

# Uloga receptora 5HT1a i 5HT2a unutar preBotzingerova kompleksa i ventalne respiracijske grupe u postizanju respiracijskog odgovora na sistemsku primjenu selektivnih agonista serotonina

---

Radočaj, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:715647>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Tomislav Radočaj

Uloga receptora 5HT1a i 5HT2a unutar  
preBotzingerova kompleksa i ventralne  
respiracijske grupe u postizanju respiracijskog  
odgovora na sistemsku primjenu selektivnih  
agonista serotonina

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u laboratoriju odjela za anesteziologiju Zablocki VA Medical Center u gradu Milwaukee-u u državi Wisconsin, Sjedinjene Američke Države.

Mentor rada: prof. dr. sc. Mladen Perić, dr.med.

Voditelj istraživanja bio je Edward J. Zuperku, PhD kojemu, kao i svim suradnicima u laboratoriju zahvaljujem na pomoći, smjernicama u istraživanju i objavljivanju rada. Mentoru rada, prof.dr.sc. Mladenu Periću, dr.med. sa Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC-a Zagreb, zahvaljujem na potpori i pruženoj mogućnosti rada u Sjedinjenim Američkim Državama. Dr.sc. Marku Severu, dr.med. s Klinike za kirurgiju KB „Sveti Duh“, zahvaljujem na savjetima pri izradi ove dizertacije. Sestri Martini, obitelji i prijateljima zahvaljujem na pruženoj podršci. Željku Vargi naročito zahvaljujem na bezuvjetnoj podršci u životu, strpljenju, vjeri u moj uspjeh te velikoj pomoći pri izradi ove dizertacije.

*Također, ovu dizertaciju posvećujem svojim pokojnim roditeljima Mirjani i Željku koji su zaslužni za sve što jesam.*

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. HIPOTEZA.....   | 4  |
| 3. CILJEVI RADA.....   | 4  |
| 3.1. Opći cilj.....  | 4  |
| 3.2. Specifični ciljevi.....   | 4  |
| 4. METODE I PROTOKOLI.....   | 5  |
| 4.1. Kirurška metoda.....  | 5  |
| 4.2. Prikupljanje podataka i metoda mikroinjektiranja.....   | 8  |
| 4.3. Lokalizacija pBC kompleksa.....   | 10 |
| 4.4. Protokoli.....  | 12 |
| 4.4.1. Protokol 1: Odgovor pojedinačnih respiratornih neurona unutar pBC kompleksa na pikoinjektiranje 8OH-DPAT i DOI.....               | 12 |
| 4.4.2. Protokol 2: Učinak mikroinjektiranja 8OH-DPAT, DOI i 5HT duž VRC-a, uključujući i pBC kompleks, na aktivnost freničnog živca..... | 12 |
| 4.4.3. Protokol 3: Učinak sistemske (intravenske tj. IV) aplikacije 8OH-DPAT i DOI na aktivnost freničnog živca.....                     | 13 |
| 4.5. Statistička analiza.....  | 14 |
| 5. REZULTATI.....  | 15 |
| 5.1. Protokol 1: Odgovor pojedinačnih respiratornih neurona unutar pBC kompleksa na pikoinjektiranje 8OH-DPAT i DOI.....                 | 15 |
| 5.2. Protokol 2: Učinak mikroinjektiranja 8OH-DPAT, DOI i 5HT duž VRC, uključujući i pBC kompleks na aktivnost freničnog živca.....      | 19 |
| 5.3. Protokol 3: Učinak sistemske (intravenske, tj. IV) aplikacije 8OH-DPAT i DOI na aktivnost freničnog živca.....                      | 24 |
| 6. RASPRAVA.....   | 28 |
| 6.1. 5HT <sub>1A</sub> receptori na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa.....  | 28 |
| 6.2. 5HT <sub>2A</sub> receptori na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa.....  | 30 |
| 6.3. Utjecaj neurona unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) u odgovoru na sistemske (IV) primjenu 5HT agonista.....                   | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 6.4. Mogući mehanizmi zbog kojih je mikroinjektiranje 8OH-DPAT u VRC bez učinka..... | 33 |
| 6.5. Druge lokacije.....   | 34 |
| 6.6. Razlike u vrstama.....  | 36 |
| 7. ZAKLJUČAK .....   | 37 |
| 8. POPIS LITERATURE.....   | 38 |
| 9. SAŽETAK.....  | 46 |
| 10. ABSTRACT .....   | 48 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....  | 50 |

## KRATICE

5HT - 5-hidroksitriptamin, serotonin

5HT<sub>1A</sub> = 5HT1a – vrsta serotoniniskih receptora

5HT<sub>2A</sub> = 5HT2a – vrsta serotoniniskih receptora

8-OHDPAT - 8-hidroksi-2-(di-n-propilamin) tetralin

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CTH - Cycle-triggered histogram

DOI - (±)-1-(2,5-dimetoksi-4-jodofenil)-2-aminopropan hidroklorid

f<sub>B</sub> - frekvencija disanja

F<sub>n</sub> – frekvencija neurona

IHMN - inspiratorni motoneuron hipoglosnog živca

NTS - *nucleus tractus solitarii*

pBC - preBötzinger kompleks

PNG - neurogram freničnog živca

PPA - vršne aktivnosti freničnog živca

RTN - *nucleus retrotrapezoideus*

T<sub>E</sub> – vrijeme ekspirija (izdaha)

T<sub>I</sub> - vrijeme inspirija (udaha)

VRC - ventralna respiratorna grupa

## 1. UVOD

Serotonin (*5-hidroksitriptamin*, *5HT*) ima ključnu ulogu u modulaciji disanja djelovanjem na različite podtipove 5HT receptora.<sup>(18)</sup> To je posebno vidljivo pri sistemskom davanju agonista 5HT<sub>1A</sub> receptora što rezultira ubrzanim disanjem.<sup>(11, 12, 55)</sup> Posebno je poraslo zanimanje za agoniste 5HT<sub>1A</sub> receptora zbog moguće prevencije ili reverzije depresije disanja uzrokovane opioidima, no istovremeno bez utjecaja na analgetski učinak opioida.<sup>(9, 14, 39, 40, 49, 55)</sup> Jedan od mogućih mehanizama sprječavanja depresije disanja agonistima serotonina je iskorištavanje međudnosa unutarstaničnih signalnih putova zajedničkih  $\mu$ -opioidnim te serotoninskim i noradrenergickim receptorima zbog činjenice da  $\mu$ -opioidi djeluju na respiratorne neurone preko G-proteinskih receptora uzrokujući inhibiciju adenilat ciklaze i smanjenje koncentraciju cAMP-a u stanicama. Sistemska primjena agonista 5HT<sub>4A</sub> receptora<sup>(39)</sup> i antagonist  $\alpha_2$ -adrenergičkih receptora,<sup>(62)</sup> koji povećavaju koncentraciju cAMP-a u stanicama, dovodi do djelomične reverzije opioidima uzrokovane depresije disanja, bez utjecaja na njihov analgetski učinak. Nadalje, drugi mogući mehanizam sprječavanja depresije disanja koristi međudnos neurona unutar respiratorne mreže na kojima su 5HT<sub>1A</sub> receptori izraženi postsinaptički, a čijom aktivacijom dolazi do inhibicije stvaranja cAMP-a. Pokazalo se kako selektivni agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora 8-hidroksi-2-(di-n-propilamin) tetralin (8-OH-DPAT) dovodi do reverzije opioidima uzrokovane depresije disanja u štakora.<sup>(14, 55)</sup> Drugi selektivni agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora, *repinutan hidroklorid*, ranije ispitan na ljudima također dovodi do prevencije i reverzije opioidima uzrokovane depresije disanja u anestetiziranih štakora.<sup>(15, 16)</sup> Nedavno se pokazalo kako Befiradol, izrazito selektivan agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora, dovodi do reverzije fentanilom uzrokovane depresije disanja, međutim uzrokuje i smanjenje njegovog analgetskog učinka.<sup>(53)</sup> Sva su navedena istraživanja pokazala kako sistemski primjenjeni (intravenski tj. IV) agonisti 5HT<sub>1A</sub> receptora, ubrzavaju disanje, no mehanizmi tog učinka kao i anatomsko mjesto djelovanja ostali su nepoznati. S obzirom na brojne provedene imunohistokemijske analize koje su pokazale prisutnost receptora biogenih amina kao i  $\mu$ -opioidnih receptora,<sup>(39, 40, 48)</sup> te temeljem in vitro farmakoloških studija,<sup>(13)</sup> smatra se kako je mjesto djelovanja serotonina na modulaciju disanja preBötzingera (pBC) kompleks (*slika 1*). Međutim, prilikom mikroinjektiranja 50  $\mu$ M 8OH-DPAT na

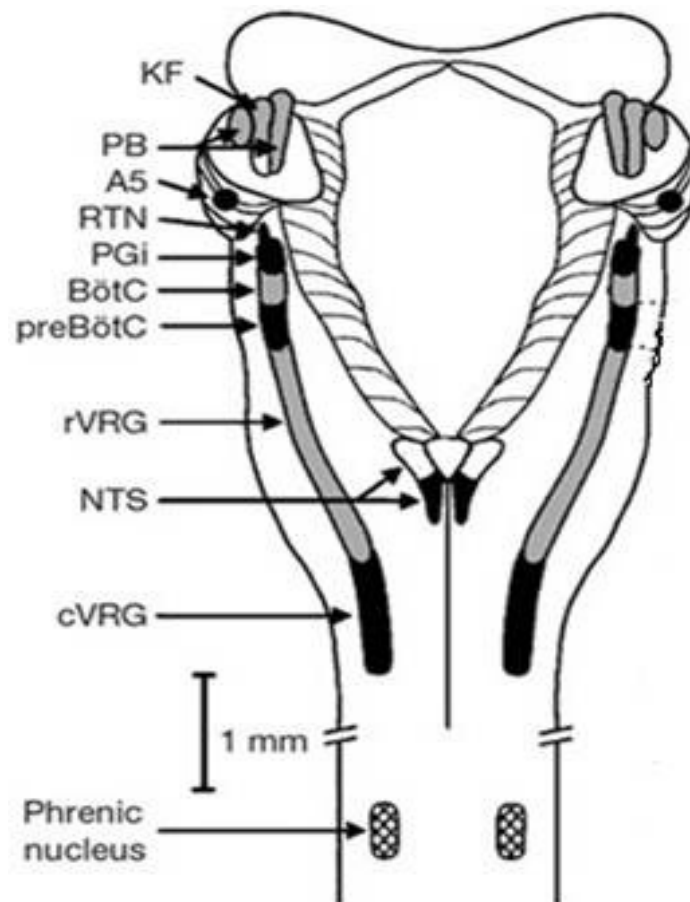
grupu respiratornih neurona unutar pBC kompleksa u anesteziranih mačaka uzrokovalo je apneju.<sup>(54)</sup> Nadalje, neuroanatomske studije su pokazale kako postoje brojne projekcije serotoninskih neurona iz *nucleus raphe obscurus* prema mjestima povezanim s kontrolom disanja u produženoj moždini (*medulla oblongata*) i mostu (*pons*). Istim studijama pronađena su 5HT imunoreaktivna vlakna u *nucleus tractus solitarii* (NTS), *nucleus ambiguus*, *nucleus retrotrapezoideus* (RTN), pBC, kao i jezgri *n. hypoglossus* (hipoglosni živac) i *n. phrenicus* (frenični živac).<sup>(22, 23, 24, 25, 26, 30 50, 63)</sup> Prema nedavnim opsežnim istraživanjima *nucleus retrotrapezoideus* (RTN) sadrži grupu neurona za koje se smatra kako potiču respiratornu mrežu te prima izravne projekcije serotoninskih neurona iz *nucleus raphe obscurus*. Aktivnost neurona RTN-a značajno je pojačana lokalnom primjenom 5HT kao i stimulacijom pomoću tvari P i tireotropin oslobađajućim hormonom (TRH).<sup>(45)</sup> Vrijedi napomenuti istraživanje Richtera i suradnika<sup>(54)</sup> prema kojem sistemski primijenjen (IV) 8OH-DPAT uzrokuje apneju, što je u suprotnosti s istraživanjima ostalih autora prema kojima uzrokuje tahipneju.<sup>(14, 55)</sup> To dovodi u pitanje da li 5HT<sub>1A</sub> agonisti postižu svoj stimulirajući učinak na disanje nakon sistemske primjene djelujući preko neurona u pBC kompleksu.

Osim preko 5HT<sub>1A</sub> receptora serotonin stimulacijski djeluje i preko drugih receptora. Na modelu presjeka kroz produženu moždinu neonatalnih štakora, obostrana mikroinfuzija i iontoforeza 5HT na respiratorne neurone unutar pBC kompleksa, uzrokovale su porast neuralne aktivnosti hipoglosnog živca.<sup>(52, 57)</sup> Smatra se kako je taj učinak postignut djelovanjem preko 5HT<sub>2A</sub> receptora, s obzirom da je isti uspješno blokiran selektivnim antagonistom 5HT<sub>2A</sub> receptora.<sup>(57)</sup> Na modelu decerebriranog psa, 5HT stimulacijski djeluje na hipoglosni živac na kojem se zna kako postoje 5HT<sub>2A</sub> receptori.<sup>(2, 67)</sup>

Cilj ove studije je utvrditi učinak selektivnih agonista serotonina na 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptore smještene na neuronima unutar pBC kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC). Hipoteza istraživanja je da agonisti serotoninskih 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptora modulacijski utječu na disanje djelovanjem na 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptore na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC). U tu svrhu proučavan je učinak sistemski (IV) primijenjenog agonista 5HT<sub>1A</sub> receptora 8-hidroksi-2-(di-n-propilamin) tetralin (8OH-DPAT) te učinak agonista 5HT<sub>2A</sub> receptora ( $\pm$ )-1-(2,5-dimetoksi-4-jodofenil)-2-aminopropan hidroklorid



(DOI) na disanje praćenjem aktivnosti freničnog živca modela odraslih decerebriranih pasa mješanaca. Također, proučavani su učinci lokalne primjene spomnutih agonista tehnikom pikoinjektiranja i mikroinjektiranja. Pikoinjektiranje je vršeno na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa, a mikroinjektiranja 5HT agonista na grupe respiratornih neurona unutar VRC-a od obeksa do 9 mm rostralno od obeksa, uz praćenje aktivnosti freničnog živca.



**Slika 1.** Shematski prikaz produžene moždine s ventralnom respiratornom grupom (VRC) i pBC kompleksom. VRG = VRC = ventralna respiratorna grupa; nAmb = nucleus ambiguus; DRG = DRC = dorzalna respiratorna grupa; NTS = nucleus tractus solitarii; preBötC = preBötzinger kompleks; BötC = Bötzinger kompleks; RTN = nucleus retrotrapezoideus; PB = parabrahijalna regija; KF = Kölliker-Fuse regija.

## **2. HIPOTEZA**

Agonisti serotoninskih 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptora modulacijski utječu na disanje djelovanjem na 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptore na respiratornim neuronima unutar preBötzingera (pBC) kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC).

## **3. CILJEVI RADA**

### 3.1. Opći cilj

Cilj ovog rada je utvrditi učinak serotonina na respiratorne neurone unutar preBötzingera (pBC) kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC).

### 3.2. Specifični ciljevi

Kako bi se utvrdio učinak serotonina ispitan je učinak selektivnih agonista serotonina na 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptore smještene na respiratornim neuronima unutar preBötzingera (pBC) kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC).

## 4. METODE I PROTOKOLI

Ova istraživanja odobrila je komisija za istraživanja na životinjama Zablocki VA Medical Center iz Milwaukeeja država Wisconsin, Sjedinjene Američke Države. Pokusi su provedeni na psima miješane vrste oba spola i težine između 8 i 16 kilograma. Primijenjena je inhalacijska anestezija maskom uz održavanje plinom isofluranom (ISO) (1.5-2,5% end-tidal koncentracija (1-2 MAC)). Istodobno su praćeni znakovi nedovoljne anestezije kao što su salivacija, lakrimacija, porast krvnog tlaka, pulsa, te je po potrebi anestezija produbljivana .

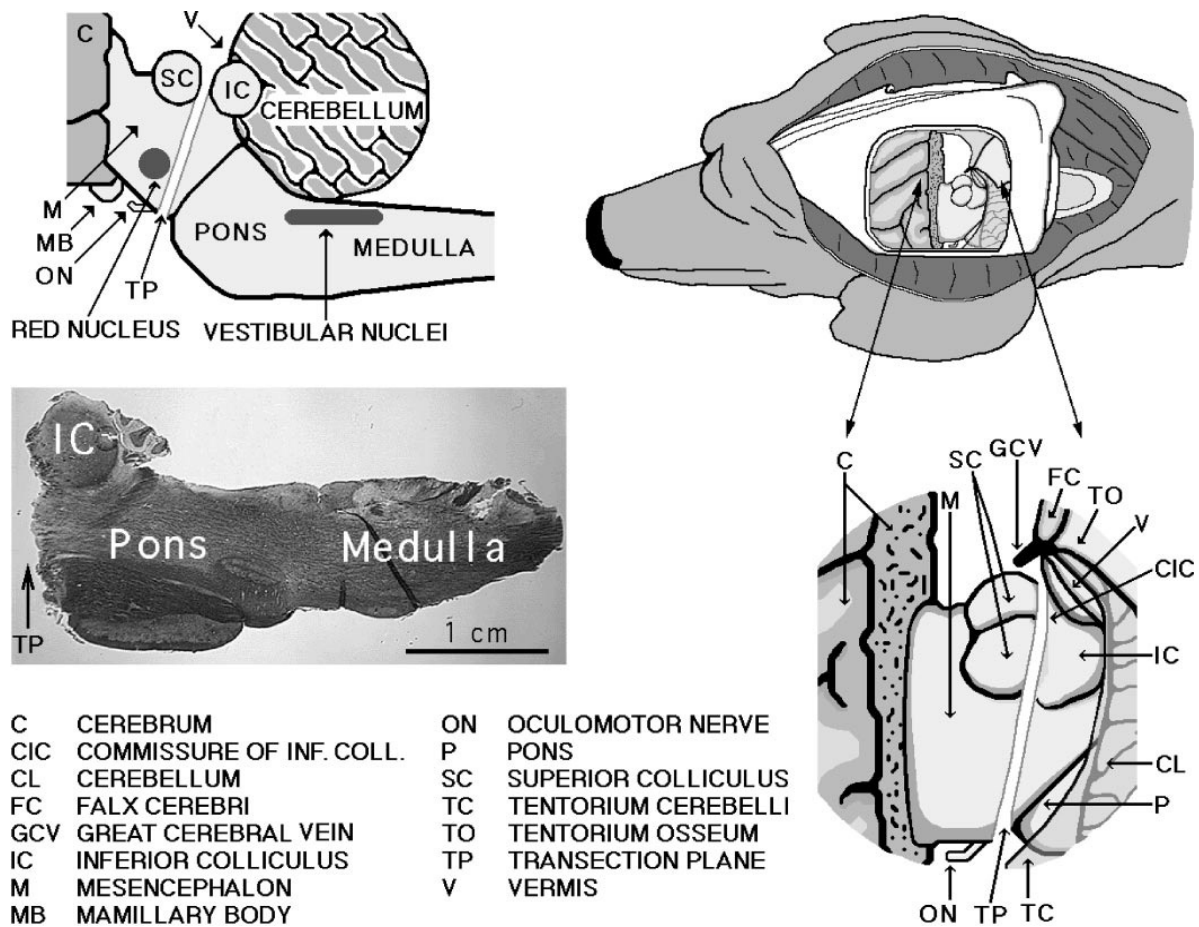
### 4.1. Kirurška metoda

Psi su intubirani endotrahealnim tubusom i mehanički ventilirani mješavinom plinova sadržaja ~60% O<sub>2</sub>, zraka i 2,5% isoflurana. Cjelokupan proces pripreme psa za pokus, kirurški postupak, promatranje i održavanje homeostaze već je detaljno opisan i objavljen.<sup>(8)</sup> Čitavo vrijeme pokusa end-tidal CO<sub>2</sub> (etCO<sub>2</sub>) nadgledan je infracrvenim analizatorom (POET II, Criticare Systems). U femoralnu venu postavljen je kateter s trostrukim lumenom korišten za davanje kontinuirane infuzije (0.9% NaCl), lijekova te ispitivanih supstanci. Također je kateter postavljen u femoralnu arteriju za kontinuirano praćenje krvnog tlaka (Gould-Statham P23 ID transducer) i povremenu plinsku analizu krvi. Temperaturna sonda postavljena je u jednjak radi kontinuiranog praćenja tjelesne temperature koja je održavana na temperaturi između 37.5 i 38.5 °C pomoću grijane podloge na kojoj je bio smješten pas. Psi su postavljeni u poseban stereotaksični aparat (Kopf model 1530) s glavom flektiranom za 30° ventralno. Kralježnica je održavana ravnom posebnim vijcima pričvršćenim i zategnutim za kukove. Dorzolateralnom disekcijom vrata pristupljeno je desnom C5 korijenu freničnog živca koji je prerezan distalno, uklonjena mu je ovojnica te je postavljen na bipolarnu elektrodu uronjenu u mineralno ulje. Postupak je dalje omogućio praćenje neuralne aktivnosti freničnog živca u određenom vremenskom intervalu iz kojeg je dobiven neurogram freničnog živca tzv. PNG. Iz neurograma freničnog živca napravljen je izračun vremena inspirija (T<sub>I</sub>), ekspirija (T<sub>E</sub>), frekvencije disanja (f<sub>B</sub>) izražene u BPM (breaths per minute ili broj udaha u minuti), te vršne aktivnosti freničnog živca (PPA) izražene u postotcima (%) u odnosu na kontrolu. Radi minimiziranja pokreta moždanog debla prilikom snimanja neuralne aktivnosti

izveden je obostrani pneumotoraks. Radi prevencije nastanka artefakata zbog pomicanja tijekom snimanja neuralne aktivnosti, za vrijeme trajanja pokusa kontinuirano je administrirana infuzija nedepolarizirajućeg blokatora neuromišićne veze pankuronija (0.1 mg/kg/h). Provedena je i obostrana cervikalna vagotomija radi eliminacije vagalnih eferentnih podražaja iz plućnih „*stretch*“ receptora.

U nastavku pripreme modela istraživanja napravljena je decerebracija, tj. odvajanje moždane kore (*cortex*) i međumozga (*diencephalon*) od moždanog debla i kralježničke moždine prekidanjem neuralnih puteva između crvene jezgre (*n. ruber*) u srednjem mozgu (*mesencephalon*) i vestibularne jezgre (*n. vestibulares*) u produženoj moždini. Decerebrirane životinje su poikilotermne zbog čega je bilo potrebno grijačima održavati temperaturu. Decerebracijom su vitalni centri u mostu i produženoj moždini i dalje funkcionalni te je većina respiratornih i cirkulatornih refleksa održana. U ovom trenutku svijest je u potpunosti prekinuta, a odgovor na bol je deprimiran te je time stvoren preduvjet za proučavanje životinja bez anestezije. Postupak decerebracija je proveden midkolikularnom transekcijom<sup>(61)</sup> (slika 2). Pri midkolikularnoj transekciji prvo je napravljena disekcija kože u središnjoj liniji od spinalnih nastavaka aksisa do nasiona. Obostrano su presječeni mišići i tkivo duž vanjskoga sagitalnoga i nuhalnoga grebena čime je dobiven pristup parijetalnoj kosti i to od središnje linije do 4 cm lateralno i od nuhalnoga grebena do 4.5 cm rostralno. Potom je obostrano napravljena kraniotomija promjera 3.5 cm na krajevima izložene parijetalne kosti približno 0.5 cm lateralno od sagitalnoga grebena i približno 1 cm rostralno od nuhalnoga grebena kako bi se spriječio mogući prekid dorzalnoga sagitalnoga i transverzalnoga venskoga sinusa (slika 2, gore desno). Kraniotomija je dovršena pomoću Ronguerove pincete, a na rubove kosti postavljeno je posebno ljepilo za kosti radi zaustavljanja krvarenja i sprječavanja moguće zračne embolije. Potom je škarama odstranjena tvrda moždana ovojnica (*dura mater*), a time je dobiven obostrani pristup parijetalnom i okcipitalnom režnju. Bipolarnim koagulatorom (malel 0441010; Burton Division, Cavort) s pincetom (Edward Weck) koagulirane su te uklonjene male količine moždanog tkiva. Time su obostrano uklonjeni dijelovi parijetalnog i temporalnog režnja, kao i cijeli okcipitalni režanj te je dobiven pristup srednjem mozgu (slika 2, dolje desno). Pokraj moždanog debla, a iza izlazišta okulomotoričnog živca (*n. oculomotorius*) s ventralne strane, postavljena je spatula te usmjerena prema midkolikularnoj liniji (linija između gornjeg i donjeg

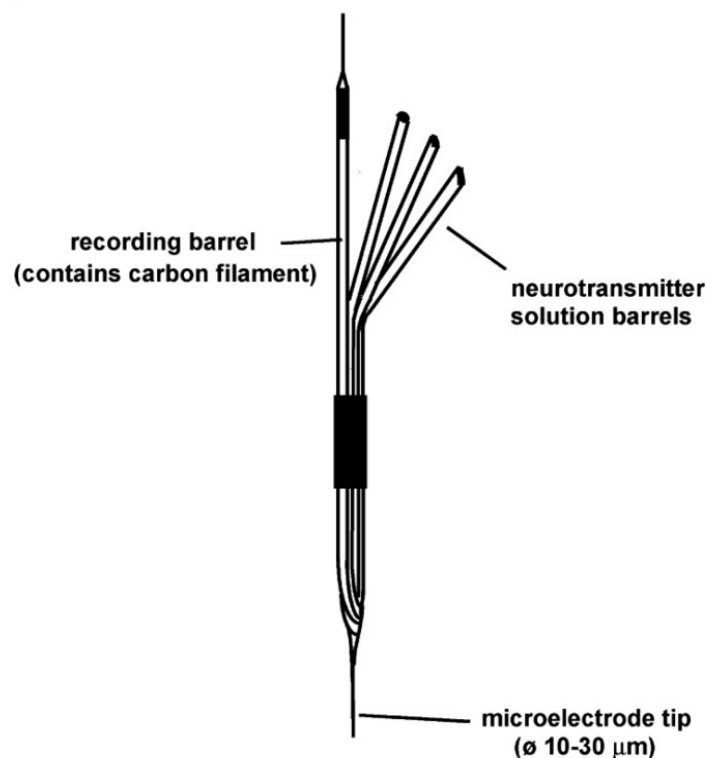
kolikula srednjeg mozga) s dorzalne strane kako bi poslužila kao vodilja skalpelu. Moguće krvarenje zaustavljeno je bipolarnom koagulacijom ili hemostatskim materijalom (Surgicel). Nakon decerebracije prekinuta je administracija isoflurana zbog isključenja mogućeg utjecaja anestezije na rezultate pokusa. Daljnja ventilacija nastavljena je mješavinom od približno 60% zraka i O<sub>2</sub> uz održavanje hiperoksične normokapnije (Fi > 0,6). Model istraživanja pripremljen prema ovom modelu stabilan je do 10 sati postdecerebracijski. Doza deksametazon od 0.25 mg/kg administrirana je intravenski zbog sprječavanja edema kao posljedice kirurške tehnike.



**Slika 2.** (Izvor: Tonkovic-Capin i suradnici 1998.) Shematski prikaz važnih intrakranijalnih struktura za decerebraciju nakon micanja kaudalnih dijelova parijetalnog i temporalnog režnja te cijeloga okcipitalnog režnja obostrano. CIC, komisure donjeg kolikula. Decerebracija se izvodi kroz srednji mozak (*mesencephalon*; M) u ravnini koja ide od midkolikularnog područja do neposredno iza izlazišta okulomotoričnog živca (*n. oculomotorius*; ON) kako prikazuje ravnina presjeka (TP) (gore lijevo i dolje desno). *Dolje desno*: Uvećani prikaz struktura srednjeg mozga kako se mogu vidjeti kroz otvor učinjen kraniotomijom (gore desno). *Dolje lijevo*: paramedijalni (5mm od središnje linije) sagitalni presjek moždanog debla pokazuje preciznu ravninu presjeka (TP) kroz srednji mozak (M) na razini koja je rostralno od donjih kolikula (IC) i mosta (P).

#### 4.2. Prikupljanje podataka i metoda mikroinjektiranja

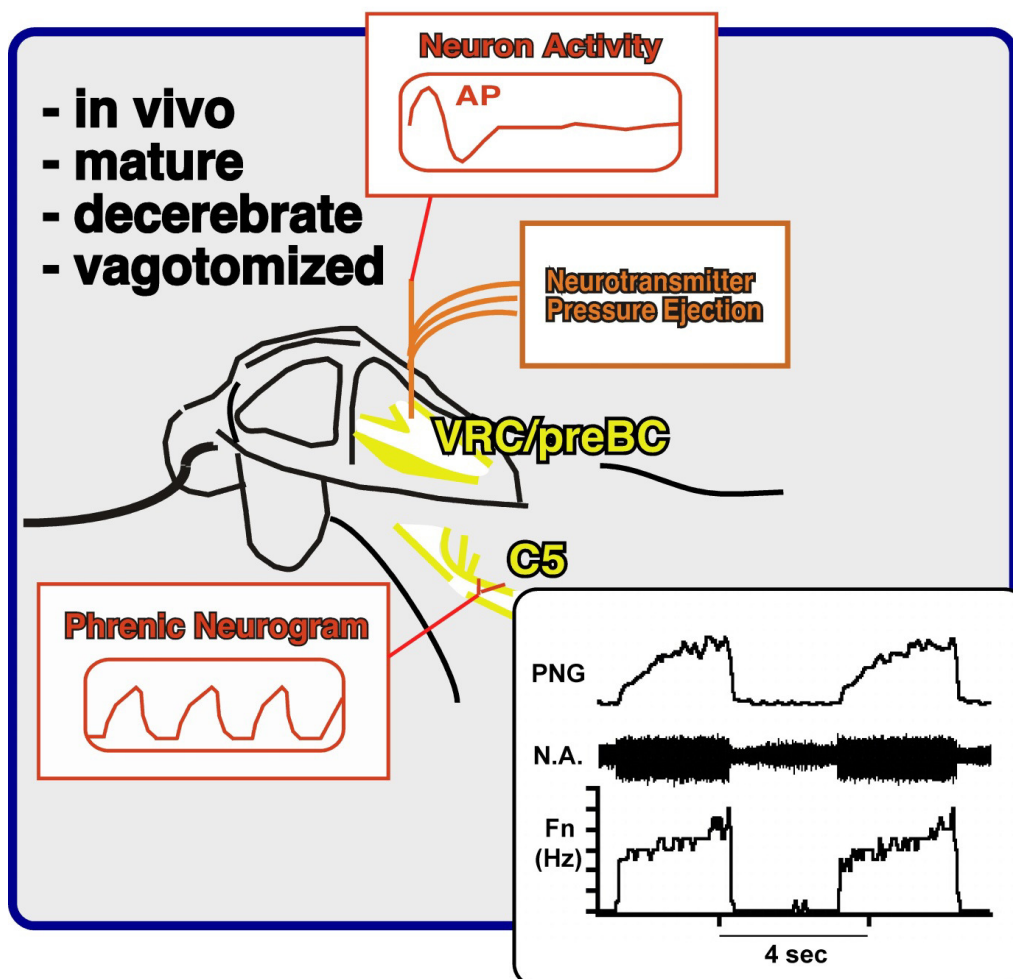
Radi stabilizacije preparata trebalo je proći najmanje jedan sat od završetka njihove pripreme do početka snimanja neuralne aktivnosti. Za lociranje VRC i pBC kompleksa, kao i za izvanstanično snimanje neuralne aktivnosti respiratornih neurona iz VRC i pBC kompleksa, korištene su staklene elektrode (promjer vrha 10-30  $\mu\text{m}$ ) s četiri barela (*slika 3*). Ista elektroda korištena je i za mikroinjektiranje supstanci na grupu respiratornih neurona unutar VRC i pikoinjektiranje istih na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa. Jedan barel elektrode bio je ispunjen tankim filamentom (7  $\mu\text{m}$ ) kojim je snimana neuralna aktivnost, dok su tri prazna barela bila ispunjena supstancama za injiciranje korištenim u našim pokusima. Pojačani i pročišćeni signali (0,1 – 3 KHz) aktivnosti respiratornih neurona i freničnog živca snimljeni su pomoću CED Power 1401 mk II i Spike2 sustava (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK).



**Slika 3.** Shematski prikaz staklene elektrode korištene u istraživanju za snimanje neuralne aktivnosti iz VRC i pBC kompleksa, kao i za injektiranje istraživanih supstanci.

Neurogram freničnog živca (PNG), frekvencija izbijanja respiratornih neurona, vrijeme inspiririja ( $T_I$ ) i ekspiririja ( $T_E$ ), etCO<sub>2</sub> i sistemski krvni tlak kontinuirano su praćeni digitalnim poligrafom (PowerLab/16SP, ADInstruments, Castle Hill, Australia). Svi neuroni i njihove pozicije zabilježeni su po koordinatama rostralno od obeksa, lateralno od središnje linije, te ventralno od dorzalne površine. Nagib produžene moždine u odnosu na horizontalnu ravninu u svakom je preparatu posebno izmjeren radi ispravljanja koordinata za naknadne analize. Iz 10 do 30 respiratornih ciklusa snimljene neuralne aktivnosti i PNG-a (neurograma freničnog živca) pomoću CED Spike2 softwera dobiven je CTH (cycle-triggered histogram) te je time određeno radi li se o ekspiratornom ili inspiratornom neuronu. Iz CTH-a je izračunata vršna i prosječna frekvencija ( $F_n$ ) respiratornih neurona snimljenih u pBC kompleksu (*slika4*).

## Preparation



Slika 4. Shematski prikaz modela istraživanja

Sve korištene supstance razrijeđene su u umjetnom cerebrospinalnom likvoru (aCSF) koji se sastojao od 124 mM NaCl, 2mM KCl, 2mM MgCl, 1,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> i 11 mM glukoze. Za mikroinjektiranje istraživanih supstanci u VRC i pBC kompleks putem staklene elektrode korišten je posebno napravljen uređaj za mikroinjektiranje s četiri zasebna kanala, koji je omogućio pojedinačnu kontrolu trajanja injektiranja, frekvencije ponavljanja istih te kontrolu tlaka pod kojim je supstanca injektirana (0-80 psi). Količina injektiranih supstanci u pBC kompleks i VRC mjerena je razlikom u visini meniska u barelu staklene elektrode putem mikroskopa (povećanje 100 puta i rezoluciju 2nl). Na kraju pokusa psi su usmrćeni intravenski primijenjenim kalijevim kloridom (KCl).

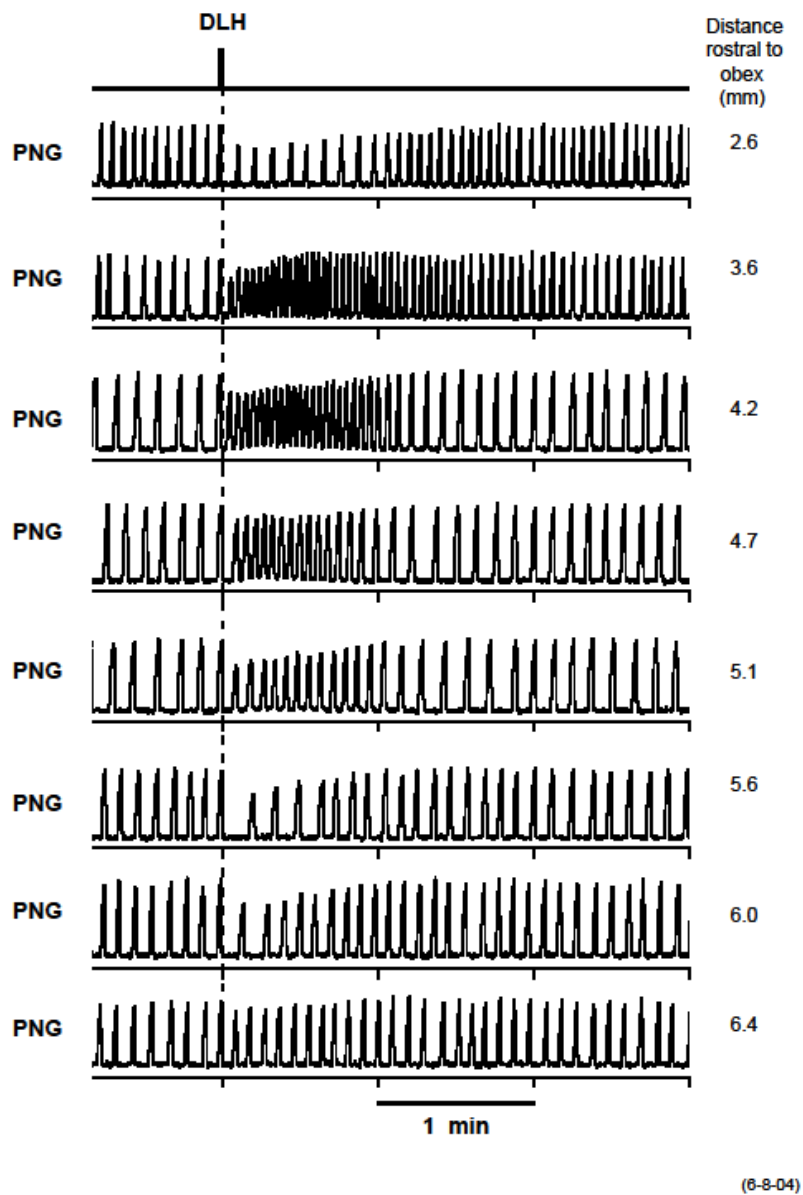
#### 4.3. Lokalizacija pBC kompleksa

Za lokalizaciju pBC kompleksa unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) u produženoj moždini iz koje je snimana aktivnost respiratornih nerona, korištena su tri kriterija. Prvi kriterij su već utvrđene stereotaksične koordinate. U prijašnjim studijama utvrđeno je kako je pBC kompleks smješten unutar VRC na lokaciji od 4,3 do 6,9 mm rostralno od obeksa, 4 do 5 mm lateralno od središnje linije i 6 do 8 mm ventralno od dorzalne površine produžene moždine.<sup>(33, 46)</sup> Drugi korišteni kriterij je prisutnost različitih tipova respiratornih neurona unutar VRC-a (inspiratornih i ekspiratornih neurona),<sup>(33, 46, 60)</sup> a treći karakteristični tahipnoični odgovor PNG-a na injektiranje glutamat agonista DLH-a (D-homocisteična kiselina) volumena 30-40 nl i koncentracije 10 mM u pBC kompleks karakteriziran smanjenjem inspiratornog (T<sub>I</sub>) i ekspiratornog (T<sub>E</sub>) vremena.<sup>(33, 44, 46, 64)</sup> Mjesto unutar VRC-a na kojem je nastala najveća promjena u PNG-u nakon primjene DLH-a, a koje se sastojalo od mješavine inspiratornih (I) i ekspiratornih (E) respiratornih neurona, određeno je kao mjesto pBC kompleksa, što je u skladu s istraživanjima i u drugih vrsta.<sup>(4, 6, 56, 60)</sup> Tahipnoični odgovor na mikroinjektiranje DLH-a u VRC brojni autori smatraju funkcionalnim markerom pBC kompleksa,<sup>(4, 33, 44, 46, 59, 64)</sup> te je stoga u ovoj studiji upotrijebljen kao jedan od glavnih kriterija.

Snimanje je vršeno na razini obeksa (0 mm) i 4.5 mm lateralno od središnje linije uz ulaz dorzalno prema ventralno u VRC, te praćenje prisutnosti respiratornih neurona. Pri detekciji mjesta najjače neuralne aktivnosti mikroinjektiran je DLH uz



praćenje odgovora PNG-a. Nakon mikroinjektiranja DLH-a elektroda je uklonjena s tog mjesta, vrh elektrode očišćen, pomaknut 1 mm rostralno te je postupak ponavljen. Isti postupak ponavljan je sve do 9 mm rostralno od obeksa. Pretpostavljeno je kako je mjesto s najvećim odgovorom na DLH ujedno i lokacija pBC kompleksa<sup>(33, 46)</sup> (slika 5). Ukoliko je nakon primjene DLH-a unutar VRC izostala tahipnoična reakcija prva dva kriterija, koordinate i prisutnost mješavine respiratornih neurona, korišteni su kao potvrda lokalizacije pBC kompleksa.



**Slika 5.** Prikaz serije mikroinjektiranja DLH-a (10 mM) u ventralnu respiratornu grupu (VRC) radi lokaliziranja maksimalne tahipnoične reakcije PNG-a, što je indikativno za pBC kompleks.

#### 4.4. Protokoli

##### *4.4.1. Protokol 1: Odgovor pojedinačnih respiratornih neurona unutar pBC kompleksa na pikoinjektiranje 8OH-DPAT i DOI*

Staklene elektrode korištene u pokusima bile su ispunjene različitim kombinacijama testiranih supstanci: aCSF, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M 8OH-DPAT ili aCSF, 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M 8OH-DPAT ili aCSF, 1  $\mu$ M i 100  $\mu$ M 8OH-DPAT ili aCSF, 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M DOI. Svaka kombinacija korištena je na drugom modelu. Nakon što je izolirana aktivnost jednog respiratornog neurona unutar pBC kompleksa, započelo je snimanje. U početku je zbog kontrole snimljeno 15-30 respiratornih ciklusa, a nakon toga je izvedeno pikoinjektiranje. Inicijalno je primijenjen aCSF, a zatim ispitivane supstance, tj. agonisti 5HT receptora od niže prema višoj koncentraciji. Postupno je povećavana brzina pikoinjektiranja sve dok više nije zabilježen utjecaj na neuralnu aktivnost ili dok se koncentracija supstance na udaljenosti  $\sim$ 200  $\mu$ m od vrha elektrode nije približno izjednačila s onom u elektrodi. Procjena udaljenosti temeljena je na teorijskom difuzijskom modelu.<sup>(66)</sup> Za period kontrole generiran je CTH, kao i za periode neposredno nakon prestanka pikoinjektiranja istraživanih supstanci. Isti smo postupak ponovili za svaku od ispitivanih supstanci u staklenoj elektrodi. Supstance su primjenjivane u razmaku od najmanje 5 minuta. Nakon završetka protokola, dopušten je oporavak ispitivanog neurona u trajanju 30-40 minuta prije generiranja završnog CTH-a. Cijeli protokol zatim je ponovljen na drugom pojedinačnom respiratornom neuronu unutar istog pBC kompleksa.

##### *4.4.2. Protokol 2: Učinak mikroinjektiranja 8OH-DPAT, DOI i 5HT duž VRC-a, uključujući i pBC kompleks, na aktivnost freničnog živca*

Kako bi se istražila uloga 5HT receptora unutar VRC-a, promatran je učinak mikroinjektiranja 8OH-DPAT, DOI i 5HT na vrijeme ekspirija ( $T_E$ ), inspirija ( $T_I$ ) i vršnu aktivnost (PPA) freničnog živca. Pomoću staklene elektrode lociran je VRC unutar produžene moždine te mikroinjektiran istraživanim supstancama. Za lociranje VRC iskorištene su već poznate koordinate, ali i prisutnost različitih inspiratornih i ekspiratornih respiratornih neurona. Nakon pronalaska VRC-a unutar produžene moždine, određena je dubina, tj. dorzo-ventralni smjer VRC-a. Potom je staklena elektroda postavljena u središte VRC-a i na tom su mjestu mikroinjektirane

supstance. Inicijalno je primijenjen DLH (30-40 nl i 10 mM) u svrhu dobivanja karakterističnog odgovora freničnog živca na aktivaciju respiratornih neurona u VRC-u (tzv. tahipnoičan odgovor). Nakon dobivenog karakterističnoga odgovora (ujedno i potvrde kako je elektroda dobro postavljena u VRC-u), mikroinjektirane su testirane supstance: ~100 nl 8OH-DPAT (200  $\mu$ M) i DOI (200  $\mu$ M) na istoj lokaciji kod 13 pasa. Volumen primijenjenih supstanci od ~100 nl ima učinkovit promjer od ~1 mm.<sup>(47)</sup> U dodatnih 6 pasa nakon mikroinjektiranja DLH-a primijenjen je 5HT (5 mM). Mjesto na kojem je započelo mikroinjektiranje unutar VRC-a bilo je razina obeksa, a zatim je mikroinjektiranje nastavljeno u razmacima od 1 mm u rostro-kaudalnom smjeru unutar VRC-a pa sve do 9 mm rostralno od obeksa pri tome i pBC kompleks. Vremenski razmak između mikroinjektiranja iznosio je 3-5 minuta. Za svako mjesto mikroinjektiranja izračunata je vršna ( $F_n$ ) i prosječna (ave  $F_n$ ) frekvencija induciranog odgovora freničnog živca iz  $T_I$ ,  $T_E$  i PPA. Kako bi se kod velikog broja respiratornih neurona unutar VRC i pBC kompleksa osigurala izloženost dovoljno visokoj koncentraciji ispitivanih supstanci, a time postigao i dovoljno učinkovit podražaj, u dodatnih 13 pasa mikroinjektirano je ~500 nl (volumni promjer ~1.6 mm) 2 mM 8OH-DPAT u VRC na grupu respiratornih neurona od 0 do 9 mm rostralno od obeksa. Time je primijenjena 250 puta veća koncentracija 8OH-DPAT po mikroinjektiranju u odnosu na prijašnji pokus.

#### *4.4.3. Protokol 3: Učinak sistemske (intravenske tj. IV) aplikacije 8OH-DPAT i DOI na aktivnost freničnog živca*

U trećem protokolu promatran je odgovor freničnog živca na sistemsku (intravensku, tj. IV) primjenu 8OH-DPAT i DOI, agonista 5HT receptora. Doza agonista postupno je povećavana sve dok nije postignut maksimalan učinak. Dopušten je period od 30 do 40 minuta za oporavak neurona prije primjene drugog agonista.

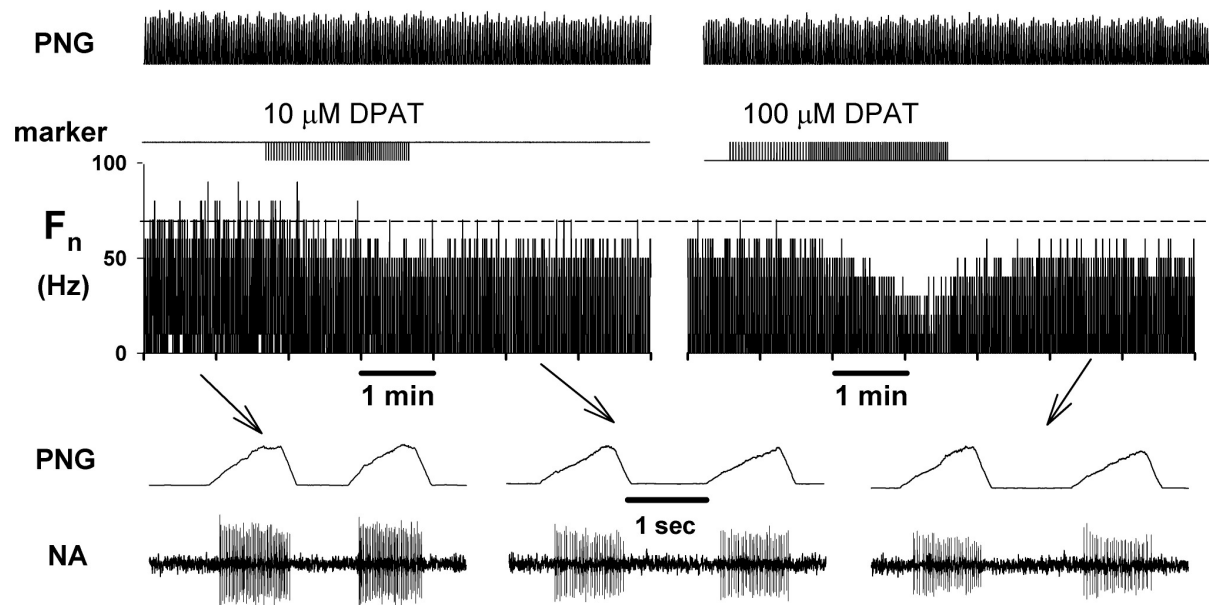
#### 4.5. Statistička analiza

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni pomoću programa SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., San Jose, CA 95110), a korišteni su sljedeći statistički testovi: one-way repeated ANOVA, osnovni linearni model, metoda Holm-Sidak, Kolmogorov-Smirnov test, Kruskal-Wallis one-way ANOVA, metoda Dunn. Razlike su smatrane značajnim ako je  $p < 0.05$ . Vrijednosti su prikazane kao median  $\pm$  SE (standardna pogreška).

## 5. REZULTATI

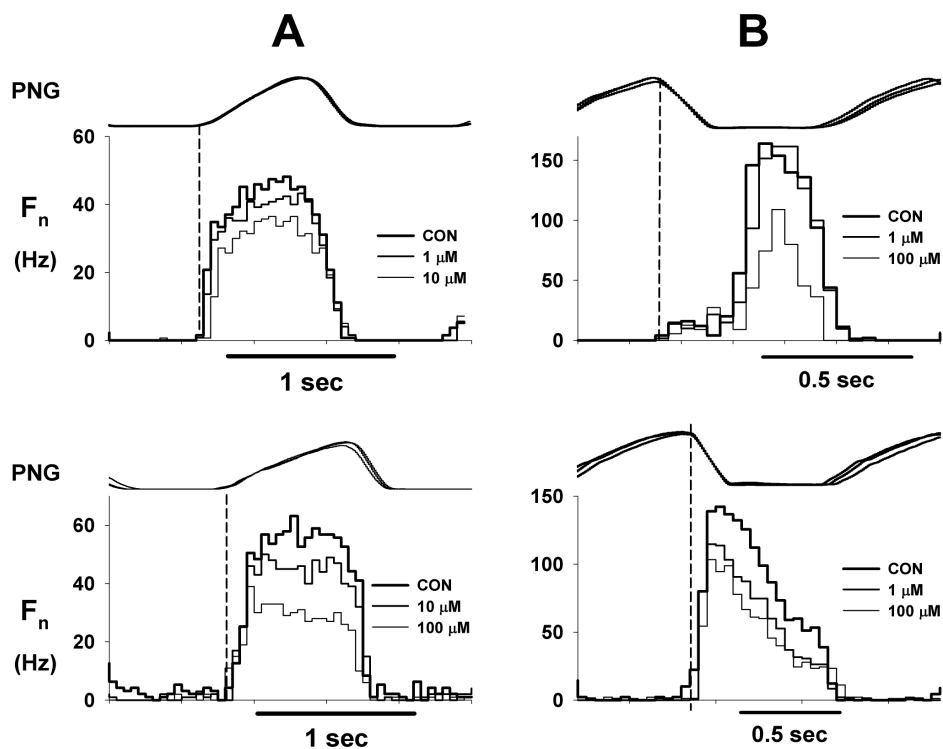
### 5.1. Protokol 1: Odgovor pojedinačnih respiratornih neurona unutar pBC kompleksa na pikoinjektiranje 8OH-DPAT i DOI

Primjer prvog protokola sa supstancom 8OH-DPAT na inspiratornom (I) neuronu prikazan je na *slici 6*. Vidljivo je kako pikoinjektiranje 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  8OH-DPAT izazva prolazno smanjenje aktivnosti (frekvencije;  $F_n$ ) respiratornog neurona ovisno o dozi. Brzina pikoinjektiranja povećavana je sve dok nije postignut maksimalni učinak na  $F_n$  neurona za svaku koncentraciju (10-15 nl/min).

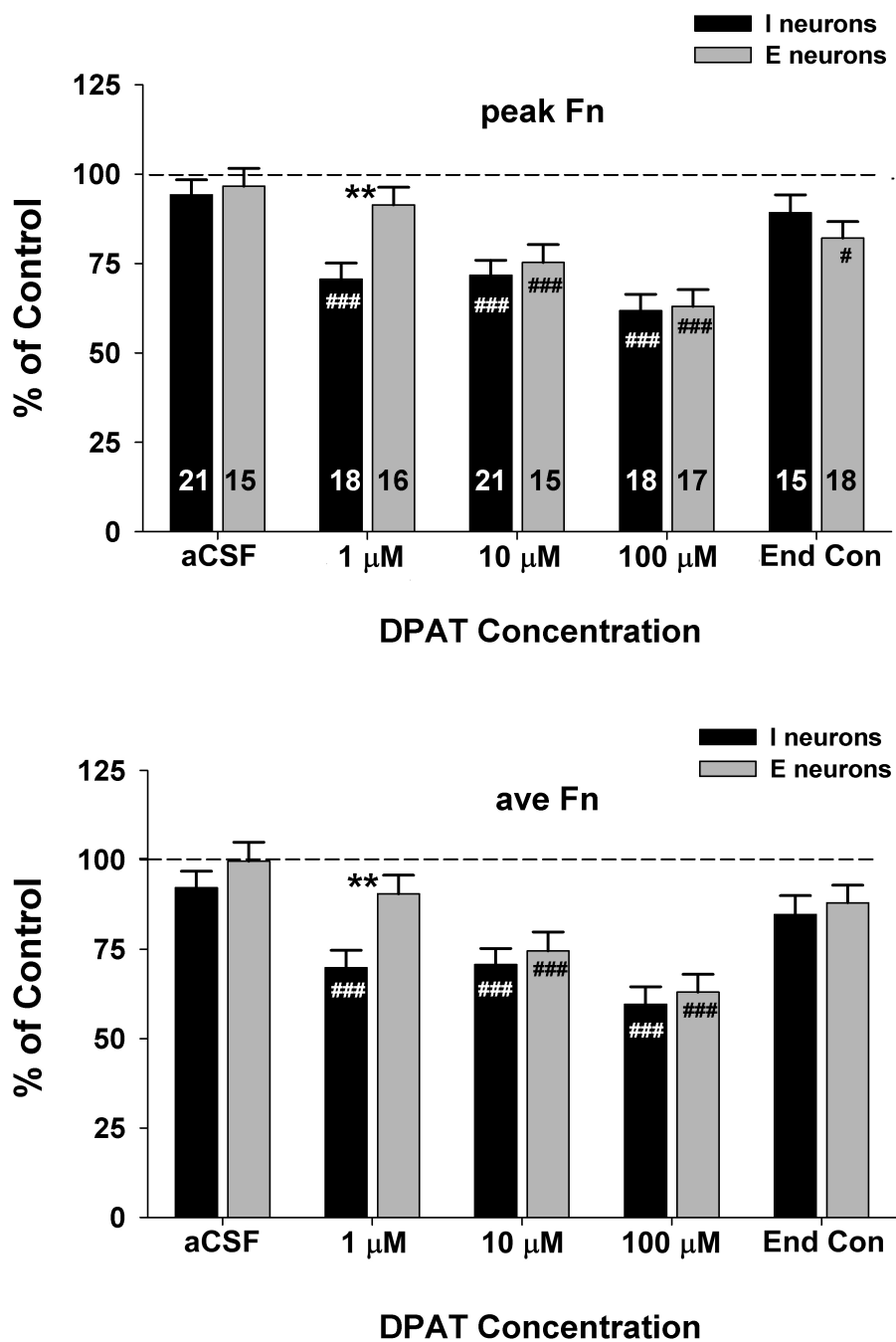


**Slika 6.** Odgovor pBC I-neurona na pikoinjektiranje 10  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  8OH-DPAT (markeri) koji pokazuje smanjenje vršne  $F_n$  ovisno o dozi. Brzina injektiranja povećavana je sve dok nije postignut maksimalan učinak za svaku koncentraciju. Prikazani su i neurogram freničnog živca (PNG) kao i neuralna aktivnost I-neurona (NA). Prolazno veliko smanjenje  $F_n$  je artefakt snimanja nastao uslijed prevelike brzine pikoinjektiranja, a koje se odmah popravilo nakon prestanka pikoinjektiranja na stvarne vrijednosti nastale administracijom supstanci.

Primjeri učinka različitih doza 8OH-DPAT na aktivnost ( $F_n$ ) različitih podtipova inspiratornih (I) i ekspiratornih (E) neurona prikazani su cycle-triggered histogramom (CTH) na slici 7. Na slici 8 prikazani su skupni podatci za vršnu ( $F_n$ ) i prosječnu frekvenciju ( $aveF_n$ ) 34 I-neurona i 24 E-neurona izraženi postotkom promjena u odnosu na kontrolu (vrijednost prije početka pikoinjektiranja) kod 16 pasa. Za tri različite kombinacije 8OH-DPAT (različitih koncentracija) uspjeh protokola, tj. pikoinjektiranja svih supstanci unutar jedne staklene elektrode na isti pojedinačni respiratorni neuron bez gubitka njegove aktivnosti, iznosi 84%. Pikoinjektiranje aCSF nije utjecalo na aktivnost ispitivanoga respiratornog neurona. Pri koncentraciji od  $1 \mu\text{M}$  8OH-DPAT znatno su smanjene vršna ( $F_n$ ) ( $71.2 \pm 5.1\%$ ) i prosječna ( $aveF_n$ ) ( $70.0 \pm 5.2\%$ ) frekvencija za I-neuron, ali ne i za E-neuron ( $91.4 \pm 3.9\%$  i  $90.5 \pm 4.3\%$ ). Pri višim koncentracijama podjednako je smanjena aktivnost I-neurona i E-neurona s najvećim smanjenjem aktivnosti od ~38 do 40 % kod koncentracije od  $100 \mu\text{M}$ . Vrijednosti nakon završetka pikoinjektiranja (end con; ~30 min kasnije) bile su nešto niže nego kontrolne vrijednosti za I-neurone, a za E-neurone i niže ( $p < 0.05$ ) što upućuje kako je za potpun oporavak neurona vjerojatno bilo potrebno više vremena

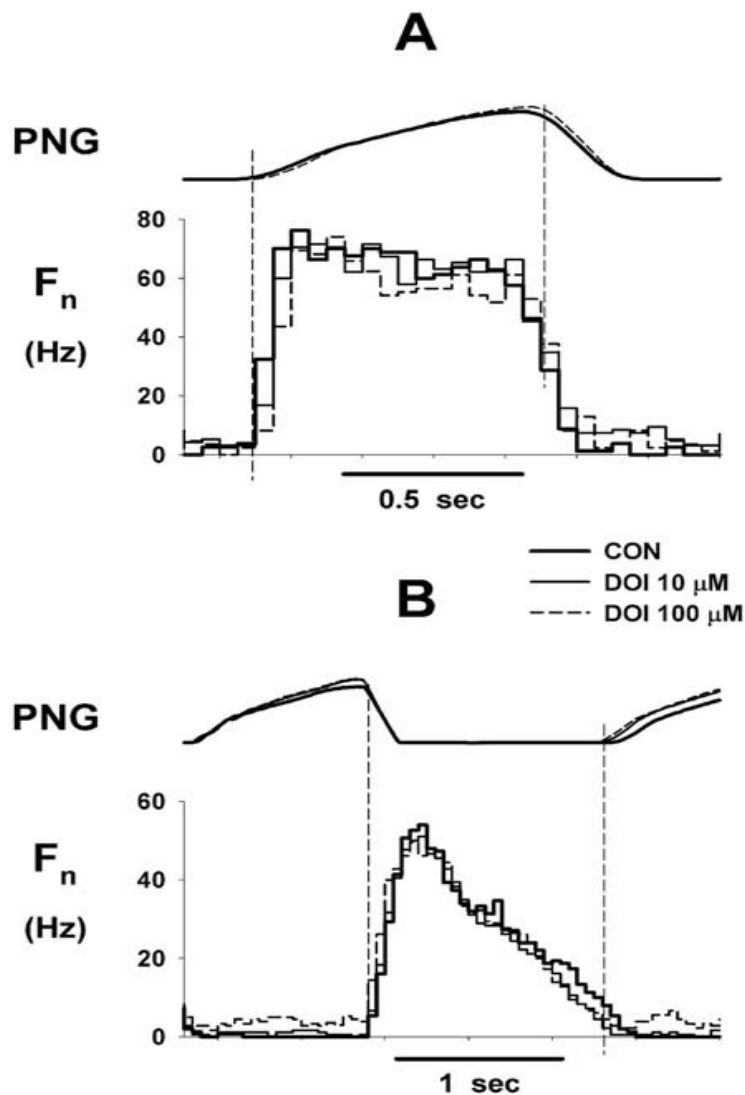


**Slika 7.** Cycle-triggered histogram (CTH) smanjenja  $F_n$  dva I-neurona i dva E-neurona unutar pBC kompleksa nakon pikoinjektiranja različitih koncentracija 8OH-DPAT. CON predstavlja  $F_n$  prije početka pikoinjektiranja (kontrola). Iscrtkana linija označava izmjenu inspiratorne i ekspiratorne faze.



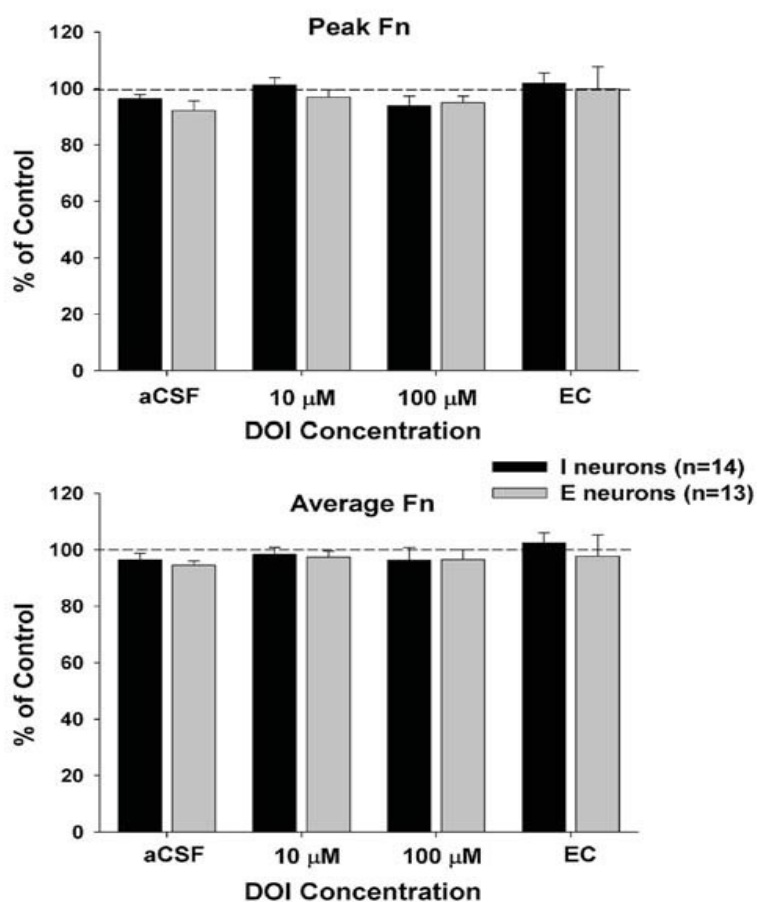
**Slika 8.** Skupni prikaz učinka različitih koncentracija 8OH-DPAT na vršnu ( $F_n$ ) i prosječnu ( $aveF_n$ ) aktivnost neurona (izraženo kao postotci (%) od kontrole). Vidljivo je kako koncentracija od 1  $\mu$ M 8OH-DPAT uzrokuje smanjenje vršne i prosječne frekvencije I-neurona međutim ne i E-neurona, dok koncentracije od 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M podjednako smanjuju frekvencije I-neurona i E-neurona. Pikoinjektiranje aCSF nije utjecalo na neuralnu aktivnost. Značajne razlike od aCSF: #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ . Znatna razlika između I-neurona i E-neurona: \*\*  $p < 0.01$ . Prikazan je i broj neurona.

Pikoinjektiranje 5HT<sub>2A</sub> agonista DOI na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa u koncentracijama od 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M nisu utjecale na I-neurone (*slika 9A*) niti E-neurone (*slika 9B*). Podatci dobiveni od 14 I-neurona i 13 E-neurona pokazali su kako DOI nije imao utjecaj niti na vršnu ( $F_n$ ) niti na prosječnu ( $aveF_n$ ) frekvenciju (*slika 10*).



**Slika 9.** Pikoinjektiranje DOI na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC nije pokazalo učinak. Primjer CTH-a za I-neuron (A) i E-neuron (B) pokazuje učinak pikoinjektiranja 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M DOI. Iscrkana linija označava izmjenu inspiratorne i ekspiratorne faze.





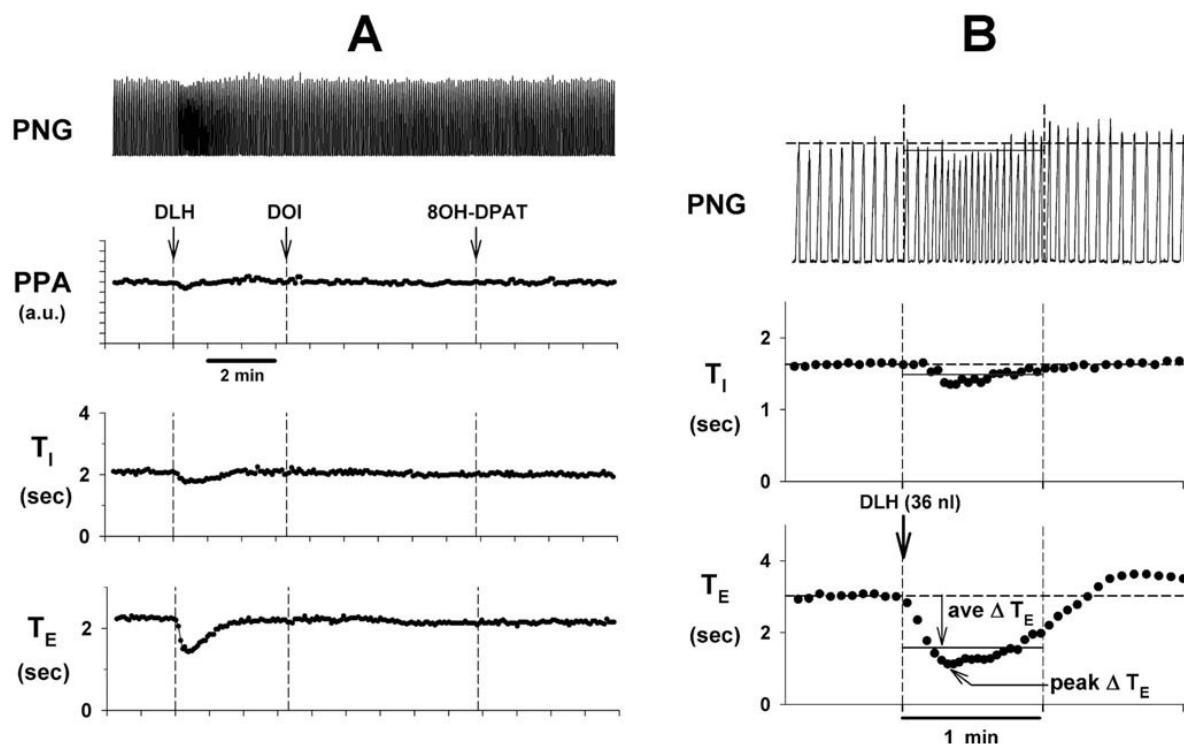
**Slika 10.** Skupni prikaz učinka pikoinjektiranja (postotak (%) od kontrole) različitih koncentracija DOI na 14 I-neurona i 13 E-neurona pokazuje kako DOI nije imao učinka.

## 5.2. Protokol 2: Učinak mikroinjektiranja 8OH-DPAT, DOI i 5HT duž VRC, uključujući i pBC kompleks na aktivnost freničnog živca

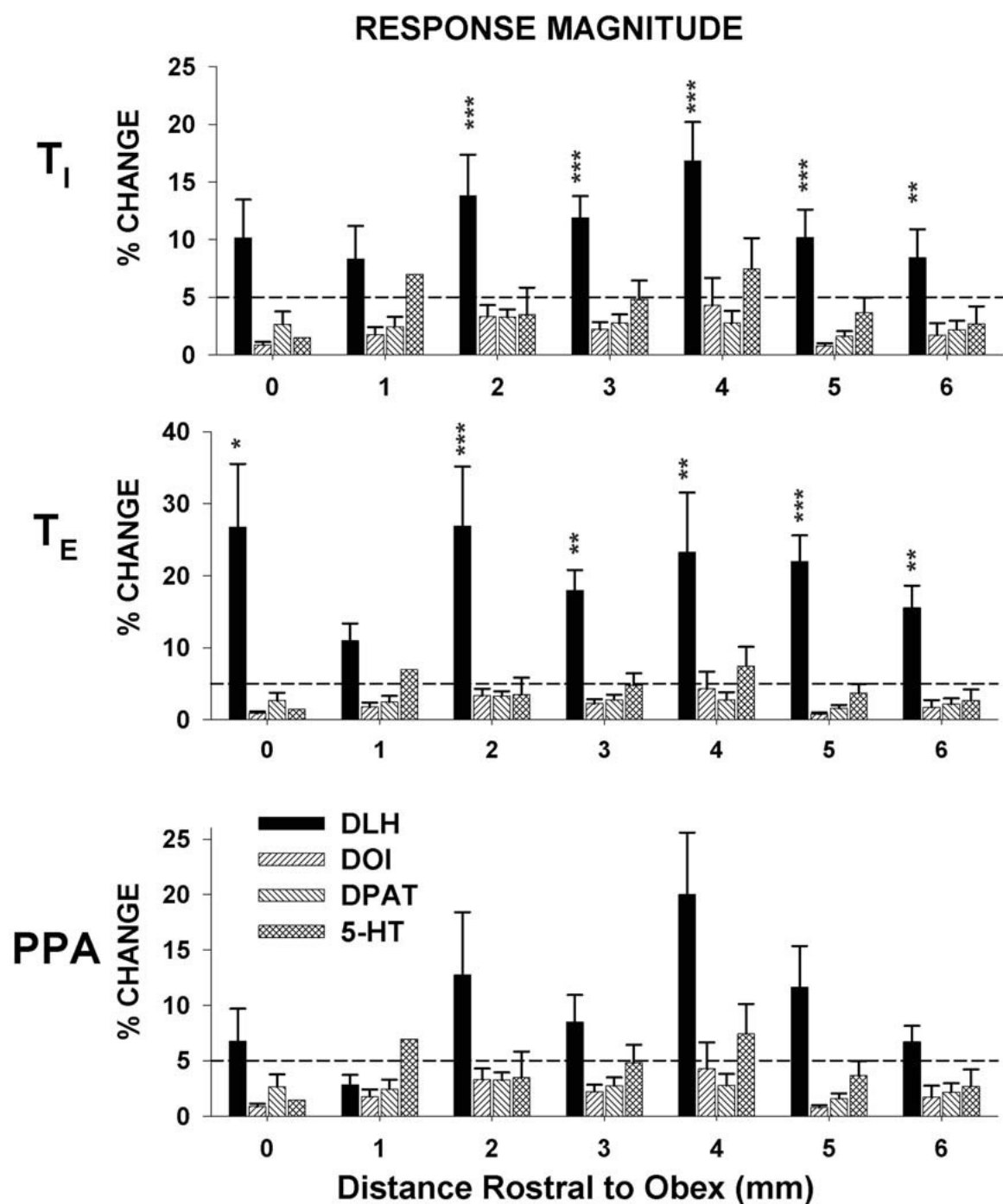
Primjer učinka mikroinjektiranja DLH, 8OH-DPAT i DOI na respiratorne neurone unutar pBC kompleksa (5 mm rostralno od obeksa unutar VRC) prikazan je na *slici 11A*. Na istoj slici prikazan je učinak na vršnu aktivnost freničnog živca (PPA), vrijeme ekspirija ( $T_E$ ) i inspirija ( $T_I$ ). DLH (36 nl, 10 mM) je uzrokovao prolaznu tahipneju (malo smanjenje  $T_I$  i značajno smanjenje  $T_E$ ), dok mikroinjektiranja 100 nl 200  $\mu$ M 8OH-DPAT i 200  $\mu$ M DOI nisu imala nikakav učinak. Vršna ( $F_n$ ) i prosječna ( $aveF_n$ ) frekvencija izračunata je za svako mikroinjektiranje kao što se vidi na slici 11B za odgovor uzrokovan DLH-om. Kod izračuna frekvencije nakon davanja DLH-a uzet je vremenski interval od 1 minute, a kod izračuna frekvencije nakon primjene

8OH-DPAT i DOI interval od 2 minute. Dulji interval za 8OH-DPAT i DOI (2 minute) uzet je u obzir zbog sporije aktivacije G-proteinskih receptora serotoniniskim agonistima.

Na slici 12 prikazani su skupni podatci za  $T_I$ ,  $T_E$  i PPA od obeksa pa rostralno u pravilnim razmacima od 1 mm kod 18 pasa. Podatci su prikazani kao apsolutna promjena u odgovoru (bez obzira na smjer tj. povećanje ili smanjenje) zbog toga što bi se kod uzimanja običnog prosjeka odgovora (povećanje ili smanjenje) na istom mjestu (iste koordinate) kod različitih pasa, dobila srednja vrijednost blizu nule čime bi pravi učinak agonista bio prikriven. Na većini mjesta DLH je imao značajan učinak (crni stupac) dok su 8OH-DPAT, DOI i 5HT imali beznačajan učinak (<5 %).

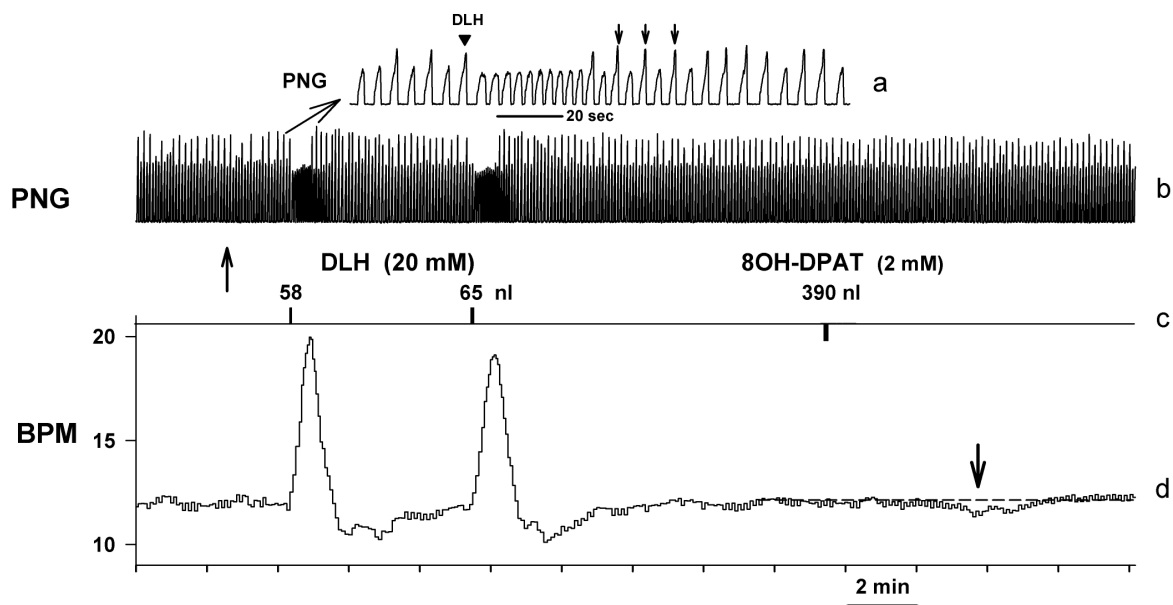


**Slika 11A.** Primjer protokola 2 tj. mikroinjektiranje DLH (10 mM), 8OH-DPAT (200  $\mu$ M) i DOI (200  $\mu$ M) u VRC i pBC kompleks. Mikroinjektiranje DLH (36nl) u pBC kompleks uzrokovalo je karakteristične reakcije (tahipneja) sa smanjenjem u vremenu inspirija ( $T_I$ ) i ekspirija ( $T_E$ ) te malom promjenom u vršnoj aktivnosti freničnog živca (PPA). Mikroinjektiranje 8OH-DPAT i DOI (strelice) na isto mjesto nije imalo učinka. Slika 11B: Primjer načina računanja prosječne promjene  $T_E$  nakon administracije DLH ( $\Delta T_E$ ). Prosječna promjena  $T_E$  od vrijednosti prije početka administracije izračunata je na temelju vrijednosti  $T_E$  između vertikalnih iscrtkanih linija.

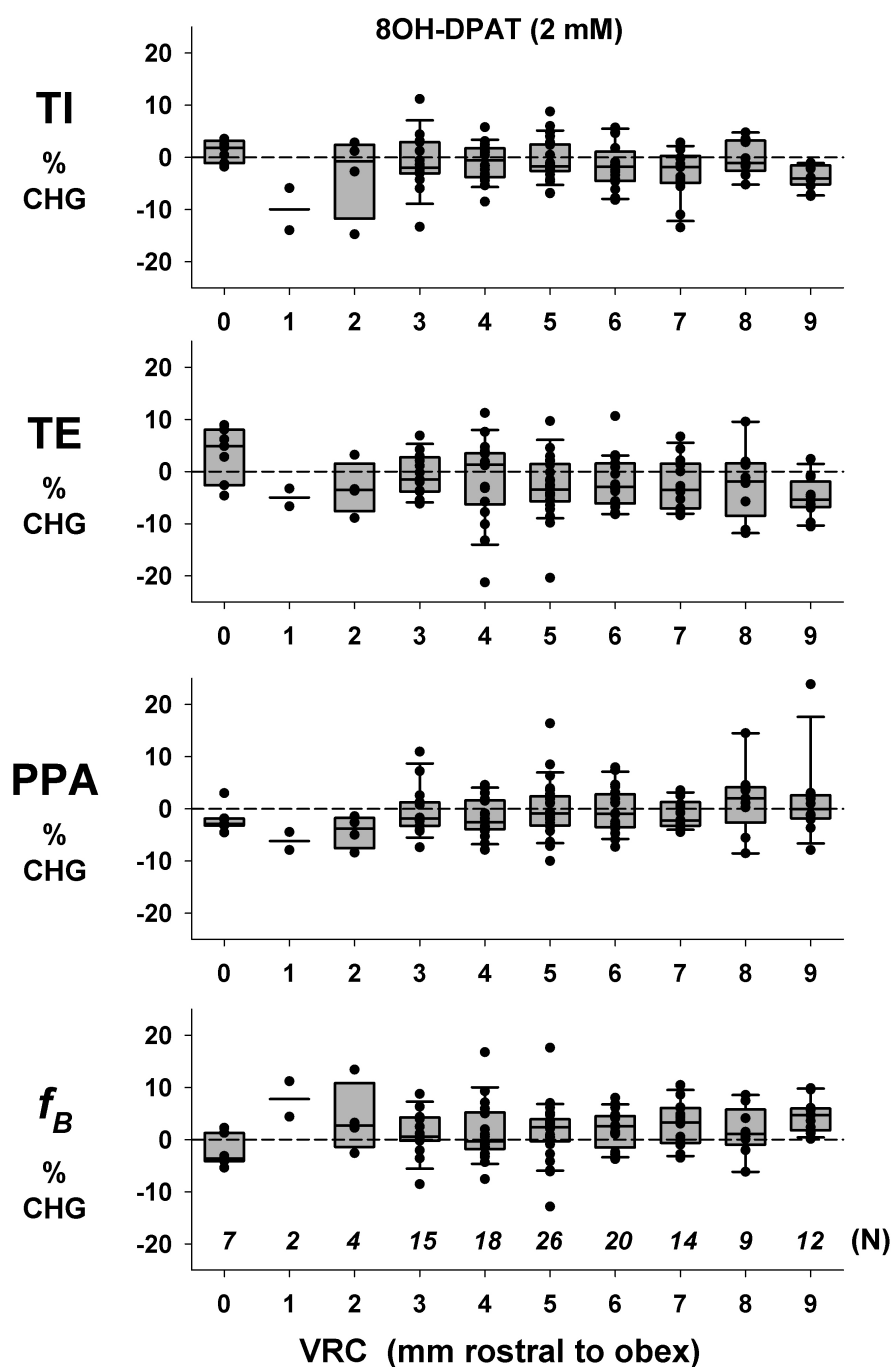


**Slika 12.** Skupni podatci odgovora (postotak (%) od kontrole) na mikroinjektiranje DLH, 8OH-DPAT, DOI i 5-HT (~100 nl svaki osim DLH: ~40 nl) u VRC na različitim udaljenostima od obeksa kod 18 pasa. Prikazane su promjene u vremenu inspirija ( $T_I$ ), ekspirija ( $T_E$ ) i vršnoj freničnoj aktivnosti (PPA). Samo je DLH uzrokovao značajne promjene (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Iscrtkana linija predstavlja razinu promjene od 5%. Odgovori na agoniste nisu se znatno razlikovali od nule.

Zbog vjerojatnosti da mikroinjektiranjem 8OH-DPAT nije bilo zahvaćeno dovoljno respiratornih neurona ili da koncentracija istog nije bila dovoljna za uzrokovanje promjene u neurogramu freničnog živca (PNG), kod dodatnih 13 pasa provedeno je dodatno testiranje. Dodatno testiranje provedeno je mikroinjektiranjem 8OH-DPAT većih volumena i koncentracija ( $468 \pm 9$  nl i 2 mM). Mikroinjektirani su respiratorni neuroni unutar VRC od obeksa pa do 9 mm rostralno od obeksa u razmacima od 1 mm. Na svakom mjestu nakon aplikacije istraživane supstance nastavljeno je snimanje neuralne aktivnosti u periodu od 20-30 minuta kako bi se dopustio povratak neuralne aktivnosti na kontrolne vrijednosti. Primjer protokola prikazan je na *slici 13*. Na slici je vidljiv učinak mikroinjektiranja DLH-a s karakterističnim odgovorom, kao i mikroinjektiranje 390 nl 8OH-DPAT (linija c) koje je uzrokovalo malo smanjenje frekvencije disanja ( $f_B$ )(linija d, BPM) i to nakon vremenskog odmaka od 3 minute.



**Slika 13.** Primjer protokola mikroinjektiranja 390 nl, 2 mM 8OH-DPAT. DLH je izazvao karakterističnu tahipnoičnu reakciju (BPM vidljivo kao linija d) nakon mikroinjektiranja u VRC 5.3 mm rostralno od obeksa unutar jedne minute od davanja što je karakteristično za pBC kompleks. Na slici je prikazan i frenični neurogram PNG (linija a) i vremenski razvučeni PNG (linija b). Mikroinjektiranje 390 nl 8OH-DPAT (linija c) na istom mjestu uzrokovalo je malo smanjenje frekvencije disanja ( $f_B$ ) s vremenskim odmakom od ~3 min. (vidljivo na koordinati BPM prikazano strelicom u odnosu na liniju d). Analizom prikupljenih podataka izveden je zaključak kako veća količina više koncentracije 8OH-DPAT uzrokuje promjene u  $T_I$ ,  $T_E$ , PPA i  $f_B$ , međutim te su promjene manje od 10% u odnosu na kontrolu (*slika 14, ispunjeni simboli*). Statistička analiza pokazala je kako odgovori nisu značajno različiti od nule na svim lokacijama (iscrtkana horizontalna linija). Na slici su prikazani 10., 25., 50., 75. i 90. percentila.

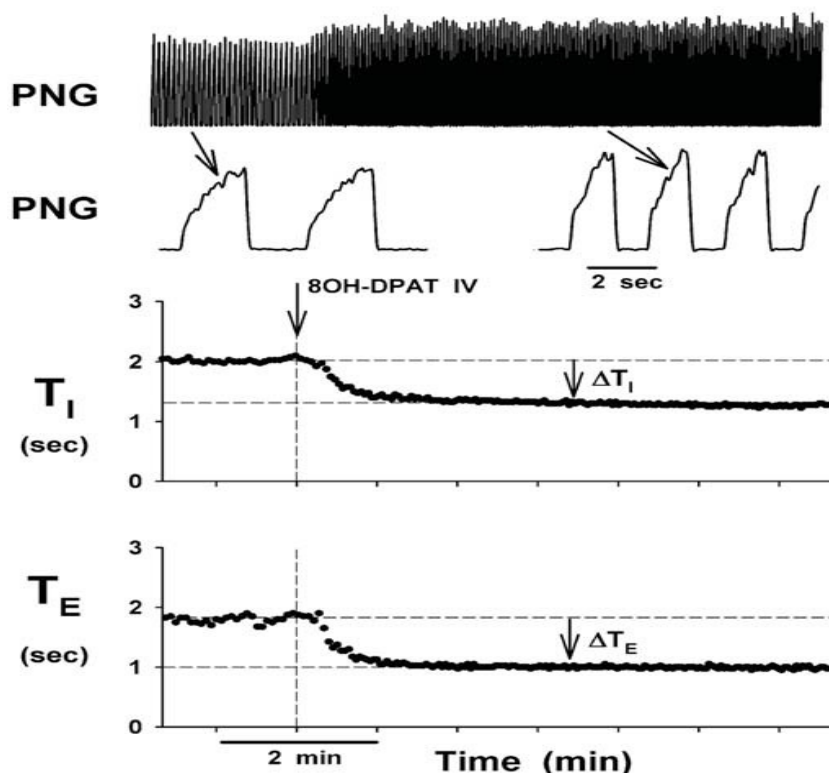


**Slika 14.** Skupni podatci za  $T_I$ ,  $T_E$ , PPA i  $f_B$  prikazani kao postotak (%) promjena od kontrole pokazali su kako je mikroinjektiranje većih volumena i koncentracija 8OH-DPAT uzrokovalo promjene < 10% od kontrole (iscrtkana linija). Puni kružići predstavljaju individualne odgovore. Kvadratići prikazuju percentile. 25.: donji rub kvadratića, 50.: crtica unutar kvadratića, 75.: gornji rub kvadratića. 10. i 50.: crtice ispod i iznad kvadratića. U 13 pasa mikroinjektiran je volumen od  $468 \pm 9$  nl u svako mjesto. Dopušteno je 20-30 minuta između mikroinjektiranja za mogući oporavak. Statistički je pokazano kako se odgovori na svim mjestima nisu znatno razlikovali od nule (iscrtkana linija).

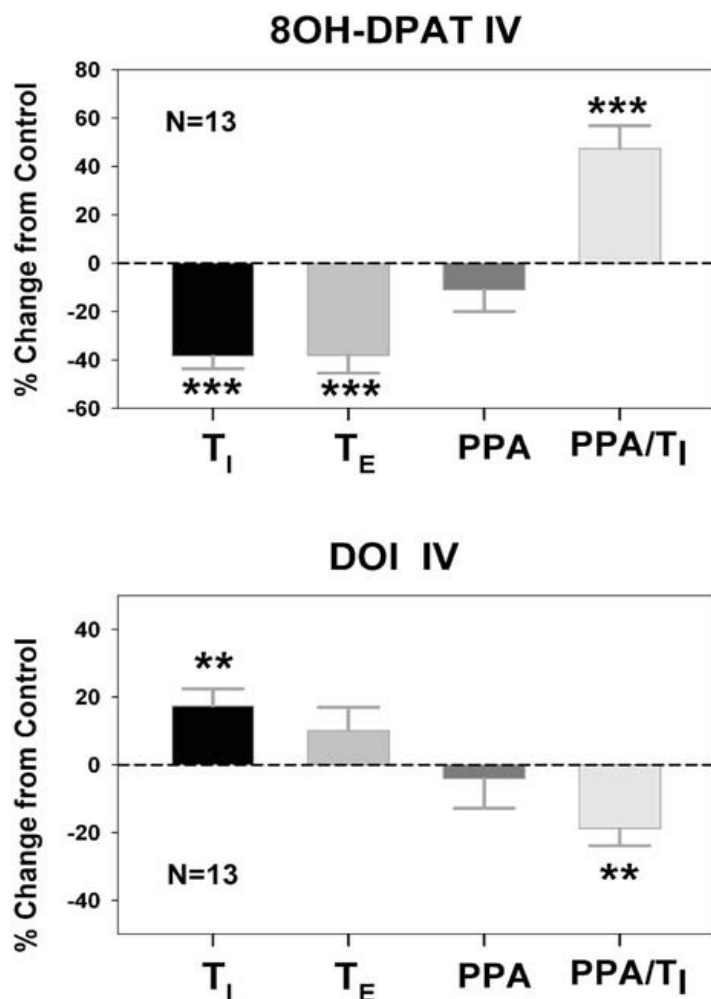
### 5.3 Protokol 3: Učinak sistemske (intravenske, tj. IV) aplikacije 8OH-DPAT i DOI na aktivnost freničnog živca

Tipičan odgovor na sistemsku (intravensku tj. IV) primjenu 8OH-DPAT bila je brza i dugotrajna tahipneja (> 60 min) zbog smanjenja u vremenu inspiririja ( $T_I$ ) i ekspiririja ( $T_E$ ) (slika 15). Odgovori su kvantificirani bilježenjem prosječnoga odgovora jednu minutu prije primjene i kroz jednu minutu nakon primjene tijekom tzv. *steady-state* uvjeta što je prikazano kao  $\Delta T_I$  i  $\Delta T_E$  na slici 15. Skupni podatci prikupljeni kod 13 pasa prikazani su na slici 16. Maksimalan učinak postignut je pri dozi 8OH-DPAT od  $19 \pm 2 \mu\text{g/kg}$ , koja je uzrokovala redukciju u  $T_I$  i  $T_E$  za ~40%, ali bez znatnog učinka na vršnu aktivnost freničnog živca (PPA). Međutim, respiratorni poticaj (PPA/ $T_I$ , slika 16) bio je znatno povećan zbog redukcije u  $T_I$ .

Za razliku od učinka 8OH-DPAT-a, DOI je nakon sistemske primjene imao suprotni učinak. Ponajprije je uzrokovao produžetak  $T_I$  s vrlo malim učinkom na  $T_E$  i PPA. DOI u koncentraciji od  $235 \pm 48 \mu\text{g/kg}$  kod 13 pasa povećao je  $T_I$  za  $17.4 \pm 5.1 \%$ , ali nije utjecao na  $T_E$  i PPA (slika 16). PPA/ $T_I$  omjer se smanjio zbog povećanja  $T_I$ .



**Slika 15.** Primjer sistemske (IV) primjene 8OH-DPAT. Oznaka strelice pokazuje izraženu tahipnoičnu reakciju.

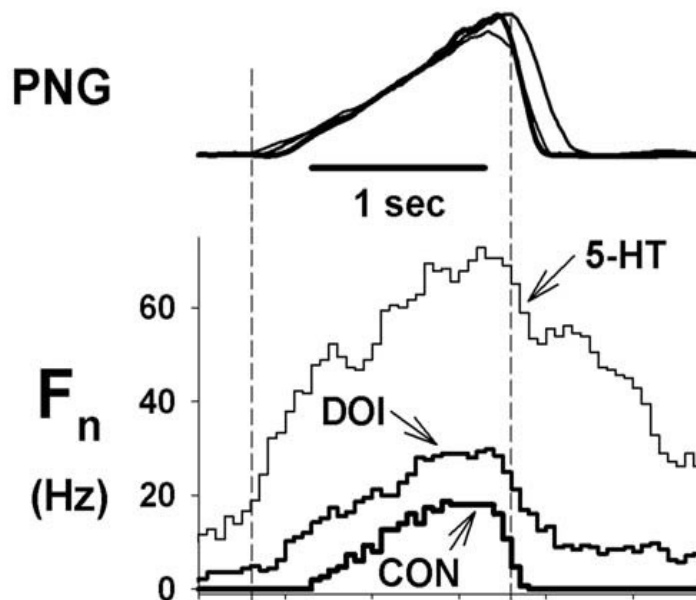


**Slika 16.** Skupni podatci za IV primijenjene 8OH-DPAT i DOI prikazani kao postotci (%) promjena od kontrole za T<sub>I</sub>, T<sub>E</sub>, PPA i PPA/T<sub>I</sub>. 8OH-DPAT uzrokovao je znatno smanjenje T<sub>I</sub>, T<sub>E</sub> i porast PPA/T<sub>I</sub>, dok je DOI uzrokovao porast T<sub>I</sub> i smanjenje PPA/T<sub>I</sub>. 8OH-DPAT doza: 19±2 µg/kg (57±5 nmol/kg). DOI doza: 235±48 µg/kg (656±135 nmol/kg). n=13 psa.

### Učinak DOI u odnosu na 5HT

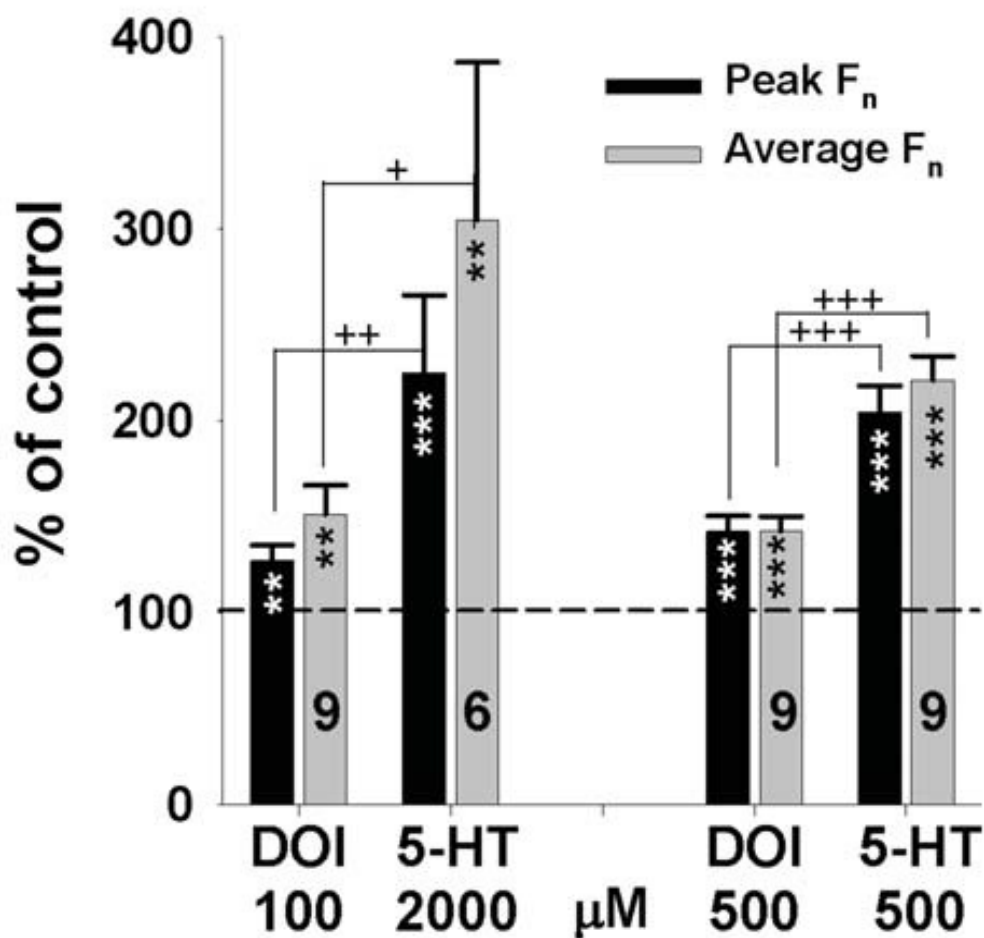
S obzirom na činjenicu da pikoinjektiranja različitih koncentracija DOI unutar pBC kompleksa nisu utjecala na I-neurone i E-neurone, postavljeno je pitanje imaju li iste koncentracije možda učinak na IHMN (inspiratorni motoneuron hipoglosnog živca). Poznato je kako na IHMN-u postoje 5HT<sub>2A</sub> receptori te da se njihova aktivnost povećava nakon primjene 5HT.<sup>(2,67)</sup> Pikoinjektiranje DOI (100 µM) uzrokovalo je blagi porast frekvencije (F<sub>n</sub>) IHMN u odnosu na pikoinjektiranje 5HT na isti IHMN (*slika 17*). Brzina davanja supstanci postupno je povećavana dok nije postignut maksimalan

učinak na aktivnost neurona. Ukupni rezultati 9 neurona sa 6 potpunih protokola pokazuju kako je DOI uzrokovao malen, ali bitan porast u vršnoj ( $27 \pm 8 \%$ ) i prosječnoj ( $51 \pm 15 \%$ ) frekvenciji ( $F_n$ ) IHMN-a. Pikoinjektiranje 5HT (2 mM) dovelo je do porasta vršne ( $125 \pm 40 \%$ ) i prosječne ( $205 \pm 82 \%$ ) frekvencije ( $F_n$ ) IHMN-a (slika 18). Iako su afiniteti vezanja DOI i 5HT za  $5HT_{2A}$  receptore prema studijama u kojima su korišteni testovi vezanja radioliganda u nižim nanomolarnim vrijednostima, cilj je bio pokazati razliku u učinku in vivo stoga su korištene iste koncentracije obje supstance. Istraživan je učinak 500  $\mu$ M DOI i 500  $\mu$ M 5HT na 9 neurona čime je izveden sličan zaključak (slika 18). DOI je utjecao na porast vršne i prosječne frekvencije ( $F_n$ ) za  $42.6 \pm 8 \%$  i  $42.9 \pm 8 \%$ , dok je 5HT doveo do porasta vršne frekvencije ( $F_n$ ) za  $104 \pm 14 \%$ , a prosječne frekvencije ( $F_n$ ) za  $121.3 \pm 13 \%$ . Učinak 5HT na neurone bio je znatno veći u oba protokola od učinka DOI (slika 17 i 18). Povećanje koncentracije DOI sa 100 na 500  $\mu$ M nije utjecalo na promjenu učinka kao ni promjena koncentracije 5HT s 2 mM na 500  $\mu$ M. Zaključak je kako je učinak 5HT ~ 3 puta veći nego učinak DOI na pseće IHMN. Dodatni pokusi pokazali su i kako je 2 mM 5HT na 10 pBC respiratorna neurona bio bez učinka.



**Slika 17.** Učinak DOI značajno je manji od učinka 5HT na  $5HT_{2A}$  receptore na inspiratornim motoneuronima hipoglosnog živca (IHMN) u psa. Primjer pokazuje maksimalan odgovor ( $F_n$ ) IHMN na pikoinjektiranje DOI i 5HT. Znatno je veći odgovor na 5HT, gdje se čak povećala aktivnost za vrijeme ekspiratorne faze. Iscrtkane linije odvajaju inspiratornu od ekspiratorne faze.





**Slika 18.** Skupni podatci za vršnu i prosječnu frekvenciju (postotak (%) od kontrole) za 100  $\mu$ M DOI i 2 mM 5HT za 9 IHMN neurona i 6 potpuno završenih protokola, te skupni podatci za vršnu i prosječnu frekvenciju za pikoinjektiranje 500  $\mu$ M DOI i 500  $\mu$ M 5HT. Između pikoinjektiranja DOI i 5HT dopušten je period od 20 do 30 minuta za oporavak. Ukupni porast uzrokovan s 5HT bio je ~3 puta veći od onog uzrokovanog s DOI. Razlika od kontrole: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Razlika između odgovora na 5HT i DOI: +  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$ .

## 6. RASPRAVA

Ova studija pokazala je kako sistemski primijenjeni agonisti 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptora imaju izražajan modulirajući učinak na disanje, međutim taj učinak ne postižu djelovanjem na specifične receptore smještene na respiratornim neuronima unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) i preBötzingera (pBC) kompleksa. Na modelu decerebriranog psa sistemska primjena 8OH-DPAT, agonista 5HT<sub>1A</sub> receptora, uzrokovala je ubrzanje disanja zbog ~40 % smanjenja u vremenu inspiriraja (T<sub>I</sub>) i ekspiriraja (T<sub>E</sub>) (*slika 15 i 16*), istovremeno vršna aktivnost freničnog živca (PPA) nije se značajno promijenila. Kada je 8OH-DPAT pikoinjektiran izravno na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa smanjila se aktivnost (frekvencija, F<sub>n</sub>) tih neurona za ~40 %, pritom su I-neuroni bili suprimirani pri manjim koncentracijama agonista (1 μM) nego E-neuroni. Međutim, primjena većeg volumena i više koncentracije 8OH-DPAT na grupu respiratornih neurona unutar VRC i pBC kompleksa od one primijenjene na pojedinačne neurone uzrokovala je male promjene aktivnosti neurona što je rezultiralo manjom promjenom u frekvenciji disanja, a to nikako nije bilo u skladu s velikim promjenama nakon sistemske primjene istog. Intravenska primjena selektivnog agonista 5HT<sub>2A</sub> receptora (DOI) dovela je do usporenja disanja uslijed porasta T<sub>I</sub> za ~20 %, ali bez ikakva značajnog učinka na T<sub>E</sub> i PPA (*slika 16*). Pikoinjektiranja visokim koncentracijama (100 μM) DOI na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa nisu imala nikakav učinak na aktivnost I-neurona i E-neurona, što upućuje na činjenicu da 5HT<sub>2A</sub> receptori ili nisu prisutni na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa kod psa ili nisu funkcionalni. Ukratko, iz rezultata ove studije može se zaključiti kako promjene u disanju nastale nakon sistemske primjene agonista 5HT receptora (8OH-DPAT i DOI) nisu nastale aktivacijom tih receptora na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC) u produženoj moždini.

### 6.1. 5HT<sub>1A</sub> receptori na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa

Podatci o promjenama u odnosu na danu dozu (*slika 8*) pokazali su kako je 8OH-DPAT na I-neuronima postigao maksimalna depresiju aktivnosti već pri koncentraciji od 1 μM, dok je maksimalna depresija aktivnosti E-neurona postignuta pri koncentraciji >10 μM. Razlika u učinkovitosti nastala je vjerojatno zbog razlike u

broju i distribuciji receptora između I-neurona i E-neurona, međutim trenutačno nema kvantitativnih podataka o gustoći receptora koji bi potvrdili tu pretpostavku. Naši rezultati slični su rezultatima dobivenima studijama u kojima se koristila mikroiontoforeza 8OH-DPAT (40 nM) na E-neurone u kaudalnoj VRC anesteziranih mačaka,<sup>(34)</sup> a koje su pokazale kako dolazi do hiperpolarizacije membrane i smanjenja membranskog otpora. Opisano upućuje na postsinaptičku depresiju u skladu s aktivacijom G-proteinskih receptora koji utječu na porast propusnosti K<sup>+</sup> kanala. Mogući izvor te inhibicije endogeno je oslobađanje serotonina iz neurona u *nucleus raphe obscurus* u moždanom deblu pošto je električna stimulacija neurona u *nucleus raphe obscurus* izazvala inhibiciju E-neurona u kaudalnoj VRC.<sup>(36)</sup> Aktivnost freničnog živca nije pogođena mikroiontoforezom. Međutim, sistemska primjena 8OH-DPAT uzrokuje depresiju vršne aktivnosti freničnog živca (PPA) što upućuje na mrežni učinak i smanjeni presinaptički input na E-neurone.<sup>(34)</sup>

U suprotnosti s inhibicijom I-neurona unutar VRC u psa s 8OH-DPAT, Schwarzacher i suradnici<sup>(57)</sup> su pokazali kako je lokalna iontoforeza 8OH-DPAT uzrokovala depolarizaciju većine pBC I-neurona (10/16) i porast membranskih otpora u većini neurona pBC kompleksa na modelu rezova kroz produženu moždinu novorođenih štakora. Međutim, iontoforeza 8OH-DPAT uzrokovala je hiperpolarizaciju četiri pBC E-neurona što se podudara s rezultatima ove studije na odraslim psima. Kako su navedeni rezultati dobiveni na perinatalnim preparatima in vitro, vjerojatno postoje razlike u prisutnosti receptora između ta dva tipa eksperimentalnih modela.

Moguće je kako je učinak 8OH-DPAT proizašao iz njegova djelovanja na 5HT<sub>7</sub> receptore koji su prisutni na 70-80% neurona unutar pBC kompleksa s 5HT<sub>1A</sub> receptorima, a što je potvrđeno imunohistokemijskim analizama.<sup>(40)</sup> 8OH-DPAT je visoko selektivan za 5HT<sub>1A</sub> receptore s disocijacijskom konstantom (K<sub>d</sub>) od ~2 nM,<sup>(19)</sup> ali može aktivirati i 5HT<sub>7</sub> receptore u većim koncentracijama (~250 nM).<sup>(18, 65)</sup> Međutim, aktivacijom 5HT<sub>7</sub> receptora raste koncentracija cAMP u stanici<sup>(29)</sup> što uzrokuje porast podražljivosti neurona.<sup>(1)</sup> Manzke i suradnici<sup>(40)</sup> pokazali su kako sistemska primjena agonista 5HT<sub>7</sub> receptora na modelu moždano deblo – kralježnična moždina in vitro, dovodi do porasta T<sub>E</sub> i smanjenja PPA, dok agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora (8OH-DPAT) dovodi do smanjenja T<sub>E</sub> i blagog porasta PPA. Ovi rezultati upućuju na to kako unatoč mogućoj aktivaciji 5HT<sub>7</sub> receptora, dominantan

učinak lokalne primjene 8OH-DPAT nastaje pod utjecajem aktivacije 5HT<sub>1A</sub> receptora.

Smatramo kako je lokalna koncentracija agonista u studiji Lalley i suradnika<sup>(34)</sup> kao i tijekom mikroinjektiranja na grupu respiratornih neurona u VRC u ovoj studiji, znatno veća od klinički značajne koncentracije na mjestu djelovanja (effect-site) agonista danih sistemski a koji su doveli do značajne promjene u disanju. Spomenuta koncentracija relativno je niska (nM ili niske  $\mu$ M koncentracije), međutim utjecala je na disanje. Daljnjim studijama trebalo bi utvrditi koncentracije agonista na razini respiratornih neurona koje dovode do učinka kako bi se odredilo jesu li koncentracije na mjestu djelovanja (effect-site) dovoljne da izravno utječu na neurone u ovoj studiji, kao prilikom sistemske primjene agonista.. Mikroinjektirana lokalna koncentracija 8OH-DPAT u ovoj studiji dokazano je morala biti  $>1 \mu$ M kako bi se postigao učinak. Ta koncentracija puno je veća od one koja se lokalno postiže nakon sistemske primjene, a koja uzrokuje izraženu tahipneju.

## 6.2. 5HT<sub>2A</sub> receptori na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa

Respiratorni neuroni unutar pBC kompleksa kod psa nisu promijenili svoju aktivnost nakon pikoinjektiranja 10  $\mu$ M i 100  $\mu$ M koncentracije selektivnog agonista 5HT<sub>2A</sub> receptora DOI (*slika 9 i 10*). Prema difuzijskom modelu te koncentracije su veće nego procijenjena disocijacijska konstanta K<sub>d</sub> od 1.5-1.7 nM.<sup>(10, 31)</sup> Ovaj nalaz poprilično je neočekivan s obzirom da su Lalley i suradnici<sup>(35)</sup> dokazali kako mikroiontoforeza selektivnog agonista 5HT<sub>2A</sub> receptora (alfa-methyl-5HT) dovodi do ekscitacije E-neurona i I-neurona u kaudalnoj VRC kod anesteziranih mačaka. Unutarstanična mjerenja na tim neuronima pokazala su kako je agonist uzrokovao depolarizaciju membrane i povećan membranski otpor, a to se djelomično objašnjava time što se aktivacijom 5HT<sub>2A</sub> receptora smanjuje provođenje K<sup>+</sup> iona. Međutim, spomenuti neuroni kod mačaka locirani su kaudalnije od istraživanih pBC neurona u ovoj studiji.

S ciljem dokazivanja kako neučinkovitost DOI na respiratorne neurone unutar pBC kompleksa proizlazi iz toga što na tim neuronima ili nema 5HT<sub>2A</sub> receptora ili nisu u funkciji, a ne iz suviše niske koncentracije, ispitan je učinak DOI na inspiratornim motoneuronima hipoglosnog živca (IHMN) u psa. Poznato je kako pseći

IHMN sadrži 5HT<sub>2A</sub> receptore koji se mogu blokirati selektivnim antagonistom 5HT<sub>2A</sub> receptora (ketanserina).<sup>(2, 3)</sup> Pikoinjektiranje DOI kao i 5HT na IHMN je utjecalo na porast aktivnosti neurona, no ipak samo trećinu porasta kakvu je uzrokovao 5HT (slika 18), bez obzira što je afinitet 5HT (16-30 nM) za receptore manji od afiniteta DOI (1.5-1.7 nM), što je utvrđeno testovima vezanja radioliganda kod ljudi.<sup>(10, 31)</sup> Veća molekularna masa DOI (M<sub>r</sub>= 321) u odnosu na 5HT (M<sub>r</sub>= 176) mogla bi promijeniti karakteristike vezanja za receptore ili posljedične unutarstanične aktivnosti. S druge strane, rezultati ove studije na IHMN sukladni su sa studijama koje su uspoređivale utjecaj DOI, alfa-metil-5HT i 5HT na kontrakcije vaskularnih glatkih mišića,<sup>(5)</sup> prema kojima je učinak DOI bio od 5 do 30 % učinka 5HT i alfa-metil-5HT. Zbog te neznatne farmakološke učinkovitosti, mala je vjerojatnost kako su korištene koncentracije DOI bile nedovoljne u postizanju učinka na respiratornim neuronima pBC kompleksa. Bez učinka bilo je i pikoinjektiranje koncentriranog 5HT (5 mM) na respiratorne neurone unutar pBC kompleksa (n=10). S obzirom da su koncentracije u mozgu koje su utjecale na disanje postignute nakon sistemske primjene DOI, a koje su znatno manje od onih izravno danih na neurone, zaključeno je da 5HT<sub>2A</sub> receptori na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa ne utječu bitno na kontrolu disanja.

### 6.3. Utjecaj neurona unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) u odgovoru na sistemsku (IV) primjenu 5HT agonista

U ovoj studiji sistemski (intravenski tj. IV) primijenjen 8OH-DPAT (~20 µg/kg) uzrokovao je ~40 % smanjenje T<sub>I</sub> i T<sub>E</sub> s vrlo malim učinkom na PPA, dok je sistemski primijenjen DOI (~240 µg/kg) doveo do povećanja T<sub>I</sub> za ~20 % istovremeno bez učinka na T<sub>E</sub> i PPA (slika 16). Kako bi se utvrdilo je li sistemski učinak nastao izravnim utjecajem na 5HT receptore na respiratornim neuronima unutar pBC kompleksa i VRC izvršeno je mikroinjektiranje 8OH-DPAT u koncentraciji od 200 µM na grupu respiratornih neurona unutar VRC i pBC kompleksa. Ta je koncentracija 8OH-DPAT veća od one koja je izazvala učinak na pojedinačnim neuronima (1-10 µM). Mikroinjektiran je i DOI (200 µM) i 5HT (20 mM) na grupe respiratornih neurona unutar VRC, uključujući i pBC kompleks. Približno izračunata koncentracija agonista na mjestu djelovanja (*effect-site*), temeljena na gore navedenim dozama te koristeći kombinirano volumen plazme i volumen izvanstanične tekućine od 241 ml/kg tjelesne težine, bila je ~0.3 µM i ~3 µM za 8OH-DPAT i DOI. Da su sistemski primijenjeni

agonisti svoj učinak na respiraciju postigli djelujući na receptore na respiratornim neuronima unutar VRC tada bi koncentracije 8OH-DPAT (200  $\mu$ M) i DOI (200  $\mu$ M) koje su bile mikroinjektirane na grupe respiratornih neurona unutar VRC trebale biti dovoljne da aktiviraju 5HT receptore i dovedu do odgovarajućeg učinka. Također volumen od 100 nl agonista gore navedenih koncentracija s procijenjenim promjerom širenja od  $\sim$ 500  $\mu$ m, nije uzrokovao odgovor freničnog živca. Smatra se kako su mikroinjektirana koncentracija i volumen u VRC bili dostatni zahvatiti dovoljno veliki broj respiratornih neurona u VRC te izazvati promjene u disanju. Volumen DLH (<40 nl) kao i volumen agonista  $\mu$ -opioidni receptora DAMGO ( $\sim$ 100 nl),<sup>(46)</sup> oboje manji od danog volumena 8OH-DPAT, doveli su do značajnog odgovora freničnog živca, što znači kako je volumen <40 nl mikroinjektiranih u VRC bio dovoljan da izazove odgovor freničnog živca.

S obzirom na to da je ova studija dokazala kako su I-neuroni i E-neuroni inhibirani lokalnom primjenom 8OH-DPAT u koncentraciji od 1  $\mu$ M za I-neurone, očekivano je kako će koncentracija od 200  $\mu$ M 8OH-DPAT mikroinjektirana u VRC uzrokovati globalan učinak, sličan onom nakon sistemske primjene. Stoga je izostanak ikakva odgovora freničnog živca bio iznenađujući. Kako bi se odstranila mogućnost primjene premale lokalne koncentracije, napravljena je dodatna studija u kojoj se radi obuhvaćanja većeg broja neurona mikroinjektiralo s 2 mM 8OH-DPAT (procijenjenog promjera  $\sim$ 800  $\mu$ m), što je 10 puta veća koncentracija od prethodnih 200  $\mu$ M i 5 puta veći volumen ( $\sim$ 500 nl). Mikroinjektiranje na respiratorne neurone unutar VRC i pBC kompleksa nije postiglo nikakav značajan učinak na  $T_I$ ,  $T_E$ , PPA i  $f_B$  (slika 14).

Za razliku od gore spomenutog, obostrana mikroinfuzija 5HT i iontoforeza 5HT u pBC kompleks na modelu presjeka kroz produženu moždinu neonatalnih štakora, uzrokovala je porast neuralne aktivnosti hipoglosnog živca.<sup>(52, 57)</sup> Smatra se kako je taj učinak postignut djelovanjem na 5HT<sub>2A</sub> receptore jer selektivni antagonist 5HT<sub>2A</sub> receptora uspijeva blokirati navedeni učinak.<sup>(57)</sup> Ovo istraživanje s DOI (selektivnim agonistom 5HT<sub>2A</sub> receptora) nije pokazalo nikakve promjene u  $T_I$ ,  $T_E$  i PPA. Ta je razlika između istraživanja moguća s obzirom na razliku in vivo/in vitro modela, kao i na razvojnu razliku između odraslog i neonatalnog modela.

#### 6.4. Mogući mehanizmi zbog kojih je mikroinjektiranje 8OH-DPAT u VRC bez učinka

U modelu decerebriranog psa prisutne su značajne razine serotonina jer se prije primijetilo<sup>(2)</sup> kako je pod sličnim eksperimentalnim uvjetima pikoinjektiranje 5HT antagonista (ketanserina) na IHMN smanjilo vršnu frekvenciju za  $68 \pm 15 \%$  ( $n=21$ ). U anestetiziranih mačaka, sistemska primjena selektivnog antagonista 5HT<sub>1A</sub> receptora (NAN-190) uzrokovala je porast aktivnosti E-neurona i freničnog živca<sup>(36)</sup> pokazujući time značajnu razinu inhibicije 5HT neuralne aktivnosti. Kad bi mikroinjektiranje 8OH-DPAT uzrokovalo presinaptičku inhibiciju putem autoreceptora na krajevima 5HT neurona, dogodila bi se značajna disinhibicija VRC neurona uz istodobnu postsinaptičku inhibiciju VRC neurona. Dakle, ta dva učinka imaju suprotan, isključujući učinak koji bi uzrokovao malu ili gotovo nikakvu promjenu u neuralnoj aktivnosti, a svakako nedovoljnu da se uoče promjene u freničnom neurogramu (PNG). Međutim, autoreceptori na krajevima 5HT neurona su 5HT<sub>1B</sub><sup>(43)</sup>, a učinak presinaptičke inhibicije preko 5HT<sub>1B</sub> receptora je značajan. Pokazalo se kako selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina (paroksetin) utječe na velik porast 5HT u frontalnom korteksu kada su 5HT autoreceptori i na somatodendritima (5HT<sub>1A</sub>) i živčanim završecima (5HT<sub>1B</sub>) neurona u *nucleus raphe obscurus* blokirani.<sup>(58)</sup> Kad su samo 5HT<sub>1A</sub> receptori bili blokirani paroksetinom koncentracija 5HT u korteksu dvostruko je porasla, a kad su bili blokirani i 5HT<sub>1B</sub> receptori taj porast bio je peterostruk. Iako su male koncentracije 8OH-DPAT učinkovito dovele do presinaptičke inhibicije *nucleus raphe obscurus* 5HT neurona najvjerojatnije zbog velike rezerve receptora,<sup>(42)</sup> pokazalo se kako 8OH-DPAT ne djeluje na 5HT<sub>1B</sub> receptore.<sup>(17)</sup> Dakle, presinaptička inhibicija oslobađanja 5HT na živčanim završecima putem 8OH-DPAT najvjerojatnije je minimalna stoga to ne može biti razlog neučinkovitosti mikroinjektiranja.

Veća je vjerojatnost kako je to rezultat sinaptički uzrokovane disinhibicije kombinirane s postsinaptičkom inhibicijom. Modulacija disanja preko 5HT<sub>1A</sub> receptora ponajprije se odnosi na inhibiciju glicinskim sinapsama.<sup>(40)</sup> Prema imunohistokemijskim analizama na mladim štakorima ~62 % pBC neurona su glicinski jer pokazuju imunoreaktivnost na glicin transporter (GlyT2), a ~80 % glicinskih neurona pokazuju na sebi ekspresiju 5HT<sub>1A</sub> receptora. S obzirom na stajališta kako glicinski neuroni imaju glavnu ulogu u sinaptičkoj inhibiciji unutar

respiratorne mreže, njihova postsinaptička inhibicija s 8OH-DPAT trebala bi promijeniti ritam disanja.<sup>(40)</sup> Nedavno istraživanje, na modelu miša bez centralnih 5HT neurona, ali s ekspresijom 5HT<sub>1A</sub> receptora (LMX1B model)<sup>(7)</sup> pokazalo je kako je 8OH-DPAT uzrokovao prolazni porast aktivnosti hipoglosnog živca dok u normalnog miša nije. Ove ekscitacije nije bilo kad je sinaptička inhibicija bila blokirana antagonistima GABA/glicinskih receptora, što upućuje kako je ekscitacija bila posljedica disinhibicije.

U pokusnom modelu ove studije pokazano je kako mnogi respiratorni neuroni u VRC imaju GABA-ergičku inhibiciju.<sup>(41,68)</sup> Blokada glicinske inhibicije strihninom imala je vrlo malen učinak na neuralnu aktivnost.<sup>(32)</sup> Postsinaptička inhibicija GABA-ergičkih neurona s 8OH-DPAT u VRC mogla bi uzrokovati disinhibiciju VRC respiratornih neurona i time prekinuti postsinaptičku inhibiciju.

Alternativno, globalna neučinkovitost mikroinjektiranja 8OH-DPAT možda je povezana s veličinom učinka na VRC neurone. Koncentracija je bila dovoljno visoka da izazove maksimalnu stimulaciju postsinaptičkih 5HT<sub>1A</sub> receptora, a mikroinjektirani volumeni bili su dovoljno veliki obuhvatiti dostatan broj neurona i izazvati globalan učinak. Prema tome, vjerojatno objašnjenje zašto mikroinjektiranje 8OH-DPAT na respiratorne neurone u VRC nije imalo učinak vidljiv na freničnom neurogramu (PNG) je taj što razmjer djelovanja na neurone nije bio dovoljan za globalni učinak. S druge strane pak mali volumen DLH uzrokovao je velike promjene u aktivnosti neurona VRC djelujući pritom na manji broj neurona, a što je dovelo do velikoga globalnog učinka.

## 6.5. Druge lokacije

Moguće je kako tahipneja nakon sistemske primjene 8OH-DPAT nastaje djelovanjem na 5HT<sub>1A</sub> receptore smještene na neuronima izvan pBC kompleksa. Promjena membranskog potencijala i aktivnosti neurona koje su primijetili Manzke i suradnici,<sup>(40)</sup> mogla je nastati zbog promjene u sinaptičkom inputu u respiratornoj mreži od neurona smještenih izvan ventralne respiratorne grupe (VRC) i pBC kompleksa. Tome u prilog ide i studija Ren i suradnika<sup>(53)</sup> u kojoj je sistemska aplikacija Befiradola (agonista 5HT<sub>1A</sub> receptora) djelomice dovela do reverzije fentanilom uzrokovane depresije disanja kod štakora. Međutim, primjena Befiradola



na in vitro modelima (preparat moždano deblo – kralježnična moždina i preparat moždanog debla s pBC kompleksom) nije imala učinak na depresiju neuralne aktivnosti uzrokovanu s DAMGO. Befiradol je ovisno o dozi doveo do porasta frekvencije disanja i volumena udara (*tidal volume*) za vrijeme fentanilom uzrokovane depresije disanja kod štakora i to s većim učinkom na frekvenciju nego na volumen udara.

Razna istraživanja pokazala su da bi 5HT agonisti mogli modulirati disanje djelujući na druge lokacije osim pBC kompleksa i VRC. Ovisno o dozi, 8OH-DPAT primijenjen na ventralnu površinu produžene moždine kod mačke u intermedijalnoj i kaudalnoj regiji bogatoj kemoreceptorima utjecao je na porast frekvencije disanja, ali ne i PPA,<sup>(27)</sup> što je slično učinku u našem modelu sa sistemskom primjenom. Zbog blizine ventralne površine produžene moždine, pretpostavljeno je da je učinak postignut djelovanjem na neurone u *nucleus raphe obscurus* i RTN. Pošto neuroni iz *nucleus raphe obscurus* inerviraju VRC neurone,<sup>(38)</sup> a i električna stimulacija neurona *nucleus raphe obscurus* uzrokuje bradipneju i apneju,<sup>(36)</sup> moguće je kako agonisti 5HT<sub>1A</sub> receptora (kao 8OH-DPAT) uzrokuju reverziju depresije disanja preko inhibicije neurona u *nucleus raphe obscurus*. Lokalna stimulacija neurona u RTN s 5HT dovela je do porasta neuralne aktivnosti i PPA, ali bez učinka na frekvenciju disanja.<sup>(45)</sup>

Druga mjesta na kojima je imunohistokemijski pokazana značajna prisutnost 5HT<sub>1A</sub> receptora su: parabrahijalni Kölliker-Fuse kompleks i NTS.<sup>9</sup> Izrazita depresija disanja (čak do apneje) nakon mikroinjektiranja agonista  $\mu$ -opioidnih receptora DAMGO u pseću parabrahijalnu regiju u dorzolateralnom mostu upućuje kako ova regija igra ključnu ulogu u kontroli disanja.<sup>(37, 51)</sup>

S obzirom na to da su 5HT<sub>1A</sub> receptori u imunoreaktivnim studijama dokazani u NTS-u,<sup>(9)</sup> regiji koja integrira impulse iz pulmonalnih receptora,<sup>(33)</sup> NTS također možda igra ulogu u tahipneji uzrokovanoj agonistima 5HT<sub>1A</sub> receptora. Stimulacija kemoreceptora na aorti u psa smanjuje T<sub>I</sub> i T<sub>E</sub> bez učinka na PPA, slično kao i sistemski (IV) 8OH-DPAT.<sup>(28)</sup> Zanimljivo je kako je odgovor na kemoreceptore iz aorte kvalitativno različit od odgovora na aktivaciju karotidnih kemoreceptora, a oboje završavaju u NTS.

## 6.6. Razlike u vrstama

PreBötzinger (pBC) kompleks je dobro definiran na psećem modelu s obzirom na izvanstanično snimljenu mješavinu respiratornih neurona unutar predodređenih koordinata.<sup>(33, 46)</sup> Isti pristup koristio se za pronalazak pBC kompleksa i kod drugih vrsta.<sup>(4, 6, 56, 60)</sup> Također je pBC kompleks unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) identificiran po karakterističnom odgovoru vidljivom u PNG-u, tj. tahipneji (*slika 5*) nakon mikroinjektiranja DLH-a kod različitih vrsta.<sup>(4, 33, 44, 46, 59, 64)</sup> 5HT<sub>1A</sub> receptori su imunohistokemijskim metodama dokazani na neuronima pBC kompleksa kod različitih vrsta.<sup>(20, 21, 24, 25, 27, 39)</sup> S obzirom na slične karakteristike pBC kompleksa kao što su: relativna lokacija unutar VRC, tipovi neurona, kao i odgovor na mikroinjektiranje DLH-a u različitim vrstama sisavaca, smatramo kako neučinkovit odgovor na mikroinjektiranje agonista 5HT<sub>1A</sub> receptora u VRC nije nastao zbog razlike u vrstama. Vjerojatnije je da je on nastao zato što sistemski primijenjeni agonisti, svoj učinak na disanje postižu djelovanjem na neko drugo mjesto i to vjerojatno izvan pBC kompleksa.

## 7. ZAKLJUČAK

Cilj ove studije bio je bolje razumjeti mjesta i mehanizam unutar respiracijske mreže gdje agonisti 5HT<sub>1A</sub> receptora i 5HT<sub>2A</sub> receptora, primijenjeni sistemski (intravenski, tj. IV) djeluju modulirajuće na disanje. Opisanim učinkom na disanje moguće je dovesti do regresije opioidima uzrokovane depresije disanja što bi u konačnici rezultiralo većom primjenom opioida u kliničkoj praksi (poglavito u analgeziji) i bez straha od mogućnosti prestanka disanja. Supstance korištene u ovom istraživanju, 8OH-DPAT (agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora) i DOI (agonist 5HT<sub>2A</sub> receptora) su dovele do promjene u disanju nakon sistemske primjene kao što se i očekivalo. Međutim, nakon primjene na pojedinačne respiratorne neurone unutar pBC kompleksa kao i na grupu respiratornih neurona unutar VRC nije došlo do očekivane promjene u disanju. Rezultati ove studije upućuju kako agonisti svoj modulirajući učinak na disanje ne postižu djelovanjem na neurone u ventralnoj respiratornoj grupi (VRC), uključujući i preBötzinger (pBC) kompleks. Potrebno je napraviti dodatna istraživanja i studije kako bi se otkrilo mjesto, ili mjesta na kojima 5HT agonisti modulirajuće djeluju na disanje.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Bacon WL, Beck SG. 5-Hydroxytryptamine(7) receptor activation decreases low afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;294:672–679.
2. Brandes IF, Zuperku EJ, Stucke AG, Jakovcevic D, Hopp FA, Stuth EA. Serotonergic modulation of inspiratory hypoglossal motoneurons in decerebrate dogs. *J. Neurophysiol.* 2006;95:3449–3459.
3. Brandes IF, Zuperku EJ, Dean C, Hopp FA, Jakovcevic D, Stuth EA. Retrograde labeling reveals extensive distribution of genioglossal motoneurons possessing 5-HT(2A) receptors throughout the hypoglossal nucleus of adult dogs. *Brain Res.* 2007;1132:110-119.
4. Chitravanshi VC, Sapru HN. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat. *Brain Res.* 1999;821:443–460.
5. Cohen ML, Johnson MP, Schenck KW, Sussemichel A, Wainscott DB, Robertson DW, Nelson DL. DOI and alpha-methylserotonin: comparative vascular and nonvascular smooth muscle effects and central 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor affinities. *J Pharmacol Exp. Ther.* 1993;266:943-949.
6. Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex in cats :respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res.* 1992;590:337–340.
7. Corcoran AE, Commons KG, Wu Y, Smith JC, Harris MB, Richerson GB. Dual effects of 5-HT(1a) receptor activation on breathing in neonatal mice. *J.Neurosci.* 2014;34:51–59.
8. Dogas Z, Krolo M, Stuth EA, Tonkovic-Capin M, Hopp FA, McCrimmon DR, Zuperku EJ. Differential effects of GABAA receptor antagonists in the control of respiratory neuronal discharge patterns. *J Neurophysiol.* 1998;80:2368-77.
9. Dutschmann M, Waki H, Manzke T, Simms AE, Pickering AE, Richter DW, Paton JF. The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked

- cardiorespiratory disturbances. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 2009;364:2611–2623.
10. Fitzgerald LW, Conklin DS, Krause CM, Marshall AP, Patterson JP, Tran DP, Iyer G, Kostich WA, Largent BL, Hartig PR. High-affinity agonist binding correlates with efficacy (intrinsic activity) at the human serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors: evidence favoring the ternary complex and two-state models of agonist action. *J Neurochem.* 1999;72:2127-2134.
  11. Garner SJ, Eldridge FL, Wagner PG, Dowell RT. Buspirone, an anxiolytic drug that stimulates respiration. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989;139:946–950.
  12. Gillis RA, Hill KJ, Kirby JS, Quest JA, Hamosh P, Norman WP, Kellar KJ. Effect of activation of central nervous system serotonin 1A receptors on cardiorespiratory function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989;248:851–857.
  13. Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science* 1999;286:1566–1568.
  14. Guenther U, Manzke T, Wrigge H, Dutschmann M, Zinserling J, Putensen C, Hoeft A. The counteraction of opioid-induced ventilatory depression by the serotonin 1A-agonist 8-OH-DPAT does not antagonize antinociception in rats in situ and in vivo. *Anesth. Analg.* 2009;108:1169–1176.
  15. Guenther U, Wrigge H, Theuerkauf N, Boettcher MF, Wensing G, Zinserling J, Putensen C, Hoeft A. Repinotan, a selective 5-HT<sub>1A</sub>-R-agonist, antagonizes morphine-induced ventilatory depression in anesthetized rats. *Anesth. Analg.* 2010;111:901–907.
  16. Guenther U, Theuerkauf NU, Huse D, Boettcher MF, Wensing G, Putensen C, Hoeft A. Selective 5-HT(1A)-R-agonist repinotan prevents remifentanyl-induced ventilatory depression and prolongs antinociception. *Anesthesiology* 2012;116:56–64.
  17. Guo JD, Rainnie DG. Presynaptic 5-HT(1B) receptor-mediated serotonergic inhibition of glutamate transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience* 2010;165:1390–1401.

18. Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P. 8-OH-DPAT acts on both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;487:125–132.
19. Herrick-Davis K, Titeler M. [<sup>3</sup>H]spiroxatrine: a 5-HT<sub>1A</sub> radioligand with agonist binding properties. *J. Neurochem.* 1988;50:528–533.
20. Herrick-Davis K, Titeler M. Detection and characterization of the serotonin 5-HT<sub>1D</sub> receptor in rat and human brain. *J. Neurochem.* 1988;50:1624–1631.
21. Hodges MR, Richerson GB. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO<sub>2</sub> chemoreception, and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 2010;108:1425–1432.
22. Holtman Jr. JR, Norman WP, Gillis RA. Projections from the raphe nuclei to the phrenic motor nucleus in the cat. *Neurosci. Lett.* 1984;44:105–111.
23. Holtman Jr. JR, Norman WP, Skirboll L, Dretchen KL, Cuello C, Visser TJ, Hokfelt T, Gillis RA. Evidence for 5-hydroxytryptamine, substance P, and thyrotropin-releasing hormone in neurons innervating the phrenic motornucleus. *J. Neurosci.* 1984;4:1064–1071.
24. Holtman Jr. JR. Immunohistochemical localization of serotonin- and substance P-containing fibers around respiratory muscle motoneurons in the nucleus ambiguus of the cat. *Neuroscience* 1988;26:169–178.
25. Holtman Jr. JR, Marion LJ, Speck DF. Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat. *Neuroscience* 1990;37:541–552.
26. Holtman Jr. JR, Vascik DS, Maley BE. Ultrastructural evidence for serotonin-immunoreactive terminals contacting phrenic motoneurons in the cat. *Exp. Neurol.* 1990;109:269–272.
27. Holtman Jr. JR, King KA. Effect of activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors at the ventral medulla on phrenic nerve activity. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;253:307–310.
28. Hopp FA, Seagard JL, Bajic J, Zuperku EJ. Respiratory responses to aortic and carotid chemoreceptor activation in the dog. *J. Appl. Physiol.* 1991;70:2539–2550.

29. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002;71:533–554.
30. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 1992;75:165–229.
31. Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G, Bickerdike M. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2004;370:114-123.
32. Krolo M, Stuth EA, Tonkovic-Capin M, Hopp FA, McCrimmon DR, Zuperku EJ. Relative magnitude of tonic and phasic synaptic excitation of medullary inspiratory neurons in dogs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279:R639–R649.
33. Krolo M, Tonkovic-Capin V, Stucke AG, Stuth EA, Hopp FA, Dean C, Zuperku EA. Subtype composition and responses of respiratory neurons in the preBötzinger region to pulmonary afferent inputs in dogs. *J. Neurophysiol.* 2005;93:2674–2687.
34. Lalley PM, Bischoff AM, Richter DW. 5-HT-1A receptor-mediated modulation of medullary expiratory neurones in the cat. *J. Physiol.* 1994;476:117–130.
35. Lalley PM, Bischoff AM, Schwarzacher SW, Richter DW. 5-HT2 receptor-controlled modulation of medullary respiratory neurones in the cat. *J Physiol.* 1995;487(Pt3):653-661.
36. Lalley PM, Benacka R, Bischoff AM, Richter DW. Nucleus raphe obscurus evokes 5-HT-1A receptor-mediated modulation of respiratory neurons. *Brain Res.* 1997;747:156–159.
37. Lalley PM, Pilowsky PM, Forster HV, Zuperku EJ. CrossTalk opposing view: the preBötzinger complex is not essential for respiratory depression following systemic administration of opioid analgesics. *J. Physiol.* 2014;592:1163–1166.

38. Lindsey BG, Arata A, Morris KF, Hernandez YM, Shannon R. Medullary raphe neurones and baroreceptor modulation of the respiratory motor pattern in the cat. *J. Physiol.* 1998;512:863–882.
39. Manzke T, Guenther U, Ponimaskin EG, Haller M, Dutschmann M, Schwarzacher S, Richter DW. 5-HT<sub>4</sub>(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science* 2003;301:226–229.
40. Manzke T, Dutschmann M, Schlaf G, Morschel M, Koch UR, Ponimaskin E, Bidon O, Lalley PM, Richter DW. Serotonin targets inhibitory synapses to induce modulation of network functions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2009;364:2589–2602.
41. McCrimmon DR, Zuperku EJ, Hayashi F, Dogas Z, Hinrichsen CFL, Stuth EA, Tonkovic-Capin M, Krolo M, Hopp FA. Modulation of the synaptic drive to respiratory premotor and motor neurons. *Respir. Physiol.* 1997;110:161–176.
42. Meller E, Goldstein M, Bohmaker K. Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonists. *Mol. Pharmacol.* 1990;37:231–237.
43. Middlemiss DN, Hutson PH. The 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;600:132–147 (discussion 347-148).
44. Monnier A, Alheid GF, McCrimmon DR. Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. *J. Physiol.* 2003;548:859–874.
45. Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG. Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J. Neurosci.* 2007;27:14128–14138.
46. Mustapic S, Radocaj T, Sanchez A, Dogas Z, Stucke AG, Hopp FA, Stuth EA, Zuperku EJ. Clinically relevant infusion rates of mu-opioid agonist remifentanyl cause bradypnea in decerebrate dogs but not via direct effects in the preBötzinger complex region. *J. Neurophysiol.* 2010;103:409–418.



47. Nicholson C. Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity. *Brain Res.* 1985;333:325–329.
48. Niebert M, Vogelgesang S, Koch UR, Bischoff AM, Kron M, Bock N, Manzke T. Expression and function of serotonin 2A and 2B receptors in the mammalian respiratory network. *PLoS One.* 2011;6:e21395.
49. Oertel BG, Schneider A, Rohrbacher M, Schmidt H, Tegeder I, Geisslinger G, Lotsch J. The partial 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist buspirone does not antagonize morphine-induced respiratory depression in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007;81:59–68.
50. Pilowsky PM, de Castro D, Llewellyn-Smith I, Lipski J, Voss MD. Serotonin immunoreactive boutons make synapses with feline phrenic motoneurons. *J. Neurosci.* 1990;10:1091–1098.
51. Prkic I, Mustapic S, Radocaj T, Stucke AG, Stuth EA, Hopp FA, Dean C, Zuperku EJ. Pontine mu-opioid receptors mediate bradypnea caused by intravenous remifentanyl infusions at clinically relevant concentrations in dogs. *J. Neurophysiol.* 2012;108:2430–2441.
52. Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC. Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J. Neurosci.* 2009;29:3720–3737.
53. Ren J, Ding X, Greer JJ. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist befiradol reduces fentanyl-induced respiratory depression, analgesia, and sedation in rats. *Anesthesiology* 2015;122:424–434.
54. Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J. Physiol.* 1999;514:567–578.
55. Sahibzada N, Ferreira M, Wasserman AM, Taveira-DaSilva AM, Gillis RA. Reversal of morphine-induced apnea in the anesthetized rat by drugs that activate 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;292:704–713.

56. Schwarzacher SW, Smith JC, Richter DW. PreBötzinger complex in the cat. *J. Neurophysiol.* 1995;73:1452–1461.
57. Schwarzacher SW, Pestean A, Gunther S, Ballanyi K. Serotonergic modulation of respiratory motoneurons and interneurons in brainstem slices of perinatal rats. *Neuroscience* 2002;115:1247–1259.
58. Sharp T, Umbers V, Gartside SE. Effect of a selective 5-HT reuptake inhibitor in combination with 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonists on extracellular 5-HT in rat frontal cortex in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121:941–946.
59. Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Patterns of phrenic motor output evoked by chemical stimulation of neurons located in the preBötzinger complex in vivo. *J. Neurophysiol.* 1999;81:1150–1161.
60. Sun QJ, Goodchild AK, Chalmers JP, Pilowsky PM. The preBötzinger complex and phase spanning neurons in the adult rat. *Brain Res.* 1998;809:204–213.
61. Tonkovic-Capin M, Krolo M, Stuth EA, Hopp FA, Zuperku EJ. Improved method of canine decerebration. *J. Appl. Physiol.* 1998;85:747–750.
62. Vonhof S, Siren AL. Reversal of mu-opioid-mediated respiratory depression by alpha 2-adrenoceptor antagonism. *Life Sci.* 1991;49:111–119.
63. Voss MD, De Castro D, Lipski J, Pilowsky PM, Jiang C. Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1990;295:208–218.
64. Wang H, Germanson TP, Guyenet PG. Depressor and tachypneic responses to chemical stimulation of the ventral respiratory group are reduced by ablation of neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *J. Neurosci.* 2002;22:3755–3764.
65. Wood M, Chaubey M, Atkinson P, Thomas DR. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT(7) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;396:1–8.
66. Zuperku EJ, Brandes IF, Stucke AG, Hopp FA. Characteristics of drug concentration profiles for picoejection studies of brainstem neurons. *FASEB J.* 2006;20:A784.

67. Zuperku EJ, Brandes IF, Stucke AG, Sanchez A, Hopp FA, Stuth EA. Major Components of Endogenous Neurotransmission Underlying the Discharge Activity of Hypoglossal Motoneurons In Vivo. In: Integration in Respiratory Control - from Genes to Systems (Advances in Experimental Medicine and Biology Series Volume 605), edited by Poulin MJ, and Wilson RJA. New York: Springer Science+Business Media, LLC. 2008;p. 279-284.
68. Zuperku EJ, McCrimmon DR, 2002. Gain modulation of respiratory neurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2002;131:121–133.

## 9. SAŽETAK

Nedavna istraživanja pokazala su kako selektivni agonisti 5HT receptora mogu spriječiti opioidima induciranu depresiju disanja bez djelovanja na njihov analgetski učinak. Primijenjeni sistemski (intravenski tj. IV) imaju modulirajući učinak na disanje, ali je mjesto djelovanja nepoznato. PreBötzinger kompleks (pBC) smatra se mogućim mjestom. Ova studija napravljena je u svrhu određivanja uloge 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptora unutar pBC kompleksa i ventralne respiratorne grupe (VRC) pri promjeni ritma disanja, a koja nastaje nakon sistemske primjene agonista istih receptora. Korišteni su agonist 5HT<sub>1A</sub> receptora 8OH-DPAT ((±)-8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide) i agonist 5HT<sub>2A</sub> receptora DOI ((±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride). Pokusi su provedeni na vagotomiziranim, decerebriranim, paraliziranim i mehanički ventiliranim psima. Primijenjena je inhalacijska anestezija maskom i održavana isofluranom (ISO) (1.5-2,5% end-tidal koncentracija (1-2 MAC)). Istodobno su praćeni znakovi nedovoljne anestezije kao što su salivacija, lakrimacija, porast krvnog tlaka i pulsa, te je po potrebi anestezija produbljivana. Zatim je napravljena decerebracija midkolikularnom transekcijom. Nakon decerebracije prekinut je isofluran (kako bi se otklonio moguć utjecaj anestezije na rezultate), a ventilacija nastavljena mješavinom ~60% zrak i O<sub>2</sub> te je održavana hiperoksična normokapnija (Fi > 0,6). Staklena elektroda korištena je za pronalazak i snimanje neuralne aktivnosti respiratornih neurona unutar pBC kompleksa i VRC te za aplikaciju testiranih supstanci. Testirane supstance administrirane su i sistemski (IV). Tijekom pokusa kontinuirano je praćen neurogram freničnog živca (PNG), frekvencija izbijanja respiratornih neurona, vrijeme inspirija (T<sub>I</sub>) i ekspirija (T<sub>E</sub>), etCO<sub>2</sub> te sistemski krvni tlak. Za lokalizaciju pBC kompleksa unutar ventralne respiratorne grupe (VRC) u produženoj moždini korištena su tri kriterija. Prvi kriterij bile su već utvrđene stereotaksične koordinate. Drugi korišteni kriterij bio je prisutnost različitih tipova respiratornih neurona unutar VRC (inspiratornih i ekspiratornih neurona). Treći kriterij bio je karakteristični tahipnoični odgovor PNG-a na injektiranje (30-40 nl, 10 mM) glutamat agonista DLH-a (D-homocisteična kiselina) u pBC kompleks. Hipoteza je da ako 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptori unutar pBC kompleksa i VRC pridonose promjeni ritma disanja, tada će lokalna primjena njihovih agonista postići isti učinak kao i nakon sistemske primjene.

Pikoinjektiranje 1, 10 i 100  $\mu\text{M}$  8OH-DPAT na pojedinačne inspiratorne (I) i ekspiratorne (E) neurone unutar pBC kompleksa smanjilo je frekvenciju izbijanja istih ( $F_n$ ) za ~40%. DOI nije imao nikakav učinak na frekvenciju istih pojedinačnih respiratornih neurona unutar pBC kompleksa. Mikroinjektiranje 8OH-DPAT (200  $\mu\text{M}$ ), DOI (200  $\mu\text{M}$ ) i 5-HT (5 mM) na grupu respiratornih neurona unutar VRC od obeksa do 9 mm rostralno nije utjecalo na vrijeme inspiriraja ( $T_I$ ), vrijeme ekspiriraja ( $T_E$ ) i vršnu aktivnost freničnog živca (PPA). Sistemski (IV) administriran 8OHDPAT ( $19 \pm 2 \mu\text{g/kg}$ ) doveo je do smanjenja  $T_I$  i  $T_E$  za ~40%, ali nije imao učinak na PPA. Sistemski primijenjen DOI ( $235 \pm 48 \mu\text{g/kg}$ ) uzrokovao je porast  $T_I$  za  $17.4 \pm 5.1\%$ , ali bez učinka na  $T_E$  i PPA. Rezultati ove studije upućuju na to kako agonisti 5HT receptora sistemski administrirani mijenjaju ritam disanja. Spomenuti učinak ne postižu djelovanjem na respiratorne neurone unutar VRC (uključujući i pBC kompleks) već negdje izvan tih mjesta. Parabrahijalna i Kölliker-Fuse regija unutar mosta moguća su mjesta djelovanja agonista.

Ključne riječi: pBC, preBötzinger, 8OH-DPAT, DOI, 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, VRC, respiracija

## 10.ABSTRACT

Selective serotonin agonists can prevent opioid-induced depression of breathing without diminishing analgesia. When given systemically (IV), it is unclear where this effect is produced within the respiratory control network. The preBötzinger (pBC) complex has been suggested as the primary site where that happens. However, this hypothesis has not been tested pharmacologically in vivo. This study sought to determine if 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors within the preBötzinger complex (pBC) and ventral respiratory column (VRC) contributed to the breathing rate response produced by IV administration of (±)-8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide (8OH-DPAT) and (±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI) in vagotomized, decerebrate, paralyzed and mechanically ventilated dogs. Inhalational anesthesia was induced by mask and maintained with isoflurane at 1.5-2.5% (1-2 MAC) end-tidal concentration. The animals were monitored for signs of inadequate anesthesia such as salivation, lacrimation, and increases in blood pressure and heart rate. The animal was then decerebrated by midcollicular transection and isoflurane was discontinued. After decerebration the animal was ventilated with an air-O<sub>2</sub> mixture and maintained in hyperoxic normocapnia (FiO<sub>2</sub> >0.6) to exclude possible effect of anesthesia. Multibarrel micropipettes were used to record extracellular neuronal activity and to pressure eject drugs onto single neurons or into localized groups of respiratory neurons. The phrenic neurogram (PNG), cyclic T<sub>I</sub> and T<sub>E</sub>, airway CO<sub>2</sub> concentration and systemic blood pressure were continuously displayed/recorded. We used three criteria to locate the pBC complex: 1) predetermined stereotaxic coordinates, 2) presence of a mixture of respiratory neuron subtypes within the VRC, and 3) tachypneic response of the phrenic nerve (PNG) to DLH microinjections (30-40 nl; 10 mM). Three protocols were made. In protocol one we measured responses of pBC complex neurons to picejection of 8OH-DPAT and DOI. Picejection of 1, 10, and 100 μM 8OH-DPAT on single inspiratory (I) and expiratory (E) pBC neurons produced dose-dependent decreases in discharge frequency (Fn) with a ceiling of ~40%. DOI had no effect on single pBC neurons. In second protocol we were looking into effects of microinjections of 8OH-DPAT, DOI and 5-HT into the VRC including the pBC on phase-timing and peak phrenic nerve activity. Microinjections of 8OH-DPAT (200

$\mu\text{M}$ ), DOI (200  $\mu\text{M}$ ) and 5-HT (5 mM) within the VRC from the obex to 9 mm rostral had no effect on I-duration ( $T_I$ ), E-duration ( $T_E$ ) and peak phrenic activity (PPA). Our last (third) protocol showed effects of IV administration of 8OH-DPAT and DOI on phase-timing and peak phrenic nerve activity. IV 8OHDPAT ( $19 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) reduced  $T_I$  and  $T_E$  by  $\sim 40\%$ , but had no effect on PPA. IV DOI ( $235 \pm 48 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) increased  $T_I$  by  $17.4 \pm 5.1\%$ , but had no effect on  $T_E$  or PPA. The findings of this study indicate respiratory neurons in the pBC complex are inhibited maximally 40% by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8OH-DPAT and pBC I-neurons are depressed at lower agonist concentrations (1  $\mu\text{M}$ ) than E-neurons. Our findings also suggest that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are not present or not functional on canine pBC neurons, since their discharge was unaltered by picroejection of the selective agonist DOI at relatively high concentrations (100  $\mu\text{M}$ ). Furthermore, our results suggest that changes in phase-timing produced by systemic administration (IV) of 8OH-DPAT and DOI are not secondary to activation of 5-HT receptors in the pBC complex. Other possible locations have been suggested. Parabrachial and Kölliker-Fuse regions of the pons are one of those.

Running title: The Role of 5HT<sub>1A</sub> And 5HT<sub>2A</sub> Receptors Within The PreBötzinger Complex (pBC) And Ventral Respiratory Column (VRC) In Eliciting Respiratory Responses To Systemic Administration Of Selective Serotonin Agonists

Key words: pBC, preBötzinger, 8OH-DPAT, DOI, 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, VRC, respiration

## 11. ŽIVOTOPIS

Tomislav Radočaj rođen je 21. srpnja 1981. u Zagrebu, gdje nakon završenoga osnovnog i srednjoškolskog školovanja, 1999. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija u sklopu programa međunarodne razmjene studenata odlazi u Estoniju, gdje se dalje usavršava na klinici za neurologiju pri tamošnjem medicinskom fakultetu. 2005. godine diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu te iste godine započinje obavezan pripravnički staž u KBC „Sestre milosrdnice“. Po položenom državnom ispitu dobiva specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u KBC „Sestre milosrdnice“. S završetkom prve godine specijalističkoga usavršavanja odlazi na znanstveno usavršavanje u Sjedinjene Američke Države gdje na Medicinskom fakultetu u Wisconsinu (Dept. of Anaesthesiology, WI, Milwaukee) boravi od 2008. do 2010. godine te se usavršava u laboratoriju pod vodstvom dr. sc. Edwarda J. Zuperkua. Tijekom boravka u SAD-u objavljuje dva rada u međunarodnim časopisima te sudjeluje na brojnim međunarodnim skupovima. Po povratku u Hrvatsku nastavlja svoje specijalističko usavršavanje te upisuje poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Perića, dr. med. Godine 2013. polaže specijalistički ispit čime postaje specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, a trenutačno radi u KBC „Sestre milosrdnice“ u Zavodu za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje.