE INTERMITENTNE HIPOKSIJE - BROJ HIPOKSIJSKIH EPIZODA	68
6.1.3.2. DAVANJE LIJEKOVA TIJEKOM EKSPERIMENTA	74
6.1.3.3. ODRŽAVANJE HEMODINAMSKE STABILNOSTI I ACIDOBAZNE RAVNOTEŽE	76
6.1.3.4. ODRŽAVANJE IZOKAPNIJE	77
<b>6.2. STUDIJA 2</b>	77
6.2.1. Serotonin u kontroli disanja	77
6.2.1.1. 5-HT <sub>1A</sub> RECEPTORI	78
6.2.2. Apneja izazvana anestheticima	79
<b>6.3. ZNANSTVENI DOPRINOS I KLINIČKE IMPLIKACIJE</b>	81
6.3.1. Povezanost opstruktivske apneje tijekom spavanja (OSA) i freničke dugoročne facilitacije	83
6.3.2. Respiracijsko zatajenje nakon ozljeda leđne moždine	85
<b>7. <u>ZAKLJUČCI</u></b>	89
<b>8. <u>SAŽETAK</u></b>	90
<b>9. <u>SUMMARY</u></b>	92
<b>10. <u>LITERATURA</u></b>	94
<b>11. <u>ŽIVOTOPIS</u></b>	121

**2. POPIS OZNAKA I KRATICA PO ABECEDNOM REDU**

5-HT – serotonin (5-hidroksitriptamin)

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

8-OH-DPAT – 8 hidroksi-2-(di-n-propilamino) tetralin, agonist 5-HT<sub>1A</sub> receptora

AHI – apneja hipopneja indeks (zbroy epizoda apneje i hipopneje u 1 satu spavanja)

AIH – akutna intermitentna hipoksija, CIH – kronična intermitentna hipoksija

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propionat (vrsta receptora za glutamat)

AR – akutni odgovor (engl. acute response)

BDNF – engl. brain-derived neurotrophic factor (neurotrofin)

C4 – razina 4. vratnog kralješka, itd.

C<sub>a</sub>O<sub>2</sub> – sadržaj kisika u arterijskoj krvi (ml/100 ml)

CBCR – kemoreceptori u karotidnim tjelešcima (engl. carotid body chemoreceptors)

CPP – fenomen ukriženih frenikusa (engl. crossed phrenic phenomenon)

CSN – živac karotidnoga sinusa, Heringov živac

dAIH – dnevna akutna intermitentna hipoksija

DRS – dorzalna respiracijska skupina, VRS – ventralna respiracijska skupina

ED<sub>50</sub> – količina tvari potrebna da izvede učinak u 50% ispitivanih životinja

ETCO<sub>2</sub> – tlak ugljikova dioksida na kraju izdisaja

FiO<sub>2</sub> – udio kisika u udahnutom zraku

GABA –  $\gamma$ -amino-maslačna kiselina, GABA<sub>A</sub> – receptor, podskupina A

HD – hipoksijska desenzitizacija

HVD – hipoksijsko sniženje ventilacije

HVR – hipoksijski ventilacijski odgovor

IH – intermitentna hipoksija

- LTF – dugoročna facilitacija, pLTF – frenička dugoročna facilitacija
- LTP – dugoročna potencijacija
- MAC – minimalna alveolarna koncentracija
- N.XII – nervus hypoglossus, XII moždani živac
- nAChRs – nikotinski acetilkolinski receptori
- NMDA – N-metil D-aspartat (vrsta glutamatnih receptora)
- OSA – opstruktivna apneja tijekom spavanja (engl. Obstructive Sleep Apnea)
- PA – progresivna augmentacija
- $P_aO_2$ , i  $P_aCO_2$  – parcijalni tlak kisika i ugljikova dioksida u arterijskoj krvi (mmHg)
- PEEP – pozitivni tlak na kraju izdisaja (engl. Positive End-Expiratory Pressure)
- PKC – protein kinaza C
- PNA – aktivnost freničkoga živca, PNG – frenički neurogram
- PRS – pontina respiracijska skupina
- REM – faza spavanja (engl. rapid eye movements)
- ROS – reaktivni kisikovi spojevi
- $S_aO_2$  – saturacija kisikom u arterijskoj krvi (%)
- SIDS – sindrom iznenadne smrti dojenčeta
- STD – kratkotrajna depresija, STP – kratkotrajna potencijacija
- SŽS – središnji živčani sustav
- Ti – trajanje udisaja, Te – trajanje izdisaja, Ttot – ukupno trajanje respiracijskoga ciklusa
- TrkB – tirozin-kinaza B
- $\dot{V}$  – minutni volumen disanja, Vt – respiracijski („tidal“) volumen, f – frekvencija disanja
- VAH – aklimatizacija ventilacije na hipoksiju, VDH – deaklimatizacija ventilacije nakon hipoksije
- vLTF – ventilacijska dugoročna facilitacija



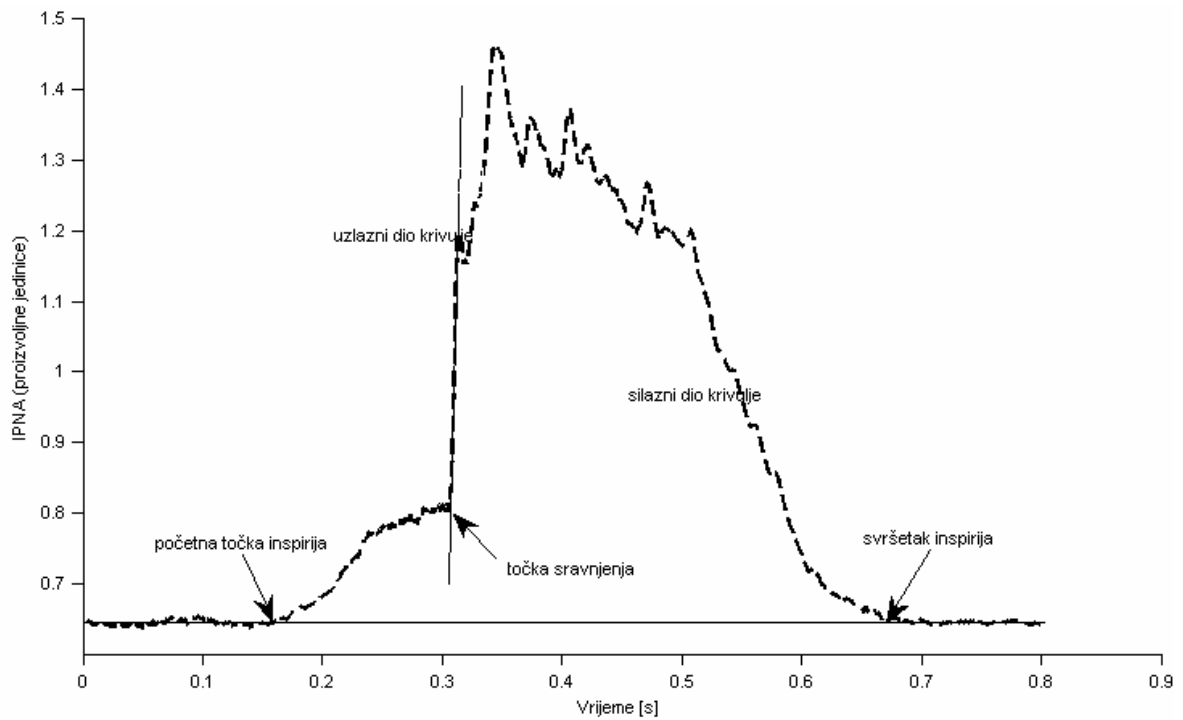
### **3. UVOD**

#### **3.1. SREDIŠNJA KONTROLA DISANJA I FRENIČKI NEUROGRAM**

U organizmu postoji kontrolni sustav koji održava stabilnost plinova u arterijskoj krvi i acidobaznu ravnotežu. On prima brojne signale i naposljetku dovodi do procesa disanja, a sastoji se iz 3 dijela – osjetnog, respiracijskog i motornog (1, 2). Osjetni dio se dalje dijeli na kemijski (pripadaju mu periferni i centralni kemoreceptori) i mehanički (razni receptori za istezanje u dišnim putovima i mišićima). Periferni kemoreceptori reagiraju prvenstveno na smanjenje parcijalnoga tlaka kisika u arterijskoj krvi ( $P_aO_2$ ), dok središnji reagiraju na promjene ugljikova dioksida ( $P_aCO_2$ ), pH i acidobazne ravnoteže. Respiracijski dio objedinjuje sve signale iz tih receptora, centara za svijest i drugih utjecaja vezanih za ponašanje (bol, napor, govor, stres), te ih dalje šalje, i to putem n. frenikusa i spinalnih živaca, motornom dijelu, kojega čine prsni koš, te ošit, međurebreni i trbušni mišići (1-3). Unutar moždanoga debla nalaze se skupine respiracijskih neurona važne za pravilno održavanje disanja: dorzalna respiracijska skupina (DRS), ventralna respiracijska skupina (VRS) i respiracijska skupina u ponsu (PRS) (4, 5). U VRS postoji specifična nakupina respiracijskih neurona, tzv. PreBötzinger područje, za koje se predmnijeva da ima ulogu generatora bazalnoga ritma disanja (6-8), a u čijem nastanku podjednako važnu ulogu imaju i ekscitacijski i inhibicijski neurotransmiteri (9-11).

Uobičajena metoda za praćenje središnje kontrole disanja je snimanje freničkoga neurograma (PNG). To je zapis koji nastaje snimanjem električne aktivnosti freničkoga živca (engl. phrenic nerve activity – PNA). Promjene u ritmu i obrascu disanja mjere se promjenama PNA koje se smatraju zrcalnim pokazateljem zbivanja u središnjem generatoru disanja. Pri tome je vršna amplituda PNA neuralni ekvivalent respiracijskoga volumena (engl. tidal volume,  $V_t$ ), dok je frekvencija izbijanja frenikusa neuralni ekvivalent frekvencije

disanja (f). Krivulja zapisa PNA ima karakterističan izgled iz kojega se može odrediti trajanje pojedinih faza ciklusa disanja. Osim toga, moguće je na temelju kvalitativnog izgleda silaznog i uzlaznog dijela krivulje odrediti obilježja obrasca disanja (*Slika 1*) (8, 12, 13).



**Slika 1. Krivulja freničkoga neurograma štakora.** (Preuzeto s dopuštenjem iz Pecotić R. Učinak GABA-e i serotonina na disanje praćen promjenama aktivnosti freničkoga živca [disertacija]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2008. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (12)

### 3.2. HIPOKSIJA I DISANJE

Hipoksija je stanje smanjenoga  $P_{aO_2}$  ispod 60 mmHg ili u širem smislu sniženje  $P_{aO_2}$  u organima, tkivima i stanicama (1). Hipoksija je snažan podražaj za disanje u sisavaca te dovodi do hipoksijskoga ventilacijskog odgovora (engl. hypoxic ventilatory response, HVR) (Slike 2 i 3) (1, 14). To je refleksni luk koji ide od karotidnoga tjelešca do respiracijskih mišića, a posredovan je perifernim kemoreceptorima u okviru tih tjelešaca (15-17) .

#### 3.2.1. Periferni kemoreceptori

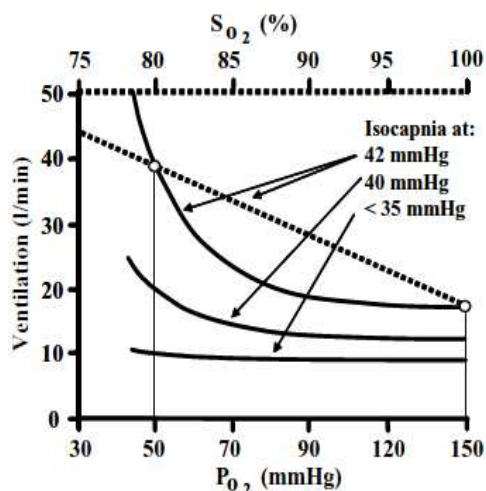
Pri nastupu hipoksije, organizam odgovara vrlo brzim (često i spasonosnim) povećanjem minutne ventilacije disanja, koja nastaje zbog aktivacije perifernih kemoreceptora. Periferne kemoreceptore sadrže i karotidna i aortna tjelešca, s tim da karotidna tjelešca prvenstveno sudjeluju u ventilacijskim, a aortna tjelešca u cirkulacijskim odgovorima. Karotidna tjelešca predstavljaju maleni par snažno prokrvljenih organa smještenih strateški na grananju obiju karotidnih arterija, gdje kemoreceptori (engl. carotid body chemoreceptors, CBCR) reagiraju prvenstveno na promjene  $P_{aO_2}$  (a ne  $S_{aO_2}$  ili  $C_{aO_2}$ !) u arterijskoj krvi koja napušta srce, a manjim dijelom na promjene  $P_{aCO_2}$ . To se zbiva unutar svega nekoliko milisekunda, a samim tim vrlo brzo se regulira dovod kisika u mozak. Početna aktivnost tih receptora bilježi se već kad  $P_{aO_2}$  padne ispod 100 mmHg, ali znakovito djelovanje pokazuju tek kad se  $P_{aO_2}$  spusti ispod 65 mmHg (1). Iako ne postoji suglasje o načinu na koji CBCR osjećaju manjak kisika, vjeruje se da je zatvaranje kalijevih kanala u glomus stanicama tipa I glavni mehanizam reakcije karotidnih tjelešaca na hipoksiju, što dovodi do povećanja unutarstaničnoga kalcija i lučenja neurotransmitera, posebice acetil-kolina i ATP/adenozina, čime se prenosi hipoksični signal iz glomus stanica prema okolnim, aferentnim živčanim završecima živca karotidnoga sinusa (CSN, Heringov živac) (18, 19) . Signali dalje putuju do petroznoga ganglija gdje se nalazi stanično tijelo CSN, a središnji

aksoni potom završavaju u *nucleus tractus solitariusu*. Dakle, periferna kemoreceptorska petlja sastoji se iz 1) perifernih kemoreceptora, 2) CSN, 3) respiracijskih integracijskih centara moždanoga debla i 4) neuromehaničke sveze između moždanoga debla i dišnih mišića, a za njeno ispravno djelovanje potrebna je cjelovitost svake komponente.

### 3.2.2. Hipoksijski ventilacijski odgovor

HVR koji nastupa stimulacijom kemoreceptora uključuje povećanje i  $f$  i  $V_t$ . (1, 14) .

HVR se može izmjeriti, i to pri promjenjivim vrijednostima  $\text{CO}_2$  (poikilokapnijski HVR) ili, što je u praksi češće, pri stalnim vrijednostima  $\text{CO}_2$  (izokapnijski HVR) (Slika 2). Vrijednost izokapnijskog  $\text{P}_a\text{CO}_2$  obično se odabere na razinu 1-2 mmHg višu od apnejičkog praga (14).



**Slika 2. Izokapnijski ventilacijski odgovor na hipoksiju.** Ventilacija se povećava hiperbolično sa smanjenjem  $\text{P}_a\text{O}_2$  ili linearno sa smanjenjem saturacije kisikom pri stalnom  $\text{P}_a\text{CO}_2$ . Pri izokapnijskom  $\text{P}_a\text{CO}_2$  ispod apnejičkog praga nema hipoksijskog ventilacijskog odgovora (donja krivulja) (preuzeto iz Duffin J. Measuring the ventilatory response to hypoxia. J Physiol 2007; 584(Pt 1): 285-93. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (14)

Hipoksijski ventilacijski odgovor ovisi o obrascu i intenzitetu izlaganja hipoksiji, te obuhvaća više fizioloških mehanizama (20-23). Ti mehanizmi se razlikuju:

- po svojim učincima (facilitacija ili depresija disanja)
- po učincima na razne komponente ventilacije ( $V_t$ ,  $f$ ), i
- po vremenskom tijeku (sekunde, dani, godine); neki mehanizmi traju dovoljno dugo da utječu i na buduće ventilacijske odgovore na hipoksiju, što je pokazatelj »pamćenja« ili funkcionalne plastičnosti u ventilacijskome kontrolnom sustavu.

Komponente HVR-a detaljno su prikazane u preglednom članku Powella i suradnika iz 1998. godine (20), a ovdje su navedeni taksativno najvažniji fiziološki fenomeni ovisno o duljini trajanja i vrsti hipoksije.

#### 3.2.2.1. KRATKA (NEPREKIDNA) HIPOKSIJSKA EPIZODA (2-5 MINUTA)

Primarni podražaj je sniženje  $P_aO_2$  unutar karotidnih kemoreceptora (*Slike 3A i 3B*).

Komponente HVR-a pri kratkoj hipoksijskoj epizodi su:

1. Akutni odgovor (engl. acute response, AR) – trenutno pojačanje ventilacijske aktivnosti nakon nastupa hipoksije, ali i trenutni prestanak nakon što se aferentni podražaj vratio na normalu; vremenska konstanta je  $10 \pm 2$  sekunde, a nastaje zbog aktivacije karotidnih tjelešaca
2. Kratkotrajna potencijacija (engl. short-term potentiation, STP) – predstavlja daljnje, progresivno pojačanje ventilacije nakon akutnog odgovora (više sekundi do 1 minute); ta sporija komponenta nastaje zbog centralne modulacije kemoreceptorskog odgovora
3. Kratkotrajna depresija (engl. short-term depression, STD) – očituje se kao prolazno naglo povećanje frekvencije disanja na početku hipoksijskog podražaja ili češće kao prolazno sniženje frekvencije na kraju kemoafherentne stimulacije, a traje do nekoliko

minuta. Često se naziva i posthipoksijsko smanjenje frekvencije, a viđa se isključivo u anestetiziranih štakora.

### 3.2.2.2. INTERMITENTNA (EPIZODNA) HIPOKSIJA

#### 3.2.2.2.1. Definicija i važnost intermitentne hipoksije

Intermitentna hipoksija (IH) može se definirati kao slijed ponavljanih epizoda hipoksije između kojih se nalaze epizode normoksije. Iako protokoli znatno variraju po duljini ciklusa, broju hipoksijskih epizoda, te broju dana izloženosti hipoksiji, najčešća je klasifikacija na 2 tipa IH: akutna intermitentna (AIH) i kronična intermitentna hipoksija (CIH) (24). Protokoli AIH (jednodnevni) sastoje se od najčešće 3-12 relativno kratkih (2-10 minuta) hipoksijskih podražaja između kojih su epizode normoksije od 2 do 20 minuta (25-27). Pri proučavanju CIH radi se, pak, o duljem dnevnom izalaganju hipoksiji (1-12 sati), a period promatranja je od 2 do 90 dana (24, 28, 29).

Bez obzira na protokol, postoje uvjerljivi dokazi da IH dovodi do trajnih promjena raznih fizioloških odgovora (25, 26). Kratkotrajno izlaganje IH (tzv. hipoksijsko prekondicioniranje) može biti korisno; ima primjera da su vrhunski sportaši, posebice na područjima bivšega SSSR, težili poboljšanju svojih rezultata upravo putem treninga IH (24, 30, 31), a poboljšanje aerobnih izvedbi napora i povećana proizvodnja eritropoetina zabilježeni su i u planinara koji su izlagani hipobaričnoj IH kroz 9 dana (32). I na razini disanja, IH za razliku od trajne hipoksije, ima sposobnost promjene aktivnosti respiracijskih neurona; dovodi do dugotrajnoga povećanja normoksične ventilacije, inducirajući fenomen dugoročne facilitacije (vidi poglavlje 3.3.) (33).

#### 3.2.2.2.2. Fiziološki mehanizmi za vrijeme ili nakon intermitentne hipoksije

Postoje 2 osnovna fiziološka mehanizma za vrijeme ili nakon IH, a to su progresivna augmentacija i dugotrajna facilitacija. Progresivna augmentacija (engl. progressive augmentation, PA) je povećanje veličine HVR pri sukcesivnim epizodama identičnih

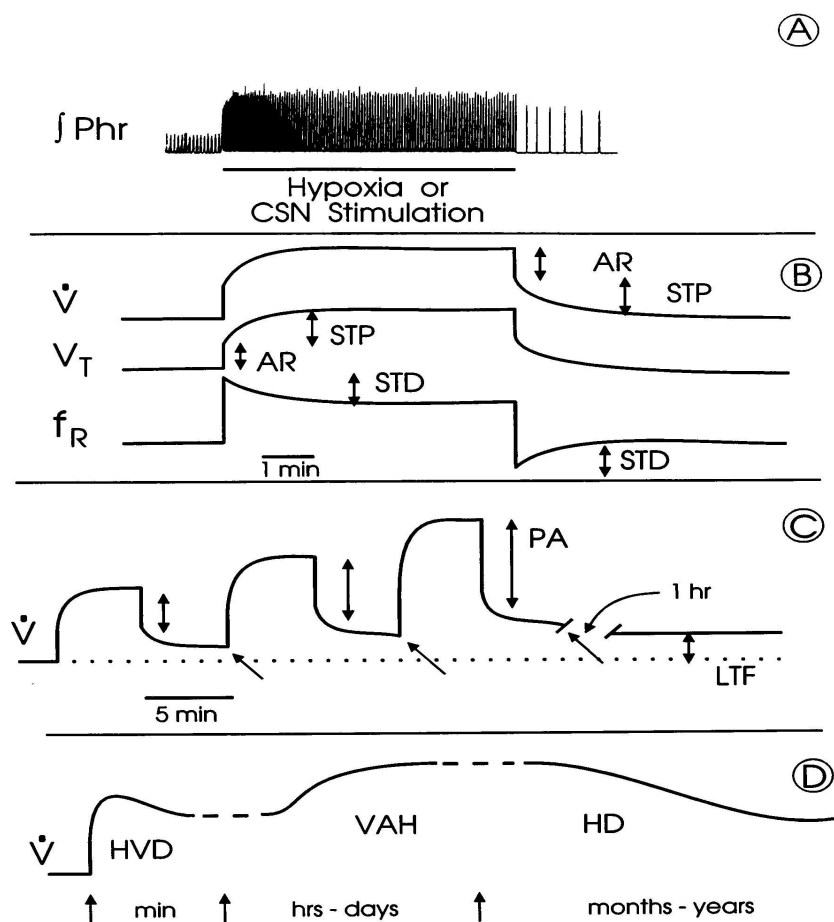
hipoksijskih podražaja, odnosno postupno povećanje respiracijske aktivnosti od početnoga do završnog izlaganja hipoksiji (28). Dugoročna facilitacija (engl. long term facilitation, LTF) je trajno povišena respiracijska aktivnost nakon izlaganja intermitentnoj hipoksiji ili njenom eksperimentalnom korelatu, stimulaciji živca karotidnoga sinusa (25, 26, 28) (*Slika 3C*).

### 3.2.2.3. PROLONGIRANE HIPOKSIJSKE EPIZODE (>5 minuta)

Dodatni se fiziološki mehanizmi aktiviraju nakon što je izlaganje hipoksiji trajno i produljeno (od više minuta do godina), a to su:

1. Hipoksijsko sniženje ventilacije (engl. hypoxic ventilatory decline, HVD) – smanjenje ventilacije u odnosu na AR, a dešava se kad umjerena hipoksemija traje 5-30 minuta.
2. Aklimatizacija ventilacije na hipoksiju (engl. ventilatory acclimatization to hypoxia, VAH) – povećanje ventilacije nakon kroničnog izlaganja hipoksiji od nekoliko sati do mjeseci; klasični primjer je ventilacijska aklimatizacija na velikim visinama. Vremenski tijek VAH ovisi o vrsti, pa je u koza ta prilagodba obavljena za 4-6 sati, a u ljudi je potrebno više od 10 dana (34). Za VAH se misli da nastaje prvenstveno zbog plastičnosti karotidnoga tjelešca, budući da trajna hipoksija dovodi do progresivnoga povećanja odgovora CBCR na hipoksiju (35, 36).
3. Deaklimatizacija ventilacije nakon hipoksije (engl. ventilatory deacclimatization to hypoxia, VDH) – nastaje kad se akutno uspostavi normoksija nakon izlaganja kroničnoj hipoksiji; ventilacija i osjetljivost ventilacije na promjene kisika ne vraćaju se odmah na kontrolne razine. Postoji trajna hiperventilacija pri normoksiji (20).
4. Hipoksijska desenzitizacija (engl. hypoxic desensitization, HD) – nastaje u ljudi koji su izloženi kroničnoj hipoksiji godinama ili čak doživotno, a očituje se slabljenjem HVR. Ventilacija u tih ljudi pri hipoksiji je smanjena u odnosu na normalne osobe koje su se aklimatizirale na visinu kroz kraće vremensko razdoblje. HD je stečeno

obilježje u ljudi te se povećava ovisno o visini, te vremenu provedenom na visini (20) (Slika 3D).



### Slika 3. Ventilacijski odgovori na hipoksiju

(A) Aktivnost freničkoga živca (Phr) nakon stimulacije karotidnih kemoreceptora hipoksijom ili izravnim električnim podraživanjem CSN u anesteziranog štakora. Tijekom podraživanja odmah se povećavaju i amplituda i frekvencija freničkoga živca, a potom se frekvencija smanjuje. Amplituda ostaje veća nega kontrolna, a frekvencija je smanjena u periodu neposredno nakon stimulacije.

(B) Ventilacijski odgovori nakon kratkog izlaganja hipoksiji (sekunde do minute): akutni odgovor (AR), kratkotrajna potencijacija (STP), kratkotrajna depresija (STD)

(C) Ventilacijski odgovori za vrijeme i nakon intermitenih hipoksijskih epizoda su progresivna augmentacija (PA) i dugotrajna facilitacija (LTF)

(D) Ventilacijski odgovori za vrijeme i nakon prolongiranih izlaganja hipoksiji su hipoksijsko sniženje ventilacije (HVD), ventilacijska aklimatizacija na hipoksiju (VAH) i hipoksijska desenzitizacija (HD). Nije prikazana deaklimatizacija ventilacije nakon hipoksije (VDH).

$\dot{V}$  = minutni volumen disanja,  $V_t$  = respiracijski (tidal) volumen,  $f_R$  = frekvencija disanja, min = minute, hrs = sati, days = dani, months = mjeseci, years = godine (preuzeto iz Powell i sur. Respir Physiol 1998 May; 112(2): 123-34. – SLIKA KAO U IZVORNIKU)



### 3.3. DUGOROČNA FACILITACIJA FRENIČKOGA ŽIVCA

Dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. phrenic long-term facilitation – pLTF) središnji je živčani mehanizam, a očituje se kao produljeno povećanje respiracijskoga motornog odgovora nakon podraživanja karotidnih receptora (bilo fiziološki intermitentnom hipoksijom, bilo električnim podraživanjem Heringova živca) koje traje satima nakon prestanka podražaja (25, 26, 28, 33, 37-39). To povećanje ne može se obrazložiti samo podraživanjem perifernih kemoreceptora, već i drugim mehanizmima u SŽS (25, 26, 40). pLTF se smatra oblikom središnje živčane plastičnosti u kontroli disanja (26), a jedinstven je po tome što ga izaziva jedino AIH, a ne ekvivalentno duga akutna trajna hipoksija, tj. nakon kratkoročnog izlaganja akutnoj hipoksiji (5 minuta), PNA se vraća na predhipoksijsku razinu već unutar 10-15 minuta (41). S druge strane, ponavljane hipoksije u intervalima od 5 minuta dovode do dugoročne ( $\geq 1$  sata) facilitacije freničkoga živca (33, 37).

Pri pLTF dolazi do povećanja i amplitude i frekvencije freničkoga živca, s tim da novija saznanja (40) ukazuju da se radi o 2 odvojena mehanizma s obzirom na neuromodulaciju; pri LTF s povećanjem amplitude ključan je prijenosnik serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), a pri LTF s povećanjem frekvencije neke druge tvari, moguće tvar P ili oreksin (42).

pLTF je po prvi puta opisan 1980. godine od strane Millhorna i suradnika (43) na anesteziranim ili decerebriranim, vagotomiranim i paraliziranim mačkama. Oni su, tada, tijekom više epizoda električnoga podraživanja živca karotidnoga sinusa mačaka (5 epizoda po 2 minute, odvojene intervalima od 5 minuta), zapazili da inspiracijska PNA ostaje povećana iznad osnovnih razina više od 90 minuta nakon prestanka podražaja. Tu pojavu su nazvali dugotrajna potencijacija (engl. long-term potentiation, LTP). Autori su zaključili da se taj mehanizam može aktivirati isključivo aferentnim signalima iz karotidnih tjelešaca, a kako decerebracija nije ugasila taj fenomen, prepostavili su da je anatomski supstrat LTP

vjerojatno smješten u pontomedularnom dijelu moždanog debla. Iste godine, autori su zapazili da se nakon primjene 5-HT antagonista (metizergida), inhibitora sinteze 5-HT (paraklorofenilalanina) ili 5-HT neurotoksina (5,7-dihidroksitriptamina) taj fenomen ne pojavljuje, što nije bio slučaj nakon davanja inhibitora sinteze kateholamina ( $\alpha$ -metiltirozina) (44). Kako je glavina 5-HT u SŽS smještena u raphe jezgrama (45), smatrali su da su upravo te jezgre anatomski supstrat LTP. Šest godina kasnije Millhorn objavljuje da kratotrajna, 10-minutna stimulacija raphe jegara aktivira serotoninerški mehanizam koji održava aktivnost freničkoga živca značajno pojačanom više od jednoga sata nakon prestanka podražaja (46).

Nakon protokola izazivanja pLTF visokofrekvencijskim električnim podraživanjem karotidnoga tjelešca, slijedili su brojni eksperimenti, gdje je pLTF dokazana uporabom akutne intermitentne hipoksije (37, 47-52), koja je također dovela i do LTF hipoglosalnoga živca (N. XII) (37, 48, 49, 53). Vrlo je važno otkriće Bacha i Mitchella iz 1996. godine na anesteziranim štakorima (48), koji navode da 5-HT modulira i frenički respiracijski motorni odgovor i podražljivost gornjega dišnog puta (inervira ga N.XII). Potvrđuju hipotezu da je mehanizam hipoksijom inducirane LTF u štakora vrlo sličan onom koji su prvi opisali Millhorn i suradnici u mačaka nakon električnoga podraživanja karotidnoga živca (43, 44), budući da oba za svoje djelovanje trebaju 5-HT receptore.

Protokol izazivanja AIH vremenom postaje glavni postav eksperimenata za proučavanje pLTF i posebni entitet u proučavanju središnje kontrole disanja jer jedino intermitentna, a ne trajna hipoksija, uspijeva izazvati pLTF i u budnih i anesteziranih životinja (37, 54).

Najkorišteniji i opće prihvaćeni eksperimentalni, životinjski model za proučavanje pLTF i njezinih staničnih i sinaptičkih mehanizama jest anestezirani, vagotomirani, paralizirani i ventilirani muški Sprague-Dawley štakor podvrgnut AIH kojemu se snima PNG kao indeks respiracijskoga motornog odgovora(26).

Postojanje pLTF dokazano je u mnogih životinja – ponajviše u već navedenih anestetiziranih štakora (47-54), ali i u anestetiziranih kunića (55), miševa (56) i mačaka (57-60), te u neanestetiziranih pasa (61), koza (27), pataka (21) i štakora (62-64).

Izgleda da je u budnih životinja pLTF slabija i kraća nego u anestetiziranih (25, 65), te uglavnom pogađa promjene frekvencije disanja ili djeluje posve drugim mehanizmima (40, 62). Kao moguće objašnjenje zašto se pLTF slabije izaziva u budnom stanju je kako 5-HT neuroni iz raphe jezgara, a koji su neophodni za započinjanje pLTF, imaju znatno manju aktivnost za vrijeme spavanja (66). Posljedično, pri nastupu IH dolazi do naglog izbijanja raphe neurona, budući da je osnovno izbijanje znatno manje nego normalno. Pri budnom stanju, pLTF ne mora biti uvijek izražena, budući da ti neuroni izbijaju gotovo maksimalno već i prije započinjanja IH (28). K tome, vjerojatno i vrsta anestezije mijenja način na koji SŽS odgovara na hipoksiju te ima znakovit učinak na 5-HT neurotransmisiju (67).

pLTF nije uvijek bilo moguće ekperimentalno izazvati unatoč korištenju opće prihvaćenoga protokola. Tako se pLTF sa sigurnošću nije mogla izazvati u mačaka s intaktnim vagusima, nasuprot vagotomiranih, anestetiziranih mačaka (58), te je moguće da i inhibicijski vagusni mehanizmi mogu ometati očitovanje pLTF. U seriji anestetiziranih, vagotomiranih, spontano dišućih štakora nije se mogao izazvati ni u mišićima jezika, ni u inspiracijskim mišićima (65). K tome, postoje i razlike u veličini i trajanju pLTF između vrsta, pa čak i unutar jedne vrste ili jedne nastambe životinja (53), što se može objasniti genetskim razlikama (68).

Iako se u literaturi navodi uglavnom frenička LTF (pLTF), proučavana je često i LTF interkostalnih živaca (57), n. hypoglossusa i mišića genioglossusa (53, 69), LTF m. sternohyoideusa (70), te LTF živca karotidnog sinusa (71). Frenička LTF i interkostalna LTF katkad se nazivaju zajedno ventilacijska LTF (vLTF) (28). Jasno je da će dugotrajna facilitacija motornih dijelova koji pokreću respiracijsku »pumpu« (frenikus, interkostalni

mišići) povećati ventilaciju. Međutim, kad se LTF očituje na motornim neuronima N. XII, a koji inerviraju mišiće protruzore (m. genioglossus) i retruzore jezika (m. hyoglossus), doći će do promjene otpora gornjega dišnog puta (48, 69). Veličina hipoglosalne LTF varira znatno više nego pLTF među podskupinama Sprague–Dawley štakora, te se s pravom implicira da su LTF gornjeg dišnog puta i respiracijske pumpe fiziološki različito regulirani (33, 53).

U zaključku, za pLTF je potrebna epizodna, a ne trajna hipoksija (37). Epizodna električna stimulacija CSN također dovodi do pLTF (43, 47), a ne uklanja ga decerebracija ili transekcija leđne moždine na razini C7/T1 (72). K tome, pLTF se uspjela izazvati, iako slabijeg intenziteta, i u anestetiziranih štakora bez intaktnih kemoreceptora (73). Sve to pokazuje da je pLTF potaknut središnjim mehanizmima lociranim u moždanom deblu i/ili vratnoj leđnoj moždini, te za njegovo pojavljivanje nisu nužno potrebni ni CBCR, ni sustavna hipoksija, ni prednji dijelovi mozga (telencephalon, diencephalon), niti donji dijelovi leđne moždine (25, 26, 28, 33, 74).

### 3.3.1. LTF u ljudi

vLTF je proučavana i u ljudi, ali pokušaji da se korištenjem gore navedenih «životinjskih» protokola izazove vLTF u budnom stanju nisu bili uspješni (75, 76). Koristili su se razni modeli IH – primjerice 10 epizoda 2-minutne hipoksije ( $F_iO_2$  8-9%) s intervalima od 2 minute normoksije (75, 77), potom 8 epizoda 4-minutne hipoksije ( $F_iO_2$  8%) s intervalima od 5 minuta normoksije (78) i tri 1-minutne hipoksije ( $F_iO_2$  6%) u razmaku od 15 minuta (76). Taj zadnji protokol doveo je do povećanja  $f$ , ali i sniženja  $V_t$ , pa je minutni volumen ostao isti. Doduše, postoje izvješća i o postojanju vLTF u budnih ljudi, ali samo uz nazočnost umjerene hiperkapnije (79-81).

vLTF je, međutim, vrlo jasno zapažena i dokazana tijekom non-REM spavanja u ljudi (82-84), ali na jedan osobiti način. Dugo je vladalo mišljenje da se vLTF u ljudi u spavanju

očituje samo u određene populacije, te isključivo na mišićima gornjega dišnog puta, ali ne i na mišićima respiracije (85). Tako se vLTF očituje samo kad se povećani otpor gornjega dišnog puta otkloni dilatacijom. I zaista, vLTF je dokazan u bolesnika s opstrukcijskom apnejom tijekom spavanja (OSA) u non-REM fazi spavanja (82), ali na način da je epizodna hipoksija smanjila otpor gornjeg dišnog puta, a nije povećala inspiracijsku ventilacijsku aktivnost. U zdravih osoba (bez OSA ili koji ne hrču) nema nikakvih smetnji protoka zraka, nema otklanjanja nikakve opstrukcije, pa nema niti povećanja respiracijskoga volumena nakon IH; stoga je dugo vremena vrijedila tvrdnja da u zdravih ljudi nema fenomena vLTF tijekom spavanja (86). Međutim, najnoviji radovi govore upravo suprotno. Chowdhuri i suradnici su i u zdravih ljudi (bez OSA, odnosno ograničenja inspiracijskog utoka) dokazali LTF mišića genioglossusa tijekom non-REM spavanja, ali ne i vLTF (83). Pierchala i suradnici (84) su po prvi puta u istoj populaciji, međutim, dokazali i postojanje vLTF. Nakon 15 kratkih hipoksijskih epizoda za vrijeme non-REM spavanja, našli su značajno povećanje respiracijskoga i minutnoga volumena disanja, kao i smanjenje otpora gornjega dišnog puta (*Tablica 7*).

Već dulje vrijeme nagađa se kako je vLTF zapravo vrlo korisni čimbenik za održavanje respiracijske homeostaze tijekom spavanja (87). vLTF može povećati tonus mišića gornjega dišnog puta, budući da se ne očituje samo na respiracijskim mišićima (pLTF), već i na N. XII (48). Stoga, danas prevladava mišljenje da je vLTF rani obrambeni mehanizam protiv napredovanja OSA (87, 88). OSA se očituje atonijom mišića genioglossusa i privremenim opstrukcijama dišnog puta uz epizode hipoksije i hiperkapnije (88). Moguća fiziološka uloga LTF N.XII stoga je možebitno povećanje tonusa genioglossusa da bi se održao dišni put tijekom narednih apnejičkih (i hipoksijskih) epizoda (48).

### 3.3.2. Neuromodulacija pri LTF – ključna uloga serotonina

Serotonin (5-hidroksitriptamin) je neurotransmiter kojega proizvodi manji broj neurona u mezencefalonu, ponsu i produljenoj moždini (89). U mozgu se 5-HT primarno sintetizira i oslobađa iz 5-HT neurona u raphe jezgrama (90). Ti raphe neuroni projiciraju se, između drugih lokacija, i u leđnu moždinu i u jezgre kranijskih živaca, te su u stanju povećati podražljivost respiracijskih motoneurona i motorni odgovor (91). Uz mnogobrojne više moždane funkcije 5-HT igra važnu ulogu i u kontroli disanja (89, 91). Za sada je poznato ukupno 7 vrsta i 15 podvrsta 5-HT receptora (89, 92).

Već je dulje vrijeme poznato da je za postojanje pLTF, bilo one nakon epizodne stimulacije CSN ili nakon IH, potrebna aktivacija spinalnih 5-HT receptora. Nedugo nakon otkrića LTF Millhorn je zapazio kako injekcija metizergida antagonista 5-HT širokog spektra (blokira 5-HT<sub>1,2,5,6,7</sub> receptore) sprječava pLTF u mačaka nakon električne stimulacije CSN (44).

I u anestetiziranih štakora pLTF je također ovisna o 5-HT (48, 93, 94). Ketanserin (selektivni 5-HT<sub>2</sub> antagonist) blokirao je pLTF, te je zaključeno da ta podvrsta receptora sudjeluje u pLTF (29, 52, 64). Budući da ketanserin ima 30-100 puta veći afinitet za 5-HT<sub>2A</sub> u odnosu na 5-HT<sub>2C</sub> receptore (92), a 5HT<sub>2A</sub> receptori su, k tome, dominantni na freničkome motoneuronu (95), misli se da je upravo ta vrsta receptora bitna za pLTF.

Kako su gore navedene studije uključivale intravensko davanje lijeka, točno mjesto 5-HT djelovanja nije bilo moguće utvrditi. Baker-Herman i Mitchell su, stoga, intratekalno davali 5-HT antagoniste (na razini korijena C4) i na taj način znatno su oslabili ili ugasili pLTF. Time su jasno pokazali da se 5-HT receptori važni za pLTF nalaze u ili blizu freničke motorne jezgre (94). Čini se da su ti 5-HT<sub>2</sub> receptori uglavnom smješteni postsinaptički (96). Nadalje, navodi se da 5-HT djeluje samo kao okidač u indukciji pLTF, ali nije potrebit za njegovo daljnje održavanje (50). Najnoviji literaturni podaci govore da bitnu ulogu pri tom

fenomenu igraju i NMDA glutamatni receptori (97). Primjerice, pLTF se ugasio nakon davanja NMDA antagonista MK-801 (97) i 2-amino-5-fosfonovalerične kiseline (APV ili AP5) (98) i u anestetiziranih i neanestetiziranih štakora. Isto tako, nastanak vLTF nakon CIH bio je znatno usporen nakon davanja MK-801 (93).

Za pLTF nužna je nova sinteza bjelančevina, posebice BDNF (engl. brain-derived neurotrophic factor), neurotrofina za koji se smatra da sudjeluje i u drugim oblicima sinaptičke plastičnosti (99). On bi trebao pojačati aktivnost ekscitacijske glutamatergičke sinapse iz respiracijskih neurona u moždanom deblu prema feničkim motoneuronima i na taj način pojačavati kontrakcije ošita (100). I sam BDNF dostatan je za izazvati pLTF budući da je njegovo intratekalno davanje dovelo do pLTF vrlo sličnog onome izazvanog hipoksijom (99). Najnoviji radovi ukazuju da i slobodni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species, ROS) imaju znakovitu ulogu pri feničkome i hipoglosalnom LTF i to putem potiskivanja proteinskih fosfataza (101, 102). Dokazano je da su ROS neophodni za LTF karotidnih kemosenzornih neurona nakon AIH u štakora pre-kondicioniranih CIH (103). Međutim, njihova uloga u feničkoj ili hipoglosalnoj LTF nakon AIH nije do kraja razjašnjena. Razina ROS u mozgu povišena je nakon AIH, a nedavno je dokazano da su ROS nužni za pLTF u anestetiziranih štakora i da djeluju u neposrednoj blizini motornih jezgara (frenikusa ili N. XII) (101).

Najprihvatljiviji, trenutni, hipotetski model pLTF izgledao bi kako slijedi (*Slike 4 i 5*): nakon podraživanja karotidnog kemoafherentnog ulaza kojega aktivira AIH ili stimulacija živca karotidnog sinusa, podražuju se raphe jezgre. Oslobođeni 5-HT iz živčanih završetaka raphe jezgara podražuje 5-HT<sub>2</sub> receptore na feničkim motoneuronima. To dovodi do čitavoga niza unutarstaničnih kaskadnih događanja koja uključuju aktivaciju G proteina, fosfolipaze C i protein kinaze C (PKC). Aktivacija PKC započinje novu sintezu BDNF, te se smatra da se BDNF oslobađa iz dendrita feničkoga motoneurona i aktivira TrkB (tirozin-kinaza)

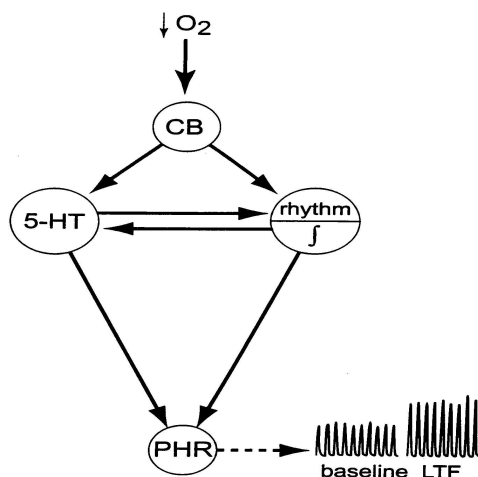
receptore, pa potom dolazi do fosforilacije raznih kinaza – ERK (engl. extracellular signal-regulated kinase), MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) i PKB (protein kinaza B). Aktivirane kinaze fosforiliraju glutamatne receptore, čime se povećava glutamatergički sinaptički prijenos između bulbospinalnih respiracijskih premotornih neurona i freničkih motoneurona, tj. nastupa pLTF. Dakle, pLTF započinje aktivacijom 5-HT<sub>2</sub> receptora, a za njezino održavanje potrebni su NMDA receptori (26, 33, 88). Na koji način IH aktivira 5-HT neurone, nije do kraja razjašnjeno. Postoje mišljenja da i oreksin može pridonijeti razvoju pLTF, jer neuroni u hipotalamusu koji sadrže oreksin šalju mnogobrojne projekcije u raphe jezgre (42, 56).

Unatoč relativno dobrom hipotetskom modelu u anestetiziranih životinja (posebice štakora), neuromodulacija pri fenomenu vLTF u ljudi nije zasad razjašnjena, a rijetki su radovi o toj problematici. Lee i suradnici su 2008. godine (kongresno priopćenje) pokazali da je vLTF smanjena u osoba s OSA koje su dobijale koktel antioksidansa prije izlaganja IH (104).

U zaključku, za pLTF vrijedi slijedeće (25, 26, 28, 33):

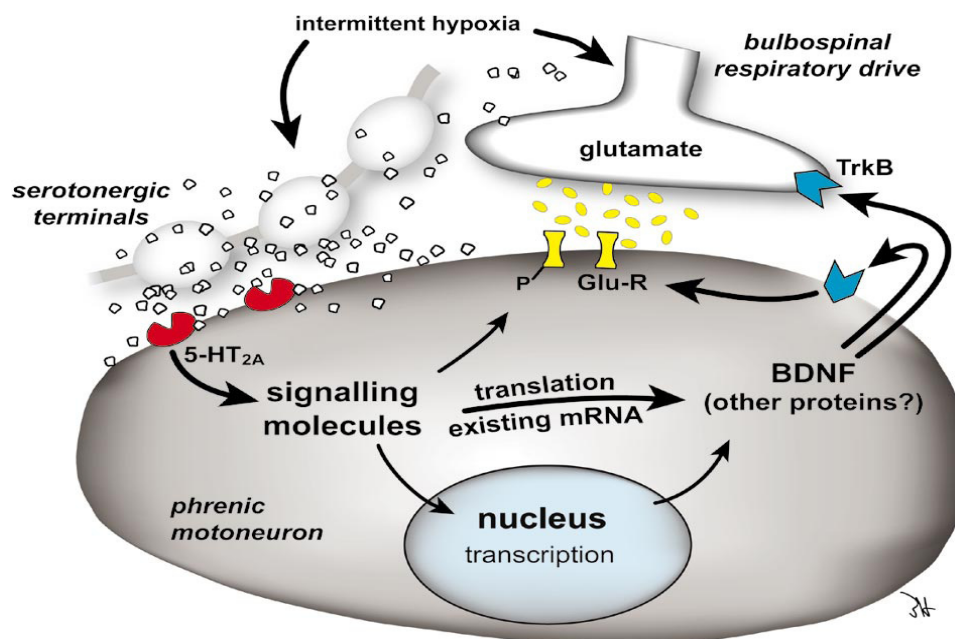
1) to je središnji živčani mehanizam, 2) ovisna je o serotoninu, tj. za početak pLTF, potrebna je aktivacija 5-HT receptora koji su smješteni u neposrednoj blizini freničkih motoneurona, a uklanja ga prethodno davanje 5-HT antagonista, 3) pri pLTF ne može se sa sigurnošću isključiti djelovanje i ostalih neurotransmitera, 4) iako aktivacijom 5-HT receptora započinje pLTF, za njegovo održavanje potrebna je spinalna sinteza proteina, posebice neurotrofina BDNF u ventralnim spinalnim područjima koji stupa u kompleksnu interakciju s 5-HT receptorima.





**Slika 4. Predloženi mehanizam freničkoga LTF.** Hipoksija aktivira karotidne kemoreceptore (*CB*), a na taj način aktiviraju se i respiracijski neuroni (*rhythm*) u medulli i serotonergički neuroni u raphe jezgrama (*5-HT*). Raphe neuroni pojačavaju oslobađanje serotonina u blizini spinalnih freničkih motoneurona (*PHR*), te na taj način potiču njihov odgovor na oslobađanje glutamata iz medularnih pre-motoneurona. Ne mogu se isključiti dodatni učinci na medularne respiracijske neurone, koji mogu nastati zbog aktivacije serotoninskog sustava. Detaljniji prikaz na staničnoj razini naveden je na slici 5.

(preuzeto iz Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol* 2000; 121(2-3): 135-46. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (33)



**Slika 5. Radni model serotoninske plastičnosti respiracijskih motoneurona** – objašnjenje u tekstu – str. 19-21 (preuzeto iz Mitchell GS i sur. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2466-75. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (26)

### 3.4. DUGOROČNA FACILITACIJA DISANJA I PLASTIČNOST RESPIRACIJSKOG SUSTAVA

Sposobnost bilo kojeg fiziološkog sustava da promijeni svoju aktivnost kao odgovor na akutne i/ili kronične izazove kritična je za optimalni učinak tog sustava. Ako su ti izazovi produljeni, većina sustava doživljava trajne promjene ili plastičnost. Plastičnost živčanoga sustava osnova je mnogih fizioloških funkcija (učenje, pamćenje), a definira se kao trajna promjena (morfološka i/ili funkcijska) u živčanome kontrolnom sustavu koja se temelji na prijašnjem iskustvu (25, 26, 105).

Pri proučavanju pojma plastičnosti živčanoga sustava definirani su još neki termini – modulacija, metamodulacija i metaplastičnost. Modulacija je neurokemijski uvjetovana promjena sinaptičke snage ili staničnih svojstava. Metamodulacija opisuje stanje gdje je sama neuromodulacija podložna modulaciji. Metaplastičnost je viši oblik plastičnosti, a to je promjena sposobnosti izražavanja plastičnosti, zasnovana na prijašnjem iskustvu. Ti pojmovi međusobno se ne isključuju, a obično je modulacija potrebna za započinjanje plastičnosti (Slika 6) (25).

Respiracijski kontrolni sustav također posjeduje impresivnu plastičnost koja se očituje kao dugotrajna promjena respiracijskog obrasca i to nakon što neposredni podražaj više nije nazočan. Može uključivati strukturne i/ili funkcijske promjene te nastaje zbog mnogobrojnih staničnih/sinaptičkih mehanizama na raznim mjestima u respiracijskom upravljačkom sustavu (25, 26). Respiracijska plastičnost može se, osim intermitentnom hipoksijom, inducirati primjerice, hiperkapnijom (106), vježbanjem (107), ozljedom leđne moždine (108), ili stresom (25), a događa se kako za vrijeme razvoja, tako i u odraslih (25, 26, 109).

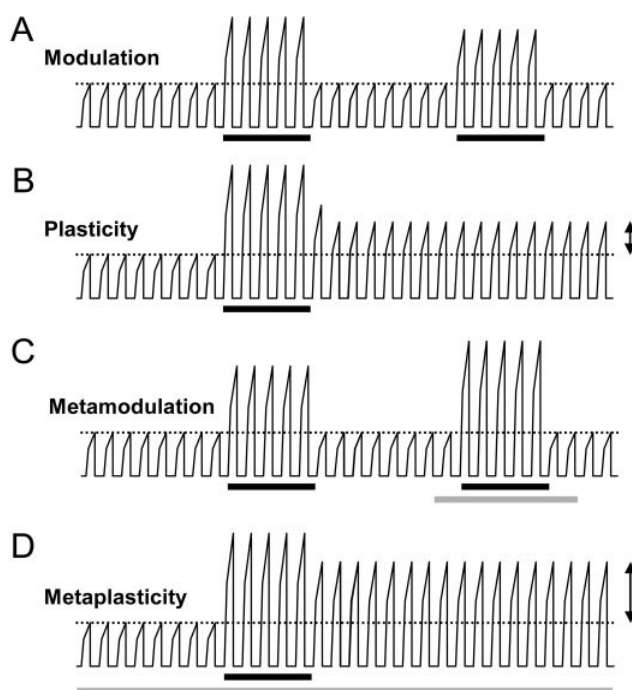
Postoje dva dobro proučena oblika respiracijske plastičnosti koje proizvodi intermitentna hipoksija. To su karotidna kemosenzitivna plastičnost nakon kronične intermitentne hipoksije (CIH) (29) i gore opisana dugoročna facilitacija respiracijskoga

motornog odgovora nakon AIH (25, 26, 28, 33). Ukratko, kemosenzitivna plastičnost nakon CIH očituje se kao 1) povećano bazalno izbijanje karotidnog tjelešca, 2) povećana hipoksijska osjetljivost, tj. odgovor na akutnu hipoksiju i 3) povećana sposobnost izražavanja LTF (71). Nasuprot tome, pLTF nakon AIH središnji je živčani mehanizam koji se očituje kao progresivno i trajno povećanje PNA koje je neovisno o promjenama u kemoafherentnom «inputu» (26).

Iako pLTF normalno traje nekoliko sati poslije AIH, izloženost životinja CIH (npr. 5-minutne epizode hipoksije, kroz 5 minutne intervale, 12 sati dnevno kroz 7 dana) dovodi do znatno dugotrajnijeg oblika respiracijske plastičnosti (*metaplastičnost – slika 6D*) (29, 64, 103). CIH se razlikuje od AIH po velikom broju hipoksijskih epizoda (gore navedeni protokoli imali su 504 hipoksijske epizode kroz 7 dana). Pretretman životinja CIH značajno pojačava ne samo hipoksijski ventilacijski odgovor na kratku hipoksijsku epizodu, već također i frenički i hipoglosalni LTF nakon AIH u anestetiziranih (29, 103, 110) i neanestetiziranih štakora (64). Ti učinci mogu trajati danima i tjednima, a vjeruje se da nastaju zbog pojačanja središnje živčane integracije kemoafherentne neuronske aktivnosti (29, 111) ili pojačanja karotidne kemoafherentne aktivnosti (71). Učinak neuromodulacije, te staničnih i sinaptičkih mehanizama, pri ovom obliku metaplastičnosti nije sasvim jasan, za razliku od onog pri AIH (vidi poglavlje 3.3.2., te slike 4 i 5). Frenički LTF nakon CIH potpuno se eliminirao nakon metizergida, ali je nakon davanja ketanserina bio samo oslabljen. Čini se, stoga, da taj učinak ovisi o 5-HT mehanizmima, ali ne isključivo o 5-HT<sub>2</sub> receptorima (29), već i o slabije poznatim 5-HT<sub>6</sub> i 5-HT<sub>7</sub> receptorima (63). Moguće je potrebno i formiranje reaktivnih kisikovih spojeva (103).

U zaključku, pLTF predstavlja jedinstveni oblik respiracijske plastičnosti ovisne o 5-HT te pokazuje da je hipoksijski ventilacijski kontrolni sustav sposoban trajno upamtiti prethodno iskustvo (hipoksija), budući da epizodna hipoksija vrši drukčije učinke na taj

sustav nego trajna hipoksija, pa bi obrazac hipoksijskog podraživanja mogao biti ključna odrednica takve respiracijske plastičnosti (112). Neuromodulacija 5-HT-om je, pak, ključni element u još nekoliko oblika respiracijske plastičnosti, posebice u odraslih. Osim pri IH (26, 29) susreće se pri hiperkapnijskom vježbanju (113), spinalnoj senzornoj denervaciji (51), kemoferentnoj denervaciji (114), ozljedama leđne moždine (115), te dugotrajnom povećanju frekvencije disanja (116).



### Slika 6. Plastičnost respiracijskog sustava

A. Modulacija – pojačani respiracijska motorna aktivnost dok je neuromodulator nazočan (crna crta); kad se ukloni neuromodulator, respiracijski motorni izlaz vraća se na osnovnu razinu.

B. Plastičnost – trajna promjena u živčanom kontrolnom sustavu, zasnovana na prijašnjem iskustvu; trajno povećanje respiracijske motorne aktivnosti koje vremenski nadmašuje početni podražaj (crna crta) – primjer: LTF.

C. Metamodulacija - kad je odgovor na neuromodulator (crna crta) pojačan u raznim eksperimentalnim uvjetima (siva crta). Nakon otklanjanja neuromodulatora, brzo se vraća na početnu razinu.

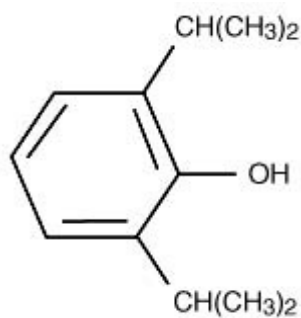
D. Metaplastičnost - pojačana plastičnost nakon istoga početnog podražaja (crna crta) zbog prekondicioniranja ili trajnog podraživanja (siva crta) – primjer LTF nakon CIH (preuzeto iz Mitchell GS, Johnson SM. Neuroplasticity in respiratory motor control. J Appl Physiol 2003; 94: 358-74. – SLIKA KAO U IZVORNIKU)

### 3.5. PROPOFOL

#### 3.5.1. Propofol – opće postavke

Propofol (2,6-diisopropilfenol) je intravenski anestetik koji je uveden u kliniku 1986. godine, a danas je najčešće rabljeni intravenski anestetik, i to za uvod i održavanje opće anestezije, za sedaciju tijekom zahvata u regionalnoj anesteziji, kao i za sedaciju bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja (Slika 7). Osobito je popularan za kratke operacijske i dijagnostičke zahvate, poglavito zbog pogodnoga farmakokinetškog profila koji omogućuje brzi nastup anestezije, ali također i vrlo brzo i ugodno buđenje (117, 118).

Davanje propofola u kontinuiranoj infuziji zajedno s jakim opioidima (fentanil, sufentanil, remifentanil) tvori metodu koja se naziva TIVA (totalna intravenska anestezija), a kod nje nema potrebe za hlapljivim anesticima (119).

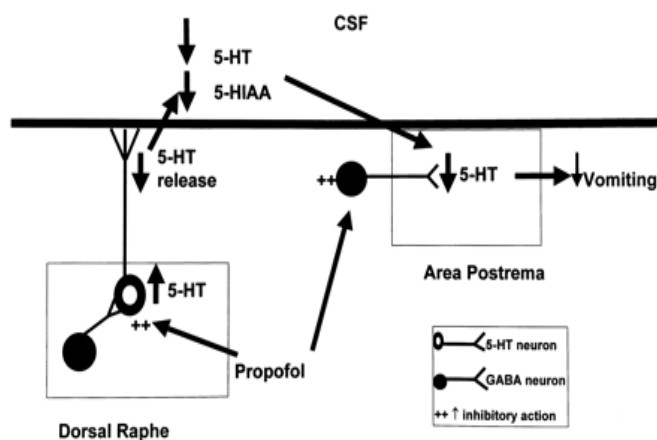


Slika 7. Kemijska struktura propofola (2,6-diisopropilfenol)

Propofol je primarno hipnotik, a smatra se da svoje djelovanje postiže vezivanjem na  $\beta$ -podjedinicu  $GABA_A$  receptora (120). Djelovanje propofola na ostale neurotransmitere nije sa sigurnošću utvrđeno (121), te većina radova donosi izvješća o *in vitro* pokusima (122-124), ali klinički značaj tih rezultata nije sasvim jasan. Osobito je zanimljiv njegov solidan antiemetski učinak (Slika 8), koji se objašnjava možebitnim antiserotoninskim djelovanjem (125). Postoje čak i klinički prikazi liječenja serotoninskog sindroma propofolom (126). Dvojbeno je još uvijek koju podvrstu 5-HT receptora inhibira propofol (122, 124, 127). Dosadašnji radovi navode da ne inhibira 5-HT<sub>2A</sub> receptore (124), a proturječni su rezultati za

5-HT<sub>3</sub> receptore (122, 125). K tome, propofol dolazi u interakcije i s nekoliko drugih neurotransiterskih receptora kao i ionskih kanala unutar perifernog i središnjega živčanog sustava; tako vjerojatno potencira glicinske receptore, inhibira nikotinske acetilkolinске receptore (nAChR), te glutamatne NMDA i AMPA receptore. Isto tako, može inhibirati i L-tip Ca<sup>2+</sup> kanala i Na<sup>+</sup> kanale ovisne o naponu (128).

Propofol inhibira dugoročnu potencijaciju (LTP) i sinaptičku plastičnost tijekom procesa memorije i to najvjerojatnije modulacijom GABA<sub>A</sub> receptora, a ne putem NMDA receptora (129). Smatra se da poremećaj održavanja LTP i poticanje razvoja dugotrajne depresije u hipokampusu štakora može dovesti do memorijskih deficita nakon propofolske anestezije (130). Za razliku od barbiturata, zasigurno nema antianalgetsko djelovanje, a u subhipnotskim dozama pomaže u dijagnozi i liječenju centralne boli (119). Glavni kardiovaskularni učinak propofola je smanjenje arterijskoga tlaka zbog smanjenja sustavnoga krvožilnog otpora, srčane kontraktilnosti i prethodnog opterećenja (»preload«) (118, 119).



**Slika 8. Djelovanje propofola na razne neurotransiterske sustave i moguće antiemetsko djelovanje.** Propofol stimulira GABAergicke sinapse na serotoninimskim neuronima u *raphe dorsalis*, što inhibira te neurone. Smanjeno okidanje 5-HT neurona dovodi do smanjenog oslobađanja 5-HT u IV komoru, što dovodi i do smanjenog preuzimanja 5-HT u *areju postremu* (preuzeto iz Cecchetto DF et al. *Anesth Analg* 2001; 92(4): 934-42. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (125).

### 3.5.2. Anestetici i kontrola disanja s posebnim osvrtom na propofol

Većina anestetika značajno djeluje na kontrolu disanja. Oni mogu utjecati na kemijsku i/ili »bihejvioralnu« kontrolu disanja, tj. onu vezanu za razne obrasce ponašanja (131). Kemijska kontrola disanja povezana je s metaboličkim parametrima, te ovisi o sastavu arterijske krvi (pH,  $P_a\text{CO}_2$ ,  $P_a\text{O}_2$ ) ili intersticijske tekućine u moždanom deblu (pH,  $\text{PCO}_2$  moždanog tkiva). Sama kemijska kontrola disanja zbiva se tijekom anestezije i non-REM spavanja, dok »bihejvioralna« kontrola vrši prilagodbe disanja u raznim životnim situacijama – budnost, bol, govor, fizički napor, stres. Inhalacijski anestetici djeluju na obje komponente kontrole disanja. Primjerice, za halotan je dokazano da smanjuje ventilaciju tako što uklanja periferni učinak karotidnih kemoreceptora, zatim općenito deprimira respiracijske centre u SŽS, a također i funkciju motornih neurona, ošita i drugih disajnih mišića (sve to je uključeno u kemijsku kontrolu disanja), ali isto tako suzbija i poticaj na disanje koji potiče od budnosti (»bihejvioralna« kontrola) (132). U svakom slučaju, vrlo su kompleksne interakcije anestezije, boli, budnosti i kemijske kontrole disanja.

Iako su poznate neke činjenice o djelovanju anestetika na HVR, dosta je oprečnih rezultata u literaturi, koji nastaju prvenstveno zbog metodoloških razlika u studijama (133). HVR se sastoji od 2 dijela: brzog (koji potječe od kemoreceptora) i sporijeg (koji nastupa zbog središnje depresije), pa je mogući problem pri studijama s anesticima i utjecajem na disanje i HVR taj da uvijek postoji mogućnost djelovanja anestetika na SŽS, čime bi se mogao maskirati njihov učinak na periferne kemoreceptore (131, 132).

Ipak, prihvaćeno je da inhalacijski anestetici, čak i u subanestetskim dozama od 0,1 minimalne alveolarne koncentracije (MAC) značajno deprimiraju HVR. Knill i Clement (134) su pred 25 godina otkrili da i male doze halotana smanjuju HVR u ljudi. U većini daljnjih istraživanja (135-137), potvrđene su te činjenice i smatra se da inhalacijski anestetici djeluju pretežito na perifernu kemoreceptorsku petlju. Međutim, čini se da postoje kvantitativne i

kvalitativne razlike među pojedinim inhalacijskim anestheticima glede učinka na HVR (138, 139). Halotan je, zasigurno, najjači depresor HVR, dok su za izofluran rezultati proturječni, te znakovito ovise o postupcima studije (137, 140). Od novijih hlapljivih anestetika izgleda da sevofluran znatno manje (ako uopće) slabi HVR (138, 139, 141), a isto vrijedi i za desfluran čija doza od 0,1 MAC nije imala mjerljivog učinka na normokapnijski HVR (142).

Što se tiče intravenskih anestetika, rezultati su također proturječni. Tiopental i barbiturati navodno su manje depresivni od halotana (143). Midazolam je isto oslabio HVR (144), a posebice u kombinacijama s fentanilom i propofolom (145). Uglavnom postoji suglasje da propofolska monoanestezija, čak i u subanestetskim dozama, smanjuje HVR za vrijeme akutne trajne hipoksije u ljudi (146-148) i životinja (149), a vjerojatni je mehanizam interakcija s GABA<sub>A</sub> i/ili nAChRs (147, 150, 151). Propofol često dovodi i do apneje nakon induksijske doze, koja može trajati i više od 30 sekundi, pogotovo u kombinaciji s opioidima (118).

Nadalje, dosta je dvojbi oko točnoga mjesta djelovanja propofola na disanje. Niuwenhuijs i suradnici (152) tvrde da propofol djeluje isključivo na središnju kemoreceptorsku petlju, a minimalno na periferne kemoreceptore, a to je u potpunoj suprotnosti s mehanizmom djelovanja hlapljivih anestetika. I prema drugim autorima periferni su kemoreceptori posve aktivni za vrijeme propofolske anestezije u ljudi, te bi bolesnik trebao biti posve sposoban odgovoriti na hipoksiju (153). Ipak, uzmu li se u obzir noviji radova Jonssona i suradnika (150) o interakciji propofola s nAChRs u karotidnom tjelešću koja dovodi do prekida prijenosa impulsa od strane CSN, te Akade i suradnika (154) gdje propofol inhibira odgovor karotidnog tjelešća na hiperkapniju znatno više nego na hipoksiju, zaključak je da je mjesto djelovanja propofola na HVR još uvijek nerazjašnjeno. Naime, periferni kemoreceptori imaju odvojene i specifične prijenosne mehanizme za hipoksiju i hiperkapniju, a sinergistički učinak hipoksije i hiperkapnije odvija se upravo na perifernim



kemoreceptorima, a ne centralno u mozgu. Smatra se da, ukoliko bilo koji anestetik mijenja taj sinergizam, onda on vjerojatno djeluje na perifernoj, a ne na središnjoj razini (155).

K tome, za propofol se pokazalo da ima antioksidantna svojstva (156), što može biti od koristi pri bolestima gdje ROS imaju važnu ulogu. Pokazalo se da antioksidansi mogu spriječiti depresiju HVR. Halotan i nešto manje izofluran značajno se metaboliziraju i mogu proizvesti dosta ROS, i posljedično su snažni depresori HVR. Desfluran se minimalno metabolizira, nema ROS, ali ni depresije HVR. Prema nizozemskoj skupini stručnjaka za HVR i utjecaj anestetika (132, 152), propofol kao antioksidans ne djeluje na brzu komponentu HVR posredovanu kemoreceptorima.

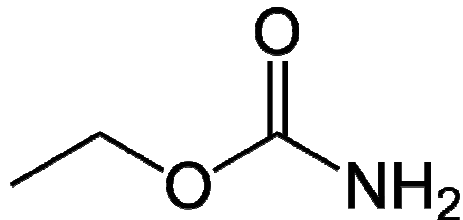
U zaključku, anestetici uglavnom deprimiraju HVR. Inhalacijski djeluju i na perifernim karotidnim receptorima i unutar SŽS. Glede propofola, točno mjesto njegova djelovanja na respiracijski sustav nije sa sigurnošću utvrđeno. Izgleda da se radi o kombiniranoj interakciji s perifernim karotidnim kemoreceptorima (149) i središnjom kontrolom disanja u moždanom deblu (147, 152, 157).

Do sada nisu rađeni pokusi u kojima se proučavao utjecaj propofola na respiracijski LTF.

### 3.6. URETAN

Anestetik uretan (etil karbamat) uveden je još 1885. godine, ne koristi se u klinici, ali je izuzetno pogodan za laboratorijske životinje (*Slika 9*) (158). Prednosti su mu dugo trajanje djelovanja kirurške anestezije od samo jedne doze, odlična relaksacija skeletnih mišića, mnogi putovi davanja i široki raspon sigurnosti, a pogotovo mogućnost anestezije životinja s minimalnim učinkom na hemodinamiku i bazalne respiracijske varijable. To je anestetik koji nema točno definirano mjesto djelovanja, ali čini se da ne djeluje ni na GABA, niti na 5-HT receptore (159). Dakle, ima sposobnost postizanja kirurške anestezije bez

utjecaja na neurotransmisiju u raznim subkortikalnim područjima i perifernome živčanom sustavu. Davno je utvrđeno da je to vrlo pogodan opći anestetik za proučavanje neuralnih funkcija, a u laboratorijskih životinja ostaju sačuvani mnogi refleksi. U štakora se primjenjuje najčešće intraperitonejski i intravenski (158, 159).



**Slika 9. Kemijska struktura uretana (etil-karbamata)**

### 3.7. PROBLEMATIKA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Predložena disertacija bavi se istraživanjem djelovanja propofolske monoanestezije na LTF praćenu promjenama aktivnosti freničkoga živca.

Tijekom opće anestezije primjenjuju se opće prihvaćena pravila za anesteziju štakora pri pokusima na SŽS (160). Za anesteziju štakora danas se najčešće rabe uretan i inhalacijski anestetici, a vrlo rijetko propofolska anestezija. Iako je monoanestezija propofolom zahtjevna, pogotovo pri većim kirurškim zahvatima na laboratorijskim životinjama, ona je jedini način za istraživanje djelovanja tog lijeka na kontrolu disanja.

Po prvi puta korištena je kontinuirana infuzija propofola pri proučavanju pLTF. Prikazana je vlastita shema monoanestezije propofolom u laboratorijskih životinja izloženih velikim kirurškim zahvatima i postupcima (traheotomija, preparacija freničkoga živca s velikom dorzalnom incizijom, obostrana preparacija prepona zbog kanulacije arterija i vena), a uz očuvanje kardiocirkulacijske stabilnosti ispitivanih životinja.

Kako je već navedeno, razlika između dvaju anestetika je u slijedećem: uretan je anestetik koji nema točno definirano mjesto djelovanja, ali smatra se da ne djeluje ni na GABA, niti na serotoninske receptore (158, 159). Dakle, ima sposobnost postizanja kirurške anestezije bez utjecaja na neurotransmisiju u raznim subkortikalnim područjima i perifernom živčanom sustavu. S druge strane, propofol je intravenski opći anestetik koji djeluje na mnoge neurotransmitore, posebice na GABA<sub>A</sub> receptore, čime umnogome i ostvaruje svoje djelovanje (118-120). Pored toga, čini se da ima upliva i na serotoninergički sustav (121-125, 127, 128), ali precizni mehanizmi djelovanja još nisu sa sigurnošću dokazani.

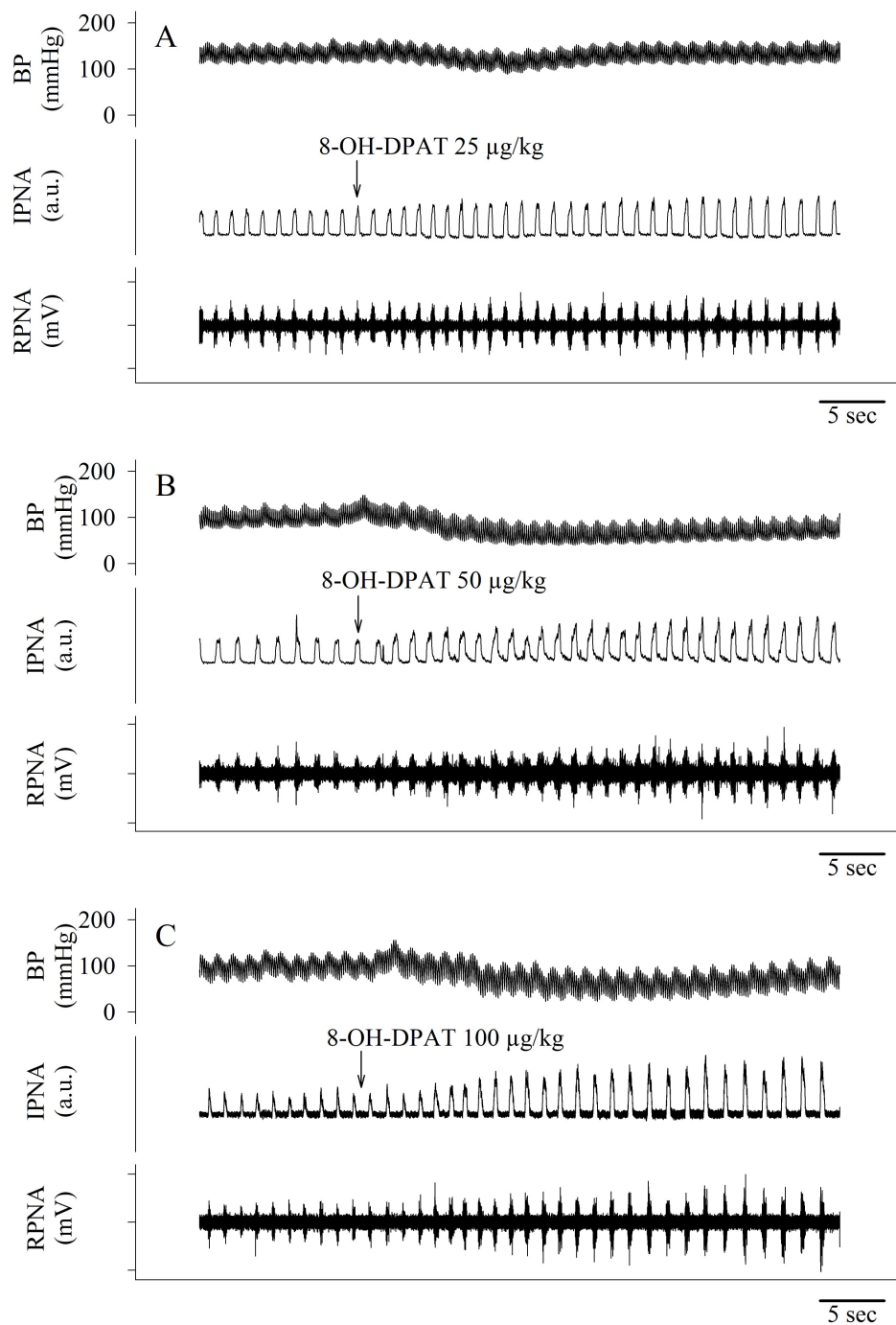
pLTF se smatra oblikom središnje živčane plastičnosti u kontroli disanja (25, 26), a jedinstven je po tome što ga izaziva AIH, ali ne i akutna trajna hipoksija. Za započinjanje tog fenomena ključan je neurotransmiter 5-HT (48). Ukoliko bi davanje propofola ukinulo ili smanjilo pLTF, to bi mogao biti neizravni dokaz antiserotoninskog djelovanja te tvari.

Prijašnja istraživanja pokazuju da pLTF korelira s aktivnosti freničkoga živca tijekom hipoksije (33, 40). U štakorskom modelu, akutni hipoksijski odgovor pod uretanskom anestezijom jako je dobro sačuvan, te izlaganje AIH dovodi do pLTF. Nasuprot ovome, čini se da propofol deprimira HVR. Stoga je postojeće istraživanje poduzeto kako bi se ispitalo deprimira li propofolska monoanestezija pLTF u modelu AIH.

Nadalje, u Laboratoriju za neuroznanost MF u Splitu, već se dokazalo stimulirajuće djelovanje sistemski primijenjenog spoja 8-hydroxy-2-di-npropylamino-tetralina (8-OH-DPAT) na bazalnu respiraciju (161) u štakora anesteziranih uretanom (*Slika 10*) koje je nalik na LTF. Taj lijek je agonist 5-HT<sub>1A</sub> receptora (162). Pokušat će se ustanoviti je li isti učinak tog lijeka na PNA i tijekom propofolske anestezije, čime bi se moglo nagađati o mogućem djelovanju propofola na 5-HT<sub>1A</sub> receptore u datom pokusnom okružju.

Temeljem gore navedene problematike, cilj disertacije je slijedeći:

- 1) utvrditi utječe li anestezija propofolom na nastanak dugoročne facilitacije freničkoga živca u modelu ponavljanih intermitentnih hipoksija,
- 2) ispitati postoje li kvantitativne i kvalitativne razlike u pLTF između propofolske (koja se vrlo često koristi u klinici) i uretanske anestezije (isključivo eksperimentalne),
- 3) preciznije odrediti moguće mehanizme djelovanja propofola na pLTF usporedbom učinaka intravenske primjene serotoninskog agonista 5-HT<sub>1</sub> receptora 8-OH DPAT-a u životinja anesteziranih propofolom ili uretanom.



**Slika 10.** Utjecaj sistemski primijenjenog spoja 8-hydroxy-2-di-npropylamino-tetralina (8-OH-DPAT) na respiraciju u životinja anesteziranih uretanom (preuzeto iz Valic M, Pecotic R, Dogas Z. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59(1):17-25. – SLIKA KAO U IZVORNIKU) (161)

### 3.8. HIPOTEZE

#### 3.8.1. Hipoteza 1

Dugoročna facilitacija freničkoga živca (LTF) izazvana akutnim intermitentnim hipoksijama dokazana je pri anesteziji uretanom. U pilot studiji našeg istraživanja, LTF je izazvan podraživanjem ponavljajućom hipoksijom prema obrascu 5x3 minute hipoksije. Dosad nije istraživana mogući utjecaj propofolske anestezije na dugoročnu facilitaciju disanja u modelu akutne intermitentne hipoksije.

- Pretpostavka je, da se istim protokolom kao pri uretanskoj anesteziji, tijekom anestezije propofolom neće izazvati LTF, tj. da će postojati značajne kvalitativne razlike u LTF između propofolske (koja se vrlo često koristi u klinici) i uretanske anestezije (isključivo eksperimentalne). Hipoteza je da će pLTF biti deprimiran u životinja anesteziranih propofolom, a neće u životinja anesteziranih uretanom.

#### 3.8.2. Hipoteza 2

U drugom dijelu istraživanja pokušat će se utvrditi mogući utjecaj propofola na serotoninske receptore u kontroli disanja. Prema postojećoj literaturi, propofol djeluje na GABA<sub>A</sub> receptore, dok je učinak na 5-HT receptore nejasan. Za pojavu fenomena pLTF nužna je aktivacija 5-HT receptora. Ukoliko u prvom dijelu istraživanja dokažemo odsutnost pLTF nakon primjene propofola, potrebno je testirati mogući mehanizam učinka propofola na pLTF. U pilot-studiji ovog istraživanja proučavan je učinak agonista 5-HT<sub>1A</sub> receptora 8-OH DPAT-a, na aktivnost freničkog živca tijekom propofolske anestezije.

- Pretpostavka je da će intravensko davanje agonista 5-HT<sub>1A</sub> receptora 8-OH DPAT-a, tijekom propofolske anestezije dovesti do promjena PNA. Ukoliko propofol nema antagonistički učinak i na 5-HT<sub>1A</sub> podvrstu serotoninskih receptora neće izostati povećanje aktivnosti freničkog živca nakon intravenske primjene 8-OH DPAT-a, a koje je dokazano pri anesteziji uretanom.

## **4. TVORIVA I POSTUPCI**

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

### **4.1. PRIPREMA POKUSNIH ŽIVOTINJA**

Ekperimenti su provedeni na ukupno 24 odrasla muška Sprague-Dawley štakora tjelesne mase 285-330 g. Postojale su 2 skupine pokusnih životinja: uretanska (U) i propofolska (P) (*Slika 11*). Istraživanje se sastojalo od 2 odvojena dijela: 1) istraživanje učinaka uretana i propofola na dugoročnu facilitaciju disanja i 2) istraživanje interakcije uretana i propofola sa serotoninim agonistom 8-OH DPAT (opširnije u poglavlju 4.2. – eksperimentalni protokol). Priprema životinja bila je zajednička za oba dijela i opisana je u slijedećim poglavljima.

#### *4.1.1. Traheotomija i mehanička ventilacija*

Traheotomija se izvodila kroz ventralnu vertikalnu inciziju na vratu. Putem traheostomijskog tubusa primjenjivana je mehanička ventilacija s pomoću posebnog uređaja za male laboratorijske životinje (SAR 830-P, CWE, Ardmore, SAD). Početna frekvencija namještena je na 50 udisaja/min uz  $T_{\text{insp}}$  0,6 sekundi i protok 300 ml/min, čime se isporučivao respiracijski volumen od oko 3 ml, a kasnije su se parametri prilagođavali arterijskim plinovima i kapnografiji. Svim životinjama primjenjivao se PEEP od 2-3 cm H<sub>2</sub>O.

Životinje u skupini U ventilirale su se tijekom čitavog pokusa mješavinom 50% kisika i dušika. Istom mješavinom ventilirale su se i životinje u skupini P, s time da se u indukcijskoj fazi anestezije rabio i sevofluran u dozi 1-2 MAC, koji se kasnije isključio (*Slika 11*).

Sve su se životinje obostrano vagotomizirale s ciljem uklanjanja kardiopulmonalnih ulaznih signala u središnju respiracijsku mrežu. Štakori su se paralizirali intravenskim pankuronij bromidom 1 mg/kg (Pavulon, Organon, Nizozemska), kako bi se spriječili spontani pokušaji disanja.

#### 4.1.2. Kanulacija krvnih žila

Svakoj životinji kanilirale su se obostrano femoralne arterije i vene i to za kontinuirani nadzor arterijskog tlaka, vađenje uzoraka krvi za acidobazni status, te za davanje lijekova i nadoknadu tekućine. Tijekom čitavog pokusa, a nakon venske kanulacije, davala se infuzija Ringer-laktata (1,7 ml/kg/h) uz Na-bikarbonat 5%. K tome, nakon injekcije svakog lijeka životinja je dobila 0,5 ml fiziološke otopine, kako bi se osigurala sigurna dostava lijeka.

Kako bi se poboljšala vijabilnost preparata zbog opsežnog kirurškog zahvata, protokol je uključivao intravensko davanje protuupalnog analgetika diklofenaka (Voltaren, Pliva, Hrvatska) u dozi prikladnoj za štakore 1,2 mg/kg (163), i to odmah nakon preparacije venskog puta, jer je tijekom pilot studije zapaženo lakše vođenje anestezije na taj način. U dosadašnjim istraživanjima nije istražen možebitni učinak diklofenaka na aktivnost freničkoga živca i respiracijsku plastičnost. Tijekom pilot-faze, testiran je taj možebitni učinak i utvrđeno je da diklofenak primijenjen intravenski nema nikakvog učinka na PNA. Nakon izlaganja epizodama ponavljanih hipoksija, 60 minuta nakon posljednje epizode hipoksije, zabilježeno je povećanje amplitude freničkoga živca kao i u skupini životinja anesteziranih uretanom, a bez primjene diklofenaka. Stoga se može izvesti zaključak da diklofenak nema učinka na bazalnu aktivnost freničkog živca, kao ni na nastanak dugoročne facilitacije freničkoga živca u modelu akutne intermitentne hipoksije.



#### 4.1.3. Kirurgija freničkoga živca

Štakori su bili postavljeni u potrbušni položaj i to u stereotaksijskom okviru (Lab Standard, Stoelting, SAD). Desni frenikus preparirao se putem dorzalnog pristupa na razini korijena C5. Zatim je bio postavljen je na bipolarne srebrne žičane elektrode i prekriven silikonskim gelom kako bi se zaštitio od sušenja. Elektrode za snimanje freničkoga živca izrađene su ručno u Laboratoriju za neuroznanost. Elektrofiziološki signal živca usmjeravao se potom do pojačala (System 1000, CWE Inc., SAD) i potom analizirao (opširnije u poglavlju 4.3. Obrada podataka).

#### 4.1.4. Monitoring tijekom anestezije

Ugljikov dioksid na kraju izdisaja (ETCO<sub>2</sub>) mjerio se kontinuirano (Gemini Gas Analyzer, CWE, Ardmore, SAD), a njegove vrijednosti održavale su se približno stalnim mijenjanjem frekvencije disanja i/ili inspiracijskog tlaka. Vrijednosti ETCO<sub>2</sub> su za 1-3 mmHg manje od onih u arterijskoj krvi.

Uzorci krvi za acidobazni status uzimani su iz femoralne arterije (0,2 ml) i s pomoću kapilarnih cjevčica periodički ubacivani u uređaj za acidobazni status (RapidLab 348, Bayer Diagnostics, Sudbery, Velika Britanija). Kontinuirano se invazivno mjerio arterijski krvni tlak u femoralnoj arteriji s pomoću preobličivača (Gould-Statham P23 ID, Cleveland, SAD), kao i rektalna temperatura, koja se održavala između 37 i 38 stupnjeva (topla prostorija, te topla podloga – FST, Heidelberg, Njemačka).

#### 4.1.5. Anestezija

Životinje su bile anestezirane intraperitonejskim uretanom ili intravenskim propofolom. Dubina anestezije pratila se tijekom cijelog pokusa (reakcije na bolni podražaj

stopala, kao i promjene arterijskog tlaka i disanja), obzirom na slijed kirurških zahvata za čije je izvođenje neophodna stabilna i duboka anestezija

#### 4.1.5.1. ANESTEZIJA U SKUPINI U

U skupini U životinje su bile anestezirane intraperitonejskom injekcijom 20% uretana (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) u dozi od 1,2 g/kg. Osim eventualnih dodatnih doza uretana od 0,2 g/kg, životinja kroz cijeli eksperiment nije dobijala niti jedan drugi anestetik.

#### 4.1.5.2. ANESTEZIJA U SKUPINI P

Za životinje u skupini P tijekom anestezije bio je znatno složeniji (*Slika 11*). Životinje su prvo bile postavljene u prozirnu staklenu komoru volumena 4 litre i tu su anestezirane mješavinom sevoflurana i 50% kisika i dušika. Protok svježih plinova 3 l/min išao je iz posebnog cilindra u kojem je bila 50% mješavina kisika i zraka, te je preko redukcijske valvule prolazio zatim kroz sevofluranski ishlapljivač (19.3 Dräger, Lübeck, Njemačka), a potom se pomoću posebnoga produžetka spajao sa staklenom komorom. Tijekom prve 3 minute davala se mješavina sevoflurana 6-8% i 50% kisika u zraku, a zatim se postupno udio udahnutog sevoflurana smanjivao na 4-6%, dok se životinja trajno pratila kroz prozirnu staklenu komoru. Minimalna alveolarna koncentracija (MAC) za sevofluran u štakora iznosi 2,5% (164).

Nakon što se životinja uspavala (prosječno 7-10 minuta), izvadila se iz staklene komore, brzo postavila na operacijski stol, a ventilacija se nastavila s pomoću posebne maske prilagođene njuški štakora. Životinja je potom spontano disala sevofluran 2,5-4%, uz protok svježih plinova 1 l/min sve do traheotomije.

Nakon vagotomije i paralize životinje u skupini P dobile su intravenski propofol (Propofol 1%, Fresenius Kabi, Graz, Austrija), i to bolus-doza 11,9 mg/kg intravenski, a simultano se uključila i kontinuirana infuzija 60-78 mg/kg/h s pomoću posebnog perfuzora za male laboratorijske životinje (SP 200iZ Syringe Pump, World Precision Instruments, Sarasota, SAD). Tijekom pilot-faze pokusa, nikad nije bilo potrebno povećavati dozu iznad

navedene, jedino je u manjeg broja životinja bilo potrebno smanjiti dozu na 60 mg/kg/h ovisno o vrijednostima arterijskog tlaka. Propofol se davao putem katetera u femoralnoj veni.

Dogovorno je postavljen period od 3-5 minuta preklapanja između propofola i inhalacijskog anestetika tijekom kojega simultano su tekli propofolska infuzija i sevofluran do 1 MAC, jer smo smatrali da je toliko potrebno da propofol preuzme puni učinak.

## 4.2. EKSPERIMENTALNI PROTOKOL

Prvo su napravljene pilot-studije (n=15), čija je svrha bila točno utvrđivanje ispravne doze propofola, koji se relativno rijetko koristi za anesteziju štakora pri velikim kirurškim zahvatima, te utvrđivanje osnovnoga postava eksperimenta. Tehnika proučavanja PNA vrlo je specifična jer zahtijeva veliki kirurški zahvat i stimulaciju. Životinja mora tolerirati traheotomijski tubus, veliku dorzalnu inciziju tijekom preparacije frenikusa, te obostranu disekciju prepona zbog postavljanja arterijskih i venskih katetera. K tome, tu je i 5 hipoksijskih epizoda, uz dugotrajnost čitavog zahvata (eksperiment traje minimalno 4-5 sati).

### 4.2.1. Prvi dio eksperimenta

Uspoređivao se utjecaj uretanske (skupina U) i propofolske anestezije (skupina P) na postojanje dugoročne facilitacije freničkoga živca (*Slika 11*).

Nakon završetka kirurškog rada i dobijanja adekvatnog signala frenikusa ostavilo se najmanje 45 minuta za stabiliziranje PNA pri 50% mješavini kisika u zraku, pri čemu se uzeo početni acidobazni status (uvjet:  $P_aO_2 > 150$  mmHg). Nakon toga se odredila bazalna PNA, koja je osnova za sve daljnje usporedbe. Bazalna PNA postiže se na slijedeći način: odredi se promjenama frekvencije i/ili inspiracijskog tlaka apnejički prag, tj. razina  $CO_2$  gdje nestaje spontana PNA (165), i postavi se početni  $ETCO_2$  otprilike 3-4 mmHg iznad te razine. Nakon što se dobije zadovoljavajući signal frenikusa, odredi se početni acidobazni status iz uzorka

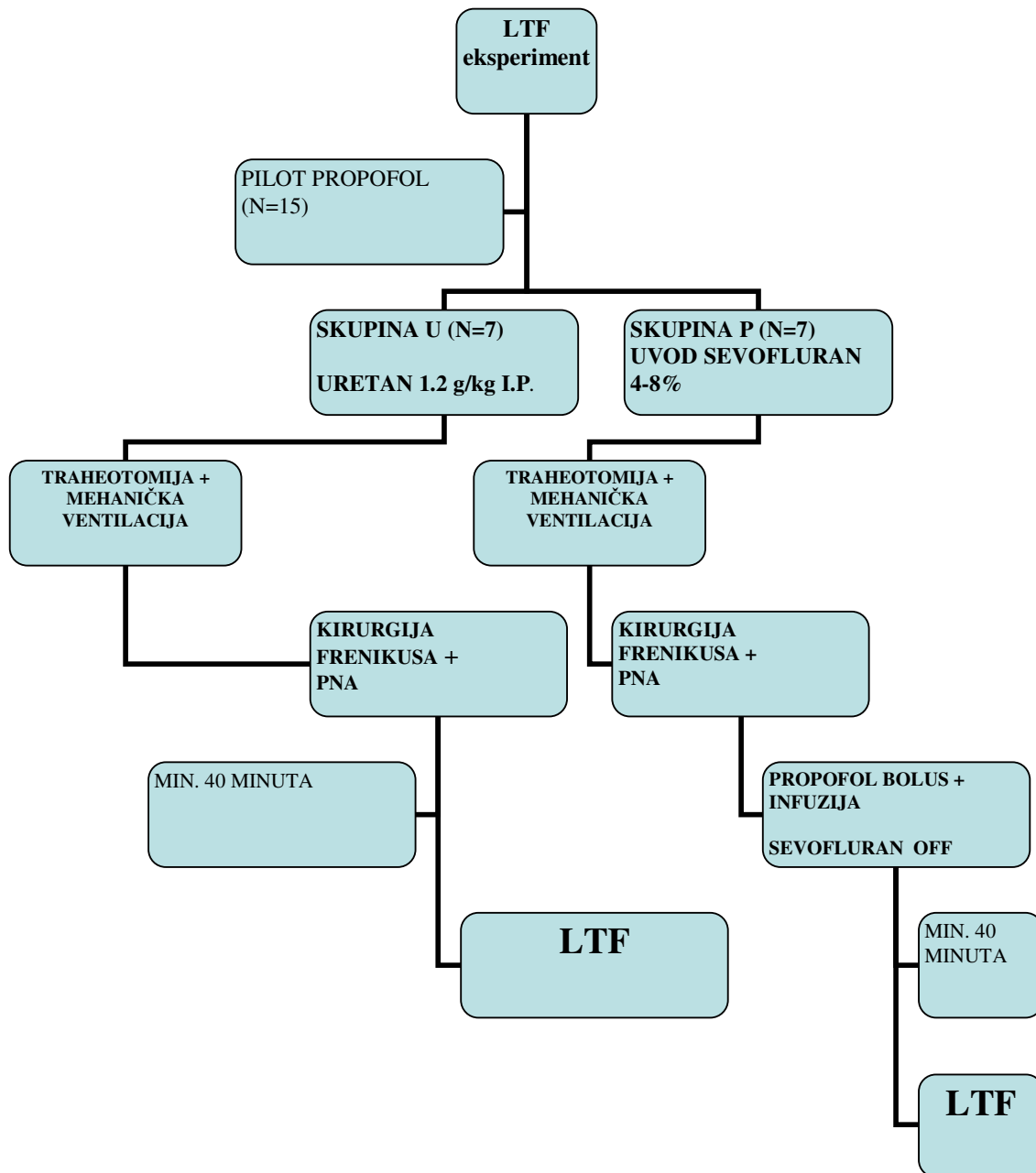
arterijske krvi iz femoralne arterije. Potom se snimi bazalna aktivnost frenikusa i započne serija od 5 hipoksijskih epizoda (mješavina 9% kisika u zraku) (*Slika 12*).

Tijekom pokusa cilj je bio održavati izokapniju kontinuiranim praćenjem CO<sub>2</sub>.

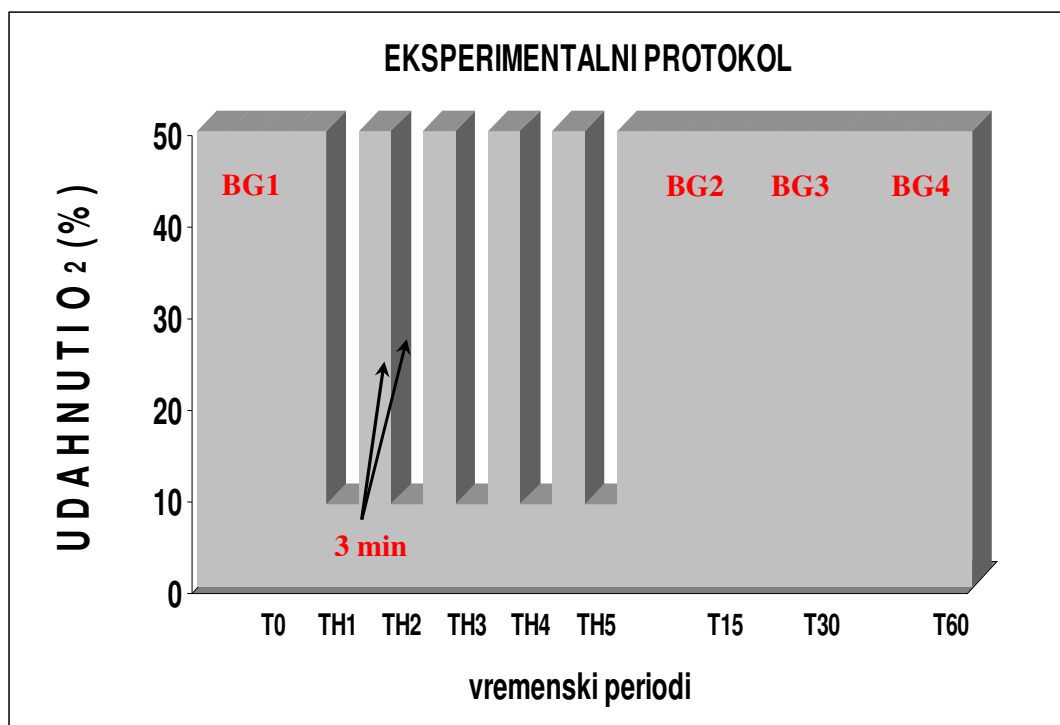
Osim početnog acidobaznoga statusa (neposredno prije 1. hipoksije), uzorci krvi za plinske analize vađeni su još 3 puta u post-hipoksijskom razdoblju (15, 30 i 60 minuta nakon završetka zadnje hipoksije). Nastojalo se održati vrijednost P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> vrlo blizu početne, kako bi se isključila mogućnost utjecaja promjena P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> na pLTF. U tim vremenskim točkama snimana je i PNA, te uspoređivana s bazalnom PNA (neposredno prije 1. hipoksije).

Za napomenuti je da je acidobazni status tijekom prve hipoksije određivan u životinja tijekom pilot faze i ustanovljeno je da se vrijednosti P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> tijekom takvog postupka vrlo stabilno kretale unutar raspona od 28-36 mmHg. U daljnjem tijeku pokusa taj acidobazni status više nije određivan iz više razloga. Na većem broju životinja ustanovljeno je da vrijednosti kisika u arterijskoj krvi odgovaraju postotku hipoksijske mješavine, te je smanjen broj uzoraka krvi za analizu, kako bi se održala hemodinamsku stabilnost. Pored toga, točna razina hipoksije i nije bila u žarištu ove studije koja se zapravo temelji na dugoročnoj facilitaciji disanja nakon AIH (≥60 minuta).

Arterijski krvni tlak održavan je unutar 20 mmHg od početnih vrijednosti, bilo manipulacijom anestheticima ili i.v. infuzijama. Na kraju eksperimenta sve životinje eutanazirane su dodatnim anestetikom i zasićenom otopinom kalijeva klorida.



Slika 11. Dijagram tijeka istraživanja



**Slika 12. Protokol akutne intermitentne hipoksije i pLTF u ovom istraživanju.**

Vrijednosti udahnutog O<sub>2</sub> (%) prikazane su u raznim vremenskim točkama eksperimenta (vremenska ljestvica nije linearna). Zahtijevao se minimum od 45 minuta stabilne aktivnosti freničkoga živca prije započinjanja protokola AIH. Bilo je pet 3-minutnih epizoda izokapnijske hipoksije (FiO<sub>2</sub> = 0,09), između kojih je bila epizoda od 3 minute oporavka (FiO<sub>2</sub> = 0,5).

T0 = vremenska točka neposredno prije 1. hipoksije, TH1, TH2, TH3, TH4, TH5 = hipoksijske epizode 1-5; T15 = 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T30 = 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T60 = 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

BG1 = kontrolni uzorak arterijske krvi za acidobazni status, BG2 = uzorak arterijske krvi 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, BG3 = uzorak arterijske krvi 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, BG4 = uzorak arterijske krvi 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

#### 4.2.2. Drugi dio eksperimenta

Analizirao se PNA u životinja anesteziranih propofolom koje su dobile intravenski 8-OH DPAT u dozi od 100 µg/kg.

Anestezija, traheotomija, mehanička ventilacija, kirurški zahvat i cijeli postupak do dobijanja signala freničkog živca provedeni su na isti način kao u prvom dijelu eksperimenta.

Nakon što je postignut zadovoljavajući signal freničkoga živca i osigurana stabilnost životinje u stereotaksijskom okviru, intravenskim putem injiciran je 8-OH-DPAT, agonist 5-HT<sub>1A</sub> receptora. Bilježena je PNA tijekom 60 minuta od injiciranja lijeka, a uz kontinuirano praćenje ET<sub>CO</sub><sub>2</sub>. Acidobazni status je određivan 5 minuta prije injiciranja lijeka, te 60 minuta nakon injiciranja lijeka. Nakon toga životinja je dobila dodatnu dozu anestetika i kalij-klorid, te je bila žrtvovana.

### 4.3 UZORKOVANJE SIGNALA I OBRADA PODATAKA

#### 4.3.1. Aktivnost freničkoga živca

Električni signal freničkoga živca uzorkovan je frekvencijom od 20 000 kHz s pomoću Power-Lab sustava (ADI Instruments, Castle Hill, Australija). Analogni neobrađeni signal usmjeren je do pojačala (MA-1000 Moving Averager, System 1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD) i filtriran široko pojasnim filterom u rasponu frekvencija 300 Hz – 10 KHz. U uređaju se ujedno vrši i predobrada signala – ispravljanje i izračun prosječne aktivnosti freničkoga živca u prozoru širine 100 ms (tzv. „moving-time average“). Izlazni signal freničkoga neurograma sprema se na računalo i naknadno analizira automatski s pomoću skripta izrađenih u MATLAB softveru. Vizualna analiza digitalnoga signala vrši se i s pomoću prigodnih PowerLab softverskih alata: Chart for Windows verzija 5.4.2 i Scope for Windows verzija 3.8 (ADI Instruments, Castle Hill, Australija).

Iz digitalnoga zapisa aktivnosti freničkoga živca određivani su sljedeći parametri:

- vremensko trajanje inspirija (Ti),
- vremensko trajanje ekspirija (Te),
- vremensko trajanje cjelokupnog ciklusa disanja (T<sub>tot</sub>) i
- amplituda aktivnosti freničkoga živca (peak PNA).

#### 4.3.2. Statistička obrada

Frenički neurogram i srednji arterijski tlak analizirani su uprosječivanjem vrijednosti  $T_i$ ,  $T_e$ ,  $T_{tot}$  i PNA u vremenskom intervalu od 20 sekundi, tj. 10 sekundi prije i 10 sekundi nakon određenih vremenskih točaka. U prvom dijelu eksperimenta te točke su osnovna aktivnost prije prve hipoksije ( $T_0$ ), hipoksijske epizode 1-5 ( $TH_1-TH_5$ ), te 15 ( $T_{15}$ ), 30 ( $T_{30}$ ), i 60 ( $T_{60}$ ) minuta iza završetka posljednje hipoksije. U drugom dijelu eksperimenta ta je točka bila intravensko davanje 8-OH DPAT. Osnovna aktivnost freničkoga živca neposredno prije davanja 8-OH DPAT te 20 sekundi nakon toga događaja korištene su kao ulazni podaci u tom dijelu analize. Vršna amplituda aktivnosti freničkoga živca određivana je u odnosu na kontrolne vrijednosti koje su izražene kao 100% u svake životinje.

Određivanje veličine uzorka bilo je u skladu s procijenjenom veličinom uzorka (tj.  $n \geq 13$ ) za obje skupine, a izračunata je putem analize uz  $\alpha=0.05$  i snagu 0.80.

Rezultati su analizirani uporabom programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Od statističkih testova korišteni su two-way ANOVA (unutar i između skupina), koju je slijedila Bonferroni post-hoc korekcija. Two-way ANOVA i post-hoc analize korištene su za dobivanje svih usporedbi, i to onih koje uspoređuju sve PNA nasuprot bazalnoj PNA, kao i za dobivanje svih usporedbi između 2 anestetika u istim vremenskim točkama za vrijeme protokola. U drugom dijelu pokusa za usporedbu arterijskih krvnih tlakova, te  $PaCO_2$  prije i nakon davanja 8-OHDPAT-a koristi se t-test za zavisne uzorke.

Sve vrijednosti navedene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ .

#### 4.4. ETIČKA NAČELA

Pokusi navedeni u prijavi ove disertacije prethodno su odobreni od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u okviru znanstveno-istraživačkog



projekta "Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju", br. 216-2163166-6513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš), te „Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava – uloga serotonina“ br. 216-2163166-3342 MZOŠ RH (voditelj doc. dr. sc. Maja Valić). Prikladni model za izvođenje ovih eksperimenata bio je štakor anesteziran otopinom uretana ili intravenskim propofolom. Svi kirurški postupci na životinjama izvođeni su u anesteziji odgovarajućeg stupnja. Eutanazija životinja po završetku eksperimenata vršila se predoziranje anestetika, te intravenskom primjenom zasićene otopine kalijevog klorida, a, u skladu s naputcima American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia (166).

## **5. REZULTATI**

### **5.1. STUDIJA I**

Glavni rezultat ovog dijela studije pokazao je da je propofolska anestezija ugasila dugoročnu facilitaciju freničkoga živca, a koja je jasno dokazana pri uretanskoj anesteziji (*slika 13*).

U štakora anesteziranih uretanom postojalo je značajno povećanje amplitude freničkoga živca 60 minuta nakon kraja zadnje hipoksijske epizode u usporedbi s bazalnom PNA prije 1. hipoksijske epizode (povećanje od  $59,4 \pm 6,6\%$ ,  $P < 0,001$ ), tj. postojao je pLTF (*slika 13, gornji dio slike*). Nije bilo statistički značajne promjene amplitude freničkoga živca 15 i 30 minuta nakon kraja zadnje hipoksijske epizode ( $+3,4 \pm 1,8\%$ , odnosno  $-4,9 \pm 2,4\%$ ,  $P > 0,05$ ; *slika 14, podslika A*)

U štakora anesteziranih propofolom nije bilo statistički značajnih promjena amplitude freničkoga živca ni u jednoj posthipoksijskoj točki (T15, T30, T60) u usporedbi s bazalnom PNA (promjene od  $-7,7 \pm 1,6\%$ ,  $-2,9 \pm 1,4\%$ , i  $+2,2 \pm 2,1\%$ ,  $P > 0,05$ ), tj. pLTF je ugašen (*slika 13, donji dio slike; slika 14, podslika A*). Postojala je statistički značajna razlika u vršnoj aktivnosti freničkoga živca između štakora anesteziranih uretanom i štakora anesteziranih propofolom u točki T60 (*slika 14, podslika A*,  $P < 0,001$ ).

Tijekom prve epizode intermitentne hipoksije, amplituda freničkoga živca statistički se značajno promijenila u obje skupine životinja. Izražena u postocima povećanja bazalne PNA, ona je iznosila  $172,0 \pm 15,8\%$  ( $P < 0,001$ ) u štakora anesteziranih uretanom, te  $106,8 \pm 16,9\%$  ( $P < 0,001$ ) u štakora anesteziranih propofolom. HVR je bio očuvan u obje skupine životinja tijekom svih 5 hipoksijskih epizoda ( $P < 0,001$  u usporedbi s bazalnom aktivnosti freničkoga živca). Uz to, akutni HVR bio je veći u štakora anesteziranih uretanom u odnosu na štakore anestezirane propofolom ( $P < 0,001$ ; *slika 14, podslika A*).

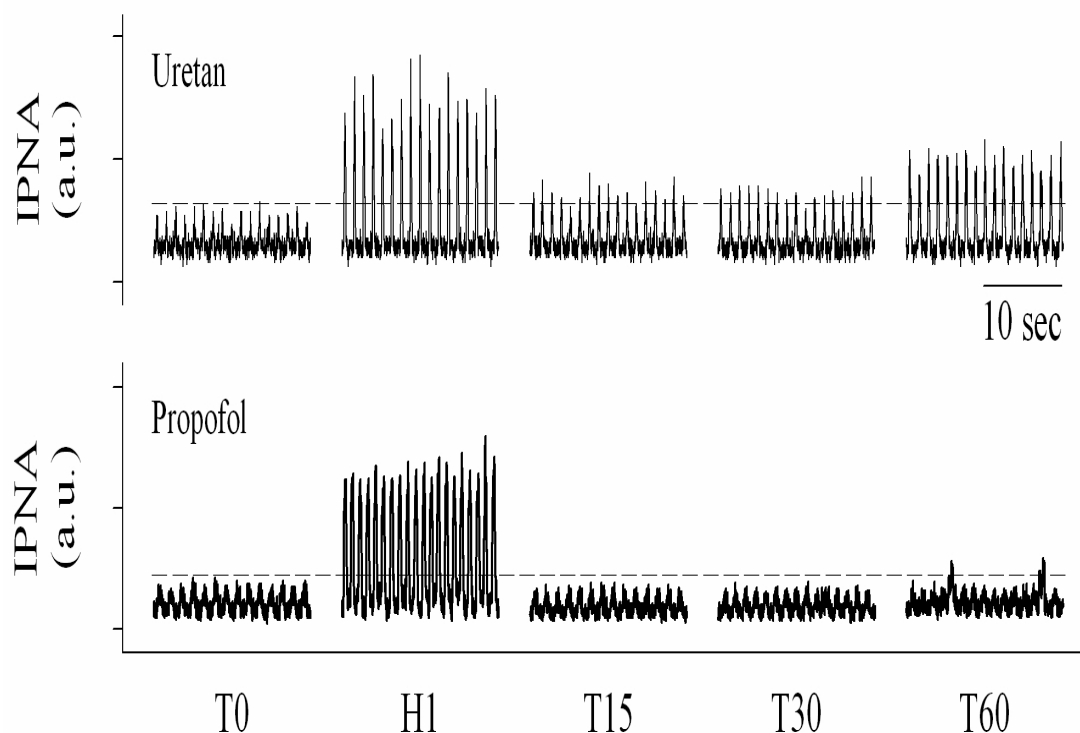
Postojalo je statistički značajno povećanje frekvencije freničkoga živca tijekom prve hipoksijske epizode u odnosu na bazalne vrijednosti PNA u životinja anesteziranih uretanom ( $51,6 \pm 2,4$  vs.  $35,1 \pm 3,6$  udisaja/min,  $P=0,003$ ), ali ne i u životinja anesteziranih propofolom ( $44,3 \pm 3,8$  vs.  $42,4 \pm 4,3$  udisaja/min,  $P>0,05$ ) (*slika 14, podslikal B*).

Akutna intermitentna hipoksija nije dovela do značajnih promjena frekvencije izbijanja freničkoga živca u obje skupine životinja u svim posthipoksijskim točkama (*slika 14, podslika B*).

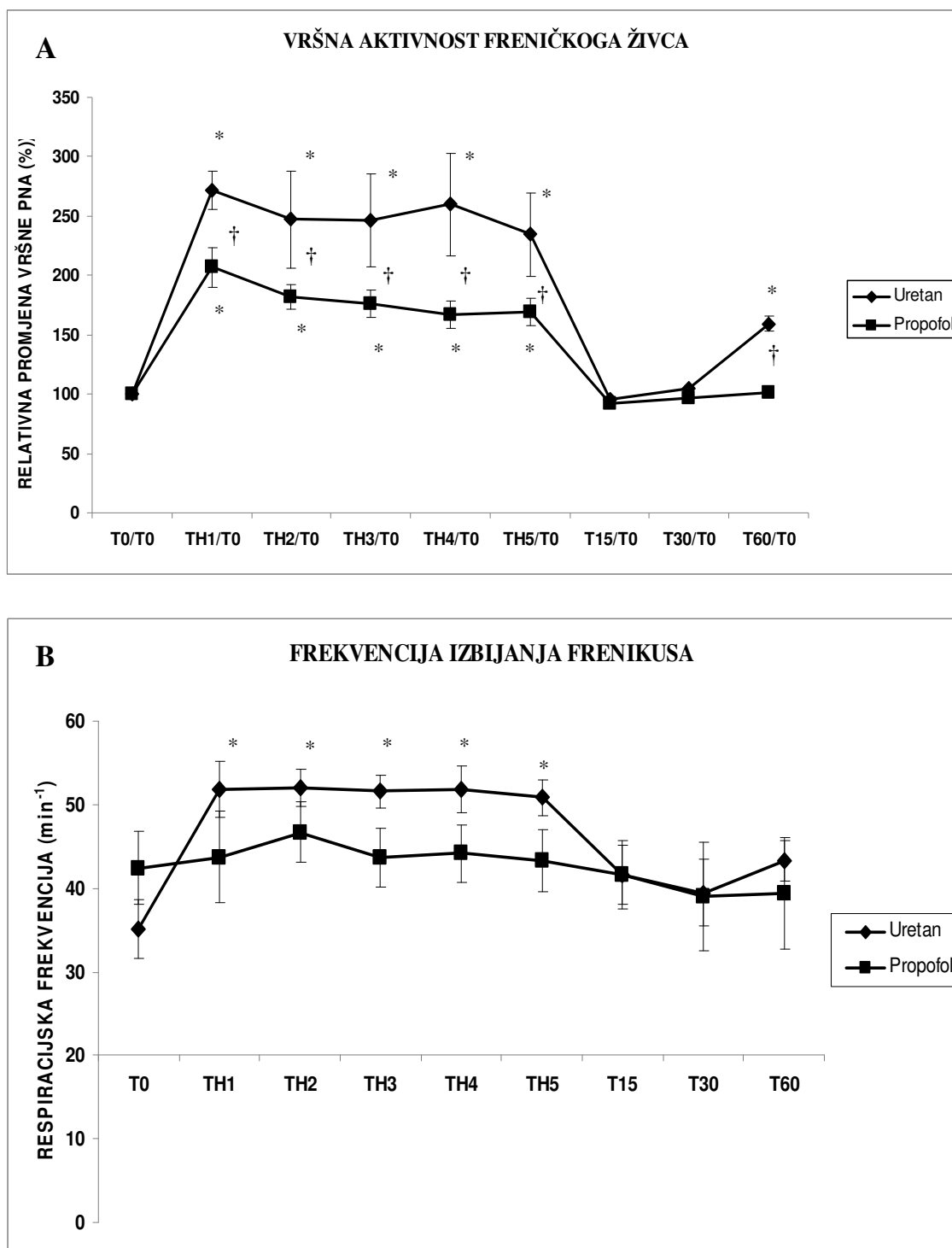
Pojedinačni odgovori za svaku životinju u obje skupine tijekom prve hipoksijske epizode prikazani su na *slici 15*, kako za vršnu aktivnost freničkoga živca (lijevo), tako i za frekvenciju disanja (desno).

U *tablici 1* navedene su izmjerene vrijednosti  $P_aCO_2$ ,  $P_aO_2$ , i pH neposredno prije prve hipoksije, kao i 15, 30 i 60 minuta nakon završetka zadnje hipoksijske epizode. Nije bilo statistički značajnih promjena u obje grupe životinja u bilo kojoj vremenskoj točki. Vrijednosti srednjega arterijskoga tlaka nisu se značajno mijenjale tijekom čitavog protokola u štakora anesteziranih uretanom, dok je u štakora anesteziranih propofolom zabilježeno značajno sniženje arterijskoga krvnog tlaka samo tijekom prve hipoksije ( $44,5 \pm 5,2$  mmHg u prvoj hipoksiji,  $99,8 \pm 15,6$  mmHg prije prve hipoksije,  $P=0,007$ ) (*tablica 2*).

Akutna intermitentna hipoksija nije dovela do značajnih promjena u ritmu disanja u obje skupine životinja. Trajanje udisaja ( $T_i$ ), trajanje izdisaja ( $T_e$ ) i trajanje respiracijskoga ciklusa ( $T_{tot}$ ) nisu se značajno promijenili za vrijeme prve hipoksijske epizode, niti 15, 30 i 60 minuta nakon kraja zadnje hipoksijske epizode (*tablica 3*).



**Slika 13.** Integrirana aktivnost freničkoga živca (IPNA; arbitarne jedinice, a.u.) u jednog štakora tijekom uretanske anestezije (gornji dio slike) i u drugoga tijekom propofolske anestezije (donji dio slike); T0 = bazalna vrijednost prije prve hipoksije, TH1 = prvi hipoksijski odgovor, T15 = 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T30 = 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T60 = 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode. Frenički LTF nazočna je 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode (T60) u životinja anesteziranih uretanom, ali ne i u životinja anesteziranih propofolom.



Slika 14. Promjene u vršnoj aktivnosti freničkoga živca (A) i frekvenciji disanja (B) u štakora anesteziranih uretanom i propofolom u svim vremenskim točkama eksperimenta. T0 odgovara bazalnim vrijednostima neposredno prije prve hipoksije, TH1,

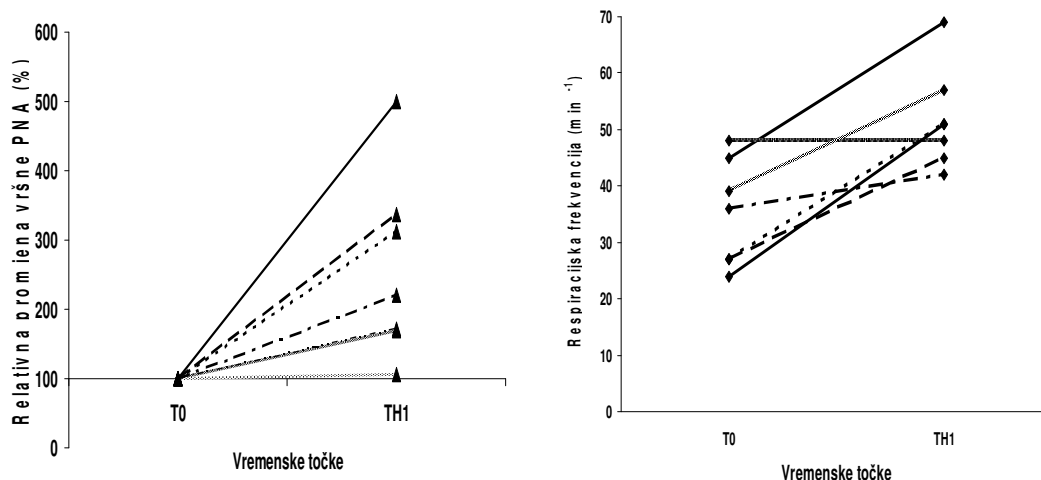
TH2, TH3, TH4, TH5 predstavljaju 5 hipoksijskih epizoda, dok su T15, T30, i T60 vremenske točke 15, 30, i 60 minuta nakon završetka zadnje hipoksije.

Podsluka A: Relativne promjene u vršnoj aktivnosti freničkoga živca u usporedbi s bazalnim vrijednostima u T0 (100%). (\*značajna razlika u odnosu na bazalne vrijednosti,  $P < 0,001$ ; †značajna razlika između štakora anestetiziranih uretanom i štakora anestetiziranih propofolom,  $P < 0,001$ ).

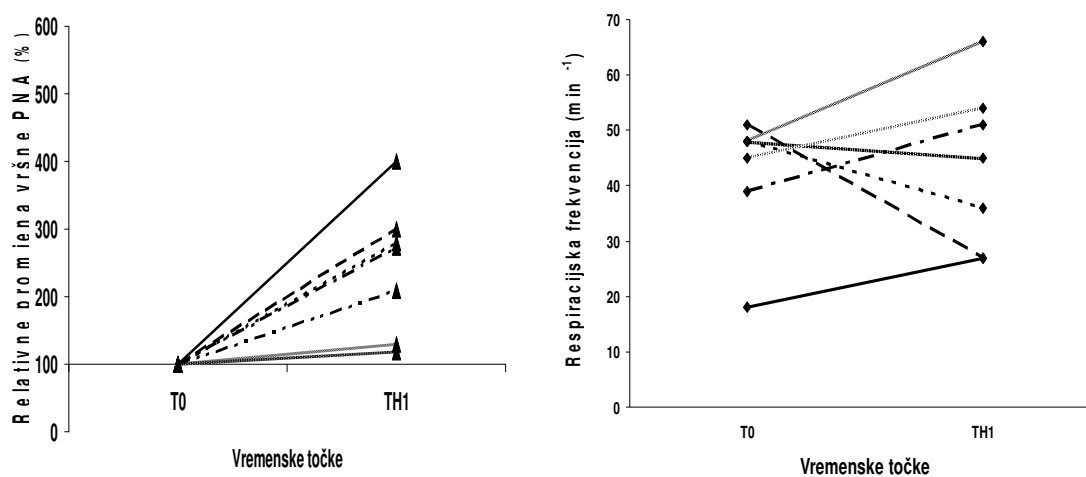
Podsluka B: Relativne promjene u frekvenciji izbijanja ( $\text{min}^{-1}$ ) u štakora anestetiziranih uretanom i štakora anestetiziranih propofolom (\*značajna razlika u odnosu na bazalne vrijednosti,  $P < 0,01$ ).

## HIPOKSIJSKI VENTILACIJSKI ODGOVOR - URETAN

A



## HIPOKSIJSKI VENTILACIJSKI ODGOVOR - PROPOFOL



**Slika 15. Individualni hipoksijski ventilacijski odgovori tijekom prve hipoksijske epizode u štakora anestetiziranih uretanom (A) i propofolom (B), prikazan kao vršna aktivnost freničkoga živca (Lijevo: bazalna vršna PNA = 100%), i respiracijska frekvencija (Desno: izbijanja frenikusa/min). T0 - bazalne vrijednosti neposredno pred prvu hipoksiju, TH1 – prva hipoksijska epizoda.**

**Tablica 1.** Parcijalni tlakovi ugljikova dioksida ( $P_aCO_2$ ) i kisika ( $P_aO_2$ ) u arterijskoj krvi, te pH vrijednosti zabilježene u obje skupine životinja u različitim vremenskim točkama tijekom pokusa

	T0	T15	T30	T60	P*
$P_aCO_2$ (mmHg)					
Uretan	44,7 ± 1,3	44,6 ± 1,0	42,1 ± 1,2	41,0 ± 2,5	p>0,05
Propofol	43,6 ± 2,2	44,9 ± 2,2	42,5 ± 2,4	41,9 ± 2,1	p>0,05
$P_aO_2$ (mmHg)					
Uretan	261,0 ± 18,6	281,8 ± 13,7	286,7 ± 22,4	272,4 ± 30,4	p>0,05
Propofol	247,8 ± 11,6	258,8 ± 7,9	273,5 ± 13,9	251,6 ± 11,5	p>0,05
pH					
Uretan	7,31 ± 0,02	7,31 ± 0,02	7,32 ± 0,02	7,31 ± 0,02	p>0,05
Propofol	7,39 ± 0,01	7,38 ± 0,02	7,38 ± 0,02	7,36 ± 0,01	p>0,05

T0 = neposredno prije prve hipoksije, T 15 = 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T30 = 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T60 = 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode

\* ANOVA, učinci između skupina



**Tablica 2.** Srednji arterijski tlakovi u obje skupine životinja u različitim vremenskim točkama eksperimentalnog protokola. Podaci prikazani kao srednja vrijednost (SEM).

ARTERIJSKI KRVNI TLAK (mmHg)									
	T0	TH1	TH2	TH3	TH4	TH5	T15	T30	T60
Uretan	105,1 (11,2)	81,1 (9,9)	66,8 (9,4)	65,0 (11,9)	64,6 (9,7)	52,7 (9,8)	95,1 (16,9)	100,5 (14,3)	92,4 (17,6)
Propofol	99,8 (15,6)	44,5* (5,2)	52,9 (5,8)	56,1 (9,7)	60,8 (12,9)	61,4 (10,7)	81,0 (11,1)	76,4 (11,6)	88,4 (11,2)

\* U usporedbi s T0 u propofolskoj skupini ( $P < 0,01$ ). Nije bilo drugih statistički značajnih razlika unutar bilo koje skupine ili između skupina u svim vremenskim točkama.

T0 = neposredno prije prve hipoksijske epizode, TH1, TH2, TH3, TH4, TH5 = hipoksijske epizode 1-5, T15 = 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T30 = 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T60 = 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode

**Tablica 3.** Relativne promjene  $T_i$ ,  $T_e$ , i  $T_{tot}$  za vrijeme eksperimentalnog protokola u štakora anesteziranih uretanom i propofolom. Podaci izraženi u sekundama (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška). Nije bilo značajnih promjena parametara ritma disanja unutar svake skupine ili između dviju skupina anestetika.

	T0	TH1	T15	T30	T60
<b>Uretan</b>					
$T_i$	$0,51 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,04$
$T_e$	$1,18 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,15$	$1,00 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,08$
$T_{tot}$	$1,69 \pm 0,17$	$1,14 \pm 0,07$	$1,47 \pm 0,14$	$1,49 \pm 0,15$	$1,34 \pm 0,07$
<b>Propofol</b>					
$T_i$	$0,60 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,05$
$T_e$	$0,62 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,16$	$0,68 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,04$
$T_{tot}$	$1,22 \pm 0,04$	$1,28 \pm 0,15$	$1,26 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,06$

$T_i$  = inspiracijsko vrijeme,  $T_e$  – ekspiracijsko vrijeme,  $T_{tot}$  – cjelokupno respiracijsko vrijeme; T0 = neposredno prije prve hipoksije, T 15 = 15 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T30 = 30 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode, T60 = 60 minuta nakon zadnje hipoksijske epizode.

## 5.2. STUDIJA 2

Intravenska primjena 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  8-OHDPAT-a u životinja anesteziranih propofolom ( $n=10$ ) dovela je do povećanja vršne amplitude freničkoga živca u 6 ispitivanih životinja, dok u 4 nije zabilježena promjena vršne aktivnosti freničkoga živca u odnosu na bazalne vrijednosti. Nakon intravenske primjene 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  8-OHDPAT-a nastupilo je značajno

sniženje srednjega arterijskoga tlaka ( $91,0 \pm 8,8$  mmHg,  $P < 0,001$ ) u odnosu na bazalne vrijednosti srednjeg arterijskoga tlaka neposredno prije davanja 8-OHDPAT-a ( $123,5 \pm 8,5$  mmHg). Izokapnija se održavala tijekom cijelog eksperimenta. Vrijednost  $P_aCO_2$  prije injiciranja 8-OH DPAT ( $45,0 \pm 1,7$  mmHg) nije se razlikovala od vrijednosti  $P_aCO_2$  60 minuta nakon injiciranja 8-OHDPAT-a ( $45,3 \pm 1,2$  mmHg,  $P = 0,83$ ).

## **6. RASPRAVA**

### **6.1. STUDIJA 1**

U ovoj studiji dugoročna facilitacija freničkoga živca bila je ugašena u štakora anestetiziranih propofolom, a izloženim protokolu AIH od 5 epizoda 3-minutne hipoksije ( $FiO_2=9\%$ ), odvojenih razdobljima hiperoksije u trajanju 3 minute ( $FiO_2=50\%$ ). S druge strane, dugoročna facilitacija freničkoga živca bila je nazočna u štakora anestetiziranih uretanom, a koji su podvrgnuti tom istom protokolu AIH.

#### *6.1.1. Dugoročna facilitacija freničkoga živca i anestezija*

Obrazac izražavanja pLTF različit je s obzirom na vrstu, stimulacijske protokole ili stanje budnosti. Vagotomija i anestezija znatno olakšavaju izražavanje pLTF (26, 40). Fenomen pLTF najviše se proučavao upravo u štakora podvrgnutim raznim protokolima AIH, te je utvrđeno da je značajno više istaknut u štakora anestetiziranih uretanom (33, 48, 52), nego u onih neanestetiziranih (26, 62, 112), a različit je i obrazac izražavanja pLTF (povećanje amplitude u anestetiziranih naspram povećanja frekvencije u budnih životinja).

Anestetik uretan korišten je uglavnom uz izofluranski uvod u anesteziju (33, 48, 52), ili u kombinaciji s  $\alpha$ -kloralozom (43, 55). Bilo je i drugih anestezijskih protokola, primjerice kombinacija podkožnog ketamina i ksilazina (167), potom intraperitonejska kombinacija pentobarbitona i kloralhidrata (engl. equithesine) (38), te pripravak Saffan (kombinacija alfaksalona i alfadalona) uz uvod u anesteziju pentobarbitonom (168), a uz napomenu da se pLTF uspješno održavao pri svim tim anestezijskim protokolima (*tablica 4*).

Rezultati ovog istraživanja po kojima je propofolska anestezija uklonila izazivanje pLTF sugeriraju da bi učinci različitih anestetika mogli imati utjecaj na izražavanje pLTF.

**Tablica 4.** Pregled važnijih eksperimenata freničke dugoročne facilitacije s obzirom na životinjsku vrstu i tip anestezije.

<b>AUTOR, godina, (ref.)</b>	<b>VRSTA</b>	<b>ANESTEZIJA</b>	<b>ANESTETIK</b>
Millhorn i sur., 1980 <sup>a</sup> (43)	mačka	DA + decerebracija	$\alpha$ -kloraloza + uretan
Cao i sur., 1992 (61)	pas	NE (budni, traheotomirani)	
Sokolowska&Pokorski, 2006 (55)	kunić	DA, SB	$\alpha$ -kloraloza i uretan ip
Fregosi&Mitchell, 1994 <sup>a</sup> (57)	mačka	DA (8 + 1 decerebrirana)	uvod halotanom + $\alpha$ -kloraloza
Turner&Mitchell,1997 (27)	koza	NE	
Mitchell i sur., 2001 (21)	patka	NE	lokalna anestezija za traheotomiju
Hayashi i sur., 1993 <sup>a</sup> (47)	štakor	DA + decerebelacija	uvod izofluran + uretan sc/iv
Bach&Mitchell, 1996.(48)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Kinkead i sur., 1998 (51)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Kinkead&Mitchell, 1999 (52)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Bach i sur., 1999 (41)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Janssen&Fregosi, 2000 <sup>b</sup> (65)	štakor	DA, SD	serija ip injekcija uretana
Bach&Mitchell, 2000 (49)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Baker&Mitchell, 2000 (37)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Fuller i sur., 2001a (50)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Fuller i sur., 2001b (53)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Zabka i sur. 2001a (169)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Zabka i sur. 2001b (170)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Ling i sur. 2001 <sup>c</sup> (29)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Olson i sur. 2001 (62)	štakor	NE	
Baker-Herman&Mitchell, 2002 (94)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
McGuire i sur., 2002 <sup>d</sup> (112)	štakor	NE	
Bavis&Mitchell, 2003 (73)	štakor	DA, karotidna denervacija	uvod izofluran + uretan iv
Peng&Prabhakar, 2003 <sup>c</sup> (103)	štakor	DA	Uretan (1.2 g/kg ip) uz 15% početne doze svaki sat
Zabka i sur., 2003 <sup>c</sup> (110)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
McGuire i sur., 2003 <sup>c</sup> (64)	štakor	NE	
McGuire i sur., 2004 <sup>c</sup> (63)	štakor	NE	
McKay i sur., 2004 (167)	neonatalni štakori	DA	ketamin 20 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg sc
Zabka i sur., 2005 (171)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv

McGuire&Ling, 2005 <sup>c, e</sup> (54)	štakor	NE	
Fuller, 2005 (69)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Golder&Mitchell, 2005 <sup>c, f</sup> (172)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
McGuire i sur., 2005 (98)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Reeves i sur., 2006 (173)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Doperalski&Fuller, 2006 <sup>f</sup> (174)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Zabka i sur., 2006. (175)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Berner i sur. 2007 (176)	štakor	NE	
Golder&Martinez, 2008 (177)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
McGuire i sur., 2007 (178)	štakor	DA	uretan ip
Neverova i sur., 2007 (179)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Dick i sur. 2007 (38)	štakor	DA	“ekvitezin” ip (30 mg/kg pentobarbitona i 133 mg/kg kloralhidrata)
MacFarlane&Mitchell, 2008 (180)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Mahamed&Mitchell, 2008 <sup>g</sup> (181)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Terada i sur., 2008 (42)	štakor	NE	
McGuire i sur., 2008 <sup>h</sup> (182)	štakor	NE	
Toyama i sur. 2009. (56)	miš	DA	uretan ip
Wilkerson&Mitchell 2009 <sup>i</sup> (183)	Brown-Norway štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Ryan&Nolan 2009. <sup>j</sup> (168)	Wistar štakor	DA, SD	uvod pentobarbitonom, održavanje iv infuzija Saffana = alfaksalon i alfadalon
Cao i sur., 2009. <sup>k</sup> (184)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan ip
MacFarlane&Mitchell, 2009 <sup>l</sup> (185)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Hoffman i sur., 2009 <sup>m</sup> (186)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv
Baker-Herman i sur., 2009 <sup>n</sup> (187)	štakor	DA	uvod izofluran + uretan iv

<sup>a</sup> LTF postignut intermitentnim podraživanjem CSN, ne putem AIH

<sup>b</sup> Nije bilo pLTF

<sup>c</sup> Pretretman životinja putem CIH, a tad primjena AIH

<sup>d</sup> Proučavani su učinci broja i težine hipoksijskih epizoda na vLTF u budnih štakora. vLTF je postignut s 10% O<sub>2</sub>, ali ne i s 8% ili 12% O<sub>2</sub>. vLTF je također postignut s 10, 20 i 72 hipoksijske epizode, ali ne s 3 ili 5 epizoda AIH.

<sup>e</sup> LTF nije dobijen u svih proučavanih životinja

<sup>f</sup> model ozljede vratne leđne moždine

<sup>g</sup> usporedba između standardnog AIH protokola i apneja od 25 sekunda (zaustavljanje respiratora na 25 s). LTF je induciran i s 3 i sa 6 apneja.

<sup>h</sup> utjecaj fragmentiranog spavanja na vLTF

<sup>i</sup> pretretman životinja s dAIH (dAIH = 10 epizoda AIH/dan, kroz 7 dana), a potom opservacija odgovora na klasični podražaj AIH-om

<sup>j</sup> LTF mišića genioglossusa induciran nakon 8, ali ne i nakon 3 hipoksijske epizode

<sup>k</sup> proučavao se LTF n. glossopharyngeusa

<sup>l</sup> pLTF izazvan intratekalnim injiciranjem 5-HT u područje vratne leđne moždine, bez AIH

<sup>m</sup> intratekalno davanje adenozijskih A2 antagonista

<sup>n</sup> razlike u pLTF-u među 3 soja štakora (Fischer 344, Lewis, Brown Norway)

*SD = spontano disanje, ip = intraperitonejski, sc = potkožno, iv = intravenski; u stupcu VRSTA riječ štakor odnosi se na soj Sprague-Dawley, ukoliko nije drukčije navedeno*

U ovoj studiji, u uretanskoj skupini životinja pLTF očitovala se prvenstveno povećanjem amplitude freničkoga živca. To je u skladu i s nedavnom meta-analizom (40) koja je obuhvatila 40 studija s AIH isključivo na štakorima Sprague-Dawley (33 studije na anestetiziranim i 7 studija na neanestetiziranim životinjama). Prema njenim rezultatima u anestetiziranih i vagotomiranih životinja AIH dovodi do pLTF koji se manifestira povećanjem i amplitude i frekvencije, a u neanestetiziranih samo povećanjem frekvencije. Međutim, povećanje frekvencije, prema toj meta-analizi, u anestetiziranih je zanemarivo u odnosu na povećanje amplitude (12% nasuprot 60%), pa se s pravom daje zaključiti da taj fenomen nastaje uglavnom zbog promjena amplitude PNA. U ovoj disertaciji, pLTF se u uretanskoj skupini očitovao gotovo identičnim povećanjem amplitude (59,4%), dok je povećanje frekvencije također postojalo, ali baš kao i u gornjoj meta-analizi, nije bilo statistički značajno (bazalno – 35,1 udisaj/min; T60 – 43,3 udisaja/min, povećanje za 23,2%). U životinja anestetiziranih propofolom, nije zabilježeno ni značajno povećanje amplitude, niti frekvencije freničkoga živca nakon AIH, tj. amplituda se povećala samo za 2.2%, a frekvencija je čak bila snižena za 7%. Fenomen pLTF nije bio izazvan (*slike 13 i 14*).

U svih eksperimenata ovakve vrste za pravilnu evaluaciju dobivenih rezultata, zasigurno je potrebno uzeti u obzir vrstu anestezije kao vrlo bitan čimbenik. Anestetici mogu imati veliki učinak pri raznim neurofiziološkim studijama, ali oni su jednostavno neizostavni,

kako zbog praktičnih, tako i zbog etičkih razloga (158). Uretan (etil-karbamat) vrlo je pogodan anestetik za laboratorijske životinje, ne samo zbog dugotrajnosti djelovanja, raznih putova davanja (intraperitonejski, potkožno, intravenski) i velike terapijske širine, već i zbog jedinstvene sposobnosti da se postigne kirurška anestezija, s minimalnim učincima na kardiovaskularni sustav i disanje. Nadalje, uretan može proizvesti kiruršku anesteziju bez utjecaja na neurotransmisiju u raznim subkortikalnim područjima i perifernom živčanom sustavu (158, 159). Od mnoštva membranskih proteina, anestetici uglavnom djeluju na neurotransmitterske ionske kanale (159). I hlapljivi i intravenski anestetici imaju vrlo jednostavan mehanizam djelovanja; ili pojačavaju GABAergički prijenos ili slabe glutamatergički prijenos (188). Čini se da je uretan vrlo specifičan, budući da zahvaća podjednako i inhibicijske i ekscitacijske sustave, i to u znatno manjoj mjeri negoli ostali anestetici (159). Upravo zbog tih značajki, uretan se smatra prihvatljivim za sve studije koje proučavaju aktivnost respiracijskih neurona, te za sve studije koje istražuju oslobađanje neurotransmitera kao odgovor na fiziološke podražaje i razne lijekove (158, 189).

S druge strane, propofol se opsežno rabi u ljudi (117), ali značajno manje na laboratorijskim životinjama u odnosu na uretan i hlapljive anestetike. Mogući razlozi su sofisticirane infuzijske pumpe potrebite za njegovu uporabu, moguća kardiovaskularna nestabilnost, teorijska mogućnost propofolskog infuzijskog sindroma (190) nakon dugotrajne primjene visokih doza, te činjenica da je taj anestetik primarno hipnotik (119), pa je propofolsku monoanesteziju tehnički dosta teško izvesti.

Opće je prihvaćena činjenica da anestetici umanjuju aktivnost respiracijskog motornog odgovora (191). Propofol deprimira centre za disanje u moždanom deblu, a također i umanjuje HVR, i to već u subanestetskim dozama u ljudi (147, 148), a rezultati su dobiveni na temelju varijabli vezanih za mehaniku disanja ( $V_t$ ,  $\dot{V}$ ,  $f$ ). Propofol je već istraživani i u štakora u proučavanju HVR (192, 193). Prema podacima iz tih studija u štakora soja Wistar



(bolus-doza 7-7,5 mg/kg, te kontinuirana infuzija 20-22 mg/kg/h), propofol nije značajno mijenjao HVR u odnosu na neanestezirane životinje. Valja reći da su promjene disanja praćene i u tim studijama putem arterijskih plinova, respiracijskoga volumena i frekvencije disanja, a ne putem PNA, koja se smatra finim pokazateljem središnje kontrole disanja. Ne postoje studije u štakora koje istražuju možebitno propofolsko slabljenje HVR putem nadzora aktivnosti freničkoga živca, a što je napravljeno u ovoj disertaciji. Doduše, utjecaj djelovanja propofola na PNA pratio se tek u nekoliko studija na kunićima (145, 194-196). Nađeno je sinergističko djelovanje (depresija) aktivnosti freničkoga živca u kombinaciji propofola s drugim anestheticima (midazolam, fentanil, remifentanil), ali ne u hipoksijskim uvjetima (145, 194). Nakamura i suradnici (196) pronašli su da je propofol u kunića značajno više deprimirao aktivnost hipoglosalnoga, nego freničkoga živca kao odgovor na hiperkapnijsku-hipoksijsku stimulaciju (respiracijski arest od 60 sekundi). Zaključuju da održavanje gornjega dišnog puta može biti kompromitirano za vrijeme propofolske anestezije. To ima i svoje kliničke implikacije. Primijećeno je u ljudi da propofol znatno slabi reflekse gornjega dišnog puta u odnosu na barbiturate (197), pa se to svojstvo koristi za određene manipulacije, npr. postavljanje laringealne maske. Valja napomenuti da se i u gore navedenoj studiji propofol rabio zajedno s drugim anestheticima (50% dušični oksidul, 0,5% sevofluran). Još uvijek nije ispitan utjecaj propofolske monoanestezije na pLTF.

Glede bazalnih respiracijskih varijabli u ovoj disertaciji, za oba anestetika pokazano je da smanjuju bazalnu frekvenciju disanja (35 udisaja/min u štakora anesteziranih uretanom, odnosno 42 udisaja/min u onih anesteziranih propofolom). Normalne vrijednosti za budne štakore Sprague-Dawley su iznad 70 udisaja/min (112, 198). Iako donekle začuđuje niža frekvencija u uretanskoj skupini, ona je u skladu s nekim istraživanjima pLTF na istom modelu anesteziranoga, vagotomiranog, paraliziranog i mehanički ventiliranoga štakora, gdje su čak izmjerene i niže frekvencije (48, 51, 52, 94), dok većina studija uopće ne navodi

bazalnu frekvenciju, već samo opisuje postojanje ili izostanak frekvencijskog pLTF (tablica 5). Zaključak je da anestetici vrše značajni depresivni učinak na frekvenciju izbijanja freničkoga živca u usporedbi s neanesteziranim ili budnim životinjama.

K tome, mnogi anestetici, posebice hlapljivi, deprimiraju bazalnu aktivnost freničkoga živca što može dovesti do apneje (139, 199). Međutim, u ovoj disertaciji propofol je, pri ovakvom doziranju u štakora, sačuvao bazalnu aktivnost freničkoga živca, te HVR u svih 5 hipoksijskih epizoda.

Depresija respiracijskih neurona od strane anestetika obično se pripisuje pojačanim inhibicijskim sinaptičkim interakcijama (157, 191). Međutim, točan mehanizam djelovanja propofola na disanje nije posve jasan. Čini se da su GABA<sub>A</sub> receptori vjerojatno mjesto djelovanja tog anestetika (118, 120). Međutim, propofol dolazi u interakciju i s nekoliko drugih neurotransmiterskih receptora i ionskih kanala unutar perifernoga živčanog sustava i SŽS-a. Izgleda da potencira glicinske receptore, inhibira nAChRs, glutamatne NMDA i AMPA receptore, kao i L-tip Ca<sup>2+</sup>-kanala i Na<sup>+</sup> kanale ovisne o naponu (128). Nadalje, postoje određeni dokazi i za interakciju propofola s 5-HT sustavom, pa se propofol često smatra antiserotoninskim ili barem anestetikom koji modulira 5-HT sustav (122, 125). Podaci iz prvog dijela studije pokazuju da je propofol oslabio pLTF, ali bez odgovora o mogućem mehanizmu. Moguće je tek iznijeti neke pretpostavke temeljene na poznatim činjenicama. Za pLTF induciran AIH, u štakora je dokazano da je ovisan o serotoninskom mehanizmu (48). Nadalje, aktivacija specifičnih 5-HT<sub>2</sub> receptora (52, 93) potrebna je za ekspresiju pLTF. K tome, nužna je aktivacija spinalnih 5-HT receptora, kao i sinteza BDNF ovisna o serotoninu u neposrednoj blizini freničkih motoneurona u ventralnim segmentima vratne leđne moždine (48, 93, 94, 99). Poznato je da propofolska anestezija inhibira LTP i sinaptičku plastičnost u procesima memorije i to najvjerojatnije putem interakcije s GABA<sub>A</sub> sustavom (129, 130), pa bi teorijski dolazilo u obzir i slično djelovanje na respiracijsku plastičnost, tj. pLTF.

U zaključku, dobiveni podaci pokazuju da je propofol ugasio pLTF, ali mehanizam još uvijek ostaje nerazjašnjen. Može se spekulirati o kombiniranim učincima propofola na sinaptičku plastičnost, interakciji s 5-HT receptorima u kontroli disanja, kao i neizravnim učincima putem kvalitativnih i kvantitativnih promjena HVR (poglavlje 6.1.2.).

### 6.1.2. Dugoročna facilitacija freničkoga živca i hipoksijski ventilacijski odgovor

Intermitentna hipoksija utječe na hipoksijski ventilacijski kontrolni sustav, te bi obrazac hipoksijske stimulacije mogao biti kritična odrednica respiracijske plastičnosti (112).

U ovoj studiji korišteno je 5 hipoksijskih epizoda kao fiziološki podražaj koji će potaknuti respiracijsku plastičnost. Tijekom prve hipoksijske epizode u štakora anestetiziranih propofolom amplituda freničkoga živca značajno je povećana u odnosu na bazalne vrijednosti ( $106,8 \pm 16,9\%$ ). Vidljivo je da propofol nije ugasio HVR, iako promjena nije bila izražena kao u štakora anestetiziranih uretanom ( $172,0 \pm 15,8\%$ ), te je postojala značajna razlika u veličini HVR između ta dva anestetika. HVR se tijekom prve hipoksije u ovoj studiji očitovao u skupini P isključivo povećanjem amplitude freničkoga živca (ekvivalent povećanog  $V_t$ ), a bez povećanja frekvencije disanja, što se čini zanimljivim i novim podatkom. U uretanskoj skupini, akutni HVR tijekom prve hipoksijske epizode očitovao se na klasičan način, tj. minutna ventilacija povećana je i zbog povećanja amplitude i frekvencije disanja.

U *tablici 5* prikazane su studije u kojima se uspoređuje veličina pLTF (u postocima), u zavisnosti od veličine HVR (1. hipoksijska epizoda).

Prijašnje studije pokazale su korelaciju između povećanja PNA za vrijeme prve hipoksijske epizode AIH i veličine postignutog pLTF 60 minuta posthipoksijski. Fuller i suradnici (33) proučavali su odnos između integrirane PNA za vrijeme prve od 3 hipoksijske epizode i ekspresije LTF, te su našli da je promjena PNA za vrijeme hipoksije pokazivala

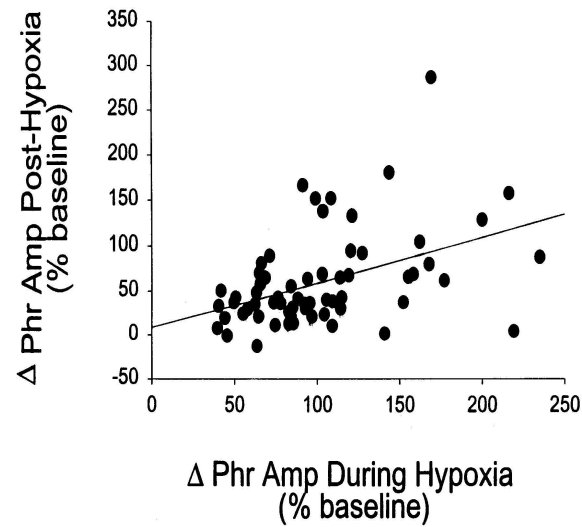
slabu, ali značajnu korelaciju s promjenama PNA 60 minuta nakon hipoksije ( $r^2 = 0,18$ ,  $P < 0,05$ ) (slika 16).

Smatra se da bi postignuta amplituda za vrijeme hipoksije mogla biti najjači predskazivajući čimbenik za amplitudni pLTF (40), pa bi životinje sa snažnijim HVR-om trebale imati i snažniji pLTF. To se, čak, dade izraziti jednadžbom:

$$\text{Frenički LTF} = -61.595 + (1.8 \times \text{bazalna frekvencija disanja}) + (2.27 \times \text{frekvencijski LTF}) + (0.31 \times \text{porast amplitude u hipoksiji})$$

Ukoliko uvrstimo brojeve iz ove studije u jednadžbu, ili izračunamo amplitudu freničkoga LTF na temelju dolje navedene slike odnosa HVR i amplitude LTF (slika 16), frenički LTF u životinja anesteziranih propofolom trebao bi biti najmanje 40-50%.

U zaključku, amplituda freničkoga LTF korelira dobro s PNA tijekom hipoksije, ali ne i s hipoksijskom razinom  $P_aO_2$ . To ukazuje na činjenicu da hipoksija bez adekvatnog HVR ne bi trebala biti dostatni podražaj za indukciju pLTF. U ovoj studiji tijekom propofolske anestezije HVR je bio očuvan u svih 5 hipoksijskih epizoda protokola AIH. Veličina postignutog HVR trebala bi biti u svakom slučaju dostatna da potakne pLTF 60 minuta poslije kraja zadnje hipoksijske epizode (on bi trebao iznositi barem 40%), a to se nije dogodilo – pLTF bio je ugašen pri propofolskoj anesteziji, unatoč vrlo jasno izraženom HVR.



**Slika 16. Odnos integrirane freničke amplitude za vrijeme prve od tri hipoksijske epizode i izražavanja pLTF 60 minuta nakon hipoksije.**

Promjena u integriranoj freničkoj amplitudi tijekom hipoksije pokazivala je slabu, ali značajnu korelaciju s promjenom freničke amplitude 60 minuta nakon AIH ( $r^2=0,18$ ;  $P<0.05$ ). Obje promjene izražene su kao % bazalnih vrijednosti (preuzeto iz Fuller et al., *Resp Physiol* 2000; 121: 135-46. – SLIKA KAO U IZVORNIKU)

**Tablica 5. Ovisnost veličine pLTF o hipoksijskom ventilacijskom odgovoru (amplituda tijekom 1. hipoksijske epizode);**

n/a = podaci nisu dostupni, f = frekvencija izbijanja frenikusa ( $\text{min}^{-1}$ ), T60 = 60 minuta nakon epizodne hipoksije,  $\uparrow$  = povećanje, NS = nesignifikantno, 5-CT = 5-karboksamidotriptamin, CRL/S = soj štakora (Charles River Laboratories/Sasco), H = soj štakora (Harlan), dAIH = dnevna akutna intermitentna hipoksija, CDR = cervikalna dorzalna rizotomija, MK-801 = dizocilpin, MnTMPyP = manganov (III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirin pentaklorid («hvatač» superoksidnih aniona).

Napomena: gdje je više skupina u eksperimentu, podaci vezani za pLTF odnose se na kontrolnu skupinu.

AUTOR godina (ref)	AMPLITUDA HVR (%)	AMPLITUDA pLTF (%)	FREKVENCIJSKI pLTF (bazalna f vs. f T60)	NAPOMENE
<i>Bach&amp;Mitchell 1996 (48)</i>	n/a	63±17%	36 vs 45/min, $P<0,05$	kontrola vs. metizergid
<i>Kinkead i sur. 1998 (51)</i>	Oko 100%	37 ± 6%	Bazalna 34/min, NS $\uparrow$	3 skupine: kontrola, CDR, CDR+ ketanserin
<i>Kinkead&amp;Mitchell 1999 (52)</i>	oko 100%	37%	31-36/min, nije bilo $\uparrow$	4 skupine: kontrola, «sham», ketanserin, 5-CT
<i>Baker&amp;Mitchell 2000 (37)</i>	n/a	78±15	$\uparrow 11\pm 2$ (bazalna fr?)	
<i>Bach&amp;Mitchell 2000 (49)</i>	109±17	46±5	mali, ali značajni $\uparrow$ (bazalna f?)	učinci jednostrane frenikotomije
<i>Fuller i sur. 2001a(53)</i>	90-130%	75±12(CRL/S) 51±8 (H)	H 47±2 CRL/S 46±3 NS $\uparrow$	Utjecaj soja i kolonije štakora
<i>Fuller i sur. 2001B (50)</i>	101±15	57±11	NS $\uparrow$ (bazalna f?)	Ketanserin
<i>Zabka i sur. 2001 (169)</i>	87±17 (mladi) 89±15 (stari)	56±14(mladi) 25±8 (stari)	NS $\uparrow$ (bazalna f?)	Razlike u pLTF-u s obzirom na dob
<i>Baker-Herman &amp; Mitchell 2002 (94)</i>	111±16	78±15	36,2±1,3 vs, 42,5±1,5 ( $P<0,05$ )	4 skupine–podaci za kontrolnu
<i>Bavis&amp;Mitchell 2003 (73)</i>	87±11	44±10	NS $\uparrow$ (bazalna f?)	Kontrola i karotidna denervacija
<i>Fuller 2005 (69)</i>	80-120	Oko 140	48±1 povećala se za 4±2/min, NS	+ LTF jezičnih mišića
<i>McGuire i sur. 2005.(98)</i>	189±15	Oko 35	45,5±1, povećala se za 4/min, $P<0,05$	2 skupine: iv. MK-801, kontrolna
<i>McGuire i sur. 2007.(178)</i>	134,3±13,9	38,8 ± 4,6	n/a	
<i>Dick i sur. 2007 (38)</i>	n/a	125	40±8 vs. 45±10	
<i>Golder&amp;Martinez2008 (177)</i>	93±14	Oko 50	39±3 vs. 39±4	podaci za vagotomirane štakore

<i>MacFarlane&amp;Mitchell 2008 (180)</i>	oko 110	93±12	oko 40/min, vs. oko 45/min, p<0,05	MnTMPyP i kontrolna grupa
<i>Wilkerson i sur. 2009.(183)</i>	110±14	18 ± 9 (kontrola) 37 ± 8 (dAIH)	36 ± 1 vs. 37 ± 1 (NS)	2 skupine: kontrola i dAIH (Brown Norway)

### 6.1.3. Tehnička razmatranja

#### 6.1.3.1. PROTOKOL AKUTNE INTERMITENTNE HIPOKSIJE - BROJ

##### HIPOKSIJSKIH EPIZODA

U ovoj studiji koristio se protokol AIH ( $FiO_2 = 9\%$ ) po obrascu 5 x 3 minute, između kojih je bilo 3 minute hiperoksije ( $FiO_2 = 50\%$ ), i s njim je postignut pLTF u uretanskoj skupini životinja.

Protokoli izazivanja pLTF-a mogu se, prema navodima iz literature, sastojati od raznog broja hipoksijskih epizoda, s različitim razinama  $F_iO_2$  (od 5-14%), i to u različitim vrsta (tablice 6 i 7). Neki protokoli bili su uspješni u izazivanju pLTF, dok ga drugi nisu uspjeli postići, posebice u ljudi. Problematika izazivanja pLTF u ljudi opisana je u poglavlju 3.3.1., a protokoli su prikazani u tablici 7. Međutim, je li pLTF postignut zbog odabira vrste AIH u raznim protokolima ili se rezultati razlikuju zbog razlike u vrstama, genetici, dobu ili spolu, nije posve jasno. Kao najbolji primjer gornjih tvrdnji je studija McGuirea i suradnika (112). U budnih štakora primjenjivali su intermitentne hipoksije i to na 3 razine (8, 10 i 12%  $O_2$ ), uz različiti broj hipoksijskih epizoda (3, 5, 10, 20, 72 epizode). Pet epizoda IH s 10%  $O_2$  dovelo je do vLTF, ali ne i 5 epizoda IH s 12% i 8%  $O_2$ . S druge strane, svega 3 epizode hipoksije s  $FiO_2$  12% sasvim su bile dostatne u nekim drugim istraživanjima za izazivanje freničkoga i hipoglosalnog LTF u anesteziranih, paraliziranih, vagotomiranih i mehanički ventiliranih (37, 48), ali ne i u spontano dišućih, anesteziranih štakora (65). Međutim, u gore navedenoj studiji McGuire i suradnika, kad se povećao broj hipoksijskih epizoda ( $FiO_2 = 12\%$ ) na 10, 20 ili čak 72, vLTF je uspješno izazvan i u budnih životinja. Autori naglašavaju

da više epizoda IH povećava učinkovitost izazivanja LTF u budnih životinja; međutim, s povećanjem broja hipoksija, nije se povećala i veličina LTF. Na temelju te studije, zaključuju da i razina hipoksije i broj hipoksijskih epizoda mogu utjecati na postizanje, održavanje i veličinu vLTF u budnih štakora. Autori smatraju da postoji razina hipoksije pri kojoj se najčešće izaziva LTF ( $\text{FiO}_2$  oko 10%). Ako je hipoksija preblaga ili preoštra, učinkovitost izazivanja LTF bit će manja. Iako ova studija donosi zanimljive rezultate u svezi s protokolom izazivanja LTF, ipak se provodila u budnih životinja, gdje je vjerojatnost izazivanja vLTF ipak manja. K tome, za napomenuti je da se u tom istraživanju koristila poikilokapnijska hipoksija, dok se u ovoj disertaciji i većini drugih istraživanja koristi izokapnijska hipoksija (25, 28, 33).

Osnovni model za proučavanje LTF je anestetizirani, paralizirani, vagotomirani i mehanički ventilirani štakor soja Sprague-Dawley. Iako takav model i nije najfiziološkiji, on omogućuje preciznu kontrolu plinova u arterijskoj krvi i uklanjanje mnogih zbunjujućih čimbenika, koji bi mogli utjecati na pojavu pLTF (25, 26, 28, 33). Također, postoje brojne studije na takvom modelu (*tablica 6*) i stoga su moguće adekvatne usporedbe odgovarajućih istraživanja. K tome, za razliku od kortikospinalnog lokomotornog sustava, smatra se da je organizacija respiracijske živčane kontrole disanja vrlo slična u glodavaca i ljudi, i uporaba štakorskog modela je opravdana u respiracijskim studijama (200). Stoga, razlike u izazivanju pLTF nisu uvjetovane samo protokolom IH, već i mnoštvom drugih čimbenika (vrsta, stanje budnosti, kao i eksperimentalna priprema – anestezija/bez anestezije, vagotomija/bez vagotomije, mehanička ventilacija/spontano disanje). Još jedna zanimljivost je da se frenički (i hipoglosalni) LTF uspio izazvati eksperimentalno, ne samo AIH-om i stimulacijom Heringova živca, nego čak i ponavljanim apnejama od 25 s (odvajanje štakora od respiratora), a intenzitet i mehanizam su bili isti kao u onoga pri IH. Kod tog oblika LTF, desaturacija nije bila velika ( $\text{SpO}_2$  oko 90%). Autori tog eksperimenta zaključuju da je pLTF jako osjetljiv za



obrazac, ali relativno neosjetljiv na težinu i trajanje hipoksije, tako dugo dok je ona intermitentna (180).

Smatra se čak da je važniji normoksijski (hiperoksijski) interval između epizoda AIH. Njegove granice nisu precizno određene, a navodi se da bi trebao biti veći od 0, a manji od 30 minuta (37, 41), a iz tablice 6 vidljivo je da u većine studija on iznosi 5 minuta, te da više autora primjenjuje hiperoksiju u odnosu na normoksiju u tom intervalu.

**Tablica 6.** Pregled najvažnijih studija na životinjama obzirom na protokol izazivanja freničkoga LTF

<b>AUTOR, godina (ref.)</b>	<b>AIH</b>	<b>FiO2 % hipoksija</b>	<b>OPORAVAK* (Trajanje, FiO<sub>2</sub>)</b>
Millhorn i sur. 1980 <sup>a</sup> (43)	5 x 2 min		5 minuta
Cao i sur. 1992 <sup>b</sup> (61)	2 minute		
Sokolowska&Pokorski 2006 (55)	5 x 1 min	14	3 min (21%)
Fregosi&Mitchell 1994 <sup>a</sup> (57)	5 x 2 min		5 minuta
Turner&Mitchell 1997 (27)	10 x 3 min	8-9	5 minuta (21%)
Mitchell i sur. 2001 (21)	a) 10 x 3 min b) 3 x 3 min	10 8	5 minuta (21%)
Hayashi i sur. 1993 <sup>a</sup> (47)	5 x 2 min		3 minuta
Bach&Mitchell 1996 (48)	3 x 5 min	10	5 min (50%)
Kinkead i sur. 1998 (51)	3 x 5 min	10	5 min (50%)
Kinkead&Mitchell 1999 (52)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Bach i sur. 1999 (41)	2-3 x 5 min	11	30 min (50%)
Janssen&Fregosi 2000 <sup>c</sup> (65)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Bach&Mitchell 2000 (49)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Baker&Mitchell 2000 (37)	3 x 3 min	11	5 min (50%)
Fuller i sur. 2001 (50)	3 x 5 min	12-14	5 min (50%)
Fuller i sur. 2001 (53)	3 x 5 min	11-12	5 min (50%)
Zabka i sur. 2001 (177)	3 x 5 min	12-13	5 min (50%)
Zabka i sur. 2001 (178)	3 x 5 min	11 –12	5 min (50%)
Ling i sur. 2001 <sup>d</sup> (29)	3 x 5 min	10 –15	5 min (50%)
Olson i sur. 2001 (62)	a) 5x3 min (izo) b) 5 x 5 min (izo) c) 5x5 (poikilo)	a) 8-9 b) 9 c) 11	2 min (50%) 5 min (21%) 5 min (21%)
Baker-Herman&Mitchell 2002 (94)	3x5 min	11	5 min (50%)
McGuire et al 2002 <sup>c</sup> (112)	a) 5 x 5 min (poikilo) b) 3x5, 5x5, 10x5, 20x5, 72x5 min (poikilo)	a) 8; 10; 12 b) 12	5 min (21%)
Peng&Prabhakar 2003 <sup>d</sup> (103)	10 x 15 sec	12	5 min (50 %)
Zabka i sur. 2003 <sup>d</sup> (110)	3 x 5 min	11-12	5 min (50%)
McGuire i sur. 2003 <sup>d</sup> (64)	a) 5 x 5 min b) 10 x 5 min	12	5 min (21%)
McGuire i sur.2004 <sup>d</sup> (63)	5 x 5 min (poikilo)	10	5 min (21%)
McKay i sur. 2004 (167)	3 x 5 min	5	5 min (21%)
McGuire&Ling 2005 <sup>d,f</sup> (54)	a) 5x5 min b) 10 x 5 min (poikilo)	12	5 min (21%)
Zabka i sur. 2005 (171)	3 x 5 min	11-12	5 min (50%)
Golder&Mitchell 2005 <sup>d,g</sup> (172)	3 x 5 min	10 –12	5 min (50%)

Fuller 2005 (69)	5 x 3 min	12-14	5 min (50%)
McGuire i sur. 2005 (98)	3x5 min	PaO <sub>2</sub> 30-45 mHg	5 min (50%)
Reeves i sur. 2006 (173)	3x5 min	0,10	5 min (50%)
Doperalski&Fuller 2006 (174)	5 x 3 min	12-13	5 min (21%)
Zabka i sur. 2006 (175)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Berner i sur. 2007 (176)	3 x 5 min	8	2 min (21%)
Golder&Martinez 2008 (177)	3 x 5 min	11-13	5 min (50%)
McGuire i sur. 2007 (178)	3 x 5 min	12	5 min (40%)
Neverova i sur. 2007 (179)	3x5 min	11	5 min (50%)
Reeves&Gozal 2007 (201)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Dick i sur. 2007 (38)	10 x 45 sec	8	5 min (100% )
MacFarlane&Mitchell 2008 (181)	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Mahamed&Mitchell <sup>h</sup> 2008 (180)	a) 3x5 min b) 3 ili 6 apneja	11	5 min (50%)
Terada i sur. 2008 (42)	5x5 min	10	5 min (21%)
McGuire i sur. 2008 (182) <sup>i</sup>	5 x 5 min (poikilo)	10	5 min (21%)
Toyama i sur. 2009 (56)	5 x 45 sec	10-15	5 min (50%)
Wilkerson&Mitchell 2009 (183) <sup>j</sup>	3 x 5 min	11	5 min (50%)
Ryan i sur. 2009 <sup>k</sup> (168)	3x3 min 8 x 3min	10	5 min (28%)
Cao i sur., 2009 <sup>l</sup> (184)	5 x 3 min	12	3 min (50%)
Hoffman i sur., 2009 <sup>m</sup> (186)	3 x 5 min	11	5 min (50%)

<sup>a</sup> LTF izazvan intermitentnom stimulacijom karotidnog živca, a ne intermitentnom hipoksijom

<sup>b</sup> Hipoksija definirana kao SpO<sub>2</sub> < 83%, a normoksija kao SpO<sub>2</sub> ≥ 93%; (nepoznat broj hipoksijskih epizoda i trajanje normoksije)

<sup>c</sup> pLTF se nije uspio izazvati

<sup>d</sup> Životinje pretretirane kroničnom intermitentnom hipoksijom, a potom ispitivan odgovor na AIH

<sup>e</sup> Eksperiment je istraživao utječe li težina hipoksije i broj hipoksijskih epizoda na pojavu LTF. LTF su izazvali hipoksija s 10% O<sub>2</sub>, a ne s 8% ili 12% O<sub>2</sub>. Također, LTF su izazvale 10, 20 i 72 epizode hipoksije, a ne 3 i 5 epizoda hipoksije!

<sup>f</sup> LTF nije izazvan u svih životinja

<sup>g</sup> model ozljede vratne leđne moždine

<sup>h</sup> uspoređen je nastanak LTF-a između klasične AIH i apneja trajanja 25 sekundi (životinje isključene s ventilatora). I protokoli s 3 i sa 6 apneičkih epizoda uspješno su inducirali LTF.

<sup>i</sup> utjecaj fragmentiranog spavanja na vLTF

<sup>j</sup> pretretman dnevnom akutnom intermitentnom hipoksijom (dAIH, 7 dana po 10 epizoda), a zatim promatran odgovor na AIH

<sup>k</sup> LTF genioglossusa zabilježen nakon 8, a ne nakon 3 hipoksijske epizode

<sup>l</sup> proučavao se LTF n. glossopharyngeusa

<sup>m</sup> intratekalno davanje adenozijskih A<sub>2</sub> antagonista

*izo = izokapnija, poikilo = poikilokapnija*

\* OPORAVAK se odnosi na normoksijski/hiperoksijski interval između sukcesivnih epizoda AIH; ukoliko je LTF izazvan električnim podraživanjem CSN-a, navodi se samo trajanje intervala u kojem se živac ne podražuje između epizoda podraživanja

**Tablica 7.** Pregled najvažnijih studija u raznih populacija ljudi s obzirom na protokol izazivanja LTF

AUTOR (godina, ref)	IH (broj x minuta)	FiO <sub>2</sub> % Hipoksija	NORMOKSIJA (FiO <sub>2</sub> = 21%)	napomena
<b>ZDRAVI LJUDI</b>				
McEvoy i sur. 1996 (77)	10 x 2 min	?	2 min	nema vLTF-a
Jordan i sur. 2002 (75)	10 x 2 min	9	2 min	nema ni vLTF-a, ni LTF-a GG
Morris&Gozal 2004 (76)	3 x 1 min	6-10	?	bez vLTF-a
Mateika i sur. 2004 (79)	8 x 4 min	8	5 min	nema vLTF-a
Morelli i sur. 2004. (78)	8 x 4 min.	8	5 min**	††
Harris i sur. 2006 (80)	8 x 4 min	8	5 min	vLTF dokazan, ali u nazočnosti hiperkapnije
Diep i sur. 2007 (202)	15 x 30 sec	6 (+ 5%CO <sub>2</sub> )	90 sec	nema vLTF-a (ni uz hiperkapniju)
Wadhwa i sur. 2008 (81)	8 x 4 min	8	†	Dokazan vLTF ali uz hiperkapniju
<b>ZDRAVI LJUDI TIJEKOM NON-REM SPAVANJA</b>				
Shkoukani i sur.2002 (85)	10 x 3 min	8	5 min	smanjen OGDPA
Babcock & Badr 1998 (203)	10 x 3 min	8	5 min	vLTF izazvan u 50% ispitanika („hrkači“)
Babcock i sur. 2003 (86)	10 x 3 min	8	5 min	vLTF, ali samo kod onih s IFL
Chowdhuri i sur. 2008 (83)	10 x 3 min	8	5 min	LTF genioglossusa, ali bez vLTF-a
Pierchalla i sur. 2008 (84)	15 x 69±14 sec	100% N <sub>2</sub> *	1 min	DOKAZAN vLTF
<b>BOLESNICI S OSA TIJEKOM NON-REM SPAVANJA</b>				
Aboubakr i sur. 2001 (82)	10 x 3 min	8	5 min	smanjenje OGDPA, nema vLTF-a
Khoddadeh i sur. 2006 (204)	8 x 4 min	8	5 min	nema vLTF-a
Rowley i sur. 2007 (205)	10 x 3 min	8	5 min	smanjenje OGDPA

\*daje se 100% N<sub>2</sub> toliko dugo dok SpO<sub>2</sub> ne padne na 84-85%

† Nadzirao se P<sub>ET</sub>O<sub>2</sub>. Udisao se 100% kisik dok se P<sub>ET</sub>O<sub>2</sub> nije vratio na normoksijske razine

\*\* 2 udaha 100% O<sub>2</sub>, a potom normoksija

†† uspoređivala se razlika između spolova u odgovoru na hiperkapniju, a nakon epizoda AIH (veći u muškaraca)

vLTF = ventilacijski LTF, LTF GG = LTF genioglossusa, OGP = otpor gornjeg dišnog puta, IFL = ograničenje inspiracijskog protoka

### 6.1.3.2. DAVANJE LIJEKOVA TIJEKOM EKSPERIMENTA

Poznato je i da bolni podražaji mogu također izmijeniti aktivnost freničkoga živca (206). U ovoj studiji sve su životinje bile premedicirane intravenski primijenjenim diklofenakom, kako bi se omogućila dodatna analgetska komponenta. Tehnika istraživanja neuralne kontrole disanja s pomoću analize aktivnosti freničkoga živca vrlo je specifična, te zahtijeva dosta visoku razinu kirurške stimulacije (traheotomija, veliki kirurški zahvat – disekcija dorzalnog vrata, kanulacija krvnih žila), a uz to je i dugotrajna. Propofolsku monoanesteziju je, stoga, jako teško provoditi u tim okolnostima, ali to je jedini način da se uspješno prouči djelovanje pojedinog anestetika na kontrolu disanja. Cilj je bio osigurati dodatnu analgetsku komponentu s tvari za koju se smatra da ne interferira s određivanjem PNA (davanje fentanila i sličnih tvari zasigurno bi dovelo do ugodnijeg i lakšeg održavanja anestezije, ali rezultate ne bi bilo moguće jednostavno tumačiti).

Mogući učinak diklofenaka na PNA i respiracijsku plastičnost, koliko nam je poznato, nije još istraživano. Za vrijeme pilot istraživanja zabilježeno je lakše vođenje propofolske anestezije u životinja premediciranih diklofenakom. Diklofenak je, stoga, prvo bio testiran u štakora anesteziranih uretanom, kao bi se utvrdilo da njegovo davanje ne utječe na dugoročnu facilitaciju freničkoga živca pri AIH, tj. nije bilo razlike u bazalnoj PNA, kao i u veličini pLTF između životinja koje su bile premedicirane diklofenakom i onih koje nisu.

Na temelju toga moglo se zaključiti da premedikacija diklofenakom nema učinka na bazalnu PNA, kao ni na nastanak i održavanje pLTF u modelu AIH, te je davan u objema skupinama životinja.

Diklofenak zasigurno ima i središnjih učinaka, barem što se tiče analgetskog djelovanja (207). On prodire u likvor vrlo brzo i njegove koncentracije ostaju tamo povišene nekoliko sati (208). Čini se da diklofenak može utjecati na razne ionske kanale (209), te

neizravno i na neke aspekte kontrole disanja (210). Međutim, kako je već naglašeno, nema izravnih dokaza da diklofenak na bilo koji način utječe na pLTF.

Iako se radi o različito dizajniranim studijama, u literaturi postoje više protokola doziranja intravenskog propofola u štakora, koje se kreću za bolus dozu od 7-20 mg/kg, a za trajnu infuziju od 0,33 – 1,33 mg/kg/min (192, 211-215). ED<sub>50</sub> za propofol u štakora iznosi 5,9 mg/kg za bolus dozu, odnosno oko 600-650 µg/kg/min za kontinuiranu infuziju (213, 216, 217). Tijekom istraživanja morale su se rabiti veće doze. U ovoj studiji, kao početna doza, korištena je bolus doza od 11,8 mg/kg, nakon koje je slijedila infuzija od 1-1,3 mg/kg/min, što odgovara otprilike 2 x ED<sub>50</sub> za propofol. Uz takvo doziranje životinje su bile kardiocirkulacijski stabilne. Doze su odabrane, osim prema podacima iz literature, i na temelju pilot studija i pokazale se se optimalnima pri velikom kirurškom zahvatu kakav je kirurgija freničkoga živca. Tijekom pilot studija (n = 15) točno se odredila ispravna doza propofola, koji se relativno rijetko koristi pri velikim kirurškim zahvatima u štakora. Pri manjim dozama propofola (1–1,5 x ED<sub>50</sub>), životinje nisu bile adekvatno anestezirane, a kirurški zahvat mogao se provoditi samo s ovdje korištenim dozama propofola. Za napomenuti je da su prva 2 pilot pokusa rađena čak i bez uporabe neuromišićnog relaksansa, upravo zato da bi procijenili dubinu anestezije i eventualno pomicanje životinje na bolni podražaj.

Navodim nekoliko protokola za doziranje propofola u štakora, uz već gore navedene respiracijske studije u soja Wistar, a isto tako i okružje u kojem se vršila primjena propofola. U nedavnoj studiji (213) istraživana je prostorna memorija u štakora nakon propofolske anestezije. Uvod u anesteziju bio je izofluran, a potom je održavana propofolom 60 mg/kg/h; potom je doziranje propofola kontrolirano na osnovu arterijskoga tlaka te se prosječna doza propofola kretala oko 36,6 mg/kg/h. Doza propofola bila je manja nego u ovoj disertaciji, ali životinje su disale spontano i nisu izvođeni kirurški zahvati. U istraživanju o utilizaciji

glukoze u mozgu u štakora korišteni su intravenski bolusi propofola od čak 20 mg/kg, da bi se prešlo na kontinuiranu infuziju u 3 različite doze, od kojih je najveća bila od 50 mg/kg/h (215). Carmichael i suradnici (211) istraživali su hemodinamiku u području splahnika štakora i potrošnju kisika u jetri s kontinuiranom infuzijom propofola od 72 mg/kg/h, što je vrlo blizu ovdje korištenoj dozi. Moguća nuspojava takvog doziranja propofola u štakora mogla bi biti relativno opterećenje životinja masnoćama. U preparatu propofola ima 10% sojinog ulja, 2,25% glicerola te 1,2 % lecitina iz jajeta (118, 119).

U zaključku, iako se doza propofola može činiti velikom, pogotovo u usporedbi s humanim protokolima, ona definitivno ima potvrdu u literaturi, a što je najvažnije valja istaknuti, da se ovdje radi o provedbi propofolske monoanestezije u sklopu velikog i dugotrajnog kirurškog zahvata.

Uporaba sevoflurana u ovoj studiji može donijeti određenu dozu kritike. No, valja naglasiti da su se u svim relevantnim studijama koje su obrađivale pLTF također rabili hlapljivi anestetici u početnoj fazi eksperimenata (37, 48, 52, 94). Sevofluran (zajedno s desfluranom i dušičnim oksidulom) slabo je topljivi plin, te se eliminacija sevoflurana smatra vrlo brzom (218). Unatoč tome, određen je period od najmanje 45 minuta nakon završetka kirurgije freničkoga živca, s ciljem ne samo dobivanja stabilnoga, bazalnog signala frenikusa na  $FiO_2=50\%$ , već da bi se omogućilo potpuno »ispiranje« sevoflurana iz organizma.

#### 6.1.3.3. ODRŽAVANJE HEMODINAMSKE STABILNOSTI I ACIDOBAZNE

##### RAVNOTEŽE

U ovom istraživanju vrijednosti arterijskoga tlaka uspješno su održavane i nikad se nisu smanjile više od 20% u odnosu na početne vrijednosti, osim pri hipoksiji u životinja anesteziranih propofolom (*tablica 2*). Vjerojatno se radi o sinergističkom učinku hipoksije i dobro poznatog negativnog inotropnog djelovanja propofola i sniženja ukupnoga perifernog otpora kojeg on uzrokuje (118). Nakon hipoksije arterijski se tlak održavao normalnim u odnosu na bazalne vrijednosti. Valja napomenuti i da ostale relevantne LTF-studije (48, 50,

52) izviješćuju o sličnom sniženju krvnog tlaka tijekom prve hipoksijske epizode, koji se kasnije tijekom eksperimenta normalizirao i nije utecao na respiracijski motorni odgovor.

Nadalje, sve su životinje održavale stabilnu acido-baznu ravnotežu (*tablica 1*) za vrijeme čitavog trajanja eksperimenta. Usprkos relativnoj dugotrajnosti istraživanja, nije bilo metaboličke acidoze, što znači da su tkiva i organi bili adekvatno perfundirani. Ukoliko bi hipotenzija bila značajan čimbenik za nastanak pLTF, zbog učinaka na tkivnu perfuziju, tad su obje skupine životinja trebale manifestirati pLTF.

#### 6.1.3.4. ODRŽAVANJE IZOKAPNIJE

Također je za napomenuti, da su vrijednosti  $P_aCO_2$  bile lagano snižene 60 minuta nakon završetka zadnje hipoksijske epizode (*tablica 1*), posebice u štakora anesteziranih uretanom. Međutim, te promjene nisu bile statistički značajne u odnosu na bazalne vrijednosti ( $P>0,05$ ), što potvrđuje činjenicu da promjene  $P_aCO_2$  nisu utjecale na pLTF.

## 6.2. STUDIJA 2

Glavni rezultat ovog dijela studije je da davanje 8-OHDPAT ne pojačava uvijek respiracijsku aktivnost u životinja anesteziranih propofolom, za razliku od stalnog i značajnog povećanja u životinja anesteziranih uretanom. To bi se moglo objasniti interakcijom propofola sa serotoninским sustavom, kojeg nema u slučaju uporabe uretana, po definiciji, inertnog anestetikom. U zaključku, 8-OHDPAT agonist 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>7</sub> receptora, vrlo je pogodan u uklanjanju apneje nakon davanja opioida i uretana, ali uz nekonzistentne rezultate tijekom propofolske anestezije u štakora.

### 6.2.1. Serotonin u kontroli disanja

Serotonin je neurotransmiter u SŽS-u, ali i važan neuromodulator u kontroli disanja, posebice glede ritma disanja (219, 220). U sisavaca, neuroni što proizvode 5-HT locirani su



blizu sredine moždanog debla (89), odakle šalju brojne projekcije, te djeluje na brojne pre- i postsinaptičke podvrste receptora (92, 164). Stoga, ne čudi da se 5-HT danas smatra upletenim u sinaptičku plastičnost (vidi poglavlje 3.3.2.), spavanje, bol, disanje, termoregulaciju, migrenske glavobolje, depresiju, sindrom iznenadne smrti dojenčeta (SIDS) (89).

Za 5-HT je poznato da je važan modulator respiracijskoga ritma, međutim, studije o učincima 5-HT na disanje nisu donijele konzistentne rezultate, bilo zbog metodoloških razlika, životinjske vrste ili veličine primijenjene doze. To bi se moglo objasniti i izražavanjem raznih podvrsta 5-HT receptora na respiracijskim neuronima (161). Aktivacija 5-HT<sub>1A</sub> receptora uglavnom je imala pozitivni učinak na poremećenu funkciju disanja (198, 221), a ta je činjenica korištena za liječenje središnjih respiracijskih poremećaja, poput apneuze ili apneje (222). Činjenica da mnogi anestetici dolaze u interakciju s 5-HT sustavom, mogla bi pridonijeti objašnjenju promjena ritma i obrasca disanja tijekom anestezije.

#### 6.2.1.1. 5-HT<sub>1A</sub> RECEPTORI

Ta vrsta 5-HT receptora vrlo je dobro proučena. U štakora ti receptori imaju visoki stupanj homolognosti s ljudskim (89%), te su najrašireniji od svih 5-HT receptora (92). U većim količinama nalaze se u hipokampusu, nekim kortikalnim područjima, u mezencefaličkim raphe jezgrama, te u područjima mozga važnima za disanje. Ti receptori smješteni su pre-, post-, i ekstrasinaptički. Na presinaptičkom dijelu 5-HT<sub>1A</sub> receptor djeluje kao klasičan «autoreceptor», tj. inhibira presinaptičko oslobađanje neurotransmitera i slabi sinaptički prijenos. Postsinaptički, taj receptor djeluje tako što dovodi do hiperpolarizacije membrane. Stoga, ne čudi da stimulacija tih receptora može dovesti do raznih odgovora. Ipak, najčešće je stimulacija 5-HT<sub>1A</sub> receptora povezana s promjenama ponašanja (anksioliza) i hipotenzivnim odgovorom (središnjim) (89, 92, 164). Nastupa navodno i analgezija (222).

Jedan od najčešće sustavno primijenjenih selektivnih agonista tih receptora je upravo 8-OHDPAT. Obzirom na nekoliko važnih polaznih pretpostavki, odlučili smo se u ovoj disertaciji, upravo putem njegove primjene, primarno istražiti moguću interakciju serotoninskih 5-HT<sub>1A</sub> receptora i propofolske monoanestezije. Propofol se, unatoč određenih dvojbi, smatra anti-5HT lijekom; stoga se izbor lijekova u istraživanju mogao suziti primarno na lijekove koji imaju agonistički učinak na aktivnost 5-HT receptora; primjerice, davanje ketanserina koji je 5-HT antagonist vjerojatno bi još više zakompliciralo interpretaciju rezultata (radilo bi se o kombinaciji dvaju antagonista). Dodatni problem je neselektivnost lijekova koji djeluju na 5-HT receptore i njihova interakcija s drugim fiziološkim funkcijama osim disanja (primjerice halucinogeno djelovanje, učinak na ponašanje i sl.) (89, 92). Budući da već postoji objavljen rad iz ovog Laboratorija o djelovanju 8-OHDPAT na bazalnu aktivnost freničkoga živca, u životinja anesteziranih uretanom (161), rezultati drugog dijela disertacije su, zapravo, logičan nastavak postojećih istraživanja o interakciji anestetika i 5-HT u kontroli disanja, te je uporaba ovog lijeka u životinja anesteziranih propofolom donijela nova, zanimljiva saznanja o mogućoj interakciji propofola sa selektivnim 5-HT<sub>1A</sub> receptorom, posebice glede eventualnog farmakoterapijskog djelovanju na apneju.

### *6.2.2. Apneja izazvana anestheticima*

Anestetici, hlapljivi ili intravenski, mijenjaju obrazac (ritam, frekvenciju i dubinu) disanja pri klinički primjenjivanim koncentracijama (131, 155, 191). Propofol dovodi do respiracijske depresije ovisne o dozi, s apnejom koja se javlja u 25 to 35% bolesnika nakon standardne indukcijske doze, a obično joj prethode značajno smanjenje respiracijskoga volumena i tahipneja (118, 223).

U ovoj studiji u 40% životinja anesteziranih propofolom nije došlo do povećanja aktivnosti freničkoga živca nakon intravenske primjene 8-OHDPAT. U studiji Valić i

suradnika (161) (*slika 10*), gdje se koristila uretanska anestezija, sve su ispitivane životinje odgovorile povećanjem PNA u istom eksperimentalnom okruženju. Autori su koristili raspon doza 8-OH DPAT od 25 do 100 µg/kg iv, ali čak i po najnižem obrascu doziranja, imali su uvjerljivo povećanje PNA. Možebitni oslabljeni odgovor u životinja anesteziranih propofolom mogao bi se objasniti interakcijom propofola s 5-HT sustavom u kontroli disanja, ali opet na temelju ove studije ne postoje sigurni dokazi za to. S druge strane, hipotenzivni odgovor na 8-OHDPAT bio je jednak u obje studije (sniženje krvnoga tlaka od 26,4% u životinja anesteziranih propofolom, a 27% u životinja anesteziranih uretanom).

Apneja nakon davanja anestetika je ozbiljan klinički problem, te često ne odgovara na farmakoterapijske pokušaje (219). Agonist 5-HT<sub>1A</sub> receptora 8-OHDPAT uspješno je uklonio apneju nakon davanja opioida u štakora, ali ne i analgetsko djelovanje (224). Međutim, taj lijek je uklonio i apneju nakon dizocilpina (NMDA antagonist, antipsihotik) (221), potom nakon barbiturata i ketamina u mačaka (225), te je popravio respiracijsku depresiju nakon poremećaja kralježnične moždine (198). Smatra se stoga da je pozitivan učinak agonista 5-HT<sub>1A</sub> receptora na poremećenu respiracijsku funkciju opći fenomen, a nije ograničen primjerice na predoziranje opioidima. Osim djelovanja na 5-HT<sub>1A</sub> receptor, danas se za 8-OHDPAT zna da djeluje i na 5-HT<sub>7</sub> receptore, također važne u procesu disanja (219).

U zaključku, poremećaji disanja zbog zatajenja respiracijskih centara, nisu rijetki. Obično se javljaju nakon plućnih i srčanih bolesti, kraniotraume, moždanih upalnih procesa, ali i nakon degenerativnih bolesti mozga, pri alkoholizmu i dubokoj anesteziji, te se na njih može vrlo teško djelovati. Manipulacijom određenih signalnih putova, kao što je primjerice djelovanje na 5-HT receptore, moći će se i farmakoterapijski djelovati na takve poremećaje disanja.

### 6.3. ZNANSTVENI DOPRINOS I KLINIČKE IMPLIKACIJE

Dugoročna facilitacija disanja predstavlja oblik respiracijske plastičnosti koji se očituje progresivnim pojačanjem disanja, nastalim nakon izlaganja kratkotrajnim ponavljanim epizodama hipoksije (25, 26). Poput mnogih ostalih oblika neuroplastičnosti, pLTF ovisi o obrascu stimulacije; potiče ga intermitentna, ali ne i trajna hipoksija sličnoga kumulativnog trajanja (25, 26, 102). Funkcionalni značaj LTF nije posve jasan, a moguće uloge su stabilizacija disanja za vrijeme spavanja, kao sredstvo uklanjanja respiracijske depresije za vrijeme hipoksije, a možda je ona čak i znatno širi fiziološki mehanizam koji sudjeluje doživotno u adaptaciji respiracijskoga motornog kontrolnog sustava. Bez obzira na ulogu, sposobnost izražavanja LTF dala bi se terapijski iskoristiti u bolestima gdje je poremećena kontrola ventilacije (33).

Dosadašnja istraživanja tog fenomena provedena su u anestetiziranih ili budnih životinja. U anestetiziranih životinja, LTF se očituje pojačanom aktivnošću freničkoga živca (pLTF) koji inervira najveći inspiracijski mišić sisavaca-ošit, ili pojačanom aktivnošću n. hypoglossusa koji inervira mišiće gornjeg dišnog puta (hipoglosalni LTF) (40, 48). Većina dosadašnjih studija u anestetiziranih životinja provedena je u uretanskoj anesteziji, dok utjecaj drugih anestetika na pLTF do sada nije istražen. Mehanizam djelovanja anestetika na središnju kontrolu disanja, pa tako i na respiracijsku plastičnost, nije poznat. Novija istraživanja ukazala su na mogući antiserotoninski učinak propofola, primarno u sprječavanju poslijeoperacijske mučnine i povraćanja (122-128). Kako je poznato da 5-HT utječe na nastanak pLTF (48, 50), ova disertacija istražila je učinak monoanestezije propofolom na pLTF u modelu AIH, te moguću interakciju propofola s 5-HT sustavom. Rezultati pokazuju da uz anesteziju propofolom dolazi do slabljenja pLTF, a to bi moglo biti od praktičnog značaja u bolesnika koji se podvrgavaju propofolskoj anesteziji, a ovisi o respiracijskoj plastičnosti.

Poznato je da se intermitentne hipoksije pojavljuju u nekim patofiziološkim stanjima. Primjerice, OSA je karakterizirana ponavljanim hipoksijama tijekom spavanja i zatvaranjem gornjega dišnog puta (226, 227). Postoje dokazi da bi vLTF mogla imati znakovitu ulogu pri OSA, i to kao koristan čimbenik za održavanje respiracijske homeostaze tijekom spavanja (87, 88). Ako prihvatimo hipotezu da je LTF stabilizirajući, kompenzacijski mehanizam koji štiti od ponavljanih hipoksija, tada se očekuje da će čimbenici koji slabe LTF ubrzati nastanak OSA, ali i svih drugih patofizioloških stanja koje ovise o respiracijskoj plastičnosti. Postoji široki spektar takvih stanja u klinici, a kao najvažniji navode se ozljede živaca, posebice nakon ozljeda kralježnične moždine (115, 172), SIDS (228), kronična opstruktivna bolest pluća (88), te neke neurološke bolesti, kao što je parkinsonizam i neurodegenerativne bolesti (amiotrofička lateralna skleroza) (229). U zadnje vrijeme postoji sve više saznanja o staničnim/sinaptičkim mehanizmima pLTF, čime bi se mogao poboljšati pristup liječenju gore navedenih teških ventilacijskih bolesti (102).

Iako nisu izravno povezani s ciljevima i interpretacijom dobijenih rezultata ove disertacije, zbog velike kliničke i praktične važnosti u daljnjem tijeku rasprave će se detaljnije naglasiti mogući utjecaj poznavanja patofiziologije pLTF u bolesnika s OSA i ozljedom kralježnične moždine. Poznavanje mehanizama pLTF i interakcije određenih anestetika s njenom pojavom, moglo bi biti od velike pomoći u uvođenju posve novih terapijskih mogućnosti. U novije vrijeme uviđa se iznenađujuće visoka prevalencija OSA u općoj populaciji (između 3 i 9%), a u određenim podskupinama taj je udio znatno veći; starija dob, muški spol, pretilost, obiteljska anamneza, menopauza, te pušenje cigareta i uživanje alkohola (230, 231). Klinički, dokazana je snažna povezanost OSA s mnogim perioperacijskim komplikacijama u anesteziji (227, 231, 232). S druge strane, ozljede kralježnične moždine veliki su terapijski problem u jedinicama intenzivnog liječenja, pogotovo ako su praćene respiracijskim zatajenjem (233).

### 6.3.1. Povezanost opstruktivske apneje tijekom spavanja (OSA) i freničke dugoročne facilitacije

OSA je skup simptoma koji nastaju zbog epizodne opstrukcije faringealnoga dišnog puta za vrijeme spavanja i pridružene noćne hipoksemije (226, 227). Postoji sve više dokaza da su neurokognitivni, upalni i kardiovaskularni simptomi koji obilježavaju sindrom OSA povezani s podražajem IH (88).

Budući da je IH glavno obilježje OSA, spekulira se da bi vLTF mogao predstavljati oblik fiziološke kompenzacije, koji bi dovodio do respiracijske stabilnosti tijekom spavanja. Smatra se da bi LTF mogao ograničiti pojavu apneja u osoba koje još nisu dosegle kliničke kriterije za dijagnozu OSA (AHI index < 5) (88). To može biti od praktičnog značaja i u anesteziologiji. Propofol se danas koristi vrlo često i u bolesnika koji boluju od OSA, a mogao bi dovesti do znakovitog pogoršanja kliničkih simptoma.

Međutim, iako gornja hipoteza izgleda privlačna, situacija oko povezanosti LTF i OSA nije ni izbliza tako jednostavna. Nema izravnog dokaza da su ta dva fenomena povezana. U najnovijem preglednom članku (28), autori daju dva scenarija o povezanosti LTF i OSA. Moguća je stabilizirajuća uloga LTF, ali i obrnuto, postojanje LTF može čak i poremetiti stabilnost disanja u bolesnika s OSA. Nedoumice uglavnom postoje stoga što niti jedna kontrolirana studija nije pronašla da izlaganje IH smanjuje broj ili težinu apnejičkih epizoda u ljudi, pa je moguća uloga LTF gornjeg dišnog puta u smanjenju apneja pri OSA dokazana neizravnim putevima, tj. studijama na pokusnim životinjama. Prevalencija OSA je znatno veća u muškaraca u odnosu na žene, kao i u starijih ljudi u odnosu na mlađe (234-236), pa se nameće zaključak da bi LTF gornjeg dišnog puta bio veći u žena, te u mlađih. Studije na životinjama to su uglavnom i potvrdile (110, 169, 170). Respiracijski LTF veći je primjerice u 1-mjesečnih nego u 2-mjesečnih štakora (54), a znatno je slabije izražen u ženki (110). To je analogno stanju u ljudi, gdje prevalencija OSA iznosi 1% u mladim muškaraca, a

zatim doseže i do 10% u dobi 40-70 godina, dok je u žena učestalost OSA vrlo rijetka do menopauze (234).

Također, LTF ovisi i o spolnim hormonima. U muških štakora gonadektomija i starenje znatno su umanjile i pLTF i hipoglosalni LTF u muških štakora, a normaliziralo ga je davanje testosterona (175). U ženskih životinja LTF ovisi o estrogenskom ciklusu i najjači je u sredovječnih plodnih ženki (110). Međutim, u ljudi nije nađena razlika u pojavi vLTF između mladih muškaraca i žena u budnom stanju (81). Pobornici drugog scenarija po kojem LTF pojačava respiracijsku nestabilnost tijekom epizoda OSA imaju slijedeće argumente. Česta IH tijekom noći dovodi do LTF gornjega dišnog puta, ali i do snažnog vLTF i progresivne augmentacije HVR. Naglo nastupa hipokapnija i posljedična centralna apneja, te zapravo po takvom scenariju LTF i dalje pogoršava OSA (28). Dodatni čimbenik može biti i to što nakon dugotrajnog izlaganja teškoj hipoksiji može, prema nekim autorima, nastupiti i poremećaj funkcije mišića gornjeg dišnog puta (237), što još više pogoršava kliničku sliku OSA.

U svezi terapijskog djelovanja, uz sve detaljnije upoznavanje fenomena LTF, postoji nekoliko mogućnosti. Jedna od njih je izlaganje bolesnika kroničnoj intermitentnoj hipoksiji. Za razliku od kratkog izlaganja IH, CIH, međutim, može pridonositi morbiditetu, nije bezopasna metoda, te dovodi do ozbiljnih nuspojava poput sustavne hipertenzije (238), apoptoze u hipokampusu, smetnji učenja (239), pa bi trebalo koristiti manje invazivne protokole. Među novijim pristupima navodi se i rutinsko dnevno izlaganje AIH (dAIH) (183), čime bi se smanjili noćni simptomi OSA. Dolazi u obzir farmakološko djelovanje analozima BDNF i/ili agonistima adenozijskih  $A_{2a}$  receptora (99, 240), o čemu se raspravlja u slijedećem poglavlju.

U zaključku, povezanost između OSA, intermitentne hipoksije i LTF, te promjena u genomskom, proteomskom i fenotipskom izražavanju nije u potpunosti istražena. OSA je

nazočna isključivo tijekom spavanja, te je zasigurno barem djelomično neuralnog mehanizma. S druge strane, LTF u ljudi vrlo se teško dokazuje, a dvojbeno je može li LTF mišića gornjeg dišnog puta ukloniti mehanička ograničenja u održavanju gornjega dišnog puta (28). Ryan i suradnici smatraju da su optimalni eksperimentalni uvjeti za proučavanje pLTF zapravo vrlo loši eksperimentalni uvjeti za proučavanje gornjega dišnog puta, jer je pokazano da je refleksni motorni odgovor gornjega dišnog puta na negativni tlak značajno smanjen u paraliziranih, ventiliranih štakora, ali je jasno nazočan u anestetiziranih, ali spontano dišućih životinja (168). Očito je da je potrebno postaviti u budućnosti dobar animalni model za proučavanje OSA (88).

### *6.3.2. Respiracijsko zatajenje nakon ozljeda kralježnične moždine*

Visoke ozljede kralježnične moždine predstavljaju velik terapijski problem u jedinicama intenzivnog liječenja. Oko 2/3 bolesnika ima razne dišne komplikacije, 40% bolesnika može biti ovisno o respiratoru, a odvajanje od respiratora jako je teško (233).

Detaljnije poznavanje staničnih mehanizama pLTF može pomoći u razvoju novih terapijskih mogućnosti u slučajevima respiracijskoga zatajenja nakon oštećenja kralježnične moždine. Ozljeda vratnog dijela kralježnične moždine u tom je smislu najbolje proučeni eksperimentalni model, koji bi se mogao primjenjivati i pri kroničnim neurološkim bolestima sa smetnjama disanja (172).

Patofiziološki, u većini slučajeva ozljeda moždine je nepotpuna, što omogućuje djelomični oporavak respiracijske motorne funkcije, a zbog spontane plastičnosti u pošteđenim spinalnim sinaptičkim putovima (241). Nakon akutnih terapijskih intervencija (stabilizacija kralježnice, eventualna endotrahealna intubacija, traheotomija) u daljnjem tijeku liječenja, ipak malo je učinkovitih terapijskih mogućnosti (242, 243). Zatajenje disanja glavni je uzrok smrtnosti, a mogućnost spontanog oporavka vrlo je ograničena. Međutim, ona ipak



postoji, a najbolje upoznati fenomen je fenomen ukriženih frenikusa (engl. crossed phrenic phenomenon, CPP) (241). U štakora taj put zapravo je monosinaptički spoj koji se sastoji od bulbospinalnih aksona koji idu obostrano iz VRG, a projiciraju se niz leđnu moždinu kontralateralno od mjesta hemisekcije, a u leđnoj moždini nastaje opet dekusacija i sinapsa na frenički motoneuron. Na taj način nastupa pojačano sinaptičko izbijanje inače funkcijski »mirnih« putova (241, 242). Glavna ideja je da bi se taj fenomen u bolesnika s ozljedom kralježnične moždine mogao potaknuti upravo intermitentnom hipoksijom (242).

Međutim, CPP je ipak vrlo spor mehanizam i ne može posve oporaviti disajnu funkciju. Nađeno je da AIH dovodi do pLTF u štakora s ozljedom vratne leđne moždine tek 4-8 tjedana nakon hemisekcije, ali ne i 2 tjedna poslije. Izostanak pLTF u ranijim fazama nastao je zbog manjka 5-HT u okolini freničkog motoneurona. Vremenom se sadržaj 5-HT povećao i doveo do pLTF putem 5-HT<sub>2A</sub> receptora (172).

Stoga su posve jasni pokušaji da se respiracijski motorni oporavak nakon tih ozljeda pokuša ubrzati jačanjem spinalnih sinapsi putem IH, odnosno s pomoću pLTF. AIH potiče funkcijski oporavak respiracijskoga motornog odgovora ispod razine lezije, i to aktivacijom neuroplastičnosti ovisne o serotoninu. Te intervencije vjerojatno su prikladne u kroničnoj fazi bolesti, kad su iscrpljene sve mogućnosti spontanog oporavka (242, 243).

Vrlo je zanimljivo i farmakološko djelovanje na indukciju pLTF nakon ozljeda moždine. Pokazalo se da je BDNF apliciran u područje moždine dostatan za indukciju pLTF (99). Međutim, davanje takvih proteina može biti povezano s raznim problemima, kao što je prolazak krvno-moždane barijere, dolazak tvari na točno određeno mjesto djelovanja, i aktiviranje neželjenog imunološkog odgovora protiv stranog proteina. Kao alternativa predloženo je davanje malih, visoko permeabilnih molekula, koje imaju svojstva na respiracijski motorni odgovor kao i sam BDNF. Pokazalo se da aktivacija adenzinskih A<sub>2a</sub> receptora ima slično djelovanje na respiraciju putem transaktivacije TrkB receptora. Stoga,

najnoviji pokušaji pokazuju da sustavno davanje adenozijskih A<sub>2a</sub> receptor agonista (CGS 21680) intraperitonejski u štakora s ozljedom vratne kralježnične moždine može potaknuti pLTF, i na taj način popraviti respiracijsko zatajenje (240).

Za indukciju LTF nakon ozljede kralježnične moždine može se koristiti više protokola (*tablica 8*) (242). CIH je učinkovita, ali povezana s nuspojavama (238, 239), te se predlažu manje invazivni protokoli AIH koji bi doveli do respiracijske plastičnosti. Dnevna AIH je alternativa CIH, jer ima znatno manje hipoksijskih epizoda (70 vs. 504 epizoda kroz 7 dana) (242). Pre-tretman životinja s dAIH pojačava veličinu pLTF. Također povećava ekspresiju ključnih proteina unutar feničke motorne jezgre, tj. BDNF (183).

U zaključku, zbog vrlo ograničenog spontanog funkcijskog oporavka nakon ozljeda kralježnične moždine, postoji potreba razvijanja novih terapijskih metoda za poticanje respiracijske funkcije, a najprihvatljivija je pojačavanje endogenih mehanizama plastičnosti u pošteđenim živčanim putovima. AIH bi mogla imati djelotvorni učinak u kroničnoj fazi, te bi se fizikalna terapija mogla olakšati prethodnom IH, koja bi ojačala rezidualne sinapse. Od raznih metoda IH, čini se da je dAIH najprihvatljivija metoda (183, 242).

**Tablica 8. Prikaz raznih protokola intermitentne hipoksije nakon ozljede vratne leđne moždine u eksperimentalnim uvjetima** (preuzeto iz Vinit S, Lovett-Barr MR, Mitchell GS. Intermittent hypoxia induces functional recovery following cervical spinal injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 169(2): 210-7.) (242)

	<b>AIH</b>	<b>CIH</b>	<b>dAIH</b>
<b>Broj hipoksija</b>	3 do 5	504	70
<b>Trajanje hipoksije</b>	Akutno izlaganje hipoksiji	72x5 min/dan kroz 7 dana	10x5 min/dan kroz 7 dana
<b>Interval između hipoksijskih epizoda</b>	5 min normoksija	5 min normoksija	5 min normoksija
<b>Regulacija CO<sub>2</sub></b>	Izokapnija ili poikilokapnija	poikilokapnija	poikilokapnija
<b>Stanje životinja</b>	Anestezirani/budni	budni	budni
<b>Interval nakon ozljede</b>	7 dana do 2 mjeseca	7 dana	7 dana
<b>Poznati korisni učinci</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Povećanje pLTF-a</li> <li>• Jačanje CPP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pojačanje aktivnosti na strani ozljede za vrijeme hiperkapnije i hipoksije,</li> <li>• pojačanje evociranih odgovora</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pojačana aktivnost na strani ozljede,</li> <li>• normalizacija kapaciteta disanja (normalizacija MV i Vt za vrijeme kemosenzorne aktivacije),</li> <li>• uspostavljanje LTF-a ispod razine ozljede</li> </ul>
<b>Poznati štetni učinci</b>	Nema ih	Gubitak stanica hippocampusa, poteškoće učenja	Nema hipokampalnog gubitka stanica niti smetnji učenja

AIH = akutna intermitentna hipoksija, CIH = kronična intermitentna hipoksija, dAIH = dnevna akutna intermitentna hipoksija, MV = minutni disajni volumen, CPP = fenomen ukriženih frenikusa.

## **7. ZAKLJUČCI**

1. Potvrđena je hipoteza da je veličina pLTF ovisila o korištenom anestetiku. U životinja anesteziranih uretanom pLTF je bio nazočan 60 minuta iza zadnje hipoksijske epizode, i očitovao se porastom amplitude. U životinja anesteziranih propofolom, pLTF nije bio izazvan.
2. Uretan je specifičan anestetik, zahvaća podjednako i inhibicijske i ekscitacijske sustave, te može proizvesti kiruršku anesteziju bez utjecaja na neurotransmisiju u raznim subkortikalnim područjima i perifernom živčanom sustavu. Propofol zadire u mnoge neurotransmitske sustave, pa i u serotoninski sustav, te je zato moguć njegov utjecaj na pLTF.
3. Međutim, na temelju ovih rezultata ne mogu se pružiti jasni zaključci o točnom mehanizmu djelovanja propofola na pLTF. Vjerojatno se radi o kombiniranim učincima propofola na sinaptičku plastičnost, interakciji s 5-HT receptorima u kontroli disanja, kao i o neizravnim učincima, a preko kvantitativnih ili kvalitativnih promjena HVR.
4. Agonist 5-HT<sub>1A</sub> receptora 8-OH DPAT potiče disanje u uretanskoj anesteziji, te otklanja depresiju disanja izazvanu opioidima, barbituratima i nakon ozljeda leđne moždine. U ovoj disertaciji taj lijek nije uvijek doveo do pojačanog disanja u životinja anesteziranih propofolom.
5. Ovi rezultati mogli bi imati kliničku važnost u onih bolesnika koji su ovisni o fenomenu respiracijske plastičnosti, a to su oni s OSA, te zatajenjem disanja nakon ozljeda leđne moždine ili u sklopu raznih neurodegenerativnih bolesti, posebice kad se podvrgavaju propofolskoj sedaciji i anesteziji.

**8. SAŽETAK**

**Uvod:** Frenička dugoročna facilitacija (pLTF) predstavlja dugotrajno povećanje respiracijskoga motornog odgovora nakon epizoda akutne intermitentne hipoksije (AIH), ali ne i nakon akutne trajne hipoksije sličnog kumulativnog trajanja. Smatra se oblikom respiracijske plastičnosti ovisne o serotoninu (5-HT). pLTF je dokazan u štakora anestetiziranih uretanom. Dosad nije istraživana utjecaj propofolske monoanestezije na pojavu pLTF u modelu AIH u anestetiziranog štakora. Hipoteza je da će propofol oslabiti pLTF u odnosu na uretan. U drugom dijelu rada ispitalo se moguće mehanizme djelovanja propofola na pLTF usporedbom učinaka intravenske primjene agonista 5-HT<sub>1A</sub> receptora 8-OH DPAT-a.

**Metode:** Četrnaest odraslih, muških, vagotomiranih, paraliziranih i mehanički ventiliranih Sprague-Dawley štakora (7 u svakoj skupini) bilo je izloženo hipoksijskim epizodama ( $F_iO_2 = 9\%$ ) po obrascu 5x3 minute (TH1-TH5), međusobno odvojenih s 3 minute hiperoksije ( $F_iO_2=50\%$ ). Životinje su bile pod uretanskom (1,2 g/kg intraperitonejski, skupina U) ili propofolskom anestezijom (intravenski bolus 11,9 mg/kg + infuzija 78 mg/kg/h, skupina P). Vršna aktivnost freničkoga živca (PNA), frekvencija izbijanja (f), te parametri ritma disanja ( $T_i$ ,  $T_e$ ,  $T_{tot}$ ) analizirani su i uspoređeni s kontrolnim bazalnim vrijednostima i to tijekom prve hipoksijske epizode (TH1), kao i 15 (T15), 30 (T30) i 60 (T60) minuta iza završetka posljednje hipoksijske epizode. U drugom dijelu eksperimenta (n=10) promjena freničkoga neurograma nakon injiciranja lijeka uspoređivana je s kontrolnim vrijednostima prije davanja 8-OHDPAT.

**Rezultati:** Izokapnija se uspješno održavala tijekom čitavog protokola. U skupini P, PNA se nije značajno promijenila ni u jednoj vremenskoj točki nakon završetka zadnje hipoksijske epizode, tj. pLTF je bio ugašen. Postojalo je značajno povećanje PNA u skupini U u točki T60, a u usporedbi s kontrolom ( $59,4 \pm 6,6\%$ ,  $P < 0,001$ ), odnosno zabilježen je pLTF.

Tijekom prve hipoksijske epizode, PNA je bila značajno povišena u obje skupine životinja u odnosu na kontrolu ( $172,0 \pm 15,8$  % u skupini U, a  $106,8 \pm 16,9$  % u skupini P,  $P < 0,001$ ). Za vrijeme svih hipoksijskih epizoda (TH1–TH5) HVR je bio održan u obje skupine životinja ( $P < 0,001$  u usporedbi s bazalnom PNA). Međutim, akutni HVR bio je veći u skupini U u odnosu na skupinu P ( $P < 0,001$ ). AIH nije dovela ni u jednoj vremenskoj točki nakon zadnje hipoksijske epizode (T15, T30, T60) do značajnih promjena  $f$ , kao ni parametara vezanih za ritam disanja ( $T_i$ ,  $T_e$ ,  $T_{tot}$ ) u obje ispitivane skupine. U drugom dijelu eksperimenta davanje 8-OH DPAT nije dovelo do povećanja PNA u 40% ispitanih životinja u skupini P.

**Zaključak:** Potvrđena je hipoteza da veličina pLTF ovisi u korištenom anestetiku. pLTF je jasno dokazan u životinja anesteziranih uretanom 60 minuta iza zadnje hipoksijske epizode, te se očitovao značajnim porastom amplitude, ali ne i frekvencije. Nasuprot ovome, pLTF je bio ugašen u štakora anesteziranih propofolom. Mogući mehanizmi su kombinirani učinci propofola na sinaptičku plastičnost, interakcija s 5-HT receptorima u kontroli disanja (nekonzistentno povećanje PNA nakon iv primjene 8-OHDPAT-a), kao i neizravni učinci putem kvantitativnih ili kvalitativnih promjena HVR. Ti rezultati mogli bi imati kliničku važnost u onih bolesnika koji su ovisni o fenomenu respiracijske plastičnosti, a to su oni s opstruktivskom sleep apnejom, te zatajenjem disanja nakon ozljeda leđne moždine ili u sklopu raznih neurodegenerativnih bolesti, posebice kad se podvrgavaju propofolskoj sedaciji i anesteziji.

Ključne riječi: disanje, frenički živac, intermitentna hipoksija, živčana plastičnost, serotonin, serotoniniski agonisti, propofol, štakori

## **9. SUMMARY**

**Background:** Phrenic long term facilitation (pLTF) is sustained augmentation of respiratory motor output elicited by acute intermittent hypoxia (AIH), but not acute sustained hypoxia of similar cumulative duration. It is considered as a serotonin (5-HT)-dependent form of the respiratory plasticity. The pLTF was demonstrated in urethane-anesthetized rats. So far, the influence of propofol anesthesia on pLTF in the model of AIH has not been studied in rats. We hypothesized that pLTF would be abolished during propofol- compared with urethane anesthesia. In the second part of the study, the possible mechanism of propofol action was tested with intravenous administration of specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-hydroxy-2-di-npropylamino-tetralin (8-OH-DPAT).

**Methods:** Fourteen adult, male, anesthetized, vagotomized, paralyzed, and mechanically ventilated Sprague–Dawley rats (seven per group), were exposed to the AIH, i.e. five (TH1-TH5), 3-min hypoxic episodes ( $F_iO_2=9\%$ ), separated by 3 minutes of hyperoxia ( $F_iO_2=50\%$ ). The animals were urethane-anesthetized (1.2 g/kg i.p., group U) or propofol-anesthetized (iv bolus 11.9 mg/kg + infusion 78 mg/kg/h, group P). Peak phrenic nerve activity (PNA), burst frequency (f), and breathing rhythm parameters (Ti, Te, Ttot) were analyzed during the first hypoxia (TH1), as well as at 15 (T15), 30 (T30), and 60 min (T60) after the final hypoxic episode, and compared to the baseline values.protocol. Regarding the second part of the study (n=10), PNA was analyzed during 60 minutes after administration of 8-OHDPAT and compared to the baseline values immediately before the administration of 8-OHDPAT.

**Results:** Isocapnia was successfully maintained throughout the protocol. In propofol-anesthetized rats no significant changes of PNA were recorded after the last hypoxic episode, i.e. no pLTF was induced. There was a significant increase of PNA ( $59.4 \pm 6.6\%$ ,  $P<0,001$ ) in urethane-anesthetized group at T60, i.e. pLTF was observed. During the first hypoxic episode,

PNA was significantly increased in both urethane- and propofol-anesthetized rats ( $172.3 \pm 15.8\%$  in the group U vs  $106.8 \pm 16.9\%$  in the group P,  $P < 0.001$ ). HVR in either group of animals was preserved during all five (TH1–TH5) hypoxic episodes ( $P < 0.001$  compared with baseline phrenic nerve activity). Also, the acute HVR was greater in urethane-anesthetized compared with propofol-anesthetized animals ( $P < 0.001$ ). AIH did not elicit significant changes in  $f$ ,  $T_i$ ,  $T_e$ , and  $T_{tot}$  in either group at T15, T30, and T60. During the second part of the study, intravenous administration of 8-OHDPAT failed to increase PNA in 40 per cent of the propofol-anesthetized animals.

**Conclusions:** We confirmed the hypothesis that the magnitude of pLTF was influenced by the specific anesthetic used. The pLTF was observed in urethane-anesthetized rats 60 min after the last hypoxia and was expressed mainly as amplitude, and not frequency pLTF. On the contrary, pLTF was abolished in the propofol-anesthetized rats. We might speculate about combined effects of propofol on synaptic plasticity, interaction with 5-HT receptors in the control of breathing (inconsistent increase of PNA after intravenous 8-OHDPAT), as well as about indirect effects through quantitative or qualitative alterations in HVR. These findings could have clinical implications, especially in patients dependent on respiratory plasticity, i.e. patients suffering from obstructive sleep apnea and respiratory insufficiency either following spinal cord injury or during neurodegenerative diseases and undergoing propofol anesthesia.

**Keywords:** respiration, phrenic nerve, intermittent hypoxia, neuronal plasticity, serotonin, serotonin agonists, propofol, rats



**10. LITERATURA**

- 1) Stock MC. Respiratory function in anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK (urednici). *Clinical Anesthesia*. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2005, p. 791-811.
- 2) Wilson WC, Benumof JL. Respiratory Physiology and Respiratory Function during Anesthesia. U: Miller RD (urednik). *Anesthesia*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005, p. 679-722.
- 3) Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol* 2005; 568(Pt 3): 715-24.
- 4) Hilaire G, Pásaro R. Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci* 2003; 18: 23-8.
- 5) Rybak IA, Abdala AP, Markin SN, Paton JF, Smith JC. Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. *Prog Brain Res* 2007; 165: 201-20.
- 6) Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 1991; 254 (5032): 726-9.
- 7) Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 2000; 83(5): 2854-68.
- 8) McCrimmon DR, Monnier A, Hayashi F, Zuperku EJ . Pattern formation and rhythm generation in the ventral respiratory group. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(1-2): 126-31.

- 9) McCrimmon DR, Smith JC, Feldman JL. Involvement of excitatory amino acids in neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. *J Neurosci* 1989; 9(6): 1910-21.
- 10) Alheid GF, McCrimmon DR. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164(1-2): 3-11.
- 11) Monnier A, Alheid GF, McCrimmon DR. Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. *J Physiol* 2003; 548(Pt 3): 859-74.
- 12) Pecotić R. Učinak GABA-e i serotonina na disanje praćen promjenama aktivnosti freničkog živca [dissertation]. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2008.
- 13) Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher S. Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 1992; 2(6): 788-93.
- 14) Duffin J. Measuring the ventilatory response to hypoxia. *J Physiol* 2007; 584(Pt 1): 285-93.
- 15) Cunningham DJ. Studies on arterial chemoreceptors in man. *J Physiol* 1987; 384: 1-26.
- 16) Kumar P, Bin-Jaliah I. Adequate stimuli of the carotid body: more than an oxygen sensor? *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 157(1): 12-21.
- 17) Prabhakar NR, Peng YJ. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J Appl Physiol* 2004; 96(1): 359-66.
- 18) Lahiri S, Rozanov C, Roy A, Storey B, Buerk DG. Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(8):755-74.
- 19) Prabhakar NR. O<sub>2</sub> sensing at the mammalian carotid body: why multiple O<sub>2</sub> sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* 2006; 91(1): 17-23.
- 20) Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 1998; 112(2): 123-34.

- 21) Mitchell GS, Powell FL, Hopkins SR, Milsom WK. Time domains of the hypoxic ventilatory response in awake ducks: episodic and continuous hypoxia. *Respir Physiol* 2001; 124(2): 117-28.
- 22) Easton PA, Slykerman LJ, Anthonisen NR. Ventilatory response to sustained hypoxia in normal adults. *J Appl Physiol* 1986; 61(3): 906-11.
- 23) Steinback CD, Poulin MJ. Ventilatory responses to isocapnic and poikilocapnic hypoxia in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 155(2): 104-13.
- 24) Neubauer JA. Invited Review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1593-99.
- 25) Mitchell GS, Johnson SM. Invited Review: Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 2003; 94: 358-74.
- 26) Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA i sur. Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol* 2001; 90(4): 2466-75.
- 27) Turner DL, Mitchell GS. Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. *J Physiol* 1997; 499( Pt2) :543-50.
- 28) Mateika JH, Narwani G. Intermittent hypoxia and respiratory plasticity in humans and other animals: does exposure to intermittent hypoxia promote or mitigate sleep apnoea? *Exp Physiol* 2009; 94(3): 279-96.
- 29) Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB Jr, Mitchell GS. Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J Neurosci* 2001; 21(14): 5381-8.
- 30) Bonetti DL, Hopkins WG. Sea-level exercise performance following adaptation to hypoxia: a meta-analysis. *Sports Med.* 2009; 39(2):107-27.
- 31) Truijens MJ, Rodríguez FA, Townsend NE, Stray-Gundersen J, Gore CJ, Levine BD. The effect of intermittent hypobaric hypoxic exposure and sea level training on

- submaximal economy in well-trained swimmers and runners. *J Appl Physiol*. 2008; 104(2): 328-37.
- 32) Rodriguez FA, Casas H, Casas M, Pages T, Rama R, Ricart A, i sur. Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 264–268.
- 33) Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol* 2000; 121(2-3): 135-46.
- 34) Bisgard GE, Busch MA, Forster HV. Ventilatory acclimatization to hypoxia is not dependent on cerebral hypocapnic alkalosis. *J Appl Physiol* 1986; 60(3): 1011-5.
- 35) Dwinell MR, Janssen PL, Pizarro J, Bisgard GE. Effects of carotid body hypocapnia during ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Appl Physiol* 1997; 82(1): 118-24.
- 36) Vizek M, Pickett CK, Weil JV. Increased carotid body hypoxic sensitivity during acclimatization to hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1987; 63(6): 2403-10.
- 37) Baker TL, Mitchell GS. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 2000; 520 (Pt1): 215-9.
- 38) Dick TE, Hsieh YH, Wang N, Prabhakar N. Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol* 2007; 92(1): 87-97.
- 39) Mahamed S, Mitchell GS. Respiratory long-term facilitation: too much or too little of a good thing? *Adv Exp Med Biol* 2008; 605: 224-7.
- 40) Baker-Herman TL, Mitchell GS. Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 162(1): 8-17.
- 41) Bach KB, Kinkead R, Mitchell GS. Post-hypoxia frequency decline in rats: sensitivity to repeated hypoxia and alpha2-adrenoreceptor antagonism. *Brain Res* 1999; 817(1-2): 25-33.

- 42) Terada J, Nakamura A, Zhang W, Yanagisawa M, Kuriyama T, Fukuda Y, i sur. Ventilatory long-term facilitation in mice can be observed during both sleep and wake periods and depends on orexin. *J Appl Physiol* 2008; 104(2): 499-507.
- 43) Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by a new central neural mechanism. *Respir Physiol* 1980; 42: 87–103.
- 44) Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir Physiol*. 1980; 42:171-88.
- 45) Poitras D, Parent A. Atlas of the distribution of monoamine-containing nerve cell bodies in the brain stem of the cat. *J Comp Neurol* 1978; 179(4): 699-717.
- 46) Millhorn DE. Stimulation of raphe (obscurus) nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat. *J Physiol* 1986; 381: 169-79.
- 47) Hayashi F, Coles SK, Bach KB, Mitchell GS, McCrimmon DR. Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am J Physiol* 1993; 265(4 Pt 2): R811-9.
- 48) Bach KB, Mitchell GS. Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol* 1996; 104(2-3): 251-60.
- 49) Bach KB, Mitchell GS. Effects of phrenicotomy and exercise on hypoxia-induced changes in phrenic motor output. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 1884-91.
- 50) Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS. Selected Contribution: Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90(5): 2001-6.
- 51) Kinkead R, Zhan WZ, Prakash YS, Bach KB, Sieck GC, Mitchell GS. Cervical dorsal rhizotomy enhances serotonergic innervation of phrenic motoneurons and serotonin-dependent long-term facilitation of respiratory motor output in rats. *J Neurosci* 1998; 18(20): 8436-43.

- 52) Kinkead R, Mitchell GS. Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. *Am J Physiol* 1999; 277 (3 Pt 2): R658-66.
- 53) Fuller DD, Baker TL, Behan M, Mitchell GS. Expression of hypoglossal long-term facilitation differs between substrains of Sprague-Dawley rat. *Physiol Genomics* 2001; 4(3): 175-81.
- 54) McGuire M, Ling L. Ventilatory long-term facilitation is greater in 1- vs. 2 mo-old awake rats. *J Appl Physiol* 2005; 98(4): 1195-201.
- 55) Sokołowska B, Pokorski M. Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 4: 341-7.
- 56) 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.
- 57) Fregosi RF, Mitchell GS. Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol* 1994; 477 ( Pt 3): 469-79.
- 58) Mateika JH, Fregosi RF. Long-term facilitation of upper airway muscle activities in vagotomized and vagally intact cats. *J Appl Physiol* 1997; 82(2): 419-25.
- 59) Morris KF, Arata A, Shannon R, Lindsey BG. Long-term facilitation of phrenic nerve activity in cats: responses and short time scale correlations of medullary neurones. *J Physiol* 1996; 490 (Pt 2): 463-80.
- 60) Morris KF, Baekey DM, Shannon R, Lindsey BG. Respiratory neural activity during long-term facilitation. *Respir Physiol* 2000; 121(2-3): 119-33.
- 61) Cao KY, Zwillich CW, Berthon-Jones M, Sullivan CE. Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J Appl Physiol* 1992; 73(5): 2083-8.

- 62) Olson EB Jr, Bohne CJ, Dwinell MR, Podolsky A, Vidruk EH, Fuller DD, i sur. Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. *J Appl Physiol* 2001; 91(2): 709-16.
- 63) McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Serotonin receptor subtypes required for ventilatory long-term facilitation and its enhancement after chronic intermittent hypoxia in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(2): R334-41.
- 64) McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 2003; 95(4): 1499-508.
- 65) Janssen PL, Fregosi RF. No evidence for long-term facilitation after episodic hypoxia in spontaneously breathing, anesthetized rats. *J Appl Physiol* 2000; 89(4): 1345-51.
- 66) Jacobs BL, Fornal CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21(2 Suppl): 9S-15S.
- 67) Whittington RA, Virág L. Isoflurane decreases extracellular serotonin in the mouse hippocampus. *Anesth Analg* 2006; 103(1): 92-8.
- 68) Golder FJ, Zabka AG, Bavis RW, Baker-Herman T, Fuller DD, Mitchell GS. Differences in time-dependent hypoxic phrenic responses among inbred rat strains. *J Appl Physiol* 2005; 98(3): 838-44.
- 69) Fuller DD. Episodic hypoxia induces long-term facilitation of neural drive to tongue protruder and retractor muscles. *J Appl Physiol* 2005; 98(5): 1761-7.
- 70) O'Halloran KD, McGuire M, O'Hare T, Bradford A. Chronic intermittent asphyxia impairs rat upper airway muscle responses to acute hypoxia and asphyxia. *Chest* 2002; 122(1): 269-75.

- 71) Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(17): 10073-8.
- 72) Eldridge FL, Millhorn DE. Oscillation, gating, and memory in the respiratory control system. U: Fishman AP, Fisher AB (urednici). *Handbook of Physiology. Section 3: The Respiratory System. Circulation and Nonrespiratory Functions*, vol. 1. Washington DC: American Physiological Society; 1986, p. 93-114.
- 73) Bavis RW, Mitchell GS. Intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation in carotid-denervated rats. *J Appl Physiol* 2003; 94(1): 399-409.
- 74) Sieck GC. Plasticity can be defined as the ability to retain a shape when deformed. (comment). *J Appl Physiol* 2003; 94(1): 390.
- 75) Jordan AS, Catcheside PG, O'Donoghue JF, McEvoy RD. Long-term facilitation of ventilation is not present during wakefulness in healthy men or women. *J Appl Physiol* 2002; 93(6): 2129-36.
- 76) Morris KF, Gozal D. Persistent respiratory changes following intermittent hypoxic stimulation in cats and human beings. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 140(1): 1-8.
- 77) McEvoy RD, Popovic RM, Saunders NA, White DP. Effects of sustained and repetitive isocapnic hypoxia on ventilation and genioglossal and diaphragmatic EMGs. *J Appl Physiol* 1996; 81(2): 866-75.
- 78) Morelli C, Badr MS, Mateika JH. Ventilatory responses to carbon dioxide at low and high levels of oxygen are elevated after episodic hypoxia in men compared with women. *J Appl Physiol* 2004; 97(5): 1673-80.
- 79) Mateika JH, Mendello C, Obeid D, Badr MS. Peripheral chemoreflex responsiveness is increased at elevated levels of carbon dioxide after episodic hypoxia in awake humans. *J Appl Physiol* 2004; 96(3): 1197-205.



- 80) Harris DP, Balasubramaniam A, Badr MS, Mateika JH. Long-term facilitation of ventilation and genioglossus muscle activity is evident in the presence of elevated levels of carbon dioxide in awake humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(4): R1111-9.
- 81) Wadhwa H, Gradinaru C, Gates GJ, Badr MS, Mateika JH. Impact of intermittent hypoxia on long-term facilitation of minute ventilation and heart rate variability in men and women: do sex differences exist? *J Appl Physiol* 2008; 104(6):1625-33.
- 82) Aboubakr AE, Taylor A, Ford R, Siddiqi S, Badr SM. Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. *J Appl Physiol* 2001; 91(6): 2751-7.
- 83) Chowdhuri S, Pierchala L, Aboubakr SE, Shkougani M, Badr MS. Long-term facilitation of genioglossus activity is present in normal humans during NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 160(1): 65-75.
- 84) Pierchala LA, Mohammed AS, Grullon K, Mateika JH, Badr MS. Ventilatory long-term facilitation in non-snoring subjects during non-REM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 160(3): 259-66.
- 85) Shkougani M, Babcock MA, Badr MS. Effect of episodic hypoxia on upper airway mechanics in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* 2002; 92(6): 2565-70.
- 86) Babcock M, Shkougani M, Aboubakr SE, Badr MS. Determinants of long-term facilitation in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* 2003; 94(1): 53-9.
- 87) White DP. Long-term facilitation (LTF) and obstructive sleep apnea (commentary to short communication). *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 158(1): 112-3.
- 88) Mahamed S, Mitchell GS. Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp Physiol* 2007;92(1):27-37.

- 89) Hodges MR, Richerson GB. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164: 222-32.
- 90) Manaker S, Tischler LJ. Origin of serotonergic afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1993; 334(3): 466-76.
- 91) Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS. Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 130(2): 207-18.
- 92) Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38(8): 1083-152.
- 93) Ling L. Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164(1-2): 233-41.
- 94) Baker-Herman TL, Mitchell GS. Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci* 2002; 22(14): 6239-46.
- 95) Basura GJ, Zhou SY, Walker PD, Goshgarian HG. Distribution of serotonin 2A and 2C receptor mRNA expression in the cervical ventral horn and phrenic motoneurons following spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 2001; 169(2):255-63.
- 96) Fuller DD, Baker-Herman TL, Golder FJ, Doperalski NJ, Watters JJ, Mitchell GS. Cervical spinal cord injury upregulates ventral spinal 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J Neurotrauma* 2005; 22(2): 203-13.
- 97) McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats. *J Physiol* 2005; 567:599-611.
- 98) McGuire M, Liu C, Cao Y, Ling L. Formation and maintenance of ventilatory long-term facilitation require NMDA but not non-NMDA receptors in awake rats. *J Appl Physiol* 2008; 105(3): 942-50.

- 99) Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, i sur. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci* 2004; 7(1): 48-55.
- 100) Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 239-66.
- 101) MacFarlane PM, Wilkerson JER, Lovett-Barr MR, Mitchell GS. Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164(1-2): 263-7.
- 102) Wilkerson JER, Macfarlane PM, Hoffman MS, Mitchell GS. Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5): 1269-72.
- 103) Peng YJ, Prabhakar NR. Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2003; 94(6): 2342-9.
- 104) Lee DS, Badr MS, Miller RE, Hadden TJ, Mateika JH. Progressive augmentation and long term facilitation of ventilation is enhanced in participants with sleep apnea compared to control and is mitigated by reductions in oxidative stress. *FASEB J* 2009; 23: 784.6
- 105) Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361(6407): 31-9.
- 106) Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS. Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol* 2001; 129(1-2): 25-35.
- 107) Martin PA, Mitchell GS. Long-term modulation of the exercise ventilatory response in goats. *J Physiol* 1993; 470: 601-17.

- 108) Goshgarian HG. The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* 2003; 94 (2): 795-810.
- 109) Bavis RW, Mitchell GS. Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *J Appl Physiol* 2008; 104(4): 1220-9.
- 110) Zabka AG, Mitchell GS, Olson EB Jr, Behan M. Selected contribution: chronic intermittent hypoxia enhances respiratory long-term facilitation in geriatric female rats. *J Appl Physiol* 2003; 95(6): 2614-23.
- 111) Fuller DD, Johnson SM, Olson EB Jr, Mitchell GS. Synaptic pathways to phrenic motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 2003; 23(7): 2993-3000.
- 112) McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 2002; 93(6): 2155-61.
- 113) Johnson SM, Mitchell GS. Activity-dependent plasticity in descending synaptic inputs to respiratory spinal motoneurons. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 131(1-2): 79-90.
- 114) Serra A, Brozoski D, Hodges M, Roethle S, Franciosi R, Forster HV. Effects of carotid and aortic chemoreceptor denervation in newborn piglets. *J Appl Physiol* 2002; 92(3): 893-900.
- 115) Golder FJ, Reier PJ, Bolser DC. Altered respiratory motor drive after spinal cord injury: supraspinal and bilateral effects of a unilateral lesion. *J Neurosci* 2001; 21(21): 8680-9.
- 116) Johnson SM, Wilkerson JE, Henderson DR, Wenninger MR, Mitchell GS. Serotonin elicits long-lasting enhancement of rhythmic respiratory activity in turtle brain stems in vitro. *J Appl Physiol* 2001; 91(6): 2703-12.

- 117) White PF. Propofol: its role in changing the practice of anesthesia (editorial). *Anesthesiology* 2008; 109(6): 1132-6.
- 118) White PF, Romero F. Nonopioid intravenous anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK (urednici). *Clinical Anesthesia*. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2005, p. 335-52.
- 119) Reves JG, Glass PSA, Lubarsky RA, McEvoy MD. Intravenous Nonopioid Anesthetics. U: Miller RD (urednik). *Anesthesia*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005, p. 318-22.
- 120) Krasowski MD, KoltchineVV, Rick CE, Ye Q, Finn SE, Harrison NL. Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol* 1998; 53(3): 530-8.
- 121) Zeller A, Arras M, Lazaris A, Jurd R, Rudolph U. Distinct molecular targets for the central respiratory and cardiac actions of the general anesthetics etomidate and propofol. *FASEB J* 2005; 19(12):1677-9.
- 122) Barann M, Linden I, Witten S, Urban BW. Molecular Actions of Propofol on Human 5-HT<sub>3A</sub> Receptors: Enhancement as Well as Inhibition by Closely Related Phenol Derivatives. *Anesth Analg* 2008; 106(3): 846-57.
- 123) Rüsç D, Braun HA, Wulf H, Schuster A, Raines DE. Inhibition of human 5-HT(3A) and 5-HT(3AB) receptors by etomidate, propofol and pentobarbital. *Eur J Pharmacol* 2007; 573(1-3): 60-4.
- 124) Minami K, Minami M, Harris RA. Inhibition of 5-hydroxytryptamine type 2A receptor-induced currents by n-alcohols and anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281(3): 1136-43.
- 125) Cechetto DF, Diab T, Gibson CJ, Gelb AW. The effects of propofol in the area postrema of rats. *Anesth Analg* 2001; 92(4): 934-42.

- 126) Ganetsky M, Babu KM, Boyer EW. Serotonin syndrome in dextromethorphan ingestion responsive to propofol therapy. *Pediatr Emerg Care* 2007; 23(11): 829-31.
- 127) Appadu BL, Lambert DG. Interaction of i.v. anesthetic agents with 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Anaesth* 1996; 76(2): 271-3.
- 128) Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(9): 709-20.
- 129) Nagashima K, Zorumski CF, Izumi Y. Propofol inhibits long-term potentiation but not long-term depression in rat hippocampal slices. *Anesthesiology* 2005; 103(2): 318-26.
- 130) Wei H, Xiong W, Yang S, Zhou Q, Liang C, Zeng BX, i sur. Propofol facilitates the development of long-term depression (LTD) and impairs the maintenance of long-term potentiation (LTP) in the CA1 region of the hippocampus of anesthetized rats. *Neurosci Lett* 2002; 324: 181-4.
- 131) Dahan A, Teppema LJ. Influence of anaesthesia and analgesia on the control of breathing. *Br J Anaesth* 2003; 91(1): 40-9.
- 132) Dahan A, Teppema L. Influence of low-dose anaesthetic agents on ventilatory control: where do we stand? *Br J Anaesth* 1999; 83(2):199-201.
- 133) Pandit JJ, Moreau B, Donoghue S, Robbins PA. Effect of pain and audiovisual stimulation on the depression of acute hypoxic ventilatory response by low-dose halothane in humans. *Anesthesiology.* 2004; 101(6): 1409-16.
- 134) Knill RL, Clement JL. Site of selective action of halothane on the peripheral chemoreflex pathway in humans. *Anesthesiology* 1984; 61(2):121-6.
- 135) Stuth EA, Dogas Z, Krolo M, Kampine JP, Hopp FA, Zuperku EJ. Dose-dependent effects of halothane on the phrenic nerve responses to acute hypoxia in vagotomized dogs. *Anesthesiology.* 1997; 87(6): 1428-39.

- 136) Dahan A, van den Elsen MJ, Berkenbosch A, DeGoede J, Olievier IC, Burm AG, i sur. Influence of a subanesthetic concentration of halothane on the ventilatory response to step changes into and out of sustained isocapnic hypoxia in healthy volunteers. *Anesthesiology*. 1994; 81(4): 850-9.
- 137) van den Elsen M, Dahan A, DeGoede J, Berkenbosch A, van Kleef J. Influences of subanesthetic isoflurane on ventilatory control in humans. *Anesthesiology* 1995; 83(3): 478-90.
- 138) Pandit JJ, Manning-Fox J, Dorrington KL, Robbins PA. Effects of subanaesthetic sevoflurane on ventilation. 2: Response to acute and sustained hypoxia in humans. *Br J Anaesth* 1999; 83(2): 210-6.
- 139) Karanovic N, Pecotic R, Valic M, Jeroncic A, Carev M, Karanovic S, i sur. The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia in rats. *Anaesthesia*. [Epub ahead of print]
- 140) Temp JA, Henson LC, Ward DS. Does a subanesthetic concentration of isoflurane blunt the ventilatory response to hypoxia? *Anesthesiology* 1992; 77(6): 1116-24.
- 141) Masuda A, Haji A, Kiriya M, Ito Y, Takeda R. Effects of sevoflurane on respiratory activities in the phrenic nerve of decerebrate cats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39(6): 774-81.
- 142) Dahan A, Sarton E, van den Elsen M, van Kleef J, Teppema L, Berkenbosch A. Ventilatory response to hypoxia in humans. Influences of subanesthetic desflurane. *Anesthesiology* 1996; 85(1): 60-8.
- 143) Knill RL, Clement JL. Variable effects of anaesthetics on the ventilatory response to hypoxaemia in man. *Can Anaesth Soc J* 1982; 29(2): 93-9.
- 144) Alexander CM, Gross JB. Sedative doses of midazolam depress hypoxic ventilatory responses in humans. *Anesth Analg* 1988; 67(4): 377-82.

- 145) Ma D, Sapsed-Byrne SM, Chakrabarti MK, Whitwam JG. Synergistic interaction between the effects of propofol and midazolam with fentanyl on phrenic nerve activity in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42(6): 670-7.
- 146) Blouin RT, Seifert HA, Babenco HD, Conard PF, Gross JB. Propofol depresses the hypoxic ventilatory response during conscious sedation and isohypercapnia. *Anesthesiology* 1993; 79(6): 1177-82.
- 147) Nieuwenhuijs D, Sarton E, Teppema L, Dahan A. Propofol for monitored anesthesia care: implications on hypoxic control of cardiorespiratory responses. *Anesthesiology* 2000; 92(1): 46-54.
- 148) Nagyova B, Dorrington KL, Gill EW, Robbins PA. Comparison of the effects of sub-hypnotic concentrations of propofol and halothane on the acute ventilatory response to hypoxia. *Br J Anaesth* 1995; 75(6): 713-8.
- 149) Ponte J, Sadler CL. Effect of thiopentone, etomidate and propofol on carotid body chemoreceptor activity in the rabbit and the cat. *Br J Anaesth* 1989; 62(1): 41-5.
- 150) Jonsson MM, Lindahl SG, Eriksson LI. Effect of propofol on carotid body chemosensitivity and cholinergic chemotransduction. *Anesthesiology* 2005; 102(1): 110-6.
- 151) Flood P, Ramirez-Latorre J, Role L. Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected. *Anesthesiology* 1997; 86(4): 859-65.
- 152) Nieuwenhuijs D, Sarton E, Teppema LJ, Kruyt E, Olievier I, van Kleef J, i sur. Respiratory sites of action of propofol: absence of depression of peripheral chemoreflex loop by low-dose propofol. *Anesthesiology* 2001; 95(4): 889-95.



- 153) Dow AC, Goodman NW. Effect of hyperoxia on the breathing of patients anaesthetized with infusions of propofol. *Br J Anaesth* 1993; 70(5): 532-5.
- 154) Akada S, Fagerlund MJ, Lindahl SG, Sakamoto A, Prabhakar NR, Eriksson LI. Pronounced depression by propofol on carotid body response to CO<sub>2</sub> and K<sup>+</sup>-induced carotid body activation. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 160(3): 284-8.
- 155) Pandit JJ. Volatile anesthetics and the hypoxic ventilatory response: effects, clinical implications, and future research. *Semin Anesth Perioperat Med Pain* 2007; 26: 49–57.
- 156) De La Cruz JP, Zanca A, Carmona JA, de la Cuesta FS. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. *Anesth Analg* 1999; 89(4): 1050-5.
- 157) Kashiwagi M, Okada Y, Kuwana S, Sakuraba S, Ochiai R, Takeda J. A neuronal mechanism of propofol-induced central respiratory depression in newborn rats. *Anesth Analg* 2004; 99(1): 49-55.
- 158) Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia* 1986; 42(5): 531-7.
- 159) Hara K, Harris RA. The anesthetic mechanism of uretan: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg* 2002; 94(2): 313-8.
- 160) Karwacki D, Kowianski P, Morys J. General anaesthesia in rats undergoing experiments on the central nervous system. *Folia Morphol* 2001; 60(4): 235-42.
- 161) Valic M, Pecotic R, Dogas Z. Phrenic nerve activity is enhanced by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT in spontaneously breathing anesthetized rats. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(1): 17-25.

- 162) Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, i sur. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46(2): 157-203.
- 163) Huntjens DR, Strougo A, Chain A, Metcalf A, Summerfield S, Spalding DJ, i sur. Population pharmacokinetic modelling of the enterohepatic recirculation of diclofenac and rofecoxib in rats. *Br J Pharmacol* 2008; 153(5): 1072-84.
- 164) Kashimoto S, Furuya A, Nonaka A, Oguchi T, Koshimizu M, Kumazawa T. The minimum alveolar concentration of sevoflurane in rats. *Eur J Anaesthesiol* 1997; 14(4): 359-61.
- 165) Boden AG, Harris MC, Parkes MJ. Apneic threshold for CO<sub>2</sub> in the anesthetized rat: fundamental properties under steady state conditions. *J Appl Physiol* 1998; 85(3): 898-907.
- 166) AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218(5): 669-96.
- 167) McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL. Episodic hypoxia evokes long-term facilitation of genioglossus muscle activity in neonatal rats. *J Physiol* 2004; 557(Pt 1): 13-8.
- 168) Ryan S, Nolan P. Episodic hypoxia induces long-term facilitation of upper airway muscle activity in spontaneously breathing anaesthetized rats. *J Physiol* 2009; 587(Pt 13): 3329-42.
- 169) Zabka AG, Behan M, Mitchell GS. Long term facilitation of respiratory motor output decreases with age in male rats. *J Physiol* 2001; 531(Pt 2): 509-14.
- 170) Zabka AG, Behan M, Mitchell GS. Selected contribution: Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are influenced by age and by the estrus cycle. *J Appl Physiol* 2001; 91(6):2831-8.

- 171) Zabka AG, Mitchell GS, Behan M. Ageing and gonadectomy have similar effects on hypoglossal long-term facilitation in male Fischer rats. *J Physiol* 2005; 563 (Pt 2): 557-68.
- 172) Golder FJ, Mitchell GS. Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 2005; 25(11): 2925-32.
- 173) Reeves SR, Mitchell GS, Gozal D. Early postnatal chronic intermittent hypoxia modifies hypoxic respiratory responses and long-term phrenic facilitation in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290(6): R1664-71.
- 174) Doperalski NJ, Fuller DD. Long-term facilitation of ipsilateral but not contralateral phrenic output after cervical spinal cord hemisection. *Exp Neurol* 2006; 200: 74-81.
- 175) Zabka AG, Mitchell GS, Behan M. Conversion from testosterone to oestradiol is required to modulate respiratory long-term facilitation in male rats. *J Physiol* 2006; 576(Pt 3): 903-12.
- 176) Berner J, Shvarev Y, Lagercrantz H, Bilkei-Gorzo A, Hökfelt T, Wickström R. Altered respiratory pattern and hypoxic response in transgenic newborn mice lacking the tachykinin-1 gene. *J Appl Physiol* 2007; 103(2): 552-9.
- 177) Golder FJ, Martinez SD. Bilateral vagotomy differentially alters the magnitude of hypoglossal and phrenic long-term facilitation in anesthetized mechanically ventilated rats. *Neurosci Lett* 2008; 442(3): 213-8.
- 178) McGuire M, MacDonald SM, Song G, Poon CS. Phrenic long-term facilitation is robust to hypercapnia and hypocapnia but not hyperventilatory hypotension under PEEP. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 158(1): 107-11.

- 179) Neverova NV, Saywell SA, Nashold LJ, Mitchell GS, Feldman JL. Episodic stimulation of  $\alpha$ 1-adrenoreceptors induces protein kinase C-dependent persistent changes in motoneuronal excitability. *J Neurosci* 2007; 27(16): 4435-42.
- 180) Mahamed S, Mitchell GS. Simulated apnoeas induce serotonin-dependent respiratory long-term facilitation in rats. *J Physiol* 2008; 586(8): 2171-81.
- 181) MacFarlane PM, Mitchell GS. Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience* 2008; 152(1): 189-97.
- 182) McGuire M, Tartar JL, Cao Y, McCarley RW, White DP, Strecker RE, et al. Sleep fragmentation impairs ventilatory long-term facilitation via adenosine A1 receptors. *J Physiol* 2008; 586(Pt 21): 5215-29.
- 183) Wilkerson JE, Mitchell GS. Daily intermittent hypoxia augments spinal BDNF levels, ERK phosphorylation and respiratory long-term facilitation. *Exp Neurol* 2009; 217(1): 116-23.
- 184) Cao Y, Liu C, Ling L. Glossopharyngeal long-term facilitation requires serotonin 5-HT(2) and NMDA receptors in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009 Dec 22. [Epub ahead of print]
- 185) MacFarlane PM, Mitchell GS. Episodic spinal serotonin receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation by an NADPH oxidase-dependent mechanism. *J Physiol* 2009; 587(Pt 22): 5469-81.
- 186) Hoffman MS, Golder FJ, Mahamed S, Mitchell GS. Spinal Adenosine 2A Receptor Inhibition Enhances Phrenic Long Term Facilitation Following Acute Intermittent Hypoxia. *J Physiol*. 2009 Nov 9. [Epub ahead of print]

- 187) Baker-Herman TL, Bavis RW, Dahlberg JM, Mitchell AZ, Wilkerson JE, Golder FJ, i sur. Differential Expression Of Respiratory Long-Term Facilitation Among Inbred Rat Strains. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009 Dec 24. [Epub ahead of print]
- 188) Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. *Curr Opin Anaesthesiol* 2005; 18(4): 386-91.
- 189) Hunter JD, McLeod JZ, Milsom WK. Cortical activation states in sleep and anesthesia. II: respiratory reflexes. *Respir Physiol* 1998; 112(1): 83-94.
- 190) Fudickar A, Bein B. Propofol infusion syndrome: update of clinical manifestation and pathophysiology. *Minerva Anesthesiol* 2009; 75(5): 339-44.
- 191) Haji A, Takeda R, Okazaki M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 2000; 86(3): 277-304.
- 192) Saiki C, Kamio T, Furuya H, Matsumoto S. Ventilation and metabolism during propofol anesthesia in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81(1): 9-13.
- 193) Kamio T, Matsumoto S, Furuya H. The Effects of Propofol Anesthesia on the Hypoxic Ventilatory Response in Adult Rats. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 2001; 29: 158-67.
- 194) Ma D, Chakrabarti MK, Whitwam JG. Effects of propofol and remifentanyl on phrenic nerve activity and nociceptive cardiovascular responses in rabbits. *Anesthesiology* 1999; 91(5): 1470-80.
- 195) Nakamura S, Hayashi K, Sakamaki H, Murakami Y, Tsuchiya M, Mishima M, i sur. Propofol depresses the activity of hypoglossal nerve more than that of phrenic nerve in rabbits. *Masui* 2003; 52(2): 135-42.
- 196) Nakamura S, Ohno R, Suzuki M, Abe T, Narita Y, Kusumoto G, i sur. Propofol suppresses the responses in hypoglossal nerve activity to hypercapnic-hypoxic stimulation. *Masui* 2004; 53(11):1234-42.

- 197) Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. *Clinical Anesthesiology*. 4th edition. New York: McGraw-Hill Companies Inc.; 2006, p. 179-205.
- 198) Teng YD, Bingaman M, Taveira-DaSilva AM, Pace PP, Gillis RA, Wrathall JR. Serotonin 1A receptor agonists reverse respiratory abnormalities in spinal cord-injured rats. *J Neurosci* 2003; 23(10): 4182-9.
- 199) Stucke AG, Stuth EA, Tonkovic-Capin V, Tonkovic-Capin M, Hopp FA, Kampine JP, i sur. Effects of sevoflurane on excitatory neurotransmission to medullary expiratory neurons and on phrenic nerve activity in a decerebrate dog model. *Anesthesiology* 2001; 95(2): 485-91.
- 200) Kastner A, Gauthier P. Are rodents an appropriate pre-clinical model for treating spinal cord injury? Examples from the respiratory system. *Exp Neurol* 2008; 213(2): 249-56.
- 201) Reeves SR, Gozal D. Protein kinase C activity in the nucleus tractus solitarii is critically involved in the acute hypoxic ventilatory response, but is not required for intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation in adult rats. *Exp Physiol* 2007; 92(6): 1057-66.
- 202) Diep TT, Khan TR, Zhang R, Duffin J. Long-term facilitation of breathing is absent after episodes of hypercapnic hypoxia in awake humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 156(2): 132-6.
- 203) Babcock MA, Badr MS. Long-term facilitation of ventilation in humans during NREM sleep. *Sleep* 1998; 21(7): 709-16.
- 204) Khodadadeh B, Badr MS, Mateika JH. The ventilatory response to carbon dioxide and sustained hypoxia is enhanced after episodic hypoxia in OSA patients. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 150(2-3): 122-34.

- 205) Rowley JA, Deebajah I, Parikh S, Najar A, Saha R, Badr MS. The influence of episodic hypoxia on upper airway collapsibility in subjects with obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 2007; 103(3): 911-6.
- 206) Jiang M, Alheid GF, Calandriello T, McCrimmon DR. Parabrachial-lateral pontine neurons link nociception and breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 143(2-3): 215-33.
- 207) Ortiz MI, Lozano-Cuenca J, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. Additive interaction between peripheral and central mechanisms involved in the antinociceptive effect of diclofenac in the formalin test in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 91: 32-7.
- 208) Kokki H, Kumpulainen E, Laisalmi M, Savolainen J, Rautio J, Lehtonen M. Diclofenac readily penetrates the cerebrospinal fluid in children. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 879-84.
- 209) Liu LY, Fei XW, Li ZM, Zhang ZH, Mei YA. Diclofenac, a nonsteroidal antiinflammatory drug, activates the transient outward K<sup>+</sup> current in rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 2005; 48: 918-26.
- 210) Koizumi H, Smith JC. Persistent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex in vitro. *J Neurosci* 2008; 28: 1773-85.
- 211) Carmichael FJ, Crawford MW, Khayyam N, Saldivia V. Effect of propofol infusion on splanchnic hemodynamics and liver oxygen consumption in the rat. A dose-response study. *Anesthesiology* 1993; 79(5): 1051-60.
- 212) Lee VC, Moscicki JC, DiFazio CA. Propofol sedation produces dose-dependent suppression of lidocaine-induced seizures in rats. *Anesth Analg* 1998; 86(3): 652-7.

- 213) Lee IH, Culley DJ, Baxter MG, Xie Z, Tanzi RE, Crosby G. Spatial memory is intact in aged rats after propofol anesthesia. *Anesth Analg* 2008; 107(4): 1211-5.
- 214) Logginidou HG, Li BH, Li DP, Lohmann JS, Schuler HG, DiVittore NA, i sur. Propofol supresses the cortical somatosensory evoked potential in rats. *Anesth. Analg* 2003; 97: 1784–8.
- 215) Dam M, Ori C, Pizzolato G, Ricchieri GL, Pellegrini A, Giron GP, i sur. The effects of propofol anesthesia on local cerebral glucose utilization in the rat. *Anesthesiology* 1990; 73: 499–505.
- 216) Eikermann M, Malhotra A, Fassbender P, Zaremba S, Jordan AS, Gautam S i sur. Differential effects of isoflurane and propofol on upper airway dilator muscle activity and breathing. *Anesthesiology* 2008; 108(5): 897-906.
- 217) Orth M, Barter L, Dominguez C, Atherley R, Carstens E, Antognini JF. Halothane and propofol differentially affect electroencephalographic responses to noxious stimulation. *Br J Anaesth* 2005; 95(4): 477-84.
- 218) Ebert TJ. Inhalation Anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK (urednici). *Clinical Anesthesia*. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2005, p. 385-421.
- 219) Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E. Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 2003; 9(12): 542-8.
- 220) Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164(1-2): 96-104.
- 221) Sahibzada N, Ferreira M, Wasserman AM, Taveira-DaSilva AM, Gillis RA. Reversal of morphine-induced apnea in the anesthetized rat by drugs that activate 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(2): 704-13.



- 222) Dutschmann M, Waki H, Manzke T, Simms AE, Pickering AE, Richter DW, i sur. The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked cardiorespiratory disturbances. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364(1529): 2611-23.
- 223) Lee YS. Effects of propofol target-controlled infusion on haemodynamic and respiratory changes with regard to safety. *J Int Med Res* 2004; 32: 19-24.
- 224) Guenther U, Manzke T, Wrigge H, Dutschmann M, Zinserling J, Putensen C, i sur. The counteraction of opioid-induced ventilatory depression by the serotonin 1A-agonist 8-OH-DPAT does not antagonize antinociception in rats in situ and in vivo. *Anesth Analg* 2009; 108(4): 1169-76.
- 225) Lalley PM, Bischoff AM, Richter DW. Serotonin 1A-receptor activation suppresses respiratory apneusis in the cat. *Neurosci Lett* 1994; 172(1-2): 59-62.
- 226) Gross JB, Bachenberg KL, Benumof JL, Caplan RA, Connis RT, Cote CJ, i sur. 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.
- 227) Chung SA, Yuan H, Chung F. A systemic review of obstructive sleep apnea and its implications for anesthesiologists. *Anesth Analg* 2008; 107(5): 1543-63.
- 228) Wang W, Richerson GB. Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience* 1999; 90(3): 1001-11.
- 229) Serebrovskaya T, Karaban I, Mankovskaya I, Bernardi L, Passino C, Appenzeller O. Hypoxic ventilatory responses and gas exchange in patients with Parkinson's disease. *Respiration* 1998; 65(1): 28-33.

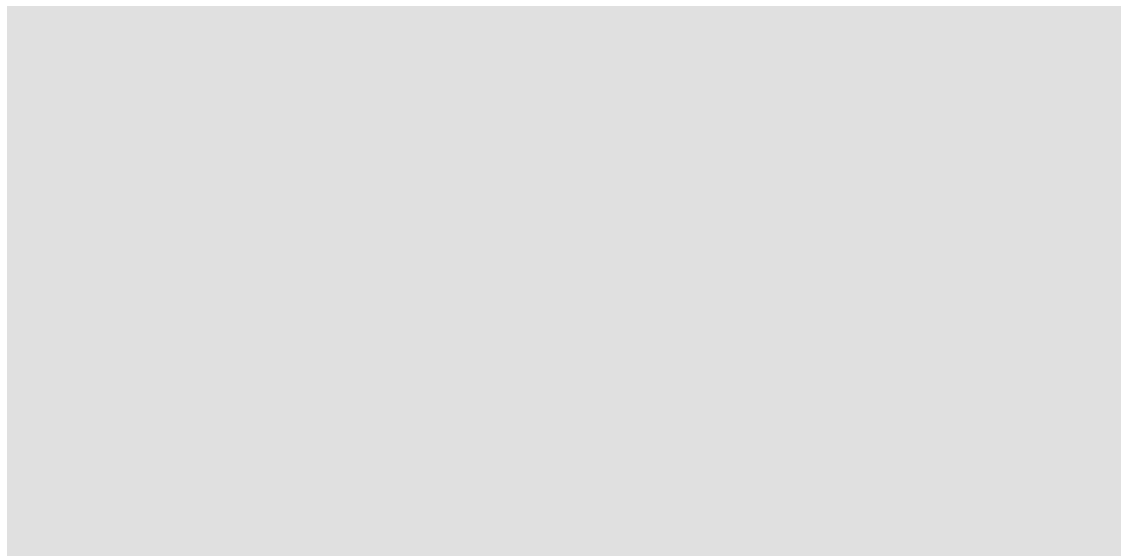
- 230) Al Lawati NM, Patel SR, Ayas NT. Epidemiology, risk factors, and consequences of obstructive sleep apnea and short sleep duration. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51(4): 285-93.
- 231) Brown KA. Intermittent hypoxia and the practice of anesthesia. *Anesthesiology*. 2009; 110(4): 922-7.
- 232) Carev M, Karanović N, Đogaš Z. Opstruktivska apneja tijekom spavanja i anestezija. *Lijec Vjesn* 2008; 130(3-4): 78-86.
- 233) Chiodo AE, Scelza W, Forchheimer M. Predictors of ventilator weaning in individuals with high cervical spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2008; 31(1): 72-7.
- 234) Lin CM, Davidson TM, Ancoli-Israel S. Gender differences in obstructive sleep apnea and treatment implications. *Sleep Med Rev* 2008; 12(6): 481-96.
- 235) Wolkove N, Elkholy O, Baltzan M, Palayew M. Sleep and aging: 1. Sleep disorders commonly found in older people. *CMAJ* 2007; 176(9): 1299-304.
- 236) Behan M, Zabka AG, Mitchell GS. Age and gender effects on serotonin-dependent plasticity in respiratory motor control. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 131: 65-77.
- 237) Bradford A, McGuire M, O'Halloran KD. Does episodic hypoxia affect upper airway dilator muscle function? Implications for the pathophysiology of obstructive sleep apnoea. *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 147(2-3): 223-34.
- 238) Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 2001; 90(4): 1600-5.
- 239) Gozal E, Gozal D. Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: developmental interactions. *J Appl Physiol* 2001; 90(5): 1995-9.
- 240) Golder FJ, Ranganathan L, Satriotomo I, Hoffman M, Lovett-Barr MR, Watters JJ, et al. Spinal adenosine A2a receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation. *J Neurosci* 2008; 28(9): 2033-42.

- 241) Goshgarian HG. The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol.* 2003; 94(2): 795-810.
- 242) Vinit S, Lovett-Barr MR, Mitchell GS. Intermittent hypoxia induces functional recovery following cervical spinal injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 169(2): 210-7.
- 243) Zimmer MB, Nantwi K, Goshgarian HG. Effect of spinal cord injury on the respiratory system: basic research and current clinical treatment options. *J Spinal Cord Med* 2007; 30(4): 319-30.

**11. ŽIVOTOPIS**

**Mr. sc. MLADEN CAREV, dr. med.**

specijalist anesteziologije, reanimacije i intenzivnog liječenja

**Obrazovanje:**

*1980-1984:* Matematičko-informatički školski centar “Ćiro Gamulin” u Splitu

*1985-1991:* Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*1994-1998:* Poslijediplomski studij “Klinička farmakologija” Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Akademski stupanj:**

*1984.* maturirao u Matematičko-informatičkoj školi “Ćiro Gamulin” u Splitu

*1991.* doktor medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

*1998.* magistrirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (naslov radnje: Razina glukoze u krvi tijekom spinalne anestezije kao neizravni pokazatelj kemijske simpatektomije i veličine stresa – mentor prof. dr. sc. Antun Bačić, dr. med.)

*2003.* Izbor u suradničko zvanje naslovnog mlađeg asistenta u Katedri za medicinu u izvanrednim uvjetima – grana Anesteziologija (Medicinski fakultet u Splitu)

**Zaposlenja:**

1991-1992. opća medicina

1992-1994. sekundarijat anesteziologije

1994-1998: specijalizacija iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja

1998- specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u KB Split.

**Članstva u profesionalnim udruženjima:**

- Hrvatski liječnički zbor od 1991.
- Hrvatska liječnička komora od 1996.
- Europsko udruženje anesteziologa (European Society of Anesthesiology) od 2003.
- Hrvatsko društvo za intenzivnu medicinu od 2007.
- Europsko udruženje kardiorakalnih anesteziologa (EACTA) od 2008.

**Profesionalni interesi:**

- anestezija u kardijalnoj kirurgiji, intenzivno liječenje, kontrola disanja

**Sudjelovanje u projektima:**

- Istraživač na znanstvenoistraživačkom projektu «Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju», br. 216-2163166-6513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš)

**Radovi u indeksiranim časopisima:****Current contents**

- 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.
- 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*. [Epub ahead of print]. doi:10.1111/j.1365-2044.2009.06194.x

- Karanovic N, Carev M, Kardum G, Pecotic R, Valic M, Karanovic S, Ujevic A, Dogas Z. The impact of a single 24 h working day on cognitive and psychomotor performance in staff anaesthesiologists. *Eur J Anaesthesiol* 2009; 26(10): 825-32.
- Karanovic N, Carev M, Ujevic A, Kardum G, Dogas Z. Association of oculocardiac reflex and postoperative nausea and vomiting in strabismus surgery in children anesthetized with halothane and nitrous oxide. *Paediatr Anaesth* 2006; 16(9): 948-54.
- Karanovic N, Jukic M, Carev M, Kardum G, Dogas Z. Rocuronium attenuates oculocardiac reflex during squint surgery in children anesthetized with halothane and nitrous oxide. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48(10): 1301-5.
- **Medline**
  - Carev M, Karanović N, Đogaš Z. Opstruktivska apneja tijekom spavanja i anestezija. *Lijec Vjesn* 2008; 130(3-4): 78-86.
  - Đogaš Z, Valić M, Pecotić R, Pupiće MC, Carev M, Bojić L, Račić G. Poremećaji disanja tijekom spavanja. *Lijec Vjesn* 2008; 130(3-4): 69-77.
- **Aktivno sudjelovanje na međunarodnim kongresima:**
  - Na kongresima Europskog udruženja anesteziologa u Madridu 2006. i Muenchenu 2007. (prvi autor\*), koautor na radovima za kongrese Europskog udruženja anesteziologa u Lisabonu 2004., Beču 2005., Madridu 2006. i Muenchenu 2007.  
\* EJA 2007; Vol 24 (Suppl 39): 3. EJA 2006; Vol 23 (suppl 37): 244.
- **Ostalo (poglavlje u knjizi):**
  - Carev M. Maligna hipertermija. U: Bačić A. (ur.). Anesteziologija, intenzivno liječenje i reanimatologija. 1. Izdanje. Split: Chrono d.o.o. 2003; 332-41.