

Hipoksijski ventilacijski odgovor pod djelovanjem halotona, izoflurana i sevoflurana praćen promjenama aktivnosti freničkoga živca štakora

Karanović, Nenad

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:171:162095>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mr. sc. Nenad Karanović, dr. med.

**HIPOKSIJSKI VENTILACIJSKI ODGOVOR POD
DJELOVANJEM HALOTANA, IZOFLURANA I
SEVOFLURANA PRAĆEN PROMJENAMA AKTIVNOSTI
FRENIČKOGA ŽIVCA ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Split, 2010.

Rad je izrađen na Zavodu za neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

Voditelj rada je prof. dr. sc. Zoran Đogaš, dr. med.

Rad ima 86 stranica

Redni broj :

SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

str.

1. Popis oznaka i skraćenica	6
2. Uvod	8
2.1. Uvodne napomene	8
2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja i spoznaja u okviru predložene problematike	9
2.2.1. Uloga mozga u središnjoj kontroli disanja	9
2.2.2. Ventralna respiracijska skupina	10
2.2.3. Mehanizam stvaranja obrasca i ritma disanja	11
2.2.4. Periferni i središnji kemoreceptori	11
2.2.5. Opća anestezija	14
2.2.5.1. Inhalacijski anestetici	15
2.2.6. Hipoksija i hipoksijski ventilacijski odgovor (HVR)	18
2.2.7. Utjecaj hlapljivih anestetika na disanje i hipoksijski ventilacijski odgovor	20
2.2.8. Aktivnost freničkoga živca (PNA)	21
3. Problematika istraživanja	23
4. Cilj i svrha istraživanja	25
5. Hipoteza	27
6. Tvoriva i postupci	28
6.1. Model i etičnost postupka	28
6.2. Testiranje izvodljivosti studije	28
6.3. Formiranje skupina i randomizacija	29
6.4. Istraživanje	30
6.4.1. Općeniti postupak	30
6.4.2. Pokusni protokol	32
6.4.3. Ulazni parametri	34
6.4.4. Izlazni parametri	35
6.4.5. Prikupljanje i analiza podataka	36
6.4.6. Statistička analiza	36
7. Rezultati	38
7.1. Učinci halotana na spontanu PNA i HVR	38
7.2. Učinci izoflurana na spontanu PNA i HVR	38
7.3. Učinci sevoflurana na spontanu PNA i HVR	41
7.4. Učinci izoflurana i sevoflurana na PNA u posthipoksijskoj fazi	45
7.5. Usporedba učinka halotana, izoflurana i sevoflurana na HVR	45
7.6. Promjene obrasca i ritma disanja: T_I , T_E , T_{TOT}	51
7.7. Brzina pojave HVR (latencija) pod utjecajem različitih hlapljivih anestetika	51
7.8. Parcijalni tlakovi plinova i acidobazni status u krvi	52

7.9. Arterijski tlakovi	52
8. Rasprava	57
8.1. Dobivanje „čistog“ djelovanja pojedinog hlapljivog anestetika	57
8.2. Odabir načina izvođenja hipoksije	58
8.3. Posthipoksijski oporavak	59
8.4. Promjene obrasca i ritma disanja: T_I , T_E , T_{TOT}	59
8.5. Latencija do pojave HVR pod utjecajem različitih hlapljivih anestetika	60
8.6. Vrijednost plinova u arterijskoj krvi	60
8.7. Vrijednosti arterijskih tlakova	61
8.8. Mogućnost lociranja djelovanja hlapljivih anestetika pri hipoksijskom podražaju	61
8.9. Ograničenja studije	62
9. Zaključci	65
10. Znanstveni doprinos i klinička primjena	67
11. Sažetak	69
12. Summary	70
13. Popis literature	71
14. Životopis	83
15. Napomena	86

1. POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

ABS – acidobazni status

AIH – akutna intermitentna hipoksija

AMPA receptori – receptori α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionata

CBCR – karotidni kemoreceptori

CSN – živac karotidnog sinusa, Heringov živac

C₄ - C₅ – razina 4. - 5. vratnog kralješka

DRS - dorzalna respiracijska skupina

ED₅₀ - količina tvari potrebna za učinak u 50% ispitivanih životinja

ETCO₂ – tlak ugljikova dioksida na kraju izdisaja

FiO₂ – udio kisika u udahnutom zraku

GABA_A receptori - receptor za GABA-u, podskupina A

GABA_B receptori - receptor za GABA-u, podskupina B

HVR – hipoksijski ventilacijski odgovor

N₂O – dušikov oksidul, inhalacijski anestetik

NMDA receptori - receptori N-metil-D-aspartata

MAC - parcijalni tlak plina u alveolama, prikazan kao postotak od jedne atmosfere, pri kojemu 50% subjekata neće reagirati na standardni bolni podražaj

p_aO₂ – parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi (mmHg)

p_aCO₂ - parcijalni tlak ugljikova dioksida u arterijskoj krvi (mmHg)

PEEP – pozitivni tlak na kraju izdisaja

PNA – aktivnost freničkoga živca

PRS - pontina respiracijska skupina

RR - od engleskih riječi *respiratory rate*, broj respiracija u minuti

S_aO₂ – saturacija kisikom u arterijskoj krvi (%)

SŽS - središnji živčani sustav

TM – tjelesna masa

TV – od engleskih riječi *tidal volume*, respiracijski volumen

T_E - trajanje izdisaja

T_I - trajanje udisaja

T_{TOT} - ukupno trajanje respiracijskog ciklusa

VRS - ventralna respiracijska skupina

2. UVOD

2.1. UVODNE NAPOMENE

Disanje je jedna od temeljnih životnih funkcija. Mnoge su stare kulture i civilizacije vrlo rano shvatile važnost disanja. Taoizam smatra disanje svetim, a ispravno disanje ključem prosvjetljenja. Budisti vjeruju da se posebna stanja prosvjetljenosti mogu postići učinkovitom modulacijom disanja. Iako svrha disanja, kao procesa kojim se zrak kreće u i iz pluća nije utvrđena sve do 18. stoljeća, u zapadnoj kulturi mehanizam disanja bio je tema stalnih promišljanja. Galenu se pripisuje vjerojatno najranija spoznaja o mogućoj ulozi mozga u disanju (1).

Desetljećima je žarište respiracijske fiziologije bilo zaokupljeno regulacijom plinova u krvi, dok je središnji živčani sustav (SŽS) tretiran kao „crna kutija“ (1). Međutim, posljednjih dvadesetak godina donijelo je značajne promjene u tom području neuroznanosti. Revolucionarne, nove tehnologije, pristupi i koncepti rezultirali su novim spoznajama o funkciji SŽS.

Disanje je bitna fiziološka funkcija koja je pod stalnim nadzorom mozga. Mehanizam disanja je složen proces, a ovisi o središnjim i perifernim neuroregulacijskim mehanizmima. Pod utjecajem je više neuronskih krugova smještenih u donjem dijelu moždanog debla (2). Disanje je regulirano pozitivnom i negativnom povratnom spregom, koja omogućuje točno usklađivanje između metaboličkih i nemetaboličkih potreba i unosa kisika preko pluća (3).

Proces disanja ovisi o nekoliko činitelja; osjetnog, respiracijskog i motoričkog (4, 5). Osjetni dio je kemijski, kojeg čine periferni i centralni kemoreceptori te mehanički dio kojega čine receptori za istezanje u dišnom putu i mišićima. Respiracijski dio objedinjuje sve podatke dobivene iz navedenih receptora te uz modulaciju iz centara za svijest kao i onih vezanih uz ponašanje (bol, govor, pjevanje, stres itd.) integrira impulse (6) te ih šalje dalje motoričkom

dijelu, putem freničkoga i spinalnih živaca. Motorički dio čine prsni koš, ošit, međurebreni i trbušni mišići.

2.2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA I SPOZNAJA U OKVIRU PREDLOŽENE PROBLEMATIKE

2.2.1. Uloga mozga u središnjoj kontroli disanja

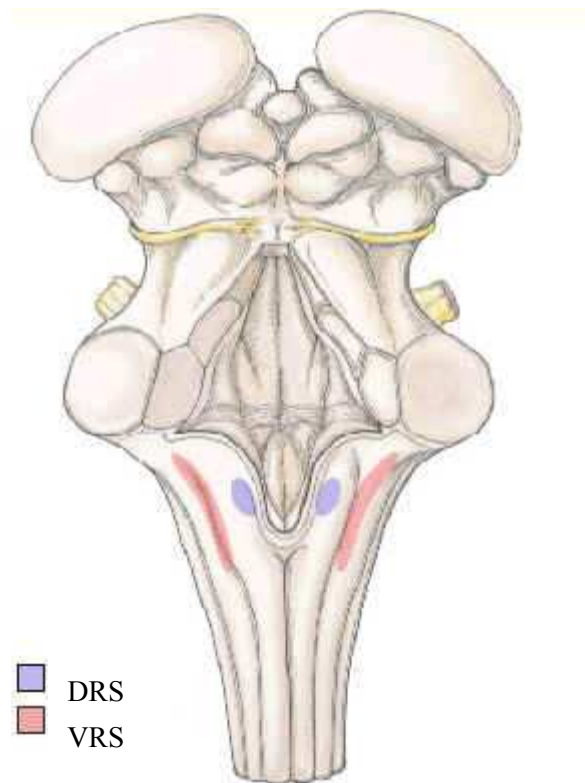
Uloga mozga u središnjem nadzoru disanja je višeznačna. Mozak vrlo precizno kontrolira disanje. Stvara temeljni ritam te ga pretvara u precizno usklađen obrazac aktivnosti respiracijskih motoneurona. Uz to, usklađuje aktivnost respiracijskih mišića s ciljem održavanja homeostaze prikladnom ventilacijom.

Precizna kontrola disanja uključuje tri neuralne faze:

- a) faza udisaja, u kojoj se kontrahiraju inspiracijski mišići;
- b) faza postinspirija ili pasivnog izdisanja – 1. stupanj ekspirija, u kojoj prestaje kontrakcija inspiracijskih mišića, dok aktivnost mišića gornjih dišnih putova smanjuje izdisanje i
- c) faza aktivnog izdisanja – 2. stupanj ekspirija, u kojoj se kontrahiraju ekspiracijski mišići (2).

Svaka faza odgovara aktivnosti respiracijskih neurona koji čine respiracijsku neuralnu mrežu. Smještaj neurona odgovornih za održavanje disanja najvećim je dijelom u moždanom deblu unutar tri specifične skupine respiracijskih neurona: dorzalnoj respiracijskoj skupini (DRS), ventralnoj respiracijskoj skupini (VRS) (slika 1) i respiracijskoj skupini u ponsu, pontina respiracijska skupina (PRS). Razmještaj neurona, način na koji su prostorno i funkcionalno povezani te vrsta neurotransmitera koji se izlučuju u sinapsama, predmet su intenzivnog istraživanja posljednja dva desetljeća. Navedeni neuroni međusobno oblikuju mrežu potrebnu za stvaranje i održavanje ritma i obrasca disanja.

Podatci dobiveni istraživanjima ukazali su na postojanje specifične nakupine respiracijskih neurona u VRS, za koje se smatra da imaju ulogu generatora osnovnog ritma disanja, tzv. *preBötzinger kompleks* (7).



Slika 1. Shematski prikaz dorzalne (DRS) i ventralne respiracijske (VRS) skupine.

2.2.2. Ventralna respiracijska skupina (VRS)

Respiracijski neuroni ventralne respiracijske skupine nalaze se obostrano unutar ventrolateralne medule koja se pruža od prvog cervikalnog kralješka do kaudalnog dijela motorne jezgre ličnog živca (8). VRS se dijeli na nekoliko dijelova s obzirom na anatomske i funkcijske specifičnosti: kaudalni dio VRS, rostralni dio VRS, *preBötzinger kompleks* i *Bötzinger kompleks*. Takva podjela rezultat je istraživanja Monnier i sur., koji su spoznali da navedene skupine neurona, izuzev kaudalnog dijela, imaju važnu ulogu u generiranju ritma i obrasca disanja (9).

2.2.3. Mehanizam stvaranja obrasca i ritma disanja

Stvaranje respiracijskog ritma razmatra se kroz tri modela: mrežni model (*network model*), model stimuliranja ritma (*pacemaker model*) i tzv. hibridni model (1). U mrežnom modelu međudjelovanje inhibicijskih sinapsi temeljno je za stvaranje ritma disanja. U modelu stimuliranja, neuroni s ritmičkim stimulirajućim svojstvima temelj su aktivnosti, dok je treći model zapravo kombinacija prva dva.

Za primjerenu ritmičnu aktivnost potrebne su dvije vrste receptora: inhibicijski i ekscitacijski. Inhibicijski su glicinski, GABA_A i GABA_B, dok su ekscitacijski NMDA (N-metil-D-aspartatni) i AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izokaszol propionska kiselina) receptori.

2.2.4. Periferni i središnji kemoreceptori

Gotovo sve stanice sisavaca reagiraju na hipoksiju. Primjeri staničnog odgovora na hipoksiju uključuju aktivaciju čimbenika transkripcije i promjene tzv. drugih glasnika (*second messengers*). Za razliku od staničnog odgovora, aktivnost perifernih kemoreceptora uključuje brzu aferentnu živčanu aktivaciju (10).

Periferni kemoreceptori reagiraju prvenstveno na smanjenje parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi (p_aO_2), dok središnji reagiraju na promjene parcijalnog tlaka ugljikova dioksida, također u arterijskoj krvi (p_aCO_2) te acidobaznog, odnosno metaboličkog statusa (4, 5, 11). Periferne kemoreceptore sadrže karotidna i aortalna tjelešca. Karotidna tjelešca strateški su smještena uz bifurkaciju zajedničke karotidne arterije tako da mogu registrirati hipoksiju puno prije nego dođe do SŽS i katkada se nazivaju „psima čuvarima“ mozga (12). Navedena tjelešca predstavljaju malen par snažno prokrvljenih organa smještenih na grananju obje karotidne arterije, gdje kemoreceptori (engl. *carotid body chemoreceptors*, CBCR) reagiraju prvenstveno na promjene p_aO_2 u arterijskoj krvi, a manjim dijelom na promjene

$p_a\text{CO}_2$. To se zbiva vrlo brzo, unutar svega nekoliko milisekunda, dok se odgovor na hipoksiju odvija između 2-10 sekundi (4, 13), čime se izuzetno brzo regulira dovod kisika u mozak. S druge strane, stanični odgovor na hipoksiju je spor (minute do sati) i zahtijeva produljenu izloženost hipoksiji (10). Kad se $p_a\text{O}_2$ snizi ispod 100 mmHg, započinje aktivnost perifernih kemoreceptora. Dovoljno je sniženje od 20 mmHg za aktivaciju aferentne živčane aktivnosti u karotidnim tjelešcima (10). Međutim, značajnu aktivnost pokazuju tek kad se $p_a\text{O}_2$ spusti ispod 60-65 mmHg (4).

Tkivo kemoreceptora se sastoji od dva tipa stanica: tip I i tip II. Stanice tipa I, nazvane i glomus stanicama, izlučuju različite neurotransmitere, dok stanice tipa II, također zvane i sustentakularne stanice su tzv. potporne stanice (10). Dostupni dokazi upućuju da su stanice tipa I, glomus stanice, osjetilno mjesto za kisik (10). Način na koji karotidna tjelešca osjećaju promjene u parcijalnom tlaku kisika i pretvaraju hipoksijski podražaj u aferentnu živčanu aktivnost, prema sadašnjim saznanjima, uključuje početnu transdukciju aktivnost praćenu aktivacijom aferentnih živčanih završetaka (senzorni prijenos). Postoje dokazi da su neurotransmiteri ključni za aferentnu živčanu aktivnost pri hipoksiji (10). Neki od njih su pobuđujući, dok su drugi inhibicijski.

Iako ne postoji suglasnost o načinu na koji karotidna tjelešca registriraju manjak kisika, postoje tri moguća mehanizma. Prvi je mehanizam tzv. metabolička hipoteza, vezana uz prepoznavanje manjka kisika putem proteina koji sadrže hem. Zatim je membranska hipoteza s ionskim kanalima kao sensorima za kisik i kemosomna hipoteza koja pokušava razjasniti reakciju interakcijama među navodnim sensorima kisika (10). Međutim, temeljni mehanizam na staničnoj i molekularnoj razini bio bi zatvaranje kalijevih kanala u glomus stanicama tipa I, što dalje dovodi do povećanja unutarstaničnog kalcija i lučenja neurotransmitera (10, 14), posebno acetil-kolina i ATP/adenozina, čime se prenosi hipoksični signal iz glomus stanica prema okolnim aferentnim živčanim završetcima živca karotidnog

sinusa (CSN, Heringov živac) (14). Signali dalje putuju do petroznog ganglija gdje se nalazi stanično tijelo CSN-a, a središnji aksoni potom završavaju u nucleus tractus solitarius. U zaključku se može reći da se periferna kemoreceptorska petlja sastoji od četiri jednako važna dijela; 1) perifernih kemoreceptora, 2) CSN-a, 3) respiracijskih integracijskih centara moždanog debla i 4) neuromehaničke veze između moždanog debla i dišnih mišića. Za pravilno djelovanje potrebna je funkcionalna cjelovitost svakog dijela.

Za razliku od karotidnih tjelešaca koja prvenstveno sudjeluju u ventilacijskim, uloga aortalnih tjelešaca je sudjelovanje u cirkulacijskim odgovorima.

Mjesta SŽS u kojima se vrši raspoznavanje, odnosno koja su osjetljiva na kisik i koja pokreću respiracijsku i simpatičku aktivnost, identificirana su u talamusu, hipotalamusu, ponsu i meduli oblongati (15- 20).

Središnji kemoreceptori locirani su u području moždanog debla. Studije su pokazale da je najpovršnije područje rostralne ventralne medule, tj. područje površinskih dijelova nukleusa retrotrapezoideusa/parafacijalna respiracijska skupina, nucleus parapyramidalis superficialis i nucleus raphae pallidus, važno za središnju kemorecepciju (21). I dalje se smatra da se raspoznavanje CO₂ prvenstveno odvija u SŽS, odnosno u središnjim kemoreceptorima, dok su za raspoznavanje O₂ odgovorni periferni kemoreceptori. Ipak, u pojedinim dijelovima SŽS odvija se i raspoznavanje O₂. Za raspoznavanje CO₂ u SŽS znalo se puno prije otkrića perifernih kemoreceptora. Raspoznavanje se odvija u neuronima i neurofilamentima (22). Zanimljivo je spomenuti da podatci dobiveni istraživanjem na pokusnim životinjama kojima su obostrano odstranjena karotidna tjelešca pokazuju značajno snižavanje aktivnosti središnjih kemoreceptora. Međutim, ta se aktivnost relativno brzo vraća na preoperacijske uvjete zahvaljujući središnjoj neuralnoj plastičnosti (23- 26).

2.2.5. Opća anestezija

Kroz cjelokupnu povijest čovječanstvo je rabilo različite prirodne pripravke i fizikalne metode u cilju smanjenja boli. Podatci sežu daleko u povijest o uporabi kanabisa, mandragore, alkohola i sl. već iz Starog Egipta, 3000. god. prije Nove ere (27). Riječ anestezija grčkog je podrijetla i označava neosjetljivost. Danas se uz taj pojam vezuje i analgezija – bezbolnost. Navodno je grčki filozof Dioscorides prvi uporabio izraz anestezija u prvom stoljeću naše ere, da bi opisao učinak biljke mandragore (28).

Nova era anestezije započela je izolacijom kisika i sintezom dušikova oksidula krajem 18. stoljeća (27). Prvi opći anestetici bili su inhalacijski: eter, dušikov oksidul i kloroform. Crawford Long, američki liječnik, izveo je prvu etersku anesteziju 1842. god., međutim tek je William Morton 16. listopada 1846. u Bostonu izveo prvu opću anesteziju eterom, objavljenu javnosti (27). U našim krajevima prvi je put izvedena opća anestezija u Zadru 13. ožujka 1847. Izveo ju je Ivan Bettini (29).

Opća anestezija rezultat je reverzibilnih promjena u neurološkoj funkciji, uzrokovanih lijekovima. Očituje se promijenjenim fiziološkim stanjem čije su karakteristike privremeni gubitak svijesti te amnezija, analgezija, inhibicija bolnih refleksa, smanjenje odgovora autonomnog živčanog sustava i relaksacija skeletnih mišića. Reverzibilne promjene u neurološkoj funkciji uzrokuju gubitak percepcije i reakcije na bol, nesvjesnost neposrednih događanja i gubitak sjećanja na njih. Farmakološki mehanizmi za takvo reverzibilno neurološko događanje uključuju učinke lijekova na različitim razinama, uključujući i molekulsku. Međutim, unatoč važnosti opće anestezije i više od stoljeća intenzivnog istraživanja, molekularni mehanizmi odgovorni za anestezijsko djelovanje i dalje ostaju jedna od neriješenih zagonetki farmakologije (30).

Prema dosadašnjim istraživanjima, čini se da je stanje anestezije vrlo vjerojatno temeljeno na različitim učincima i na multiplim biološkim mjestima djelovanja (27). Ipak, kako se

znanje kontinuirano povećava zahvaljujući brojnim istraživanjima, danas nas već zabrinjava mogućnost negativnog učinka anestezije. Nedavno su uočene mogućnosti trajnog nepovoljnog djelovanja anestetika na aktivnost SŽS (27). Na žalost, za sada nema drugih načina za smanjenje boli i patnji tijekom operacijskih zahvata, stoga se u daljnjim istraživanjima može ići samo na poboljšanje sadašnjih mogućnosti.

Danas se rabe dvije osnovne vrste općih anestetika, inhalacijski i intravenski. Inhalacijski anestetici posebno su pogodni za uvođenje u anesteziju pedijatrijskih bolesnika, vrlo često nespremni na prihvaćanje intravenskih linija. Za razliku od njih, odrasli bolesnici najčešće preferiraju brz uvod intravenskim sredstvima. Uz same anestetike, za opću anesteziju rabe se sredstva koja izazivaju analgeziju i mišićnu relaksaciju.

2.2.5.1. Inhalacijski anestetici

Inhalacijski anestetici spadaju u veliku skupinu anestetika sličnog djelovanja. Specifični su po načinu unosa u organizam - udisanjem. Strukturne razlike među inhalacijskim anesticima upućuju na to da oni ne stupaju u interakciju izravno sa specifičnim, jedinstvenim receptorskim mjestom (31). Ipak, određena saznanja upućuju na jedinstveni mehanizam opće anestezije, povezan s fizikalno-kemijskim osobinama anestetika (31). Zbog njihovog jedinstvenog načina davanja, inhalacijski anestetici imaju značajne farmakološke značajke koje drugi anestetici nemaju. Prema osnovnoj podjeli razlikuju se hlapljivi (halotan, enfluran, izofluran, desfluran, sevofluran) i plinoviti (dušikov oksidul, ksenon).

Inhalacijski anestetici sredstva su koja se danas najčešće rabe za provođenje općih anestezija (32). Dodavanje samo male količine inhalacijskog anestetika kisiku dovodi do stanja nesvijesti i amnezije. Popularnost tih sredstava posljedica je njihove jednostavnosti u primjeni i mogućnosti nadgledanja učinka uz pomoć kliničkih znakova i koncentracije na

kraju izdaha. Najčešće rabljeni inhalacijski anestetici su sevofluran, desfluran i izofluran. Danas se značajno manje koristi halotan, ali kao jedan od prvih inhalacijskih anestetika predstavlja određeni standard među anesticima.

Dušikov oksidul i ksenon su pri normalnom tlaku zraka plinoviti, dok su ostali u tekućem stanju. Hlapljivi ili volatilni anestetici primjenjuju se putem posebnih isparivača (vaporizatora) u sklopu anesteziološkog uređaja.

Uz opću anesteziju javljaju se dva problema:

1. široko i nespecifično vezivanje inhalacijskih anestetika u SŽS, što onemogućuje jasno razlikovanje specifičnih i nespecifičnih mjesta vezivanja;

2. za sada nema specifičnog spoja koji bi antagonizirao opću anesteziju.

Stoga smo u nedostatku snažnih kemijskih antagonista prisiljeni rabiti alternativne putove procjene navodnih mjesta odgovornih za anesteziju u SŽS-u.

Iako danas još uvijek postoje dvojbe o mjestu anestezijskog djelovanja inhalacijskih anestetika, kako na makroskopskoj, tako i na mikroskopskoj i molekularnoj razini, ipak, prihvaćeno je mišljenje da postoje dvije odvojene anatomske lokacije na koje djeluju inhalacijski anestetici:

- a) supraspinalna, odgovorna za amneziju te

- b) spinalna, odgovorna za prevenciju pokreta pri bolnim podražajima (31).

Inhalacijski anestetici prekidaju neuronski prijenos u mnogim dijelovima mozga. Mogu pojačati ili oslabiti ekscitacijski ili inhibicijski prijenos kroz akson ili sinapsu. Otkriveni su i pre- i postsinaptički učinci. Bez obzira na makroskopsko mjesto djelovanja, pravi učinak inhalacijskih anestetika je na neuronskoj membrani (31). Mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika nije jasan i izaziva nedoumice, naročito molekularni mehanizmi (33).

Radi međusobne usporedbe pojedinih inhalacijskih anestetika i njihove potentnosti tj. indeksa anestetičke snage rabi se tzv. minimalna alveolarna koncentracija (MAC). MAC je

definiran kao parcijalni tlak plina u alveolama, prikazan kao postotak od jedne atmosfere, pri kojem 50% subjekata neće reagirati na standardni bolni podražaj. Analogan je ED₅₀ intravenskih lijekova, odnosno anestetika. Vrijednost od 1 MAC za različite anestetike je različita. Također se vrijednosti MAC istog anestetika razlikuju za pojedine životinjske vrste uključujući i čovjeka (34).

Halotan je u uporabi već više desetljeća. Unatoč tome i dalje je vrlo popularan. Pripada skupini halogeniranih alkana. Upotrebljava se za uvod i održavanje anestezije. Minimalna alveolarna koncentracija u ljudi iznosi mu oko 0,75%. Ima jako izraženu metaboličku razgradnju, koja se kreće između 15 i 20%. Svi hlapljivi anestetici, uključujući halotan, djeluju depresivno na kontraktilnu funkciju srca, a djelovanje je izraženije na miopatskom srcu. Nadalje, značajnije dovode do miokardijalne depresije na ishemičnom srcu. Međutim, hlapljivi anestetici imaju i vrlo važan pozitivan učinak na mehaničku funkciju srca tijekom ishemije i reperfuzijske ozljede.

Halotan, kao i ostali anestetici iz te skupine, uzrokuju izravno negativno kronotropno djelovanje. Ipak, promjene u srčanom ritmu prvenstveno su određene interakcijom anestetika i baroreceptorske refleksne aktivnosti, koju halotan smanjuje.

Izofluran je halogenirani metil-etil-eter. Na sobnoj temperaturi je bistra, nezapaljiva tekućina, intenzivnog, nadražujućeg mirisa. MAC u ljudi je oko 1,2%. Postao je „zlatni standard“ za inhalacijske anestetike od 1970. kada je uveden u uporabu. Ne koristi se za uvod, već samo za održavanje anestezije.

Neko vrijeme postojalo je nesuglasje vezano uz mogućnost izazivanja fenomena koronarne „krađe“ pri uporabi izoflurana zbog vrlo snažnog utjecaja na vazodilataciju koronarnih arterija, međutim, u kliničkoj primjeni ta mogućnost iznimno je rijetka (32).

Sevofluran je fluorirani metil-izopropil-eter, slatkastog mirisa. Ne nadražuje dišne putove kao izofluran. Upola je slabiji od izoflurana (MAC u ljudi je približno 2,0%). Snažan je bronhodilatator te je također upola slabiji koronarni vazodilatator u odnosu na izofluran (32). Rabi se, kako za uvođenje, tako i za održavanje opće anestezije. Posljednjih godina postaje sve popularniji i sve češće se rabi, unatoč cijeni.

2.2.6. Hipoksija i hipoksijski ventilacijski odgovor (HVR)

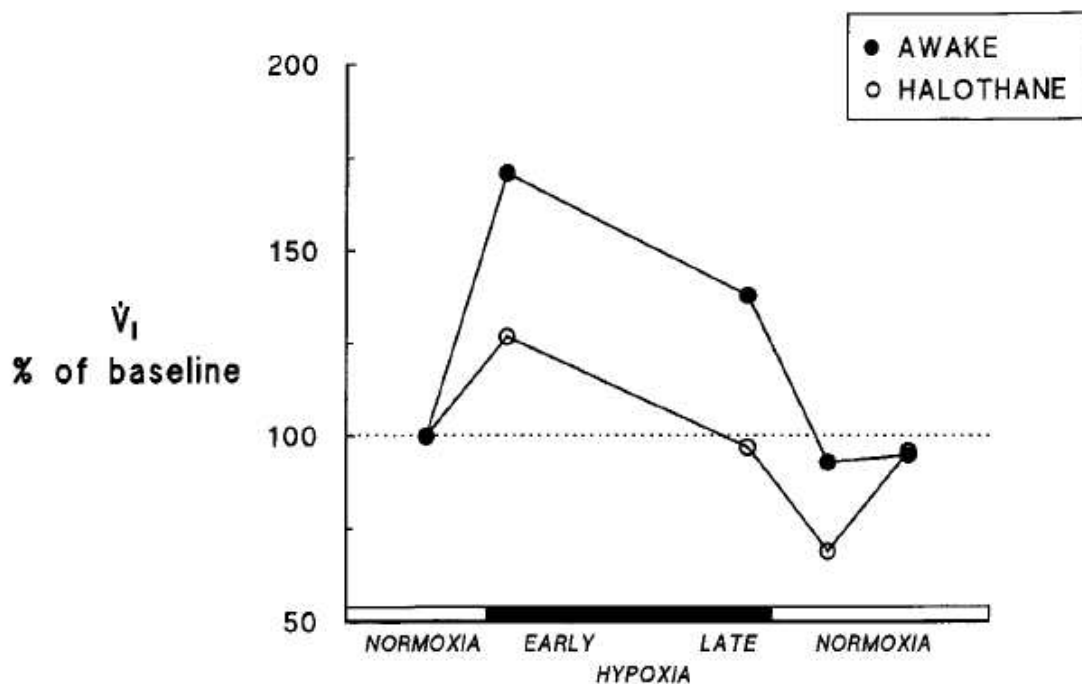
Disanje omogućuje organizmu dobivanje primjerene količine kisika, a respiracijski poremećaji dovode do sustavne hipoksije. Unutar nekoliko sekundi nakon nastanka, sustavna hipoksija pobuđuje disanje i povisuje arterijski tlak (10). U pomanjkanju tih kompenzacijskih kardio-respiracijskih odgovora sustavna hipoksija dovela bi do tkivne, odnosno stanične hipoksije, koja ima potencijalno poguban učinak. Način na koji se sustavna hipoksija prepoznaje i kako pobuđuje kompenzacijske mehanizme bila je nepoznanica do dvadesetih godina prošlog stoljeća. Do tada se smatralo da se hipoksija prepoznaje u SŽS (10). Taj je stav izmijenjen otkrićem karotidnih tjelešaca.

Pri nastupu hipoksije, organizam odgovara vrlo brzim povećanjem minutne ventilacije, koja nastaje zbog aktivacije perifernih kemoreceptora. Međutim, hipoksijski ventilacijski odgovor u kralježnjaka nije rezultat samo jednog, nego je složena međuigra nekoliko mehanizama.

Hipoksija je stanje sniženog parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi (p_aO_2) ispod 60 mmHg odnosno sniženje p_aO_2 u organima, tkivima i stanicama (4). Hipoksija pokreće složeni respiracijski odgovor u sisavaca (35, 36). Stimulira aktivaciju perifernih, ali ne i središnjih kemoreceptora (37-39). Ventilacijski odgovor na hipoksiju važan je refleks koji osigurava primjerenu izmjenu plinova te se mijenja ovisno o razini CO_2 , starosti, uvježbanosti i genetskim čimbenicima (40). Ventilacijski odgovor izazvan hipoksijom u sisavaca je složen i

ovisan o vremenu trajanja. Posljedica je jedinstvenog neuralnog mehanizma, razlučivog na temelju vremena, ventilacijskih i neurokemijskih promjena (35, 36). Unutar akutne kratke hipoksije (do 5 min) dolazi do hipoksijskog ventilacijskog odgovora (HVR) koji se temelji na barem tri mehanizma: akutni odgovor, kratkotrajno potenciranje i kratkotrajna depresija (35, 36, 41).

U čovjeka tijekom blage do umjerene hipoksije (zasićenost periferne krvi do 80%), dolazi do brzog početnog povećanja ventilacije, nakon čega slijedi polagano sniženje, unutar 5 minuta, do postizanja nove razine stabilnosti (engl. „steady state“) od 25 do 40% iznad prethodnih (normoksijskih) vrijednosti (42) (slika 2).



Slika 2. Ventilacijski odgovor na izokapnijsku hipoksiju. Hipoksija je inducirana sa šest udisaja i održavana 20 min. U budnom stanju minutna ventilacija (\dot{V}_I) povećala se otprilike za 75% iznad početnih vrijednosti (engl. „baseline“) (*early hypoxia*). Nakon 5 min. vidljiv je blagi otklon prema novim vrijednostima, otprilike 40% iznad predhipoksijskih (*late hypoxia*). Prekidanje hipoksije izaziva trenutni povratak na početne vrijednosti. Tijekom halotanske sedacije (0,15 MAC) ventilacija se u početku poveća za 25%, a daljni tijek krivulje odgovara onom u budnom stanju, s razlikom pri kasnoj hipoksiji (*late hypoxia*) u kojoj je ventilacija nižih vrijednosti od početnih. Prekidanje hipoksije izaziva inicijalno snižavanje vrijednosti na otprilike 30% ispod početnih vrijednosti (preuzeto iz Dahan A. 1996.) (42).

Početno povećanje ventilacije započinje aktivnošću perifernih kemoreceptora, dok je mehanizam polaganog ventilacijskog sniženja pri hipoksiji nejasan, a uključuje promjene u hemodinamici i aktivnost različitih neurotransmitera (42).

2.2.7. Utjecaj hlapljivih anestetika na disanje i hipoksijski ventilacijski odgovor (HVR)

Općenito je prihvaćeno da je anestezija respiracijski depresor koji usporava disanje (43). Hlapljivi anestetici izravno djeluju na mehanizme središnjega nadzora disanja (44). Pri klinički značajnim koncentracijama hlapljivi anestetici mijenjaju veličinu i obrazac disanja (45-49). Utjecaj hlapljivih anestetika na ventilaciju u mirovanju ovisan je o dozi (koncentraciji), a depresija disanja postaje klinički značajna pri dozama $>1,0$ MAC (42). Međutim, akutni ventilacijski odgovor na hipoksiju puno je osjetljiviji i može biti značajno deprimiran u ljudi, čak i sa subanestetskim koncentracijama ($\sim 0,1$ MAC). Točan mehanizam za sada ostaje nepoznat (45). Nadalje, pokazalo se da hlapljivi anestetici imaju snažniji depresivni učinak na perifernu kemosenzitivnost za kisik, nego na središnju za ugljikov dioksid (50-52).

Knill i Gelb bili su prvi koji su ukazali na osjetljivost HVR u ljudi na hlapljive anestetike (45). Novija istraživanja produbila su postojeće spoznaje.

Subanestetske koncentracije hlapljivih anestetika, vrijednosti $\sim 0,1$ MAC, mogu značajno smanjiti odgovor na hipoksiju i hiperkapniju (53-56). Knill, Gelb i sur. ustanovili su da hlapljivi anestetici pri dozama $<0,2$ MAC deprimiraju akutni HVR za približno 50-70% (45, 57-59). Lindahlova skupina izvijestila je u nizu radova da je akutni HVR održan i relativno neizmijenjen pri koncentracijama izoflurana od 0,6 do 1,1 MAC-a (60). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je učinak hlapljivih anestetika na akutni HVR promjenjiv. Različiti anestetici imaju vjerojatno različite kvalitativne i kvantitativne učinke na kontrolu disanja (60, 61). Ta spoznaja u određenoj mjeri može objasniti zašto halotan izaziva

snažnu redukciju u ventilacijskom odgovoru na hipoksiju i hiperkapniju, dok drugi inhalacijski agensi to ne čine (62-65). Nadalje, Pandit i sur. uočili su da sevofluran slabi HVR u manjoj mjeri, približno 20%, što je značajno manje nego kod ostalih hlapljivih anestetika (63). Koh i Severinghaus također ukazuju da i pri višim koncentracijama hlapljivih anestetika (1 MAC) hipoksijski ventilacijski odgovor (HVR) ostaje očuvan (66).

Pandit i sur. nedavno su predložili red potentnosti hlapljivih anestetika u ljudi vezan uz HVR, pri čemu su pretpostavili da je halotan najsnažniji depresor (45, 67), a sevofluran najvjerojatnije najslabiji (62, 63), dok bi izofluran imao intermedijarnu razinu depresije u odnosu na prethodna dva anestetika (68-70).

Pandit u nedavnom članku naglašava da svi podatci dobiveni pri niskim dozama anestetika nisu ponavljani, tako da je do danas zadržan stav da je HVR i pri subanestetskim dozama oslabljen (60).

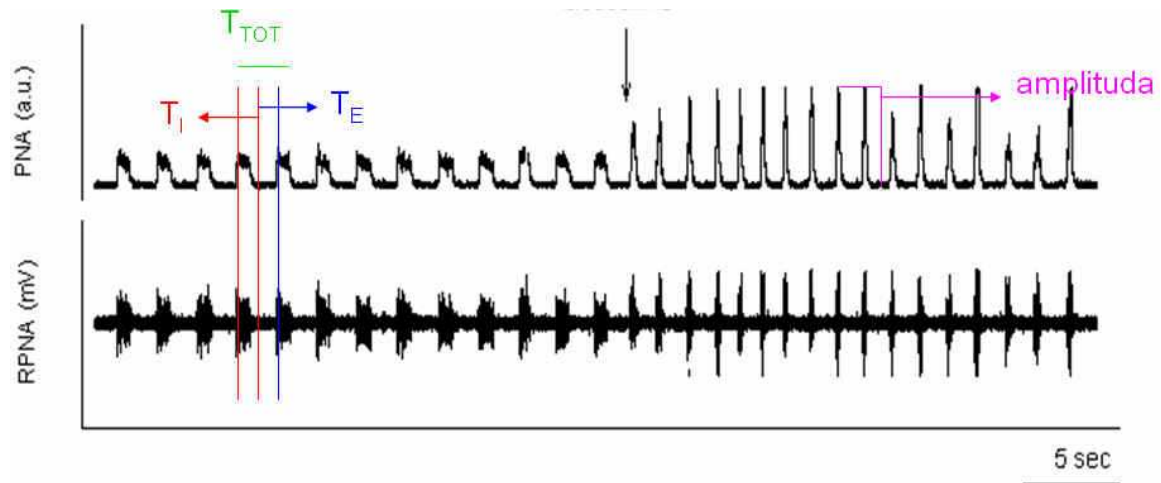
Nadalje, postoje značajni nedostaci u istraživanjima vezanim za navedenu problematiku (71). Ti nedostaci vezani su uz uvjete izazvane hipoksije, prvenstveno s obzirom na hipo- i hiperkapniju. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja posebnu pozornost potrebno je usmjeriti na ustroj studije, metodologiju i moguću primjenu vanjskih podražaja (61, 72, 73). Također, uporaba neuromišićnih relaksansa može rezultirati promjenom HVR-a blokadom nikotinskih acetilkolinških receptora u karotidnim tjelešcima (42, 74, 75) i centralno (76).

2.2.8. Aktivnost freničkoga živca (PNA)

PNA je neuralni ekvivalent respiracijskog volumena, tj. pokazatelj učinka središnje kontrole disanja. Cohen je prvi uporabio autospektralnu analizu freničkoga neurograma da bi razjasnio stvaranje središnjeg obrasca disanja (77).

Krivulja zapisa aktivnosti freničkoga živca ima karakterističan izgled iz kojega se može odrediti trajanje pojedinih faza ciklusa disanja. Iz integriranog signala aktivnosti freničkoga živca moguće je odrediti varijable ritma i obrasca disanja (78) (slika 3).

U ovom istraživanju po prvi put se u *in vivo* modelu usporedio učinak tri hlapljiva anestetika na disanje i na hipoksijski ventilacijski odgovor analizom aktivnosti freničkoga živca štakora.



Slika 3. Karakteristični prikaz aktivnosti freničkoga živca. Faze disanja: udisaj (T_I), izdisaj (T_E), ukupno trajanje ciklusa disanja (T_{TOT}).

3. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

Mehanizam depresije HVR izazvan inhalacijskim anestheticima još uvijek je slabo razumljiv (32).

Dosadašnje spoznaje upućuju na različito djelovanje hlapljivih anestetika pri akutnoj hipoksiji. Kako u istraživanjima na ljudima, tako i u istraživanjima provedenim na životinjama na *in vivo* modelima, najčešće su se istraživale subanestezijske koncentracije hlapljivih anestetika i njihov utjecaj na HVR. Anestezijske koncentracije hlapljivih anestetika veće od 1 MAC rijetko se rabe u tim istraživanjima budući da već i subanestezijske koncentracije dovode do slabljenja HVR. Međutim, upravo anestezijske koncentracije (>1 MAC) važne su tijekom operacijskih zahvata. Razlog što se manja pozornost poklanja anestetiskim dozama vjerojatno je stalna prisutnost anesteziologa tijekom zahvata i njegova spremnost na intervenciju. Stoga se predmnijeva da nema opasnosti za bolesnika pri mogućoj pojavi hipoksije. To je vjerojatno jedan od praktičnih razloga zašto se najčešće istražuju subanestetske koncentracije koje su prisutne u postoperacijskom tijeku.

S druge pak strane, zbog mogućnosti potpunog razumijevanja djelovanja anestetika na respiraciju, potrebno je poznavati učinak i anestezijskih doza tj. koncentracija inhalacijskih anestetika.

Prethodna istraživanja pokazala su da inhalacijski anestetici (halotan, izofluran i sevofluran) smanjuju trajanje, kako inspirija tako i ekspirija u pasa i mačaka (79-81). U ljudi, halotan pri dubini anestezije od 1,1 MAC dovodi do izostajanja akutnog HVR (45). Različiti anestetici vrlo vjerojatno imaju različite utjecaje na HVR.

Prema podacima u literaturi najčešće korištene pokusne životinje u istraživanju kontrole respiracije su psi, mačke i kunići (82, 83). Međutim, nema podataka koji uspoređuju

utjecaj halotana, izoflurana i sevoflurana na HVR praćen promjenom aktivnosti freničkoga živca (PNA) u štakora.

Također treba istaknuti činjenicu da su u ovom istraživanju testirana tri različita hlapljiva anestetika na istom modelu i pod istim uvjetima, čime se postigla primjerena usporedba navedenih anestetika.

4. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je istražiti učinak anestezijskih doza hlapljivih anestetika na aktivnost freničkoga živca pri akutnoj normokapnijskoj hipoksiji.

Budući da je aktivnost freničkoga živca općenito u životinja prihvaćena kao pokazatelj središnjeg nadzora disanja, pratila se navedena aktivnost kao pokazatelj promjena disanja i hipoksijskog ventilacijskog odgovora pri djelovanju inhalacijskih anestetika. Ova studija provedena je radi usporedbe odgovora PNA na akutnu normokapnijsku hipoksiju pod utjecajem halotana, izoflurana i sevoflurana pri različitim razinama anestezije.

Po prvi put se u jednakim laboratorijskim uvjetima i pri istovjetnim vanjskim podražajima, bez uporabe miorelaksansa, u normokapniji, usporedio utjecaj ekvipotentnih anestezijskih koncentracija halotana, izoflurana i sevoflurana na hipoksijski ventilacijski odgovor u štakora mjeren aktivnošću freničkoga živca.

Svrha predloženog istraživanja bila je:

- a) Istražiti hipoksijski ventilacijski odgovor testiranih anestetika kroz promjenu ritma i obrasca freničkoga živca.
- b) Usporediti djelovanje različitih doza pojedinih hlapljivih anestetika na HVR.

Odrediti red potentnosti inhalacijskih anestetika, odnosno potvrditi saznanja dobivena na ljudskom modelu.

Istražiti tzv. „granicu sigurnosti“ za pojedini hlapljivi anestetik, odnosno utvrditi koja je „sigurna koncentracija“ koja se može rabiti pri inhalacijskim anestezijama, a da pri pojavi hipoksije neće izostati zaštitni respiracijski mehanizmi.

- c) Utvrditi postoji li razlika u promjenama ritma i obrasca aktivnosti freničkoga živca pri primjeni različitih hlapljivih anestetika pri jednakim minimalnim alveolarnim koncentracijama.
- d) Utvrditi postoji li razlika u oporavku od HVR između hlapljivih anestetika pri povratku na uvjete prije izazivanja hipoksije (30% kisika).

5. HIPOTEZA

Hipoteza 1: Sva tri testirana hlapljiva anestetika smanjuju ventilacijski odgovor izazvan udisanjem smjese kisika i dušika u omjeru 9% : 91%, uz stabilne ostale čimbenike kao što su PaCO₂ (35-45 mmHg), metabolički status (pH 7.35–7.45) i vanjski podražaji.

Hipoteza 2: Halotan najsnažnije depresivno utječe na disanje i HVR pri istovjetnim razinama MAC, dok je učinak sevoflurana najslabiji.

Red potentnosti inhalacijskih anestetika u štakorskom modelu isti je kao i onaj utvrđen kod ljudi.

Hipoteza 3: Pri oporavku nakon hipoksijske stimulacije izofluran dodatno kratkotrajno pojačava PNA, za razliku od sevoflurana.

6. TVORIVA I POSTUPCI

6.1. MODEL I ETIČNOST POSTUPKA

Pokusi navedeni u izradi ove disertacije prethodno su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u okviru znanstveno-istraživačkih projekata "Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju", br. 216-2163166-6513 MZOŠ RH (voditelj prof. dr. sc. Zoran Đogaš), te „Središnja regulacija kardiovaskularnog i respiracijskog sustava – uloga serotonina“ br. 216-2163166-3342 MZOŠ RH (voditelj doc. dr. sc. Maja Valić). Prikladan model za izvođenje ovih eksperimenata je štakor anesteziran inhalacijskim anestheticima. Svi kirurški postupci na životinjama izvođeni su u odgovarajućoj dubini anestezije. O svim životinjama brinuli su se za to osposobljeni doktor veterine i tehničar. Eutanazija životinja po završetku eksperimenata vršena je predoziranje anestetika te intravenskom primjenom zasićene otopine kalijevog klorida, a u skladu s naputcima American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia (84).

6.2. TESTIRANJE IZVODLJIVOSTI STUDIJE

Istraživanje se provodilo u laboratoriju Zavoda za neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

U postupku planiranja i testiranja izvodljivosti istraživanja provedena je pilot studija na mužjacima štakora Sprague-Dawley, tjelesne mase 300-350 g. Obzirom na zahtjevnost kirurških postupaka morala se osigurati i postići primjerna dubina anestezije. U početnoj fazi koristili smo, uz jedan od hlapljivih anestetika (halotan, izofluran ili sevofluran) i plinoviti dušikov oksidul (N_2O). Međutim, iako se taj anestetik brzo eliminira iz organizma, pokušali smo naći prikladnu dubinu monoanestezije (halotan, izofluran, sevofluran) za planirane

kirurške postupke. Prihvatljivu dubinu ustanovili smo postupnim povećanjem dubine anestezije na 2 MAC i istovremenim smanjivanjem, do isključivanja, primjene N₂O. Ta dubina anestezije pokazala se zadovoljavajućom za kirurške zahvate primijenjene u ovom istraživanju, poput traheotomije, kanulacije arterijskog i venskog sustava te prepariranja freničkoga živca i vagotomije.

Nadalje, zbog etičkih razloga morali smo naći dovoljnu dubinu anestezije pri kojoj životinje nisu osjećale bol, a kojom bismo započeli testiranje. Pri pokušaju provođenja anestezije na nižim koncentracijama anestetika od 1,4 MAC, nije bilo moguće izvoditi kirurške postupke zbog vidljivih bolnih reakcija životinja i promjene arterijskog tlaka. Ta saznanja su slična podacima dobivenim u humanim istraživanjima pri kojima je nađeno da su koncentracije od 1,2 do 1,3 MAC zadovoljavajuće za sprječavanje pokreta pacijenta tijekom anestezije (32). Stoga smo odlučili provesti istraživanje s početnom najnižom dubinom anestezije od 1,4 MAC. Pokazalo se da se uz tu dubinu anestezije uz postignutu zadovoljavajuću analgeziju u potpunosti moglo prijeći na kontrolirano disanje, bez uporabe miorelaksansa.

6.3. FORMIRANJE SKUPINA I RANDOMIZACIJA

Određene su tri ispitne i tri kontrolne skupine laboratorijskih životinja.

Ispitne skupine: Podijeljene su prema korištenom inhalacijskom anestetiku; halotan – H, izofluran – I, sevofluran – S. Halotansku skupinu činilo je 9 pokusnih životinja, izofluransku 14 te sevofluransku 13 štakora.

Kontrolne skupine: Kontrolne skupine (halotanska - KH, izofluranska - KI, sevofluranska - KS) sačinjavale su četiri životinje anestezirane na isti način kao i pokusne, uz isti kirurški protokol, osim pristupa i prepariranja freničkoga živca.

Randomizacija životinja izvršena je vezano uz skupinu (kontrolnu ili pokusnu), a

zatim uz vrstu anestetika te dubinu anestezije, jednostavnim izvlačenjem kuglica iz zatvorene kutije. U prvoj fazi randomizacije određivana je skupina, zatim anestetik, a na kraju se vršio slučajni odabir vezan uz početnu dubinu anestezije.

6.4. ISTRAŽIVANJE

6.4.1. Općeniti postupak

U pokusu su korišteni mužjaci štakora soja Sprague-Dawley, tjelesne mase 300-350 g. Štakori su anestezirani jednim od proučavanih anestetika (halotan – H, izofluran – I ili sevofluran – S), ovisno o protokolu. Uvod u anesteziju započet je stavljanjem štakora u staklenu, prozirnu komoru, volumena 4 l. Posebnim dovodom bila je priključena na anesteziološki uređaj (Draeger „Sula“, Lübeck, Njemačka) preko kojeg se započela anestezija mješavinom dušika (N₂) i kisika (O₂) u omjeru 70%:30%, uz protok plinova od 3 l min⁻¹. U prvoj minuti štakori su bili izloženi dubini anestezije, tj. minimalnoj alveolarnoj koncentraciji 3 MAC, s postupnim snižavanjem koncentracije unutar 3 minute na 2 MAC. Rabljeni su isparivači za inhalacijske anestetike (Dräger, Lübeck, Njemačka, 19.1 za halotan, 19.3 za izofluran i sevofluran).

Nakon postizanja zadovoljavajuće dubine anestezije koja je provjeravana izostankom reakcije na bolni podražaj šape pokusne životinje, nastavilo se anestezijom na masku (posebno prilagođena maska za male pokusne životinje) uz protok plinova od 1 l min⁻¹. Nakon toga obrijano je područje kirurškog zahvata. Po pripremi operacijskog polja, učinjena je traheotomija medijalnim pristupom i osiguran dišni put prikladnim metalnim tubusom koji je učvršćen kirurškim koncem. Ventilacija je zatim nastavljena respiratorom za male laboratorijske životinje (SAR 830, CWE Inc., Ardmore, SAD) po tipu kontrolirane ventilacije, bez uporabe neuromišićnih relaksansa, uz PEEP od 2 cm vodenog stupca. Dubina anestezije po potrebi se mijenjala i prilagođavala. Svim životinjama učinjena je obostrana

vagotomija, koja je u većini istraživanja uvriježeni dio laboratorijskih protokola u *in vivo* studijama središnje kontrole disanja (9, 85-90), budući da je dobro poznata činjenica da se putem n. vagusa u određene dijelove središnjega živčanog sustava prenose informacije iz plućnih receptora za istežanje. Jedan dio tih istraživanja pokazao je da informacije koje se prenose iz plućnih receptora putem n. vagusa završe u nucleus tractus solitarius čije završne projekcije potom dolaze u VRS. Cilj je u takvim istraživanjima postići stabilne uvjete sa što manjim uplivom informacija s periferije, pa je izvođenje vagotomije metoda izbora za takva istraživanja.

Nakon vagotomije obostrano su kanulirane femoralne vene i arterije radi lakšeg davanja infuzije 0,9% otopine NaCl te mjerenja arterijskog tlaka i uzimanja uzoraka krvi. Uzorci krvi uzimani su u vremenskim razmacima kako bi se arterijske koncentracije plinova i acido-bazni status (ABS) održavali u fiziološkim granicama ($\text{PaCO}_2 \sim 35\text{-}45$ mmHg, $\text{pH} \sim 7.35\text{-}7.45$). Održavanje plinskog statusa i ABS-a postizalo se prikladnom ventilacijom i bolusima fiziološke otopine. Bolus doza fiziološke otopine od 1,5 – 2,0 ml davana je nakon uspostave venskog puta (otprilike 50-60 min nakon uvoda u anesteziju). Zatim se nastavilo s kontinuiranom infuzijom 0,9% NaCl s 25 mM otopinom NaHCO_4 u dozi 1-8 ml h^{-1} pomoću intravenskog perfuzora (PerfusorSpace 688D, Brown, Melsungen, Njemačka).

Koncentracija na kraju izdisaja CO_2 (engl. „end tidal concentration“, ET CO_2) stalno je nadzirana analizatorom plinova GEMINI (CWE Inc., Ardmore, SAD) i održavana u fiziološkim granicama (35-45 mmHg) pomoću postavki broja udisaja (RR) i dišnog volumena (TV). Na početku kontrolirane ventilacije TV je postavljen na 6-8 ml kg^{-1} tjelesne mase (TM), a RR na 45-48 udisaja u minuti.

Prije svake promjene ventilacijskih parametara, uključujući dubinu anestezije, uzimani su uzorci krvi za ABS i plinske analize. Uzorci su uzimani 120-180 s prije i 45-60 s po

nastupu hipoksije te 5 min nakon prekida hipoksije. Radi sprječavanja mogućnosti iskrvarenja štakora rabljene su kapilarne cjevčice.

Rektalna temperatura mjerena je digitalnim toplomjerom i održavana između 37 i 38.5 °C pomoću vanjske grijaae podloge (FST, Heidelberg, Njemačka).

Štakori su postavljeni u pronacijski položaj u stereotaksijskom okviru (LabStandard, Stoelting, Wood Dale, SAD). Glava životinje fiksirana je ušnim i čeljusnim držačima, tako da je postavljena paralelno s ravnom podlogom. Potom se dorzalno pristupilo freničkom živcu koji je prepariran na razini C₄-C₅ korijena pod kontrolom mikroskopa. Nakon prepariranja živac je postavljen na bipolarne srebrne elektrode, načinjene ručno u Laboratoriju za neuroznanost, koje su se pokazale primjerenima za predviđeno snimanje te zaliven silikonskim gelom da bi se spriječilo isušivanje i poboljšala kvaliteta signala.

6.4.2. Pokusni protokol

Svih šest skupina životinja (tri pokusne skupine [halotan – H, izofluran – I, sevofluran – S] i tri kontrolne [kontrola halotan – KH, kontrola izofluran – KI, kontrola sevofluran – KS]) bile su izložene hipoksiji pri četiri dubine anestezije (1,4; 1,6; 1,8 i 2,0 MAC). U skupini H bilo je ukupno 9 životinja, dok je u I skupini bilo 14 te u S skupini 13 životinja. Obzirom da je istraživanje u ovoj disertaciji provođeno na laboratorijskim životinjama, vrijednosti MAC primjenjivanih u ovom istraživanju ispravljene su u skladu s vrijednostima MAC koje se uvriježeno koriste u kliničkoj praksi, kako slijedi: za vrijednost 1,0 MAC halotana u štakora uzeta je vrijednost 1,0% koncentracije na kraju izdisaja (ETkoncentracija) (86), za 1,0 MAC izoflurana u štakora vrijednost je 1,46% ETkoncentracije (86) te 1,0 MAC sevoflurana u štakora uzeta je vrijednost od 2,4% ETkoncentracije (87) u izdahnutom zraku.

Kontrolne skupine (KH, KI, KS) od po četiri životinje bile su anestezirane na isti način kao i pokusne uz isti kirurški protokol osim pristupa i prepariranja freničkoga živca. Praćeni su svi parametri arterijskog tlaka i plinskih analiza kao i u ispitnim skupinama.

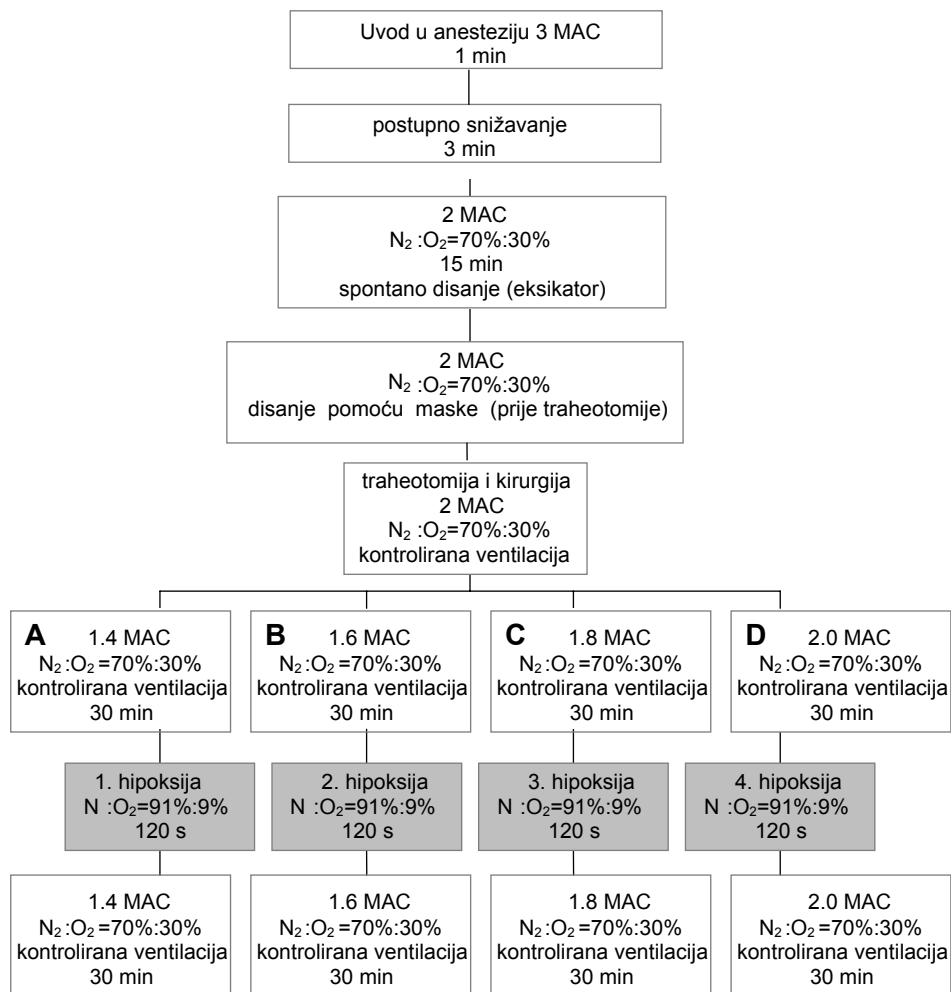
Po okončanju kirurškog postupka za pristup i snimanje aktivnosti freničkoga živca (PNA) pri anesteziji od 2,0 MAC, dubina anestezije prilagođavana je na vrijednost određenu randomizacijom. Nakon prelaska na nižu dubinu anestezije ventilacija je provedena 30 min mješavinom od 70% N₂ i 30% O₂ uz protok od 1 l min⁻¹ kako bi se postigla željena dubina anestezije. Koncentracija plinova na kraju izdisaja – ET koncentracija, nadzirana je monitorom Dräger PM 8050 (Dräger, Lübeck, Njemačka).

Nakon postizanja stabilnog PNA na željenoj dubini anestezije (1,4; 1,6; 1,8 ili 2,0 MAC) životinje su izložene ventilaciji hipoksičnom smjesom (91% N₂ i 9% O₂) tijekom 120 sekundi. Po prestanku 120 sekundi ventilacije s hipoksičnom smjesom uz pojedini anestetik (H, I, S), nastavljeno je ventilacijom uz uporabu mješavine 70% N₂ i 30% O₂ dok se PNA nije vratila na početne vrijednosti, a zatim se produžavala ventilacija s navedenim koncentracijama tijekom dodatnih 30 min.

Sljedeći korak je bilo povećanje ili smanjenje dubine anestezije, ovisno o randomizaciji na narednu vrijednost MAC za pojedini anestetik. Nakon postavljanja isparivača na traženu koncentraciju vrijednosti MAC, životinje su ventilirane tijekom 30 minuta da bi se postigla željena dubina anestezije i *steady state*. Hipoksijski podražaj je ponavljan kao u prethodnom izlaganju.

Isti postupak je ponavljen za sve četiri dubine anestezije u svih pokusnih skupina (slika 4).

Na kraju svakog pokusa životinje su bile eutanazirane u dubokoj anesteziji i intravenskim bolusom od 5 ml 7,45% KCl. Nakon ustanovljenja prestanka srčanog rada praćenjem krivulje srednjega arterijskog tlaka, životinje su odvajane od respiratora.



Slika 4. Prikaz protokola. Nakon traheotomije pri kontroliranoj ventilaciji kirurški postupak je završen. Protokoli A, B, C, D provedeni su na svakoj pokusnoj životinji anesteziranoj jednim anestetikom (halotan, izofluran ili sevofluran).

6.4.3. Ulazni parametri

- tjelesna masa u gramima (vaganje je obavljeno u „nastambi“ za pokusne životinje)
- vrijeme početka anestezije
- vrijeme početka kirurške pripreme
- rektalna temperatura
- arterijski tlak prije hipoksije
- PNA prije hipoksije

- koncentracija O₂ u arterijskoj krvi u mmHg prije hipoksije
- koncentracija CO₂ u arterijskoj krvi u mmHg prije hipoksije
- vrijednost pH u arterijskoj krvi prije hipoksije
- koncentracija CO₂ u izdahnutom zraku prije hipoksije
- ET koncentracija inhalacijskih anestetika prije izlaganja hipoksiji
- Ventilacija: frekvencija – broj udisaja u minuti; udisajni volumen u ml

6.4.4. Izlazni parametri

- ET koncentracija inhalacijskih anestetika pri izlaganju hipoksiji
- Vremensko razdoblje od početka hipoksije do pojave hipoksijskog ventilacijskog odgovora
- Aktivnost freničkoga živca za vrijeme i nakon hipoksijskog podražaja:
 - Razlike u PNA ovisno o uporabljenom anestetiku i dubini anestezije za vrijeme i neposredno nakon hipoksije te nakon oporavka, u odnosu na kontrolne vrijednosti pred hipoksiju
 - Veličina amplitude PNA za vrijeme i nakon hipoksije
 - Razlike u obrascu i ritmu PNA
- Promjene u arterijskom tlaku za vrijeme i nakon hipoksijskog podražaja
- Promjene u koncentracijama arterijskog CO₂ za vrijeme i nakon hipoksijskog podražaja
- Promjene u koncentracijama arterijskog O₂ za vrijeme i nakon hipoksijskog podražaja
- Promjene u vrijednostima pH za vrijeme i nakon hipoksijskog podražaja

6.4.5. Prikupljanje i analiza podataka

Tijekom pokusa bilježena je aktivnost freničkoga živca, a mjerena je desetak sekundi prije, tijekom same hipoksije te posthipoksijski do povratka aktivnosti živca na izgled zapisa prije izazvane hipoksije. Elektrofiziološki signal živca usmjeren je do pojačala (System 1000, CWE Inc., Ardmore, SAD). Takozvana „moving-time“ prosječna aktivnost freničkoga živca ili frenički neurogram bilježen je i rabljen za određivanje trajanja udisaja i izdisaja, kao i za određivanje amplitude aktivnosti freničkoga živca. Signal je bilježen pomoću Power-Lab sustava u elektronskom zapisu (ADI Instruments, Chalgrove, Velika Britanija), a analiziran MATLAB 2007b sustavom (Mathworks, Inc. Natick. SAD).

U slučajevima da PNA nije bila u vidljivom spektru (životinje koje nisu disale jer su bile ispod praga disanja) koristili smo *pwelch* metodu za registriranje svake i minimalne aktivnosti freničkoga živca. To je složena metoda registriranja frekvencije i posljedične rekonstrukcije amplitude signala prekrivenog bukom (šumom) pomoću spektralne analize. Usrednjeni spektar za analizu izveden je kako slijedi: PNA digitalno je filtrirana između 1,5 - 120 Hz nakon čega je izvršeno smanjenje rezolucije signala („down –sampled“) na 400 Hz. Pedeset sekundi trajanja PNA signala bez detektabilnih amplituda podvrgnuto je Fourierovoj analizi (računalna metoda Fourierove transformacije) za procjenu snage spektra kratkih segmenata (duljina prozora 1024 točke) (91-93). Navedeni algoritam integralni je dio *pwelch* algoritma, ugrađenog u MATLAB sustav. Nakon usrednjavanja vrijednost je ponovno izračunavana iz dobivenog spektra. Na taj način smo mogli registrirati, mjeriti i analizirati PNA signal čak i ispod vidljivoga praga disanja.

6.4.6. Statistička analiza

Izračun potrebne veličine uzorka i snage statističkog testa (t-test) za usporedbu vršnih amplituda freničkoga živca izvršen je *a priori* metodom. Vrijednost ulaznih parametara je

procijenjena iz rezultata pilot istraživanja pri dubinama anestezije od 1.4 MAC. Na temelju rezultata procijenjeno je da je minimalni broj životinja u skupini kojim se postiže snaga od $\geq 80\%$ jednak 6 ($\alpha=0,05$).

PNA je analizirana u odnosu na duljinu trajanja udisaja (T_I), duljinu trajanja izdisaja (T_E), trajanje cijelog ciklusa (T_{TOT}) te veličinu vršne amplitude aktivnosti freničkoga živca. Aktivnost freničkoga živca izražena je kao postotak promjene u odnosu na predhipoksijske vrijednosti. Apsolutne vrijednosti svih varijabli usrednjene su za period 25 s prije hipoksije (engl. „baseline“) te za 25 s nakon dostizanja stabilnog hipoksijskog odgovora.

Nakon završene hipoksijske stimulacije pričekalo se na vraćanje amplitude aktivnosti freničkoga živca na predhipoksijsku veličinu za koju je uzeta vrijednost od 100% u svake životinje.

Sve prosječne vrijednosti i odstupanja izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. GLM model analize varijance uporabljen je za usporedbu između skupina u ponovljenim mjerenjima uz Bonferroni post hoc korekciju što je omogućilo pouzdaniju analizu promjene amplitude PNA pri hipoksijskom odgovoru s obzirom na veličinu uzorka i broj ponovljenih mjerenja. Statistička značajnost određena je na razini $P < 0,05$.

7. REZULTATI

Rezultati istraživanja koji su prikazani u nastavku provedeni su na ukupno 36 štakora u pokusnim i 12 štakora u kontrolnim skupinama. Pokusne skupine sastojale su se od 9 štakora anestetiziranih halotanom, 14 anestetiziranih izofluranom te 13 anestetiziranih sevofluranom (tablica 1). Svaka životinja bila je izložena akutnoj hipoksiji pri četiri različite dubine anestezije (vidi sliku 4). Rezultati pokazuju kako kvalitativnu, tako i kvantitativnu razliku u učincima halotana, izoflurana i sevoflurana na aktivnost freničkoga živca u odgovoru na akutnu normokapnijsku hipoksiju u štakora. HVR je snažnije deprimiran pod utjecajem halotanske nego izofluranske ili sevofluranske anestezije.

7.1. UČINCI HALOTANA NA SPONTANU PNA I HVR

U svih životinja anestetiziranih halotanom (n=9) spontana frenička aktivnost u potpunosti je bila ugašena na najnižoj dubini anestezije (1,4 MAC) (tablica 1). Odsutnost PNA ostala je nepromijenjena i pri izlaganju hipoksijskom podražaju (tablica 1, slika 5 i 8). Isti učinak halotan je pokazao na PNA i HVR i na sljedećim dubinama anestezije od 1,6; 1,8 te 2,0 MAC (tablica 1, slika 5, 8 i 12).

7.2. UČINCI IZOFLURANA NA SPONTANU PNA I HVR

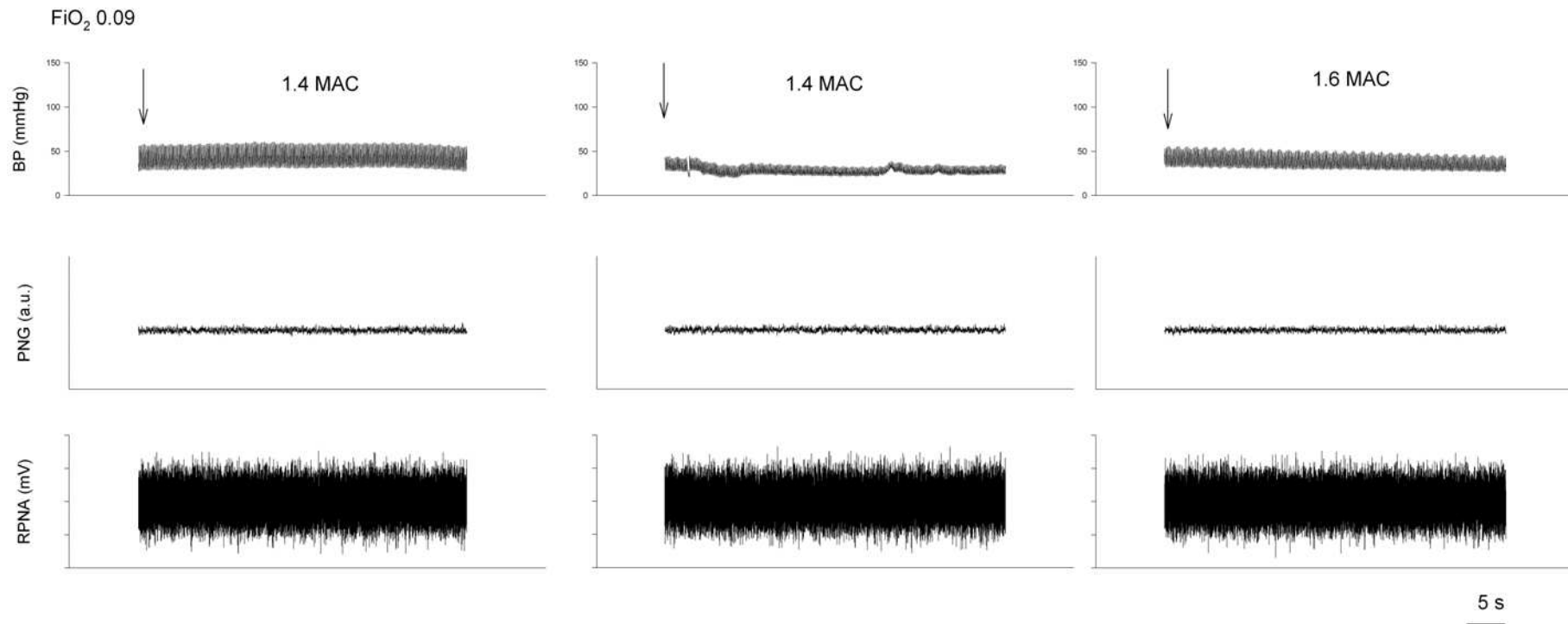
Od 14 životinja anestetiziranih izofluranom spontana aktivnost freničkoga živca bila je prisutna u 5 štakora, dok je u ostalih 9 u potpunosti bila ugašena na najnižoj dubini anestezije (1,4 MAC) (tablica 1 i slika 6 i 8). Na dubinama anestezije od 1,6, 1,8 i 2,0 MAC spontana PNA bila je u potpunosti ugašena (tablica 1 i slika 6 i 8). Hipoksijski podražaj pri dubini anestezije od 1,4 MAC u 10/14 životinja izazvao je značajno povećanje u vršnoj amplitudi

Tablica 1. Vidljiva aktivnost freničkoga živca u štakora u vremenu prije hipoksije i za vrijeme hipoksije pod različitim anestetikima i pri različitim dubinama anestezije.

* Broj životinja s vidljivim PNA signalom (životinje s dišnom aktivnošću) prikazane kao broj tih životinja/ukupni broj proučavanih životinja pod pojedinim anestetikom.

† Binomial test proporcije vidljive PNA aktivacije u hipoksičnim uvjetima u odnosu na *baseline* unutar skupina ($P < 0.05$).

Životinje s vidljivim PNA signalom*						
Dubina anestezije (MAC)	Halotan (n=9)		Izofluran (n=14)		Sevofluran (n=13)	
	Predhipoksija	Hipoksija	Predhipoksija	Hipoksija	Predhipoksija	Hipoksija
1,4	0/9	0/9	5/14	10/14†	6/13	13/13†
1,6	0/9	0/9	0/14	1/14	4/13	13/13†
1,8	0/9	0/9	0/14	0/14	3/13	8/13†
2,0	0/9	0/9	0/14	0/14	2/13	6/13†

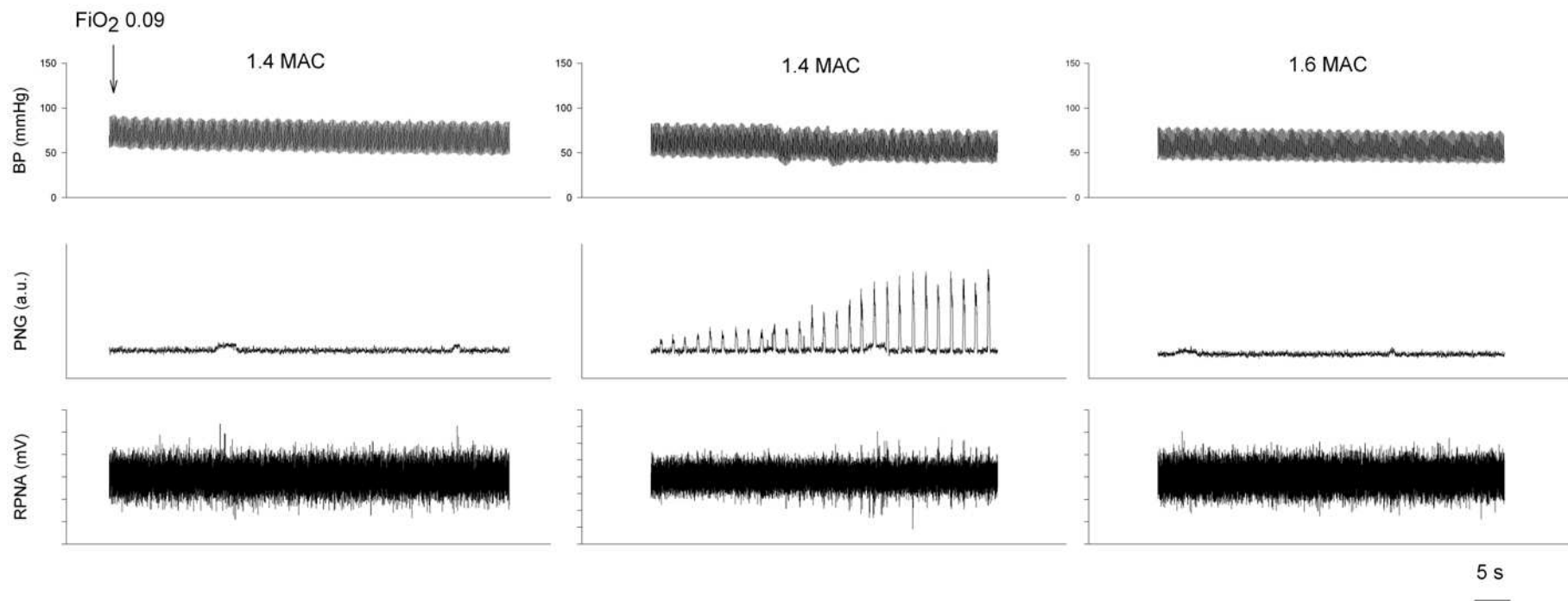


Slika 5. HVR tijekom halotanske anestezije. Odgovori arterijskog krvnog tlaka (BP), integrirane PNA (IPNA) i neobrađene (engl. raw) PNA (RPNA); Lijevo: početak hipoksije nakon postizanja „steady state“ pri dubini od 1,4 MAC. Sredina: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,4 MAC. Desno: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,6 MAC.

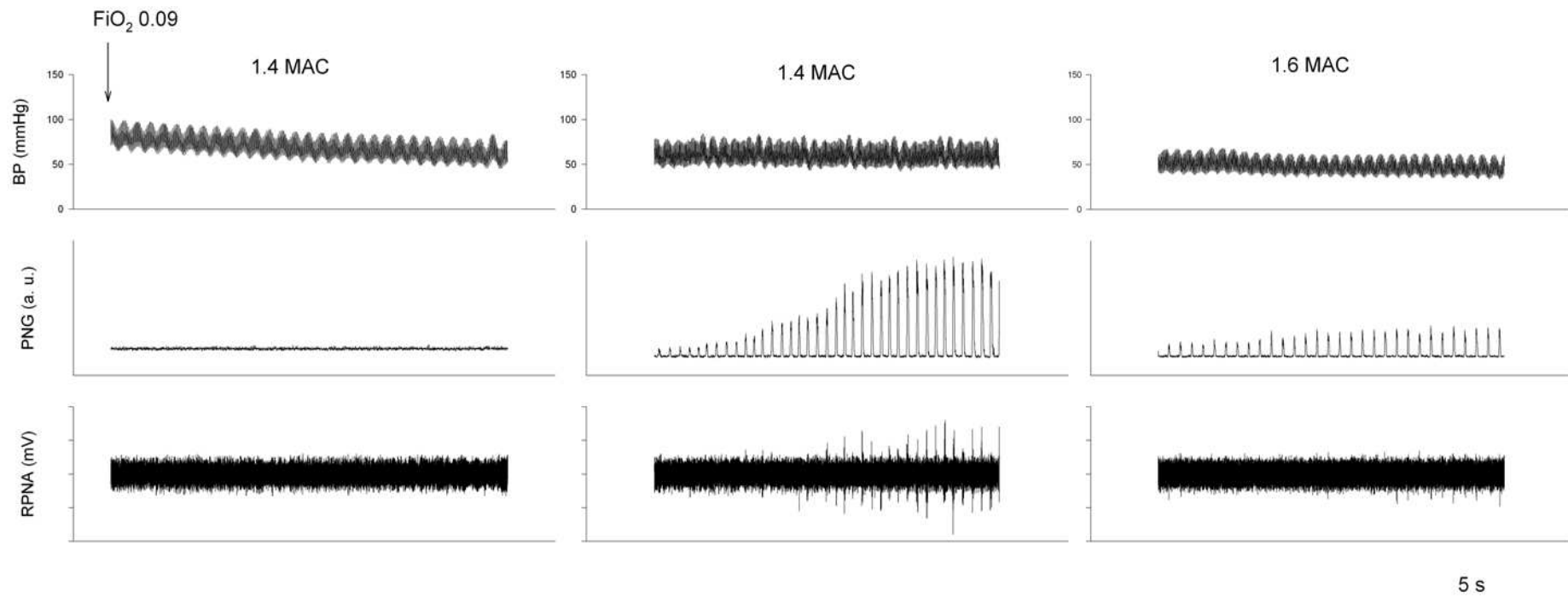
integrirane PNA od $302 \pm 203\%$ u usporedbi s predhipoksijskim vrijednostima, ($P=0.004$) (tablica 1, slika 6, 8 i 12). Na razini 1,6 MAC samo u jedne životinje hipoksijski podražaj pokrenuo je HVR, s povećanjem amplitude od 106%, dok u ostalih životinja hipoksija nije izazvala povećanje PNA (tablica 1). Pri dubinama anestezije od 1,8 i 2,0 MAC izostala je promjena aktivnosti freničkoga živca u odgovoru na akutnu normokapnijsku hipoksiju (tablica 1, slika 8 i 12).

7.3. UČINCI SEVOFLURANA NA SPONTANU PNA I HVR

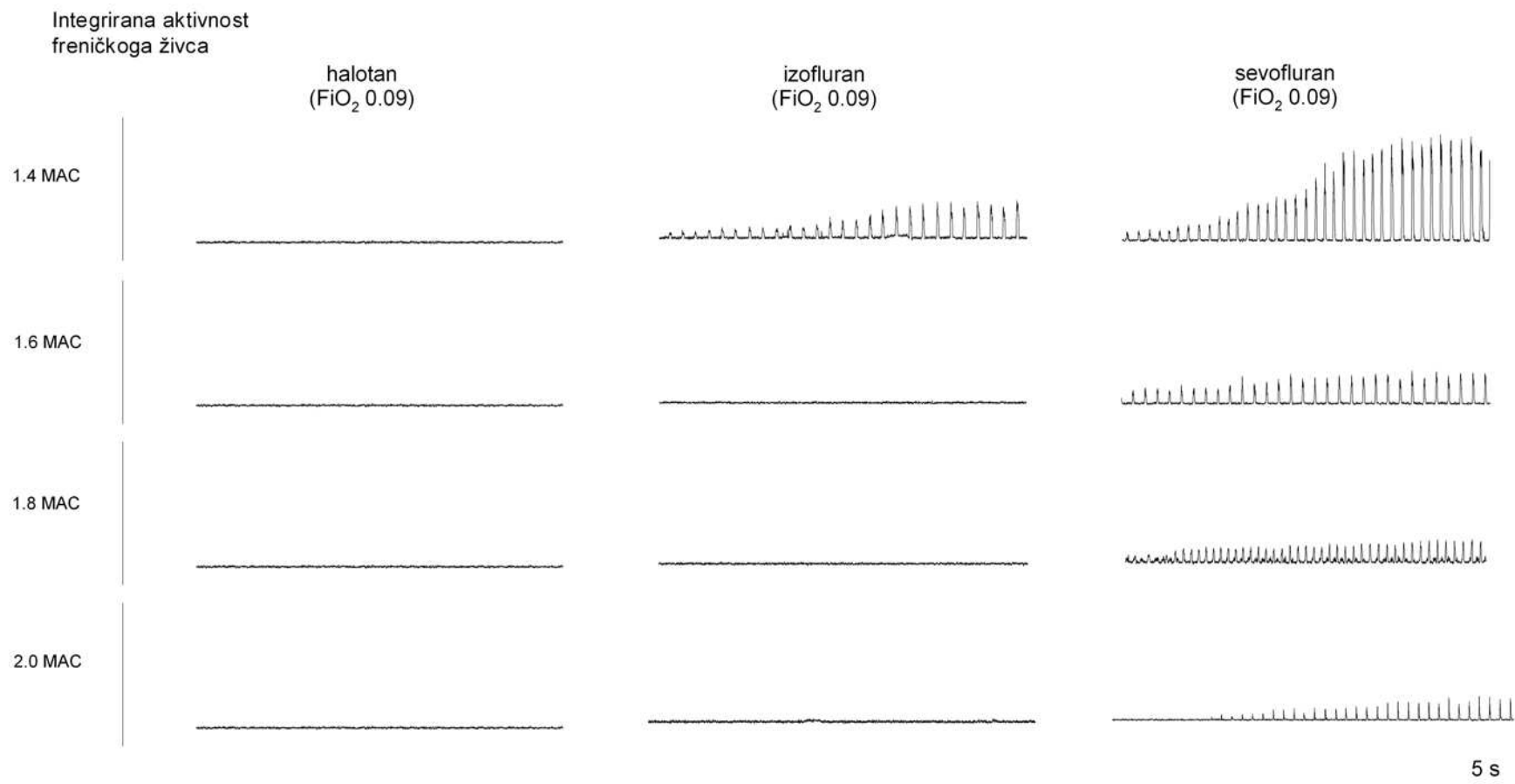
Pri dubini anestezije od 1,4 MAC spontana PNA bila je prisutna u šest od trinaest životinja. Pri dubini anestezije od 1,6 MAC spontana PNA ostala je prisutna u 4 štakora, dok je pri dubini anestezije od 1,8 MAC spontana PNA bila prisutna u 3 te pri 2,0 MAC u 2 životinje (tablica 1). Na dubini od 1,4 MAC izlaganje hipoksiji izazvalo je značajni HVR određen veličinom amplitude integrirane PNA u svih životinja (13/13) za $693 \pm 1091\%$, ($P=0.001$), dok je pri 1,6 MAC kod 13/13 životinja izazvalo HVR određen veličinom amplitude integrirane PNA od $199 \pm 137\%$ ($P=0.033$) (tablica 1, slika 7, 8 i 12). Pri dubinama anestezije od 1,8 MAC nije bilo statistički značajne promjene u amplitudi PNA, dok je HVR izazvan u 8 od 13 životinja ($149 \pm 39\%$, $P=0.237$) (tablica 1, slika 8 i 12). Pri dubini anestezije od 2,0 MAC u 6 štakora zabilježena je aktivnost freničkoga živca od $112 \pm 7\%$, ($P=0.140$) u odgovoru na akutnu normokapnijsku hipoksiju, dok u 7 životinja nije zabilježen odgovor na hipoksiju (tablica 1, slika 8 i 12).



Slika 6. HVR tijekom izofluranske anestezije. Odgovori arterijskog krvnog tlaka (BP), integrirane PNA (IPNA) i neobrađene (raw) PNA (RPNA); Lijevo: početak hipoksije nakon postizanja „steady state“ pri dubini od 1,4 MAC. Sredina: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,4 MAC. Desno: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,6 MAC.



Slika 7. HVR tijekom sevofluranske anestezije. Odgovori arterijskog krvnog tlaka (BP), integrirane PNA (IPNA) i neobrađene (raw) PNA (RPNA); Lijevo: početak hipoksije nakon postizanja „steady state“ pri dubini od 1,4 MAC. Sredina: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,4 MAC. Desno: šezdeset sekundi nakon početka hipoksije pri 1,6 MAC.



Slika 8. Signal freničkoga živca oslikava učinke izlaganja hipoksijskom podražaju ($F_{iO_2}=0.09$) prosječno 60 s od početka hipoksije. Svaki zapis predstavlja tipični odgovor u jedne od pokusnih životinja, ovisno o skupini (halotan, izofluran i sevofluran) pri različitim dubinama anestezije (1,4; 1,6; 1,8, i 2,0 MAC). HVR je najbolje bio očuvan pri sevofluranskoj anesteziji. Preuzeto iz Karanovic N, et al. 2010 (94).

7.4. UČINCI IZOFLURANA I SEVOFLURANA NA PNA U POSTHIPOKSIJSKOJ FAZI

Pri dubini anestezije od 1,4 MAC nakon hipoksijske stimulacije vidljiva je značajna kratkotrajna razlika između izoflurana i sevoflurana u aktivnosti freničkoga živca pri povratku na koncentraciju kisika od 30% (predhipoksijska vrijednost). Naime, u izofluranskoj anesteziji došlo je do kratkotrajnog povećanja aktivnosti freničkoga živca u razdoblju od 5 sekundi nakon izlaganja euoksiji (FiO_2 0,3) u odnosu na PNA u sevofluranskoj anesteziji (slika 9, 10 i 11).

7.5. USPOREDBA UČINKA HALOTANA, IZOFLURANA I SEVOFLURANA NA HVR

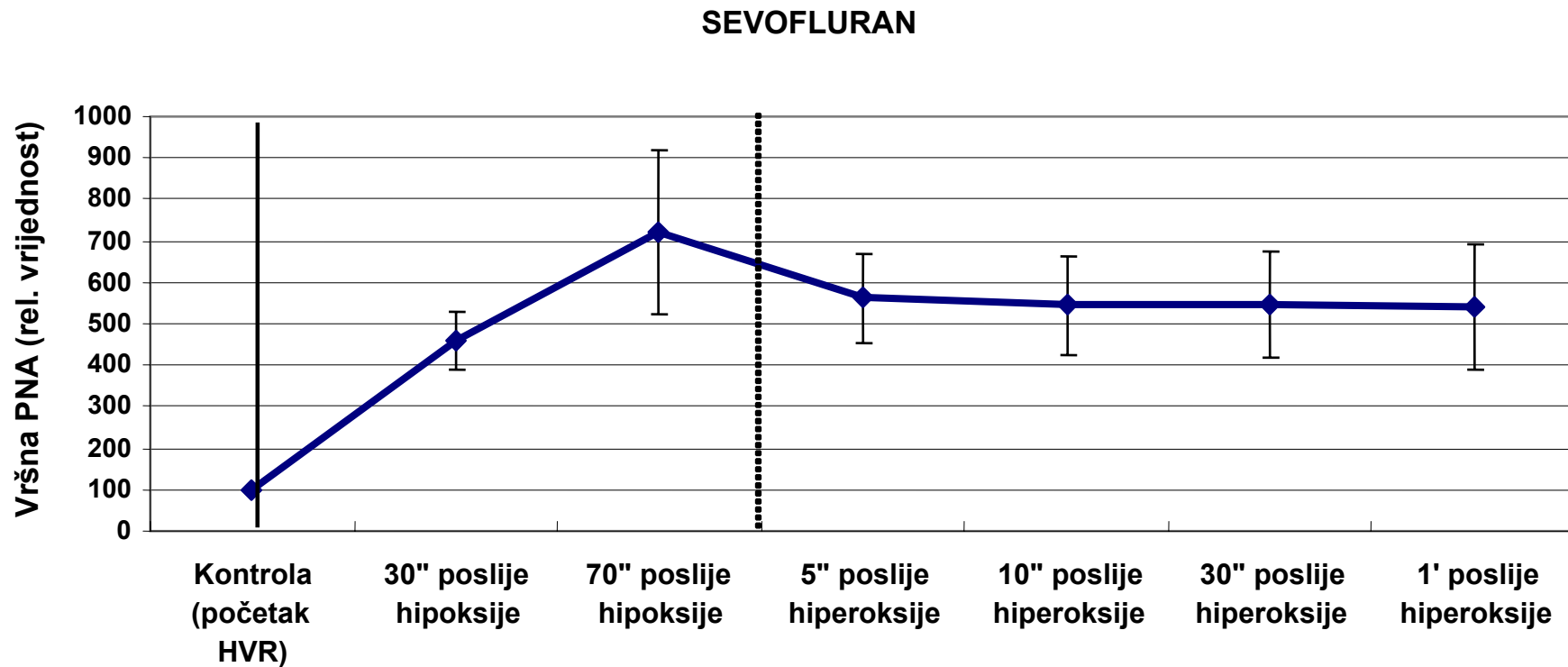
Monoanestezija sevofluranom značajno je bolje očuvala, kako temeljnu (*baseline*) PNA, tako i aktivnost frenikusa tijekom izlaganja hipoksiji u usporedbi s druga dva anestetika (tablica 1).

Halotan je u potpunosti ugasio PNA, kako u temeljnom ritmu prije hipoksije, tako i pri pokušaju izazivanja HVR u svih testiranih životinja (9/9) (tablica 1).

Izofluran je ugasio temeljni ritam prije hipoksije u 9/14 životinja pri 1,4 MAC, dok je pri anestezijama od 1,6; 1,8 i 2,0 MAC temeljni ritam bio ugašen u svih (14/14) životinja. HVR je pokrenut samo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji izoflurana (1,4 MAC) u 10 od 14 životinja, dok su 4 životinje bile apnejične tijekom hipoksijske epizode (tablica 1).

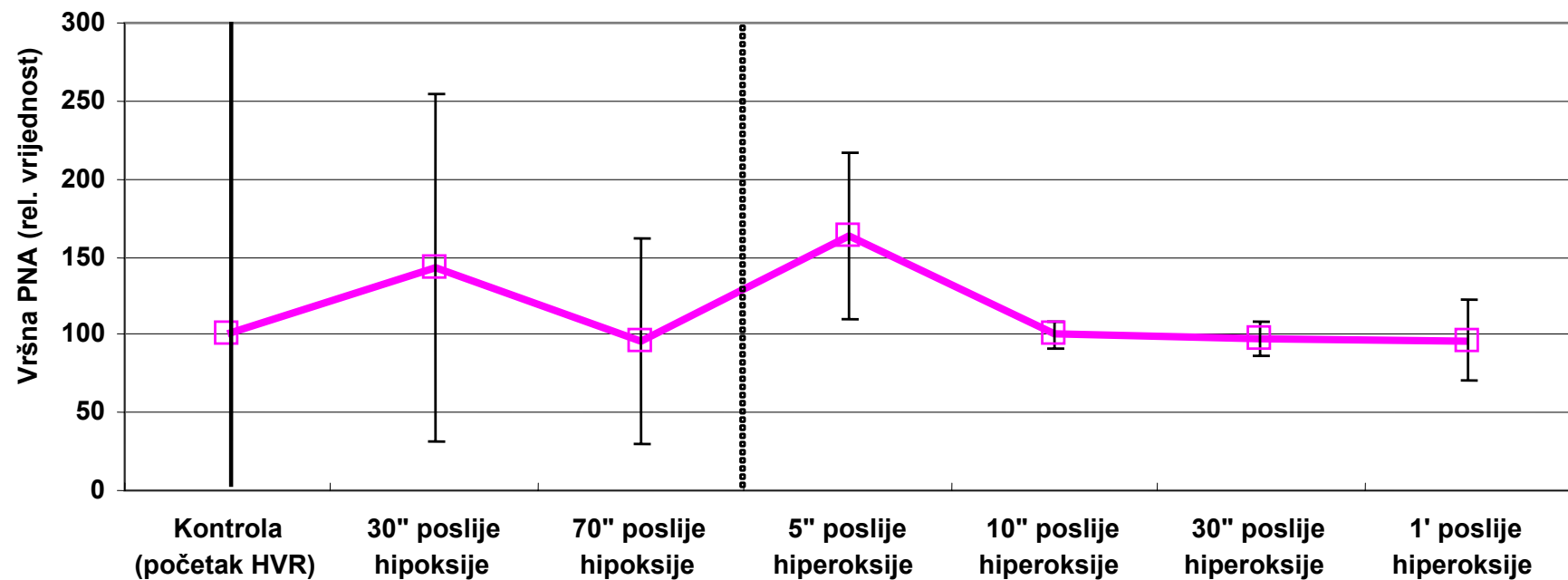
Monoanestezija sevofluranom očuvala je temeljni ritam u 6/13 životinja pri 1,4 MAC. Također je pri 1,6 MAC temeljni ritam sačuvan u 4/13 životinja, dok je pri 1,8 i 2,0 MAC temeljni ritam sačuvan u 3, odnosno 2/13 životinja. HVR je pokrenut u svih (13/13) životinja pri dubini anestezije od 1,4 i 1,6 MAC, dok je samo 5 od 13 životinja bilo apnejično pri 1,8 MAC. Sedam životinja od 13 pri 2,0 MAC sevoflurana bilo je apnejično tijekom hipoksijskog podražaja (tablica 1).

Relativne promjene PNA amplitude za sve ispitivane inhalacijske anestetike pri dubinama od 1.4; 1.6; 1,8 i 2.0 MAC, procijenjene su univarijantnim GLM modelom i prikazane su na slici 12.

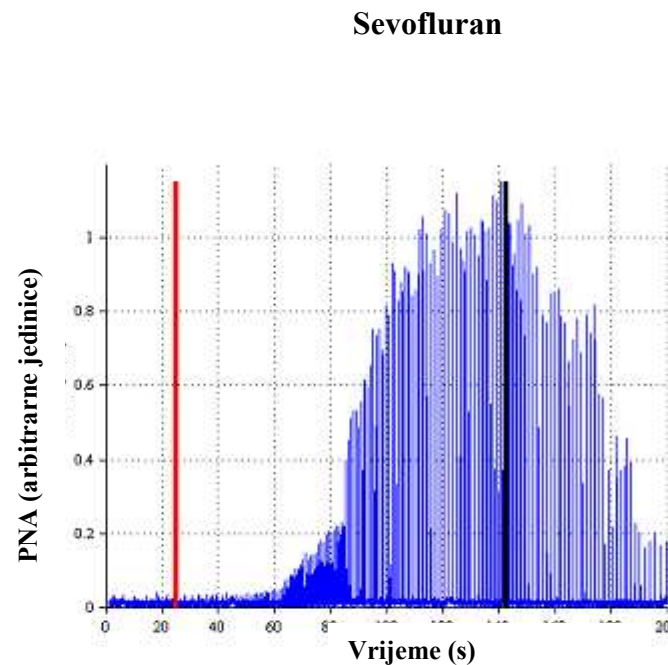
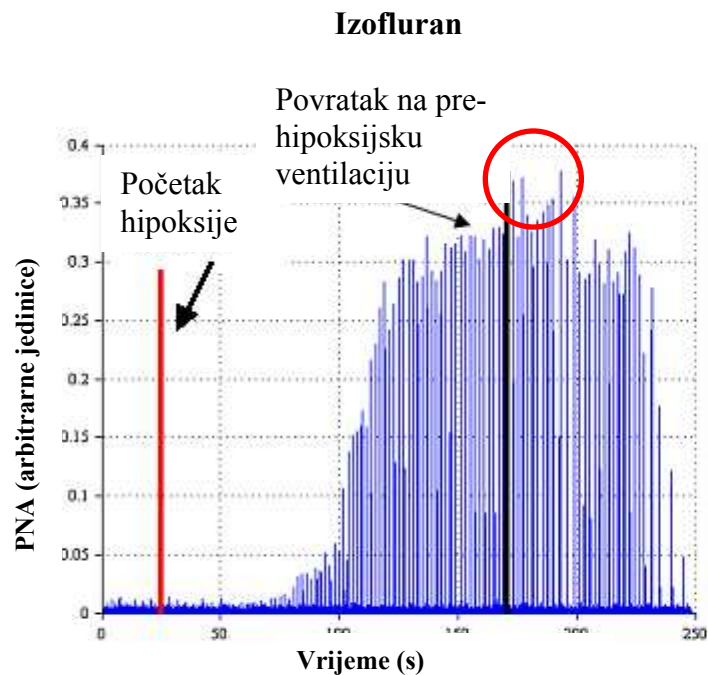


Slika 9. Vrijednosti amplitude freničkoga živca u sevofluranskoj anesteziji. Puna crta označava početak hipoksije (9% O₂). Isprekidana crta označava početak izlaganja 30% kisiku (povratak na ventilaciju prije izazivanja hipoksije). Jasno je vidljivo sniženje PNA u neposrednom posthipoksijskom razdoblju.

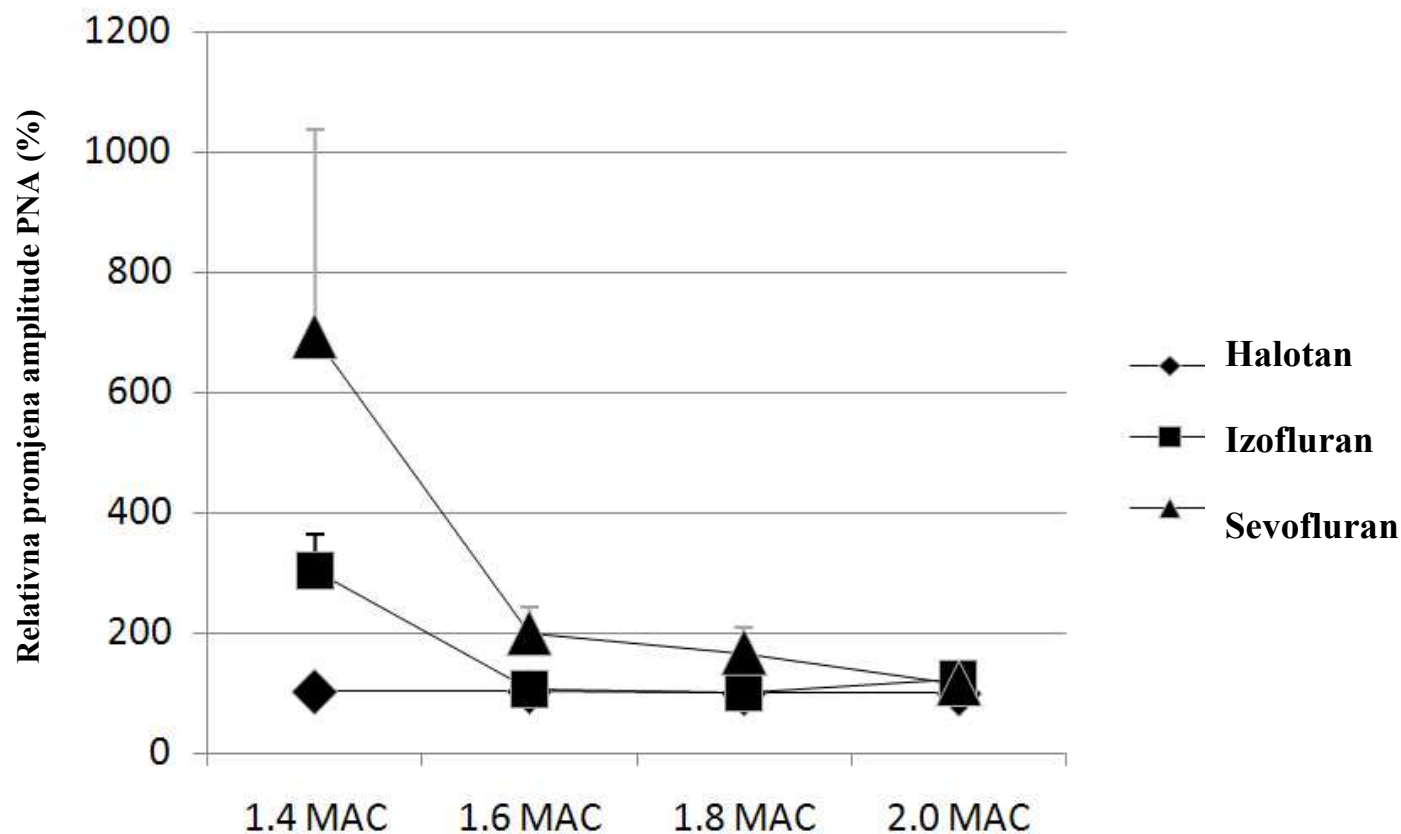
IZOFLURAN



Slika 10. Vrijednosti amplitude freničkoga živca u izofluranskoj anesteziji. Puna crta označava početak hipoksije (9% O₂). Isprekidana crta označava početak izlaganja 30% kisiku (povratak na ventilaciju prije izazivanja hipoksije). Vidljivo je povećanje aktivnosti freničkoga živca u početku ventilacije 30% kisikom.



Slika 11. Usporedba izoflurana i sevoflurana u posthipoksijskom periodu. Primjer PNA uzrokovan akutnom hipoksijom pri dubini anestezije od 1.4 MAC izoflurana (lijevo) i sevoflurana (desno) (PNA, proizvoljne [arbitrarne] jedinice). Početak hipoksije je naznačen uspravnom crvenom crtom, a vraćanje na predhipoksijsku ventilaciju (30% O₂) uspravnom crnom crtom. Crvenom kružnicom je označena kratkotrajno povećana aktivnost feničkog živca u izofluranskoj anesteziji nakon povratka na predhipoksijsku ventilaciju.



Slika 12. Relativno povećanje PNA za vrijeme izlaganja hipoksijskom podražaju (9% O₂) pri različitim dubinama anestezije za sva tri ispitivana anestetika (aritmetička sredina±SD). Temeljna (*baseline*) aktivnost freničkoga živca prije izlaganja hipoksiji pri najdubljoj anesteziji (2,0 MAC) odgovara proizvoljnim jedinicama (engl. arbitrary units, a.u.) od 100. Vidljivo je da se PNA nakon hipoksijskog podražaja pri sevofluranskoj anesteziji povećala ~7 puta na 1,4 MAC te ~2 puta pri 1,6 MAC. U izofluranskoj anesteziji vidljivo je povećanje PNA ~3 puta, ali samo na 1,4 MAC. U halotanskoj anesteziji nije se moglo izazvati nikakvo povećanje PNA hipoksijskim podražajem ni pri jednoj dubini anestezije. Preuzeto iz Karanovic et. al. (94).

7.6. PROMJENE OBRASCA I RITMA DISANJA (T_I , T_E , T_{TOT})

Relativne promjene obrasca disanja odnosno T_I , T_E i T_{TOT} , bile su ispitane u svih životinja u kojih je signal freničkoga živca prije hipoksije bio očuvan (iznad apnejičnog praga). Zbog tog ograničenja uspoređene su samo vrijednosti u životinja anesteziranih sevofluranom i izofluranom pri anesteziji od 1,4 MAC. Za početnu vrijednost od 100% uzeli smo temeljno disanje prije hipoksije („baseline“). Navedene promjene bile su minimalne, statistički neznčajne. Vrijednosti T_I pri sevofluranskoj anesteziji bile su $85 \pm 14\%$ ($P=0,34$) u odnosu na predhipoksijsku vrijednost, dok je ista vrijednost u izofluranskoj anesteziji iznosila $119 \pm 17\%$ ($P=0,32$). Za cjeloviti ciklus disanja (T_{TOT}) vrijednosti u odnosu na „baseline“ iznosile su za sevofluran $82 \pm 15\%$ ($P=0,31$) i $84 \pm 9\%$ ($P=0,16$) za izofluran. Vrijednosti T_E prosječno su pri sevofluranskoj anesteziji iznosile $111 \pm 40\%$ ($P=0,82$), dok su pri izofluranskoj anesteziji zabilježene vrijednosti od $83 \pm 12\%$ ($P=0,24$), u odnosu na predhipoksijske vrijednosti.

7.7. BRZINE POJAVE HVR (LATENCIJA) POD UTJECAJEM RAZLIČITIH HLAPLJIVIH ANESTETIKA

HVR se javlja vrlo brzo nakon nastupa hipoksije, međutim, pri izlaganju inhalacijskim anestheticima uočena je latencija do pojave HVR. Pri izofluranskoj anesteziji od 1,4 MAC to vrijeme je iznosilo 61.1 ± 62.8 sekundi.

U sevofluranskoj anesteziji pri 1,4 MAC vrijeme latencije bilo je 62.8 ± 55.3 sekundi. Pri 1,6 MAC 74.1 ± 55.3 , dok je pri 1,8 MAC to vrijeme bilo 76.3 ± 42.7 sekundi. Pri najdubljij anesteziji od 2,0 MAC koju smo ispitivali, početak pojave HVR bio je produljen na 78.8 ± 24.0

sekundi. Nije nađena statistički značajna razlika u latenciji ovisno o dubini anestezije, $P=0,864$ (ANOVA).

7.8. PARCIJALNI TLAKOVI PLINOVA I ACIDOBAZNI STATUS U KRVI

PaCO₂ je održavan u normokapnijskim vrijednostima tijekom svih protokola (35-45 mmHg). Sve životinje (pokusne i kontrolne) imale su slično sniženje PaO₂ (~35,24±2,75 mmHg) pri izlaganju akutnom hipoksijskom podražaju (9% O₂). pH arterijske krvi održavan je u granicama 7,35-7,45 (tablica 2 i 3).

7.9. ARTERIJSKI TLAKOVI

Arterijski tlakovi prije, za vrijeme i nakon hipoksije za sva tri ispitivana anestetika i za sve 4 dubine anestezije u pokusnih životinja prikazani su na tablici 4. U tablici 5 prikazane su vrijednosti arterijskih tlakova za kontrolne skupine. Nisu nađene statistički značajne razlike u arterijskim tlakovima između skupina, uključujući i pokusne i kontrolne.

Tablica 2. Rezultati pretraga iz arterijske krvi u tri pokusne skupine životinja za vrijeme predhipoksijskog razdoblja i tijekom hipoksijskog podražaja. Nije bilo značajnih razlika u pH, PaCO₂ i PaO₂ među skupinama, niti unutar skupina. Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina±SD. Sve vrijednosti parcijalnih tlakova prikazane su u mmHg.

		Halotan (n=9)			Izofluran (n=14)			Sevofluran (n=13)		
MAC		pH	PaCO₂	PaO₂	pH	PaCO₂	PaO₂	pH	PaCO₂	PaO₂
1,4	predhipoksija	7,39±0,03	41,7±3,3	144,6±18,1	7,40±0,03	40,3±2,0	154,9±11,0	7,39±0,02	40,9±3,5	142,7±16,5
	hipoksija	7,39±0,03	37,5±2,2	32,2±4,2	7,41±0,02	37,0±2,4	30,9±4,4	7,39±0,02	37,0±2,2	32,7±4,3
1,6	predhipoksija	7,41±0,02	41,1±2,4	155,4±10,7	7,42±0,03	42,0±2,8	149,0±5,1	7,41±0,02	40,5±2,5	155,8±11,6
	hipoksija	7,41±0,02	37,2±1,5	36,1±6,5	7,42±0,02	39,0±2,8	33,0±3,5	7,41±0,01	37,0±1,4	36,3±5,6
1,8	predhipoksija	7,42±0,02	41,0±2,3	156,9±9,0	7,40±0,01	40,2±3,3	159,0±12,8	7,41±0,02	40,6±3,0	157,6±8,7
	hipoksija	7,42±0,01	36,3±1,8	33,0±3,6	7,42±0,02	38,0±2,0	36,4±2,8	7,42±0,02	36,9±1,9	32,6±4,3
2,0	predhipoksija	7,39±0,01	41,9±2,1	158,5±6,1	7,41±0,02	39,0±2,3	158,1±8,8	7,40±0,02	41,5±2,3	159,4±6,5
	hipoksija	7,39±0,02	37,3±1,4	35,2±7,2	7,42±0,03	37,0±2,4	32,2±4,1	7,40±0,03	37,6±1,9	35,5±6,4

Tablica 3. Rezultati pretraga iz arterijske krvi u tri kontrolne skupine životinja za vrijeme predhipoksijskog razdoblja i tijekom hipoksijskog podražaja. Nije bilo značajnih razlika u pH, PaCO₂ i PaO₂ među skupinama, niti unutar skupina. Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina±SD. Sve vrijednosti parcijalnih tlakova prikazane su u mmHg.

MAC		Halotan (n=4)			Izofluran (n=4)			Sevofluran (n=4)		
		pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂
1,4	predhipoksija	7,39±0,02	40,8±2,3	147,7±17,8	7,39±0,03	39,9±2,1	155,7±11,2	7,40±0,01	41,2±3,3	142,8±15,3
	hipoksija	7,39±0,03	36,9±2,1	33,1±4,1	7,40±0,02	36,1±2,2	32,8±3,8	7,40±0,02	38,0±2,0	33,9±4,0
1,6	predhipoksija	7,41±0,03	41,7±1,8	154,8±9,8	7,42±0,03	41,0±2,1	150,1±4,9	7,40±0,02	41,1±2,2	153,7±10,8
	hipoksija	7,41±0,03	37,1±1,6	35,9±5,9	7,41±0,01	38,9±2,6	33,7±3,1	7,40±0,01	36,9±2,2	35,9±4,8
1,8	predhipoksija	7,42±0,01	40,9±2,1	151,7±8,1	7,41±0,01	41,0±2,8	157,2±11,9	7,41±0,01	41,1±2,5	158,1±8,4
	hipoksija	7,42±0,01	37,1±1,5	34,8±2,1	7,41±0,02	39,2±2,1	35,9±2,2	7,42±0,02	37,1±1,8	33,1±4,1
2,0	predhipoksija	7,39±0,03	42,1±1,8	157,6±5,7	7,39±0,02	39,9±2,2	158,2±4,9	7,40±0,01	40,9±2,2	157,9±5,1
	hipoksija	7,39±0,03	38,1±1,5	36,1±3,1	7,40±0,03	37,4±2,2	33,1±4,2	7,39±0,03	36,9±1,8	36,2±5,7±

Tablica 4. Vrijednosti arterijskih tlakova (mmHg) u pokusnih životinja prilikom izlaganja različitim dubinama anestezije (MAC) i pod različitim anestetici; **prije** izlaganja hipoksiji, za vrijeme **hipoksije** i **nakon** hipoksije. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost±SD. Nisu nađene značajne razlike u arterijskom tlaku unutar skupina, niti među skupinama (ANOVA).

MAC	Halotan (n=9)			Izofluran (n=14)			Sevofluran (n=13)		
	Prije	Hipoksija	Nakon	Prije	Hipoksija	Nakon	Prije	Hipoksija	Nakon
1,4	74,2±1,8	45,4±13,3	65,2±13,5	86,9±10,9	63,1±15,6	85,0±14,7	86,2±13,8	57,5±7,4	99,8±6,8
1,6	62,5±8,0	46,5±9,8	60,3±17,9	71,1±7,4	56,2±7,0	64,6±11,9	75,0±8,3	56,2±9,8	84,9±14,4
1,8	57,6±10,6	45,9±15,4	51,1±16,3	59,2±4,1	51,7±1,8	58,0±4,6	68,1±8,4	53,9±7,9	73,6±12,3
2,0	39,4±2,0	30,0±3,8	34,7±4,2	52,8±6,5	42,7±6,6	50,4±7,0	55,1±6,9	47,7±6,7	52,2±6,5

Tablica 5. Vrijednosti arterijskih tlakova (mmHg) u skupinama kontrolnih životinja prilikom izlaganja različitim dubinama anestezije (MAC) i pod različitim anestheticima; **prije** izlaganja hipoksiji, za vrijeme **hipoksije** i **nakon** hipoksije. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost±SD.

Nisu nađene značajne razlike u arterijskom tlaku unutar skupina, niti među skupinama (ANOVA).

MAC	Halotan (n=4)			Izofluran (n=4)			Sevofluran (n=4)		
	Prije	Hipoksija	Nakon	Prije	Hipoksija	Nakon	Prije	Hipoksija	Nakon
1,4	75,2±1,7	47,4±12,2	66,3±14,6	88,86±10,12	65,2±14,3	85,0±13,0	85,6±14,2	58,1±7,0	96,2±5,8
1,6	63,7±5,9	47,0±9,0	60,0±15,7	73,2±7,0	59,1±6,2	66,8±12,1	74,2±7,2	55,4±8,8	82,9±13,6
1,8	58,7±9,5	49,9±13,3	55,3±15,0	61,2±4,3	53,9±2,1	58,2±5,1	67,2±8,2	52,8±7,1	74,3±11,7
2,0	39,8±2,4	30,2±3,0	36,3±4,2	55,0±5,9	42,2±5,9	51,1±8,9	54,9±7,7	48,1±5,4	53,3±5,9

8. RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja potvrdili su u potpunosti sve tri postavljene hipoteze.

Potvrdili smo da sva tri ispitivana hlapljiva anestetika deprimiraju HVR. Također smo potvrdili da je relativan red potentnosti, odnosno anestetičke snage hlapljivih anestetika u štakora, kako na temeljnu respiraciju (baseline), tako i na hipoksijski ventilacijski odgovor: halotan > izofluran > sevofluran. Time smo potvrdili i red potentnosti hlapljivih anestetika uočen na ljudima (60, 71, 83). Naše opažanje da HVR djelomično opstaje čak i pri relativno visokim koncentracijama sevoflurana i izoflurana također je u skladu s prethodnim studijama na ljudima (46, 48).

Potvrdili smo da nakon hipoksijskog podražaja u posthipoksijskom razdoblju postoje razlike između pojedinih hlapljivih anestetika (izofluran vs. sevofluran).

8.1. DOBIVANJE „ČISTOG“ DJELOVANJA POJEDINOG HLAPLJIVOG ANESTETIKA

Rabljene koncentracije, tj. dubine anestezije omogućile su nam ispitivanje pojedinog anestetika bez uporabe neuromišićnih relaksansa, što je po našem mišljenju, u svim dosadašnjim istraživanjima moglo predstavljati značajnu metodološku pogrešku budući da neuromišićni relaksansi mogu utjecati na HVR blokadom nikotinskih acetilkolinških receptora u karotidnim tjelešcima te u SŽS (60, 76, 83, 95-97).

Nadalje, pažljivo smo pokušali izbjeći mogući utjecaj vanjske stimulacije na ventilaciju u našem istraživanju. Bol, audiovizualna ili kirurška stimulacija mogu same po sebi utjecati na ventilacijski odgovor, a kod nekih anestetika, kao što je izofluran, antagonizirati depresivni učinak samog anestetika na ventilacijski odgovor pri hipoksiji (42, 54, 56, 67). Ipak, to nije slučaj za sve hlapljive anestetike, naročito za halotan i sevofluran (54, 67). Unatoč istraživanjima, nije još uvijek poznat precizni mehanizam putem kojega bol

utječe na kontrolu disanja (42). Stoga smo vrlo pažljivo radili sve pokuse u mirnom i tihom okruženju, bez buke, u dovoljnoj dubini anestezije i bez nepotrebne traumatizacije tkiva, izbjegavši time dodatne bolne i ostale podražaje. U svakom slučaju sve 3 pokusne skupine životinja bile su izložene približno jednakim vanjskim podražajima.

8.2. ODABIR NAČINA IZVOĐENJA HIPOKSIJE

Pri planiranju izvođenja hipoksije postojale su dvije mogućnosti: brzo izazivanje (engl. step input ili step mode) ili postupno izazivanje hipoksije (engl. ramp mode ili ramp input). Najnovije studije preferiraju tzv. "step input", koji smo i mi rabili (42, 56, 62, 63, 65, 71-83). Naime, tijekom postupnog izazivanja hipoksije može doći do slabljenja HVR (56, 69) uzrokovanog dugotrajnijom hipoksijom poznatog pod nazivom hipoksijsko ventilacijsko sniženje ili *hypoxic ventilatory decline* (HVD), pa smo stoga izabrali navedeni način izazivanja hipoksije, koji se pokazao primjerenim.

Općenito se smatra da se HVR može najbolje proučavati u kontroliranim izokapnijskim uvjetima ili pri 1-2 mmHg višim vrijednostima od normalnih (42, 56, 71, 98) u cilju održavanja bolje kontrole parcijalnog tlaka CO₂. U ljudi taj se učinak postiže tehnikom kao što je „dinamičko forsiranje pri kraju izdisaja“ („*dynamic end-tidal forcing*“) (94). Iako su naše srednje vrijednosti parcijalnih tlakova plinova u arterijskoj krvi bile jednake među skupinama (tablica 2), moguće fluktuacije za vrijeme provođenja pokusa mogle su, ali samo u manjoj mjeri, utjecati na rezultate. Međutim, normokapnijski uvjeti bili su održani, tako da hipo- ili hiperkapnija nisu mogle utjecati na rezultate.

8.3. POSTHIPOKSIJSKI OPORAVAK

Neuralni mehanizmi respiracijske depresije izazvane učinkom hlapljivih anestetika i dalje nisu u potpunosti poznati, niti shvaćeni, stoga su još uvijek predmet zanimanja i istraživanja (32, 97). Jedna od naših hipoteza bila je vezana uz posthipoksijski period i oporavak nakon hipoksije, u kojoj smo pretpostavili da će se obrazac oporavka PNA nakon hipoksije razlikovati između izoflurana i sevoflurana. Ta hipoteza dokazana je u našem istraživanju. Razlog tome nije nam poznat. Nismo našli u dostupnoj literaturi nikakve podatke ili slična opažanja drugih istraživača. U svakom slučaju taj nalaz mogao bi implicirati moguće različite modele ili različita mjesta djelovanja navedenih dvaju anestetika.

8.4. PROMJENE OBRASCA I RITMA DISANJA (T_I , T_E , T_{TOT})

Poznato je da inhalacijski anestetici u klinički značajnoj koncentraciji mijenjaju obrazac disanja (45-49). Nismo zabilježili promjenu obrasca disanja pod utjecajem hipoksijskog podražaja pri anestezijskoj koncentraciji (1,4 MAC) hlapljivih anestetika. Međutim, ispravni zaključak ne može se donijeti na temelju naših podataka. Ostaje nepoznato je li utjecaj hlapljivih anestetika prije hipoksijskog podražaja već doveo do promjene obrasca disanja mjerenih varijabli (T_I , T_E , T_{TOT}) u odnosu na neku imaginarnu vrijednost bez utjecaja anestetika, budući da nismo imali kontrolnu vrijednost bez anestezije (etički razlozi). Na žalost, ne postoje slične studije s kojima bi se mogla izvršiti usporedba.

8.5. LATENCIJA DO POJAVE HVR POD UTJECAJEM RAZLIČITIH HLAPLJIVIH ANESTETIKA

Kako je već poznato, HVR se javlja vrlo brzo nakon nastupa hipoksijskog podražaja, otprilike nakon 2-10 s (4, 13). U našoj studiji uočljivo je kašnjenje pojave HVR, koje je iznosilo dulje od 1 minute. Razlog tome je djelomično metodološki jer je čitav sustav anesteziološkog uređaja i respiratora za male životinje imao nešto veći mrtvi prostor („dead space“), međutim, metodologija je bila jednaka za sve životinje, a poduzete su sve mjere da se nehipoksijska smjesa plinova i anestetika brzo ukloni iz sustava. U svakom slučaju latencija je produljena pri višim dozama anestetika što govori u prilog hipotezi o ovisnosti latencije HVR o dubini anestezije. Nismo našli radove u kojima je opisana navedena pojava. Stoga bi bilo uputno provesti dodatna istraživanja u tom segmentu te procijeniti je li razlog uočenoj pojavi djelovanje hlapljivih anestetika, i ima li razlike među njima.

8.6. VRIJEDNOSTI PLINOVA U ARTERIJSKOJ KRVI

Iz tablica 2 i 3 vidljive su vrijednosti parcijalnih tlakova plinova u arterijskoj krvi štakora i njihovog metaboličkog statusa u pokusnim i kontrolnim skupinama. Rezultati su očekivani. Parcijalni tlakovi razlikuju se međusobno u hipoksiji s jedne strane te u pred- i posthipoksijskom razdoblju. Ono što treba naglasiti je da se vrijednost PaCO₂ tijekom hipoksije dodatno minimalno, ali statistički neznačajno, snižavala u svih životinja što je najčešće razlog povećavanja koncentracija CO₂ u radovima u kojima je opisan postupak dobivanja izokapnijskih vrijednosti PaCO₂, što je spomenuto već prije (42, 56, 71, 98). Vrijednosti PaO₂ nisu se značajno mijenjale u predhipoksijskom i posthipoksijskom razdoblju.

8.7. VRIJEDNOSTI ARTERIJSKIH TLAKOVA

U tablicama 4 i 5 mogu se pratiti vrijednosti tlakova u pokusnim i kontrolnim skupinama životinja. Statistički nije bilo značajnih razlika u tlakovima između tri testirana anestetika, što je na neki način određeno iznenađenje. Očekivali smo da će halotan uz najsnažnije respiracijsko, pokazati i najsnažnije kardiocirkulacijsko depresorno djelovanje na štakorskom modelu. Nažalost, nismo mogli naći radove u kojima se na štakorskom modelu pratila i međusobno uspoređivala vrijednost tlakova pri tri vrste anestezije i pri četiri različite dubine anestezije.

8.8. MOGUĆNOST LOCIRANJA MJESTA DJELOVANJA HLAPLJIVIH ANESTETIKA PRI HIPOKSIJSKOM PODRAŽAJU

Postavlja se pitanje, je li primarno mjesto depresivnog učinka hlapljivih anestetika na akutni HVR centralno (mozak) ili periferno (karotidna tjelešca). Odgovor i dalje ostaje nejasan (94). Pandit smatra, nakon meta-analize, da različiti hlapljivi anestetici imaju značajno različit utjecaj na ventilacijski odgovor te je zaključio da to može upućivati na različit molekularni/stanični mehanizam djelovanja na karotidna tjelešca (71). Međutim, alternativna tumačenja su da različiti odgovori mogu biti posljedica različitog primarnog mjesta djelovanja za pojedini hlapljivi anestetik. Odnosno, da neki mogu djelovati na hipoksijske kemorefleksi periferno na razini karotidnih tjelešaca, dok drugi mogu učinak pokazati više centralno, u mozgu (60). Sustavni pregled studija provedenih na životinjama uistinu otvara mogućnost da hlapljivi anestetici djeluju izravno na karotidna tjelešca, izazivajući depresiju hipoksijskog odgovora (83). Međutim, nekoliko studija opovrgava utjecaj hlapljivih anestetika na karotidna tjelešca (99, 100, 101, 102). Nedavna istraživanja

Pandita i Bucklera daje snažnu podršku izravnom djelovanju hlapljivih anestetika na glomus stanice karotidnih tjelešaca (95, 96). Ipak, i dalje ostaje nepoznato jesu li te razlike među studijama proistekle samo zbog razlike u vrstama istraživanih pokusnih životinja ili je razlog druge prirode. Treba naglasiti da su u većini prethodnih studija za istraživanje najčešće korišteni psi, mačke i kunići (82, 83). Nažalost, metoda našeg istraživanja nije nam omogućila lociranje mjesta depresivnog učinka hlapljivih anestetika, odnosno je li njihovo djelovanje izraženo na perifernim kemoreceptorima ili na SŽS. Ako bi se naše opažanje zadržke, tj. kašnjenje pojave HVR pod utjecajem hlapljivih anestetika pokazalo točnim, to bi dodatno doprinjelo pojavi nejasnoća i nepoznanica u raspravi o mjestu djelovanja hlapljivih anestetika. Stoga je na temelju našeg istraživanja nemoguće reći jesu li dobiveni rezultati uzrokovani perifernim ili centralnim učincima hlapljivih anestetika. Nadalje, dodatnu nejasnoću može unijeti korištenje relativno novog štakorskog modela.

8.9. OGRANIČENJA STUDIJE

Potrebno je naglasiti da postoje određena metodološka ograničenja ovog istraživanja.

Budući da su životinje zahtijevale neki oblik anestezije, nije bilo moguće imati „prave“ kontrolne skupine (bez bilo kakvog anestetika), niti smo mogli izabrati bilo koji anestetik kao referentni. Međutim, umjesto toga, rabili smo broj životinja koje su pokazale aktivnost freničkoga živca kao surogat za usporedbu (tablica 1). Stoga, što je manje životinja pokazalo PNA te što je manja amplituda freničke aktivnosti izazvana hipoksijskim podražajem pod djelovanjem pojedinog anestetika, to smo smatrali anestetik potentnijim respiracijskim depresorom (slika 8 i 12).

Potrebno je naglasiti da smo bili svjesni mogućnosti pojave tzv. dugotrajnog pojačavanja HVR „*long term facilitation - LTF*“. Zbog te mogućnosti smo hipoksiju ograničili samo na 120 s, a stanka između dviju hipoksija bila je dulja od 60 min.

LTF se javlja nakon višekratnog izlaganja (3-12) hipoksiji u trajanju od 2-10 min s razdobljima normoksije u trajanju od 2-20 minuta (103-106). LTF je karakteriziran pojačavanjem respiracijskog motornog odgovora nakon podraživanja karotidnih kemoreceptora, koje može trajati i satima nakon prestanka podražaja. Za PNA poznato je da se nakon kratkoročnog izlaganja akutnoj hipoksiji (do 5 minuta), vraća na predhipoksijsku razinu relativno brzo, već unutar 10-15 minuta (107). S druge strane, ponavljane hipoksije u intervalima od 5 minuta dovode do dugoročne (≥ 1 sata) facilitacije freničkoga živca (108, 109). U našoj studiji imali smo četiri izlaganja pojedinih štakora akutnoj hipoksiji u trajanju od 120 s., što je bitno drukčije od svih poznatih studija u kojima je izazvana pojava LTF. Osim toga, između svakog hipoksijskog podražaja bilo je razdoblje euoksije s FiO_2 0,3 u trajanju >60 min. Na taj način izbjegli smo neposredno sukcesivno izlaganje hipoksiji. Za potrebe našeg rada zaključili smo da je takav protokol sasvim zadovoljavajući za izbjegavanje pojave LTF.

U ljudi općenito, hlapljivi anestetici pri subanestetskim koncentracijama ne utječu na euoksijsku ventilaciju (42, 44, 45, 48, 62, 63, 65, 68, 69, 110), ali smo uočili depresiju ventilacije u euoksiji ovisnu o dozi, odnosno koncentraciji, pri vrijednostima $>1,0$ MAC (tablica 1). Stoga bi naša studija mogla potaknuti daljnja istraživanja na ljudima vezanim uz euoksiju i anestezijske koncentracije anestetika. Nažalost, nismo mogli istražiti niže doze hlapljivih anestetika za usporedbu sa studijama na ljudima zbog etičkih razloga, budući da bi životinje osjećale bol pri nižim koncentracijama anestetika od 1,4 MAC (podatci dobiveni u pilot studiji).

U zaključku se može reći da smo utvrdili da je red potentnosti hlapljivih anestetika i njihova mogućnost depresije HVR u štakora jednaka kao u prethodnim istraživanjima provedenim na ljudima. Iako to opažanje ne daje izravnu potporu raspravi o primarnom mjestu djelovanja hlapljivih anestetika (karotidna tjelešca vs. centralno djelovanje), može se reći da je potvrdilo štakorski model kao prikladan model za istraživanje tog područja humane respiracije. Štakorski model može se rabiti za pomoć u razumijevanju utjecaja hlapljivih anestetika na hipoksijski ventilacijski odgovor i kontrolu disanja pri anesteziji. Dodatna temeljna istraživanja na izoliranim karotidnim tjelešcima štakora uz uporabu preciznih doza hlapljivih anestetika mogla bi omogućiti bolje poznavanje humane respiracijske fiziologije i utjecaja anestetika na nju.

Buduće studije trebale bi se usredotočiti na molekularne učinke anestezioloških pripravaka na staničnoj razini, što bi moglo omogućiti uvid u interakciju anestetika s transdukcijom hipoksijskih signala.

9. ZAKLJUČCI

1. Hlapljivi anestetici djeluju depresivno na hipoksijski ventilacijski odgovor, kao i na temeljnu („baseline“) euoksijsku ventilaciju ovisno o dozi. U ljudi subanestezijske doze ne utječu na disanje u euoksijskim uvjetima, međutim, pod utjecajem hlapljivih anestetika u klinički značajnim koncentracijama (kirurška anestezija) na štakorskom modelu uočili smo da postoji depresija euoksijske respiracije ovisna o dozi.
2. Red potentnosti hlapljivih anestetika identičan je istraživanjima dobivenim na ljudima, odnosno pokazalo se da je halotan naj snažniji respiracijski depresor, dok je sevofluran najslabiji. Izofluran ima intermedijarno djelovanje. Stoga je poredak temeljen na potentnosti respiracijske depresije slijedeći: halotan > izofluran > sevofluran.
3. Iako na štakorskom modelu, dokazali smo da pojedini hlapljivi anestetici, kao halotan, mogu pri značajnim kliničkim koncentracijama pri pojavi hipoksije u potpunosti spriječiti zaštitne respiracijske mehanizme, dok ih drugi i pri visokim dozama deprimiraju, ali još uvijek ne dokidaju, poput sevoflurana.
4. U neposrednom posthipoksijskom razdoblju razlika u signalu freničkoga živca pod utjecajem izoflurana u odnosu na sevofluran mogla bi upućivati na različit mehanizam ili mjesto djelovanja izoflurana u odnosu na sevofluran.
5. U našoj studiji smo na zadovoljavajući način postigli mogućnost istraživanja utjecaja monoanestezije na disanje u euoksiji kao i na HVR, bez utjecaja hiperkapnije, neuromišićnih relaksansa i uz jednake vanjske podražaje, koji su posebno važni pri

izofluranskoj anesteziji. Na taj način dobili smo „čiste“ rezultate te možemo govoriti samo o utjecaju pojedinog anestetika na disanje u euoksiji i na hipoksijski ventilacijski odgovor.

6. Nismo mogli testirati niže koncentracije hlapljivih anestetika zbog etičkih razloga, budući da su životinje pri vrijednostima $<1,4$ MAC pokazivale znakove nedovoljno duboke anestezije, odnosno osjećale su bol.
7. Našom metodologijom nismo mogli dokazati je li primarno mjesto djelovanja hlapljivih anestetika na perifernoj razini (karotidna tjelešca) ili više centralno (mozak).
8. Štakorski model pokazao se prikladnim za istraživanje kontrole respiracije, hipoksijskog ventilacijskog odgovora i utjecaja hlapljivih anestetika u odnosu na humani model. Pokazalo se da su rezultati slični onima dobivenim na ljudima. Međutim, treba istaknuti da su doze rabljene u istraživanju bitno različite od doza – koncentracija rabljenih u istraživanjima na ljudima (subanestetske). Doze rabljene u našem istraživanju su prave anestetske, koje su omogućavale kirurški rad, a što do sada nije istraživano niti na humanom, niti na animalnom modelu.

10. ZNANSTVENI DOPRINOS I KLINIČKA PRIMJENA

Mogućnost inhibicije HVR-a inhalacijskim anestheticima ima veliki klinički značaj (32).

U samoj anesteziji i pri spontanom disanju opasnost razvoja hipoksije je realna. Budući da inhalacijski anestetici izravno djeluju na središnje mehanizme nadzora disanja, u kliničkoj primjeni od velikog značaja može biti pravilan odabir inhalacijskoga anestetika i anestezijske koncentracije, odnosno vrsta i dubina anestezije.

Kako je dokazano da inhalacijski anestetici slabe hipoksijski ventilacijski odgovor već u subanestetskim koncentracijama, postoji opasnost od komplikacija, kako pri anesteziji, tako i u neposrednom postoperacijskom periodu. Te čimbenike potrebno je razmotriti ne samo pri spontanom disanju, nego i u situacijama kad se bolesnika mehanički ventilira tijekom operacijskog zahvata. Posebna pozornost potrebna je u neposrednom postoperacijskom razdoblju dok se čeka da bolesnik spontano prodiše kako bi ga se moglo u određenim kliničkim situacijama ekstubirati u još uvijek dubokoj anesteziji. Ekstubacija u dubokoj anesteziji rabi se radi izbjegavanja bronhospazma i kašlja u cilju sprječavanja mogućih teških posljedica i invaliditeta (npr. operacije na otvorenom oku). Pri mogućoj pojavi hipoksije u još prisutnoj dubokoj anesteziji može biti važno koji se anestetik uporabio i u kojim koncentracijama, odnosno koji anestetik predstavlja najmanji rizik anesteziranom bolesniku.

Utjecaj inhalacijskih anestetika na HVR može imati vrlo značajnu ulogu u bolesnika koji su ovisni o hipoksičnoj stimulaciji (*hypoxic drive*) za održavanje ventilacije, kao što su bolesnici s kroničnim zatajenjem disanja i oboljeli od opstruktivske apneje tijekom spavanja (engl. obstructive sleep apnea, OSA). (32).

Aktivnost freničkoga živca smatra se zrcalnim pokazateljem zbivanja u središnjem generatoru ritma i obrasca disanja. Rezultati istraživanja snažno upućuju na kvalitativnu i

kvantitativnu razliku u učinku pojedinih inhalacijskih anestetika (halotan, izofluran, sevofluran) na spontanu aktivnost freničkoga živca, kao i na aktivnost pri akutnoj hipoksiji.

U ovoj disertaciji pružen je izravni odgovor na pitanje kako hlapljivi anestetici u višim, anestezijskim koncentracijama utječu na disanje, kao i na prilagodbu disanja u specifičnim stanjima poput hipoksije na animalnom modelu štakora. Klinički je bilo opravdano istražiti u kolikoj mjeri postoji optimalni raspon graničnih vrijednosti minimalnih alveolarnih koncentracija za pojedini hlapljivi anestetik, pri kojem se može očekivati fiziološki vidljiv i značajan odgovor u prilagodbi disanja na podražaj poput akutne hipoksije. Iako je teško primjenjivati rezultate dobivene na pokusnim životinjama u kliničkoj primjeni na ljudima, mogući klinički doprinos provedenog istraživanja jest i u činjenici da može sugerirati odabir i uporabu hlapljivih anestetika. Nadalje, ova studija pokazala je da je štakorski model prikladan za istraživanje i humane respiracije, odnosno utjecaja inhalacijskih anestetika na respiraciju i HVR, budući se pokazalo da je red potentnosti i utjecaj samih hlapljivih anestetika identičan rezultatima dobivenim na humanom modelu.

11. SAŽETAK

Relativan red potentnosti hlapljivih anestetika na hipoksijski ventilacijski odgovor proučavan je na ljudima i to uglavnom u subanestezijskim dozama, a podatci dobiveni na životinjskom modelu su razmjerno rijetki, pogotovo oni s pravim anestezijskim dozama hlapljivih anestetika. U našem istraživanju proučavali smo utjecaj 1,4; 1,6; 1,8 i 2,0 MAC halotana, izoflurana i sevoflurana na freničku aktivnost u euoksiji (*baseline*) i tijekom akutne normokapnijske hipoksije ($FiO_2=0,09$) na odraslim mužjacima štakora soja Sprague-Dawley. Pri halotanskoj anesteziji sve proučavane životinje (9/9) bile su apnejične u euoksiji, kao i pri hipoksijskom podražaju pri sve četiri razine anestezije. Pod utjecajem izoflurana od 1,4 MAC, 5 od 14 životinja imalo je prisutnu aktivnost freničkoga živca čak i pri euoksiji i pokazalo HVR (povećanje od 302% od osnovne vrijednosti). Međutim, svi štakori su postali apnejični i izgubili HVR pri višim dozama. Pod sevofluranskom anestezijom, frenička aktivnost je zadržana u nekih životinja pri svim dubinama anestezije, kao i HVR (čak i pri najvišoj rabljenoj vrijednosti od 2,0 MAC). Slično prethodno uočenom na ljudima, red potentnosti hlapljivih anestetika određen na temelju depresije HVR u štakora bio je halotan > izofluran > sevofluran ($P=0,01$ za razliku među anestheticima).

Pri oporavku od hipoksijskog podražaja uočena je razlika između izoflurana i sevoflurana. Ubrzo nakon povratka na euoksijsku ventilaciju ($FiO_2=0,3$) došlo je do kratkotrajnog povećanja PNA, što nije zabilježeno pri sevofluranskoj anesteziji.

U našem istraživanju uočili smo produženje vremena potrebnog za fiziološki odgovor na akutni hipoksijski podražaj pri izofluranskoj i sevofluranskoj anesteziji.

12. SUMMARY

The relative order of potency of anaesthetic agents on the hypoxic ventilatory response has been tested in humans, but animal data are sparse. We examined the effects of 1.4, 1.6, 1.8, and 2.0 MAC halothane, isoflurane, and sevoflurane on phrenic nerve activity in euoxia (baseline) and during acute normocapnic hypoxia (inspired oxygen fraction 0.09) in adult Sprague-Dawley rats. Under halothane, all animals became apnoeic even in euoxia, and the hypoxic response was completely abolished at all anaesthetic levels. With isoflurane, 5 of 14 animals exhibited phrenic nerve activity in euoxia at 1.4 MAC and demonstrated a hypoxic response (302% of baseline), but all became apnoeic and lost the hypoxic response at higher doses. With sevoflurane phrenic nerve activity and a hypoxic response was preserved in, at least, some animals at all doses (i.e. even the highest dose of 2.0 MAC). Similar to the rank order of potency previously observed in humans, the relative order of potency of depression of the hypoxic ventilatory response in rats was halothane (most depressive) > isoflurane > sevoflurane ($P=0,01$ for differences between agents).

During the posthypoxic recovery at euoxic ventilation ($FiO_2=0,3$) we registered the difference between isoflurane and sevoflurane. PNA increased shortly under isoflurane anaesthesia, whereas under sevoflurane anaesthesia the decrease was continuous.

We also observed latency at the beginning of HVR under isoflurane, as well as under sevoflurane anaesthesia.

13. POPIS LITERATURE

1. Feldman JL, McCrimmon DR. Neural control of breathing U: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR ur. *Fundamental neuroscience*. San Diego-London: Academic Press; 1999, str. 1063-1090.
2. Haji A, Takeda R, Okazaki M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 2000; 86: 277-304.
3. Dahan A, Nieuwenhuijs D, Teppema L. Plasticity of central chemoreceptors: Effect of bilateral carotid body resection on central CO₂ sensitivity. *PLoS Med* 2007; 4: e239.
4. Stock MC. Respiratory function in anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK ur. *Clinical Anesthesia*. 5. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, str. 791-811.
5. Wilson WC, Benumof JL. Respiratory physiology and respiratory function during anesthesia. U: Miller RD ur. *Anesthesia* 6. izd. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2005, str. 679-722.
6. Sheel WA, MacNutt MJ. Control of ventilation in humans following intermittent hypoxia. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33: 573-581.
7. Smith JC, Ellenberger HH, Balanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 1991; 254: 726-729
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: 126-131.
9. Monnier A, Alheid GF, McCrimmon DR. Defining ventral medullary respiratory compartments with glutamate receptor agonist in rat. *J Physiol* 2003; 548: 859-874.

10. Prabhakar NR. O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* 2006; 91: 17-23.
11. Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol* 2005; 568: 715-724.
12. Knill RL, Gelb AW. Peripheral chemoreceptors during anesthesia: Are the watchdogs sleeping? *Anesthesiology* 1982; 57: 151-152.
13. Dahan A, Teppema LJ. Influence of anaesthesia and analgesia on the control of breathing. *BrJ Anaesth* 2003; 91: 40-49.
14. 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: 755-74.
15. Dawes GS, Gardner WN, Johnston BM, Walker DW. Breathing in fetal lambs: the effect of brain stem section. *J Physiol* 1983; 335: 535-553.
16. Horn EM, Waldrop TG. Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control. *Respir Physiol* 1997; 110: 219-228.
17. Koos BJ, Chau A, Matsura M, Punla O, Kruger L. Thalamic locus mediates hypoxic inhibition in breathing in fetal sheep. *J Neurophysiol* 1998; 79: 2383-2393.
18. Martin-Body RL, Johnston BM. Central origin of the hypoxic depression of breathing in the newborn. *Respir Physiol* 1988; 71: 25-32.
19. Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. The pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemoreceptor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 2000; 83: 2854-2868.
20. Sun M-K, Reis DJ. Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1994; 266: R245-R256.

21. Okada Y, Kuwana S, Chen Z, Ishiguro M, Oku Y. The central respiratory chemoreceptor: Where is it located? *Adv Exp Med Biol* 2009; 648: 377-385.
22. Lahiri S, Forster RE II. CO₂/H⁺ sensing: peripheral and central chemoreception. *IJBCB* 2003; 35: 1413-1435.
23. Pan LG, Forster HV, Martino P, Strecker PJ, Beales J, Serra A, et al. Important role of the carotid afferents in control of breathing. *J Appl Physiol* 1998; 85: 1299-1306.
24. Lowry TF, Forster HV, Pan LG, Serra A, Wenninger J, Nash R, et al. Effects on breathing of carotid body denervation in neonatal piglets. *J Appl Physiol* 1999; 87: 2128-2135.
25. Serra A, Brozoski D, Hedin N, Franciosi RA, Forster HV. Mortality after carotid body denervation in rats. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1298-1306.
26. Forster HV. Plasticity in the control of breathing following sensory denervation. *J Appl Physiol* 2003; 94: 784-794.
27. Kopp Lugli A, Yost CS, Kindler CH. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia. *Eur J Anaesth* 2009; 807-820.
28. Stanski DR. Monitoring depth of anesthesia. U: Miller RD, ur. *Anesthesia* 5. izd. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000, str. 1087-1116.
29. Jukić M. Razvoj anestezije u našim krajevima od 1847. do 1950. U: Jukić M, ur. *Anesteziologija u Hrvatskoj*. Zagreb: Medicinska naklada; 1999, str. 45-60.
30. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. Cellular and molecular mechanisms of anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, ur. *Handbook of clinical anesthesia* 4. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2001, str. 46-53.
31. Koblin DD. Mechanisms of action. U: Miller RD, ur. *Anesthesia* 5. izd. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000, str. 48-73.

32. Ebert TJ, Schmid PG. Inhaled anesthetics U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan MK, Stock MC, ur. *Clinical Anesthesia* 6. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2009, str. 414-443.
33. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. Cellular and molecular mechanisms of anesthesia. U: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, ur. *Handbook of clinical anesthesia*. 4. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2001, str. 45-60.
34. MAC. U: Eger EI II, Eisenkraft JB, Weiskopf RB, ur. *The pharmacology of inhaled anesthetics*. 2. izd.: Edmond I Eger II; 2003, str. 21-32.
35. Hayashi F, Coles SK, Bach KB, Mitchel GS, McCrimmon DR. Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am J Physiol* 1993; 265: R811-R819.
36. Powell FL, Mitchel GS, Milsom WK. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 1998; 112: 1223-1234.
37. Barnard P, Andronikou S, Pokorski M, Smatrsek N, Mokashi A, Lahiri S. Time-dependent effect of hypoxia on carotid body chemosensory function. *J Appl Physiol* 1987; 63: 685-691.
38. Dillon GH, Waldrop TG. In vitro responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. *Neuroscience* 1992; 51: 941-950.
39. Dillon GH, Waldrop TG. Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Exp Brain Res* 1993; 96: 260-272.
40. Caruana-Montaldo B, Gleeson K, Zwillich CW. The control of breathing in clinical practice. *Chest* 2000; 117: 205-225.
41. Eldridge FL, Millhorn DE. Oscillation, gating, and memory in the respiratory control system. U: *Handbook of Physiology: The respiratory system. Control of breathing*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1986, sect 3. vol II, 93-114.

42. Dahan A. General anesthesia and control of respiration. *Semin Anesth* 1996; 15: 328-334.
43. Kafer ER, Sugioka K. Respiratory and cardiovascular responses to hypoxemia and the effects of anesthesia. *Int Anesthesiol Clin* 1981; 19: 85-122.
44. Groeben H, Meier S, Tankersley CG, Mitzner W, Brown RH. Influence of volatile anaesthetics on hypercapnoeic ventilatory responses in mice with blunted respiratory drive. *BrJ Anaesth* 2004; 92: 697-703.
45. Knill RL, Gelb AW. Ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia during halothane sedation and anesthesia in man. *Anesthesiology* 1978; 49: 244-251.
46. Sjögren D, Sollevi A, Ebberyd A, Lindahl SGE. Isoflurane anaesthesia (0.6 MAC) and hypoxic ventilatory responses in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 17-22.
47. Lockhart SH, Rampil IJ, Yasuda N, Eger EI, Weiskopf RB. Depression of ventilation by desflurane in humans. *Anesthesiology* 1991; 74: 484-488.
48. Sollevi A, Lindahl SGE. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses during isoflurane sedation and anaesthesia in women. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 931-938.
49. Hirshman CA, McCullough RE, Cohen PJ, Weil JV. Depression of hypoxic ventilatory response by halothane, enflurane and isoflurane in dogs. *BrJ Anaesth* 1977; 49: 957-962.
50. Morray JP, Nobel R, Bennet L, Hanson MA. The effect of halothane on phrenic and chemoreceptor response to hypoxia in anesthetized kittens. *Anesth Analg* 1996; 83: 329-335.
51. Stuth EA, Dogas Z, Krolo M, Kampine JP, Hopp FA, Zuperku EJ. Effects of halothane on the phrenic nerve response to carbon dioxide mediated by carotid body chemoreceptors in vagotomized dogs. *Anesthesiology* 1997; 87: 1440-1449.

52. Pandit JJ, Moreau B. Interaction of arousal states and low dose halothane on the acute hypercapnic ventilatory response in humans. *Anaesthesia* 2004; 60: 139-145.
53. Van den Elsen M, Sarton E, Teppema L, Berkenbosch A, Dahan A. Influence of 0.1 minimum alveolar concentration of sevoflurane, desflurane, and isoflurane on dynamic ventilatory response to hypercapnia in humans. *BrJ Anaesth* 1998; 80: 174-182.
54. Sarton E, Dahan A, Teppema L, van den Elsen M, Olofsen E, Berkenbosch A, et al. Acute pain and central nervous system arousal do not restore impaired hypoxic ventilatory response during sevoflurane sedation. *Anesthesiology* 1996; 85: 295-303.
55. Dahan A, Sarton E, van den Elsen, van Kleef J, Teppema L, Berkenbosch A. Ventilatory responses to hypoxia in humans. Influence of subanesthetic desflurane. *Anesthesiology* 1996; 85: 60-68.
56. Van den Elsen, Dahan A, Berkenbosch A, DeGoede J, van Kleef JW, Olievier ICW. Does subanesthetic isoflurane affect the ventilatory response to acute isocapnic hypoxia in healthy volunteers? *Anesthesiology* 1994; 81: 860-867.
57. Gelb AW, Knill RL. Subanesthetic halothane: its effect on regulation of ventilation and relevance to the recovery room. *Can Anaesth Soc J* 1978; 25: 488-494.
58. Knill RL, Clement JL. Site of selective action of halothane on the peripheral chemoreflex pathway in humans. *Anesthesiology* 1984; 61: 121-126.
59. Knill RL, Clement JL. Ventilatory response to acute metabolic acidemia in humans awake, sedated and anesthetized with halothane. *Anesthesiology* 1985; 62: 745-753.
60. Pandit JJ. Volatile anesthetics and the hypoxic ventilatory response: effects, clinical implications, and future research. *Semin Anesth Perioperat Med Pain* 2007; 26: 49-57.
61. Dahan A, Tepema L. Editorial I. Influence of low-dose anaesthetic agents on ventilatory control: where do we stand? *Br J Anaesth* 1999; 83: 199-201.

62. Pandit JJ, Manning-Fox J, Dorrington KL, Robins PA. Effects of subanesthetic sevoflurane on ventilation. 1: Response to acute and sustained hypercapnia in humans. *BrJ Anaesth* 1999; 83: 204-209.
63. Pandit JJ, Manning-Fox J, Dorrington KL, Robins PA. Effects of subanesthetic sevoflurane on ventilation. 2: Response to acute and sustained hypoxia in humans. *BrJ Anaesth* 1999; 83: 210-216.
64. Dahan A, Berkenbosch A, DeGoede J, van Kleef JW, Olievier ICW. Does subanesthetic isoflurane affect the ventilatory response to acute isocapnic hypoxia in healthy volunteers? *Anesthesiology* 1994; 81: 860-867.
65. Temp JA, Henson LC, Ward DS. Does a subanesthetic concentration of isoflurane blunt the ventilatory response to hypoxia? *Anesthesiology* 1992; 77: 1116-1124.
66. Koh SO, Severinhghaus JW. Effects of halothane on hypoxic and hypercapnic ventilatory response of goats. *Br J Anaesth* 1990; 65: 713-717.
67. 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: 1409-1416.
68. Knill RL. Subanesthetic isoflurane and the ventilatory response to hypoxemia. *Anesthesiology* 1993; 78: 1189-1192.
69. Temp JA Henson LC, Ward DS. Effect of a subanesthetic minimum alveolar concentration of isoflurane on two tests of the hypoxic ventilatory response. *Anesthesiology* 1994; 80: 739-750.
70. Sjögren D, Lindahl SG, Gottlieb C, Sollevi A. Ventilatory response to acute and sustained hypoxia during sevoflurane anesthesia in women. *Anesth Analg* 1999; 89: 209-214.

71. Pandit JJ. The variable effect of low-dose volatile anaesthetics and the ventilatory response to hypoxia in humans: a quantitative review. *Anaesthesia* 2002; 57: 632-643.
72. Robotham JL. Do low dose inhalational anesthetic agents alter ventilatory control? *Anesthesiology* 1994; 80: 723-726.
73. Goodman NW. Volatile agents and the ventilatory response to hypoxia. *Br J Anaesth* 1994; 72: 503-505.
74. Jonsson M, Wyon N, Lindahl SGE, Fredholm BB, Eriksson LI. Neuromuscular blocking agents block carotid body neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 2004; 497: 173-180.
75. Eriksson LI, Sato M, Severinghaus JW. Effect of a vecuronium-induced partial neuromuscular block on hypoxic ventilatory response. *Anesthesiology* 1993; 78: 693-699.
76. Sakuraba S, Kuwana S-I, Ochiai R, Okada Y, Kashiwagi M, Hatori E, Takeda J. *Neurosci Res* 2003; 47: 289-298.
77. Cohen MI. Synchronisation of discharge, spontaneous and evoked, between inspiratory neurons. *Acta Neurobiol Exp* 1973; 33: 189-218.
78. Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher S. Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 1992; 2: 788-793.
79. Stuth EA, Tonkovic-Capin M, Kampine JP, Zuperku EJ. Dose-dependent effects of isoflurane on the CO₂ responses of expiratory medullary neurons and the phrenic nerve activity in dogs. *Anesthesiology* 1992; 76: 763-774.
80. Takeda R, Haji A. Effects of halothane on membrane potential and discharge activity in pairs of bulbar respiratory neurons of decerebrate cats. *Neuropharmacology* 1992; 31: 1049-1058.

81. Takeda R, Haji A. Cellular effects of isoflurane on bulbar respiratory neurons in decerebrate cats. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62: 57-65.
82. Lu F, Qin C, Foreman RD, Farber JP. Chemical activation of C₁ – C₂ spinal neurons modulate intercostals and phrenic nerve activity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: 1069-1076.
83. Pandit JJ, O'Gallagher K. Effects of volatile anesthetics on carotid body response to hypoxia in animals. *Adv Exp Med Biol* 2008; 605: 46-50.
84. AVMA Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 669-696.
85. Chitravanshi VC, Sapru HN. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat. *Brain Res* 1999; 821: 443-460.
86. Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Patterns of phrenic motor output evoked by chemical stimulation of neurons located in the pre-Bötzinger complex in vivo. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1150-1161.
87. Pierrefiche O, Schwarzacher SW, Bischoff AM, Richter DW. Blockade of synaptic inhibition within the pre-Bötzinger complex in the cat suppresses respiratory rhythm generation in vivo. *J Physiol* 1998; 509: 245-254.
88. Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 2000; 83: 2854-2868.
89. Mazze R, Rice S, Baden J. Halothane, isoflurane, and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats. *Anesthesiology* 1985; 62: 339-341.

90. Crawford MW, Lerman J, Saldivia Carmicheal FJ. Hemodynamic and organ blood flow response to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth Analg* 1992; 75: 1000-1006.
91. Welch PD. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. *IEEE Trans Audio Electroacoustics* 1967; 15: 70-73.
92. Cohen MI, See WR, Christakos CN, Sica AL. High-frequency and medium-frequency components of different inspiratory nerve discharge and their modification by various inputs. *Brain Res* 1987; 417: 148-152.
93. Comte JC, Morfu S. Stochastic resonance: another way to retrieve subthreshold digital data. *Phys Lett A* 2003; 309: 39-43.
94. Karanovic N, Pecotic R, Valic M, Jeroncic A, Carev M, Karanovic S, Ujevic A, Dogas Z. The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia in rats. *Anaesthesia* 2010; 65: 227-234.
95. Pandit JJ, Buckler KJ. Halothane and sevoflurane exert different degrees of inhibition on carotid body glomus cell hypoxic response. *Anesth Analg* 2008; 16: S-186.
96. Pandit JJ, Buckler KJ. Differential effects of halothane and sevoflurane on hypoxia-induced intracellular calcium transients of neonatal rat carotid body type I cells. *Br J Anaesth* 2009; 103: 701-710.
97. Kuribayashi J, Sakuraba S, Kashiwagi M, Hatori E, Tsujita M, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana Shu-ichi. Neural mechanisms of sevoflurane-induced respiratory depression in newborn rats. *Anesthesiology* 2008; 109: 233-242.
98. Steinback CD, Poulin MJ. Ventilatory responses to isocapnic and poikilocapnic hypoxia in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 155: 104-113.

99. Eriksson LI. The effects of residual neuromuscular blockade and volatile anesthetics on the control of ventilation. *Anesth Analg*; 1999; 89: 243-251.
100. Stuth EA, Dogas Z, Krolo M, Kampine JP, Hopp FA, Zuperku E J . Dose dependent effects of halothane on the phrenic nerve response to acute hypoxia in vagotomized dogs. *Anesthesiology* 1997; 87: 1428-1439.
101. Koh SO, Severinghaus JW. Effects of halothane on hypoxic and hypercapnic ventilatory response of goats. *BrJ Anaesth* 1990; 65: 713-717.
102. Ward DS. Inhalational anesthetics and control of breathing during hypoxia. *Anesthesiol Clin North America* 1998; 16: 77-88.
103. Neubauer JA. Invited Review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1593-1599.
104. Mitchell GS, Johnson SM. Invited Review: Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* 2003; 94: 358-374.
105. Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA et al. Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2466-2475.
106. Turner DL, Mitchell GS. Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. *J Physiol* 1997; 499: 543-550.
107. Bach KB, Kinkead R, Mitchell GS. Post-hypoxia frequency decline in rats: sensitivity to repeated hypoxia and alpha2-adrenoreceptor antagonism. *Brain Res* 1999; 817: 25-33.
108. Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS. Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol* 2000; 121: 135-146.
109. Baker TL, Mitchell GS. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 2000; 520: 215-219.
110. Van den Elsen M, Dahan A, DeGoede J, Berkenbosch A, van Kleef J. Influences of

subanesthetic isoflurane on ventilator control in humans. *Anesthesiology* 1995; 83:
478-490.

14. ŽIVOTOPIS

Školovanje

- Osnovna škola, Split
- Klasična gimnazija „Natko Nodilo“, Split
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Specijalizacija iz anesteziologije i reanimatologije, Split, Beograd
- Poslijediplomski studij iz Alergologije i imunologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Poslijediplomski znanstveni studij iz Kliničke medicine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Akademski stupanj

- 1979: Dr. med., Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Hrvatska
- 2002: Mr. sc., Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Hrvatska (naslov magisterija: «Utjecaj rokuronija na okulokardijalni refleks pri operacijama dječjeg strabizma u halotanskoj anesteziji»). Mentor prof. dr. sc. Zoran Đogaš

Posebni profesionalni tečajevi

- 1982. Osnove hiperbarične, podvodne i pomorske medicine, Split. Mentor prof. dr. sc. Stracimir Gošović
- 2006. Intensive Training Course in Pedagogy and Didactics in Medical Education TEMPUS-Project STEAMED, Beč, Austrija. Mentori prof dr. sc. Richard März i prof. dr. sc. Hubert Wiener
- 2007. Intensive Training Course on General Didactics TEMPUS-Project STEAMED, Beč, Austrija. Mentor prof. dr. sc. Gottfried Csanyi
- 2009. Tečaj vještine medicinske edukacije i znanstvenog rada, Split. Mentor prof. dr. sc. Zoran Đogaš
- 2009. Training of Hospital Response for Major Incidents Course –THRMI. Mentor prof. dr. sc. Sten Lennquist
- 2009. Završen tečaj za instruktora: Medical response to major incidents (MRMI). Mentor prof. dr. sc. Sten Lennquist

Dosadašnji rad

- 1979. - 1981. obvezni pripravnički staž D.Z. Split i Opća bolnica Split
- 1981. – 1985. primarna zdravstvena zaštita

- 1985. – 1989. specijalizacija bivša Vojna bolnica Split, KBC Split, VMA Beograd. Specijalizaciju završio s odličnim uspjehom
- 1989. – 1991. bivša Vojna bolnica Split
- 1991. – sada Klinički bolnički centar Split
- 1991. – 1995. kao član mobilnih kirurških ekipa aktivno učestvovao u Domovinskom ratu
- Od 1998. – 2009. asistent na Katedri za medicinu u izvanrednim uvjetima
- Od 2009. – sada asistent na Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje, tajnik Katedre
- Od 2002.-2004. član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Od 2007. – 2008., ponovo član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Od 2006. - sada u kumulativnom radnom odnosu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu kao asistent
- Od 2005.- 2009. član Povjerenstva za nastavu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Specijalistički rad

- Specijalist anesteziologije i reanimatologije 20 godina.
- Kao jedan od dvojice anesteziologa započeo s primjenom i uvođenjem regionalne očne anestezije.
- Učestvovao u organizaciji i pokretanju sustavne opstetrijske analgezije tzv. „bezbolnog poroda“.
- Od samog početka učestvuje u pripremi, uvođenju i organizaciji kardijalne anestezije i intenzivnog liječenja kardiokirurških bolesnika u KBC Split.
- Od 2006. – sada v.d. zamjenika voditelja Odjela za anesteziju i intenzivno liječenje KBC Split
- Od 2007. – sada koordinator rada kardiokirurške anestezije i intenzivnog liječenja kardiokirurških bolesnika
- U KBC Split odgovoran za organiziranje sekundarnih transporta prema drugim medicinskim ustanovama.
- Od 2007. – sada član Upravnog odbora Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu
- 2009. dodijeljen naziv primarijus od strane Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH

Rad na stručnom uzdizanju zdravstvenih djelatnika

- Kao nositelj radova učestvuje na europskim i domaćim kongresima i sastancima anesteziologa, kirurga i srodnih struka
- Pozvani predavač na međunarodnim tečajevima za liječnike te na međunarodnim kongresima i simpozijima
- Više godina stalni predavač na poslijediplomskim usavršavanjima iz anesteziologije i intenzivnog liječenja za specijaliste i specijalizante, u organizaciji regionalnog FEEA (Fondation Europeenne d'Enseignement en Anesthesiologie) centra pod pokroviteljstvom Europske unije
- 2004. – sada: stalni predavač i utemeljitelj međunarodnih tečajeva *Emergency medicine* u organizaciji EMSA (European medical students' association), Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i HLZ (Hrvatski liječnički zbor) – *Summer school* (Ljetna škola) za studente medicine i mlade liječnike

Stručno/znanstveno - publicistički rad

- Objavio više radova u indeksiranim i neindeksiranim časopisima, od toga 7 radova indeksiranih u *Current Contents*. Autor desetak poglavlja u udžbenicima i priručnicima iz anesteziologije, intenzivne i hitne medicine
- Ukupno objavio više od 60 stručnih i znanstvenih radova

Usavršavanje

- 2002. Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA, Department of Physiology, Respiratory Laboratory.
- 2003.-2007. Edukacija i usavršavanje iz kardijalne anestezije. Klinika za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Klinička bolnica „Dubrava“ Zagreb.
- 2004. Usavršavanje iz kardiovaskularne anestezije. Klinika za kardiovaskularnu kirurgiju Semmelweis sveučilišta, Budimpešta, Mađarska.
- 2008. Usavršavanje iz kardijalne anestezije – specifičnosti u tzv. „off-pump“ kardijalnoj anesteziji, Klinika za kardijalnu kirurgiju, Zürich, Švicarska.

Znanstveni rad

- 2002.- 2005. istraživač u znanstvenom projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Neurotransmiteri u kontroli disanja“ pod vodstvom prof. dr. sc. Z. Đogaša
- 2006.- sada: Istraživač u znanstvenom projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa „Neuralna kontrola disanja u budnosti i spavanju“, voditelj prof. dr. sc. Z. Đogaš

Profesionalni interes: intenzivno liječenje, kardijalna anestezija

Priznanja

- Zahvalnica hrvatske bolnice u Novoj Bili, BiH
- Zahvalnica HLZ-a za zbrinjavanje ozlijeđenih u Domovinskom ratu
- Zahvalnica za dogodišnju suradnju Instituta za pomorsku medicinu HRM
- Zahvalnica HLZ-a za zasluge u radu Zbora, unaprijeđenju medicinske struke te za zdravstvenu i humanitarnu djelatnost
- Diploma HLZ za značajan doprinos u promidžbi Zbora, promicanju stručnih, znanstvenih i etičkih načela i unapređenju zdravlja naroda

Članstvo u stručnim i strukovnim udruženjima

- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatsko društvo za anesteziologiju i intenzivno liječenje
- Hrvatsko društvo za intenzivnu medicinu
- Hrvatsko društvo za pomorsku, podvodnu i hiperbaričnu medicinu
- Hrvatsko somnološko društvo
- European society of anesthesiologists
- European association of cardiothoracic anesthesiologists
- European society of intensive care medicine

15. NAPOMENA

Podatci iz pilot pokusa djelomično su prikazani na Europskom kongresu anesteziologa održanom u Kopenhagenu, Danska, od 31. svibnja do 3. lipnja 2008. pod nazivom: *The effects of sevoflurane, isoflurane and halothane on the pattern of phrenic nerve activity in response to acute hypoxia in rats* pristupnika Nenada Karanovića i koautora Renate Pecotić, Maje Valić, Mladena Careva i Zorana Đogaša.

Istraživanje je većim dijelom objavljeno u časopisu Udruženja anesteziologa Velike Britanije i Irske: Karanovic N, Pecotic R, Valic M, Jeroncic A, Carev M, Karanovic S, Ujevic A, Dogas Z. The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane and sevoflurane anaesthesia in rats. *Anaesthesia* 2010; 65: 227-234.