

Promjene aktivnosti renalnoga živca u ovisnosti o udjelu kisika u udahnutoj smjesi u modelu akutne ponavljane hiperkapnije u štakora - uloga Alfa2-adrenoreceptora

Madirazza, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:071140>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Katarina Madirazza

**PROMJENE AKTIVNOSTI RENALNOGA ŽIVCA U OVISNOSTI
O UDJELU KISIKA U UDAHNUTOJ SMJESI U MODELU
AKUTNE PONAVLJANE HIPERKAPNIJE U ŠTAKORA
– ULOGA ALFA2-ADRENORECEPTORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Split, 2022.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za temeljnu neuroznanost Zavoda za neuroznanost Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanja su provedena uz potporu Hrvatske zaklade za znanost (*Translacijsko istraživanje neuroplastičnosti disanja i učinka intermitentne hipoksije u anesteziji i spavanju, TIHO2_SLEEP_BREATH, broj projekta IP-11-2013-5935, voditelja prof. dr. sc. Zorana Đogaša*).

VODITELJICA RADA:

Izv. prof. dr. sc. Renata Pecotić, dr. med.

Zavod za neuroznanost, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

ZAHVALA

Teško je pronaći prikladne riječi kojima bih mogla izraziti svoju neizmjernu zahvalnost mentorici, izv. prof. dr. sc. Renati Pecotić. Ona je tijekom cijeloga procesa izrade ove disertacije vjerovala u mene, poticala me da budem najbolja što mogu i svesrdno dijelila svoje vrijeme, bogato znanje i znanstveno iskustvo. Čast mi je bila učiti od izvrsne znanstvenice, a ujedno i od osobe koju krasi humanost i dobrota.

Kolegici Jeleni Baričević, iskazujem osobitu zahvalnost za nebrojene sate zajedničkog rada i sudjelovanje u svakom pokusu uključenom u ovu disertaciju. Svojom predanošću i energijom olakšala je i uveselila svaki radni dan.

Posebnu zahvalu upućujem kolegama sa Zavoda za neuroznanost, prof. dr. sc. Zoranu Đogašu, prof. dr. sc. Maji Valić, doc. dr. sc. Ivani Pavlinac Dodig i dr. sc. Lindi Lušić Kalcina, koji su značajno pridonijeli izradi ove disertacije i što su me od prvog dana smatrali dijelom svoje male obitelji.

U danima u kojima je bilo teško zadržati pribranost te ustrajati u ovome što radim, Danijel i Maja dali su mi snagu i poticali me da nastavim dalje. Bez njihove vedrine i optimizma zasigurno ne bih prošla cijeli ovaj put pa im se iskreno zahvaljujem na prijateljstvu i vjeri u mene.

Mariju Maličkom osobito hvala što me bez zadržke preporučio prof. Pecotić i na taj način omogućio mi doći u priliku izraditi ovu disertaciju i postati dijelom Zavoda za neuroznanost.

Mojim dragim prijateljicama, Marijani, Danieli, Ani i Željki, hvala što su mi trajni životni oslonac i što su mi stoput rekle kako se ponose mojim postignućima. Vjerujte mi, značilo je.

Najveće hvala mojoj obitelji, majci Ivani, ocu Vinku, sestri Maji i teti Marini, što su, usprkos udaljenosti koja nas je često razdvajala, uvijek bili tu, a bez čije bezgranične ljubavi i podrške ništa od ovoga ne bi bilo moguće.

Naposljetku, hvala mom Hrvoju i kćerki Riti, na strpljenju i odricanju. Zbog vas je sve i dobilo smisao.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....	i
1. UVOD.....	1
1.1. Simpatički živčani sustav	2
1.2. Središnja regulacija simpatičkoga živčanog sustava.....	3
1.2.1. Uloga kaudalnih rafe jezgara u regulaciji simpatičke aktivnosti.....	5
1.3. Refleksna regulacija simpatičkoga živčanog sustava.....	6
1.3.1. Barorefleks i regulacija simpatičke živčane aktivnosti	6
1.3.2. Kemorefleks i regulacija simpatičke živčane aktivnosti	7
1.3.2.1. Periferni kemoreceptori	7
1.3.2.2. Središnji kemoreceptori	8
1.3.2.3. Međuodnos perifernoga i središnjeg kemorefleksa	9
1.4. Respiracijska regulacija simpatičkoga živčanog sustava	10
1.5. Simpatička regulacija bubrega	11
1.6. Prekomjerna aktivacija simpatikusa i poremećaji disanja tijekom spavanja	13
1.7. Animalni modeli opstruktivske apneje tijekom spavanja.....	13
1.8. Hiperkapnija i utjecaj na respiracijski i simpatički sustav	14
1.9. Uloga rafe jezgara i noradrenalinske signalizacije u odgovoru na hiperkapniju	15
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Etička načela	20
3.2. Pokusne životinje	20
3.3. Anestezija i kirurška priprema životinja	20
3.3.1. Kirurgija renalnoga simpatičkog živca	21
3.3.2. Okcipitalna kraniotomija	21
3.4. Snimanje i obrada zapisa renalnoga simpatičkog živca i arterijskog tlaka	22

3.5. Pokusni postupci prve studije.....	23
3.5.1. Pokusni protokol akutne ponavljane hiperkapnije.....	23
3.6. Pokusni postupci druge studije.....	25
3.6.1. Intravenska primjena antagonista alfa2-adrenoreceptora – johimbina.....	26
3.6.2. Mikroubrizgavanje u područje kaudalnih rafe jezgara	26
3.6.3. Pokusni protokol akutne ponavljane hiperkapnije.....	27
3.6.4. Histološka potvrda mjesta ubrizgavanja	28
3.7. Statistički postupci	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Rezultati prve studije.....	31
4.1.1. Odgovor renalnoga simpatičkog živca na značajnu ponavljanu hiperkapniju	31
4.1.2. Odgovor renalnoga simpatičkog živca na umjerenu ponavljanu hiperkapniju	31
4.1.3. Usporedba skupina izlaganih značajnoj i umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji	34
4.1.4. Promjene srednjega arterijskog tlaka.....	35
4.1.5. Promjene srčane frekvencije.....	35
4.1.6. Acidobazni status.....	35
4.2. Rezultati druge studije.....	39
4.2.1. Sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora	39
4.2.2. Središnje blokiranje alfa2-adrenoreceptora	44
4.2.2.1. Kontrolna skupina.....	44
4.2.2.2. Johimbinska skupina.....	44
4.2.2.3. Usporedba kontrolne i johimbinske skupine.....	44
4.2.2.4. Histološka potvrda mjesta mikroubrizgavanja.....	45
5. RASPRAVA.....	46
5.1. Učinak akutne ponavljane hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca	47
5.2. Uloga alfa2-adrenoreceptora u promjenama aktivnosti renalnoga simpatičkog živca uslijed izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.....	51

5.3. Ograničenja istraživanja.....	53
5.4. Znanstveni doprinos disertacije.....	54
6. ZAKLJUČCI.....	56
7. SAŽETAK	58
8. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY).....	61
9. POPIS LITERATURE	64
10. ŽIVOTOPIS	80

POPIS OZNAKA I KRATICA

3R	etičko načelo (engl. <i>replacement, reduction, refinement</i>)
7N	sedmi moždani živac (facijalni živac)
A5	skupina noradrenergičnih neurona kaudalnoga ventrolateralnog ponsa
A6	skupina noradrenergičnih neurona locus coeruleusa
ABS	acidobazni status
AIH	akutna ponavljana hipoksija (engl. <i>acute intermittent hypoxia</i>)
AIHc	akutna ponavljana hiperkapnija (engl. <i>acute intermittent hypercapnia</i>)
a.j.	arbitrarne (proizvoljne) jedinice
AMB	lat. <i>nucleus ambiguus</i>
Ang II	angiotenzin II
ANOVA	analiza varijance; statistički postupak
AP	lat. <i>area postrema</i>
AT	arterijski tlak
C	kaudalno kemosenzitivno područje (engl. <i>caudal</i>)
C1R	bubrežni kemoreceptor; vrsta
C2R	bubrežni kemoreceptor; vrsta
cNTS	kaudalna jezgra solitarnog trakta (engl. <i>caudal nucleus tractus solitarius</i>)
CVLM	kaudalna ventrolateralna produljena moždina (engl. <i>caudal ventrolateral medulla</i>)
DLH	D,L-homocisteična kiselina
DR	dorzalna rafe jezgra
DRG	ganglij dorzalnog korijena
F	frekvencija disanja
FiCO ₂	udio ugljikova dioksida u udahnuтой smjesi (engl. <i>fraction of inspired carbon dioxide</i>)
FiO ₂	udio kisika u udahnuтой smjesi (engl. <i>fraction of inspired oxygen</i>)
FN	fastigijalna jezgra
GABA _A	receptor za gama-aminomaslačnu kiselinu (engl. <i>gamma-aminobutyric acid</i>)
HR	srčana frekvencija (engl. <i>heart rate</i>)
IML	intermediolateralni stupić
iRSNA	integrirani signal renalnoga simpatičkog živca (engl. <i>integrated renal sympathetic nerve activity</i>)

IX	deveti moždani živac (lat. <i>nervus glossopharyngeus</i>)
JGS	jukstaglomerularne stanice
JOHIMBIN _{i.v.}	skupina u kojoj je johimbin bio primijenjen intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu
JOHIMBIN _{rafe}	skupina u kojoj je johimbin bio mikroubrizgan u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu
KONTROLA _{i.v.}	skupina u kojoj je fiziološka otopina bila primijenjena intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu
KONTROLA _{rafe}	skupina u kojoj je fiziološka otopina bila mikroubrizgana u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu
LC	locus coeruleus
LHA	područje lateralnog hipotalamusa
M	središnje kemosenzitivno područje (engl. <i>middle</i>)
MAP	srednji arterijski tlak (engl. <i>mean arterial pressure</i>)
MHc	umjerena hiperkapnija (engl. <i>moderate hypercapnia</i>)
MHoHc	umjerena hiperoksijska hiperkapnija (engl. <i>moderate hyperoxic hypercapnia</i>)
MR	bubrežni mehanoreceptori
NTS	jezgra solitarnog trakta (lat. <i>nucleus tractus solitarius</i>)
OSA	opstrukcijska apneja tijekom spavanja (engl. <i>obstructive sleep apnea</i>)
OVL	lat. <i>organum vasculosum lamina terminalis</i>
PACAP	hipofizni polipeptid koji aktivira adenilat ciklazu (engl. <i>pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>)
PaCO ₂	parcijalni tlak ugljikova dioksida u arterijskoj krvi
PaO ₂	parcijalni tlak kisika u arterijskoj krvi
PBC	pre-Bötzingеров комплекс (engl. <i>pre-Bötzingер complex</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
pFRG	parafacijalna respiracijska skupina (engl. <i>parafacial respiratory group</i>)
pLTF	dugoročna facilitacija freničkoga živca (engl. <i>phrenic long-term facilitation</i>)
Pn	pons
POA	preoptičko područje hipotalamusa (engl. <i>preoptic area</i>)
PVN	paraventrikularna jezgra hipotalamusa (engl. <i>paraventricular nucleus</i>)
R	rostralno kemosenzitivno područje

RAS	sustav renin-angiotenzin
RMg	jezgra <i>raphe magnus</i>
ROb	jezgra <i>raphe obscurus</i>
RPa	jezgra <i>raphe pallidus</i>
rRSNA	neobrađeni signal renalnoga simpatičkog živca (engl. <i>raw renal sympathetic nerve activity</i>)
RSNA	aktivnost renalnoga simpatičkog živca (engl. <i>renal sympathetic nerve activity</i>)
RTN	retrotrapezoidna jezgra (engl. <i>retrotrapezoid nucleus</i>)
RVLM	rostralna ventrolateralna produljena moždina (engl. <i>rostral ventrolateral medulla</i>)
RVMM	rostralna ventromedijalna produljena moždina (engl. <i>rostral ventromedial medulla</i>)
rVRG	rostralna ventralna respiracijska skupina (engl. <i>rostral ventral respiratory group</i>)
SEM	standardna pogreška (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SFO	subfornikalni organ
SHc	značajna hiperkapnija (engl. <i>severe hypercapnia</i>)
SHoHc	značajna hiperoksijska hiperkapnija (engl. <i>severe hyperoxic hypercapnia</i>)
sLTF	simpatička dugoročna facilitacija (engl. <i>sympathetic long-term facilitation</i>)
SO	gornja oliva (engl. <i>superior olive</i>)
SON	supraoptička jezgra hipotalamusa (engl. <i>supraoptic nucleus</i>)
SPGN	simpatički preganglijski neuroni
SŽS	središnji živčani sustav
T0	početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije; vremenska točka pokusa
T15	15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode; vremenska točka pokusa
THc1-5	hiperkapnijske epizode 1-5; vremenske točke pokusa
T _i	trajanje udisaja u sekundama
V4	četvrta moždana komora
VII	jezgra facijalnog živca
X	deseti moždani živac (lat. <i>nervus vagus</i>)

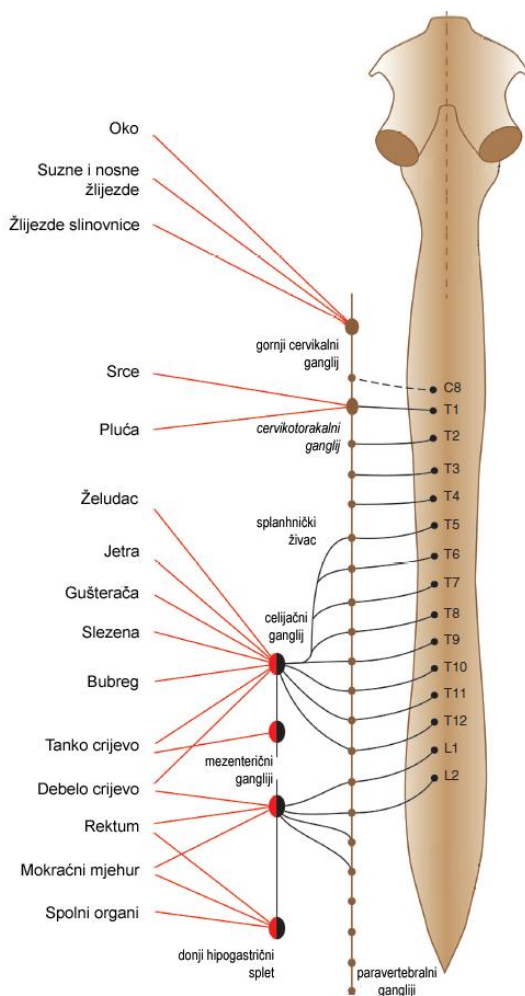
1. UVOD

1.1. Simpatički živčani sustav

Simpatički, parasimpatički i enterički živčani sustav čine autonomni živčani sustav, čija je glavna funkcija održavanje homeostaze stanica, organa i tijela, kao odgovor na kolebanja unutarnjih i okolišnih čimbenika (1).

Simpatički živčani sustav inervira krvne žile (prvenstveno arteriole i vene), žlijezde znojnice, strukture glave (oko, žlijezde slinovnice, sluznicu nosa) te visceralne organe (srce, pluća, želudac, crijeva, gušteraču, slezenu, nadbubrežnu žlijezdu, mokraćni mjehur) (1, 2). Čine ga relativno kratki simpatički preganglijski neuroni (SPGN) intermediolateralnog stupića (IML) koji izlaze iz torako-lumbalnih segmenata (T1-L2) kralježnične moždine te postganglijski neuroni prevertebralnih i paravertebralnih simpatičkih ganglija (Slika 1). Postganglijski simpatički neuroni duži su i završavaju sinapsom na ciljnim organima i tkivima. Simpatički preganglijski neuroni luče neurotransmiter acetilkolin, dok većina postganglijskih neurona luče noradrenalin, s iznimkom postganglijskih neurona koji inerviraju žlijezde znojnice i srž nadbubrežne žlijezde (1, 2).

Jedan preganglijski simpatički neuron može inervirati više postganglijskih neurona, tipično u omjeru 1:20, što omogućuje koordiniranu simpatičku aktivaciju više ciljnih organa (1). Ranije se, zbog tog svojstva te zbog značajne aktivacije simpatikusa u emotivnim stanjima, smatralo kako odgovor simpatikusa funkcionira po načelu „sve ili ništa“ te da se sve komponente simpatičkog sustava zajednički aktiviraju (1). Međutim, poznato je da je simpatički živčani sustav tonički aktivan i u stanju mirovanja za održavanje tonusa arteriola i arterijskog tlaka. Nadalje, simpatički se živčani sustav dodatno aktivira u situacijama “bijega ili borbe” (engl. *fight-or-flight*), kad je nužno pripremiti tijelo na iscrpljujuću tjelesnu aktivnost ili kao odgovor na nagle promjene okolišnih čimbenika. Aktivacija simpatikusa u takvim uvjetima ima za cilj povećati dotok krvi bogate kisikom i hranjivim tvarima u tkiva kojima je u tom trenutku potrebna (2). Usprkos istodobnoj aktivaciji više sustava kontroliranih simpatikusom za vrijeme stresnih događaja, postoje brojni anatomske i fiziološki dokazi da je simpatička inervacija ciljnih organa vrlo različita te da područja središnjega živčanog sustava (SŽS) koja kontroliraju simpatičku aktivnost imaju organotopski ustroj (3, 4).



Slika 1. Građa simpatičkoga živčanog sustava s prikazom simpatičkih preganglijskih (označeni crnom bojom) i postganglijskih neurona (označeni crvenom bojom) te raspodjelom vlakana prema ciljnim organima [preuzeto i izmijenjeno iz Wehrwein i sur. (1)].

1.2. Središnja regulacija simpatičkoga živčanog sustava

Simpatički preganglijski neuroni IML-a izravno su inervirani, a njihova aktivnost kontrolirana je aktivnošću simpatičkih premotoričkih neurona. Ranijim studijama utvrđeno je da brojna supraspinalna područja šalju izravne projekcije prema SPGN, uključujući određene jezgre moždanog debla i hipotalamusa te se, stoga, smatraju simpatičkim premotoričkim neuronima (5-7). Metodom retrogradnog bojanja utvrđeno je da se radi o neuronima rostralne ventrolateralne produljene moždine (engl. *rostral ventrolateral medulla*, RVLN), rostralne ventromedijalne produljene moždine (engl. *rostral ventromedial medulla*, RVMM), kaudalnih rafe jezgara, A5 skupine noradrenergičnih neurona kaudalnog ventrolateralnog ponsa te neuronima paraventrikularne jezgre hipotalamusa (engl. *paraventricular nucleus*, PVN) (7). Svi navedeni putevi sudjeluju u regulaciji homeostatskih funkcija koje uključuju održavanje

4

Nadalje, glavna središta za regulaciju simpatičke aktivnosti koja se nalaze u produljenoj moždini pod nadzorom su i moždane kore, srednjeg mozga i limbičkog sustava, ali se smatra da je važnost tih puteva isključivo u kratkoročnoj regulaciji simpatičkog tonusa povezanoj s ponašanjem (3). Dodatno, neuroni središnje mreže za regulaciju simpatičkog sustava, ali i sami simpatički gangliji, mogu biti regulirani hormonima i različitim čimbenicima koji se izlučuju u krvotok. Hormoni, citokini i drugi medijatori mogu djelovati izravno na simpatička središta ili putem cirkumventrikularnih organa (subfornikalni organ - SFO, *organum vasculosum lamina terminalis* i *area postrema*) te tako mijenjati simpatičku aktivnost (3).

Dodatnu složenost daje i činjenica da na središnju mrežu za regulaciju simpatičke aktivnosti, putem brojnih i još nedovoljno razjašnjenih mehanizama može djelovati i sustav renin-angiotenzin (RAS) te aktivnost središnjih osmo- i kemoreceptora, koji su osjetljivi na promjene koncentracije natrijevih iona i osmolalnosti te hipoksiju i hiperkapniju (3).

1.2.1. Uloga kaudalnih rafe jezgara u regulaciji simpatičke aktivnosti

Poznato je da RVLM nije isključivi izvor inervacije simpatičkih preganglijskih neurona koji nadziru kardiovaskularne funkcije (14, 15). S obzirom da je većina dosadašnjih istraživanja bila usmjerena definiciji uloge silaznih projekcija RVLM-a u regulaciji kardiovaskularne funkcije, uloga ostalih simpatičkih premotoričkih jezgara do danas je ostala nedostavno istražena.

Kaudalne rafe jezgre čine *nucleus raphe magnus*, *nucleus raphe obscurus* i *nucleus raphe pallidus*, koje su u štakora raspoređene u usku skupinu stanica u središnjoj crti produljene moždine koja se proteže od rostralnog pola jezgre facijalnog živca do piramidne dekusacije (11, 16-18). Neuroni kaudalnih rafe jezgara većinom šalju silazne projekcije prema drugim dijelovima produljene moždine i kralježničnoj moždini, a njihovi su aksoni vrlo razgranati i imaju veliki broj završetaka na gotovo svim razinama SŽS-a (11). Takva anatomska organizacija omogućuje istodobno podraživanje više područja te je malo vjerojatno da aktivacija kaudalnih rafe jezgara dovodi do izolirane aktivacije pojedinačnih ciljnih organa. To sve ide u prilog tvrdnji da je primarna uloga kaudalnih rafe jezgara upravo modulacija kardiovaskularnih refleksnih puteva (11, 17).

Većinom serotoninski neuroni kaudalnih rafe jezgara uključeni su u brojne neurofiziološke funkcije poput modulacije osjeta boli, disanja, motoričke aktivnosti te brojnih autonomnih funkcija (6, 11, 18, 19). Prethodna istraživanja utvrdila su da su kaudalne rafe jezgre uključene u regulaciju simpatikusa putem izravnih projekcija u IML (6, 12, 13, 20, 21), ali i u druga područja koja sudjeluju u regulaciji simpatičke aktivnosti, primjerice RVLM (9).

Istraživanja u kojima su neuroni kaudalnih rafe jezgara električno ili kemijski podraživani potvrdila su postojanje funkcionalno specifičnih neurona u ovom području, čije podraživanje može imati simpatoekscitacijski ili simpatoinhibicijski učinak, ovisno o preciznom mjestu podraživanja (5, 17, 18, 20, 22-24). Podraživanje kaudalnih rafe jezgara rostralno od *obex*-a, odnosno dijela gdje se četvrta moždana komora sužava prema centralnom kanalu kralježnične moždine većinom ima simpatoekscitacijski učinak, dok podraživanje područja kaudalno od *obex*-a većinom dovodi do simpatoinhibicije (22, 25, 26).

1.3. Refleksna regulacija simpatičkoga živčanog sustava

Osim održavanja bazalne aktivnosti simpatičkih preganglijskih neurona, područje produljene moždine ključno je i u refleksnoj kontroli arterijskog tlaka te integrira aferentne signale barorefleksa, kemorefleksa i kardiopulmonalnog refleksa (3, 27). Aktivacija navedenih kardiovaskularnih refleksa, ali i brojnih drugih autonomnih refleksa, utječe na aktivnost RVLM-a posredstvom jezgre solitarnog trakta (lat. *nucleus tractus solitarius*, NTS) koja obavlja funkciju relejne postaje za većinu aferentnih osjetnih signala (3, 5, 28). U NTS-u završavaju aferentna živčana vlakna moždanih živaca glosofaringeusa i vagusa, koja prenose informacije iz brojnih perifernih receptora (5, 29, 30). Iako su za kontrolu kardiovaskularnog sustava najvažniji baro- i kemoreceptori, na simpatičku živčanu aktivnost može djelovati i upliv iz brojnih somatskih te visceralnih receptora (5, 30).

1.3.1. Barorefleks i regulacija simpatičke živčane aktivnosti

Najvažniji periferni nadzor nad arterijskim tlakom i simpatičkom aktivnošću zasigurno je arterijski barorefleks. Baroreceptori, koji se nalaze u karotidnom sinusu i aortnom luku, mehanoreceptori su koji zamjećuju istezanje krvnih žila uslijed promjena arterijskog tlaka, a putem glutamatergičnih vlakana vagusa i glosofaringeusa prenose informaciju u središnji živčani sustav (3, 28, 31).

Arterijski barorefleks djeluje kao negativna povratna sprega. Pri naglom povećanju arterijskog tlaka aktiviraju se baroreceptori, koji posredstvom vagusa i glosofaringeusa te intermedijarne podjezgre NTS-a, aktiviraju kaudalnu ventrolateralnu produljenu moždinu (engl. *caudal ventrolateral medulla*, CVLM) koja dodatno inhibira RVLM. Smanjena aktivnost RVLM neurona dovodi do smanjenja aktivnosti SPGN, smanjujući otpor perifernih krvnih žila, a posljedično i arterijski tlak (28, 31, 32).

Donedavno se smatralo da barorefleks ima ulogu isključivo u kratkoročnoj regulaciji arterijskog tlaka, međutim novija istraživanja pokazala su kako se osjetljivost barorefleksa

može mijenjati te su promjene u funkciji barorefleksa zabilježene u brojnim patofiziološkim stanjima (4, 32, 33). Iako su mehanizmi većinom nepoznati, smatra se da su dugoročne promjene arterijskog tlaka koje mogu nastati uslijed ponavljane aktivacije barorefleksa posredovane sustavom RAS ili drugim humoralnim čimbenicima (32, 34, 35). Nadalje, važnost barorefleksa u dugoročnoj kontroli arterijskog tlaka razlikuje se u normalnim uvjetima i stanjima stresa te tako disfunkcija barorefleksa može pridonijeti razvoju arterijske hipertenzije u određenim animalnim modelima (primjerice u štakora, engl. *Dahl salt-sensitive rat*), dok je njegova važnost u normalnim uvjetima zanemariva u dugoročnoj kontroli arterijskoga tlaka (3, 36).

1.3.2. Kemorefleks i regulacija simpatičke živčane aktivnosti

Kemorefleks je važan modulator simpatičke živčane aktivnosti, a njegova aktivacija, uz značajne promjene disanja i ponašanja, dovodi do povećanja srednjega arterijskog tlaka (engl. *mean arterial pressure*, MAP) koje je najvjerojatnije posljedica aktivacije simpatikusa (37). Fiziologija kemorefleksa je složena, a molekularni i stanični mehanizmi kemorecepcije predmet su brojnih istraživanja (38-40). Kemorefleks čine periferni i središnji putevi koji započinju kemoreceptorima, čija je glavna uloga nadzor nad plinovima u krvi i regulacija perfuzije tkiva (38).

1.3.2.1. Periferni kemoreceptori

Karotidna i aortna tjelešca, koja se nalaze na račvištima karotidnih arterija te aortnom luku, smatraju se glavnim perifernim kemoreceptorima (39). Iako su i u područjima prsnog koša i trbušne šupljine identificirana tkiva koja su morfološki slična tkivu karotidnih i aortnih tjelešaca i koja bi mogla služiti kao dodatni kemoreceptori, karotidna tjelešca su od svih perifernih kemoreceptora do sada identificiranih nedvojbeno najvažnija (39). Karotidna su tjelešca, za razliku od aortnih tjelešaca kojih nema u štakora, kunića i miševa, prisutna u svih sisavaca (29, 41). Aktivira ih niz podražaja poput hipoksije, hiperkapnije, acidoze, hipoglikemije te promjena temperature i protoka krvi (42). Neurosekretorne glomusne (tip I) stanice karotidnog tjelešca osjetljive su i depolariziraju se pri promjenama sastava krvi te utječu na aktivnost aferentnih osjetnih vlakana glosfaringeusa putem lučenja različitih neurotransmitera (32, 39, 42, 43). Precizni mehanizam kemosenzitivnosti tih stanica i vrste neurotransmitera koje sudjeluju u njihovoj signalizaciji do danas su predmet rasprave (38, 44). Trenutna saznanja ukazuju da hipoksija i hiperkapnija mogu dovesti do depolarizacije tih stanica zatvaranjem kalijevih kanala ovisnih o naponu te onih neovisnih o naponu (40, 42).

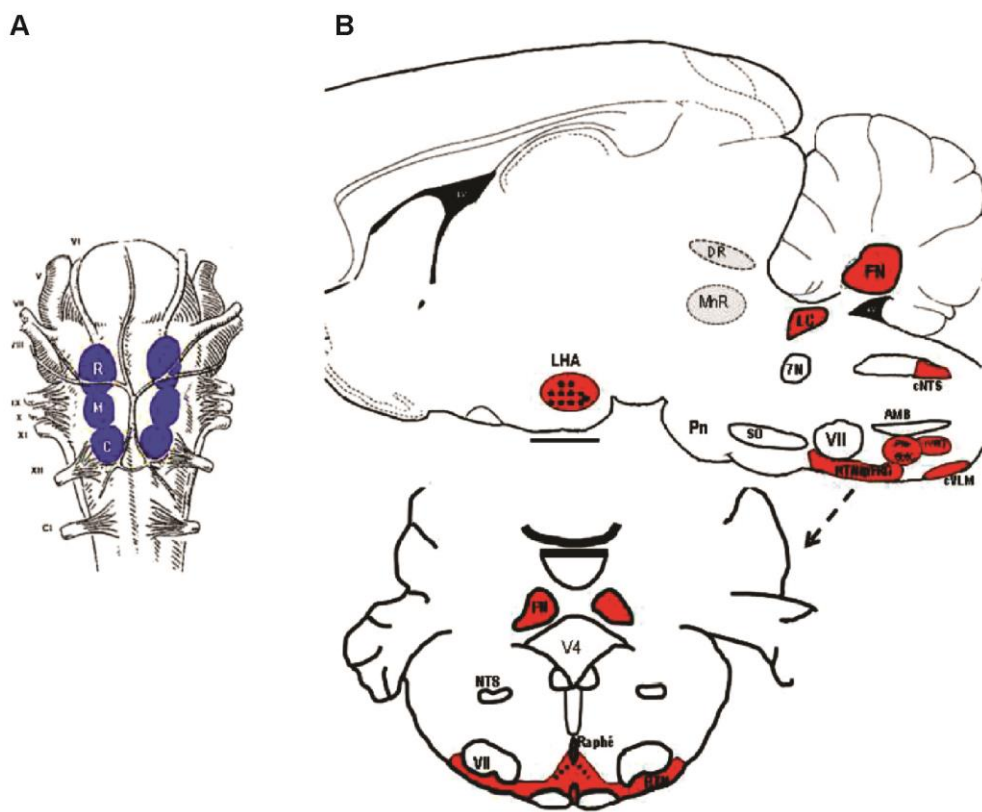
Vlakna glosofaringeusa koja prenose informaciju iz glomusnih stanica završavaju u komisuralnoj i medijalnoj podjezgi NTS-a, koje su dio dorzalne respiracijske skupine neurona zadužene za održavanje kardiorespiracijske homeostaze (39). Ekscitacijski neuroni komisuralnog NTS-a šalju projekcije prema brojnim područjima SŽS-a koja su uključena u regulaciju autonomne i respiracijske aktivnosti, primjerice retrotrapezoidnoj jezgri (engl. *retrotrapezoid nucleus*, RTN), inspiracijskim neuronima pre-Bötzingerovog kompleksa te RVLM-u (32, 45-48). Prijašnja istraživanja pokazala su da aktivacija perifernog kemorefleksa dovodi do povećanja frekvencije disanja, pojave aktivnog izdisanja te do povećanja simpatičke aktivnosti, koje može biti posredovano respiracijskom aktivnošću, ali i neovisno o disanju (29, 46, 49).

1.3.2.2. Središnji kemoreceptori

Pojam središnje kemorecepcije odnosi se na svojstvo osjetljivosti SŽS-a na promjene CO_2/H^+ koje posljedično dovede do promjena disanja, arterijskog tlaka i simpatičke aktivnosti (14, 50).

Prva istraživanja o lokaciji središnjih kemoreceptora u kojima je ventralna površina produljene moždine bila podvrgnuta lezijama ili primjeni kiselih otopina, predložila su da je upravo to područje primarno mjesto zamjećivanja promjena CO_2 u SŽS-u (49-52). U prilog toj tezi idu i druga istraživanja, kojima je dokazano postojanje specifičnih fenotipova stanica na ventralnoj površini produljene moždine za koje se smatra da bi mogle predstavljati središnje kemoreceptore (14, 49, 50, 53). Međutim, brojna druga područja SŽS-a osjetljiva su na promjene CO_2 te mogu aktivirati disanje i simpatikus *in vivo* (Slika 3), što je dovelo do mišljenja da je središnja kemorecepcija „raspodijeljena funkcija“ (50, 52).

U područjima NTS-a, RTN-a, kaudalnih rafe jezgara, pre-Bötzingerovog kompleksa, locus coeruleusa (LC) te hipotalamusa, funkcionalno su opisane kemosenzitivne strukture (29, 54). Lezije svih navedenih područja u različitim mjerama umanjuju respiracijski odgovor na CO_2 (55). Međutim, smatra se da RTN ima ključnu ulogu u središnjoj CO_2 kemorecepciji, s obzirom da blokiranje tog područja muscimolom (selektivni agonist GABA_A receptora) u potpunosti sprječava aktivaciju freničkog živca izazvanu hiperkapnijom (48). Nasuprot tome, aktivacija simpatikusa tijekom hiperkapnije samo je djelomično umanjena blokiranjem RTN-a, što nalaže da je povećanje simpatičke aktivnosti uslijed aktivacije središnjeg kemorefleksa posredovano i drugim područjima SŽS-a (48).



Slika 3. Lokacija središnjih kemoreceptora. Dosadašnje spoznaje – kemosenzitivna područja nalaze se na ventralnoj površini produljene moždine (podsjlika A); trenutne spoznaje – središnja kemorecepcija kao „raspodijeljena funkcija“ brojnih područja središnjeg živčanog sustava (podsjlika B). R: rostralno kemosenzitivno područje, M: središnje kemosenzitivno područje, C: kaudalno kemosenzitivno područje, LHA: područje lateralnog hipotalamusa, DR: dorzalna rafe jezgra, FN: fastigijalna jezgra, V4: četvrta moždana komora, LC: locus coeruleus, 7N: facijalni živac, cNTS: kaudalna jezgra solitarnog trakta, AMB: *nucleus ambiguus*, VII: jezgra facijalnog živca, SO: gornja oliva, PBC: pre-Bötzingrov kompleks, rVRG: rostralna ventralna respiracijska skupina, CVLM: kaudalna ventrolateralna produljena moždina, RTN/pFRG: retrotrapezoidna jezgra/parafacijalna respiracijska skupina, Pn: pons [preuzeto iz Nattie i sur. (50)].

1.3.2.3. Međuodnos perifernoga i središnjeg kemorefleksa

Periferni i središnji kemorefleksi imaju ključnu ulogu u održavanju respiracijske i kardiovaskularne homeostaze, ali je relativni doprinos svakoga pojedinačno te njihov međuodnos u stanju mirovanja i za vrijeme hiperkapnije još uvijek predmet rasprave (29, 44, 50, 56). Periferne kemoreceptore prvenstveno aktivira hipoksija, dok su središnji kemoreceptori aktivirani hiperkapnijom (38). Dugi niz godina smatralo se kako je osjetljivost na CO₂ isključiva posljedica aktivnosti središnjih kemoreceptora, međutim novijim istraživanjima utvrđeno je da su i periferni kemoreceptori osjetljivi na promjene parcijalnog

tlaka ugljikova dioksida u arterijskoj krvi (PaCO_2) te da mogu pridonijeti i do 30% sveukupnog odgovora na hiperkapniju (29, 56-58). Nasuprot tome, konsenzus o međuodnosu perifernoga i središnjeg kemorefleksa do danas nije postignut. Prethodne studije na životinjama i ljudima pokazale su da kemorefleks i mogu djelovati zajedno, tako da se međusobno pojačavaju ili oslabljuju, ali i neovisno jedan o drugome (44, 56, 59, 60). Zaključno, relativni doprinos i međuodnos perifernoga i središnjeg kemorefleksa može ovisiti o animalnom modelu, stanju budnosti/spavanja te ponašanju životinje (mirovanje/napor). Međutim, čini se da ipak periferni i središnji kemorefleks i nisu funkcionalno odvojene cjeline već su međuvizisni jedan o drugom te se mogu uzajamno modulirati na način da osjetljivost jednog refleksa određuje informacija iz onoga drugoga (60).

1.4. Respiracijska regulacija simpatičkoga živčanog sustava

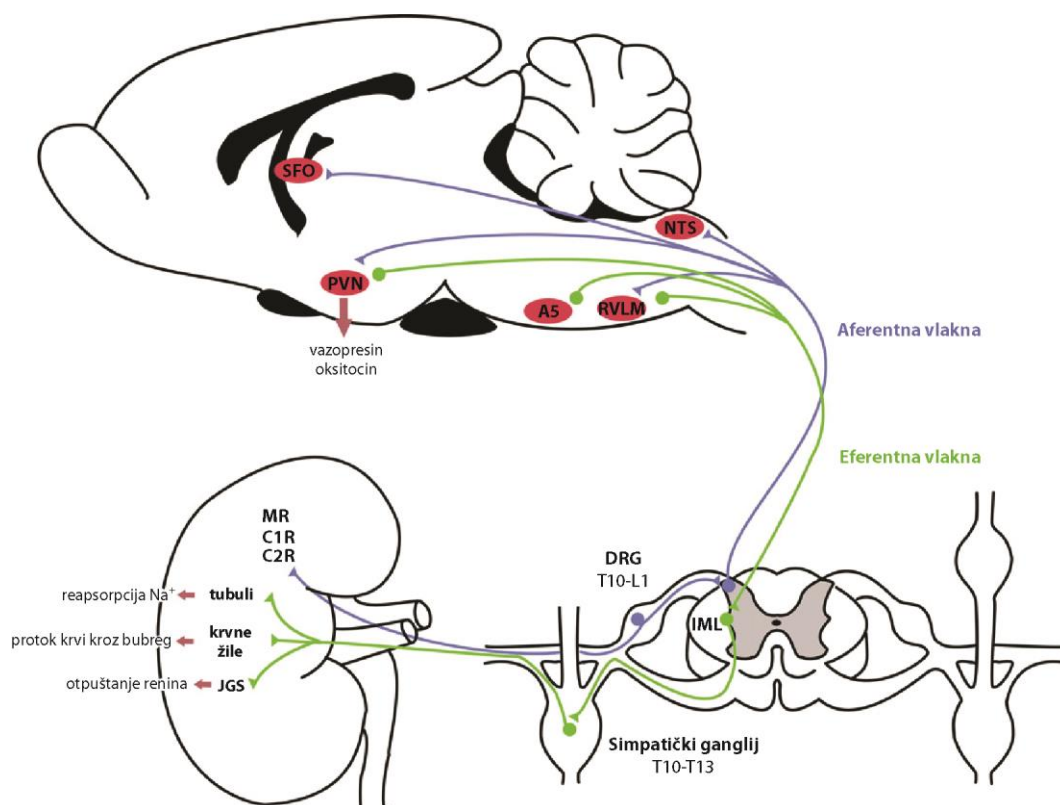
Simpatička aktivnost pod značajnim je utjecajem i može biti izrazito modulirana respiracijskom aktivnošću (32, 44, 61). U anestetiziranih životinja, u simpatičkoj aktivnosti vidljiva je ritmičnost usklađena s ciklusom disanja (61). Sam obrazac ritmičnosti može se uvelike razlikovati ovisno o vrsti životinje, pokusnoj preparaciji, korištenom anestetiku te snimanom simpatičkom živcu (44, 62, 63). Mehanizmi u pozadini uparivanja (engl. *coupling*) respiracijske i simpatičke aktivnosti do danas nisu u potpunosti razjašnjeni i ostaje za istražiti pojavljuje li se taj fenomen u neanestetiziranih životinja te ima li fiziološki značaj (44). Brojne studije upućuju kako je uparivanje respiracijske i simpatičke aktivnosti posredovano izravnim vezama respiracijskih i simpatičkih središta ventralne površine produljene moždine te da je to dinamični proces koji se može mijenjati u skladu s obrascem disanja ili metaboličkim izazovima (63-65). Elektrofiziološke studije pokazale su kako je u normalnim uvjetima (normoksija/normokapnija) tijekom udisaja vidljivo povećanje simpatičke aktivnosti, koja postiže vršne vrijednosti u kasnom udisaju ili ranom izdisaju (tzv. post-inspiracijska faza) (63, 66). Nasuprot tome, za vrijeme hiperkapnije ili hipoksije obrazac uparivanja respiracijske i simpatičke aktivnosti može se značajno razlikovati u odnosu na normalne uvjete te je zabilježeno povećanje simpatičke aktivnosti za vrijeme izdisaja, što je najvjerojatnije povezano s pojavom aktivnog izdisanja koje se očituje povećanom aktivnošću abdominalnog živca (67). Uparivanje respiracijske i simpatičke aktivnosti, stoga, može predstavljati važan mehanizam za održavanje optimalne cirkulacije i izmjene plinova kako u normalnim uvjetima, tako i za vrijeme metaboličkih izazova (32, 66, 68).

1.5. Simpatička regulacija bubrega

Bubrezi imaju važnu ulogu u regulaciji arterijskog tlaka i cirkulirajućeg volumena krvi, a inervirani su spletom živaca koji se protežu uzduž bubrežnih arterija i ulaze u hilus bubrega (69). Autonomnu inervaciju bubrega čine većinom simpatička vlakna koja luče noradrenalin i inerviraju bubrežne krvne žile, jukstaglomerularne stanice i tubule (Slika 4) (69-71). Renalni živac, stoga, u ovisnosti o frekvenciji aktivnosti renalnoga simpatičkog živca (engl. *renal sympathetic nerve activity*, RSNA) regulira izlučivanje natrija i vode, sužavanje bubrežnih žila i aktivnost sustava renin-angiotenzin (70, 71). Ranija su istraživanja pokazala da je RSNA pouzdani pokazatelj sveukupne simpatičke aktivnosti u životinja (72, 73) i ljudi (69). Nadalje, RSNA je uslijed izlaganja različitim stresorima najčešće povišena u patofiziološkim stanjima poput poremećaja rada bubrega ili hipertenzije (74). Povećana RSNA može doprinijeti povećanju arterijskog tlaka putem tri mehanizma: 1) povećanim lučenjem renina posredovanim aktivacijom β_1 -adrenoreceptora na jukstaglomerularnim stanicama koje posljedično aktivira sustav RAS; 2) povećanjem reapsorpcije natrija i vode posredovano aktivacijom α_1 -adrenoreceptora u epitelu tubula te 3) smanjenjem protoka krvi kroz bubreg i stope glomerularne filtracije uslijed vazokonstrikcije posredovane α_1 - i α_2 -adrenoreceptorima u bubrežnim arterijama (69, 70, 74).

Na RSNA mogu utjecati i signali iz bubrega koji se osjetnim vlaknima prenose u supraspinalna područja koja su uključena u regulaciju kardiovaskularnih funkcija, primjerice NTS, RVLM i PVN (71, 75). Tijela osjetnih neurona bubrega nalaze se u ganglijima dorzalnog korijena T10-L1 segmenata kralježnične moždine (71). Aferentna osjetna vlakna aktivirana su podraživanjem bubrežnih mehanoreceptora uslijed istezanja bubrežne nakapnice te bubrežnih kemoreceptora uslijed ishemije ili nakupljanja uremičnih toksina (71, 74). Iako aferentna signalizacija uslijed aktivacije mehanoreceptora ili reno-renalnog refleksa može dovesti do inhibicije eferentne RSNA, smatra se da je aferentna signalizacija prvenstveno povezana s aktivacijom eferentne RSNA. Takvo povećanje eferentne RSNA najvjerojatnije je posljedica opće aktivacije simpatikusa uslijed podraživanja jezgara SŽS-a uključenih u regulaciju simpatičkog sustava (69). Nadalje, eferentna i aferentna aktivnost renalnog živca djeluju po načelu negativne povratne sprege, tako što aktivacija eferentne RSNA povećava aktivnost aferentne RSNA, a to dovodi do smanjenja eferentne RSNA (76). Taj mehanizam važan je za održavanje homeostaze te sprječava prekomjernu aktivaciju renalnog živca koja može imati brojne posljedice, primjerice prekomjerno zadržavanje natrija i povećanje arterijskog tlaka (76). S obzirom na važnu ulogu bubrega u homeostatskim mehanizmima, praćenje RSNA

značajno je u istraživanju uloge bubrega u regulaciji arterijskog tlaka kao i reakcije simpatičkog sustava na različite vrste stresnih podražaja, poput primjerice hipoksije ili hiperkapnije.



Slika 4. Inervacija bubrega i integracija eferentne i aferentne signalizacije u središnjem živčanom sustavu. Simpatički premotorički neuroni paraventrikularne jezgre hipotalamusa (PVN), rostralne ventrolateralne produljene moždine (RVLM) i A5 skupine noradrenergičkih neurona projiciraju u simpatičke preganglijske neurone intermediolateralnog stupića (IML). U simpatičkim ganglijima na razini T10-T13 prekapčaju se s postganglijskim simpatičkim neuronima, što čini eferentnu signalizaciju do bubrega (označena zelenom bojom). Renalni postganglijski neuroni ulaze u hilus bubrega i reguliraju reapsorpciju natrija i vode, protok krvi kroz bubrege i otpuštanje renina iz jukstaglomerularnih stanica (JGS). Aferentnu signalizaciju iz bubrega (označena plavom bojom) čine osjetna vlakna bubrežnih kemo- (C1R, C2R) i mehanoreceptora (MR) koja detektiraju promjene u bubregu, a putem vlakana koja se prekapčaju u ganglijima dorzalnog korijena (DRG) šalju informaciju o stanju bubrega u središta koja reguliraju simpatičku aktivnost i arterijski tlak, poput subfornikanog organa (SFO), jezgre solitarnog trakta (NTS), PVN-a i RVLM-a [preuzeto i izmijenjeno iz Nishi i sur. (71)].

1.6. Prekomjerna aktivacija simpatikusa i poremećaji disanja tijekom spavanja

Prekomjerna aktivacija simpatikusa ili simpatoekscitacija obilježje je patofizioloških stanja kardiovaskularnog sustava, ali i drugih stanja poput bolesti bubrega, šećerne bolesti tipa II, pretilosti, opstruktivske apneje tijekom spavanja (engl. *obstructive sleep apnea*, OSA) te brojnih drugih (4, 77). Jedna od posljedica prekomjerne aktivnosti simpatikusa jest povećanje arterijskog tlaka, a brojne studije ukazuju kako upravo povećanje aktivnosti simpatikusa ima značajnu ulogu u početku i razvoju hipertenzivnih stanja (77-79). Usprkos desettljećima istraživanja, još uvijek nije poznato koji su glavni okidači i mehanizmi koji dovode do povećanja simpatičkog tonusa (80).

Iako su mehanizmi disfunkcije simpatičkog sustava složeni, jedan od važnih mehanizama koji doprinosi simpatičkoj aktivaciji, ponajprije u poremećajima disanja, upravo je kemorefleks (32, 38, 42, 77, 81, 82). Poremećaji disanja, posebice OSA, obilježeni su učestalim epizodama hipoksije i hiperkapnije, koje su posljedica ponavljanih djelomičnih ili potpunih opstrukcija gornjih dišnih putova tijekom spavanja (33, 42). Isprekidano disanje tijekom spavanja popraćeno je promjenama parcijalnog tlaka kisika u arterijskoj krvi (PaO_2) i PaCO_2 koje dovode do ponavljane stimulacije, kako perifernih, tako i središnjih kemoreceptora te posljedično do aktivacije kemorefleksa i promjena simpatičke živčane aktivnosti (83). Takva učestala stimulacija kemorefleksa dovodi se u izravnu svezu s razvojem funkcionalnih promjena kardiovaskularnog sustava, primjerice arterijske hipertenzije (63, 84). S obzirom da su istraživanja u bolesnika s OSA-om ograničena prisutnošću brojnih komorbiditeta (npr. pretilost, metabolički poremećaji i sl.) te invazivnom prirodom mjerenja simpatičke aktivnosti, istraživanja na pokusnim životinjama mogu dati iscrpniji uvid u patofiziološke mehanizme u pozadini takvih promjena (42).

1.7. Animalni modeli opstruktivske apneje tijekom spavanja

Uz modele sa spontanom te one s kirurški ili mehanički izazvanom OSA-om, najčešće korišteni animalni model u istraživanju OSA-e jest model akutne ili kronične ponavljane hipoksije (85). Model su razvili Fletcher i suradnici 1992. godine s ciljem izazivanja ponavljanih epizoda desaturacija i reoksigenacija poput onih prisutnih u bolesnika s OSA-om, a u svrhu proučavanja patofizioloških mehanizama u pozadini OSA-e (86). U tom modelu, pokusne se životinje, smještanjem u komore ili izravnom mehaničkom ventilacijom, izlažu različitim mješavinama plinova prema prilagođenim protokolima, koji se razlikuju u frekvenciji, trajanju, intenzitetu i vrsti podražaja. Najčešće korišteni način izazivanja hipoksije

ili hiperkapnije u tom modelu jest izmjena udjela kisika/uglikova dioksida u udahnutoj smjesi (engl. *fraction of inspired oxygen/carbon dioxide*, $\text{FiO}_2/\text{FiCO}_2$). Dosadašnji modeli izlaganja pokusnih životinja ponavljanim hipoksijama i/ili hiperkapnijama uspješno su izazivali određene patološke posljedice OSA-e, poput hipertenzije ili simpatoeckscitacije (42, 86-92). S obzirom da se smatra da je hipoksija najvažniji čimbenik koji povezuje OSA-u s razvojem funkcionalnih promjena kardiovaskularnog sustava (85), većina je dosadašnjih istraživanja bila usmjerena prema opisivanju učinaka ponavljane hipoksije na respiracijsku i simpatičku aktivnost te kako dugoročne promjene u ta dva sustava mogu dovesti do razvoja arterijske hipertenzije (40, 67, 85, 88, 90, 93). Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima nalažu da ponavljana hipoksija može izazvati značajne promjene u središnjoj regulaciji ritma disanja te kardiovaskularnog sustava (66). Značajne promjene respiracijskog sustava očituju se povećanom respiracijskom motoričkom aktivnošću u vidu dugoročne facilitacije freničkoga živca (engl. *phrenic long-term facilitation*, pLTF) te prisutnosti aktivnog izdisanja zbog povećane aktivnosti abdominalnog živca (46, 66, 67, 94-101). Nadalje, nekoliko istraživačkih skupina opisalo je i pojavu plastičnosti simpatičkog sustava u obliku simpatičke dugoročne facilitacije (engl. *sympathetic long-term facilitation*, sLTF) u životinja i ljudi nakon izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji (engl. *acute intermittent hypoxia*, AIH) (88, 90, 102, 103). Konačno, ponavljana hipoksija može dovesti do simpatoeckscitacije povećanjem osjetljivosti perifernog kemorefleksa ili izravnim utjecajem na strukture SŽS-a poput PVN-a, SFO-a i NTS-a koje kontroliraju aktivnost simpatikusa (4, 93). Iako je istraživanje hipoksijskog podražaja dalo vrijedan uvid te doprinijelo razumijevanju izravnih učinaka i posljedica izlaganja hipoksiji, utjecaj drugih podražaja prisutnih u OSA-i, poput primjerice hiperkapnije, isprekidanog spavanja, promjena intratorakalnog tlaka te hemodinamskih čimbenika nisu razmatrani (104).

1.8. Hiperkapnija i utjecaj na respiracijski i simpatički sustav

Hiperkapnija se definira kao povećanje PaCO_2 iznad fizioloških granica i poznato je da može imati značajni utjecaj na simpatički i respiracijski sustav u sisavaca (105, 106). Prethodna istraživanja ukazala su na sinergistički učinak hipoksije i hiperkapnije na povećanje simpatičke i respiracijske aktivnosti, s obzirom da oba podražaja zasebno izazivaju ekscitaciju simpatičkoga i respiracijskog sustava (107-109). Hiperkapnija može djelovati na periferne i središnje kemoreceptore (57, 106) posljedično dovodeći do hiperventilacije te povećanja simpatičke aktivnosti i arterijskog tlaka (105, 110). Respiracijski odgovor na hiperkapniju iscrpno je opisan u prethodnim istraživanjima i nedvojbeno je da povećanje PaCO_2 dovodi do

značajne aktivacije područja koja reguliraju respiracijsku aktivnost te da taj odgovor uvelike ovisi o aktivnosti neurona kaudalnih rafe jezgara (44, 111, 112). Štoviše, u protokolima akutne ponavljane hiperkapnije (engl. *acute intermittent hypercapnia*, AIHc), dokazano je da hiperkapnija može dovesti do dugoročne depresije disanja, koja je posredovana serotoninским i adrenergičkim receptorima (97, 98, 100, 113, 114).

Iz dosadašnjih modela vidljivo je da izlaganje izoliranom hiperkapnijskom podražaju dovodi do značajnog povećanja aktivnosti torakalnoga, splanhničnoga, lumbalnoga i renalnoga simpatičkog živca (48, 67, 105, 106, 115, 116). Nasuprot tome, studije koje su proučavale hemodinamski odgovor na hiperkapniju polučile su različite rezultate (103, 105, 108, 109, 117-120). S obzirom da je ukupni hemodinamski odgovor posljedica izravnog djelovanja hiperkapnije na krvne žile i srce te neizravnog djelovanja posredovanog simpatikusom, promjene srčane frekvencije (engl. *heart rate*, HR) i arterijskog tlaka uslijed izlaganja hiperkapniji rezultat su složenih međuodnosa tih mehanizama (117, 121). Nadalje, heterogenost rezultata dosadašnjih studija vjerojatna je posljedica primjene hiperkapnijskih podražaja različitih intenziteta i trajanja, dubine i vrste anestezije te korištenja različitih animalnih modela (117, 122). Usprkos navedenome, uslijed izlaganja izoliranoj hiperkapnijskoj epizodi najčešće je zabilježeno povećanje MAP-a, koncentracije noradrenalina u plazmi te simpatičke aktivnosti (105, 115-117, 120, 122, 123).

Poznato je da je ponavljana hiperkapnija snažan podražaj za nastanak kratkoročnih i dugoročnih respiracijskih promjena (97, 98, 100, 113, 114, 124) te da izlaganje izoliranim hiperkapnijskim epizodama kraćeg trajanja ili pak jednoj hiperkapnijskoj epizodi duljeg trajanja značajno aktivira simpatikus (48, 105, 106, 115, 116). Ipak, učinak akutne ponavljane hiperkapnije na kratkoročne i dugoročne promjene simpatičke živčane aktivnosti još uvijek nije dovoljno istražen. Simpatoekscitacija izazvana hiperkapnijom ovisi o povećanom otpuštanju noradrenalina, no još uvijek nije poznato može li biti očuvana tijekom duljeg vremenskog razdoblja i pridonijeti razvoju arterijske hipertenzije (48, 98).

1.9. Uloga rafe jezgara i noradrenalinske signalizacije u odgovoru na hiperkapniju

Prijašnja istraživanja pokazala su da hiperkapnija značajno aktivira noradrenalinsku signalizaciju. Izlaganje akutnoj hiperkapniji u trajanju od svega nekoliko minuta može dovesti do povećanja koncentracije katekolamina u krvi, dok hiperkapnijski podražaji trajanja od 30 min do 24 h mogu mijenjati metabolizam katekolamina na razini SŽS-a (108, 125-127). Nasuprot tome, u modelu kronične hiperkapnije (od 24 h do 30 dana) pokazano je kako ona ima neznatan učinak na promjene koncentracije serotonina i katekolamina u tkivima SŽS-a, ali

može dovesti do smanjenja broja serotoninskih neurona moždanog debla, što su autori objasnili kao kompenzacijski mehanizam prilagodbe na kroničnu hiperkapniju (125).

Serotoninski neuroni iznimno su važni u respiracijskom odgovoru na hiperkapniju, s obzirom da njihova farmakološka inhibicija te lezije ili genetski gubitak dovode do značajno smanjenoga respiracijskog odgovora (128-131). Nadalje, ranijom studijom iz Laboratorija za temeljnu neuroznanost Medicinskog fakulteta u Splitu pokazano je da neuroni kaudalnih rafe jezgara imaju važnu ulogu u mehanizmu nastanka dugoročne depresije disanja koji je moduliran serotoninskom i adrenergičkom signalizacijom (98). Poznato je i da projekcije skupina noradrenergičkih neurona (A5 i LC) pridonose respiracijskom i simpatičkom odgovoru na hiperkapniju ili smanjenje pH u određenim područjima produljene moždine (10, 52). Osim brojnih projekcija prema RVLM-u, području važnom za regulaciju arterijskog tlaka i simpatičke aktivnosti, opisane su i brojne projekcije LC-a u kaudalne rafe jezgre (12). Te projekcije mogu putem alfa1-adrenoreceptora aktivirati ili putem alfa2-adrenoreceptora inhibirati kaudalne rafe jezgre (12, 132-134). S obzirom na prethodno opisanu ulogu kaudalnih rafe jezgara u regulaciji simpatičke aktivnosti te činjenicu da noradrenalin može djelovati inhibicijski na serotoninske neurone kaudalnih rafe jezgara (48, 98, 114), važno je istražiti ulogu noradrenalinских receptora kaudalnih rafe jezgara u regulaciji simpatičke živčane aktivnosti tijekom i nakon izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Dosadašnja istraživanja bila su većinom usmjerena prema ispitivanju uloge akutne ponavljane hipoksije, kao glavnog obilježja isprekidanog disanja, u kratkoročnim i dugoročnim promjenama respiracijskoga i simpatičkog sustava. Nadalje, poznato je da je akutna ponavljana hiperkapnija snažan podražaj za razvoj dugoročne depresije disanja. Međutim, učinak akutne ponavljane hiperkapnije na kratkoročne promjene aktivnosti simpatikusa do sada nije dovoljno istražen, a mjesto djelovanja i mehanizmi nastanka promjena nisu razjašnjeni.

Slijedom navedenog, glavni ciljevi ove doktorske disertacije bili su:

- 1) ustanoviti učinak akutne ponavljane hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca;
- 2) ispitati ulogu alfa2-adrenoreceptora u opaženim promjenama uslijed sistemske i središnje modulacije navedenih receptora u štakora.

Sporedni ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

- Istražiti utjecaj različitih intenziteta hiperkapnijskog podražaja (značajne, 15% CO₂ i umjerene hiperkapnije, 5% CO₂ u udahnuтой smjesi) na odgovor renalnoga simpatičkog živca u modelu akutne ponavljane hiperkapnije.
- Ispitati ulogu udjela kisika u udahnuтой smjesi na odgovor renalnoga simpatičkog živca u modelu akutne ponavljane hiperkapnije.
- Istražiti učinak akutne ponavljane hiperkapnije u kombinaciji s različitim udjelima kisika u udahnuтой smjesi tijekom hiperkapnijskih podražaja i izvan njih na promjene arterijskog tlaka i srčane frekvencije.

Hipoteze istraživanja bile su:

- 1) Intenzitet simpatoekscitacije mjeren aktivnošću renalnoga simpatičkog živca bit će moduliran međuodnosima udjela kisika i ugljikova dioksida u udahnuтой smjesi u modelu akutne ponavljane hiperkapnije, na način da će povećanje udjela ugljikova dioksida i smanjenje udjela kisika dovesti do povećanja odgovora renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljanu hiperkapniju.
- 2) Sistemska i središnje blokiranje alfa2-adrenoreceptora johimbinom u području kaudalnih rafe jezgara povećat će intenzitet simpatoekscitacije mjeren aktivnošću renalnoga simpatičkog živca u modelu akutne ponavljane hiperkapnije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etička načela

Svi pokusi u sklopu provedenih istraživanja odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede. Eutanazija životinja po završetku pokusa provedena je primjenom prekomjerne doze anestetika te zasićene otopine kalijeva klorida, a u pokusima sa središnjim mikroubrizgavanjem transkardijalnom perfuzijom Zambonijevim fiksativom u dubokoj anesteziji, sve u skladu s naputcima Američkog udruženja za veterinarsku medicinu (engl. *American Veterinary Medical Association*).

3.2. Pokusne životinje

Istraživanja su provedena na mladim odraslim mužjacima štakora soja Sprague-Dawley, tjelesne mase 280-360 g, starosti 2-3 mjeseca. Životinje su uzgojene i smještene u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu, a porijeklo soja bila je kolonija Envigo (Udine, Italija). Životinje međusobno nisu bile srodne. U nastambi su u svakom kavezu bile smještene po dvije životinje na režimu 12h:12h svjetlo/tama te s hranom (4RF21GLP, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodom dostupnom *ad libitum*. Životinje koje su se koristile u istraživanjima bile su nasumično odabrane iz različitih legala poštujući pravilo starosti/tjelesne mase te nasumično raspodijeljene u kontrolne i pokusne skupine.

3.3. Anestezija i kirurška priprema životinja

Na početku pokusa, životinje su bile anestezirane intraperitonealnom injekcijom uretana (20% otopina uretana u 0,9% fiziološkoj otopini; 1,2 g/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Učinkovitost anestezije provjeravana je izazivanjem kornealnog refleksa te refleksa povlačenja stražnjih šapica što predstavlja bolni podražaj u štakora. U slučaju pozitivnog refleksa, životinjama je dana dodatna doza uretana (0,2 g/kg i.p. ili i.v.), sve do gubitka refleksa tj. postizanja željenog stupnja anestezije. Nakon anestezije, životinje su postavljene u položaj na leđima na grijaću podlogu (FST, Heidelberg, Njemačka) kako bi im se održavala stalna tjelesna temperatura. Svakoj životinji postavljeni su kateteri u obje femoralne arterije u svrhu kontinuiranog praćenja arterijskoga tlaka i uzimanja uzoraka arterijske krvi te u obje femoralne vene u svrhu nadoknade cirkulirajućeg volumena fiziološkom otopinom i intravenske primjene lijekova (Slika 5). Nakon postavljanja katetera, životinjama je venskim putem za vrijeme cijelog trajanja pokusa nadoknađivana tekućina (0,6 ml/kg/h fiziološke otopine). Životinjama

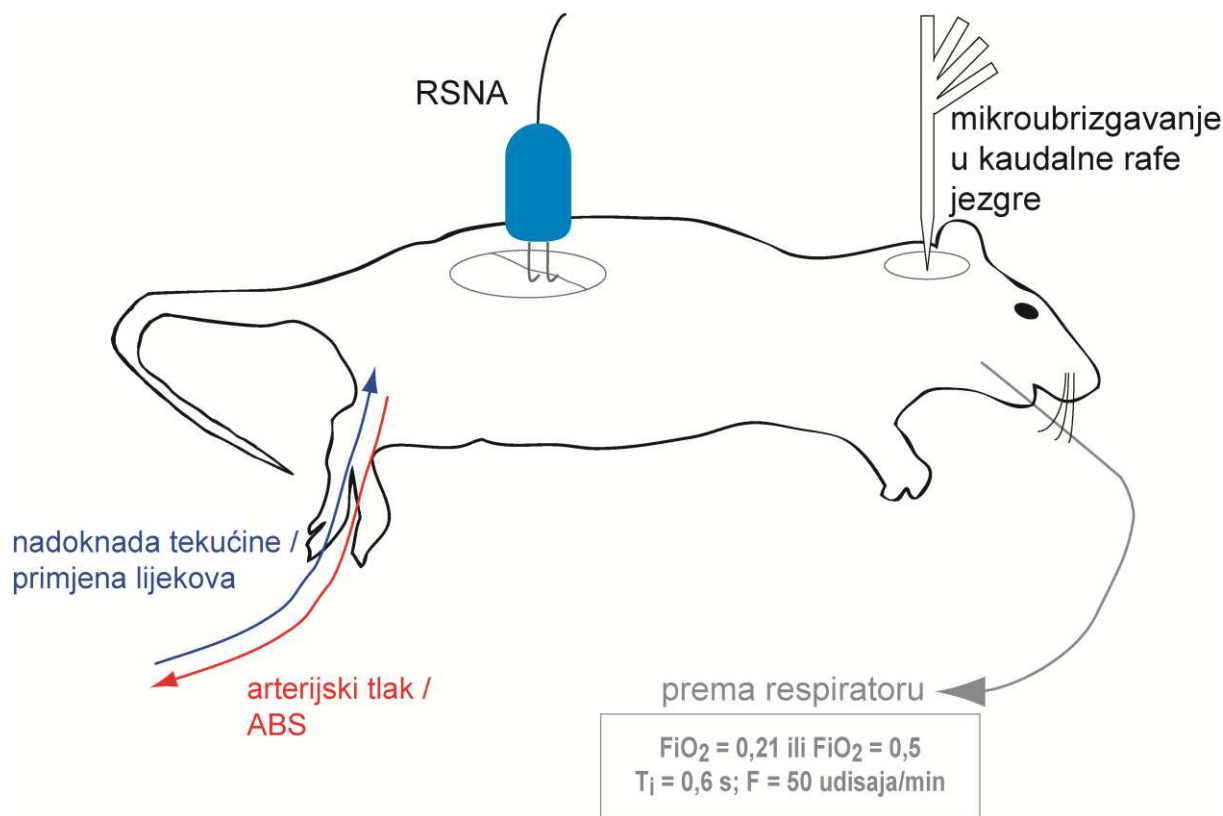
se iz arterijske krvi redovito tijekom pokusa određivao acidobazni status (RapidPoint500, Siemens Healthcare, Erlangen, Njemačka), a vrijednosti PaO₂, PaCO₂ i pH održavane su unutar fizioloških granica mijenjanjem parametara mehaničke ventilacije. Sve životinje bile su traheotomirane, vagotomirane te mehanički ventilirane respiratorom za male životinje (SAR830-P, CWE, Ardmore, SAD) smjesom kisika (50%) i dušika (50%) ili sobnim zrakom. Početne postavke respiratora bile su volumen od 250 do 350 ml/min, frekvencija 50 udisaja/min i trajanje udisaja 0,6 s uz pozitivni tlak na kraju izdisaja od 2 do 3 cm H₂O.

3.3.1. Kirurgija renalnoga simpatičkog živca

Životinje su nakon kirurške pripreme bile postavljene u stereotaksijski okvir (Lab Standard, Stoelting, Wood Dale, SAD) u pronacijski položaj. Lijevi renalni simpatički živac izoliran je retroperitonealnim pristupom u visini lijevog bubrega (Slika 5), na način ranije opisan u literaturi (135, 136). Ukratko, kirurškim skalpelom načinjena je dorzalna subkostalna incizija kože i potkožnog tkiva duljine 2-3 cm, lateralno duž kralježnice, nekoliko mm kaudalno od prsnog koša (zadnjeg rebra). Leđno mišićje i masno tkivo razmaknuto je s pomoću retraktora te je prikazan lijevi bubreg i bubrežne krvne žile. Pod kirurškim mikroskopom uzduž bubrežne arterije identificiran je splet renalnoga živca te je jedna grana renalnoga živca distalno od ganglija pažljivo odvojena od okolnog tkiva. Nakon izolacije živac je postavljen na fleksibilnu bipolarnu srebrnu elektrodu te prekriven silikonskom gelom (Elastosil RT 601 A+B, Wacker Silicones, Riemerling, Njemačka) kako bi se osigurala električna izolacija, spriječilo isušivanje živca i pomicanje elektrode.

3.3.2. Okcipitalna kraniotomija

U pokusima u kojima se provodilo središnje mikroubrizgavanje u područje kaudalnih rafe jezgara, životinjama se dodatno načinila djelomična okcipitalna kraniotomija prema ranije opisanoj metodi (94, 98, 101). Na dorzalnoj strani glave, kirurškim škalicama načinjene su incizije kože rostrokaudalno u središnjoj crti te lateralno prema uškama. Potom je retraktorom nježno razmaknuto mišićje stražnje strane vrata, a kirurškim skalpelom uklonjen periost kako bi se prikazala koštana struktura lubanje. U stražnjem dijelu lubanje, mikrobušilicom su postepeno uklonjeni slojevi kosti lubanje, a preostali tanki dio kosti pažljivo je odvojen mikropincetom. Nakon uklanjanja kostiju lubanje, razrezana je vanjska moždana ovojnica (*dura mater*) te je otvoren pristup dijelu produljene moždine u kojem je prikazan *obex* (vršak četvrte moždane komore), koji je služio kao orijentacijska točka za mikroubrizgavanje u područje kaudalnih rafe jezgara (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz kirurške pripreme pokusnih životinja u provedenim istraživanjima. RSNA: aktivnost renalnoga simpatičkog živca, ABS: acidobazni status, FiO_2 : udio kisika u udahnutoj smjesi, T_i : trajanje udisaja u sekundama, F: frekvencija disanja.

3.4. Snimanje i obrada zapisa renalnoga simpatičkog živca i arterijskog tlaka

Elektroda postavljena na renalni simpatički živac spojena je na zasebni sustav pojačala (SuperZ & System1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD) te preko PowerLab 8S sustava (ADInstruments, Castle Hill, Australija) na računalo putem kojeg je aktivnost živca praćena u stvarnom vremenu, a zapisi pohranjeni za daljnju analizu. Neobrađeni (engl. *raw RSNA signal*, rRSNA) signali renalnoga simpatičkog živca bili su pojačani, filtrirani (pojasni filter 300 Hz–10 kHz) i pročišćeni. Integrirani signali renalnoga simpatičkog živca (engl. *integrated RSNA signal*, iRSNA) računalno su izrađeni putem PowerLab sustava te s pomoću MA-1000 Moving Averager modula - System 1000 Modular Instrumentation (CWE Inc., Ardmore, SAD) s vremenskom konstantom od 50 ms. Tijekom pokusa životinjama je kontinuirano praćen arterijski tlak te neobrađeni i integrirani signali RSNA. Praćene varijable snimane su s pomoću računalnog programa Chart for Windows verzije 5.4.2 (ADInstruments, Castle Hill, Australija), a svaka varijabla snimana je u visokoj rezoluciji (20000 uzoraka u sekundi).

Nakon stabilizacije signala (~30 min) svakoj životinji uzet je početni uzorak arterijske krvi u svrhu određivanja acidobaznog statusa. Vrijednosti RSNA i arterijskog tlaka u toj vremenskoj točki smatrane su početnim uvjetima (T0) prema kojima su kvantificirane nastale promjene za vrijeme i nakon pokusnog protokola. Aktivnost renalnoga simpatičkog živca izražena je u proizvoljnim (arbitrarnim) jedinicama i iskazana kao postotna promjena u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima. Iz zapisa arterijskog tlaka izveden je MAP, izražen u milimetrima žive (mmHg) te HR, izražen u otkucajima u minuti. Za analizu živčane aktivnosti korišten je integrirani signal renalnoga simpatičkog živca u programu Chart for Windows. Aktivnost renalnoga simpatičkog živca kvantificirana je analizom površine ispod krivulje primjenom funkcije izračuna integrala od najniže točke krivulje (engl. *Integral from minimum*), a dobivene vrijednosti pohranjene su u bazi podataka u programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD) do statističke obrade.

3.5. Pokusni postupci prve studije

U prvoj studiji, kojoj je cilj bio ispitati učinak akutne ponavljane hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca, načinjene su dvije serije pokusa. U prvoj seriji pokusa životinje su bile izložene značajnoj hiperkapniji (engl. *severe hypercapnia*, SHc, $\text{FiCO}_2 = 0,15$), a u drugoj seriji umjerenoj hiperkapniji (engl. *moderate hypercapnia*, MHc, $\text{FiCO}_2 = 0,05$) u kombinaciji s različitim udjelima kisika u udahnuutoj smjesi – sobni zrak ($\text{FiO}_2 = 0,21$) i hiperoksija ($\text{FiO}_2 = 0,5$), čijom je kombinacijom oblikovano ukupno 8 pokusnih skupina (Slika 6).

3.5.1. Pokusni protokol akutne ponavljane hiperkapnije

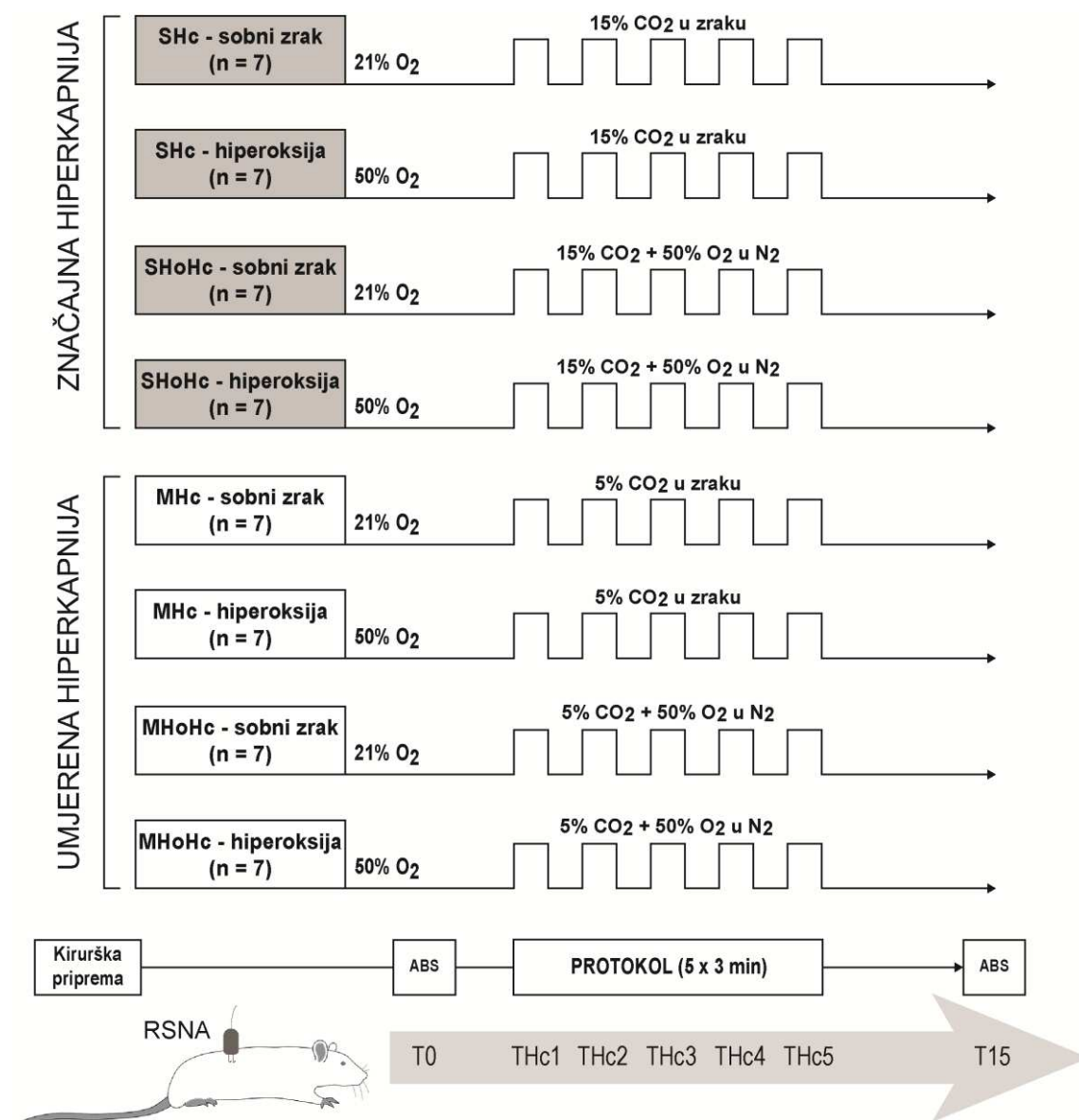
Svaka pokusna skupina u prvoj studiji bila je izložena različitom protokolu AIHc (Slika 6), kako slijedi:

1. skupina značajna hiperkapnija-sobni zrak (SHc-sobni zrak, $n = 7$) bila je izložena značajnoj hiperkapniji ($\text{FiCO}_2 = 0,15$) u kombinaciji sa sobnim zrakom ($\text{FiO}_2 = 0,21$);
2. skupina značajna hiperkapnija-hiperoksija (SHc-hiperoksija, $n = 7$) bila je izložena značajnoj hiperkapniji ($\text{FiCO}_2 = 0,15$) u kombinaciji s hiperoksijom ($\text{FiO}_2 = 0,5$);
3. skupina značajna hiperoksijska hiperkapnija-sobni zrak (SHoHc-sobni zrak, $n = 7$) bila je izložena značajnoj hiperoksijskoj hiperkapniji ($\text{FiCO}_2 = 0,15 + \text{FiO}_2 = 0,5$) u kombinaciji sa sobnim zrakom ($\text{FiO}_2 = 0,21$);

4. skupina značajna hiperoksijska hiperkapnija-hiperoksija (SHoHc-hiperoksija, $n = 7$) bila je izložena značajnoj hiperoksijskoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,15 + FiO_2 = 0,5$) u kombinaciji s hiperoksijom ($FiO_2 = 0,5$);
5. skupina umjerena hiperkapnija-sobni zrak (MHc-sobni zrak, $n = 7$) bila je izložena umjerenoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,05$) u kombinaciji sa sobnim zrakom ($FiO_2 = 0,21$);
6. skupina umjerena hiperkapnija-hiperoksija (MHc-hiperoksija, $n = 7$) bila je izložena umjerenoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,05$) u kombinaciji s hiperoksijom ($FiO_2 = 0,5$);
7. skupina umjerena hiperoksijska hiperkapnija-sobni zrak (MHoHc-sobni zrak, $n = 7$) bila je izložena umjerenoj hiperoksijskoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,05 + FiO_2 = 0,5$) u kombinaciji sa sobnim zrakom ($FiO_2 = 0,21$);
8. skupina umjerena hiperoksijska hiperkapnija-hiperoksija (MHoHc-hiperoksija, $n = 7$) bila je izložena umjerenoj hiperoksijskoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,05 + FiO_2 = 0,5$) u kombinaciji sa sobnim zrakom ($FiO_2 = 0,5$).

Protokol AIHc sastojao se od izlaganja životinje epizodama akutne ponavljane hiperkapnije (5 x 3 min) razdvojenim trominutnim razdobljima oporavka za vrijeme kojih je životinja bila ventilirana 50%-om smjesom O_2 u N_2 ili sobnim zrakom. Praćene varijable bile su konstantno snimane tijekom 5 hiperkapnijskih epizoda (THc1-THc5) te 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode (T15). Uzorci arterijske krvi za određivanje acidobaznog statusa (pH, $PaCO_2$ i PaO_2) uzimani su isključivo prije i nakon završetka pokusnog protokola kako bi se smanjio sveukupni gubitak krvi životinja te osigurala stabilnost pokusne životinje.

U svrhu utvrđivanja učinaka udisanja hiperoksijske mješavine ($n = 3$) te sobnog zraka ($n = 4$) na praćene varijable, načinjeni su pokusi bez izlaganja životinje protokolu AIHc. U trajanju do 45 minuta, ni u jednom pokusu nisu utvrđene promjene RSNA, MAP-a i HR ovisne o vremenu, što ukazuje na stabilnost pokusne životinje tijekom pokusnog protokola.



Slika 6. Pokusni protokol prve studije s prikazom pokusnih skupina i 7 vremenskih točaka pokusa. SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode, ABS: acidobazni status, RSNA: aktivnost renalnoga simpatičkog živca.

3.6. Pokusni postupci druge studije

U drugoj studiji, kojoj je cilj bio ispitati ulogu alfa2-adrenoreceptora u promjenama RSNA, arterijskog tlaka i srčane frekvencije uslijed sistemske i središnje modulacije navedenih receptora u modelu akutne ponavljane hiperkapnije u štakora, načinjene su dvije serije pokusa. U prvoj seriji pokusa načinjeno je sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora intravenskom

primjenom antagonista alfa2-adrenoreceptora – johimbina, dok je u drugoj seriji načinjeno središnje blokiranje istih izravnim mikroubrizgavanjem johimbina u područje kaudalnih rafe jezgara. Pokusne skupine životinja bile su izložene jednoj dozi johimbina prije izlaganja pokusnom protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, dok su životinje iz kontrolnih skupina primile jednaki volumen fiziološke otopine (Slika 7).

3.6.1. Intravenska primjena antagonista alfa2-adrenoreceptora – johimbina

Nakon stabilizacije zapisa arterijskog tlaka i RSNA (~30 min), jednoj je skupini životinja (JOHIMBIN_{i.v.}, n = 9) antagonist alfa2-adrenoreceptora – johimbin ubrizgan intravenski (1 mg/kg u fiziološkoj otopini; 0,6 ml; bolus; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) prije izlaganja protokolu AIHc. Kako bi se poštovalo načelo smanjenja iz etičkoga načela 3R (engl. *replacement, reduction, refinement*, 3R), za kontrolnu skupinu korištena je jedna skupina životinja iz prve studije. Riječ je o skupini izloženoj značajnoj hiperoksijskoj hiperkapniji u kombinaciji s hiperoksijom (KONTROLA_{i.v.}, n = 7). U toj skupini, životinjama je u bolusu intravenski ubrizgan isti volumen (0,6 ml) fiziološke otopine prije izlaganja protokolu AIHc, a pokusni uvjeti bili su u potpunosti istovjetni uvjetima druge studije. Intravenska primjena johimbina izazvala je prolazne promjene RSNA i statistički značajno smanjenje srednjeg arterijskog tlaka, dok primjena fiziološke otopine intravenski nije imala značajan učinak na praćene varijable. Nakon stabilizacije arterijskog tlaka i RSNA, određene su vrijednosti praćenih varijabli u početnim uvjetima (T0) i životinje su bile izložene protokolu AIHc.

U svrhu utvrđivanja učinaka primjene johimbina (n = 2) na praćene varijable, načinjeni su pokusi u kojima je johimbin primijenjen intravenski, a životinja nije bila izložena protokolu AIHc. U trajanju do 45 minuta, ni u jednom pokusu nisu utvrđene promjene RSNA i arterijskog tlaka ovisne o vremenu, što ukazuje na stabilnost pokusne životinje tijekom pokusnog protokola.

3.6.2. Mikroubrizgavanje u područje kaudalnih rafe jezgara

Nakon kraniotomije koja je opisana u odjeljku 3.3.2., načinjena je priprema za mikroubrizgavanje. Mikropipeta s četiri cjevčice, vanjskog promjera vrška 30-50 µm, napunjena je: 1) fiziološkom otopinom (0,9% NaCl), 2) otopinom selektivnoga glutamatnog agonista, D,L-homocisteične kiseline (DLH; 10 mM u fiziološkoj otopini, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 3) otopinom selektivnoga antagonista alfa2-adrenoreceptora johimbina (2 mM u fiziološkoj otopini) te 4) otopinom boje (India ink) razrijeđenom u fiziološkoj otopini. Vršak mikropipete je uz pomoć nastavaka na stereotaksijskom okviru spušten u područje kaudalnih

rafe jezgara prema početnim koordinatama. Početne koordinate određene su prema prethodnim studijama našega laboratorija (94, 98, 101) i u skladu s atlasom štakorskoga mozga prema Paxinosu i Watsonu (137), a bile su: 0,2 mm anteriorno; 0,0 mm mediolateralno i 2,5 mm ventralno od *obex*-a. Nakon postavljanja mikropipete, mikroubrizgavanje je provedeno uz pomoć injekcijske šprice koja je tankim polietilenskim cjevčicama bila spojena na staklene cjevčice mikropipete, a primjenom pozitivnog tlaka ispušteno je 20 ± 5 nl otopine kroz vršak mikropipete u ciljano područje. Volumen mikroubrizgane tekućine kontroliran je promatranjem meniska tekućine u cjevčicama s pomoću mikroskopa koji je imao okular s mjerilom.

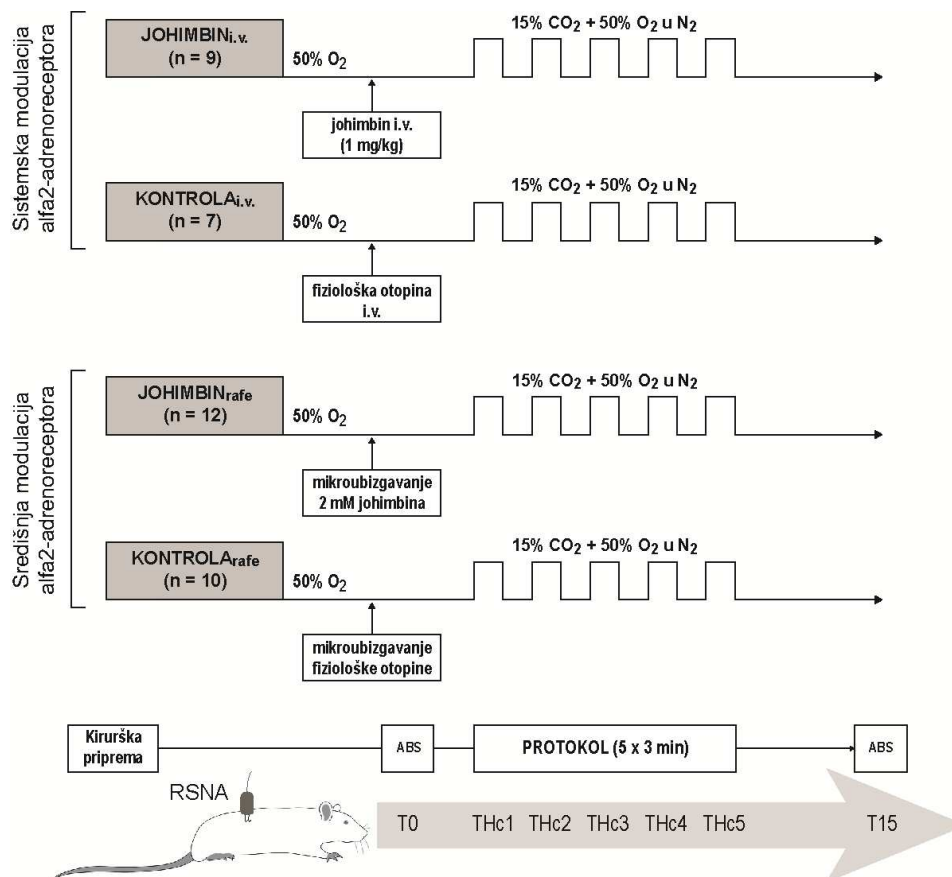
Kako bi se farmakološki identificiralo područje kaudalnih rafe jezgara, DLH (20 ± 5 nl) je mikroubrizgan u ciljano područje te su praćeni zapisi RSNA i arterijskog tlaka. Ukoliko nije bilo vidljivog odgovora, koordinate su izmijenjene i DLH je ponovno mikroubrizgan dok nije izazvano povećanje RSNA te arterijskog tlaka za više od 20 mmHg (9). Nakon što su prolazni učinci agonista glutamatnih receptora prestali, mikropipeta je isprana fiziološkom otopinom, kako u pipeti ne bi zaostao DLH.

Potom je, u isto područje, jednoj skupini životinja (JOHIMBIN_{rafe}, $n = 12$) mikroubrizgan johimbin (2 mM u fiziološkoj otopini, 20 ± 5 nl), dok je u kontrolnoj skupini (KONTROLA_{rafe}, $n = 10$), životinjama u područje kaudalnih rafe jezgara mikroubrizgan isti volumen (20 ± 5 nl) fiziološke otopine. Iako mikroubrizgavanje johimbina ili fiziološke otopine nije izazvalo značajne promjene RSNA i srednjega arterijskog tlaka, nakon mikroubrizgavanja životinjama je bilo osigurano kratko stabilizacijsko razdoblje (~3 min) prije izlaganja pokusnom protokolu.

3.6.3. Pokusni protokol akutne ponavljane hiperkapnije

Prije izlaganja pokusnom protokolu, životinjama je u hepariniziranu špricu (RapidLyte, Siemens Healthcare, Erlangen, Njemačka) uzet uzorak arterijske krvi (0,2 ml) iz katetera prethodno postavljenog u femoralnu arteriju te određen acidobazni status i početne vrijednosti RSNA, MAP-a i HR-a (T0). U drugoj studiji, sve istraživane skupine izlagane su istom protokolu akutne ponavljane hiperkapnije (Slika 7), koji se sastojao od pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-5) razdvojenih trominutnim razdobljima oporavka za vrijeme kojih je životinja bila ventilirana hiperoksijskom mješavinom (50% O₂ u N₂). Za vrijeme hiperkapnijskih epizoda životinja je bila ventilirana mješavinom 15% CO₂ + 50% O₂ u N₂. Kontrolni uzorak arterijske krvi uzet je 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode (T15). Uzorci krvi nisu uzimani za vrijeme hiperkapnijskih epizoda kako bi se smanjio sveukupni gubitak

cirkulirajućeg volumena krvi te izbjegao mogući utjecaj gubitka tekućine na arterijski tlak i simpatičku aktivnost.



Slika 7. Pokusni protokol druge studije s prikazom pokusnih skupina i 7 vremenskih točaka pokusa. JOHIMBIN_{i.v.}: skupina u kojoj je johimbini bio primijenjen intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{i.v.}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila primijenjena intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, JOHIMBIN_{rafe}: skupina u kojoj je johimbini bio mikroubrizgan u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{rafe}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila mikroubrizgana u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode, ABS: acidobazni status, RSNA: aktivnost renalnoga simpatičkog živca.

3.6.4. Histološka potvrda mjesta ubrizgavanja

Po završetku pokusa u kojima se provodila središnja modulacija alfa2-adrenoreceptora i pripadajućih kontrolnih pokusa, životinje su bile perfundirane transkardijalno Zambonijevim fiksativom (2% formalin i 15% zasićena pikrična kiselina u 0,1 M fosfatnom puferu, PBS-u). Nakon perfuzije, dio moždanog debla u kojega je provedeno mikroubrizgavanje bio je uklonjen

i pohranjen 24 sata u Zambonijevom fiksativu te je potom ispran i pohranjen u PBS-u. Poprečni rezovi debljine 50 μm izrezani su vibratomom (Vibratome series 1000, Technical Products Inc, St. Louis, SAD) u svrhu histološke potvrde mjesta mikroubrizgavanja, prema referentnim presjecima iz atlasa štakorskog mozga (137).

3.7. Statistički postupci

Unutar pojedine istraživane skupine, MAP, HR i RSNA kvantificirani su usrednjavanjem vrijednosti pojedine varijable u intervalu od 20 sekundi u 7 vremenskih točaka pokusa: u početnim uvjetima (T0), za vrijeme pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-THc5) te 15 minuta (T15) nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Za statističku analizu i izračun veličine uzorka korišten je računalni program MedCalc inačica 11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) i podatci iz pilot istraživanja ($n = 3$ po skupini). Uz α pogrešku od 0,05 i statističku snagu od 90%, izračunom je utvrđeno da je potrebno najmanje 7 životinja u svakoj istraživanoj skupini. Normalnost raspodjele podataka za svaku istraživanu varijablu provjerena je Shapiro-Wilkovim testom normalnosti raspodjele podataka. Za usporedbu rezultata unutar skupine korištena je dvosmjerna analiza varijance za ponavljana mjerenja (engl. *two-way repeated measures ANOVA*) i post-hoc Bonferroni korekcija. Za usporedbe između skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*) praćena Student-Newman-Keuls-ovom post-hoc analizom parova. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti i standardne pogreške (engl. *standard error of the mean*, SEM). P vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

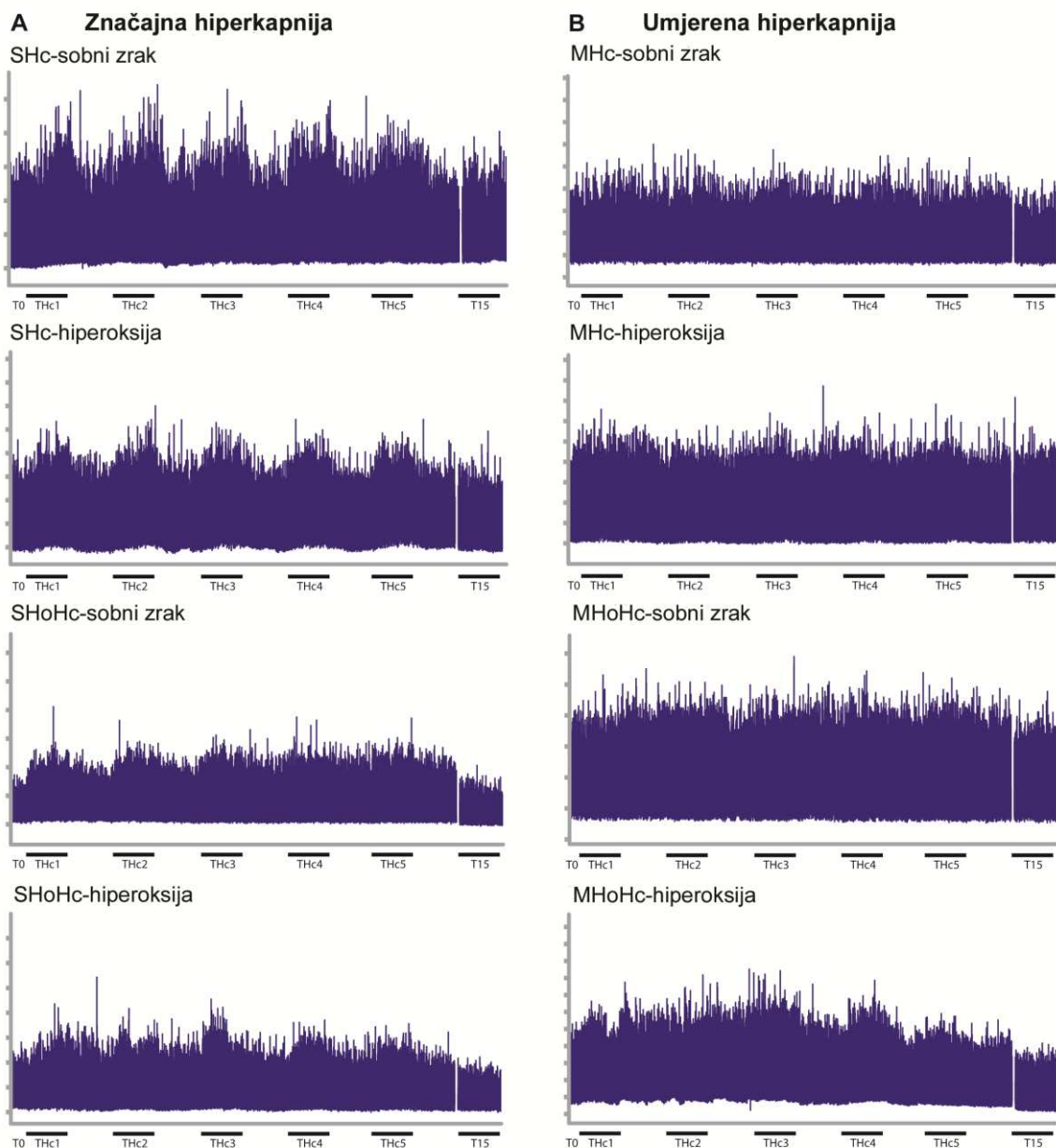
4.1. Rezultati prve studije

4.1.1. Odgovor renalnoga simpatičkog živca na značajnu ponavljaju hiperkapniju

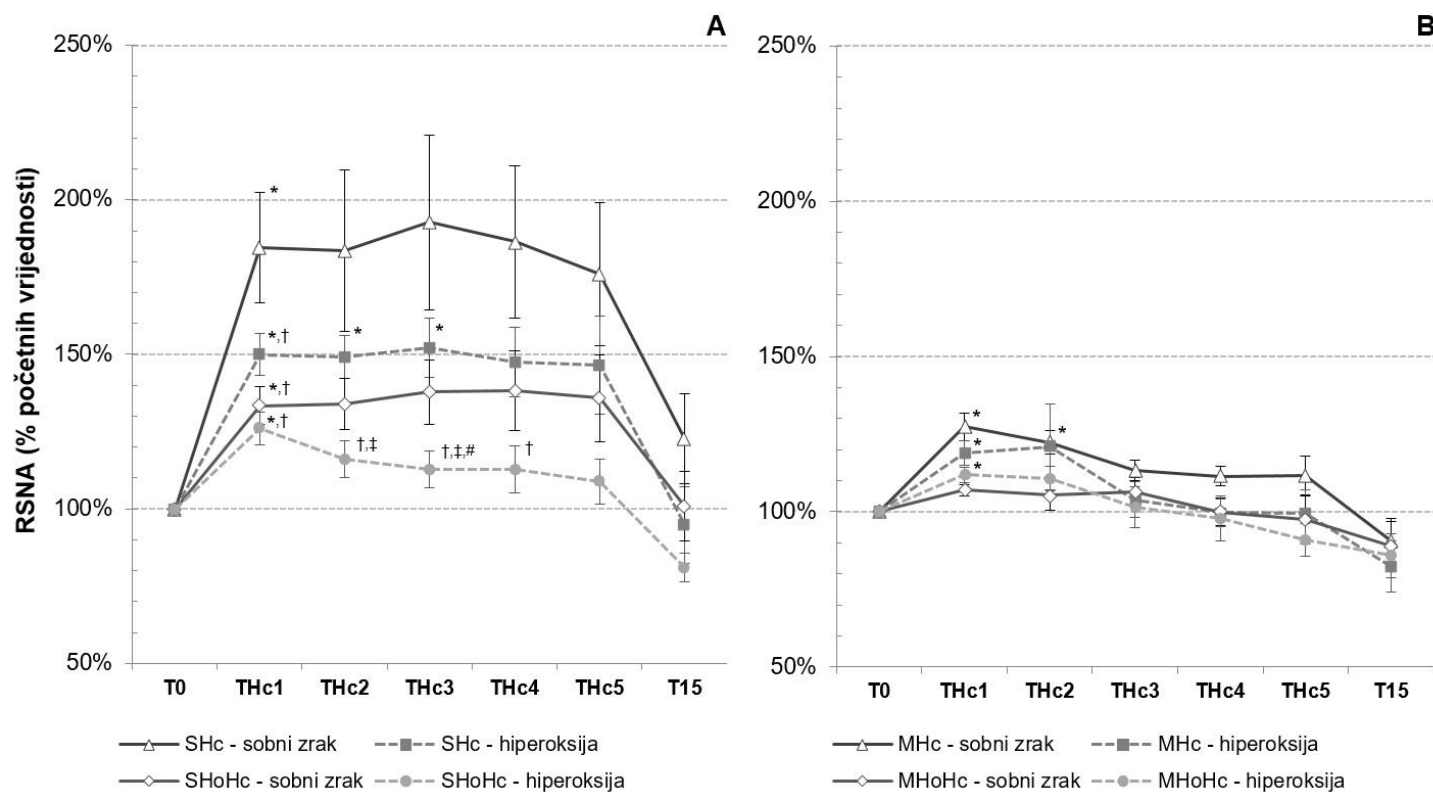
U skupinama životinja koje su bile izložene značajnoj ponavljanoj hiperkapniji ($\text{FiCO}_2 = 0,15$), RSNA je bila povećana i očuvana tijekom svih pet hiperkapnijskih epizoda u usporedbi s vrijednostima zabilježenim u početnim uvjetima (T0) (Slika 8, Slika 9). Međutim, veličina odgovora RSNA na hiperkapniju značajno se razlikovala među pokusnim skupinama. Prosječno povećanje RSNA tijekom THc1 bilo je najveće u skupini SHc-sobni zrak ($184,7 \pm 17,8\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,048$), pa redom u skupini SHc-hiperoksija ($149,9 \pm 6,7\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,005$), skupini SHoHc-sobni zrak ($133,4 \pm 6,0\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,022$) te skupini SHoHc-hiperoksija ($126,0 \pm 5,2\%$ početnih vrijednosti; $P = 0,036$). U THc1, veličina odgovora RSNA bila je značajno veća u skupini SHc-sobni zrak odnosu na sve ostale pokusne skupine ($F = 6,38$, $df = 3$, $P = 0,002$; Slika 9). U narednim hiperkapnijskim epizodama (THc2-5), odgovor RSNA na hiperkapniju bio je značajno manji u skupini SHoHc-hiperoksija u odnosu na skupinu SHc-sobni zrak (THc2: $P = 0,012$; THc3: $P = 0,011$; THc4: $P = 0,021$; THc5: $P = 0,052$, Slika 9). Nakon izlaganja protokolu AIHc, veličina RSNA imala je tendenciju smanjenja u svim pokusnim skupinama (Slika 9).

4.1.2. Odgovor renalnoga simpatičkog živca na umjerenu ponavljaju hiperkapniju

U svim skupinama izloženima umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji ($\text{FiCO}_2 = 0,05$) bilo je vidljivo povećanje RSNA za vrijeme izlaganja prvoj hiperkapnijskoj epizodi (Slika 8, Slika 9). Veličina odgovora RSNA za vrijeme THc1 bila je najveća u skupini MHc-sobni zrak ($127,4 \pm 4,4\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,012$) pa redom, u skupini MHc-hiperoksija ($118,9 \pm 3,9\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,045$), skupini MHoHc-hiperoksija ($111,9 \pm 2,4\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,037$) te skupini MHoHc-sobni zrak ($107,1 \pm 1,8\%$ početnih vrijednosti; $P = 0,121$; Slika 9). U narednim hiperkapnijskim epizodama (THc2-5), postojala je tendencija progresivnog smanjenja veličine odgovora RSNA u svim pokusnim skupinama ($P > 0,05$; Slika 9). Nakon izlaganja protokolu AIHc, RSNA je imala tendenciju smanjenja ispod vrijednosti zabilježenih u početnim uvjetima u svim pokusnim skupinama ($P > 0,05$; Slika 9).



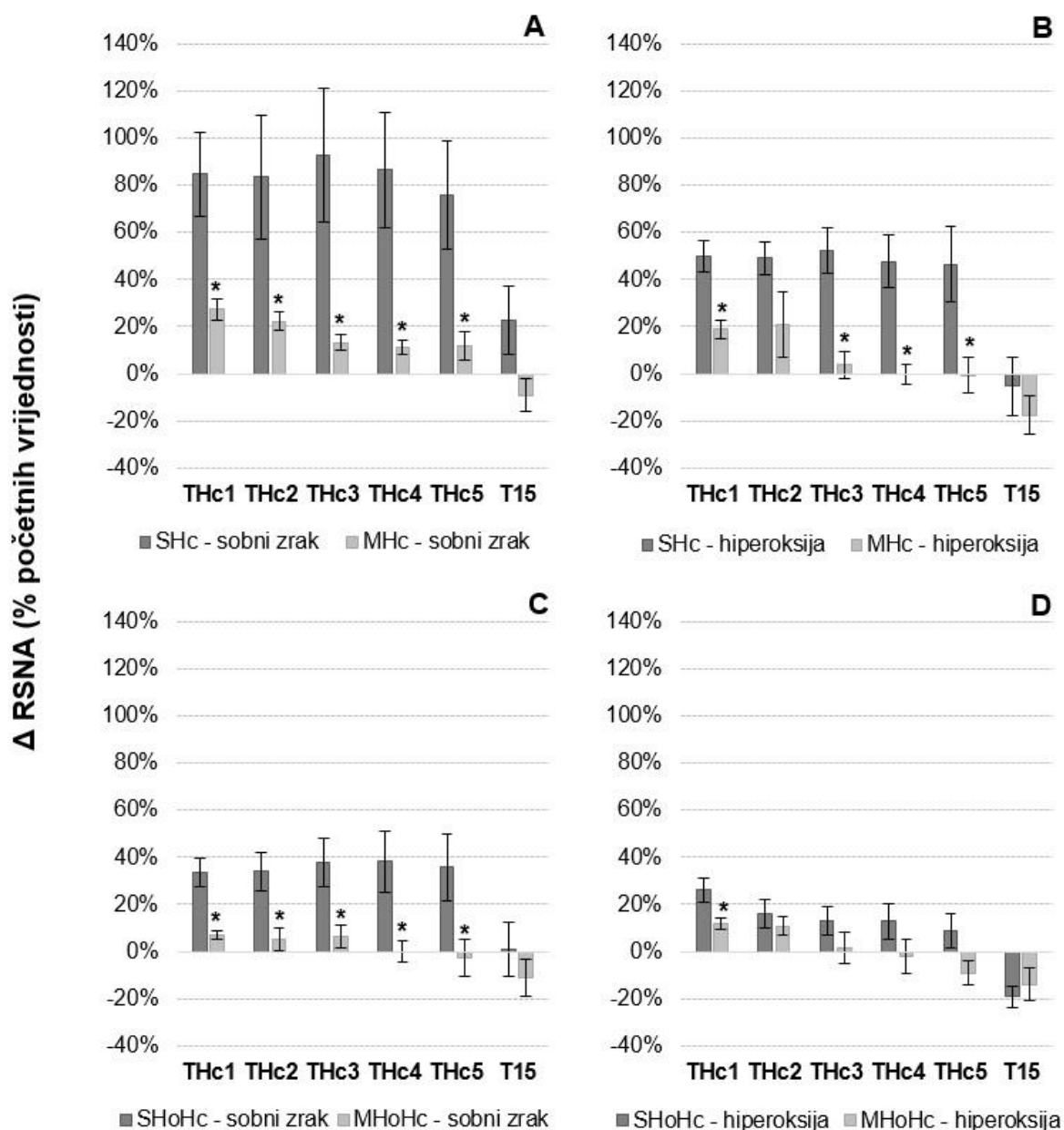
Slika 8. Komprimirani neurogrami integrirane renalne simpatičke aktivnosti (iRSNA; izražena u μV) tijekom protokola akutne ponavljane hiperkapnije u 4 skupine izložene značajnoj (podslika A) te 4 skupine izložene umjerenoj hiperkapniji (podslika B). Odozgo prema dolje: (A) skupina značajna hiperkapnija-sobni zrak (SHc-sobni zrak), skupina značajna hiperkapnija-hiperoksija (SHc-hiperoksija), skupina značajna hiperoksijska hiperkapnija-sobni zrak (SHoHc-sobni zrak), skupina značajna hiperoksijska hiperkapnija-hiperoksija (SHoHc-hiperoksija); (B) skupina umjerena hiperkapnija-sobni zrak (MHc-sobni zrak), skupina umjerena hiperkapnija-hiperoksija (MHc-hiperoksija), skupina umjerena hiperoksijska hiperkapnija-sobni zrak (MHoHc-sobni zrak) i skupina umjerena hiperoksijska hiperkapnija-hiperoksija (MHoHc-hiperoksija). T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.



Slika 9. Vremenski slijed promjena aktivnosti renalnoga simpatičkog živca (RSNA; izražena postotkom početnih vrijednosti) tijekom pokusnog protokola u skupinama izloženim značajnoj (podstika A) i umjerenoj hiperkapniji (podstika B). U skupinama izloženim značajnoj hiperkapniji, odgovor RSNA na akutnu ponavljanu hiperkapniju bio je očuvan tijekom svih hiperkapnijskih epizoda, dok je u skupinama izloženim umjerenoj hiperkapniji uočena tendencija progresivnog smanjenja veličine odgovora RSNA. * značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima, † značajno različito u odnosu na skupinu značajna hiperkapnija-sobni zrak, ‡ značajno različito u odnosu na skupinu značajna hiperkapnija-hiperoksija, # značajno različito u odnosu na skupinu značajna hiperoksijska hiperkapnija-sobni zrak; ANOVA, $P < 0,05$. SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapniji, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

4.1.3. Usporedba skupina izlaganih značajnoj i umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji

Analiza parova pokazala je da je izlaganje značajnoj hiperkapniji dovelo do značajno većeg odgovora RSNA u THc1 u odnosu na izlaganje umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji (Slika 10).



Slika 10. Usporedba promjena u odgovoru renalnoga simpatičkog živca (Δ RSNA, izražena postotnim promjenama početnih vrijednosti) tijekom i nakon izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji za parove skupina izloženih značajnoj i umjerenoj hiperkapniji u istovjetnim uvjetima udjela kisika u udahnutoj smjesi – značajna hiperkapnija vs. umjerena hiperkapnija u kombinaciji sa sobnim zrakom (podsluka A), značajna hiperkapnija vs. umjerena hiperkapnija u kombinaciji s hiperoksijom (podsluka B), značajna hiperoksijska hiperkapnija vs. umjerena hiperoksijska hiperkapnija u kombinaciji sa

sobnim zrakom (podsluka C) te značajna hiperoksijska hiperkapnija vs. umjerena hiperoksijska hiperkapnija u kombinaciji s hiperoksijom (podsluka D). Izlaganje značajnoj hiperkapniji dovelo je do značajno većeg odgovora RSNA tijekom izlaganja pokusnom protokolu u usporedbi s izlaganjem umjerenoj hiperkapniji. * značajno različito u odnosu na odgovarajuću skupinu izloženu značajnoj hiperkapniji; ANOVA, $P < 0,05$. SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Nadalje, veličina odgovora RSNA tijekom THc2-5 bila je povećana u skupinama izloženim značajnoj hiperkapniji u odnosu na skupine izložene umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji (Slika 10). Izlaganje umjerenoj hiperkapniji u usporedbi s izlaganjem značajnoj hiperkapniji izazvalo je izraženije smanjenje RSNA nakon izlaganja protokolu AIHc (T15, Slika 10).

4.1.4. Promjene srednjega arterijskog tlaka

U početnim uvjetima, MAP se nije razlikovao među pokusnim skupinama ($F = 1,26$, $df = 7$, $P = 0,293$). Izlaganje protokolu AIHc, ni u jednoj pokusnoj skupini, nije dovelo do značajnih promjena MAP-a kako za vrijeme, tako i nakon izlaganja pokusnom protokolu (Tablica 1).

4.1.5. Promjene srčane frekvencije

Srčana frekvencija se u početnim uvjetima prije provođenja pokusnog protokola nije značajno razlikovala među pokusnim skupinama ($F = 1,03$, $df = 7$, $P = 0,425$). Tijekom izlaganja protokolu AIHc, srčana frekvencija bila je značajno manja u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima u svim pokusnim skupinama (Tablica 2).

4.1.6. Acidobazni status

Vrijednosti PaCO_2 i pH nisu se značajno razlikovale među pokusnim skupinama. PaO_2 bio je značajno veći u skupinama izloženim AIHc u kombinaciji s hiperoksijom u usporedbi sa skupinama koje su bile izložene AIHc u kombinaciji sa sobnim zrakom ($F = 354,81$, $df = 7$, $P < 0,001$). Acidobazni status prikazan je u Tablici 3.

Tablica 1. Srednji arterijski tlak (mmHg) u 7 vremenskih točaka pokusa u skupinama izloženim protokolima značajne i umjerene akutne ponavljane hiperkapnije.

Pokusne skupine	T0	THc1	THc2	THc3	THc4	THc5	T15
<i>Značajna hiperkapnija</i>							
SHc-sobni zrak	103,92 ± 12,52	111,33 ± 17,37	123,47 ± 17,29	116,55 ± 12,41	111,87 ± 14,82	117,12 ± 11,21	110,81 ± 5,72
SHc-hiperoksija	89,83 ± 2,33	80,07 ± 5,68	83,78 ± 4,35	90,34 ± 3,65	89,21 ± 3,90	90,76 ± 3,76	95,36 ± 3,13
SHoHc-sobni zrak	86,11 ± 1,18	92,45 ± 2,01	91,20 ± 2,12	94,01 ± 2,35	95,96 ± 2,95	94,78 ± 3,08	91,10 ± 1,93
SHoHc-hiperoksija	94,27 ± 7,16	95,69 ± 4,32	100,08 ± 5,32	99,95 ± 5,72	98,90 ± 5,48	98,65 ± 5,37	99,03 ± 6,96
<i>Umjerena hiperkapnija</i>							
MHc-sobni zrak	85,65 ± 2,59	83,87 ± 3,47	88,51 ± 4,34	87,73 ± 3,78	86,81 ± 2,90	85,77 ± 4,31	85,63 ± 2,54
MHc-hiperoksija	88,83 ± 3,33	83,64 ± 4,66	81,81 ± 5,24	82,70 ± 5,56	82,18 ± 5,46	81,21 ± 5,79	86,82 ± 3,88
MHoHc-sobni zrak	87,46 ± 4,35	89,24 ± 3,33	91,31 ± 3,52	91,78 ± 3,60	88,74 ± 2,92	88,10 ± 3,17	84,44 ± 5,27
MHoHc-hiperoksija	92,27 ± 3,13	93,58 ± 2,53	93,21 ± 2,55	90,78 ± 3,41	89,92 ± 3,75	92,81 ± 3,93	88,21 ± 3,45

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM.

ANOVA (unutar skupina) – P > 0,05

SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1: prva hiperkapnijska epizoda, THc2: druga hiperkapnijska epizoda, THc3: treća hiperkapnijska epizoda, THc4: četvrta hiperkapnijska epizoda, THc5: peta hiperkapnijska epizoda, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Tablica 2. Srčana frekvencija (otkucaji/min) u 7 vremenskih točaka pokusa u skupinama izloženim protokolima značajne i umjerene akutne ponavljane hiperkapnije.

Pokusne skupine	T0	THc1	THc2	THc3	THc4	THc5	T15
<i>Značajna hiperkapnija</i>							
SHc-sobni zrak	361,57 ± 8,36	339,63 ± 7,21	343,65 ± 9,73	343,94 ± 8,10	341,08 ± 10,37	341,13 ± 9,63	364,96 ± 7,45
SHc-hiperoksija	381,38 ± 6,61	348,52 ± 0,77 ^{*,†}	351,64 ± 1,06 ^{*,†}	356,06 ± 4,88 ^{*,†}	352,39 ± 2,53 ^{*,†}	353,78 ± 6,12 ^{*,†}	382,02 ± 7,07
SHoHc-sobni zrak	373,46 ± 5,48	338,08 ± 5,84 ^{*,†}	343,09 ± 5,23 ^{*,†}	342,52 ± 5,19 ^{*,†}	342,55 ± 4,65 ^{*,†}	338,82 ± 5,82 ^{*,†}	372,26 ± 4,99
SHoHc-hiperoksija	371,39 ± 7,96	337,01 ± 7,71 ^{*,†}	340,12 ± 7,31 ^{*,†}	338,40 ± 7,48 ^{*,†}	338,02 ± 7,32 ^{*,†}	336,89 ± 7,26 ^{*,†}	377,02 ± 8,51
<i>Umjerena hiperkapnija</i>							
MHc-sobni zrak	371,18 ± 5,45	360,29 ± 4,12 [*]	361,97 ± 4,48	360,89 ± 5,22 [*]	362,71 ± 5,44 [*]	360,34 ± 6,12	367,35 ± 4,86
MHc-hiperoksija	371,16 ± 6,62	361,03 ± 5,95 [*]	362,56 ± 7,11	361,21 ± 7,31	358,38 ± 7,83	356,68 ± 8,04 ^{*,#}	366,33 ± 8,07
MHoHc-sobni zrak	364,05 ± 4,53	345,08 ± 5,37 ^{*,#}	348,22 ± 5,62 [*]	348,56 ± 5,34 [*]	345,43 ± 5,76 [*]	344,34 ± 5,42 [*]	357,22 ± 5,97
MHoHc-hiperoksija	377,59 ± 2,77	362,52 ± 4,10 [*]	362,65 ± 4,10 [*]	360,80 ± 3,54 ^{*,†}	358,03 ± 3,66 ^{*,†}	356,01 ± 3,04 ^{*,†}	373,89 ± 3,02

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM.

* značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (unutar skupine), [†] značajno različito u odnosu na T15 (unutar skupine), [#] značajno različito u odnosu na THc2 (unutar skupine); ANOVA, P < 0,05

SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1: prva hiperkapnijska epizoda, THc2: druga hiperkapnijska epizoda, THc3: treća hiperkapnijska epizoda, THc4: četvrta hiperkapnijska epizoda, THc5: peta hiperkapnijska epizoda, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Tablica 3. Vrijednosti pH i parcijalnih tlakova ugljikova dioksida (PaCO₂, mmHg) i kisika (PaO₂, mmHg) u arterijskoj krvi u pokusnim skupinama izloženim protokolima značajne i umjerene akutne ponavljane hiperkapnije.

Pokusne skupine	T0			T15		
	pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂
<i>Značajna hiperkapnija</i>						
SHc-sobni zrak	7,345 ± 0,018	44,4 ± 1,6	107,7 ± 4,2	7,251 ± 0,096	45,6 ± 1,3	122,3 ± 5,4 [†]
SHc-hiperoksija	7,273 ± 0,019	49,3 ± 2,6	267,4 ± 4,6	7,257 ± 0,040	53,4 ± 7,1	263,6 ± 8,7
SHoHc-sobni zrak	7,301 ± 0,006	45,4 ± 0,6	96,5 ± 2,2	7,275 ± 0,015	50,2 ± 1,7*	106,0 ± 4,1*
SHoHc-hiperoksija	7,300 ± 0,005	46,2 ± 1,3	281,5 ± 8,5	7,279 ± 0,012	49,3 ± 2,3	292,5 ± 7,3
<i>Umjerena hiperkapnija</i>						
MHc-sobni zrak	7,285 ± 0,008	47,1 ± 1,1	99,5 ± 3,8	7,263 ± 0,010*	50,9 ± 1,9	95,6 ± 3,3
MHc-hiperoksija	7,299 ± 0,009	45,6 ± 1,2	287,9 ± 6,8	7,300 ± 0,012	45,5 ± 2,4	293,7 ± 5,2
MHoHc-sobni zrak	7,268 ± 0,009	47,9 ± 1,2	96,5 ± 3,3	7,259 ± 0,027	48,3 ± 3,3	106,6 ± 7,6
MHoHc-hiperoksija	7,313 ± 0,012	45,1 ± 1,5	286,8 ± 4,2	7,306 ± 0,009	45,2 ± 1,9	292,6 ± 5,3

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM.

* značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (unutar skupine), [†] značajno različito u odnosu na skupinu MHc-sobni zrak; ANOVA, P < 0,05
 SHc: značajna hiperkapnija, SHoHc: značajna hiperoksijska hiperkapnija, MHc: umjerena hiperkapnija, MHoHc: umjerena hiperoksijska hiperkapnija, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

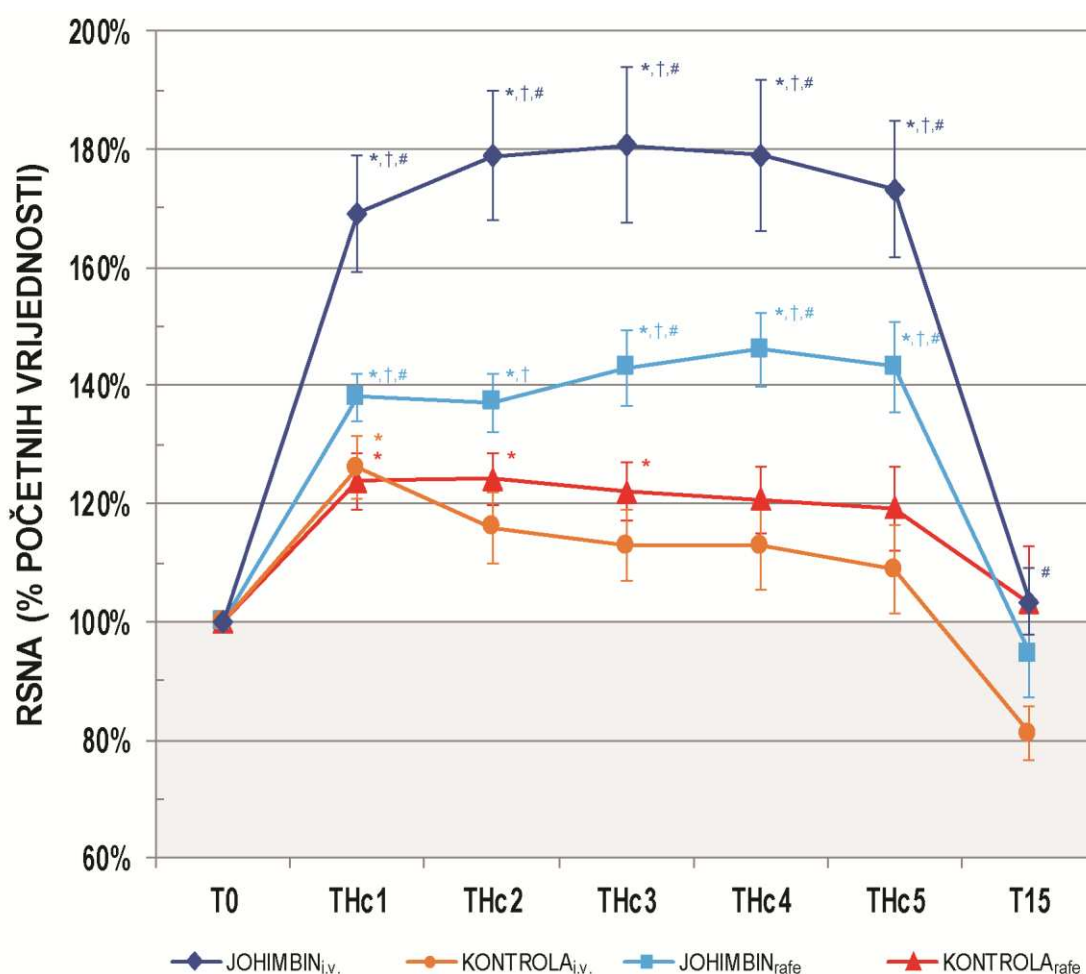
4.2. Rezultati druge studije

4.2.1. Sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora

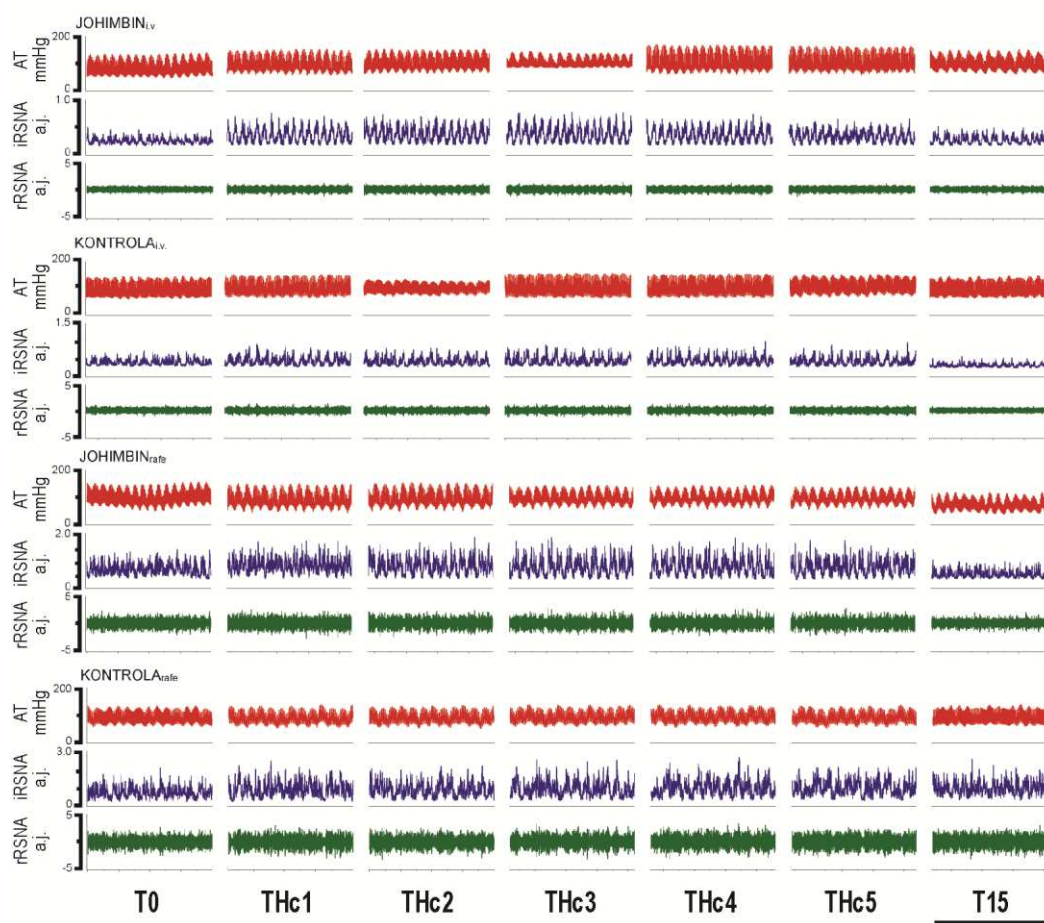
Intravenska primjena johimbina (skupina JOHIMBIN_{i.v.}) izazvala je značajno povećanje RSNA za vrijeme svih pet hiperkapnijskih epizoda u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (THc1: $169,2 \pm 10,0\%$, $P = 0,009$; THc2: $178,9 \pm 11,0\%$, $P = 0,008$; THc3: $180,7 \pm 13,2\%$, $P = 0,023$; THc4: $179,0 \pm 12,7\%$, $P = 0,019$; THc5: $173,2 \pm 11,5\%$ početnih vrijednosti, $P = 0,018$; $F = 30,81$, $df = 6$, $P < 0,001$; Slika 11, Slika 12). U kontrolnoj skupini (KONTROLA_{i.v.}), značajno povećanje RSNA u odnosu na početne vrijednosti bilo je zabilježeno isključivo za vrijeme prve hiperkapnijske epizode (THc1: $126,0 \pm 5,2\%$, $P = 0,036$; $F = 5,82$, $df = 5$, $P = 0,014$; Slika 11). Između slijeda hiperkapnijskih epizoda i primjene lijeka postojala je statistički značajna interakcija ($F = 10,84$, $df = 6$, $P = 0,001$). Tijekom svih hiperkapnijskih epizoda (THc1-5) i u T15, RSNA odgovor bio je veći u skupini JOHIMBIN_{i.v.} u odnosu na skupinu KONTROLA_{i.v.} (Slika 11).

U početnim uvjetima, MAP je bio značajno niži u skupini JOHIMBIN_{i.v.} u odnosu na skupinu KONTROLA_{i.v.} ($54,9 \pm 1,9$ mmHg vs. $94,3 \pm 7,2$ mmHg, $F = 35,57$, $df = 1$, $P < 0,001$), dok se HR nije značajno razlikovao među skupinama. Za vrijeme hiperkapnijskih epizoda, značajno smanjenje HR zabilježeno je u obje pokusne skupine (Tablica 4). Izlaganje protokolu AIHc, nije dovelo do značajnih promjena MAP-a u skupini KONTROLA_{i.v.}, dok je u skupini JOHIMBIN_{i.v.} MAP bio značajno veći u THc4, THc5 i T15 u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (redom: $71,1 \pm 3,7$ mmHg, $P = 0,018$; $73,4 \pm 3,3$ mmHg, $P = 0,004$; $67,3 \pm 3,3$ mmHg, $P = 0,028$ vs. $54,9 \pm 1,9$ mmHg; $F = 11,31$, $df = 6$, $P < 0,001$, Tablica 4).

U početnim uvjetima, nije bilo značajnih razlika u vrijednostima pH ($F = 0,40$, $df = 1$, $P = 0,536$) i PaCO₂ ($F = 0,63$, $df = 1$, $P = 0,442$) između skupina JOHIMBIN_{i.v.} i KONTROLA_{i.v.}, dok je PaO₂ bio značajno veći u skupini JOHIMBIN_{i.v.} u odnosu na skupinu KONTROLA_{i.v.} (T0: $316,6 \pm 8,7$ vs. $281,5 \pm 8,5$ mmHg, $F = 8,29$, $df = 1$, $P = 0,013$; Tablica 5). U obje skupine, nije bilo značajnih promjena pH, PaCO₂ i PaO₂ u T15 u odnosu na T0 (Tablica 5).



Slika 11. Vremenski slijed promjena aktivnosti renalnoga simpatičkoga živca (RSNA; izražena postotkom početnih vrijednosti) tijekom izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije. Odgovor RSNA na akutnu ponavljaju hiperkapniju bio je veći za vrijeme svih hiperkapnijskih epizoda u skupini kojoj je johimbin bio primijenjen intravenski (JOHIMBIN_{i.v.}, n = 8, tamnoplavo, ♦) u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je intravenski bila primjenjena fiziološka otopina (KONTROLA_{i.v.}, n = 7, narančasto, ●). Nadalje, mikroubrizgavanje johimbina u kaudalne rafe jezgre (JOHIMBIN_{rafe}, n = 12, plavo, ■) dovelo je do značajno većeg odgovora RSNA na akutnu ponavljaju hiperkapniju tijekom svih hiperkapnijskih epizoda u usporedbi s kontrolnom skupinom kojoj je mikroubrizgana fiziološka otopina u isto područje (KONTROLA_{rafe}, n = 10, crveno, ▲). * značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (unutar skupine), † značajno različito u odnosu na T15 (unutar skupine), # značajno različito u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu; ANOVA, P < 0,05. T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.



Slika 12. Zapisi pokusa za svaku pojedinu pokusnu skupinu, odozgo prema dolje: pokus u kojem je provedeno sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora (JOHIMBIN_{i.v.}); pokus iz odgovarajuće kontrolne skupine (KONTROLA_{i.v.}); pokus u kojem je provedeno blokiranje alfa2-adrenoreceptora u području kaudalnih rafe jezgara mikroubrizgavanjem johimbina (JOHIMBIN_{rafe}) i pokus iz odgovarajuće kontrolne skupine (KONTROLA_{rafe}). Za svaku skupinu prikazani su zapisi arterijskoga tlaka (AT; izražen u mmHg, crveno), integrirani signali renalnoga simpatičkog živca (iRSNA; izraženi u arbitrarnim jedinicama, a.j., plavo) te neobrađeni signali renalnoga simpatičkog živca (rRSNA; izraženi u arbitrarnim jedinicama, a.j., zeleno) u 7 vremenskih točaka pokusa. Crta predstavlja vremensko razdoblje od 20 sekundi. T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1-5: pet hiperkapnijskih epizoda, T15: 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Tablica 4. Srednji arterijski tlak (MAP, mmHg) i srčana frekvencija (HR, otkucaji/min) u pokusnim skupinama izloženim akutnoj ponavljanoj hiperkapniji kojoj je prethodila sistemska ili središnja modulacija alfa2-adrenoreceptora.

Pokusne skupine		T0	THc1	THc2	THc3	THc4	THc5	T15
<i>Sistemska modulacija alfa2-adrenoreceptora</i>								
JOHIMBIN _{i.v.} (n = 9)	MAP	54,9 ± 1,9 [#]	64,5 ± 4,0	67,6 ± 4,3	71,9 ± 5,3	71,1 ± 3,7*	73,4 ± 3,3*	67,3 ± 3,3*
	HR	375,1 ± 6,0	348,1 ± 5,7*, [†]	348,1 ± 5,9	348,2 ± 5,8*, [†]	344,0 ± 6,3*, [†]	345,4 ± 5,1*, [†]	376,2 ± 4,3
KONTROLA _{i.v.} (n = 7)	MAP	94,3 ± 7,2	95,7 ± 4,3	100,1 ± 5,32	99,9 ± 5,7	98,9 ± 5,5	98,7 ± 5,4	99,0 ± 7,0
	HR	371,4 ± 8,0	337,0 ± 7,7*, [†]	340,1 ± 7,3*, [†]	338,4 ± 7,5*, [†]	338,0 ± 7,3*, [†]	336,9 ± 7,3*, [†]	377,0 ± 8,5
<i>Središnja modulacija alfa2-adrenoreceptora</i>								
JOHIMBIN _{rafe} (n = 12)	MAP	82,0 ± 3,4	82,1 ± 3,6	85,0 ± 3,9	88,3 ± 3,8 [†]	87,9 ± 3,5 [†]	88,1 ± 3,7 [†]	75,8 ± 3,5
	HR	344,5 ± 8,2	304,1 ± 9,4*, [†]	306,4 ± 9,7*, [†]	306,1 ± 8,3*, [†]	304,6 ± 8,7*, [†]	302,1 ± 8,6*, [†]	339,4 ± 8,3
KONTROLA _{rafe} (n = 10)	MAP	89,4 ± 4,5	86,5 ± 3,5	89,1 ± 3,4	91,0 ± 3,8	90,7 ± 3,8	90,7 ± 4,4	86,0 ± 4,3
	HR	331,3 ± 7,9	283,5 ± 8,1*, [†]	281,6 ± 6,5*, [†]	281,0 ± 8,2*, [†]	279,6 ± 7,6*, [†]	277,5 ± 6,9*, [†]	327,2 ± 7,0

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM.

* značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (unutar skupine), [†] značajno različito u odnosu na T15 (unutar skupine), [#] značajno različito u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu; ANOVA, P < 0,05

JOHIMBIN_{i.v.}: skupina u kojoj je johimbin bio primijenjen intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{i.v.}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila primijenjena intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, JOHIMBIN_{rafe}: skupina u kojoj je johimbin bio mikroubrizgan u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{rafe}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila mikroubrizgana u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, THc1: prva hiperkapnijska epizoda, THc2: druga hiperkapnijska epizoda, THc3: treća hiperkapnijska epizoda, THc4: četvrta hiperkapnijska epizoda, THc5: peta hiperkapnijska epizoda, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

Tablica 5. Vrijednosti pH i parcijalnih tlakova ugljikova dioksida (PaCO₂, mmHg) i kisika (PaO₂, mmHg) u arterijskoj krvi u pokusnim skupinama izloženim akutnoj ponavljanoj hiperkapniji kojoj je prethodila sistemska ili središnja modulacija alfa2-adrenoreceptora.

Pokusne skupine	T0			T15		
	pH	PaCO ₂	PaO ₂	pH	PaCO ₂	PaO ₂
<i>Sistemska modulacija alfa2-adrenoreceptora</i>						
JOHIMBIN _{i.v.} (n = 9)	7,314 ± 0,021	44,0 ± 2,4	316,6 ± 8,7	7,255 ± 0,023	47,4 ± 3,1	319,2 ± 7,3
KONTROLA _{i.v.} (n = 7)	7,300 ± 0,005	46,2 ± 1,3	281,5 ± 8,5	7,279 ± 0,012	49,3 ± 2,3	292,5 ± 7,3
<i>Središnja modulacija alfa2-adrenoreceptora</i>						
JOHIMBIN _{rafe} (n = 12)	7,288 ± 0,016	44,3 ± 1,5	312,3 ± 8,8	7,293 ± 0,020	43,7 ± 2,8	313,1 ± 12,9
KONTROLA _{rafe} (n = 10)	7,271 ± 0,015	42,8 ± 1,5	286,6 ± 3,9	7,262 ± 0,018	44,8 ± 2,8	299,5 ± 5,3*

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SEM.

* značajno različito u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima (unutar skupine); ANOVA, P < 0,05

JOHIMBIN_{i.v.}: skupina u kojoj je johimbin bio primijenjen intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{i.v.}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila primijenjena intravenski prije izlaganja pokusnom protokolu, JOHIMBIN_{rafe}: skupina u kojoj je johimbin bio mikroubrizgan u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, KONTROLA_{rafe}: skupina u kojoj je fiziološka otopina bila mikroubrizgana u kaudalne rafe jezgre prije izlaganja pokusnom protokolu, T0: početni uvjeti prije izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije, T15: 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode.

4.2.2. Središnje blokiranje alfa2-adrenoreceptora

4.2.2.1. Kontrolna skupina

U skupini KONTROLA_{rafe}, zabilježeno je značajno povećanje RSNA tijekom THc1-3 u odnosu na T0 ($F = 5,54$, $df = 6$, $P = 0,014$; Slika 11, Slika 12). Nije bilo značajnih promjena RSNA u T15 u odnosu na T0 (T15: $103,1 \pm 9,8\%$ početnih vrijednosti, $F = 5,54$, $df = 6$, $P = 1,000$; Slika 11). Izlaganje protokolu AIHc nije dovelo do značajnih promjena MAP-a za vrijeme te nakon izlaganja pokusnom protokolu ($F = 1,37$, $df = 6$, $P = 0,280$; Tablica 4). Za vrijeme THc1-5, HR je bio značajno manji u odnosu na vrijednosti zabilježene u početnim uvjetima ($F = 143,85$, $df = 6$, $P < 0,001$; Tablica 4). Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima pH i PaCO₂, dok je vrijednost PaO₂ bila značajno veća u T15 u odnosu na T0 ($299,5 \pm 5,3$ mmHg vs. $286,6 \pm 3,9$ mmHg, $F = 18,83$, $df = 1$, $P = 0,002$; Tablica 5).

4.2.2.2. Johimbinska skupina

U skupini JOHIMBIN_{rafe}, RSNA je bila značajno veća tijekom svih pet hiperkapnijskih epizoda u odnosu na T0. Nadalje, u T15, RSNA je bila značajno manja u odnosu na THc1-5, ali ne i u odnosu na T0 ($F = 27,40$, $df = 6$, $P < 0,001$; Slika 11, Slika 12). MAP je bio značajno manji u T15 u odnosu na THc3-5, ali ne i u odnosu na T0 ($F = 7,26$, $df = 6$, $P = 0,001$; Tablica 4). Tijekom THc1-5, HR je bio značajno manji u odnosu na T0 i T15 ($F = 78,57$, $df = 6$, $P < 0,001$; Tablica 4). Nije bilo značajne razlike u HR između T0 i T15 ($344,5 \pm 8,2$ otkucaja u minuti vs. $339,4 \pm 8,3$ otkucaja u minuti, $F = 78,57$, $df = 6$, $P = 1,000$; Tablica 4). U skupini JOHIMBIN_{rafe} nije bilo značajnih promjena u pH, PaCO₂ i PaO₂ u T15 u odnosu na T0 (Tablica 5).

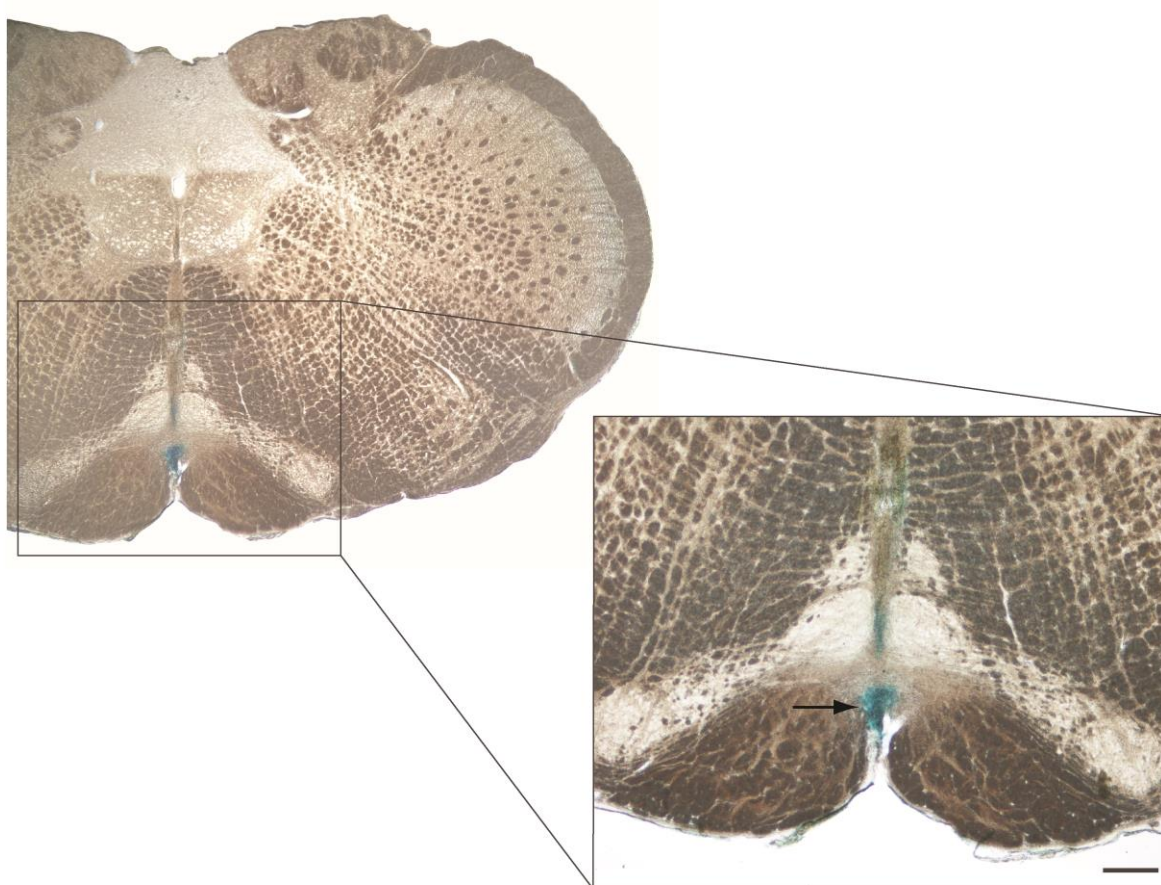
4.2.2.3. Usporedba kontrolne i johimbinske skupine

Statistički značajna interakcija postojala je između slijeda hiperkapnijskih epizoda i primjene lijeka ($F = 4,44$, $df = 6$, $P = 0,012$). Izlaganje protokolu AIHc, dovelo je do značajno veće aktivacije RSNA tijekom THc1-5 u skupini JOHIMBIN_{rafe} u odnosu na skupinu KONTROLA_{rafe} (THc1: $138,0 \pm 4,0\%$ vs. $123,7 \pm 4,8\%$, $F = 5,32$, $df = 1$, $P = 0,032$; THc2: $137,1 \pm 5,0\%$ vs. $124,1 \pm 4,5\%$, $F = 3,63$, $df = 1$, $P = 0,071$; THc3: $143,1 \pm 6,4\%$ vs. $122,0 \pm 4,8\%$, $F = 6,39$, $df = 1$, $P = 0,020$; THc4: $146,1 \pm 6,2\%$ vs. $120,7 \pm 5,7\%$, $F = 8,85$, $df = 1$, $P = 0,007$ and THc5: $143,2 \pm 7,7\%$ vs. $119,2 \pm 7,2\%$ početnih vrijednosti, $F = 4,97$, $df = 1$, $P = 0,038$; Slika 11). U T15, nije bilo statistički značajne razlike u RSNA između skupina JOHIMBIN_{rafe} i KONTROLA_{rafe} (T15: $103,1 \pm 9,8\%$ vs. $94,6 \pm 7,3\%$ početnih vrijednosti, $F = 0,49$, $df = 1$, $P = 0,490$; Slika 11).

U početnim uvjetima nije bilo značajnih razlika u HR ($F = 1,29$, $df = 1$, $P = 0,269$), MAP-u ($F = 1,77$, $df = 1$, $P = 0,198$, Tablica 4) te u vrijednostima pH ($F = 0,57$, $df = 1$, $P = 0,457$) i PaCO_2 ($F = 0,49$, $df = 1$, $P = 0,492$) između skupina $\text{JOHIMBIN}_{\text{rafe}}$ i $\text{KONTROLA}_{\text{rafe}}$, dok je PaO_2 bio značajno veći u skupini $\text{JOHIMBIN}_{\text{rafe}}$ u odnosu na skupinu $\text{KONTROLA}_{\text{rafe}}$ (T_0 : $312,3 \pm 8,8$ vs. $286,6 \pm 3,9$ mmHg, $F = 6,23$, $df = 1$, $P = 0,021$; Tablica 5).

4.2.2.4. Histološka potvrda mjesta mikroubrizgavanja

U svim pokusima skupina $\text{JOHIMBIN}_{\text{rafe}}$ i $\text{KONTROLA}_{\text{rafe}}$ provedena je histološka potvrda mjesta mikroubrizgavanja u kaudalno rafe područje kako je i prikazano na Slici 13.



Slika 13. Mikroskopska fotografija poprečnog presjeka kroz moždano deblo s prikazom mjesta mikroubrizgavanja u područje kaudalnih rafe jezgara označenog razrijeđenom otopinom India ink boje (plavo) i dodatno istaknutog strelicom. Koordinate za mikroubrizgavanje bile su: 0,2 mm anteriorno; 0,0 mm mediolateralno i 2,5 mm ventralno od *obex*-a. Crta predstavlja dužinu od 500 μm .

5. RASPRAVA

Ovom doktorskom disertacijom proučen je učinak značajne i umjerene akutne ponavljane hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca u kombinaciji s različitim udjelima kisika u udahnutoj smjesi te uloga alfa2-adrenoreceptora u opaženim promjenama uslijed sistemske i središnje modulacije tih receptora u štakora.

Rezultati prve studije ukazuju da hiperkapnijski podražaji dovode do povećanja RSNA, ovisnih o udjelu CO₂ u udahnutoj smjesi, na način da značajna hiperkapnija izaziva značajno veći odgovor RSNA u odnosu na umjerenu hiperkapniju. Nadalje, povećanje RSNA odgovora za vrijeme izlaganja značajnoj ponavljanoj hiperkapniji bilo je očuvano tijekom svih epizoda, dok se u skupinama izloženim umjerenoj ponavljanoj hiperkapniji odgovor progresivno smanjivao. Međutim, izlaganje akutnoj ponavljanoj hiperkapniji u kombinaciji s hiperoksijom (50% O₂) dovelo je do smanjenja veličine odgovora RSNA u odnosu na izlaganje akutnoj ponavljanoj hiperkapniji u kombinaciji sa sobnim zrakom, kako u skupinama izloženim značajnoj, tako i u skupinama izloženim umjerenoj hiperkapniji.

Drugom studijom dokazano je da sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora johimbinom pojačava odgovor renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljanu hiperkapniju u vagotomiranih i mehanički ventiliranih štakora anesteziranih uretanom. Nadalje, lokalno mikroubrizgavanje johimbina u područje kaudalnih rafe jezgara dovelo je do izraženijih povećanja RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji u odnosu na povećanja zabilježena u kontrolnoj skupini. Navedeni rezultati, stoga, pokazuju kako područje kaudalnih rafe jezgara može imati važnu ulogu u regulaciji simpatičke živčane aktivnosti za vrijeme izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.

5.1. Učinak akutne ponavljane hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca

Brojne studije pokazale su kako hiperkapnija može značajno utjecati na simpatički, kardiovaskularni i respiracijski sustav (97, 100, 113, 124, 138), a učinci mogu biti posredovani središnjim i/ili perifernim kemoreceptorima (46, 57, 105, 106, 120, 139, 140). U pojedinim modelima istraživao je učinak kombiniranog hipoksijskog i hiperkapnijskog podražaja, s obzirom da su oba podražaja obilježje poremećaja disanja tijekom spavanja (141). Ti modeli pokazali su kako hipoksija i hiperkapnija u sinergiji mogu dovesti do simpatoekscitacije u ljudi (107, 109) i pokusnih životinja (118, 141, 142). Različite kombinacije PaO₂ i PaCO₂ mogu dovesti i do promjena u izražaju gena i proteina (143), a u modelu hipoksijsko-ishemijske ozljede mozga u novorođenih štakora dokazano je da to može dovesti do strukturnih i

funkcionalnih promjena u pojedinim područjima SŽS-a (144). Rezultati drugih modela u kojima je ispitivan učinak izoliranih podražaja, ukazali su da je hipoksija, a ne hiperkapnija, glavni podražaj koji vodi razvoju hipertenzije i povećane simpatičke aktivnosti (145). Nadalje, jednom je studijom utvrđena važna uloga hipofiznog polipeptida koji aktivira adenilat ciklazu (engl. *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*, PACAP) u trajnoj simpatoekscitaciji izazvanoj ponavljanom hipoksijom (146). S obzirom da je PACAP prisutan u gotovo svim dijelovima simpatičke mreže, smatra se da bi mogao biti važan posrednik u razvoju hipertenzije u oboljelih od poremećaja disanja tijekom spavanja (146). Nasuprot tome, simpatoekscitacija izazvana hiperkapnijom ovisi o aktivnosti noradrenalinskog sustava i povećanom otpuštanju noradrenalina. No iz dosadašnjih modela istraživanja nije jasno može li simpatoekscitacija biti očuvana i na taj način pridonijeti razvoju hipertenzije (48, 98). Mjerenjem splanhničnoga, torakalnoga, lumbalnoga ili renalnoga simpatičkog živca ustanovljeno je da izolirani hiperkapnijski podražaj može dovesti do povećanja simpatičke aktivnosti, ali povećanje može značajno ovisiti o snimanom simpatičkom živcu (67, 105, 106, 115, 116, 123). Dobro je poznato da se aktivacija simpatikusa tijekom hiperkapnije može značajno razlikovati među organima te da pojedine skupine neurona SŽS-a imaju različitu osjetljivost na hiperkapniju (121).

Prethodne studije pokazale su da se aktivnost renalnoga živca progresivno povećava kao posljedica izloženosti sve većem udjelu CO₂ (67, 121). U našoj studiji, mjerena je aktivnost renalnoga simpatičkog živca, a rezultati studije pokazuju kako je povećanje RSNA tijekom hiperkapnije usporedivo s vrijednostima ranije zabilježenima za renalni živac (106, 115). Nadalje, prethodna istraživanja ukazala su da odgovor simpatikusa na hiperkapniju može značajno ovisiti o pozadinskom udjelu kisika. Izmjena pozadinskog udjela kisika može dovesti do promjena u osjetljivosti središnjeg kemorefleksa, kao funkcija udjela kisika u udahnutoj smjesi plinova te ukupnog trajanja hiperoksije (59, 147). Rezultati naše studije podupiru tu tvrdnju, fokusirajući se na kratkoročne promjene simpatičke živčane aktivnosti izazvane akutnom ponavljanom hiperkapnijom. U studiji Teppeme i suradnika, imunohistokemijskim označavanjem proteina Fos, koji je neizravni pokazatelj aktivnosti neurona, mapirane su skupine neurona produljene moždine aktivirane hiperkapnijom. Autori su pronašli značajno više stanica označenih na proteine Fos u NTS-u i RVLM-u nakon izlaganja hiperkapniji s normoksijom u pozadini u usporedbi s izlaganjem hiperkapniji s hiperoksijom u pozadini (148). Rezultati navedenih studija ukazuju da je hiperkapnija s normoksijom u pozadini snažniji podražaj za skupine neurona koje sudjeluju u integraciji kemo- i simpatorefleksa te naglašavaju

važnost perifernih kemoreceptora u odgovoru na akutnu ponavljanu hiperkapniju, što je vidljivo i iz rezultata naše studije.

Usprkos činjenici da su rezultati *in vivo* studija o učincima hiperoksije na tonus krvnih žila, renalni simpatoekscitacijski te hemodinamski odgovor vrlo heterogeni, poznato je da izlaganje hiperoksiji može dovesti do smanjenja minutnog volumena i povećanja otpora perifernih krvnih žila (141, 149, 150). Nadalje, studijom Ferreire i suradnika dokazano je da hiperoksija može umanjiti, ali ne i u potpunosti spriječiti odgovor simpatikusa, srčane frekvencije i arterijskog tlaka na akutnu opstrukciju dišnih putova u štakorskom modelu (141). Prijašnje studije pokazale su i da različiti udjeli kisika u udahnutoj smjesi mogu mijenjati hemodinamiku bubrega, što može imati izravni utjecaj na metabolički status bubrega i posljedično dovesti do promjena u protoku krvi kroz bubrege (151). Stoga je za očekivati da bi i neznatna promjena PaO_2 mogla dovesti do promjena protoka krvi kroz bubrege koje su najvjerojatnije posredovane aktivacijom RSNA. Pored toga, moguće je da su promjene RSNA za vrijeme hiperoksije koje su uočene u ovoj studiji, rezultat promjena osjetne signalizacije iz bubrega uslijed aktivacije kemoreceptora. Međutim, iz korištenog pokusnog modela nije moguće izvući jasan zaključak o mehanizmu nastanka uočenih promjena.

Izlaganje akutnoj hiperkapniji, osim povećanja simpatičke aktivnosti, može dovesti i do značajnih promjena kardiovaskularne dinamike te do brojnih autonomnih, hormonalnih i prilagodbi uzrokovanih stresom (121, 148). Usprkos velikom broju objavljenih istraživanja o učincima akutne hiperkapnije na kardiovaskularne funkcije, rezultati koji se odnose na promjene srednjega arterijskog tlaka i srčane frekvencije za vrijeme izlaganja hiperkapniji vrlo su različiti. Heterogenost rezultata može se pripisati korištenju različitih animalnih modela, anestetika te pokusnih protokola koji se mogu razlikovati u broju, trajanju i intenzitetu hiperkapnijskih epizoda (87, 105, 115-117, 120, 122, 123, 152). U našem istraživanju nisu zabilježene značajne promjene srednjega arterijskog tlaka za vrijeme izlaganja protokolima akutne ponavljane hiperkapnije, usprkos značajnim povećanjima RSNA tijekom izlaganja pokusnom protokolu. S obzirom da hiperkapnija izravnim djelovanjem na periferne krvne žile može dovesti do vazodilatacije te posljedično do smanjenja arterijskog tlaka (48, 117, 121), moguće je da je fiziološki značaj povećanja RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji suprostavljanje smanjenju MAP-a. Aktivacija RSNA potiče antinatriuretsko i antidiuretsko djelovanje bubrega te na taj način može dovesti do očuvanja i stabilizacije MAP-a (121). Nadalje, regulacija arterijskog tlaka nije regulirana isključivo simpatičkom aktivnošću već ovisi i o izravnim učincima cirkulirajućih hormona i drugih čimbenika koji se izlučuju u

krvotok, koji izravno mogu mijenjati otpor perifernih krvnih žila. Stoga, odgovor MAP-a tijekom izlaganja protokolu AIHc vjerojatno je neto učinak svih navedenih čimbenika. Nasuprot tome, tijekom izlaganja protokolu AIHc zabilježeno je smanjenje srčane frekvencije u svim pokusnim skupinama. Iako hiperkapnija u različitim modelima može dovesti do povećanja ili smanjenja HR-a, naši rezultati u skladu su s prijašnjim studijama koje su zabilježile smanjenje HR-a tijekom hiperkapnije u anesteziranih životinja (105, 106, 117, 120). Jedan od predloženih mehanizama smanjenja HR-a tijekom izlaganja hiperkapniji je izravan utjecaj hiperkapnije na sinus-atrijski čvor (106, 117). U svakom slučaju, sveukupni kardiovaskularni odgovor na hiperkapniju ovisit će o nizu čimbenika, poput izravnih učinaka na srce, aktivnosti barorefleksa i parasimpatičkog sustava i sl.

Poznato je da hiperkapnija može aktivirati periferne i središnje kemoreceptore, dok hipoksija svoje djelovanje ostvaruje većinom putem perifernih kemoreceptora. Modelom korištenim u ovom istraživanju bilo je moguće razlučiti ulogu perifernih i središnjih kemoreceptora za vrijeme izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji. Intenzitet hiperkapnijskog podražaja korištenog u ovom istraživanju rijetko se može vidjeti u kliničkom okružju. Međutim, korištenje hiperkapnijskih smjesa (5% i 15% CO₂) u zraku mogu voditi blagom hipoksijsko-hiperkapnijskom podražaju. Stoga je bilo smisleno primijeniti hiperkapnijski podražaj u kombinaciji s hiperoksijom kako bi se isključio zbunjujući učinak hipoksijskog podražaja. U ovom istraživanju, usporedba umjerene i značajne hiperkapnije u istoj studiji na istom podsoju Sprague-Dawley štakora, omogućila je izravnu usporedbu učinka umjerene i značajne hiperoksijske hiperkapnije na aktivnost renalnoga simpatičkog živca, čime je dokazano da intenzitet hiperoksijsko-hiperkapnijskog podražaja može imati značajan učinak na veličinu i održivost odgovora RSNA na hiperkapniju. Značajna hiperkapnija dovela je do izraženijih povećanja RSNA tijekom izlaganja pokusnom protokolu u usporedbi s umjerenom hiperkapnijom. U skupinama izloženim umjerenom hiperoksijskoj hiperkapniji, odgovor na hiperkapniju nije bio očuvan, već je uočena tendencija progresivnog smanjenja odgovora RSNA. Međutim, na temelju korištenog modela nije moguće precizno opisati mehanizam u pozadini promjena RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.

5.2. Uloga alfa2-adrenoreceptora u promjenama aktivnosti renalnoga simpatičkog živca uslijed izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji

U drugoj studiji sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora intravenskom primjenom johimbina značajno je utjecalo na odgovor RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji. Taj nalaz nije neočekivan s obzirom da je poznato da alfa2-adrenoreceptori imaju većinom simpatoinhibicijsku ulogu te da su uključeni u regulaciju arterijskog tlaka (153, 154). Prilikom intravenske primjene, antagonist alfa2-adrenoreceptora johimbina može se vezati na receptore prisutne u perifernim krvnim žilama te u relativno kratkom vremenu dospjeti i u mozak, gdje se može vezati na alfa2-adrenoreceptore široko rasprostranjene u brojnim središtima koja kontroliraju simpatičku živčanu aktivnost (134, 154, 155). Stoga, sistemskim blokiranjem alfa2-adrenoreceptora nije bilo moguće doći do jasnih zaključaka o točnom mjestu djelovanja johimbina te preciznom mehanizmu kojim njegova primjena dovodi do povećanja odgovora RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.

Poznato je da hiperkapnija može značajno aktivirati pojedine skupine neurona moždanoga debla te da može dovesti do različitih odgovora uslijed izlaganja akutnom ili kroničnom podražaju (48, 97, 98, 125). Konvencionalni način izlaganja životinja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji jest ciklička izmjena udjela ugljikova dioksida u udahnuтой smjesi u različitim pozadinskim smjesama plinova, a kao takav, model je doveo do različitih odgovora u ovisnosti o intenzitetu hiperkapnijskog podražaja (97, 98, 100, 113, 114, 124). Prijašnje studije pokazale su kako akutno izlaganje izoliranom podražaju značajne hiperkapnije (15% CO₂) u trajanju od 30 min do 24 h može dovesti do značajnih promjena koncentracije noradrenalina, dopamina i serotonina u brojnim područjima SŽS-a (126, 127). Nadalje, brojne studije pružile su dokaze da hiperkapnija, putem perifernih i središnjih kemoreceptora, može dovesti do povećanja respiracijske i simpatičke aktivnosti (48, 105, 106, 116). Općenito se smatra da je RTN glavno mjesto središnje CO₂ kemorecepcije (156), s obzirom da je aktivnost neurona te jezgre neophodna u respiracijskom odgovoru na hiperkapniju (48). Međutim, povećanje simpatičke aktivnosti izazvano hiperkapnijom samo djelomično ovisi o aktivnosti neurona RTN-a (48) te može biti posredovano aktivnošću brojnih drugih područja produljene moždine koja imaju svojstvo kemosenzitivnosti, uključujući i rafe jezgre (17, 20, 25, 50). Iz navedenih razloga, cilj druge studije ove doktorske disertacije bio je ispitati ulogu kaudalnih rafe jezgara u odgovoru simpatikusa na značajnu akutnu ponavljaju hiperkapniju.

Područje kaudalnih rafe jezgara prepoznato je kao izvor živčanih projekcija u brojna područja produljene i kralježnične moždine, putem kojih može imati utjecaj na različite

funkcije, uključujući regulaciju kardiovaskularne i autonomne aktivnosti (17, 112). Poznato je da kaudalne rafe jezgre šalju brojne izravne projekcije prema simpatičkim preganglijskim neuronima IML-a (6, 11, 17). Nadalje, rafe jezgre mogu neizravno doprinijeti sveukupnoj simpatičkoj aktivnosti putem projekcija u druga područja moždanoga debla koja su uključena u regulaciju simpatičke aktivnosti, primjerice RVLM (9) i RTN (48, 129). Također, kaudalne rafe jezgre recipročno su povezane s RVLM-om (9, 11) i LC-om (10, 12), područjima sa središnjom ulogom u regulaciji autonomne aktivnosti u stanju mirovanja i prilikom izlaganja različitim vrstama stresa. Svi navedeni anatomske dokazi idu u prilog tvrdnji da područje kaudalnih rafe jezgara može sudjelovati u regulaciji arterijskog tlaka, srčane frekvencije i simpatičke živčane aktivnosti.

Prijašnje studije pokazale su kako noradrenalin, koji se povećano izlučuje uslijed izlaganja hiperkapniji, može djelovati na alfa2-adrenoreceptore kaudalnih rafe jezgara te tako dovesti do njihove inhibicije. Inhibicija rafe jezgara potom dovodi do smanjenog lučenja serotonina, što posljedično ima utjecaj na silazne projekcije iz kaudalnog rafe područja (98, 114, 124, 157, 158). Stoga je povećani učinak AIHc nakon blokiranja alfa2-adrenoreceptora kaudalnih rafe jezgara na odgovor RSNA, koji je zabilježen u drugoj studiji, moguća posljedica prestanka inhibicije kaudalnih rafe jezgara od strane noradrenergičkih neurona LC-a. S obzirom na rezultate naše studije, može se pretpostaviti da je prestanak inhibicije kaudalnih rafe jezgara vjerojatno doveo do povećanja, kako izravne signalizacije prema IML-u, tako i signalizacije putem drugih područja uključenih u regulaciju simpatičke aktivnosti poput RVLM-a i RTN-a (9, 129). Ta pretpostavka ima uporište i u drugim studijama koje su pokazale kako prestanak inhibicije *raphe pallidus*-a može dovesti do povećanja RSNA te aktivnosti splanhničnoga simpatičkog živca (25, 159).

Johimbin se, u funkciji farmakološkog pripravka, smatra selektivnim antagonistom alfa2-adrenoreceptora. Međutim, dokazano je da johimbin može pokazivati različiti afinitet vezivanja na podvrste alfa2-adrenoreceptora te je poznato da se može vezati i na alfa1-adrenoreceptore (160). S obzirom da su u kaudalnom rafe području prisutni alfa1- i alfa2-adrenoreceptori (134), moguće je da je simpatoekscitacijski učinak zabilježen u drugoj studiji ove doktorske disertacije u određenoj mjeri posljedica podraživanja alfa1-adrenoreceptora. Nadalje, johimbin svoje učinke može ostvarivati i putem drugih receptora, uključujući i 5-HT_{1A} receptore na koje može djelovati kao djelomični agonist (161, 162). S obzirom da se u ovoj doktorskoj disertaciji provodilo mikroubrizgavanje johimbina u područje kaudalnih rafe jezgara, moguće je da se određeni udio johimbina vezao i za 5-HT_{1A} receptore te na taj način

utjecao na opažene obrasce odgovora RSNA. Međutim, s obzirom na mali volumen i koncentraciju korištene otopine johimbina te na njegov 80 puta veći afinitet za alfa2-adrenoreceptore nego za 5HT_{1A} receptore u štakora (162), malo je vjerojatno da je johimbin doveo do značajnih učinaka djelovanjem na 5HT_{1A} receptore u ovom istraživanju.

Johimbin je u ovom istraživanju korišten jer se već dugi niz godina primjenjuje kao prototipski antagonist alfa2-adrenoreceptora u farmakološkim istraživanjima što nam je omogućilo izravnu usporedbu rezultata s rezultatima prijašnjih studija. Međutim, novija istraživanja pokazuju kako je drugi lijek, atipamezol, čak 100 puta selektivniji prema alfa2-adrenoreceptorima te da mu je alfa2:alfa1 omjer selektivnosti čak 200 puta veći u odnosu na johimbin (163, 164). Nadalje, atipamezol pokazuje visok afinitet prema svim podvrstama alfa2-adrenoreceptora, dok je afinitet vezivanja johimbina najveći prema alfa2_A-adrenoreceptorima (163, 164). Također, atipamezol, osim na alfa2-adrenoreceptorski sustav, nema izrazit učinak na druge receptorske sustave. Sve navedeno zasigurno ga čini prikladnijim pripravkom za buduće proučavanje funkcije i uloge alfa2-adrenoreceptora te otvara mogućnost nastavka ovoga istraživanja i usporedbe učinaka johimbina i atipamezola na odgovor RSNA tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.

5.3. Ograničenja istraživanja

U ovoj doktorskoj disertaciji korištene su anestetizirane životinje te se može postaviti pitanje u kolikoj je mjeri sama anestezija imala učinak na simpatičku i respiracijsku aktivnost te njihov međuodnos u opisanim studijama. Poznato je da anestezija može umanjiti respiracijsku aktivnost, posljedično dovodeći do smanjenja pH arterijske krvi i povećanja PaCO₂ (165, 166). Međutim, raspon vrijednosti pH i PaCO₂ zabilježen u obje studije ove doktorske disertacije odgovara vrijednostima koje se smatraju normativnima za anestetizirane štakorske modele (166). Nadalje, dokazano je kako anestezija uretanom u dozama manjim od 1,5 g/kg te putem intraperitonealne primjene, što je u skladu s metodologijom ove doktorske disertacije, ima neznatan učinak na kardiorespiracijsku i simpatičku aktivnost (167). Ono što dodatno čini uretansku anesteziju primjerenom za ovu vrstu istraživanja jest i njen zanemarivi učinak na živčanu signalizaciju općenito te činjenica da refleksi odgovori (posebice periferni kemorefleks) ostaju očuvani, s obzirom da su rezultati studija na anestetiziranim životinjama vrlo slični onima na neanestetiziranim životinjama (48, 116, 118, 159, 167). Konačno, u protokolima ove doktorske disertacije uretan je bio primijenjen u jednoj dozi, a dodatne doze davane su isključivo ukoliko je to bilo potrebno i to prije početka same kirurške pripreme

životinja. Stoga, malo je vjerojatno da su opažene razlike u odgovoru RSNA tijekom izlaganja protokolu akutne ponavljane hiperkapnije između pokusnih skupina rezultat primjene uretana.

Ostaje za razmotriti i moguću aktivaciju serotoninske signalizacije uslijed relativno snažnih izlaganja značajnom hiperkapnijskom podražaju (15% CO₂) koji je korišten u ovoj doktorskoj disertaciji. Moguće je da je taj podražaj doveo do aktivacije puteva koji sudjeluju u regulaciji stanja budnosti (44). Međutim, upravo ovakav dizajn studije koristi se kao model OSA-e te je taj podražaj primjeren i može dovesti do sličnih učinaka onima koji se mogu zamijetiti tijekom epizoda opstrukcije dišnih putova u OSA-i, koje između ostalog dovode i do hiperkapnije te buđenja.

Konačno, do danas nije ustanovljeno koji je primarni podražaj koji aktivira središnje kemoreceptore. Još uvijek se razmatra je li aktivacija središnjih kemoreceptora isključiva posljedica zamijećenih promjena CO₂ ili je možda posljedica drugih fizioloških čimbenika, primjerice vanstaničnog/unutarstaničnog pH, koncentracije bikarbonata ili pak kombinacija svih navedenih podražaja (140, 156). U ovoj doktorskoj disertaciji, korišten je model koji se temelji na izmjeni udjela CO₂ u udahnutoj smjesi, koji u svojoj naravi može dovesti do hiperkapnijske acidoze. Međutim, korištenjem ovakvog *in vivo* pokusa nije moguće definirati primarni podražaj koji aktivira kemoreceptore i dovodi do opaženih promjena u odgovoru renalnoga simpatičkoga živca na akutnu ponavljaju hiperkapniju.

5.4. Znanstveni doprinos disertacije

Simpatički živčani sustav važan je modulator kardiovaskularnog sustava. Povećani simpatički tonus može biti posljedica ponavljanih zastoja disanja, koji su obilježje brojnih poremećaja disanja tijekom spavanja od kojih je najznačajnija OSA. U patofiziologiji OSA-e važnu ulogu ima sinergizam ponavljane hipoksije i hiperkapnije koji dovodi do simpatoekscitacije podraživanjem perifernih i središnjih kemoreceptora. Iako su učinci ponavljane hipoksije i njen utjecaj na razvoj poremećaja autonomnoga živčanog sustava dobro opisani u literaturi, učinak akutne ponavljane hiperkapnije na simpatički živčani sustav i kardiovaskularni sustav još uvijek nije dovoljno istražen. Ovom doktorskom disertacijom razjasnio se učinak akutne ponavljane hiperkapnije na promjene aktivnosti simpatikusa mjerene aktivnošću renalnoga živca. Nadalje, po prvi puta je u animalnom modelu istražen učinak kombinirane hiperkapnije i različitih udjela kisika u udahnutoj smjesi na aktivnost simpatičkog sustava. Zaključno, ova disertacija proširila je dosadašnje znanstvene spoznaje o važnoj ulozi akutne ponavljane hiperkapnije u aktivaciji simpatikusa te učinku modulacije signalizacije posredovane noradrenalinom, mjestu djelovanja i značenju alfa2-adrenoreceptora

u opaženim promjenama aktivnosti simpatikusa. Iako ne možemo govoriti o izravnoj translaciji rezultata ove disertacije na kliničku medicinu, istraženi mehanizmi zasigurno ukazuju na veliki utjecaj akutne hiperkapnije na aktivnost renalnoga živca pa samim time i simpatičkoga živčanog sustava. Ostaje otvorena mogućnost da bi u kliničkoj procjeni, osim standardnog kontinuiranog mjerenja zasićenosti krvi kisikom tijekom spavanja pulsni oksimetrom u bolesnika sa sumnjom na opstruktivnu apneju tijekom spavanja, dodatnu vrijednost moglo dati i neinvazivno kontinuirano mjerenje vrijednosti ugljikova dioksida tijekom spavanja. Takva mjerenja ukazala bi na veličinu i brzinu promjena aktivnosti simpatičkoga živčanog sustava koje dugoročno u nekih bolesnika mogu dovesti do razvoja arterijske hipertenzije te povećati rizik za razvoj kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti u ljudi koji boluju od opstruktivne apneje tijekom spavanja.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Izlaganje akutnoj ponavljanoj hiperkapniji dovodi do povećanja aktivnosti renalnoga simpatičkog živca.
- 2) Veličina odgovora renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljaju hiperkapniju ovisi o intenzitetu hiperkapnijskog podražaja te o udjelu kisika u udahnutoj smjesi.
- 3) Povećani udio kisika u udahnutoj smjesi oslabljuje odgovor renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljaju hiperkapniju u vagotomiranih, mehanički ventiliranih i uretanom anesteziranih štakora.
- 4) Sistemsko blokiranje alfa2-adrenoreceptora intravenskom primjenom johimbina dovodi do povećanog odgovora renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljaju hiperkapniju u vagotomiranih i mehanički ventiliranih štakora anesteziranih uretanom.
- 5) Lokalno mikroubrizgavanje johimbina u područje kaudalnih rafe jezgara dovodi do izraženijih povećanja odgovora renalnoga simpatičkog živca tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hiperkapniji u odnosu na povećanja zabilježena u kontrolnoj skupini u vagotomiranih i mehanički ventiliranih štakora anesteziranih uretanom.
- 6) Neuroni kaudalnog rafe područja mogu značajno pridonijeti renalnom simpatoekscitacijskom odgovoru uslijed izlaganja značajnoj akutnoj ponavljanoj hiperkapniji.
- 7) Ponavljana hiperkapnija mogla bi biti jedan od važnih mehanizama koji mogu dovesti do povećanog simpatičkog tonusa u poremećajima disanja tijekom spavanja.

7. SAŽETAK

Prekomjerna aktivacija simpatikusa ili simpatoekscitacija ima važnu ulogu u patofiziologiji poremećaja disanja tijekom spavanja. Isprekidano disanje tijekom spavanja popraćeno je promjenama parcijalnih tlakova kisika i ugljikova dioksida u arterijskoj krvi koje dovode do ponavljane stimulacije perifernih i središnjih kemoreceptora te posljedično dovode do aktivacije kemorefleksa i promjena simpatičke živčane aktivnosti. Dosadašnja istraživanja bila su većinom usmjerena prema ispitivanju uloge hipoksije u kratkoročnim i dugoročnim promjenama respiracijskog i simpatičkog sustava, dok učinak akutne ponavljane hiperkapnije na kratkoročne promjene aktivnosti simpatikusa do sada nije bio istražen.

Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio ispitati učinak različitih intenziteta hiperkapnijskog podražaja u kombinaciji s različitim udjelima kisika u udahnuтой smjesi na veličinu simpatoekscitacije, mjerene aktivnošću renalnoga simpatičkog živca (RSNA) u štakorskom modelu akutne ponavljane hiperkapnije (AIHc). Nadalje, ovom disertacijom istražena je uloga alfa2-adrenoreceptora kaudalnih rafe jezgara u simpatičkom i kardiovaskularnom odgovoru na AIHc u štakora.

Istraživanje je provedeno na vagotomiranim i mehanički ventiliranim štakorima soja Sprague-Dawley anesteziranih uretanom. U prvoj studiji, svaka pokusna skupina ($n = 7$ /skupini) bila je izložena različitom protokolu AIHc, koji se razlikovao u intenzitetu hiperkapnijskog podražaja i udjelu kisika u udahnuтой smjesi. Srednji arterijski tlak (MAP), srčana frekvencija (HR) i RSNA izmjerene su i analizirane u 7 vremenskih točaka: u početnim uvjetima prije izlaganja pokusnom protokolu, tijekom pet hiperkapnijskih epizoda (svaka trajanja 3 min) te 15 min nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode. Izlaganje značajnoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,15$) dovelo je do povećanja RSNA odgovora koji je bio očuvan tijekom cijelog pokusnog protokola, dok je u skupinama izloženim umjerenoj hiperkapniji ($FiCO_2 = 0,05$) uočena tendencija progresivnog smanjenja veličine odgovora RSNA nakon prve hiperkapnijske epizode. Izlaganje značajnoj hiperkapniji dovelo je do značajno većeg odgovora RSNA u prvoj hiperkapnijskoj epizodi u usporedbi sa skupinama izloženima umjerenoj hiperkapniji. Nadalje, izlaganje AIHc u kombinaciji s hiperoksijom (50% O_2) dovelo je do smanjenja veličine odgovora RSNA u odnosu na izlaganje akutnoj ponavljanoj hiperkapniji u kombinaciji sa sobnim zrakom, kako u skupinama izloženim značajnoj, tako i u skupinama izloženim umjerenoj hiperkapniji.

Među protokolima korištenim u prvoj studiji, ustanovljeno je da značajna akutna ponavljana hiperoksijska hiperkapnija (15% CO_2 + 50% O_2) može aktivirati RSNA, međutim veličina odgovora bila je značajno manja u odnosu na izlaganje istoj u kombinaciji sa sobnim

zrakom, što upućuje na uključenost središnjih mehanizama. Iz tog razloga, u drugoj studiji životinje su bile izložene protokolu AIHc (5 x 3 min, 15% CO₂ + 50% O₂) u kombinaciji s hiperoksijom (50% O₂). Prije izlaganja protokolu AIHc, antagonist alfa2-adrenoreceptora – johimbin primijenjen je intravenski (1 mg/kg, n = 9) ili izravnim mikroubrizgavanjem u područje kaudalnih rafe jezgara (2 mM, n = 12). U kontrolnim skupinama životinja primjenjena je fiziološka otopina intravenski (n = 7) ili u područje kaudalnih rafe jezgara (n = 10) prije izlaganja protokolu AIHc. RSNA, MAP i HR analizirani su prije izlaganja protokolu AIHc (T0), tijekom pet hiperkapnijskih epizoda (THc1-5) i 15 minuta nakon završetka zadnje hiperkapnijske epizode (T15). Nakon intravenske primjene johimbina, odgovor RSNA bio je značajno veći tijekom THc1-5 i u T15 u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$). Mikroubrizgavanje johimbina u kaudalno rafe područje prije izlaganja protokolu AIHc dovelo je do većeg odgovora RSNA tijekom THc1-5 u usporedbi s kontrolnom skupinom (THc1: $138,0 \pm 4,0\%$ vs. $123,7 \pm 4,8\%$, $P = 0,032$; THc2: $137,1 \pm 5,0\%$ vs. $124,1 \pm 4,5\%$, $P = 0,071$; THc3: $143,1 \pm 6,4\%$ vs. $122,0 \pm 4,8\%$, $P = 0,020$; THc4: $146,1 \pm 6,2\%$ vs. $120,7 \pm 5,7\%$, $P = 0,007$ te THc5: $143,2 \pm 7,7\%$ vs. $119,2 \pm 7,2\%$, $P = 0,038$). Za vrijeme THc1-5, HR značajno se smanjio u odnosu na T0 u svim skupinama, dok su promjene MAP-a zabilježene isključivo u skupini koja je johimbin primila intravenski.

Zaključno, rezultati ove doktorske disertacije upućuju da akutna ponavljana hiperkapnija može dovesti do značajnog povećanja aktivnosti renalnoga simpatičkog živca, u ovisnosti o intenzitetu hiperkapnijskog podražaja i o udjelu kisika u udahnuutoj smjesi. Nadalje, blokiranje alfa2-adrenoreceptora johimbinom povećava odgovor renalnoga simpatičkog živca na akutnu ponavljaju hiperkapniju. Konačno, mikroubrizgavanje johimbina u kaudalne rafe jezgre dovelo je do izraženijih povećanja RSNA u odnosu na kontrolnu skupinu te možemo zaključiti da kaudalne rafe jezgre mogu imati važnu ulogu u regulaciji simpatičke živčane aktivnosti tijekom izlaganja AIHc.

8. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY)

The activation of the sympathetic nervous system plays an important role in the pathophysiology of sleep-related breathing disorders. Interrupted breathing is characterized by sudden drops in blood oxygen and rises in blood carbon dioxide leading to repeated stimulation of, both, peripheral and central chemoreceptors, which control the sympathetic nervous activity through the activation of the chemoreflex pathways. Until now, much attention has been directed towards describing the short- and long-term effects of hypoxia on respiratory and sympathetic activity, but the effects of the acute intermittent hypercapnia on short-term changes in sympathetic activity have not been assessed as yet.

Therefore, this dissertation aimed to examine the effects of different levels of hypercapnia in the presence of various background oxygen levels on the magnitude of sympathoexcitation, measured by the renal sympathetic nerve activity (RSNA) in the acute intermittent hypercapnia (AIHc) rat model. Moreover, this dissertation investigated the role of α_2 -adrenergic receptors of the caudal raphe region in the sympathetic and cardiovascular responses to the AIHc in rats.

The research was conducted on urethane-anesthetized, vagotomized and mechanically ventilated Sprague-Dawley rats. In the first study, each experimental group ($n = 7/\text{group}$) was subjected to a distinct AIHc protocol that varied in the applied levels of hypercapnia and background oxygen. Mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and RSNA were analyzed in 7 experimental time points: baseline, five hypercapnic episodes (each lasting 3 min) and 15 minutes following the last hypercapnic episode. Exposure to severe hypercapnia ($\text{FiCO}_2 = 0.15$) evoked an increase in RSNA, which was preserved throughout the protocol, whereas in moderate hypercapnia ($\text{FiCO}_2 = 0.05$) groups there was a trend of progressive diminution of RSNA magnitude following the first hypercapnic episode. Exposure to severe hypercapnia elicited significantly greater RSNA response during the first hypercapnic episode and it was enhanced during subsequent episodes compared to exposure to moderate hypercapnia. Additionally, hyperoxic background (50% O_2) blunted the RSNA response to AIHc compared to room air background, both in severe and moderate hypercapnia groups. Mean arterial blood pressure was preserved throughout the experimental protocol, while HR decreased in all studied groups.

From the protocols used in the first study, we found that severe acute intermittent hyperoxic hypercapnia (15% $\text{CO}_2 + 50\% \text{O}_2$) modestly activates the RSNA, but the magnitude of the response was significantly lower than in a normoxic background, suggesting the involvement of a central mechanism. For that reason, in the second study the animals were

exposed to the AIHc protocol (5 x 3 min, 15% CO₂ + 50% O₂) in a hyperoxic background (50% O₂). Prior to the exposure to AIHc, alpha2-adrenergic receptor antagonist – yohimbine was applied intravenously (1 mg/kg, n = 9) or microinjected into the caudal raphe region (2 mM, n = 12). Control groups of animals received saline intravenously (n = 7) or into the caudal raphe region (n = 10) prior to exposure to AIHc. RSNA, MAP and HR were monitored before exposure to the AIHc protocol (T0), during five hypercapnic episodes (THc1-5) and at 15 minutes following the end of the last hypercapnic episode (T15). Following intravenous administration of yohimbine, RSNA was significantly greater during THc1-5 and at T15 than in the control group ($P < 0.05$). When yohimbine was microinjected into the caudal raphe region, AIHc elicited greater increases in RSNA during THc1-5 when compared to the controls (THc1: $138.0 \pm 4.0\%$ vs. $123.7 \pm 4.8\%$, $P = 0.032$; THc2: $137.1 \pm 5.0\%$ vs. $124.1 \pm 4.5\%$, $P = 0.071$; THc3: $143.1 \pm 6.4\%$ vs. $122.0 \pm 4.8\%$, $P = 0.020$; THc4: $146.1 \pm 6.2\%$ vs. $120.7 \pm 5.7\%$, $P = 0.007$ and THc5: $143.2 \pm 7.7\%$ vs. $119.2 \pm 7.2\%$, $P = 0.038$). During THc1-5, significant decreases in HR from T0 were observed in all groups, while changes in MAP were observed in the group that received yohimbine intravenously.

In conclusion, these findings indicate that acute intermittent hypercapnia evokes increased renal sympathetic nerve activity that is dependent on the severity of hypercapnic exposures and the background oxygen level. Moreover, blockade of the alpha2-adrenergic receptors by yohimbine enhances the renal sympathetic nerve response to the acute intermittent hypercapnia. Finally, microinjections of yohimbine into the caudal raphe region resulted in more pronounced increases in RSNA than in the control group, indicating that the caudal raphe region might have an important role in the regulation of sympathetic outflow during exposure to the AIHc.

9. POPIS LITERATURE

1. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. *Compr Physiol*. 2016;6:1239-78.
2. McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*. 2007;71:78.
3. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:335-46.
4. Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2010;90:513-57.
5. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74:323-64.
6. Loewy AD, Neil JJ. The role of descending monoaminergic systems in central control of blood pressure. *Fed Proc*. 1981;40:2778-85.
7. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res*. 1989;491:156-62.
8. Dempsey B, Le S, Turner A, Bokinić P, Ramadas R, Bjaalie JG, et al. Mapping and analysis of the connectome of sympathetic premotor neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat using a volumetric brain atlas. *Front Neural Circuits*. 2017;11:9.
9. Bago M, Marson L, Dean C. Serotonergic projections to the rostroventrolateral medulla from midbrain and raphe nuclei. *Brain Res*. 2002;945:249-58.
10. Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch*. 2008;455:1119-28.
11. Jacobs BL, Martin-Cora FJ, Fornal CA. Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals. *Brain Res Brain Res Rev*. 2002;40:45-52.
12. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6:254-85.
13. Ramage AG, Villalon CM. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:472-81.

14. Guyenet PG, Stornetta RL, Abbott SB, Depuy SD, Fortuna MG, Kanbar R. Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108:995-1002.
15. Jansen AS, Nguyen XV, Karpitskiy V, Mettenleiter TC, Loewy AD. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science*. 1995;270:644-6.
16. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*. 1992;72:165-229.
17. Lovick TA. The medullary raphe nuclei: a system for integration and gain control in autonomic and somatomotor responsiveness? *Exp Physiol*. 1997;82:31-41.
18. Morrison SF. Medullary raphe neurons in autonomic regulation. U: Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, urednici. *Neural mechanisms of cardiovascular regulation*. Boston, MA: Springer US; 2004. str. 245-64.
19. Allen GV, Cechetto DF. Serotonergic and nonserotonergic neurons in the medullary raphe system have axon collateral projections to autonomic and somatic cell groups in the medulla and spinal cord. *J Comp Neurol*. 1994;350:357-66.
20. Morrison SF. Raphe pallidus excites a unique class of sympathetic preganglionic neurons. *Am J Physiol*. 1993;265:R82-9.
21. Pilowsky PM, Lung MS, Spirovski D, McMullan S. Differential regulation of the central neural cardiorespiratory system by metabotropic neurotransmitters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:2537-52.
22. Coleman MJ, Dampney RA. Powerful depressor and sympathoinhibitory effects evoked from neurons in the caudal raphe pallidus and obscurus. *Am J Physiol*. 1995;268:R1295-302.
23. McCall RB. Evidence for a serotonergically mediated sympathoexcitatory response to stimulation of medullary raphe nuclei. *Brain Res*. 1984;311:131-9.
24. McCall RB. GABA-mediated inhibition of sympathoexcitatory neurons by midline medullary stimulation. *Am J Physiol*. 1988;255:R605-15.
25. Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of

- medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R824-32.
26. Rathner JA, McAllen RM. Differential control of sympathetic drive to the rat tail artery and kidney by medullary premotor cell groups. *Brain Res*. 1999;834:196-9.
 27. Dampney RA, Horiuchi J. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. *Prog Neurobiol*. 2003;71:359-84.
 28. Gibbons CH. Basics of autonomic nervous system function. *Handb Clin Neurol*. 2019;160:407-18.
 29. Spyer KM, Gourine AV. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:2603-10.
 30. Guyenet PG. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol*. 2000;121:147-62.
 31. Thomas GD. Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ*. 2011;35:28-32.
 32. Freet CS, Stoner JF, Tang X. Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. *Auton Neurosci*. 2013;174:8-14.
 33. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010;90:47-112.
 34. Lohmeier TE. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens*. 2001;14:147S-54S.
 35. Nishida Y, Tandai-Hiruma M, Kemuriyama T, Hagisawa K. Long-term blood pressure control: is there a set-point in the brain? *J Physiol Sci*. 2012;62:147-61.
 36. Osborn JW. Hypothesis: set-points and long-term control of arterial pressure. A theoretical argument for a long-term arterial pressure control system in the brain rather than the kidney. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:384-93.
 37. Machado BH. Chemoreflex and sympathoexcitation. U: Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, Uredneci. *Neural mechanisms of cardiovascular regulation*. Boston, MA: Springer US; 2004. str. 31-58.
 38. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes – physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand*. 2003;177:377-84.

39. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012;2:141-219.
40. Prabhakar NR, Peng YJ, Kumar GK, Nanduri J. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr Physiol*. 2015;5:561-77.
41. de Burgh Daly M. Peripheral arterial chemoreceptors and respiratory-cardiovascular Integration. Monograph for the Physiological Society. Oxford, UK: Clarendon Press; 1997. 756 str.
42. Iturriaga R, Del Rio R, Idiaquez J, Somers VK. Carotid body chemoreceptors, sympathetic neural activation, and cardiometabolic disease. *Biol Res*. 2016;49:13.
43. Leonard EM, Salman S, Nurse CA. Sensory processing and integration at the carotid body tripartite synapse: neurotransmitter functions and effects of chronic hypoxia. *Front Physiol*. 2018;9:225.
44. Guyenet PG. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol*. 2014;4:1511-62.
45. Andresen MC, Kunze DL. Nucleus tractus solitarius – gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol*. 1994;56:93-116.
46. Barnett WH, Abdala AP, Paton JF, Rybak IA, Zoccal DB, Molkov YI. Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits. *Exp Neurol*. 2017;287:153-64.
47. Bodineau L, Frugiere A, Marlot D, Wallois F. Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci Lett*. 2000;280:111-4.
48. Takakura AC, Colombari E, Menani JV, Moreira TS. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R501-10.
49. Guyenet PG. The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO₂ homeostasis, and breathing automaticity. *J Appl Physiol* (1985). 2008;105:404-16.
50. Nattie E, Li A. Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol*. 2012;2:221-54.
51. Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol*. 1982;332:1-24.

52. Moreira TS, Takakura AC, Damasceno RS, Falquetto B, Totola LT, Sobrinho CR, i sur. Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:883-9.
53. Richerson GB, Wang W, Hodges MR, Dohle CI, Diez-Sampedro A. Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Exp Physiol.* 2005;90:259-66.
54. Nattie E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol.* 1999;59:299-331.
55. Nattie E, Li A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106:1464-6.
56. Forster HV, Smith CA. Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂/H⁺. *J Appl Physiol (1985).* 2010;108:989-94.
57. Dogas Z, Stuth EA, Hopp FA, McCrimmon DR, Zuperku EJ. NMDA receptor-mediated transmission of carotid body chemoreceptor input to expiratory bulbospinal neurones in dogs. *J Physiol.* 1995;487:639-51.
58. Forster HV, Martino P, Hodges M, Krause K, Bonis J, Davis S, i sur. The carotid chemoreceptors are a major determinant of ventilatory CO₂ sensitivity and of PaCO₂ during eupneic breathing. *Adv Exp Med Biol.* 2008;605:322-6.
59. Day TA, Wilson RJ. A negative interaction between brainstem and peripheral respiratory chemoreceptors modulates peripheral chemoreflex magnitude. *J Physiol.* 2009;587:883-96.
60. Smith CA, Blain GM, Henderson KS, Dempsey JA. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂: role of carotid body CO₂. *J Physiol.* 2015;593:4225-43.
61. Adrian ED, Bronk DW, Phillips G. Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol.* 1932;74:115-33.
62. Machado BH, Zoccal DB, Moraes DJA. Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017;312:R864-72.

63. Moraes DJ, Machado BH, Zoccal DB. Coupling of respiratory and sympathetic activities in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Prog Brain Res.* 2014;212:25-38.
64. Mandel DA, Schreihof AM. Central respiratory modulation of barosensitive neurones in rat caudal ventrolateral medulla. *J Physiol.* 2006;572:881-96.
65. McAllen RM. Central respiratory modulation of subretrofacial bulbospinal neurones in the cat. *J Physiol.* 1987;388:533-45.
66. Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36:1188-96.
67. Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH, Rybak IA. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol.* 2011;105:3080-91.
68. Habler HJ, Janig W, Michaelis M. Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones. *Prog Neurobiol.* 1994;43:567-606.
69. Ziakas A, Gossios T, Doulas M, Karali K, Megarisiotou A, Stiliadis I. The pathophysiological basis of renal nerve ablation for the treatment of hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12:23-9.
70. DiBona GF. Physiology in perspective: the wisdom of the body. Neural control of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R633-41.
71. Nishi EE, Bergamaschi CT, Campos RR. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. *Exp Physiol.* 2015;100:479-84.
72. Burgess DE, Hundley JC, Li SG, Randall DC, Brown DR. Multifiber renal SNA recordings predict mean arterial blood pressure in unanesthetized rat. *Am J Physiol.* 1997;273:R851-7.
73. Igaya K, Muller-Ribeiro FC, Horiuchi J, McDowall LM, Nalivaiko E, Fontes MA, et al. Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303:R599-610.

74. Sata Y, Head GA, Denton K, May CN, Schlaich MP. Role of the sympathetic nervous system and its modulation in renal hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:82.
75. Solano-Flores LP, Rosas-Arellano MP, Ciriello J. Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. *Brain Res*. 1997;753:102-19.
76. Johns EJ, Kopp UC, DiBona GF. Neural control of renal function. *Compr Physiol*. 2011;1:731-67.
77. Fisher JP, Young CN, Fadel PJ. Central sympathetic overactivity: maladies and mechanisms. *Auton Neurosci*. 2009;148:5-15.
78. Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *Am J Hypertens*. 2010;23:1052-60.
79. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DA. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17:217-22.
80. Mann SJ. Neurogenic hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. *Clin Auton Res*. 2018;28:363-74.
81. Schultz HD, Li YL, Ding Y. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. *Hypertension*. 2007;50:6-13.
82. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation scientific statement from the American Heart Association Council for high blood pressure research professional education committee, Council on clinical cardiology, Stroke council, and Council on cardiovascular nursing. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:686-717.
83. Mifflin S, Cunningham JT, Toney GM. Neurogenic mechanisms underlying the rapid onset of sympathetic responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2015;119:1441-8.
84. Fletcher EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol*. 2000;119:189-97.

85. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin JL, i sur. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J.* 2009;50:262-81.
86. Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, 3rd, Stauss H, Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72:1978-84.
87. Bakehe M, Miramand JL, Chambille B, Gaultier C, Escourrou P. Cardiovascular changes during acute episodic repetitive hypoxic and hypercapnic breathing in rats. *Eur Respir J.* 1995;8:1675-80.
88. Dick TE, Hsieh YH, Wang N, Prabhakar N. Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol.* 2007;92:87-97.
89. Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10073-8.
90. Xing T, Pilowsky PM. Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. *J Physiol.* 2010;588:3075-88.
91. Xing T, Pilowsky PM, Fong AY. Mechanism of sympathetic activation and blood pressure elevation in humans and animals following acute intermittent hypoxia. *Prog Brain Res.* 2014;209:131-46.
92. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, i sur. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol.* 2008;586:3253-65.
93. Weiss JW, Liu MD, Huang J. Physiological basis for a causal relationship of obstructive sleep apnoea to hypertension. *Exp Physiol.* 2007;92:21-6.
94. Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Valic M, Dogas Z. Acute intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation which is modulated by 5-HT_{1A} receptor in the caudal raphe region of the rat. *J Sleep Res.* 2012;21:195-203.
95. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. Role of 5-HT_{1A} receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;175:146-52.

96. Pecotic R, Dogas Z, Valic Z, Valic M. Blockade of 5-HT_{1A} receptors in the phrenic nucleus of the rat attenuated raphe induced activation of the phrenic nerve activity. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60:167-72.
97. Stipica I, Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Dogas Z, Valic Z, Valic M. Periodicity during hypercapnic and hypoxic stimulus is crucial in distinct aspects of phrenic nerve plasticity. *Physiol Res.* 2016;65:133-43.
98. Stipica Safic I, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Dogas Z, Valic Z, Valic M. Phrenic long-term depression evoked by intermittent hypercapnia is modulated by serotonergic and adrenergic receptors in raphe nuclei. *J Neurophysiol.* 2018;120:321-9.
99. Valic M, Pecotic R, Dogas Z. Phrenic nerve activity is enhanced by 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT in spontaneously breathing anesthetized rats. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59:17-25.
100. Valic M, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Valic Z, Stipica I, Dogas Z. Intermittent hypercapnia-induced phrenic long-term depression is revealed after serotonin receptor blockade with methysergide in anaesthetized rats. *Exp Physiol.* 2016;101:319-31.
101. Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Valic Z, Peros K, Dogas Z. Microinjection of methysergide into the raphe nucleus attenuated phrenic long-term facilitation in rats. *Exp Brain Res.* 2010;202:583-9.
102. Leuenberger UA, Brubaker D, Quraishi SA, Hogeman CS, Imadojemu VA, Gray KS. Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. *Auton Neurosci.* 2005;121:87-93.
103. Xie A, Skatrud JB, Puleo DS, Morgan BJ. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2001;91:1555-62.
104. Schwarz EI. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea in different study models and novel perspectives. *Curr Opin Pulm Med.* 2019;25:614-22.
105. Makeham JM, Goodchild AK, Costin NS, Pilowsky PM. Hypercapnia selectively attenuates the somato-sympathetic reflex. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;140:133-43.
106. Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, Hayashida Y. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci.* 2005;117:105-14.

107. Jouett NP, Watenpaugh DE, Dunlap ME, Smith ML. Interactive effects of hypoxia, hypercapnia and lung volume on sympathetic nerve activity in humans. *Exp Physiol*. 2015;100:1018-29.
108. Rose CE, Jr., Kimmel DP, Godine RL, Jr., Kaiser DL, Carey RM. Synergistic effects of acute hypoxemia and hypercapnic acidosis in conscious dogs. Renal dysfunction and activation of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 1983;53:202-13.
109. Somers VK, Mark AL, Zavala DC, Abboud FM. Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. *J Appl Physiol* (1985). 1989;67:2101-6.
110. Takakura AC, Moreira TS. Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. *Exp Physiol*. 2011;96:989-99.
111. Andrzejewski K, Budzinska K, Kaczynska K. Effect of 6-OHDA on hypercapnic ventilatory response in the rat model of Parkinson's disease. *Physiol Res*. 2019;68:285-93.
112. Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:449-61.
113. Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS. Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol*. 2001;129:25-35.
114. Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS. Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130:207-18.
115. Huang J, Lusina S, Xie T, Ji E, Xiang S, Liu Y, i sur. Sympathetic response to chemostimulation in conscious rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;166:102-6.
116. Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J Physiol*. 2006;577:369-86.

117. Fukuda Y, Sato A, Suzuki A, Trzebski A. Autonomic nerve and cardiovascular responses to changing blood oxygen and carbon dioxide levels in the rat. *J Auton Nerv Syst.* 1989;28:61-74.
118. Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* (1985). 1999;86:298-305.
119. Hirakawa H, Nakamura T, Hayashida Y. Effect of carbon dioxide on autonomic cardiovascular responses to systemic hypoxia in conscious rats. *Am J Physiol.* 1997;273:R747-54.
120. Sabino JP, Oliveira M, Giusti H, Glass ML, Salgado HC, Fazan R, Jr. Hemodynamic and ventilatory response to different levels of hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68:395-9.
121. Shirahata M, Nishino T, Honda Y, Itoh K, Yonezawa T. Effects of hypercapnia on renal nerve activity. *Jpn J Physiol.* 1985;35:391-9.
122. Brofman JD, Leff AR, Munoz NM, Kirchhoff C, White SR. Sympathetic secretory response to hypercapnic acidosis in swine. *J Appl Physiol* (1985). 1990;69:710-7.
123. Kristen AV, Just A, Haass M, Seller H. Central hypercapnic chemoreflex modulation of renal sympathetic nerve activity in experimental heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2002;97:177-86.
124. Bach KB, Mitchell GS. Hypercapnia-induced long-term depression of respiratory activity requires α_2 -adrenergic receptors. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84:2099-105.
125. Burgraff NJ, Neumueller SE, Buchholz KJ, LeClaire J, Hodges MR, Pan L, i sur. Brainstem serotonergic, catecholaminergic, and inflammatory adaptations during chronic hypercapnia in goats. *FASEB J.* 2019;33:14491-505.
126. Garcia de Yebenes Prous J, Carlsson A, Mena Gomez MA. The effect of CO₂ on monoamine metabolism in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1977;301:11-5.
127. Stone EA. Rapid adaptation of the stimulatory effect of CO₂ on brain norepinephrine metabolism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1983;324:313-5.

128. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, i sur. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci*. 2008;28:2495-505.
129. Leirao IP, Colombari DSA, da Silva GSF, Zoccal DB. Lesion of serotonergic afferents to the retrotrapezoid nucleus impairs the tachypneic response to hypercapnia in unanesthetized animals. *Neuroscience*. 2021;452:63-77.
130. Messier ML, Li A, Nattie EE. Inhibition of medullary raphe serotonergic neurons has age-dependent effects on the CO₂ response in newborn piglets. *J Appl Physiol* (1985). 2004;96:1909-19.
131. Nattie EE, Li A, Richerson GB, Richerson G, Lappi DA. Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J Physiol*. 2004;556:235-53.
132. Guyenet PG, Stornetta RL, Riley T, Norton FR, Rosin DL, Lynch KR. Alpha 2A-adrenergic receptors are present in lower brainstem catecholaminergic and serotonergic neurons innervating spinal cord. *Brain Res*. 1994;638:285-94.
133. Jones BE, Yang TZ. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol*. 1985;242:56-92.
134. Unnerstall JR, Kopajtic TA, Kuhar MJ. Distribution of alpha 2 agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain research*. 1984;319:69-101.
135. DiBona GF, Jones SY, Sawin LL. Chaotic behavior of renal sympathetic nerve activity: effect of baroreceptor denervation and cardiac failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F491-501.
136. Miki K, Kosho A, Hayashida Y. Method for continuous measurements of renal sympathetic nerve activity and cardiovascular function during exercise in rats. *Exp Physiol*. 2002;87:33-9.
137. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4. izdanje. San Diego, CA: Academic Press; 1998. 256 str.

138. Papp H, Sarusi A, Farkas AS, Takacs H, Kui P, Vincze D, i sur. Hyperventilation assists proarrhythmia development during delayed repolarization in clofilium-treated, anaesthetized, mechanically ventilated rabbits. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67:731-7.
139. Angell-James JE, Clarke JA, de Burgh Daly M, Taton A. Role of the carotid body chemoreceptors in the conscious renal hypertensive rabbit. *Acta Physiol Pol.* 1985;36:38-41.
140. Wang W, Bradley SR, Richerson GB. Quantification of the response of rat medullary raphe neurones to independent changes in pH_o and PCO_2 . *J Physiol.* 2002;540:951-70.
141. Ferreira CB, Cravo SL, Stocker SD. Airway obstruction produces widespread sympathoexcitation: role of hypoxia, carotid chemoreceptors, and NTS neurotransmission. *Physiol Rep.* 2018;6.
142. Hoka S, Arimura H, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Regional venous outflow, blood volume, and sympathetic nerve activity during hypercapnia and hypoxic hypercapnia. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992;70:1032-9.
143. Zimna A, Wiernicki B, Kolanowski T, Malcher A, Rozwadowska N, Labedz W, i sur. Influence of hypoxia prevailing in post-infarction heart on proangiogenic gene expression and biological features of human myoblast cells applied as a pro-regenerative therapeutic tool. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69:859-74.
144. Nemeth J, Toth-Szuki V, Varga V, Kovacs V, Remzso G, Domoki F. Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Physiol Pharmacol.* 2016;67:677-89.
145. Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:447-9.
146. Farnham MMJ, Tallapragada VJ, O'Connor ET, Nedoboy PE, Dempsey B, Mohammed S, i sur. PACAP-PAC1 receptor activation is necessary for the sympathetic response to acute intermittent hypoxia. *Front Neurosci.* 2019;13:881.
147. Bavis RW, Millstrom AH, Kim SM, MacDonald CA, O'Toole CA, Asklof K, i sur. Combined effects of intermittent hyperoxia and intermittent hypercapnic hypoxia on respiratory control in neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2019;260:70-81.

148. Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol*. 1997;388:169-90.
149. Smit B, Smulders YM, Eringa EC, Oudemans-van Straaten HM, Girbes ARJ, Wever KE, i sur. Effects of hyperoxia on vascular tone in animal models: systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2018;22:189.
150. Smit B, Smulders YM, van der Wouden JC, Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AME. Hemodynamic effects of acute hyperoxia: systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2018;22:45.
151. Flemming B, Seeliger E, Wronski T, Steer K, Arenz N, Persson PB. Oxygen and renal hemodynamics in the conscious rat. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:18-24.
152. Pijacka W, Katayama PL, Salgado HC, Lincevicius GS, Campos RR, McBryde FD, i sur. Variable role of carotid bodies in cardiovascular responses to exercise, hypoxia and hypercapnia in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol*. 2018;596:3201-16.
153. Lin YH, Liu YP, Lin YC, Lee PL, Tung CS. Cooling-evoked hemodynamic perturbations facilitate sympathetic activity with subsequent myogenic vascular oscillations via alpha2-adrenergic receptors. *Physiol Res*. 2017;66:449-57.
154. Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:R287-95.
155. Hubbard JW, Pfister SL, Biediger AM, Herzig TC, Keeton TK. The pharmacokinetic properties of yohimbine in the conscious rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1988;337:583-7.
156. Guyenet PG, Stornetta RL, Souza G, Abbott SGB, Shi Y, Bayliss DA. The retrotrapezoid nucleus: central chemoreceptor and regulator of breathing automaticity. *Trends Neurosci*. 2019;42:807-24.
157. Dobbins EG, Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol*. 1994;347:64-86.
158. Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277:861-71.

159. Morrison SF. RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1999;276:R962-73.
160. Goldberg MR, Robertson D. Yohimbine: a pharmacological probe for study of the alpha 2-adrenoreceptor. *Pharmacol Rev.* 1983;35:143-80.
161. Winter JC, Rabin RA. Yohimbine as a serotonergic agent: evidence from receptor binding and drug discrimination. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:682-9.
162. Zaretsky DV, Zaretskaia MV, DiMicco JA, Rusyniak DE. Yohimbine is a 5-HT_{1A} agonist in rats in doses exceeding 1 mg/kg. *Neurosci Lett.* 2015;606:215-9.
163. Haapalinna A, Viitamaa T, MacDonald E, Savola JM, Tuomisto L, Virtanen R, i sur. Evaluation of the effects of a specific alpha 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor subtype binding, brain neurochemistry and behaviour in comparison with yohimbine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;356:570-82.
164. Pertovaara A, Haapalinna A, Sirvio J, Virtanen R. Pharmacological properties, central nervous system effects, and potential therapeutic applications of atipamezole, a selective alpha2-adrenoceptor antagonist. *CNS Drug Rev.* 2005;11:273-88.
165. Brun-Pascaud M, Gaudebout C, Blayo MC, Pocidal JJ. Arterial blood gases and acid-base status in awake rats. *Respir Physiol.* 1982;48:45-57.
166. Subramanian RK, Sidharthan A, Maneksh D, Ramalingam L, Manickam AS, Kanthakumar P, i sur. Normative data for arterial blood gas and electrolytes in anesthetized rats. *Indian J Pharmacol.* 2013;45:103-4.
167. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia.* 1986;42:109-14.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: **Katarina Madirazza**
Adresa: Zavod za neuroznanost
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Šoltanska 2, 21000 Split
Telefon: +385 21 557 800
E-pošta: kmadirazza@yahoo.com
Datum i mjesto rođenja: 22. ožujka 1984. u Splitu
Državljanstvo: hrvatsko, kanadsko

Obrazovanje

Doktorandica 2014.- Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Doktorska škola “Translacijska istraživanja u biomedicini”
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Renata Pecotić, dr. med.

MSc in Biomedicine 2012. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Španjolska
(Master Universitario en Laboratorio de Analisis Clinicos)
Prosjeck ocjena: 8,83/10
Master’s thesis: “Anti-HLA DQ antibody study in renal transplant recipients”

Magistra inženjerka 2010. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora
biologije i ekologije mora
Prosjeck ocjena: 4,578/5
Diplomski rad: “Procjena ekološkog statusa priobalnih voda šireg područja Splita pomoću zajednica morske cvjetnice Posidonia oceanica (L.) Delile”

Opća gimnazija 2003. Central Commerce Collegiate, Toronto, Kanada
2002. Jarvis Collegiate Institute, Toronto, Kanada

Stručna usavršavanja

2016. EMBO tečaj “Napredna optička mikroskopija”
Europska organizacija za molekularnu biologiju, MBL, Plymouth, UK

2015. Tečaj “Znanost o laboratorijskim životinjama”
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, RH

Nastavne aktivnosti

- Asistentica na Katedri za neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu od 2016. godine
- Vanjska suradnica na Katedri za znanstvenu metodologiju i Katedri za neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru od 2017. godine

Znanstveni i stručni projekti

2019. Internacionalizacija studijskih programa svih razina na Medicinskom fakultetu u Splitu, Europski socijalni fond, Operativni program „Učinkoviti ljudski potencijali 2014.–2020.“, (kod projekta: UP.03.1.1.02.0035) – suradnik
- 2017.-2020. Translacijsko istraživanje neuroplastičnosti disanja i učinka intermitentne hipoksije u anesteziji i spavanju – TIHO2_SLEEP_BREATH, HRZZ istraživački projekti – suradnik
- 2014.-2016. Jačanje kapaciteta Sveučilišta u Splitu za istraživanje, razvoj i inovacije u području medicinske neuroelektronike – STRIPmed, EU strukturni fondovi (kod projekta: RC.2.2.08-059) – suradnik
2014. Europska noć istraživača – Cro-EU-reka, Obzor 2020 MSCA – projektna asistentica
2014. Jačanje znanstveno-poslovne suradnje u području intraoperativne neurofiziologije u Hrvatskoj - CortexSTIM, IPA IIIC – projektna asistentica
2013. Auditorna neuro-elektronička sučelja – AudNes, POC-BICRO – suradnik
2013. Noć istraživača – NLO, FP7 MSCA – projektna asistentica
2012. Monitorización humoral tras modificación del tratamiento inmunosupresor en paciente trasplantado renal y cardíaco – MOMO (*Humoral monitoring after immunosuppressive treatment modification in kidney and heart transplantation – MOMO study*), Fondo de Investigación en Salud – suradnik
2012. Monitorización de la respuesta inmune humoral y celular en el trasplante renal y su correlación clínica (*Monitoring humoral and cell immune response in renal transplantation and clinical correlation*), Fondo de Investigación en Salud (FIS PI 10/01370) – suradnik

PUBLIKACIJE

Izvorni znanstveni radovi

- 1) Madirazza K, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Valic M, Dogas Z. Blockade of α 2-adrenergic receptors in the caudal raphe region enhances the renal sympathetic nerve activity response to acute intermittent hypercapnia in rats. *Physiol Res*. 2022. doi: 10.33549/physiolres.934717.
- 2) Đogaš Z, Lušić Kalcina L, Pavlinac Dodig I, Demirović S, Madirazza K, Valić M, Pecotić R. The effect of COVID-19 lockdown on lifestyle and mood in Croatian general population: a cross-sectional study. *Croat Med J*. 2020;61:309-18.

3) Madirazza K, Pecotic R, Pavlinac Dodig I, Valic M, Dogas Z. Hyperoxia blunts renal sympathetic nerve activity response to acute intermittent hypercapnia in rats. J Physiol Pharmacol. 2019;70:737-46.

4) Repic T, Madirazza K, Bektur E, Sapunar D. Characterization of dorsal root ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates. Sci Rep. 2016;6:39560.

Radovi u zbornicima

1) Pecotić R, Pavlinac Dodig I, Lušić Kalcina L, Demirović S, Madirazza K, Valić M, Đogaš Z. The COVID-19 lockdown induced changes in sleep habits among Croatian general population. 8. Hrvatski kongres neuroznanosti, Zagreb (virtualni kongres, rujan 2021.)

2) Madirazza K, Đogaš Z, Pavlinac Dodig I, Valić M, Pecotić R. The effects of acute intermittent hypercapnia at different background oxygen concentrations on renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in rats. 7. Hrvatski kongres neuroznanosti, Zadar (rujan 2019.)

3) Kraljević I, Madirazza K, Valić M, Đogaš Z, Pecotić R. The effect of α -2 adrenergic receptors blockade on renal sympathetic nerve activity (RSNA) during exposure to acute intermittent hypoxia (AIH) in rats. NeuRi kongres 2018, Rijeka (travanj 2018.)

4) Madirazza K, Pecotić R, Valić M, Valić Z, Đogaš Z. Increased respiratory drive suppresses renal sympathetic nerve activity in rats exposed to acute intermittent hypoxia. 6. Hrvatski kongres neuroznanosti, Osijek (rujan 2017.)

5) Repic T, Madirazza K, Bektur E, Sapunar D. Characterization of Dorsal Root Ganglion Neurons Cultured on Silicon MicroPillar Substrates. 16th World Congress on Pain, Yokohama, Japan (rujan 2016.)

6) Crespo M, Mas V, Torío A, Madirazza K, Pérez-Saez M, Mir M, Soler MJ, Puig JM, Pascual J. Impacto clínico de los anticuerpos donante-específicos HLA Clase II pretrasplante renal detectados con técnicas de fase sólida, 12 Congreso Societat Catalana de Trasplantament, Barcelona, Španjolska (ožujak 2013.)

7) Crespo M, Torío A, Guerra R, Mas V, Pérez-Valentín MA, Madirazza K, Pérez-Saez MJ, Mir M, Checa MD, Pascual J. Significado de la capacidad para fijar C1q de los anticuerpos donante-específicos pretrasplante detectados por Luminex, 12 Congreso Societat Catalana de Trasplantament, Barcelona, Španjolska (ožujak 2013.)

8) Crespo M, Mas V, Torío A, Madirazza K, Pérez-Saez M, Mir M, Soler MJ, Puig JM, Pascual J. Anticuerpos donante-específicos HLA clase II pretrasplante renal detectados con técnicas de fase sólida y trascendencia clínica, XLII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, Maspalomas, Španjolska (listopad 2012.)

9) Crespo M, Torío A, Guerra R, Mas V, Pérez-Valentín MA, Madirazza K, Pérez-Saez MJ, Mir M, Checa MD, Pascual J. Significado clínico de los anticuerpos donante-específicos pretrasplante detectados por Luminex capaces de fijar C1q, XLII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología, Maspalomas, Španjolska (listopad 2012.)

Strani jezici

Engleski jezik razumijevanje, govor i pisanje – stupanj C2 (*Zajednički europski referentni okvir za jezike)

Španjolski jezik razumijevanje i govor – stupanj B1, pisanje – stupanj A2 (*Zajednički europski referentni okvir za jezike)

Članstvo u stručnim udruženjima

2019.- članica Hrvatskog društva za neuroznanost

2017.- članica Hrvatskog somnološkog društva-Društva za medicinu spavanja

Priznanja i nagrade

- Nagrada za najbolji poster – 6. Hrvatski kongres neuroznanosti, Osijek, rujan 2016.
- Priznanja za akademska postignuća („*Honour Roll*“) od 10.-13. razreda u školama Jarvis Collegiate Institute i Central Commerce Collegiate, Toronto, Kanada, 1999.-2003.
- Priznanje „*Chem13 Contest*“ za rang u 76. percentili, Toronto, Kanada, 2002.
- Nagrada „*Spanish (novice)*“, Toronto, Kanada, 2001.
- Priznanje „*Cayley Math Contest Certificate of Distinction*“, Toronto, Kanada, 2000.
- Priznanje „*Fermat Math Contest Certificate of Distinction*“, Toronto, Kanada, 2000.
- Brojne medalje u odbojci, višestruki MVP (najkorisniji igrač) odbojkaških turnira (2002.-2003.), nagrada za sportaša mjeseca škole Central Commerce Collegiate, Toronto, Kanada (prosinac 2002.)