

# Učinak promjene osmolarnosti krvi i cerebrospinalnog likvora na volumen i tlak cerebrospinalnog likvora

---

**Maraković, Jurica**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*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:105:802317>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





## Središnja medicinska knjižnica

**Maraković, Jurica (2013) *Učinak promjene osmolarnosti krvi i cerebrospinalnog likvora na volumen i tlak cerebrospinalnog likvora [Effect of changes in serum and cerebrospinal fluid osmolarity on cerebrospinal fluid volume and pressure]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/1877>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jurica Maraković**

**Učinak promjene osmolarnosti krvi i  
cerebrospinalnog likvora na volumen i  
tlak cerebrospinalnog likvora**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jurica Maraković**

**Učinak promjene osmolarnosti krvi i  
cerebrospinalnog likvora na volumen i  
tlak cerebrospinalnog likvora**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu

Voditelj rada: dr. sc. Darko Orešković, znanstveni savjetnik

Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Darku Oreškoviću na nesebičnoj pomoći, trudu i vremenu uloženom tijekom izrade ove disertacije i pročelniku Zavoda za neurokirurgiju prof. dr. sc. Darku Chudyju na velikoj podršci.

Disertaciju posvećujem svojoj obitelji koja mi je beskrajnim strpljenjem i bezuvjetnom podrškom omogućila izradu ove disertacije.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. OSNOVNI PODACI O CEREBROSPINALNOM LIKVORU</b> .....	1
<b>1.2. DINAMIKA CEREBROSPINALNOG LIKVORA</b> .....	5
<b>1.2.1. Klasična hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora</b> .....	5
Sekrecija likvora .....	6
Tok likvora .....	9
Apsorpcija likvora .....	9
Eksperimentalni dokazi i klinička opažanja koja govore u prilog klasičnoj hipotezi .....	10
Ventrikulo-cisternalna perfuzija kao metoda određivanja sekrecije likvora .....	12
Kritike ventrikulo-cisternalne perfuzije kao metode određivanja sekrecije likvora .....	13
Direktna ventrikulo-akveduktalna perfuzija kao metoda određivanja sekrecije likvora .....	14
Druge metode određivanja sekrecije likvora .....	15
Kritike klasične hipoteze o dinamici cerebrospinalnog likvora .....	15
<b>1.2.2. Nova hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora</b> .....	19
<b>1.3. INTRAKRANIJSKI TLAK</b> .....	21
Povišen intrakranijski tlak .....	22
Snižen intrakranijski tlak .....	24
<b>1.4. OSMOTSKA TERAPIJA INTRAKRANIJSKE HIPERTENZIJE</b> .....	24
Povijest osmotske terapije .....	24
Manitol .....	25
Hipertonična otopina NaCl .....	25
Aditivan učinak furosemida .....	26
Hiperosmolarnost .....	26
Hipoosmolarnost i hiperosmolarnost plazme .....	27
Mehanizam djelovanja hiperosmolarne terapije .....	27

<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MODELI I METODE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I ANESTEZIJA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. OPERATIVNI ZAHVATI .....</b>	<b>32</b>
Postavljanje kanila u krvnu cirkulaciju .....	32
Postavljanje životinje u stereotaksijski aparat .....	32
Uvođenje kanile u lateralne komore .....	33
Uvođenje kanile u Sylvijev akvedukt .....	33
Uvođenje kanile u cisternu magnu .....	33
<b>3.3. VRSTE I TIJEK POKUSA .....</b>	<b>34</b>
Ventrikulo-akveduktalna perfuzija .....	34
Ventrikulo-cisternalna perfuzija .....	35
Spontano istjecanje likvora .....	36
Mjerenje tlaka likvora .....	37
<b>3.4. PRIPREMA KEMIKALIJA I OTOPINA .....</b>	<b>38</b>
Umjetni likvor .....	38
Hiperosmolarni i hipoosmolarni pripravci .....	38
Standardne otopine za mjerenje uzoraka pomoću metode tekućinske kromatografije visoke razlučivosti s elektrokemijskim detektorom .....	38
<b>3.5. MJERENJE OSMOLARNOSTI I KONCENTRACIJE METABOLITA NEUROTRANSMITERA U UZORCIMA LIKVORA .....</b>	<b>39</b>
Mjerenje osmolarnosti .....	39
Mjerenje koncentracije metabolita neurotransmitera .....	39
<b>3.6. STATISTIČKA OBRADA .....</b>	<b>39</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. OVISNOST VOLUMENA CEREBROSPINALNOG LIKVORA O POVEĆANJU OSMOLARNOSTI LIKVORA KAO I O POVEĆANJU POVRŠINE LIKVORSKOG SUSTAVA IZLOŽENOG TOM DJELOVANJU .....</b>	<b>40</b>

<b>4.2. VOLUMEN CEREBROSPINALNOG LIKVORA NAKON POVEĆANJA OSMOLARNOSTI KRVI .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. VOLUMEN CEREBROSPINALNOG LIKVORA NAKON SNIŽENJA OSMOLARNOSTI KRVI .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4. INTRAKRANIJSKI TLAK NAKON SNIŽENJA OSMOLARNOSTI KRVI IZAZVANE INTRAPERITONEALNOM APLIKACIJOM DESTILIRANE VODE .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5. METABOLITI NEUROTRANSMITERA U CEREBROSPINALNOM LIKVORU KAO BIOLOŠKI POKAZATELJI PROMJENE VOLUMENA LIKVORA .....</b>	<b>64</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1. ODRŽAVANJE VOLUMENA CEREBROSPINALNOG LIKVORA .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2. MEĐUSOBNA POVEZANOST PROMJENE OSMOLARNOSTI KRVI S PROMJENAMA VOLUMENA I TLAKA CEREBROSPINALNOG LIKVORA .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3. PONAŠANJE METABOLITA NEUROTRANSMITERA U CEREBROSPINALNOM LIKVORU NAKON PROMJENE VOLUMENA LIKVORA .....</b>	<b>83</b>
<b>5.4. NOVIJE SHVAĆANJE FIZIOLOGIJE CEREBROSPINALNOG LIKVORA .....</b>	<b>86</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>88</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>89</b>
<b>8. SUMMERY.....</b>	<b>90</b>
<b>9. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>91</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>100</b>



## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

aCSF – artificial cerebrospinal fluid – umjetni likvor

CBF – cerebral blood flow – moždani protok krvi

CPP – cerebral perfusion pressure – cerebralni perfuzijski tlak

CSF – cerebrospinal fluid – cerebrospinalni likvor

DA – dopamin

HPLC – high-performance liquid chromatography – tekućinska kromatografija visoke razlučivosti

HUGO – Human Genome Organisation – Organizacija ljudskog genoma

HVA – homovanillic acid – homovanilna kiselina

5-HIAA – 5-hydroxyindoleacetic acid – 5-hidroksiindoloctena kiselina

ICP – intracranial pressure – intrakranijski tlak

i.p. – intraperitonealno

i.v. – intravenski

Kir kanali – KCNJ kanali prema HUGO – "Inward rectifier"

Kv kanali – KCNA kanali prema HUGO – "Voltage – gated potassium channel"

MAP – mean arterial pressure – srednji arterijski tlak

SEM - standard error of the mean – standardna pogreška srednje vrijednosti

SI – Système International d'Unités – Međunarodni sustav mjernih jedinica

SIADH – syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion – sindroma neprimjerenog lučenja antidiuretskog hormona

RISA – radioiodinated serum albumin – radioaktivnim jodom označen serumski albumin

RT-PCR – reverse transcription–polymerase chain reaction – reverzna transkripcija–polimeraza lančana reakcija

# 1. UVOD

U liječenju povišenog intrakranijskog tlaka zadnjih četrdeset godina često se primjenjuje osmotska terapija. Unatoč brojnim istraživanjima, sam mehanizam djelovanja osmotskih tvari u snižavanju intrakranijske hipertenzije nije razjašnjen. Stoga u ovom radu želimo ispitati ima li promjena osmolarnosti krvi ili cerebrospinalnog likvora učinak na volumen cerebrospinalnog likvora, te da li se ta promjena volumena odražava na intrakranijski tlak (ICP). Također želimo ispitati jesu li i za održavanje ukupnog volumena likvora odgovorne osmotske sile ili kao što se vjeruje odnos koji vlada između aktivnog stvaranja likvora (sekrecije) moždanih komora s jedne i pasivne apsorpcije likvora kroz arahnoidalne resice u venozne sinuse s druge strane. Zbog boljeg razumijevanja problema u uvodnom dijelu ćemo prikazati relevantne podatke iz literature o cerebrospinalnom likvoru, intrakranijskom tlaku i osmotskoj terapiji intrakranijske hipertenzije.

## 1.1. OSNOVNI PODACI O CEREBROSPINALNOM LIKVORU

Cerebrospinalni likvor je bistra, bezbojna tekućina, specifične težine od 1,003 do 1,008 g/cm<sup>3</sup>, pH vrijednosti 7,33 do 7,35, koja ispunjava moždane komore (dvije lateralne komore, III i IV komoru), središnji kanal kralješničke moždine, te moždani i moždinski subarahnoidni prostor. Likvor je odvojen od neuronalnog tkiva epindimom (koji čini stijenke komora i središnjeg kanala) i pijom (koja prekriva vanjsku površinu mozga). Predstavlja glavni dio ekstracelularne tekućine središnjeg živčanog sustava [1, 2].

Već je u sedamnaestom stoljeću prije Krista egipatski liječnik primijetio postojanje tekućine na površini mozga. Godine 1536. Nicola Massa je prvi točno opisao tekućinu unutar moždanih komora, a Valsalva je 1692. godine primijetio spinalnu tekućinu kod psa. Domenico Cotugno je 1764. godine opisao tekućinu oko mozga i kralješničke moždine povezanu s tekućinom unutar komora, a Magendie je 1825. godine u svojim anatomskim opisima potvrdio da je tekućina, a ne zrak ono što ispunjava

moždane komore i subarahnoidni prostor. Godine 1891. Quincke uvodi u kliničku praksu lumbalnu punkciju što omogućava proučavanje sastava cerebrospinalnog likvora [3-5].

Sastav likvora vrlo je sličan sastavu plazme s tim da likvor sadrži znatno manje proteina, glukoze i kalija, a više klorida. Voda čini 99% volumena likvora, a ostale tvari preostalih 1% (Tablica 1). U likvoru se normalno nalazi do 5 limfocita ili mononukleara u  $\text{mm}^3$ , a nema polimorfonuklearnih leukocita niti eritrocita [6].

*Tablica 1. Sastav likvora i plazme /arterijska plazma/ [6].*

	<b>Jedinica</b>	<b>Likvor</b>	<b>Plazma</b>	<b>Likvor:Plazma</b>
<b>Osmolarnost</b>	mosmol/L	295	295	1,0
<b>Udio vode</b>		99%	93%	
<b>Natrij</b>	mmol/L	138	138	1,0
<b>Kalij</b>	mmol/L	2,8	4,5	0,6
<b>Klor</b>	mmol/L	119	102	1,2
<b>Kalcij</b>	mmol/L	2,1	4,8	0,4
<b>pCO<sub>2</sub></b>	mm Hg	47	41	1,1
<b>pH</b>		7,33	7,41	
<b>pO<sub>2</sub></b>	mm Hg	43	104	0,4
<b>Glukoza</b>	mg/dL	60	90	0,67
<b>Laktat</b>	mmol/L	1,6	1,0	1,6
<b>Piruvat</b>	mmol/L	0,08	0,11	0,73
<b>Laktat:piruvat</b>		26	17,6	
<b>Ukupni proteini</b>	mg/dL	35	7000	0,005
<b>Albumini</b>	mg/L	155	36600	0,004
<b>IgG</b>	mg/L	12,3	9870	0,001

Osmolarnost tekućine određuje koncentracija osmotski aktivnih tvari. Obično se izražava u miliosmol po litri (mosmol/L). Osmolarnost plazme i likvora je ista i iznosio oko 295 mosmol/L. Osmotska koncentracija natrija ( $\text{Na}^+$ ) u plazmi je 142 mosmol/L, a klorida ( $\text{Cl}^-$ ) 108 mosmol/L što čini 83% ukupne osmolarnosti plazme. Ostali anorganski ioni kao što su  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i  $\text{SO}_4^{2-}$  čine 11%, proteini 0,4%,

a organske tvari kao glukoza, urea, kreatinin, aminokiseline, laktat i kreatinin čine samo 4,3% osmolarnosti plazme. Obzirom da u cerebrospinalnom likvoru ima manje proteina, glukoze i kalija, a više klorida, većinu osmolarnosti likvora čine ioni natrija ( $\text{Na}^+$ ) i klora ( $\text{Cl}^-$ ). U kliničkoj praksi često se koristi sljedeća formula za brzo računanje osmolarnosti plazme na temelju koncentracije osnovnih sastojaka (mmol/L) [6] :

$$\text{Osmolarnost (mosmol/L)} = 2 \times (\text{Na}^+ + \text{K}^-) + \text{urea} / 2,8 + \text{glukoza} / 18$$

U različitim eksperimentima vezanim za cerebrospinalni likvor predlagane su i korištene brojne formule umjetnog likvora s ciljem da budu što sličnije s pravim cerebrospinalnim likvorom prema vrijednosti pH, osmolarnosti,  $\text{pCO}_2$  i koncentraciji membranski aktivnih iona. Od najpoznatijih i u prošlosti najčešće korištena formula umjetnog likvora je Elliottova otopina, poznata i kao otopina B Elliotta i Jaspera (Tablica 2) [6].

*Tablica 2. Sastav Elliottove B otopine [6].*

<b>Alkalna-slana otopina „Stock“ otopina</b>	<b>Kisela-slana otopina</b>	<b>Glukozna otopina</b>
236 g NaCl	24 g $\text{CaCl}_2$	8 g dekstroze
92 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	12 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	500 mL destilirane vode
12 g KCl	300 mL konc. HCl	
8 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$		
4 mL fenolnog crvenila 1 mg/mL		
Destilirana voda do 1 L	25 mL „Stock“ otopine + destilirane vode do 1 L, dodavati dok ružičasta boje ne nestane	50 mL dodaje se u 1 L „Stock“ otopine

U neurokirurškim operacijama za ispiranje i ispunjavanje likvorskog prostora po završetku operacija uglavnom se koristi na 37° C zagrijana fiziološka otopina NaCl-a.

U likvoru se nalaze i različiti produkti metabolizma i sinaptičke aktivnosti poput 5-hidroksiindolactone kiseline (5-HIAA) koja je glavni metabolit neurotransmitera serotonina (5-hidroksitriptamina, 5-HT) i homovanilne kiseline (HVA) koja je glavni metabolit neurotransmitera dopamina (DA). Obzirom da je cerebrospinalni likvor u direktnom kontaktu sa svim strukturama središnjeg živčanog sustava, metabolizam neurotransmitera serotonina i dopamina odražavat će se u promjenama koncentracije tih kiselina u likvoru. Stoga su se promjene koncentracija tih kiselina u likvoru često promatrale u različitim istraživanjima fiziologije i patofiziologije mozga, ali i dinamike cerebrospinalnog likvora [7]. Poznato je i da postoji koncentracijski gradijent ovih kiselina u likvorskim prostorima, tako da je najveća koncentracija u moždanim komorama, manja u kranijском subarahnoidnom prostoru, a najmanja u lumbalnom subarahnoidnom prostoru. Razlog za taj koncentracijski gradijent pokušava se objasniti različitom distribucijom serotoninergičkih i dopaminergičkih neurona unutar središnjeg živčanog sustava. Međutim, različiti eksperimenti često su pokazali drugačije, čak i kontradiktorne rezultate [8-10].

Koncentracija tvari u likvoru je u fiziološkim uvjetima konstantna, a nadziru je procesi koji omogućavaju izmjenu tvari između mozga, krvi i likvora. Između krvi i središnjeg živčanog sustava, pa tako i između krvi i cerebrospinalnog likvora postoji tzv. krvno-moždana barijera koja ograničava i nadzire ulazak tvari iz krvi u središnji živčani sustav (stanice, međustanični prostor i likvor). Tu barijeru čine moždane kapilare koje su drugačije građene od kapilara u drugim dijelovima tijela. Moždane kapilare nisu fenestrirane, a rubovi endotelnih stanica spojeni su čvrstim vezama (engl. tight junction). Te stanice imaju povećanu količinu mitohondrija i enzima što omogućava razgradnju tvari koje prolaze kroz njih. Uz to je 85% površine tih kapilara prekriveno nožicama astrocita [11]. Slaba barijera postoji između cerebrospinalnog likvora i međustaničnog prostora, a čini je jedan sloj stanica ependima. To omogućava miješanje međustanične tekućine i likvora [2].

Odrasli čovjek ima oko 150 mL cerebrospinalnog likvora u kraniospinalnom prostoru, od toga je oko 25 mL u moždanim komorama, oko 95 mL u kranijском, a oko 35 mL u spinalnom subarahnoidnom prostoru [2].

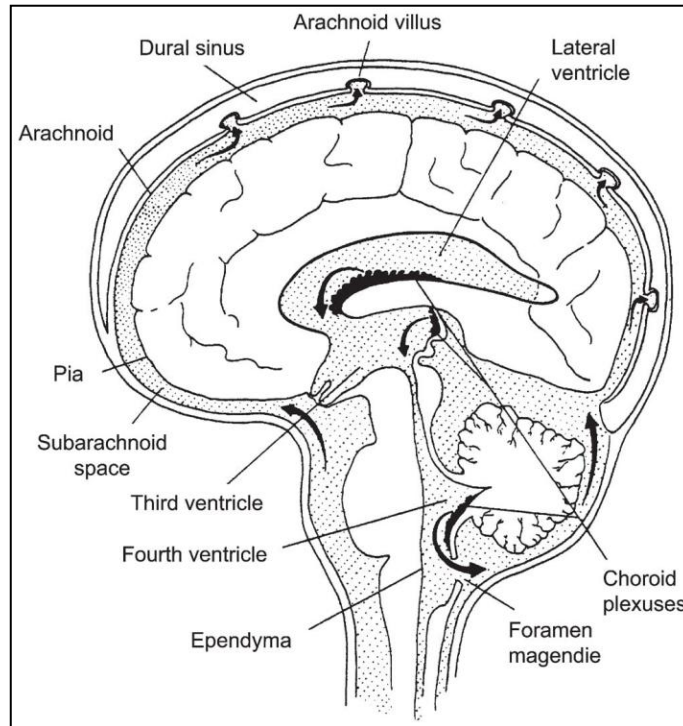
Cerebrospinalni likvor ima brojne važne funkcije. Likvor je fiziološki medij za mozak i mehanički štiti mozak i kralješničku moždinu, te smanjuje tenziju na korijene živaca. Težina mozga u zraku je oko 1500 g, a uronjenog u likvor prividno (zbog Arhimedovog zakona) oko 50 g. Likvor razrjeđuje i odstranjuje štetne produkte metabolizma i sinaptičke aktivnosti, te strane tvari. Omogućava transport tvari i komunikaciju unutar mozga. Dovodi nutritivne tvari. Smatra se da ima i važnu ulogu u razvoju mozga [1, 2].

## **1.2. DINAMIKA CEREBROSPINALNOG LIKVORA**

Brojna patološka stanja središnjeg živčanog sustava povezana su s poremećajem dinamike cerebrospinalnog likvora (hidrocefalus, hidromijelija i siringomijelija, arahnoidne ciste). Njihovo uspješno liječenje i danas je ograničeno, a razlog je vjerojatno još uvijek nepotpuno razumijevanje dinamike cerebrospinalnog likvora.

### **1.2.1. Klasična hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora.**

Prema klasičnoj hipotezi o dinamici cerebrospinalnog likvora, likvor teče poput spore rijeke od mjesta stvaranja unutar moždanih komora do mjesta apsorpcije koje predstavljaju venski sinusi na površini mozga (Slika 1) [2, 12, 13].



*Slika 1. Shema klasične hipoteze o dinamici cerebrospinalnog likvora [1].*

**Sekrecija likvora.** Stvaranje cerebrospinalnog likvora je zamišljeno kao aktivni proces (sekrecija) koji se poglavito odvija preko koroidnog pleksusa moždanih komora od čega je 70% secerniranog likvora iz koroidnog pleksusa, a 30% iz ependima [5, 13, 14].

Koroidni pleksus je izrazito vaskulariziran. Endotel kapilara koroidnog pleksusa je fenestriran i prvi korak u secerniranju likvora predstavlja prolazak ultrafiltrata plazme kroz endotel olakšan pomoću hidrostatskog tlaka. Drugi korak sekrecije likvora predstavlja prolazak ultrafiltrata kroz koroidni epitel i ulazak u moždanu komoru. Prema klasičnoj hipotezi smatra se da se prolazak kroz koroidni epitel odvija kao aktivni metabolički proces, koji pretvara ultrafiltrat u likvor [5, 15]. Aktivni proces je zamišljen kao aktivni transport iona natrija (natrijeva pumpa) kroz epitelne stanice koroidnog pleksusa i ependima u likvor, koji zbog razlike u osmotskom tlaku istovremeno pasivno slijedi voda [16, 17].

Obzirom da je drugi korak sekrecije likvora aktivan proces, smatra se da stvaranje likvora ne ovisi o promjenama intrakranijskog tlaka [18-22].

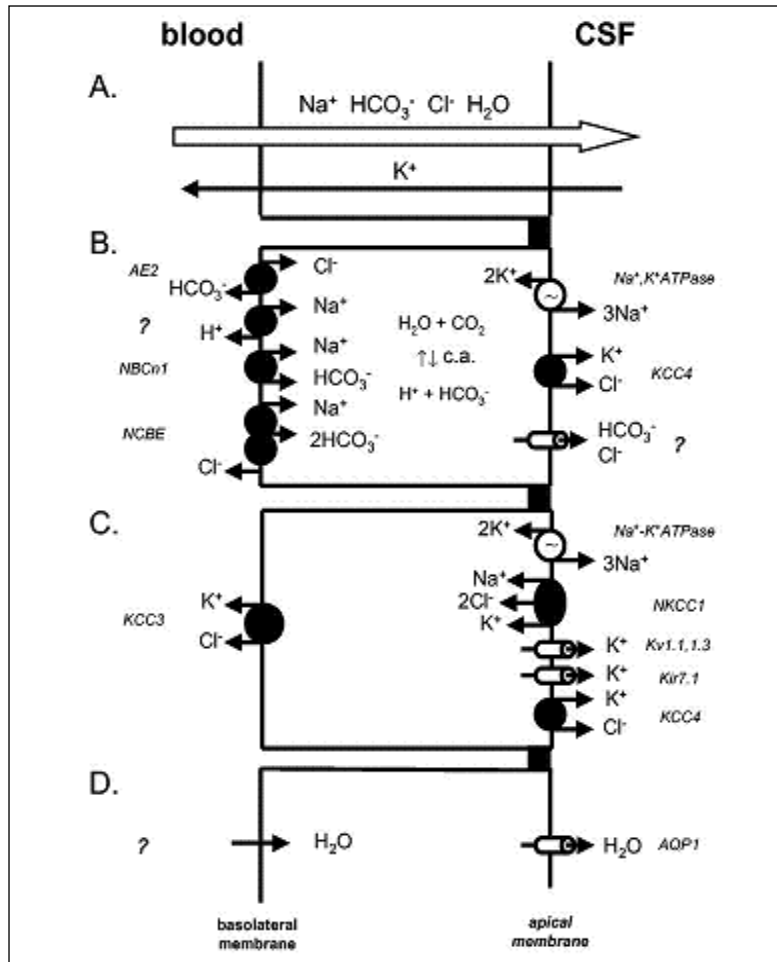
U zadnjih petnaest godina metodama molekularne biologije kao što su RT-PCR, in situ hibridizacija i imunohistokemija otkriveni su mnogi ionski transporteri i kanali na stanicama koroidnog pleksusa sisavaca za koje se smatra da sudjeluju u procesu aktivne sekrecije likvora. Neki od njih su:

- $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATP-aza
- $\text{Na}^+$ - $2\text{Cl}^-$ - $\text{K}^+$  kotransporter
- $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  kotransporter
- $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  izmjenjivač
- $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  kotransporter
- $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  izmjenjivač
- Kv kanali
- Kir kanali

Tu su i kanali za vodu, tzv. akvaporini čija uloga još nije razjašnjena, te enzimi poput karboanhidraze koja katalizira stvaranje  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{H}^+$  iona iz  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CO}_2$  i iako nije direktno uključena u transport iona, smatra se da ima važnu ulogu u sekreciji cerebrospinalnog likvora [1].

Predloženi su i mnogi modeli sekrecije cerebrospinalnog likvora na molekularnoj razini. Sljedeći model sumira prijašnje brojne modele, ali kao i mnogi drugi nije bio rigoroznije eksperimentalno testiran što treba učiniti u budućnosti (Slika 2).





*Slika 2. Shema modela sekrecije cerebrospinalnog likvora [1].*

Centralno mjesto tog modela i aktivne sekrecije cerebrospinalnog likvora predstavlja  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$  ATP-aza na apikalnoj membrani stanica koroidnog pleksusa koja generira jednosmjerni tok iona  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  kroz epitel koroidnog pleksusa koje potom osmotski slijedi voda kroz kanale za vodu.

U eksperimentima je pokazano da se određenim lijekovima može smanjiti sekrecija likvora, a mehanizmi djelovanja tih lijekova pokušavaju se objasniti na molekularnoj razini. Najčešće se spominje acetazolamid, koji inhibira karboanhidrazu, te kardialni glikozid ouabain koji dan intraventricularno, ali ne i intravenski inhibira  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$  ATP-azu, te tako smanjuju sekreciju likvora [12, 19, 20, 23, 24]. U kliničkoj praksi koristi se acetazolamid u liječenju hidrocefalusa, ali su rezultati ograničeni i kratkotrajni [6, 25].

Smatra se da je prosječna brzina sekrecije cerebrospinalnog likvora kod ljudi oko 0,35 mL/min, odnosno oko 500 mL dnevno [20, 26]. Kod mačke, koja je eksperimentalna životinja u našim istraživanjima, smatra se da prosječna brzina sekrecije likvora iznosi između 20 i 25  $\mu$ L/min, što predstavlja dnevnu količinu između 29 i 36 mL [27].

**Tok likvora.** Prema klasičnoj teoriji likvor teče jednosmjerno iz lateralnih moždanih komora kroz interventrikularne otvore (Monro) u treću komoru, kroz Sylvijev akvedukt u IV komoru, te kroz središnji Magendijev i lateralne Lushkine otvore u cisternu magnu. Iz bazalnih cisterna cirkulira duž subarahnoidnog prostora preko površine korteksa i manjim dijelom u spinalni subarahnoidni prostor te se reapsorbira u duralnim venskim sinusima [2].

Smatra se da osim aktivnog stvaranja likvora kao glavnog generatora cirkulacije likvora, na tok likvora utječe gradijent hidrostatskog tlaka između likvorskog prostora i venskih sinusa, pomaci mozga i kralješničke moždine sa sistolom srca i respiracijom, pulzacije koroidnog pleksusa, te manjim dijelom pomaci cilija endotela. I položaj tijela ima utjecaj na tok i tlak likvora [2, 28].

**Apsorpcija likvora.** Što se tiče apsorpcije likvora, vjeruje se da se likvor apsorpira u krv preko sloja arahnoidnih resica koje strše u venske sinuse mozga. Apsorpcija se zamišlja kao pasivni proces ovisan o razlici tlakova koji vladaju između likvora i krvi (koloidno osmotski tlak krvi i hidrostatski tlak, odnosno razlika između tlaka likvora u subarahnoidnom prostoru i venskog tlaka), a odvija se preko sloja mezotelijalnih stanica koje čine stijenku resice [29, 30]. Elektronskim mikroskopom pokazano je da se unutar tih stanica stvaraju gigantske vakuole koje istovremeno mogu komunicirati i sa subarahnoidnim i s luminalnim dijelovima stanice, te se smatra da se na taj način odvija transcelularni transport tekućine [2]. Također se smatra da postoji linearni odnos između tlaka cerebrospinalnog likvora i brzine apsorpcije, te da apsorpcija prestaje ako tlak padne ispod 68 mm H<sub>2</sub>O što odgovara tlaku u venskim sinusima [19, 20].

Osim apsorpcije u duralne venske sinuse postoje literaturni podaci koji sugeriraju značajnu apsorpciju likvora iz subarahnoidnog prostora u limfu [12, 31, 32], resorpciju od strane mozga, koroidnog pleksusa, arahnoidne membrane, adventicije krvnih žila,

endotela kapilara [14, 17, 33]. Kao glavno mjesto apsorpcije likvora u limfu spominju se otvori kribriiformne ploče za olfaktorne živce i nazalni limfni putovi, a manje perineuralne ovojnice u spinalnom kanalu.

### **Ekperimentalni dokazi i klinička opažanja koja govore u prilog klasičnoj hipotezi**

Brojni su eksperimenti, anatomska, histološka i klinička opažanja doveli do postavljanja klasične hipoteze dinamike likvora koja podrazumijeva da se cerebrospinalni likvor aktivno stvara u moždanim komorama od strane koroidnog pleksusa, jednosmjerno teče poput spore rijeke kroz komore i subarahnoidni prostor i pasivno se apsorbira u duralne venske sinuse kroz arahnoidne resice.

Prvi ekperimentalni rezultati koji su doveli do postavljanja klasične hipoteze dinamike likvora vezani su uz ekperimentalno izazivanje hidrocefalusa. Tako su Dandy i Blackfan 1913. godine pokazali da opstrukcija Sylvijevog akvedukta malim opstruktivnim tijelom dovodi do dilatacije komora proksimalno od mjesta opstrukcije. Thomas je 1913. godine izazvao hidrocefalus davanjem iritansa (suspenzije granula alerunata) u lateralne komore. Iritans je izazvao kroničnu upalu koja je dovela do opstrukcije likvorskih puteva, što je pokazano davanjem boje u komore [4, 34].

Potom je Walter Dandy izveo niz eksperimenata na psima kojim su postavljene osnove za klasičnu hipotezu dinamike cerebrospinalnog likvora. U eksperimentima je pokazano da:

- opstrukcija Sylvijevog akvedukta dovodi do dilatacije III i lateralnih komora
- opstrukcija jednog foramena Monro dovodi do unilateralnog hidrocefalusa
- opstrukcija jednog foramena Monro nakon odstranjivanja koroidnog pleksusa dovodi do kolapsa te komore
- opstrukcija Sylvijevog akvedukta nakon obostrane pleksusektomije dovodi do dilatacije III i lateralnih komora, ali manje nego bez pleksusektomije

Na temelju tih eksperimenata zaključio je da se cerebrospinalni likvor stvara unutar svih moždanih komora od strane koroidnog pleksusa i da se apsorbira gotovo u cijelosti u

subarahnoidnom prostoru, te da endolimfni prostor ne stvara likvor i da nema kolateralnih puteva iz komora u subarahnoidni prostor osim kroz Sylvijev akvedukt. Također je zaključio da ligiranje polazišta vene magne Galeni uzrokuje hidrocefalus zbog povećane produkcije likvora, a da izazivanje priraslica iritansom u perimezencefaličkom području uzrokuje komunicirajući tip hidrocefalusa zbog opstrukcije dotoka likvora u središnji subarahnoidni prostor gdje se većina likvora apsorbira [4].

Na temelju tih eksperimenata i zaključaka Dandy je također počeo primjenjivati koroidnu pleksusektomiju kao metodu liječenja komunicirajućeg hidrocefalusa [35, 36].

Harvey Cushing u svojim studijama o cerebrospinalnom likvoru opisuje zapažanja tijekom neurokirurških operacija kako iz površine koroidnog pleksusa na dnu porencefaličke šupljine koja je bila ispražnjena secernira tekućina. U drugom slučaju nakon ligiranja dovodne krvne žile koroidnog pleksusa sekrecija je trenutno prestala. On uvodi i naziv „treća cirkulacija“ (uz krv i limfu) za cirkulaciju likvora [3].

Radi dokazivanja da je koroidni pleksus glavno mjesto sekrecije likvora Welch je kanuliranjem vena koroidnog pleksusa i određivanjem hematokrita izračunao da sekrecija koroidnih pleksusa u sve četiri komore odgovara ukupnoj sekreciji određenoj pomoću drugih metoda, a Ames je mikropipetom skupljao sekreciju koroidnog pleksusa i ustanovio da je sastav drugačiji od plazme, te da to nije samo ultrafiltrat plazme već produkt aktivne sekrecije [23, 24].

I brojna klinička opažanja prisutnosti hidrocefalusa kod difuzne vilozne hiperplazije, papiloma ili karcinoma koroidnog pleksusa i objašnjenje da hidrocefalus nastaje zbog prekomjerne sekrecije likvora od strane hiperplazije stanica, odnosno tumora koriste se kao dokaz da je koroidni pleksus primarno mjesto sekrecije likvora [37].

Makroskopski vidljive Pacchionijeve granulacije ili tjelešca prvotno su opisane još 1721. godine, a predstavljaju zapravo uvećane arahnoidne resice. Prvo su 1875. godine Key i Retzius, a potom i Weed 1914. godine svojim eksperimentima davanja različitih granula i boja u subarahnoidni prostor i naknadnim histološkim analizama pokazali da su arahnoidne resice koje strše u venske duralne sinuse glavno mjesto apsorpcije likvora [2, 30].

## Ventrikulo-cisternalna perfuzija kao metoda određivanja sekrecije likvora

Značajan doprinos tumačenju dinamike cerebrospinalnog likvora, ali i potvrđivanju klasične hipoteze o sekreciji, cirkulaciji i apsorpciji likvora dala je metoda ventrikulo-cisternalne perfuzije razvijena od strane Heiseya i Pappenheimera 1962. godine na anesteziranim kozama [18].

Perfuzija se vrši od lateralne komore do cisterne magne umjetnim likvorom koji sadrži marker (inulin, albumin, dekstran). Određivanje sekrecije likvora temelji se na pretpostavci da se bilo kakvo razrjeđivanje markera tijekom prolaska kroz moždane komore događa samo zbog sekrecije nove tekućine odnosno likvora bez markera. Sekrecija likvora određuje se indirektno odnosno računa se iz jednadžbe. Jednadžba je postavljena u analogiji s jednadžbom za računanje glomerularne filtracije prema klirensu inulina u bubrezima:

$$V_f = V_i \times (C_i - C_o) / C_o \quad (\text{mL/min})$$

$V_f$  - brzina sekrecije (mL/min)

$V_i$  - brzina perfuzata (mL/min)

$C_i$  - koncentracija markera u ulaznom perfuzatu

$C_o$  - koncentracija markera u izlaznom perfuzatu

Kako bi se jednadžbom doista izračunalo stvaranje – sekrecija likvora neophodno je da se marker na putu ne smije apsorbirati, te da se hidrodinamika likvora doista odvija prema klasičnoj hipotezi, odnosno da se sav cerebrospinalni likvor stvara samo unutar komora, a da se apsorpira u subarahnoidnom prostoru.

Tom metodom Heisey i Pappenheimer odredili su u seriji od 12 koza prosječan iznos sekrecije likvora od 0,16 mL/min. Istom metodom su Lechman i Fitzgerald odredili iznos sekrecije likvora kod mačaka od 0,015 mL/min.

Na temelju korelacije težine koroidnog pleksusa i iznosa stvaranja likvora kod različitih vrsta zaključili su da se većina likvora stvara sekrecijom od strane koroidnog pleksusa. Promjene tlaka od -10 do + 30 cm H<sub>2</sub>O nisu značajnije utjecale na izračunati iznos

stvaranja likvora. Promjena osmolarnosti perfuzata dovela je do promjene izračunate vrijednosti stvaranja likvora, te su pretpostavili da bi i osmotski tok kroz ependim mogao sudjelovati u stvaranju likvora.

Ova metoda dugo se vremena smatrala preciznom i fiziološkom metodom za proučavanje sekrecije i apsorpcije cerebrospinalnog likvora [38] i korištena je u brojim istraživanjima dinamike cerebrospinalnog likvora, ali se primjenjivala prvenstveno na životinjama obzirom da je invazivna.

### **Kritike ventrikulo-cisternalne perfuzije kao metode određivanja sekrecije likvora.**

Obzirom da je metoda indirektna i da se sekrecija likvora računa iz vrijednosti razrjeđivanja indikatora novonastalim likvorom, bilo kakva greška u interpretaciji stupnja razrjeđenja indikator zbog drugih razloga (odlazak indikatora ili vode u okolno tkivo ili nepravilno miješanje indikatora) rezultirat će krivim zaključcima u vezi sa stvaranjem likvora.

Tako je vršeci ventrikulo-cisternalnu perfuziju kod mačaka s plavim dekstranom kao indikatorom različitim brzinama perfuzije (32,0; 65,5; 125,0 i 252,0  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) pri istom intrakranijskom tlaku pokazano da povećanje brzine perfuzije rezultira u značajnom povećanju koncentracije indikatora u izlaznom perfuzatu, a time se prema jednadžbi Heiseya i Pappenheimera izračunata vrijednost sekrecije likvora smanjuje, te da je ta promjena linearna povećanju brzine perfuzije. Mogući razlozi tome su različito miješanje između likvora duž cijelog likvorskog prostora i indikatora u perfuzatu, različito širenje perfuzata kroz likvorski prostor i moguća apsorpcija indikatora ili vode u okolno tkivo [39, 40]. Također je u modelu perfuzije plastičnog cilindra pokazano da su izračunate vrijednosti stvaranja na temelju razrjeđenja indikatora veće od stvarne, pumpom stimulirane brzine stvaranja, a pokazano je i da se kod životinje nakon usmrćivanja prema izračunatim vrijednostima likvor i dalje secernira što nije moguće [41].

Poznato je i da indikator može proći iz likvora u moždani parenhim i da inulin brzo odlazi u perivaskularne prostore, doseže velike površine kapilara i prolazi kroz stijenku krvnih žila [15, 42, 43], a i u drugim istraživanjima su primijećene neočekivane i

neobjašnjive promjene dobivenih vrijednosti brzina sekrecije likvora, iako se uvjeti kod provođenja eksperimenata nisu mijenjali [44].

Sve to ukazuje da ventrikulo-cisternalna perfuzija nije tako precizna i pouzdana metoda za određivanje sekrecije cerebrospinalnog likvora kao što se smatralo, te je zbog toga razvijena direktna metoda određivanja brzine stvaranja likvora drenažom likvora iz Sylvijevog akvedukta [45].

### **Direktna ventrikulo-akveduktalna perfuzija kao metoda određivanja sekrecije likvora.**

Metoda je modifikacija metode drenaže Sylvijevog akvedukta od Flexnera i Wintersa iz 1932. godine [46]. U Sylvijev akvedukt uvodi se pod kontrolom oka plastična kanila. Šupljina oko kanile u vermisu ispuni se trakicama fibrina koje se na površini preliju cijanoakrilnim ljepilom, te se otvor kosti zatvori akrilatom čime se fiksira kanila i hermetiski zatvori kranijum. Time se sprečava bilo kakvo curenje likvora oko kanile i bilo kakav utjecaj atmosferskog tlaka. Druga kanila uvodi se stereotaksijski u lateralnu komoru te se vrši perfuzija umjetnim likvorom pri fiziološkom tlaku. To je ključna modifikacija napravljena u našem laboratoriju [45]. Ako se prema klasičnoj hipotezi cerebrospinalni likvor stvara unutar moždanih komora, apsorbira u subarahnoidnom prostoru i cirkulira kroz Sylvijev akvedukt, onda će sav likvor koji u jedinici vremena pri fiziološkom tlaku isteče na vanjskom kraju kanile postavljene u Sylvijev akvedukt predstavljati količinu stvaranja likvora.

U eksperimentima na mačkama tijekom 60 minuta bez provođenja perfuzije, pri fiziološkom tlaku likvora, likvor je cijelo vrijeme pulzirao pri vrhu vanjskog kraja kanile uvedene u Sylvijev akvedukt, ali nije skupljena niti jedna kap likvora. Tijekom dva sata perfuzije s umjetnim likvorom brzinama od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  i 26,06  $\mu\text{L}/\text{min}$  (koje se nalaze u granicama očekivanog stvaranja likvora prema klasičnoj hipotezi [26]), pri fiziološkom tlaku nije bilo razlike između brzine ulaznog i izlaznog perfuzata, što znači da nema „čistog“ stvaranja likvora unutar komora i da likvor ne cirkulira kroz komore [45, 47, 48].

## **Druge metode određivanja sekrecije likvora**

Druge metode koje su korištene za određivanje brzine sekrecije likvora su:

- drenaža cerebrospinalnog likvora [46]
- radiografska metoda [49]
- manometrijska metoda [49]
- ekstrakorporalna perfuzija koroidnog pleksus [50]
- magnetska rezonanca [51]
- mikropunkcija glavne drenažne vene koroidnog pleksusa [23]
- kolekcija likvora s površine koroidnog pleksusa [52]
- izolacija koroidnog pleksusa u komori [53]

Iako su navedenim metodama provedena brojna istraživanja dinamike cerebrospinalnog likvora slobodno se može reći da sve te metode imaju svoja ograničenja i nepreciznosti, kao što je pokazano i za ventrikulo-cisternalnu perfuziju uvedenu od Heiseya i Pappenheimera.

## **Kritike klasične hipoteze o dinamici cerebrospinalnog likvora**

Prije iznesena i objašnjena klasična hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora prema kojoj likvor teče poput spore rijeke od mjesta stvaranja unutar moždanih komora do mjesta apsorpcije u venske sinuse na površini mozga, s manjim modifikacijama, predstavlja ključno stajalište u znanstvenim radovima, revijalnim člancima, u nizu knjiga, udžbenika, shematskih prikaza i uzima se kao neupitna činjenica. Pomoću te hipoteze se pokušava objasniti i odstranjivanje metabolita iz središnjeg živčanog sustava i cerebrospinalnog likvora, distribucija tvari duž likvorskih prostora, porast intrakranijskog tlaka, patofiziologija hidrocefalusa, periventrikularni edem i drugo.

Međutim, niz dobivenih eksperimentalnih podataka i dugogodišnjih kliničkih opažanja i rezultata liječenja nije moguće objasniti u skladu s klasičnom hipotezom.

Tako je još 1921. godine Foley zaključio da postoji resorpcija likvora i od strane koroidnog pleksusa nakon što je, kod slučajnog ulaska ferocijanida iz manometra u



subarahnoidni prostor kod atlanto-okcipitalne punkcije radi mjerenja tlaka nakon davanja hipertonične otopine, kasnija histološka preparacija pokazala da otopina nije otišla samo putem arahnoidnih resica i ovojnica živaca, već i u perivaskularne prostore mozga i unutar ventrikularnog sustava [33, 54].

Na temelju histopatoloških studija mozga i kralješničke moždine kod različitih bolesti središnjeg živčanog sustava (meningitisa, apscesa, degenerativnih bolesti i dr.) Hassin je zaključio da je subarahnoidni prostor odlagalište za otpadne produkte moždanog i spinalnog parenhima koji također sudjeluju u stvaranju cerebrospinalnog likvora [55].

U eksperimentima s D<sub>2</sub>O (teškom vodom, deuterium oksid) koja je davana intravenski pokazano je da se istovremeno počinje povećavati njena koncentracija u komorama, cisterni magni i lumbalnom subarahnoidnom prostoru, ali nešto brže u cisterni magni, što znači da ne dolazi iz komora. Nakon radikalne kirurške pleksusektomije, te kod pacijenata s izoliranim spinalnim subarahnoidnim prostorom (blok na razini akvedukta i blok na razini foramena magnum) nije bilo razlike u izmjeni D<sub>2</sub>O u odnosu na pacijente s normalnim likvorskim putovima. Sve to ukazuje na malu ulogu koroidnog pleksusa u izmjeni vode koja se odvija puno brže nego li što to može objasniti tok likvora, te da se izmjena vrši stalno na površini mozga, kralješničke moždine, komora i subarahnoidnog prostora slobodnom difuzijom [56, 57].

I druge studije s radioaktivnim izotopima vode (D<sub>2</sub>O), elektrolita (<sup>24</sup>Na, <sup>42</sup>K, <sup>38</sup>Cl) i albumina (<sup>131</sup>I albumin – RISA) pokazale su da oni i ulaze i izlaze iz cerebrospinalnog likvora i u komorama i u subarahnoidnom prostoru brzinom koja ovisi i o mjestu izmjene i o vrsti molekule [58].

Koristeći metode perfuzije za proučavanje dinamike likvora također su dobiveni rezultati koji se ne uklapaju u klasičnu hipotezu i koji ukazuju na značajno ekstraventrikularno stvaranje likvora.

Tako je Sato u eksperimentima na psima, ventrikulo-cisternalnom, cisternalno-cisternalnom i spinalnom subarahnoidnom perfuzijom izračunao intraventrikularno stvaranje likvora od 0,027 mL/min, intrakranijsko – ekstraventrikularno (u subarahnoidnom prostoru) stvaranje od 0,02 mL/min, te stvaranje likvora u spinalnom prostoru od 0,018 mL/min. Uspoređujući površine intrakranijskog i spinalnog

subarahnoidnog prostora (120 cm<sup>2</sup> i 119,8 cm<sup>2</sup>) zaključio je da se omjeri površina tih likvorskih prostora i omjeri stvaranja likvora podudaraju [59-61].

Među brojnim pokazateljima koji su u suprotnosti s klasičnom hipotezom je i činjenica da je u liječenju hidrocefalusa, koroidna pleksusektomija rijetko kurativna i značajno manje efikasna nego što bi se očekivalo.

U eksperimentima na majmunima Milhorat je pokazao da se nakon odstranjenja koroidnog pleksusa lateralnih komora produkcija cerebrospinalnog likvora smanjila samo za trećinu (što je znatno manje nego udio pleksusa lateralnih komora u ukupnom tkivu svih pleksusa), da se hidrocefalus nakon opstrukcije akvedukta i dalje razvija unatoč učinjenoj pleksusektomiji iako je nešto manji, te da se sastav likvora nakon pleksusektomije nije mijenjao [62]. Također je prikazao slučaj petogodišnjeg djeteta kod kojeg je pet godina nakon učinjene pleksusektomije brzina stvaranja likvora određena perfuzijskom metodom bila u granicama normale [63]. Zbog sličnih kliničkih rezultata većina neurokirurga 1950-tih godina napušta koroidnu pleksusektomiju kao metodu liječenja hidrocefalusa [64].

Daljnijim razvojem mikrokirurške tehnike i endoskopske neurokirurgije sredinom 1990-tih godina ponovno se pokušava liječiti hidrocefalus zahvatima na koroidnom pleksusu, ali rezultati i dalje nisu zadovoljavajući, te je i dalje glavni način liječenja hidrocefalusa ugradnja sistema za ventrikulo-peritonealnu ili ventrikulo-atrionsku drenažu likvora [65, 66].

Treba spomenuti i da je u jednoj studiji od 202 male djece koja su zbog progresivnog hidrocefalusa liječena postavljanjem ventrikulo-atrionskog šanta čak 34 djece postalo šant neovisno [67]. U drugoj studiji od desetero djece i dvoje odraslih s hidrocefalusom i abnormalnim likvorskim putovima metodom ventrikulo-lumbalne perfuzije određena je brzina sekrecije likvora, te je utvrđeno da je manja nego kod djece s normalnim putovima [38].

Kao što je već spomenuto, česta povezanost papiloma koroidnog pleksusa i hidrocefalusa smatrala se jednim od dokaza sekrecije cerebrospinalnog likvora od strane koroidnog pleksusa, pri čemu se hidrocefalus objašnjavao hipersekrecijom likvora od strane tumora. Međutim, nađeni su brojni papilomi pleksusa koroideusa pri obdukcijama pacijenata koji

nisu imali hidrocefalus, a i često se nakon odstranjivanja takvih tumora hidrocefalus nije smanjio [68, 69].

Uz gore navedene eksperimentalne rezultate i klinička opažanja, u zadnjih dvadesetak godina na Institutu Ruđer Bošković i na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu provedeni su brojni eksperimenti i razvijeni eksperimentalni modeli u istraživanju dinamike cerebrospinalnog likvora čiji rezultati nisu u skladu s klasičnom hipotezom. Tako je eksperimentima ventrikulo-cisternalne perfuzije i ventrikulo-ventrikularne perfuzije s blokiranim Sylvijevim akveduktom (perfuzija izoliranih komora) pokazano da su pri fiziološkom tlaku u izoliranim komorama stvaranje i apsorpcija cerebrospinalnog likvora u ravnoteži, odnosno da nema „čistog“ stvaranja likvora. Promjene tlaka u izoliranim komorama utjecale su i na stvaranje i na apsorpciju likvora, a uspoređujući perfuziju izoliranih komora i ventrikulo-cisternalnu perfuziju, te računajući brzinu stvaranja likvora na temelju razrjeđenja indikatora pokazalo se da se u komorama stvara samo trećina likvora [70].

Obzirom da je pokazano kako ventrikulo-cisternalna perfuzija kao indirektna metoda određivanja sekrecije likvora nije tako precizna metoda kako se to smatralo [39-41], razvijen je novi eksperimentalni model ventrikulo-akveduktalne perfuzije i direktnog određivanja stvaranja likvora. Potvrđeno je da u izoliranim komorama pri fiziološkom tlaku nema „čistog“ stvaranja likvora. Također je pokazano da povećanje osmolarnosti likvora perfuzijom s hipertoničnom otopinom dovodi do povećanja volumena likvora u izoliranim komorama, vjerojatno promjenom osmotskih sila koje postoje između cerebrospinalnog likvora i okolnog tkiva [45, 47, 48].

Novim modelom akutne blokade Sylvijevog akvedukta pokazano je da tijekom 120 minuta blokade akvedukta ne dolazi niti do povećanja intrakranijskog tlaka niti do proširenja komora. Infuzija umjetnog likvora u izolirane komore različitim brzinama dovela je do porast tlaka koji se brzo nakon prestanka infuzije vratio na normalu. Pri tom nije došlo do proširenja komora, što ukazuje da se infudirani volumen brzo apsorbirao unutar komora pod povišenim tlakom [71].

U eksperimentima s fenosulfonftaleinom instaliranim u cisternu magnu pokazano je da organski anioni, kao što su i kiselinski metaboliti mozga (5-hidroksiindoloctena kiselina,

homovanilna kiselina) difundiraju iz cerebrospinalnog likvora u okolno tkivo od kuda se aktivnim transportom odstranjuju u kapilare [72]. Proučavanje distribucije označenog  $^3\text{H}$ -inulina danog intraventrikularno i u subarahnoidni prostor također je potvrdilo odlazak inulina i inulinu sličnih tvari iz likvora u okolni parenhim mozga, te potom u kapilare [43]. Rezultati oba eksperimenta pokazuju da se tvari iz likvora odstranjuju difuzijom, te aktivnom transportom, iz likvora, kroz okolni parenhim mozga u kapilare, a ne likvorskom cirkulacijom u duralne venske sinuse.

U eksperimentima s označenom  $^3\text{H}$ -vodom infundiranom intravenski, te u lateralne moždane komora, cisternu magnu i u kortikalne subarahnoidne prostore pokazano je da voda ne teče duž subarahnoidnih prostora prema duralnim sinusima već da se brzo apsorbira lokalno – iz komora u periventrikularne kapilare odnosno iz subarahnoidnih prostora kroz piju mater u priležeće cerebralne kapilare. Obzirom da voda čini 99% volumena likvora niti likvor prema tome ne cirkulira [73, 74].

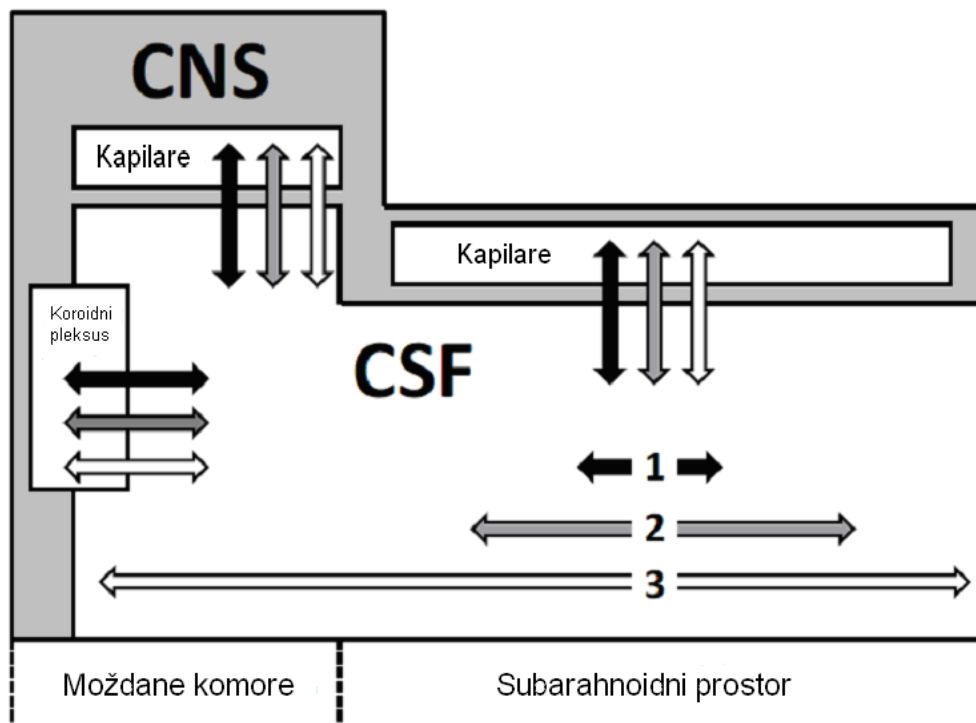
Svi ovi rezultati u suprotnosti su i ne mogu se lako uklopiti u klasičnu hipotezu o dinamici likvora, te je stoga i predložena nova hipotezu o dinamici cerebrospinalnog likvora u koju se navedeni rezultati lako uklapaju te je i potvrđuju.

### **1.2.2. Nova hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora.**

Prema novoj hipoteze o dinamici cerebrospinalnog likvora, likvor se stalno stvara i apsorbira u cijelom likvorskom sustavu kao posljedica filtracije vode kroz stijenku arterijskih kapilara i reapsorpcije vode kroz stijenku venskih kapilara i postkapilarnih venula, pod utjecajem hidrostatskih i osmotskih sila koje djeluju između cerebrospinalnog likvora i kapilara smještenih u koroidnom pleksusu, subependimalnom i subpialnom tkivu. Te sile reguliraju volumen cerebrospinalnog likvora i utječu na intrakranijski tlak u fiziološkim i patološkim stanjima, slično kao što su regulirani volumeni između vanstanične i stanične tekućine u drugim organima. Disbalans između tih sila trebao bi rezultirati promjenom volumena likvora, a ako su promjene jače izražene i promjenom intrakranijskog tlaka [75-77].

Uz hidrostatske i osmotske sile vrlo važno mjesto u regulaciji homeostaze likvora imaju aktivni transporti tvari, ovisni o energiji. Oni su prisutni na svim stanicama u središnjem živčanom sustavu i odvijaju se u oba smjera, u stanicu i iz stanice, te sudjeluju u regulaciji osmotske ravnoteže, a time i volumena cerebrospinalnog likvora [75].

Suprotno klasičnoj hipotezi prema kojoj likvor teče poput spore rijeke, voda koja čini 99% volumena međustanične tekućine i volumena likvora ne teče jednosmjerno duž likvorskih prostora već se lokalno (duž cijelog likvorskog sustava) stvara i reapsorbira. Za razliku od vode, tvari koje slabo prolaze kroz stijenke malih krvnih žila imaju dugo poluvrijeme zadržavanja u likvoru i polako se prenose bidirekcijski duž svih likvorskih prostora uslijed sistoličko-dijastoličkih pulzacija likvora naprijed-nazad i njegova miješanja (Slika 3) [75-77].



*Slika 3. Shema nove hipoteze o dinamici cerebrospinalnog likvora [77]. Prikazani su likvorski prostori (moždane komore i subarahnoidni prostor) s okolnim moždanom parenhimom u kojem se nalaze kapilare, te kapilare koroidnog pleksusa. Voda (dvosmjerna crna strelica) se izmjenjuje brzo između likvora i kapilara, ima kratko*

*poluvrijeme zadržavanja u likvoru i ograničenu distribuciju duž likvorskih prostora (1). Tvari s vrlo ograničenim prolazom iz likvora u kapilare kao što je inulin (dvosmjerna bijela strelica) imaju dugo poluvrijeme zadržavanja u likvoru i neograničenu bidirekcijsku distribuciju duž likvorskih prostora (3). Intermedijalna grupa tvari kao što su organske kiseline sa sporijim prolazom iz likvora u kapilare od vode i intermedijalnim poluvremenom zadržavanja u likvoru pokazuju ograničenu distribuciju duž likvorskih prostora (2). Smatra se da je bidirekcijska distribucije tvari duž likvorskih prostora posljedica pulzacija likvora naprijed – nazad.*

### **1.3. INTRAKRANIJSKI TLAK**

Intrakranijski tlak je tlak unutar lubanje i često ga se naziva i likvorski tlak, odnosno tlak cerebrospinalnog likvora. Intrakranijski prostor je kod odraslog čovjeka zatvoren čvrsto spojenim kostima i u potpunosti ispunjen određenim volumenom mozga, krvi i cerebrospinalnog likvora. Kod odraslog čovjeka volumen mozga je oko 1400 mL, intrakranijski volumen krvi je oko 75 mL, a intrakranijski volumen likvora oko 120 mL. U fiziološkim uvjetima, kod normalnog intrakranijskog tlaka ta tri volumena su u ravnoteži. Prema klasičnoj Monro-Kellievoj hipotezi povećanje jednog od ta tri volumena dovest će do povećanja intrakranijskog tlaka ako se druga dva volumena proporcionalno ne smanje. Normalni intrakranijski tlak kod odraslog čovjeka i starije djece iznosi oko 10 - 15 mm Hg, kod djece je tlak nešto niži i iznosi 3 - 7 mm Hg, a kod novorođenčadi 1,5 – 6 mm Hg [6].

Intrakranijski tlak u fiziološkim uvjetima nije statičan nego stalno oscilira i pulzira u skladu s respiracijama i sistolom srca, a jače se povećava kod kašljanja, kihanja, naprezanja. I promjene položaja tijela uzrokuju promjene intrakranijskog tlaka [11]. Mjerenje intrakranijskog tlaka može se vršiti uvođenjem punkcijske igle, kanile ili katetera u likvorski prostor (perkutanom punkcijom u cervikalni ili lumbalni subarahnoidni prostor ili cisternu magnu, trepanacijom i uvođenjem kanile ili katetera u moždane komore, perkutanom punkcijom kroz fontanelu kod djece), koji se potom putem cjevčice spajaju na pretvarač tlaka koji se spaja s poligrafom (monitorom). Također postoje i koriste se senzori za intraparenhimno, epiduralno i subduralno mjerenje tlaka.

Kao referentna – nulta točka obično se uzima visina foramena Monroe odnosno vanjski slušni otvor [6, 11].

Međunarodna jedinica (SI) za tlak je paskal (Pa), a veća kilopaskal (kPa), ali se u kliničkoj praksi za intrakranijski tlak koriste jedinice mm Hg ili mm H<sub>2</sub>O (1 kPa = 7,5 mm Hg = 102 mm H<sub>2</sub>O). Tako se lako iz vrijednosti krvnog tlaka koji se također najčešće izražava u mm Hg i intrakranijskog tlaka izračunava cerebralni perfuzijski tlak (CPP) koji odgovara razlici srednjeg arterijskog tlaka (MAP) i intrakranijskog tlaka (ICP).

**Povišen intrakranijski tlak.** U kliničkoj praksi intrakranijski tlak se najčešće mjeri kod teških kranio cerebralnih ozljeda kada dolazi do značajnog povišenja intrakranijskog tlaka. Tada se prema preporukama za liječenje teške kranio cerebralne ozljede i povišenog intrakranijskog tlaka uvodi kateter obično u frontalni rog lateralne komore [78]. Kateter je spojen s pretvaračem tlaka i poligrafom radi mjerenje i praćenja intrakranijskog tlaka, a omogućava i terapijsku vanjsku drenažu likvora kojom se prema klasičnoj Monro-Kellievoj hipotezi smanjivanjem intrakranijskog volumena likvora, kao jednog od intrakranijskih volumena pokušava smanjiti povišeni intrakranijski tlak.

Obzirom da moždani protok krvi (CBF) ovisi o cerebralnom perfuzijskom tlaku (CPP), a kao što je već rečeno cerebralni perfuzijski tlak (CPP) je jednak razlici između srednjeg arterijskog tlaka (MAP) i intrakranijskog tlaka (ICP) svako značajnije povećanje intrakranijskog tlaka dovodi do smanjenja cerebralnog perfuzijskog tlaka što može dovesti do manjeg ili većeg oštećenja mozga.

Osim kod teških kranio cerebralnih ozljeda, stanje povišenog intrakranijskog tlaka javlja se kod različitih dobroćudnih i zloćudnih tumora mozga, spontanog intrakranijskog krvarenja (intracerebralnog krvarenja i subarahnoidnog krvarenja), infekcija, cerebrovaskularnog infarkta, akutnog hidrocefalusa. U svim tim stanjima osim primarnog procesa koji sam predstavlja dodatni volumen u zatvorenom intrakranijskom prostoru obično nastaje i različiti edem mozga (vazogeni, citotoksični, hidrostatski, osmotski) koji dodatno povisuje intrakranijski tlak dodatnim povećanjem intrakranijskog volumena, ali i smanjivanjem podatnosti mozga, sužavanjem likvorskih prostora i otežavanjem komunikacije među likvorskim prostorima. Također sva ta stanja mogu poremetiti i

povećati normalni intrakranijski volumen krvi koji je u normalnim uvjetima pod kontrolom vaskularne autoregulacije, što dodatno povisuje intrakranijski tlak.

Poznato je da intrakranijski tlak može biti normalan ili blago povišen i u slučaju postojanja većih ekspanzivnih masa u intrakranijskom prostoru naročito ako oni nastaju ili rastu sporo (kronični subduralni hematomi, dobroćudni tumori mozga) što ukazuje na značajne kompenzacijske mehanizme. Kao mogući kompenzacijski mehanizmi u regulaciji intrakranijskog tlaka spominju se:

- povećanje resorpcije likvora iz kranija
- pomicanje volumena likvora iz kranija u spinalni subarahnoidni prostor
- promjena intrakranijskog volumena krvi (vazokonstrikcija, vazodilatacija)
- elastičnost spinalne dure
- plastičnost moždanog tkiva

Međutim, kada dođe do sloma kompenzacijskih mehanizama dolazi do porasta intrakranijskog tlaka i oštećenja mozga [11]. Kao gornja granice intrakranijskog tlaka za koji se smatra da se još može tolerirati bez oštećenja mozga najčešće se spominje 20 – 25 mm Hg [6, 11].

U konzervativnom liječenju povišenog intrakranijskog tlaka, najčešće kod teške kraniocerebralne ozljede uz niz drugih mjera kao što su povišenje glave za 30-45° (reducira intrakranijski tlak povećanjem venske drenaže i smanjenjem srednjeg karotidnog tlaka), glava u središnjoj liniji (oslobađanje jugularnih vena), mehanička ventilacija do normokapnije uz izbjegavanje hiperventilacije (redukcija pCO<sub>2</sub> dovodi do cerebralne vazokonstrikcije i redukcije intrakranijskog volumena krvi), sedacija, relaksacija, analgezija, redovito se primjenjuje i hiperosmolarna odnosno osmotska terapija, najčešće manitol [6, 78, 79]. Peritumorski edem dobro reagira na kortikosteroide, prvenstveno deksametazon [6].

Neurokirurško liječenje povišenog intrakranijskog tlaka obuhvaća odstranjivanje patološkog supstrata koji je doveo do povišenog intrakranijskog tlaka (epiduralnog krvarenja, subduralnog krvarenja, kompresivnog prijeloma lubanje, intracerebralnog krvarenja, tumora, ciste, apscesa), te već prije spomenutu vanjsku drenažu likvora, ventrikulo-peritonealnu ili ventrikulo-atrionsku drenažu likvora kod hidrocefalusa, a u



određenim slučajevima nemogućnosti kontrole intrakranijskog tlaka i dekompresivnu kraniotomiju kojom se proširuje zatvoreni intrakranijski prostor.

**Snížen intrakranijski tlak.** Stanje sníženog intrakranijskog tlaka odnosno intrakranijske hipotenzije relativno je rijetko u kliničkoj praksi. Najčešće se javlja zbog prekomjerne drenaže likvora kod liječenja hidrocefalusa ventrikulo-peritonealnom ili ventrikulo-atrísjskom drenažom, te vrlo rijetko kod kraniocerebralnih ozljeda s prijelomom baze lubanje i likvor fistulom gdje cerebrospinalni likvor istječe kroz paranazalne sinuse na nos ili u grlo. U liječenju je potrebno uspostaviti „normalnu“ drenažu likvora postavljanjem odgovarajućeg ventila u sistemu drenaže likvora, dok se likvorske fistule ako se spontano ne zatvore trebaju zatvoriti kirurški [6].

Kao što je ovdje već rečeno uz druge navedene postupke u konzervativnom liječenju povišenog intrakranijskog tlaka važno mjesto ima osmotska terapija ili hiperosmolarna terapija čije mehanizam djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, kao što i odnosi intrakranijskog tlaka s volumenom cerebrospinalnog likvora nisu u potpunosti objašnjeni. To ćemo pokušati učiniti u ovom našem radu.

#### **1.4. OSMOTSKA TERAPIJA INTRAKRANIJSKE HIPERTENZIJE**

Osmotska terapija ili hiperosmolarna terapija podrazumijeva primjenu osmotski aktivne tvari koja se daje intravenski radi snížavanja povišenog intrakranijskog tlaka. U kliničkoj praksi najčešće se koristi u liječenju teških ozljeda mozga, ali i kod drugih stanja povišenog intrakranijskog tlaka (tumori, subarahnoidno krvarenje, intracerebralno krvarenje, ishemijski inzult, hepaticka encefalopatija i dr.). Također se rutinski primjenjuje prije početka većine neurokirurških operacija radi stvaranja dodatnog prostora unutar lubanje i lakšeg pristupa patološkom procesu.

**Povijest osmotske terapije.** Principi hiperosmolarne terapije dolaze još od radova Weeda i McKibbena koji su 1919. godine pokazali smanjenje intrakranijskog tlaka kod mačke nakon intravenskog davanje hiperosmolarnih tvari kao što su hipertonična otopina NaCl, glukoza, Na bikarbonat, a slično je prikazao i Foley [80, 81].

U eksperimentima s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom pokazano je da povećanje osmolarnosti plazme infuzijom hiperosmolarne otopine glukoze smanjuje izračunate vrijednosti sekrecije likvora, dok infuzija hipoosmolarne otopine smanjuje osmolarnost plazme i povećava sekreciju likvora. Također je došlo do promjene sadržaja vode u mozgovnom tkivu [82, 83]. U sličnim eksperimentima s tri različita perfuzata (saharoza, NaCl, urea) također je pokazano da povećanjem osmolarnosti perfuzata dolazi do povećanja izračunate vrijednosti toka likvora. Uz to su perfuzati iste osmolarnosti, ali s različitom tvari izazivali različit intenzitet promjena što nije lako objasniti [27].

Haden je među prvima 1919. godine pokazao kliničko poboljšanje pacijenata s ozljedom glave nakon davanja hiperosmolarnih tvari. Od toga vremena primjenjuju se hiperosmolarne tvari odnosno hiperosmolarna terapija u liječenju intrakranijske hipertenzije. Koristili su se urea, sorbitol, glicerol, hipertonična otopina NaCl, te manitol koji je postupno zamijenio ostale tvari [79].

**Manitol.** Manitol je osmotski diuretik koji se danas najčešće koristi u hiperosmolarnoj terapiji. Ne metabolizira se u tijelu i izlučuje se nepromijenjen urinom. Manitol se daje kao 20 ili 25%, intravenski u bolusu ili u obliku kontinuirana infuzije, u dozi od 0,25 – 2 g/kg tjelesne težine. Smatra se da je manitol efikasan kod vazogenog i intersticijskog edema, dok je uloga kod intracelularnog citotoksičnog edema upitna [79]. Rizici upotrebe manitola su akutno bubrežno zatajenje i „rebound“ edem mozga. Akutno bubrežno zatajenje najvjerojatnije nastaje zbog oštećenja tubula bubrega radi prevelike hiperosmolarnosti plazme. „Rebound“ fenomen nastaje zbog ulaska i akumulacije osmotski aktivne tvari – manitola u intrakranijske prostore kod ponavljanog i produženog davanja, što onda osmotski navlači vodu u suprotnom smjeru. Spominju se i idiogeni intracelularni osmoliti, ali su saznanja o tome mala [79].

**Hipertonična otopina NaCl.** Zadnjih desetak godina, naročito kod djece, u liječenju povišenog intrakranijskog tlaka kod teške kranio cerebralne ozljede umjesto manitola sve se više koristi hipertonična otopina NaCl. Pokazalo se da je efikasnija kod intrakranijske hipertenzije refraktorne na manitol. Za razliku od manitola ne povezuje se s akutnim bubrežnim zatajenjem i može se koristiti i kod veće osmolarnosti plazme bez

većih nuspojava. Kao rijetka komplikacija kod prebrze korekcije hiponatremije s hipertoničnom otopinom NaCl spominje se centralna pontina mijelinoliza. „Rebound“ fenomen također je moguć kao i kod manitola [79, 84].

**Aditivan učinak furosemida.** U kliničkoj praksi zajedno s manitolom primjenjuje se i diuretik furosemid koji pojačava njegovo djelovanje u snižavanju intrakranijskog tlaka. Pokazalo se da sam furosemid ne smanjuje intrakranijski tlak, niti mijenja osmolarnost plazme. Međutim, davanje furosemida nakon davanja manitola pojačava pad intrakranijskog tlaka koji sam manitol uzrokuje, a najvažnije je što furosemid prolongira trajanje tog pada intrakranijskog tlaka. Kao mehanizam aditivnog djelovanja furosemida uz manitol spominje se djelovanje furosemida na razini koroidnog pleksusa smanjivanjem sekrecije cerebrospinalnog likvora. Vjerojatnije je da furosemid direktnim diuretskim djelovanjem na razini bubrega povećava diurezu i gubitak vode iz plazme i time povećava i produžava hiperosmolarno stanje u plazmi koje je napravio manitol, a što se smatra glavnim mehanizmom djelovanja hiperosmolarne terapije odnosno manitola [85, 86].

**Hiperosmolarnost.** Brojni patofiziološki procesi u središnjem živčanom sustavu (trauma, krvarenje, ishemija, infekcija) uzrokuju među ostalim i promjene u osmolarnosti tekućina (staničnih i vanstaničnih) u različitim dijelovima središnjeg živčanog sustava, što dovodi do promjena osmotskih sila, a time i promjene izmjene vode između mozga, intersticijskog prostora i likvora, te promjene volumena cerebrospinalnog likvora i intrakranijskog tlaka.

Hiperosmolarnost nakon oštećenja mozga pokazana je u svim studijama u kojima je mjerena osmolarnost, neovisno je li oštećenje nastalo mehaničkom traumom ili ishemijom. Postoji više teorija zašto hiperosmolarnost u tkivu nastaje i više faktora koji u tome sudjeluju. Neki faktori uzrokuju intracelularnu hiperosmolarnost (gubitak Na-K pumpe, otpuštanje mitohondrijskog kalcija, oslobađanje vezanog kalija, anaerobni metabolizam, stvaranje idiogenih osmolita, edem gigantskih stanica, toksičnost glutamata), a drugi ekstracelularnu hiperosmolarnost (pomak tekućine intracelularno, gubitak krvno-moždane barijere, upala) [87].

**Hipoosmolarnost i hiperosmolarnost plazme.** Osim zbog patofizioloških procesa koji nastaju unutar samog mozga, promjene osmolarnosti unutar mozga nastaju i sekundarno uslijed patofizioloških procesa nastalih izvan središnjeg živčanog sustava. Tako se u stanjima hipoosmolarnosti plazme i hiponatrijemije (SIADH, psihogena polidipsija, infuzija hipotonične otopina) razvija osmotski edem mozga zbog pomaka tekućine (vode) iz plazme u međustanični prostor i likvor. Suprotno tome, u stanjima hiperosmolarnosti plazme (dijabetes insipidus, teški proljevi) dolazi do pomaka vode iz mozga u plazmu i posljedičnog „skupljanja“ mozga [88]. Na sličan način pokušava se i objasniti mehanizam djelovanja hiperosmolarne terapije.

**Mehanizam djelovanja hiperosmolarne terapije.** Iako se hiperosmolarne terapija koristi već dugi niz godina u konzervativnom liječenju povišenog intrakranijskog tlaka [89] točan mehanizam djelovanja nije do kraja razjašnjen. Obzirom da se intrakranijski tlak objašnjava (prema klasičnoj Monro-Kellievoj hipotezi) međusobnim odnosom volumena mozga, intrakranijskog volumena krvi i volumena likvora, onda se i učinak hiperosmolarne terapije prvenstveno pokušavao objasniti djelovanjem na ta tri volumena. Poznato je da voda teče iz odjeljka niže osmolarnosti prema onom s višom osmolarnosti i da razlika u osmolarnosti od 1 mosmol/kg između dva odjeljka (kod osmolarnosti od oko 300 mosmol/kg i temperaturi od 37° C) odvojenih polupropusnom membranom rezultira tlakom od 2,59 kPa odnosno 19,4 mm Hg. Također se zna da povećanje osmolarnosti plazme uzrokuje izvlačenje vode iz ekstracelularnog prostora u krv, pa se tako pokušava objasniti djelovanje hiperosmolarne terapije na intrakranijski tlak smanjivanjem sadržaja vode iz mozga, a time i volumena samog mozga [90]. Temeljeno na kliničkim opažanjima s manitolom, sorbitolom i glicerolom, smatra se da je potrebno povećanje osmolarnosti plazme od 5-10 mosmol/kg za terapijsku učinkovitost kod povišenog intrakranijskog tlaka [84].

Međutim, pokazano je da maksimalna dehidracija moždanog parenhima, a time i maksimalno smanjivanje volumena mozga nastupa petnaest i više minuta kasnije od maksimalnog pada intrakranijskog tlaka [91]. Stoga se za početni, brzi učinak manitola odnosno osmotske terapije pretpostavlja da je zaslužan reološki efekt smanjivanjem

hematokrita i viskoznosti krvi što povećava cerebralni protok krvi te se autoregulacijom smanjuje promjer krvnih žila u mozgu, što bi onda smanjilo intrakranijski volumen krvi (jedno od mogućih objašnjenja). Dodatno manitol kao diuretik smanjuje centralni venski tlak što bi moglo smanjiti intrakranijski tlak jačom drenažom putem venskih sinusa.

U radovima koji govore u sekreciji likvora pokusi s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom pokazali su smanjenje sekrecije likvora nakon davanja manitola, te povećanje apsorpcije likvora, što bi onda moglo smanjiti volumen likvora, ali se tom metodom obzirom na vremenski slijed postupaka u metodi nije moglo pratiti što se događa sa sekrecijom likvora odmah nakon same primjene manitola u fazi maksimalnog pada intrakranijskog tlaka.

Na temelju svega navedenog možemo zaključiti da iako je najvjerojatnije da je osnovni mehanizam djelovanja hiperosmolarne terapije u redukciji intrakranijskog tlaka pomak vode iz mozga u plazmu uzrokovan izazvanim promjenama osmotskih sila još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno iz kojeg je dijela mozga (stanice, međustanična tekućina ili likvora) pomak vode u (sistemska) cirkulaciju ključan za snižavanje intrakranijskog tlaka, i u kojem se trenutku i kojom dinamikom nakon davanja osmoterapeutika ti osmotski pomaci vode odvijaju.

Pretpostavljajući da u tome centralnu ulogu ima upravo volumen cerebrospinalnog likvora mi u ovom radu želimo ispitati da li promjena osmolarnosti krvi (osmotskom terapijom) doista ima učinak na volumen cerebrospinalnog likvora i ima li ta promjena volumena učinak na intrakranijski tlak, čime bi se značajno doprinijelo objašnjenu mehanizma djelovanja osmotske terapije.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U konzervativnom liječenju povišenog intrakranijskog tlaka već dugo se koriste hiperosmolarne otopine (najviše manitol) koje se daju intravenski. Obzirom da se intrakranijski tlak objašnjava međusobnim odnosom volumena mozga i intrakranijskog volumena krvi i likvora i djelovanje hiperosmolarnih otopina pokušava se objasniti djelovanjem na ta tri volumena. Međutim, točan mehanizam djelovanja hiperosmolarnih otopina na snižavanja intrakranijskog tlaka, kao i učinak na volumen likvora nedostatan je istražen i još uvijek nepotpuno objašnjen.

Cilj ovog rada je eksperimentalno, na mačkama, pokazati izravnu povezanost između promjena osmolarnosti krvi i promjena osmolarnosti cerebrospinalnog likvora s promjenama volumena cerebrospinalnog likvora. Također je cilj rada pokušati pokazati da su promjene tlaka cerebrospinalnog likvora odnosno intrakranijskog tlaka povezane s promjenama tog volumena cerebrospinalnog likvora koji je uzrokovan eksperimentalnim promjenama osmolarnosti tjelesnih tekućina. Pri tom se očekuje da će promjena osmolarnosti krvi ili likvora koja dovede do akutnog povećanja volumena likvora rezultirati povišenjem intrakranijskog tlaka. Tražeći odgovore na postavljene teze pokušao bi se razjasniti i mehanizam terapijskog učinka hiperosmolarnih otopina.

Prema klasičnoj hipotezi o dinamici cerebrospinalnog likvora, likvor se aktivno stvara – secernira unutar moždanih komora od strane koroidnog pleksusa te teče poput spore rijeke do mjesta apsorpcije kroz arahnoidalne resice u duralne venske sinuse. Prema toj hipotezi ukupni volumen likvora ovisi o ravnoteži između secerniranog likvora i apsorbiranog likvora, odnosno o količini likvora koji se na jednom mjestu (unutar moždanih komora) stvara, a na drugom mjestu (venozni sinusi) apsorbira. Međutim, niz dobivenih eksperimentalnih podataka i dugogodišnjih kliničkih opažanja i rezultata liječenja nije moguće objasniti u skladu s klasičnom hipotezom, te je predložena nova hipoteza o dinamici cerebrospinalnog likvora po kojoj se likvor stalno stvara i apsorbira u cijelom likvorskom sustavu kao posljedica filtracije vode kroz stijenku arterijskih kapilara i reapsorpcije vode kroz stijenku venskih kapilara i postkapilarnih venula, pod utjecajem hidrostatskih i osmotskih sila (tlakova) koje djeluju između cerebrospinalnog likvora i kapilara smještenih u koroidnom pleksusu, subependimnom i subprijalnom tkivu.

Prema toj hipotezi ukupni volumen likvora nije rezultat sekrecije likvora samo na jednom mjestu i njegove apsorpcije na drugom mjestu, već je rezultat djelovanja tih hidrostatskih i osmotskih sila duž cijelog likvorskog prostora.

U skladu s novom hipotezom i našim preliminarnim rezultatima smatramo da ćemo planiranim eksperimentima i dobivenim rezultatima jasno pokazati kako isto povećanje osmolarnosti likvora (koje ćemo izazvati perfuzijom likvorskih prostora hipertoničnom otopinom saharoze), dovodi do promjene ukupnog volumena cerebrospinalnog likvora ovisno o površini likvorskog sustava koja je izložena djelovanju te hiperosmolarnosti. Pri tom se očekuje da je učinak na ukupni volumen likvora to veći što je veća površina likvorskog sustava koja je izložena djelovanju hiperosmolarnosti. To će biti istraženo s dva različita modela perfuzije likvorskih prostora, ventrikulo-cisternalnom perfuzijom (velika kontaktna površina) i ventrikulo-akveduktalnom perfuzijom (mala kontaktna površina). Time bi jasno pokazali kako ukupni volumen likvora nije rezultat sekrecije na jednom mjestu i apsorpcije na drugom mjestu, već rezultat ravnoteže osmotskih (i hidrostatskih) sila duž cijelog likvorskog sustava.

Također, ukoliko promjena osmolarnosti cerebrospinalnog likvora ili krvi utječe na promjenu ukupnog volumena likvora, za očekivati je da bi promjena koncentracije metabolita neurotransmitera koji su prisutni u likvoru, mogla poslužiti kao indikator promjene tog ukupnog volumena likvora. U tu svrhu će se u likvoru određivati 5-hidroksiindolactena kiselina (5-HIAA; glavni metabolit neurotransmitera serotonina) i homovanilna kiselina (HVA; glavni metabolit neurotransmitera dopamina), te uspoređivati njihova koncentracija prije i nakon promjene volumena likvora.

Na kraju vjerujemo da ćemo dobivenim rezultatima značajno doprinijeti predloženoj novoj hipotezi o dinamici cerebrospinalnog likvora kao i novom shvaćanju fiziologije likvora.

### **3. MODELI I METODE**

#### **3.1. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE I ANESTEZIJA**

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Zavoda za molekularnu biologiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Svi eksperimenti provedeni su u skladu s Europskom direktivom 86/609/EEC o zaštiti životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe, sa Zakonom o zaštiti životinja Republike Hrvatske, te uz odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mačka je odabrana kao eksperimentalna životinja jer je relativno velika i ima dobro razvijen živčani sustav vrlo sličan ljudskom, te je vrlo često korištena u eksperimentima istraživanja fiziologije cerebrosposinalnog likvora. Eksperimenti su vršeni na odraslim mačkama oba spola, tjelesne težine od 1,6 do 3,8 kg. Životinje su prije eksperimenata prebivale u kavezima s prirodnom izmjenom dana i noći i uz slobodan pristup hrani i vodi. Prije eksperimenata životinje su bile u karanteni 30 dana.

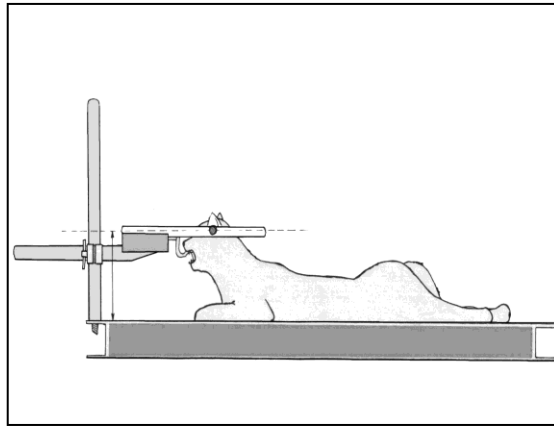
Mačke su anestezirane kloralozom (alfa-kloraloza) koja je poznata kao dobar anestetik dugog djelovanja koji ne dovodi do značajnih promjena acidobaznog statusa te krvnog i intrakranijskog tlaka. Anestetik je apliciran intraperitonealno u dozi od 100 mg/kg (5 mL otopine po kg). Otopinu anestetika pripremili samo tako da smo 500 mg kloraloze razrijedili u 25 mL fiziološke otopine te smo otopinu miješali u ciklomikseru dok ne bude dovoljno bistra. Učinak kloraloze je spor i potrebno je više od sat vremena nakon intraperitonealne injekcije da se postigne duboka anestezija. To vrijeme koristi se za pripremu operacijskog stola, kirurških instrumenata, baždarenje aparature za mjerenje intrakranijskog tlaka, te pripremu drugih otopina. Tijekom eksperimenta dubina anestezije se po potrebi održavala povremenom primjenom tiopentala (Nesdonal, Pliva, 60 mg/kg) intravenski kroz kanilu uvedenu u venu femoralis. Tijekom eksperimenta mačke su spontano disale u anesteziji i nije bilo značajnije promjene niti krvnog tlaka niti plinova u krvi.



### 3.2. OPERATIVNI ZAHVATI

**Postavljanje kanila u krvnu cirkulaciju.** Životinji se venska kanila postavi tako da se izolira vena safena i u nju uvede plastična cjevčica (intranila). Ona nam je potrebna za primjenu hiperosmolarne otopine manitola, te da povremeno možemo dodati barbituratni anestetik (Nesdonal, Pliva), ako anestezija tijekom pokusa popusti zbog biološke varijabilnosti. Na kraju pokusa bi se kroz kanilu dodavanjem prekomjerne doze anestetika izvršilo žrtvovanje životinje. Također putem venske kanile možemo održavati životinju hidriranom. U arteriju femoralis također je postavljena kanila za mjerenje krvnog tlaka i za uzimanje uzoraka krvi.

**Postavljanje životinje u stereotaksijski aparat.** U svim pokusima glava mačke je bila fiksirana u stereotaksijski aparat (model za mačke, D. Kopf, Tujunga, CA, SAD). Fiksacija glave mačke vrši se tako da se ušni nastavci aparata uvedu u vanjske slušne otvore, glava se smjesti u sredinu, a pomoću trećeg nastavka koji se uvede u usta fiksira se gornja čeljust. Tako učvršćena mačka zauzima tzv. sfinga položaj, gdje je glava povišena, a vanjski slušni otvori 12 cm iznad stereotaksijskog stola (Slika 4).



*Slika 4. Mačka fiksirana u stereotaksijski aparat – „sfinga položaj“.*

**Uvođenje kanile u lateralne komore.** Tek pošto je životinja u stereotaksijskom aparatu može se pristupiti uvođenju kanila. Nožem se učini rez kože u medijalnoj liniji od orbitalnih lukova do trnastog nastavka trećeg vratnog kralješka, te se oštrim disektorom odvoji periost i mišić i sve se razmakne rastvaračem te se tako učini hemostaza. Krvarenje iz kosti zaustavljamo voskom.

Na parijetalnoj kosti se odrede koordinate za uvođenje kanila (unutarnjeg promjera 0,9 mm) u lateralne komore i to 9 mm lateralno i 4,5 mm anteriorno od nulte točke stereotaksijskog aparata. Na tom mjestu lateralna komora zavija prema temporalnom rogu, te je dublja i šira nego na ostalim dijelovima što olakšava postavljanje kanile. Visokofrekventnom bušilicom učini se otvor na kosti promjera oko 3-4 mm, te se pomoću mikromanipulatora uvedu kanile u obje lateralne komore 10-12 mm ispod dure. Kanila je spojena na plastičnu cjevčicu ispunjenu umjetnim likvorom. Spontano prolaženje umjetnog likvora ukazuje da je vrh kanile u lateralnoj komori. Otvor na kosti zatvori se cijanoakrilnim ljepilom i zubnim cementom.

**Uvođenje kanile u Sylvijev akvedukt.** U slučaju kad se uvodi kanila u Sylvijev akvedukt glava mačke se flektira prema naprijed za 30° radi lakšeg pristupa okcipitalnoj kosti. Visokofrekventnom bušilicom učini se ispod vanjske protuberancije okcipitalis otvor kosti promjera oko 10 mm. Dura se otvori škarama i kroz srednji dio vermisa se aspiracijom tkiva napravi kanal do prednjeg dijela četvrte komore te se prikaže vanjski otvor Sylvijevog akvedukta. Uvede se plastična kanila unutarnjeg promjera 1,2 mm, a vanjskog promjera 1,5 mm u akvedukt, oko 2 mm duboko. Šupljina oko kanile se prekrije trakicama fibrina koje se na površini preliju cijanoakrilnim ljepilom, te se otvor kosti zatvori akrilatnom čime se fiksira kanila i hermetički zatvori kranijum. Komunikacija između komora i Sylvijevog akvedukta se provjerava tako da se dodaju kapi umjetnog likvora prvo kroz kanilu u jednu lateralnu komoru, a potom i u drugu i promatra se da li spontano istječu kroz kanilu uvedenu u Sylvijev akvedukt.

**Uvođenje kanile u cisternu magnu.** Kanila (metalna cjevčica s unutarnjim promjerom 1 mm) se u cisternu magnu uvodi rukom kroz otvor između okcipitalne kosti i atlasa pazeći da se pritom ne izazove krvarenje u likvorski sustav. Kanila se uvodi direktno kroz mišićne vrata i u slučaju da je mišićna masa veća, napravi se manji medijalni rez kroz mišićne u području prvog vratnog kralješka. Na kanilu se nastavlja plastična

cjevčica koja je spojena sa štrcaljkom pomoću koje asistent lagano potiskuje umjetni likvor da spriječi začepljenje kanile prilikom njenog uvođenja. Uvođenje kanile se zaustavlja čim se probije dura. Kanila se pričvrsti za mikromanipulator pomoću zubnog cementa, a kroz izlazni otvor cjevčice se ispusti par kapi tekućine da se provjeri nalazi li se kanila u cisterni magni. Ukoliko kapi lagano i spontano istječu, to ukazuje da smo kanilu uveli u cisternu magnu. Dobru prohodnost sustava nam potvrđuje pulziranje tekućine u plastičnoj cjevčici.

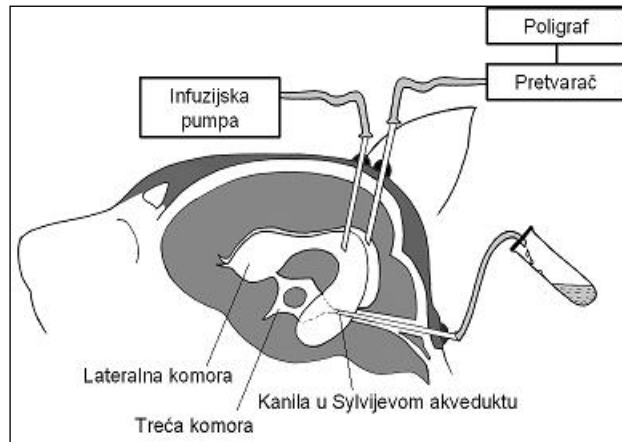
Kanila uvedena u jednu lateralnu komoru služi kao ulazna kanila za perfuziju i spojena je na infuzijsku pumpu (Palmer 51, Engleska). Druga kanila uvedena u lateralnu komoru služi kao kanila za mjerenje intrakranijskog tlaka i spojena je preko pretvarača tlaka (Statham) na poligraf (7D, Grass, Quincy, MA, SAD).

Kanila uvedena u Sylvijev akvedukt je izlazna kanila, pomoću koje skupljamo uzorke likvora. Spaja se s cjevčicom s epruvetom postavljenom na odgovarajućoj visini u odnosu na nultu točku (vanjski slušni otvor).

### **3.3. VRSTE I TIJEK POKUSA**

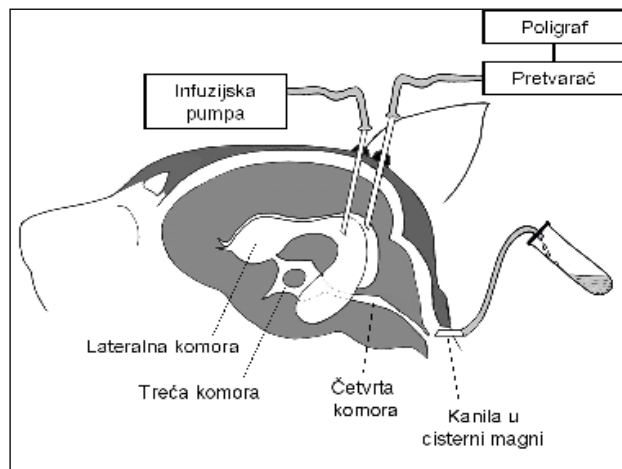
Učinak promjene osmolarnosti cerebrospinalnog likvora na volumen cerebrospinalnog likvora smo ispitivali tako da se na anesteziranim mačkama kod normalnog likvorskog tlaka usporede izlazni volumeni nakon ventrikulo-akveduktalne perfuzije koja obuhvaća malenu kontaktnu površinu (obje lateralne moždane komore i treću komoru) i ventrikulo-cisternalne perfuzije koja obuhvaća veliku kontaktnu površinu (obje lateralne komore, treću i četvrtu komora i subarahnoidni prostor - cisternu magnu).

**Ventrikulo-akveduktalna perfuzija.** Ventrikulo-akveduktalna perfuzija vrši se tako da se po dvije kanile postave u lateralne moždane komore, jedna kao ulazna kanila na koju se priključi perfuzijska pumpa, a druga kao kanila pomoću koje se mjeri intrakranijski tlak tijekom čitavog pokusa. Treća kanila uvodi se u Sylvijev akvedukt kao izlazna kanila za skupljanje uzoraka perfuzata u epruvetu čiji položaj određuje tlak (likvorski) pri kojem se sakuplja likvor, s time da interaurikularna razina označava nulti tlak likvora (Slika 5).



*Slika 5. Shema ventrikulo-akveduktalne perfuzije.*

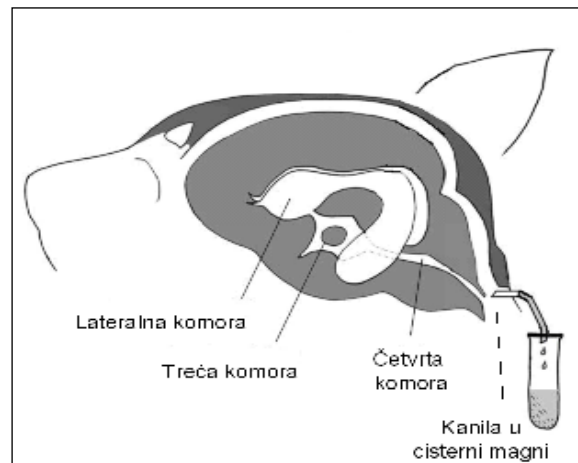
**Ventrikulo-cisternalna perfuzija.** Ventrikulo-cisternalna perfuzija vrši se tako da se na isti način kao i kod ventrikulo-akveduktalne perfuzije po dvije kanile uvedu u lateralne komore, jedna kao ulazna kanila za perfuziju, druga kao kanila za mjerenje intrakranijskog tlaka. Treća kanila uvodi se u cisternu magnu kao izlazna kanila za skupljanje uzoraka likvora (Slika 6).



*Slika 6. Shema ventrikulo-cisternalne perfuzije.*

Obje vrste perfuzije učinjene su pomoću perfuzijske pumpe (N°6135; Palmer, London, Engleska). Brzine perfuzija i vrsta perfuzijskih otopina korištene su ovisno o vrsti pokusa (vidi Rezultate).

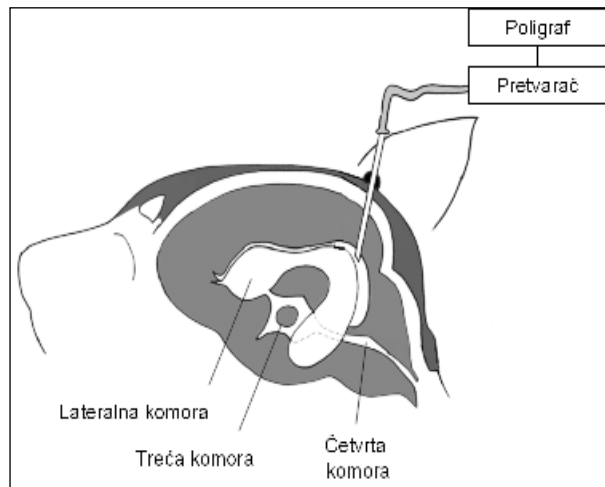
**Spontano istjecanje likvora.** Spontano istjecanje likvora se vrši na način da se izlazni kraj plastične kanile koja je uvedena u cisternu magnu spusti na -10 cm H<sub>2</sub>O i spontano se u epruvetu sakuplja likvor (Slika 7). Nakon određenog vremena, istjecanje likvora se stabilizira. Model spontanog istjecanja uveden je kako bi se dobili uzorci likvora u kojima bi se mogli određivati njegovi nativni sastojci. Naime, očekujemo da bi u slučaju da dođe do promjene volumena likvora to moglo rezultirati promjenom fiziološke koncentracije tvari prisutnih u likvoru. Stoga ćemo istražiti mogu li 5-hidroksiindoloctena kiselina (5-HIAA; glavni metabolit neurotransmitera serotonina) i homovanilna kiselina (HVA; glavni metabolit neurotransmitera dopamina) poslužiti kao biološki pokazatelji promjene volumena likvora.



*Slika 7. Shema spontanog istjecanja cerebrospinalnog likvora.*

Volumene sakupljenog perfuzata ili likvora koji je spontano istjecao određivali smo na način da smo izvagali neto težinu sakupljene tekućine u miligramima (Mettler, Toledo 20, Švicarska), te je preračunavali u  $\mu\text{L}$ . Nakon toga smo dobiveni volumen dijelili s vremenom sakupljanja uzorka i vrijednosti izražavali u  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

**Mjerenje tlaka likvora.** Tlak likvora smo mjerili u lateralnoj moždanoj komori na mačkama gdje je kanila uvedena samo u lijevu lateralnu komoru. Svrha takvog mjerenja je bila očekivanje da će promjena osmolarnosti plazme dovesti do promjene volumena likvora što bi moglo rezultirati promjenom likvorskog tlaka. Aparatura za mjerenje tlaka likvora sastoji se od pretvarača tlaka (Statham P23 ID, Gold Electronics, SAD) i poligrafa (Grass 7D) (Slika 8). Pretvarač tlaka pretvara promjene tlaka u električne signale. Nastali signali se predpojačalom i pojačalom u poligrafu pojačavaju do željene jačine. Promjena električnog signala dovodi do odgovarajućeg otklona pisaljke na poligrafu te se tako na vrpci milimetarskog papira zapisuje tlak likvora. Interaurikularna linija stereotaksijskog aparata je referentna (nulta) točka prema kojoj određujemo promjene tlaka likvora. Pretvarač tlaka i poligraf baždaramo tako da nam tlak pokazuje nulu kad je vrh kanile postavljen na interaurikularnoj liniji stereotaksijskog aparata.



*Slika 8. Shema mjerenja tlaka cerebrospinalnog likvora.*

Tjelesnu temperaturu životinja tijekom pokusa smo kontrolirali uvođenjem termometra u rektum, a u fiziološkim granicama smo temperaturu održavali pomoću električnog termofora stavljenog na leđa mačke. Na kraju pokusa smo u likvorski prostor kroz kanilu u lateralnoj komori injicirali tripan plavilo otopljeno u umjetnom likvoru. Nakon izvršene

obdukcije mozga tako smo dobili točan uvid u položaj kanile. Životinje smo žrtvovali prekomjernom dozom anestetika Nesdonala danog i.v.

### 3.4. PRIPREMA KEMIKALIJA I OTOPINA

**Umjetni likvor.** Umjetni likvor je rađen prema receptu Merlisa. U jednoj litri prokuhane destilirane vode otopi se: 8,1 g NaCl; 0,25 g KCl; 0,14 g CaCl; 0,11 g MgCl<sub>2</sub>; 1,76 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,07 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,13 g urea; 0,61 g glukoze. pH otopine se podesi na 7,3-7,4 dodavanjem 0,1 M otopine HCl ili NaOH [92]. Čuvanjem u hladnjaku otopina se može koristiti dva tjedna.

**Hiperosmolarni i hipoosmolarni pripravci.** Kao hiperosmolarnu otopinu smo koristili 20% manitol i hiperosmolarnu otopinu saharoze. Dvadeset postotni manitol smo primjenjivali kao infuzijsku otopinu (Pliva d.d.) u kojoj jedna litra otopine sadrži 1098 mmol manitola. Manitol je apliciran intravenski u bolusu tijekom tri minute u dozi od 1,00 g/kg. Hiperosmolarna otopina saharoze (400 mosmol/L) pripremljena je otapanjem 21,43 g saharoze (Saharoza, Kemika, RH) u jednoj litri umjetnog likvora. Za svaki pokus pripremala se nova otopina. Kao hipoosmolarnu otopinu smo koristili destiliranu vodu. Destiliranu vodu smo aplicirali intraperitonealno u dozi 100 mL/kg mačke. Prije davanja smo sve otopine zagrijali na 37°C.

**Standardne otopine za mjerenje uzoraka pomoću metode tekućinske kromatografije visoke razlučivosti s elektrokemijskim detektorom.** Za određivanje koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline (5-HIAA; glavni metabolit neurotransmitera serotonina) u uzorku likvora koristili smo kao standardni pripravak 4 μM otopinu 5-HIAA (Fluka, pure). Otopina je pripremljena tako da se prvo odvaže 3,82 mg 5-HIAA (molekularna težina 191,12) i otopi u 10 mL kvarcne vode. Tako dobivena otopina (2 mM) se stavi u alikvotima od 0,5 mL u duboko smrzavanje (-20° C), a neposredno prije korištenja se izvadi i otopi. Nakon toga se 20 μL 2 mM otopine pomiješa s 10 mL kvarcne vode i tako dobije standardna otopina željene koncentracije (4 μM).

Za određivanje koncentracije homovanilne kiseline (HVA; glavni metabolit neurotransmitera dopamina) u uzorku likvora, koristili smo kao standardni pripravak 4 μM otopinu HVA (Koch-Light, pure). Otopina je pripremljena tako da se prvo odvaže

3,64 mg HVA (molekularna težina 182,18) i otopi u 10 mL kvarcne vode. Daljnji postupak i držanje otopine identičan je postupku opisanom za 5-HIAA.

Pufer (mobilna faza) koji protiče kroz HPLC je fosfatno-citratni s 3% CH<sub>3</sub>OH u kojem je pH podešen (s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) na 3,6. Pufer se sastoji od 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05 M limunske kiseline; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 1 mM KCl. Brzina protoka pufera je bila 0,8 mL/min.

### **3.5. MJERENJE OSMOLARNOSTI I KONCENTRACIJE METABOLITA NEUROTRANSMITERA U UZORCIMA LIKVORA**

**Mjerenje osmolarnosti.** Osmolarnost otopina i uzoraka likvora mjerili smo pomoću osmometra (Knauer, Semi-Micro Osmometer) koji radi na principu određivanja točke ledišta različitih otopina u usporedbi s ledištem destilirane vode.

**Mjerenje koncentracije metabolita neurotransmitera.** Metabolite neurotransmitera serotonina (5-hidroksiindoloctena kiselina; 5-HIAA) i dopamina (homovanilna kiselina; HVA) u likvoru mačke mjerili smo pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti (HPLC) s elektrokemijskim detektorom (ED). HPLC sistem se sastoji od pumpe (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, SAD), injektora uzoraka (Rheodyne 7125, SAD), kolone (Agilent, Eclipse XDB-C18, 4,6x150 mm, 5 μm), zaštitne kolone (4x4 mm, Agilent Technologies, SAD) s elektrokemijskim detektorom (HP-ED 1094AA, Hewlett-Packard, SAD) s ugljikovom elektrodom podešenom na -0,55 V u odnosu na referentnu elektrodu. Svi kromatogrami su bilježeni pomoću HPCore ChemStation Software. Koncentracije 5-HIAA i HVA su određivane temeljem površine ispod „peaka“ uspoređene s površinama standardnih uzoraka.

### **3.6. STATISTIČKA OBRADA**

Dobivene vrijednosti svih eksperimenata biti će prikazane kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška srednje vrijednosti. Statistički značajna razlika u vrijednostima determinirati će se pomoću Student t-testa, a p<0,05 smatrat će se statistički značajnom razlikom.



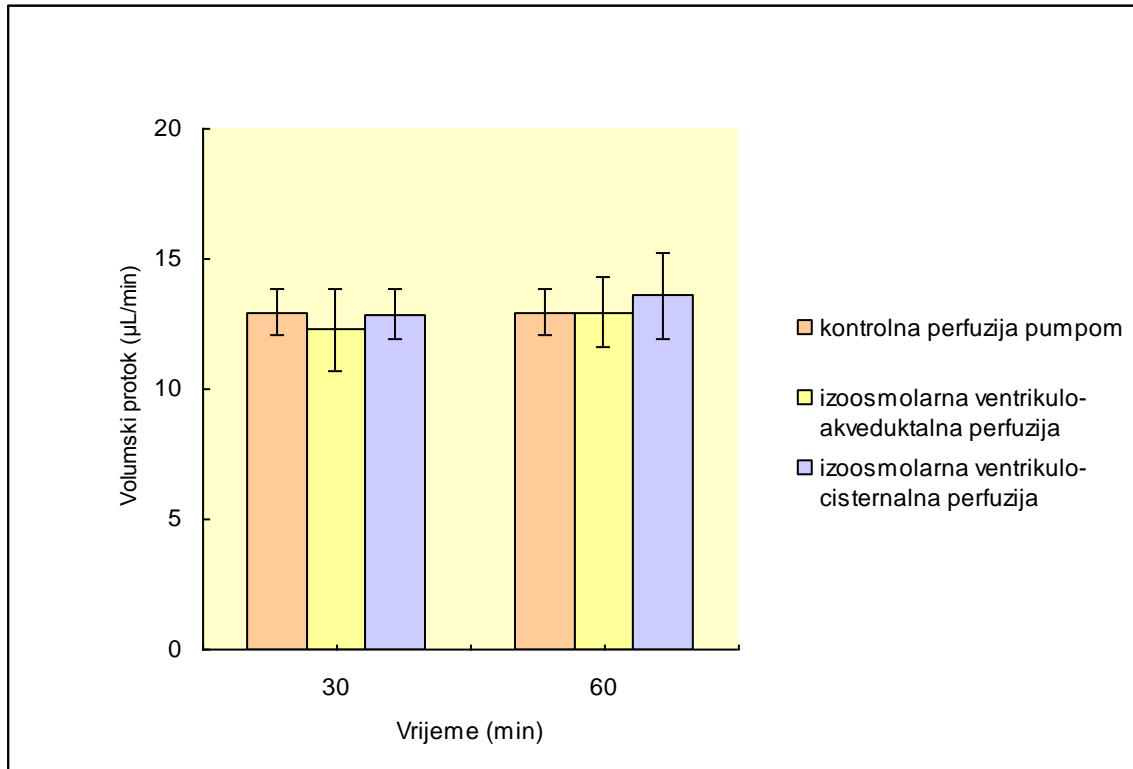
## 4. REZULTATI

### 4.1. OVISNOST VOLUMENA CEREBROSPINALNOG LIKVORA O POVEĆANJU OSMOLARNOSTI LIKVORA KAO I O POVEĆANJU POVRŠINE LIKVORSKOG SUSTAVA IZLOŽENOG TOM DJELOVANJU

Temeljem naših preliminarnih pokusa očekivali smo da će ukupni volumen cerebrospinalnog likvora (vidi Hipoteza i ciljevi istraživanja), osim o povećanju osmolarnosti likvora, ovisiti i o površini likvorskog sustava koja je toj hiperosmolarnosti izložena. U tu svrhu su uspoređivani volumeni sakupljenog perfuzata pod istim osmotskim opterećenjem za vrijeme ventrikulo-akveduktalne (manja površina likvorskog sustava) i ventrikulo-cisternalne (veća površina) perfuzije. Na Slici 9 prikazane su kontrolne vrijednosti na mački pri normalnom likvorskom tlaku za vrijeme ventrikulo-akveduktalne perfuzije i ventrikulo-cisternalne perfuzije s izosmolarnom otopinom umjetnog likvora, brzinom perfuzije od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Određivan je izlazni protok perfuzata izražen u  $\mu\text{L}/\text{min}$  (izlazni volumen) tijekom 60 minuta perfuzije i uspoređivan s ulaznim protokom odnosno s brzinom perfuzije (ulazni volumen) koja je bila 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Na apscisi je prikazano vrijeme u minutama, a na ordinati volumski protok u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Okomiti stupići predstavljaju volumski protok u promatranom vremenu. Vidi se da nije bilo razlike u izlaznom volumenu između ventrikulo-akveduktalne perfuzije i ventrikulo-cisternalne perfuzije tijekom 30 i 60 minuta perfuzije, odnosno ulazni volumen umjetnog likvora odgovarao je izlaznom volumenu kod obje vrste perfuzije (Slika 9).

To znači da kod perfuzije s izosmolarnom otopinom umjetnog likvora pri normalnom likvorskom tlaku, neovisno o veličini i dijelu likvorskog prostora koji je perfundiran (ventrikulo-akveduktalna perfuzija, samo moždane komore = manji dio likvorskog prostora, malena kontaktna površina ili kod ventrikulo-cisternalne perfuzije, moždane komore i subarahnoidni prostor zajedno = veći dio likvorskog prostora, velika kontaktna površina) nije bilo promjene volumena likvora u perfundiranom dijelu likvorskog prostora, odnosno da nije bilo dodatnog „čistog“ stvaranja niti apsorpcije likvora, što smo i očekivali obzirom da nije bilo promjene osmolarnosti likvora odnosno

osmotskih sila. Drugim riječima, isti volumen umjetnog likvora koji je bio infundiran u moždanu komoru je sakupljen kroz izlaznu kanilu.



*Slika 9. Kontrolni protok umjetnog likvora izazvan pumpom (n=5; brzinom 12,96 µL/min) tijekom 30 i 60 minuta i izlazni protok dobiven kod mačaka ventrikulo-akveduktalnom (n=6) i ventrikulo-cisternalnom perfuzijom (n=6) s umjetnim likvorom tijekom istog vremena i iste brzine perfuzije. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između kontrolnog protoka dobivenog pomoću pumpe i izlaznog volumena perfuzata nije statistički značajna.*

Na Tablici 3 je prikazana ventrikulo-akveduktalna perfuzija na 6 mačaka pri normalnom likvorskom tlaku s izoosmolarnim umjetnim likvorom i hiperosmolarnom otopinom saharoze u umjetnom likvoru, brzinom perfuzije od 12,96 µL/min pod istim uvjetima kao i kod kontrolnih eksperimenata (Slika 9). Također su određivani izlazni volumeni likvora u jedinici vremena tijekom 60 minuta perfuzije i uspoređivani s

izlaznim volumenima likvora u jedinici vremena kod eksperimenata s perfuzijom s izoosmolarnom otopinom. U oba vremenska perioda opaženo je statistički značajno povećanje izlaznog volumena kod hiperosmolarne perfuzije.

*Tablica 3. Izlazni protok perfuzata ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) kod mačke ( $n=6$ ) za vrijeme ventrikulo-akveduktalne perfuzije ( $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$ ) s izoosmolarnim likvorom i hiperosmolarnom otopinom saharoze ( $400 \text{ mosmol}/\text{L}$ ).*

Ventrikulo-akveduktalna perfuzija od $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$		
Vrijeme (min)	Volumski protok ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	
	izoosmolarna	hiperosmolarna
0-30	$12,30 \pm 1,57$	$19,58 \pm 2,73^*$
30-60	$12,95 \pm 1,33$	$22,10 \pm 2,31^*$

*Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Razlika između izlaznog volumena tijekom izoosmolarne i hiperosmolarne perfuzije je statistički značajna ( $*p < 0,05$ ).*

Na Tablici 4 je prikazana ventrikulo-cisternalna perfuzija na 6 mačaka pri normalnom likvorskom tlaku s izoosmolarnim umjetnim likvorom i hiperosmolarnom otopinom saharoze u umjetnom likvoru, brzinom perfuzije od  $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$  pod istim uvjetima kao i kod kontrolnih eksperimenata (Slika 9). Također su određivani izlazni volumeni perfuzata tijekom 60 minuta perfuzije i uspoređivani s izlaznim volumenima perfuzata kod eksperimenata s perfuzijom s izoosmolarnom otopinom u istom vremenskom intervalu. U oba vremenska perioda opaženo je statistički značajno povećanje izlaznog volumena kod hiperosmolarne perfuzije.

*Tablica 4. Izlazni protok perfuzata ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) kod mačke ( $n=6$ ) za vrijeme ventrikulo-cisternalne perfuzije ( $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$ ) s izoosmolarnim likvorom i hiperosmolarnom otopinom saharoze ( $400 \text{ mosmol}/\text{L}$ ).*

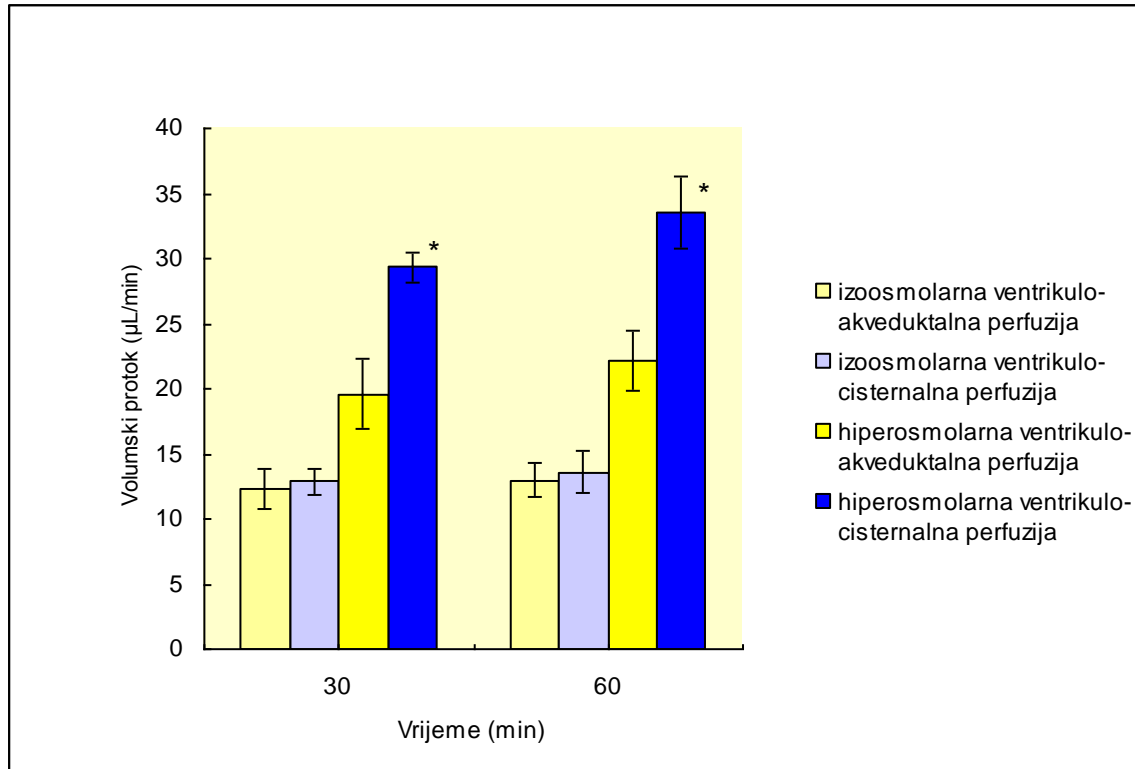
Ventrikulo-cisternalna perfuzija od $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$		
Vrijeme (min)	Volumski protok ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	
	izoosmolarna	hiperosmolarna
0-30	$12,86 \pm 0,96$	$29,36 \pm 1,17^*$
30-60	$13,58 \pm 1,64$	$33,50 \pm 2,78^*$

*Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Razlika između izlaznog volumena tijekom izoosmolarne i hiperosmolarne perfuzije je statistički značajna ( $*p < 0,05$ ).*

Dobiveni rezultati jasno ukazuju da je i nakon 30 minuta i nakon 60 minuta perfuzije s hiperosmolarnom otopinom umjetnog likvora došlo do značajnog povećanja izlaznog volumena i kod ventrikulo-akveduktalne i kod ventrikulo-cisternalne perfuzije u odnosu na volumen izlaznog perfuzata kod izoosmolarne perfuzije (Tablice 3 i 4). To znači da je eksperimentalno izazvano povećanje osmolarnosti likvora pri normalnom likvorskom tlaku dovelo do povećanja volumena likvora, odnosno da nastale osmotske sile značajno utječu na kontrolu volumena cerebrospinalnog likvora u svim dijelovima likvorskog prostora i to kako u moždanim komorama (ventrikulo-akveduktalna perfuzija; Tablica 3) tako i u moždanim komorama i subarahnoidnom prostoru zajedno (ventrikulo-cisternalna perfuzija; Tablica 4).

Na Slici 10 je prikazan izlazni protok perfuzata kod ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije na 6 mačaka pri normalnom likvorskom tlaku s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora i hiperosmolarnom otopinom saharoze u umjetnom likvoru, brzinom perfuzije od  $12,96 \mu\text{L}/\text{min}$ . Uspoređivani su izlazni volumeni perfuzata u jedinici vremena tijekom 60 minuta perfuzije između te dvije vrste perfuzije.

Na apscisi je prikazano vrijeme u minutama, a na ordinati protok perfuzata u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Okomiti stupići predstavljaju volumen izlaznog perfuzata u promatranom vremenu.



*Slika 10. Izlazni protok perfuzata dobiven kod mačaka tijekom 30 i 60 minuta ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora ( $n=6$ ), te hiperosmolarnom otopinom saharoze ( $n=6$ ; 400 mosmol/L). Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Razlika između izlaznog volumena tijekom izoosmolarne i hiperosmolarne perfuzije je statistički značajna i kod ventrikulo-akveduktalne i kod ventrikulo-cisternalne perfuzije kao i između hiperosmolarne ventrikulo-akveduktalne i hiperosmolarne ventrikulo-cisternalne perfuzije (\* $p<0,05$ ).*

Uočava se značajno povećanje izlaznog volumena perfuzata kod obje vrste perfuzije u odnosu na kontrolnu perfuziju (Slika 10). Nadalje, to povećanje izlaznog volumena kod perfuzija s hiperosmolarnom otopinom značajno je veće kod ventrikulo-

cisternalne perfuzije gdje je perfundiran veći dio likvorskog prostora (velika kontaktna površina) nego kod ventrikulo-akveduktalne perfuzije gdje je perfundiran manji dio likvorskog prostora (malena kontaktna površina), iako su obje vrste perfuzije vršene istom brzinom, kod istog likvorskog tlaka i s istom osmolarnosti perfuzata (Slika 10).

To jasno ukazuje da jednako povećanje osmolarnosti likvora pri normalnom likvorskom tlaku u kontaktu s većom površinom dovodi do većeg navlačenja volumena tekućine jer su osmotske sile nastale uslijed promjene osmolarnosti likvora djelovale na većem području likvorskog prostora. Takav učinak tih sila na kontrolu ukupnog volumena likvora postoji u svim dijelovima likvorskog prostora, kako u moždanim komorama tako i u subarahnoidnom prostoru. Drugim riječima, što je veća površina likvorskog sustava koja je izložena djelovanju hiperosmolarnosti to je i veći volumen sakupljenog perfuzata.

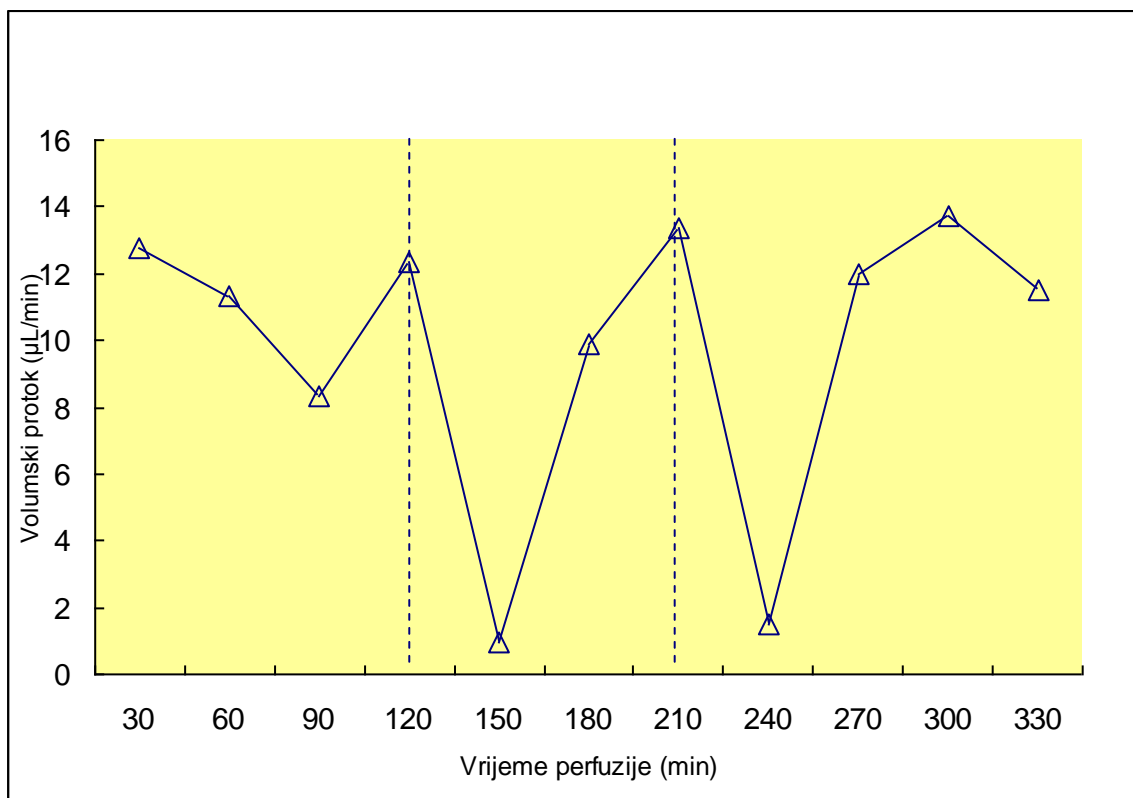
Gornje rezultate nije moguće uklopiti u općeprihvaćenu hipotezu o fiziologiji likvora, prema kojoj likvor aktivno nastaje samo unutar moždanih komora (sekrecija). Naime, ukoliko bi likvor nastajao na takav način (samo unutar komora – rezultati dobiveni ventrikulo-akveduktalnom perfuzijom), u tom slučaju ne bi bilo nikakvog razloga da dođe do dodatnog povećanja volumena perfuzata kad se istraživanje („stvaranja“) kod povišene osmolarnosti likvora proširi i na područje izvan komora (subarahnoidni prostor – ventrikulo-cisternalna perfuzija; Slika 10).

#### **4.2. VOLUMEN CEREBROSPINALNOG LIKVORA NAKON POVEĆANJA OSMOLARNOSTI KRVI**

Budući da se intravenska aplikacija hiperosmolarnih otopina (20% manitol) uobičajeno koristi u terapiji snižavanja povišenog intrakranijskog tlaka, željeli smo ispitati je li sniženje intrakranijskog/likvorskog tlaka vezano uz smanjenje volumena cerebrospinalnog likvora. Učinak povećane osmolarnosti krvi na volumen cerebrospinalnog likvora pratili smo pomoću metode ventrikulo-cisternalne perfuzije određujući volumene perfuzata prije i nakon intravenskog davanja hiperosmolarne tekućine. Naime, temeljem naših istraživanja očekivali smo da će ukupni volumen likvora

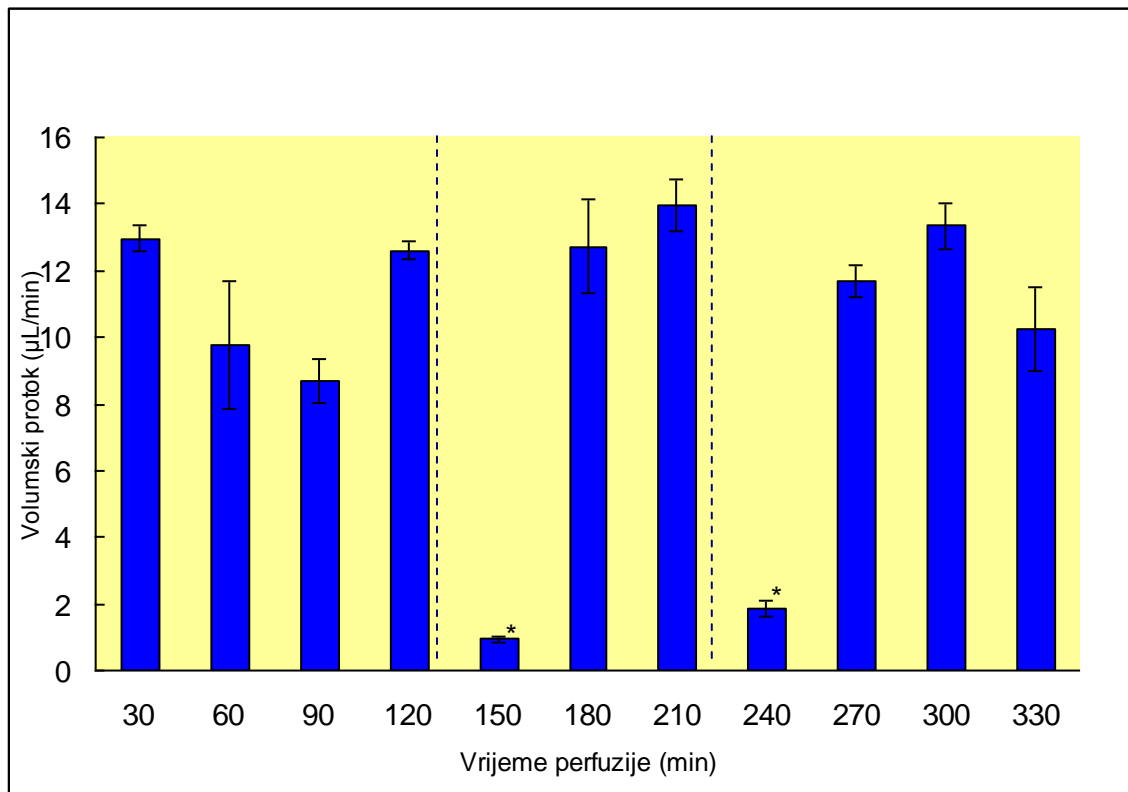
ovisiti o promjeni osmolarnosti krvi kao što je ovisio i o promjeni osmolarnosti likvora (Tablica 3 i 4; Slika 10).

Na Slici 11 prikazan je na anesteziranoj mački izlazni volumen perfuzata kod ventrikulo-cisternalne perfuzije prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg, kod brzine perfuzije od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  u jednom tipičnom pokusu. Na apscisi je prikazano vrijeme perfuzije u minutama, a na ordinati brzina izlaznog perfuzata u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Vidi se da nakon davanja 20% manitola dolazi do naglog pada volumena izlaznog perfuzata.



*Slika 11. Protok perfuzata dobiven kod mačke tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg. Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja manitola. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*

Slika 12 prikazuje srednje vrijednosti izlaznog volumena na tri mačke kod ventrikulo-cisternalne perfuzije prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola, kod brzine perfuzije od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Na apscisi je prikazano vrijeme perfuzije u minutama, a na ordinati protok izlaznog perfuzata u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Vidi se da nakon davanja 20% manitola dolazi do naglog pada volumena izlaznog perfuzata. Manitol je dan (kao na Slici 12) u dva navrata u razmaku od sat i pol i nakon svakog davanja manitola došlo je do značajnog pada izlaznog volumena perfuzata, čije su vrijednosti bile najniže nakon pola sata, a nakon sat vremena su postigle vrijednosti izlaznog volumena prije davanja manitola (kontrolne vrijednosti).

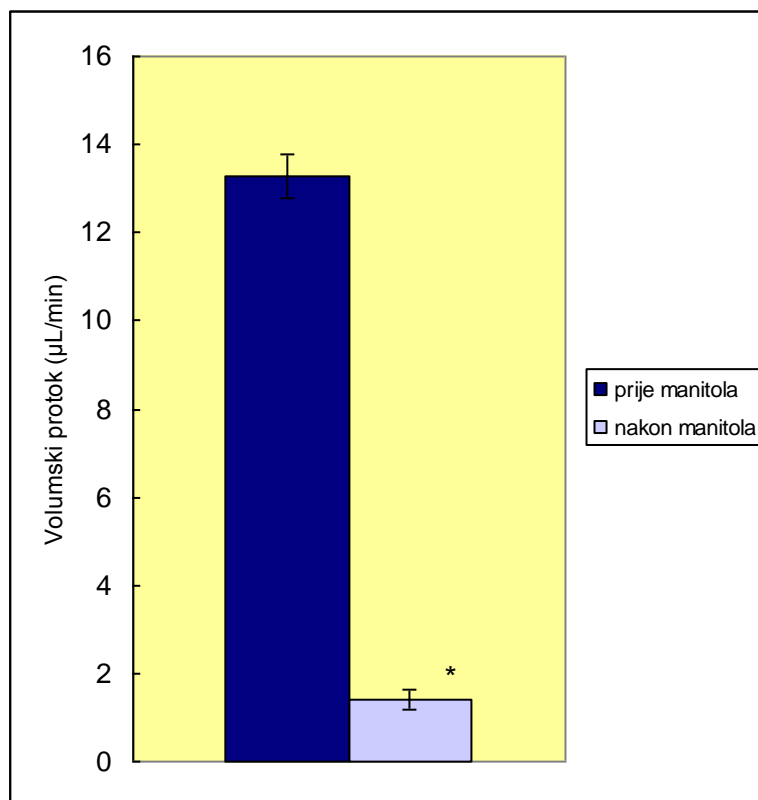


*Slika 12. Protok perfuzata dobiven kod mačaka ( $n=3$ ) tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg. Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja manitola. Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM.*



Razlika između brzina izlaznog volumena prije i nakon davanja manitola je statistički značajna (\* $p < 0,005$ ).

Na Slici 13 su prikazane samo srednje vrijednosti izlaznog volumena neposredno prije davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg i za vrijeme najnižih vrijednosti izlaznih volumena nakon davanja 20% manitola. Na ordinati je prikazan protok izlaznog perfuzata u  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost izlaznog protoka. Vidimo da je učinak 20% manitola vrlo jak i da protok s 13,28  $\mu\text{L}/\text{min}$  padne na 1,41  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Drugim riječima „navlačenje“ tekućine iz likvorskog prostora u hiperosmolarnu krv, iskazano u izlaznom volumenu od 11,87  $\mu\text{L}/\text{min}$  (13,28  $\mu\text{L}/\text{min}$  – 1,41  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gotovo zaustavi perfuzijski protok.



*Slika 13. Izlazni volumen dobiven kod mačaka ( $n=3$ ) tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$  s izosmolarnom otopinom umjetnog likvora u*

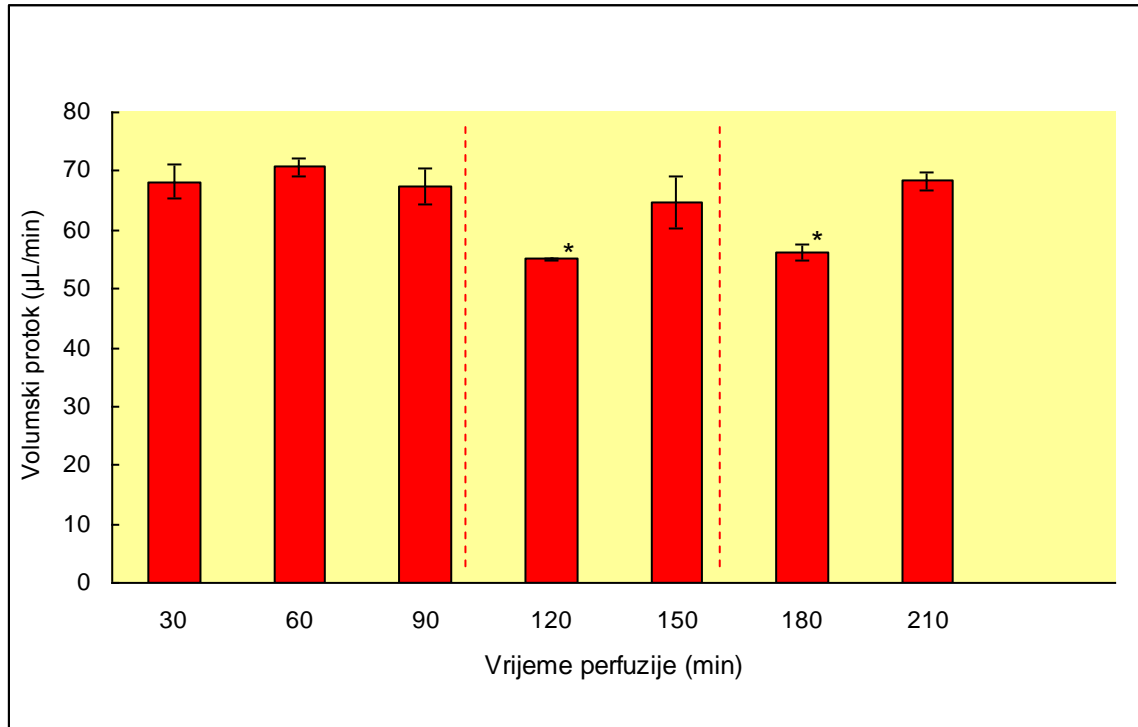
*intervalu neposredno prije intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg (90-120 min i 180-210 min) i izlazni volumen u intervalu 30 minuta nakon intravenskog davanja 20% manitola (120-150 min i 210-240 min). Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Razlika između brzina izlaznog volumena neposredno prije i neposredno nakon davanja manitola je statistički značajna (\* $p < 0,0001$ ).*

Budući da je 20% manitol apliciran intravenski praktički pod opisanim eksperimentalnim uvjetima gotovo zaustavio protok perfuzije, željeli smo ispitati hoće li i u slučaju većeg perfuzijskog protoka (veći volumen tekućine u likvorskom sustavu) i učinak 20% manitola biti veći. U tu svrhu su na mačkama vršeni eksperimenti pod istim uvjetima kao i u upravo gore opisanim uvjetima (Slike 11, 12 i 13) osim što smo perfuziju vršili brzinom od 65,00  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Na Slici 14 prikazan je na anesteziranoj mački izlazni volumen perfuzata kod ventrikulo-cisternalne perfuzije prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg kod brzine perfuzije od 65,00  $\mu\text{L}/\text{min}$  u jednom tipičnom pokusu. Na apscisi je prikazano vrijeme perfuzije u minutama, a na ordinati protok izlaznog perfuzata u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Vidi se da nakon davanja 20% manitola dolazi do naglog pada volumena izlaznog perfuzata.



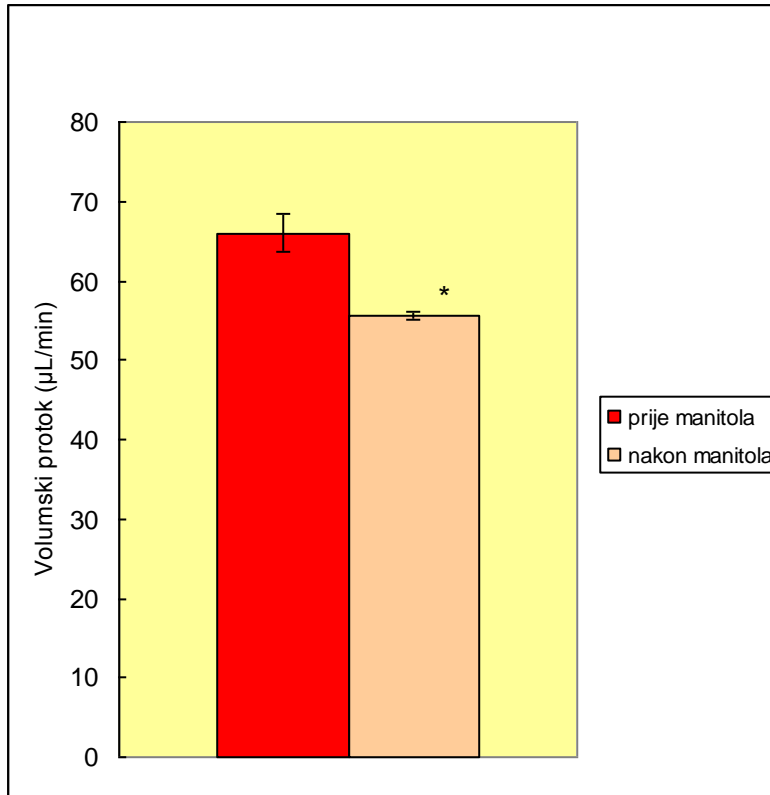
*Slika 14. Protok perfuzata dobiven kod mačke tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 65,00 µL/min s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg . Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja manitola. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*

Slika 15 prikazuje srednje vrijednosti izlaznog volumena na tri mačke kod ventrikulo-cisternalne perfuzije prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg, kod brzine perfuzije od 65,00 µL/min. Na apscisi je prikazano vrijeme perfuzije u minutama, a na ordinati protok izlaznog perfuzata u µL/min. Uzorci perfuzata su skupljani u vremenu od 30 min. Vidi se da nakon davanja 20% manitola dolazi do pada volumena izlaznog perfuzata. Manitol je dan (kao na Slici 15) u dva navrata u razmaku od jednog sata i nakon svakog davanja manitola došlo je do značajnog pada izlaznog volumena perfuzata, čije su vrijednosti bile najniže nakon pola sata, a nakon sat vremena su postigle vrijednosti izlaznog volumena prije davanja manitola (kontrolne vrijednosti).



*Slika 15. Protok perfuzata dobiven kod mačaka (n=3) tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 65,00 µL/min s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora prije i nakon intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg. Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja manitola. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između brzina izlaznog volumena prije i nakon davanja manitola je statistički značajna (\*p<0,005).*

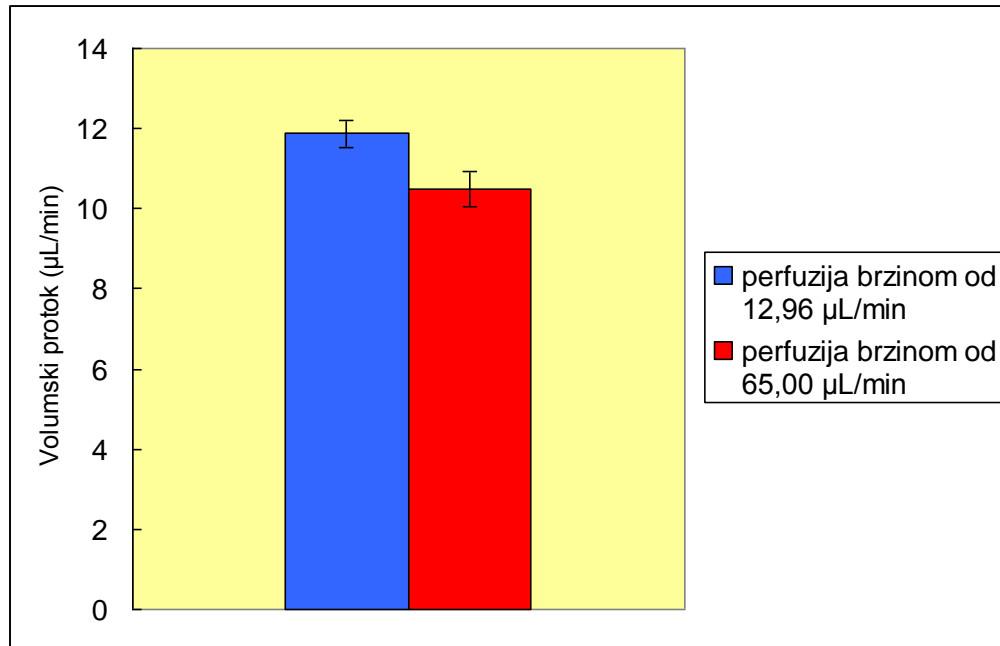
Na Slici 16 su prikazane samo srednje vrijednosti izlaznog volumena kod perfuzije od 65,00 µL/min neposredno prije i za vrijeme najnižih vrijednosti nakon davanja 20% manitola. Na ordinati je prikazan protok izlaznog perfuzata u µL/ min, dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost izlaznog protoka. Vidimo da je učinak 20% manitola vrlo sličan kao i kod perfuzije od 12,96 µL/min, te da protok s 66,03 µL/min padne na 55,53 µL/min, što znači da je 10,50 µL/min likvora iz likvorskog sustava otišlo u krvnu cirkulaciju.



*Slika 16. Izlazni volumen dobiven kod mačaka (n=3) tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 65,00 µL/min s izoosmolaranom otopinom umjetnog likvora u intervalu neposredno prije intravenskog davanja 20% manitola u dozi od 1,00 g/kg (75-90 min i 135-150 min) i izlazni volumen u intervalu 15 minuta nakon intravenskog davanja 20% manitola (90-105 min i 150-165 min). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između brzina izlaznog volumena prije i nakon davanja manitola je statistički značajna (\* $p < 0,005$ ).*

Na Slici 17 je usporedno prikazan rezultat izlaznog volumena perfuzata kod perfuzije od 12,96 µL/min i 65,00 µL/min 30 min nakon i.v. davanja 20% manitola (pad protoka) koji se dobije kada se od ulaznog volumena odbije izlazni volumen. Budući da nema statistički značajne razlike između tih vrijednosti možemo ustvrditi kao i kod prethodnih rezultata (Slika 16) da je učinak manitola identičan u oba slučaja. Drugim riječima, ukoliko je osmotska sila koja djeluje na „navlačenje“ tekućine ista (20%

manitol) volumen tekućine koji će biti „navučen“ biti će gotovo isti bez obzira da li je u tom trenutku više ili manje tekućine u likvorskom sustavu, pod uvjetom da je u tim eksperimentalnim uvjetima raspoložive tekućine u promatranim slučajevima u suvišku.



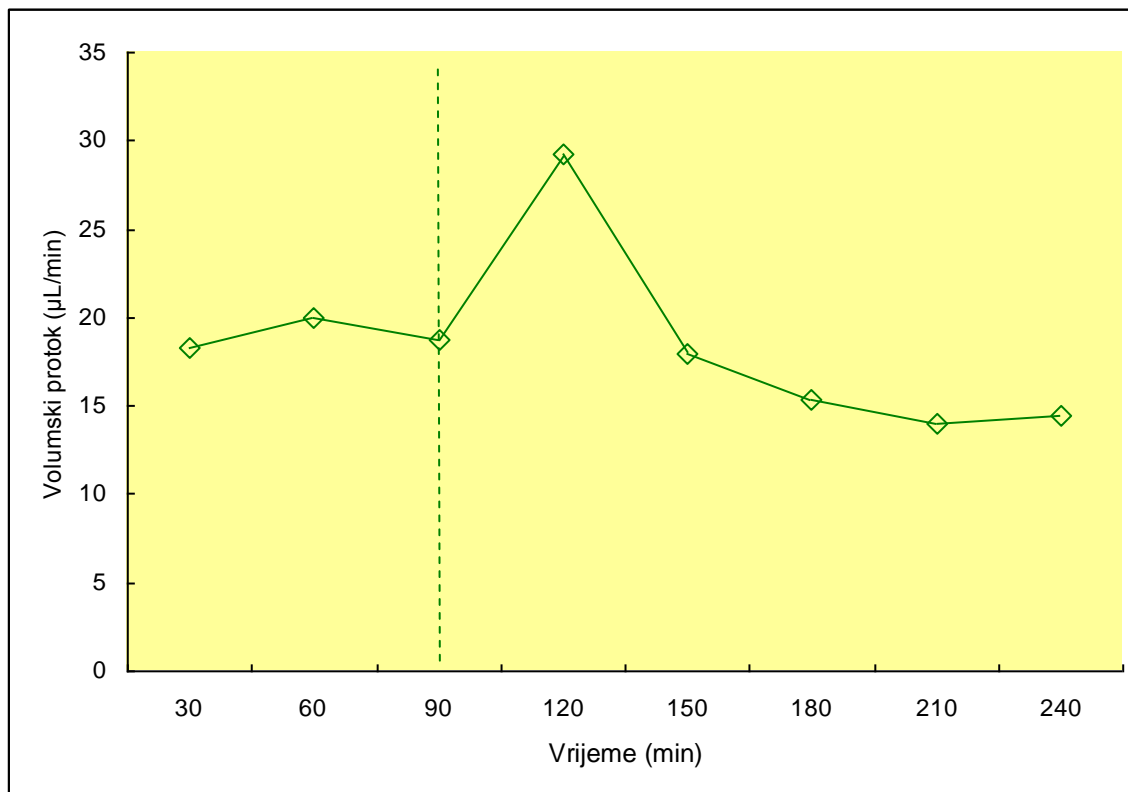
*Slika 17. Smanjivanje (pad) protoka perfuzata nakon intravenskog davanja 20% manitola dobiven kod mačaka tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 12,96 µL/min (n=3) i tijekom ventrikulo-cisternalne perfuzije brzinom od 65,00 µL/min (n=3) s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika tog smanjivanja (pada) protoka perfuzata između perfuzije brzinom od 12,96 µL/min i perfuzije brzinom od 65,00 µL/min nije statistički značajna.*

U prikazanim eksperimentima je očito da 20% manitol djeluje tako da „navlači likvor“ iz likvorskog prostora te da je terapijski učinak manitola na povišeni likvorski tlak vezan i uz smanjenje volumena likvora. Možemo zaključiti da je uočeno vrlo slično djelovanje 20% manitola danog intravenski na izlazni volumen likvora i kod perfuzije od 12,96 µL/min (Slika 11, 12, 13) kao i kod perfuzije od 65,00 µL/min (Slika 14, 15, 16), što znači da je protok od 12,96 µL/min dostatan protok da se sav kapacitet osmotske sile

izazvane manitolom iskoristi u „navlačenju likvora“ iz likvorskog prostora. Drugim riječima, tek kad bi protok bio značajno manji, ne bi se vidio ukupan učinak osmotske sile. Zbog toga, iako smo mi značajno povećali protok kod perfuzije od 65,00  $\mu\text{L}/\text{min}$ , i time povećali volumen tekućine izložene djelovanju osmotske sile, to nije bio razlog koji bi doveo do povećanja „pada“ izlaznog volumena.

#### **4.3. VOLUMEN CEREBROSPINALNOG LIKVORA NAKON SNIŽENJA OSMOLARNOSTI KRVI**

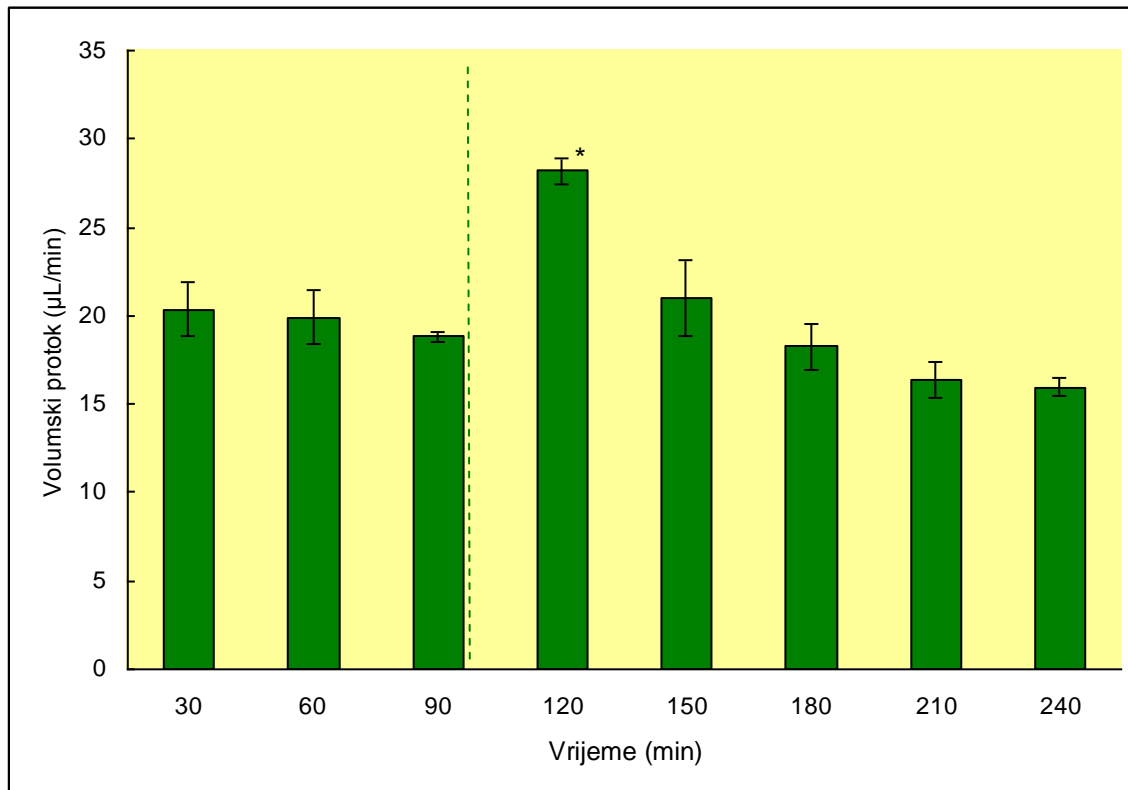
Budući da smo pokazali da volumen likvora ovisi o povećanoj osmolarnosti krvi, za očekivati je da će također na volumen likvora učinak imati i smanjenje osmolarnosti krvi. Na taj način bismo pokazali da bi eksperimentalno izazvana promjena osmolarnosti krvi u odnosu na fiziološku vrijednost (bilo smanjenje, bilo povećanje) mogla dovesti do promjene volumena likvora. Učinak snižene osmolarnosti krvi na volumen cerebrospinalnog likvora smo pratili pomoću metode spontanog istjecanja likvora iz cisterne magne pod negativnim tlakom (-10 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ; vidi Raspravu). Za razliku od perfuzijskih metoda, umjesto perfuzata kod ove metode se skuplja samo cerebrospinalni likvor. Nakon što bi se uspostavio ujednačeni spontani tok likvora pratili smo volumen isteklog likvora prije i nakon smanjenja osmolarnosti krvi izazvanog intraperitonealnim davanjem destilirane vode (100 mL/kg) i izračunavali protok iskazujući volumen likvora u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . U tako skupljenim uzorcima likvora smo također određivali i osmolarnost likvora. Na Slici 18 prikazan je na anesteziranoj mački izlazni volumen likvora prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode u jednom tipičnom pokusu. Na apscisi je prikazano vrijeme istjecanja likvora u minutama, a na ordinati volumen izlaznog likvora u  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Vidi se da nakon davanja destilirane vode dolazi do naglog porasta volumena izlaznog likvora koji se vrati na kontrolne vrijednosti (prije davanja destilirane vode) nakon sat vremena.



*Slika 18. Volumen izlaznog likvora dobiven kod mačke tijekom istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*

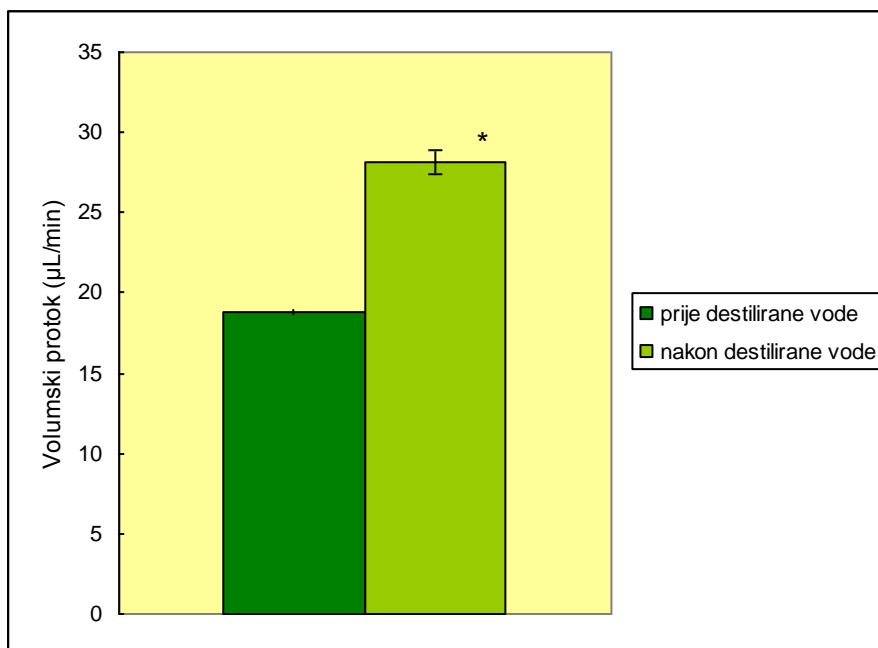
Na Slici 19 su prikazane srednje vrijednosti kod četiri mačke izlaznog volumena likvora pri spontanom istjecanju kod negativnog tlaka prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Na ordinati je prikazan izlazni protok likvora (µL/min), dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost izlaznog protoka. Vidimo da destilirana voda dovodi do statistički značajnog porasta izlaznog volumena likvora koji se vrati na početne (kontrolne vrijednosti) nakon jednog sata.





*Slika 19. Volumen izlaznog likvora dobiven kod mačaka (n=4) tijekom istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između brzina izlaznog volumena prije i nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\*p<0,001).*

Na Slici 20 su prikazane samo srednje vrijednosti izlaznog volumena likvora kod spontanog istjecanja likvora neposredno prije i za vrijeme najviših vrijednosti nakon davanja destilirane vode. Na ordinati je prikazan izlazni protok likvora (µL/min), dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost izlaznog protoka. Vidimo da je učinak destilirane vode dan intraperitonealno na volumen likvora vrlo značajan i da dovodi do povećanja ukupnog volumena likvora. Destilirana voda je dovela do smanjenja osmolarnosti krvi, te je tako stvorena razlika u osmolarnosti između likvora i krvi (vidi Raspravu). Smanjenje osmolarnosti krvi uzrokuje ulazak vode iz krvi prema likvoru i rezultira povećanjem volumena likvora.

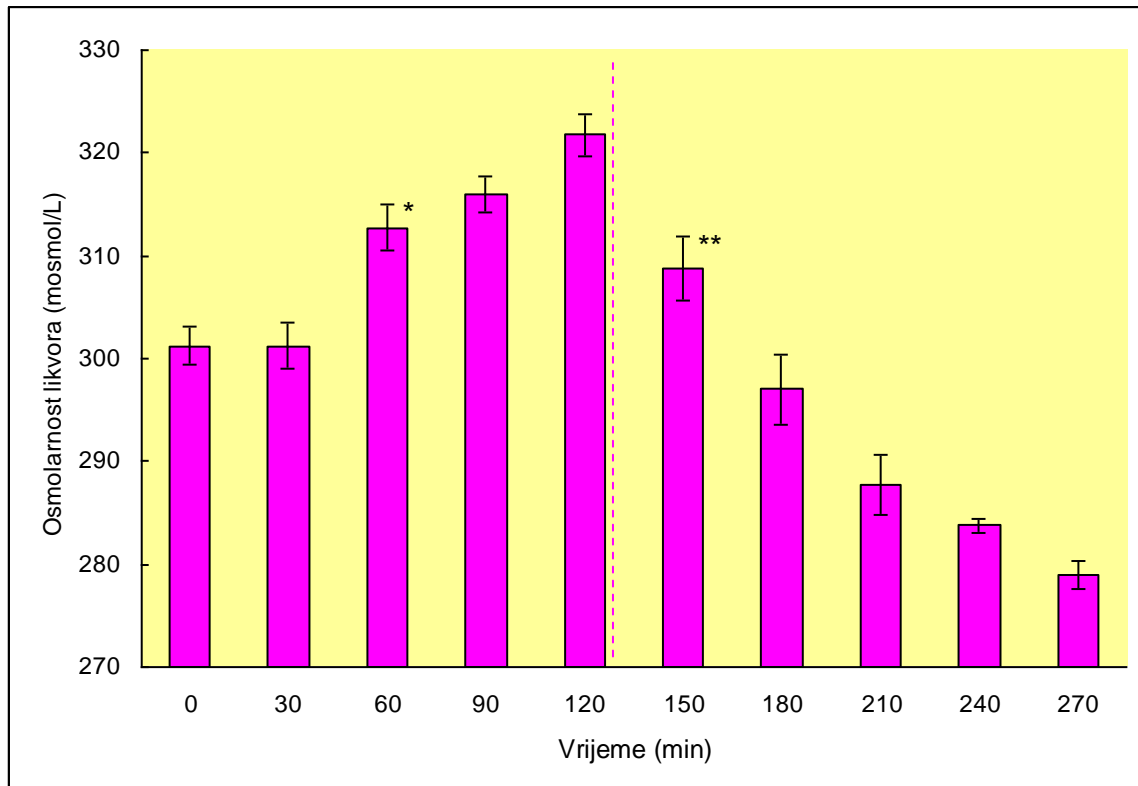


*Slika 20. Izlazni volumen dobiveni kod mačaka (n=4) tijekom istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) neposredno prije (90-120 min) i 30 minuta nakon (120-150 min) intraperitonealnog davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između brzina izlaznog volumena prije i nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\*p<0,0001).*

Dakle, trideset minuta nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode došlo je do značajnog povećanja izlaznog volumena likvora (Slike 18, 19, 20). To znači da je smanjivanje osmolarnosti plazme dovelo do povećanja volumena likvora, odnosno da nastale osmotske sile značajno utječu na kontrolu volumena cerebrospinalnog likvora.

Na Slici 21 prikazane su na četiri anestetizirane mačke dobivene vrijednosti osmolarnosti likvora prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode za vrijeme spontanog istjecanja likvora pod negativnim tlakom. Na apscisi je prikazano vrijeme istjecanja likvora u minutama, a na ordinati osmolarnost likvora u mosmol/L. Vidi se da se osmolarnost cerebrospinalnog likvora tijekom spontanog istjecanja likvora kod

negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) povećavala u odnosu na vrijednosti prije početka istjecanja (kontrola) i to povećanje je već nakon 60 minuta bilo statistički značajno. Nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode osmolarnost se stalno smanjivala u odnosu na zadnje vrijednosti prije davanja destilirane vode. To smanjenje je već nakon 60 minuta bilo statistički značajno i taj je pad osmolarnosti trajao kroz čitavo vrijeme trajanja pokusa (do 270 min; vidi Raspravu).



*Slika 21. Osmolarnost skupljenih uzoraka cerebrospinalnog likvora tijekom istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) kod mačaka (n=4) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između osmolarnosti prije početka istjecanja (0 minuta) i nakon 60 minuta statistički je značajna (\*p<0,05). Razlika između osmolarnosti prije i 60 minuta nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\*\*p<0,005).*

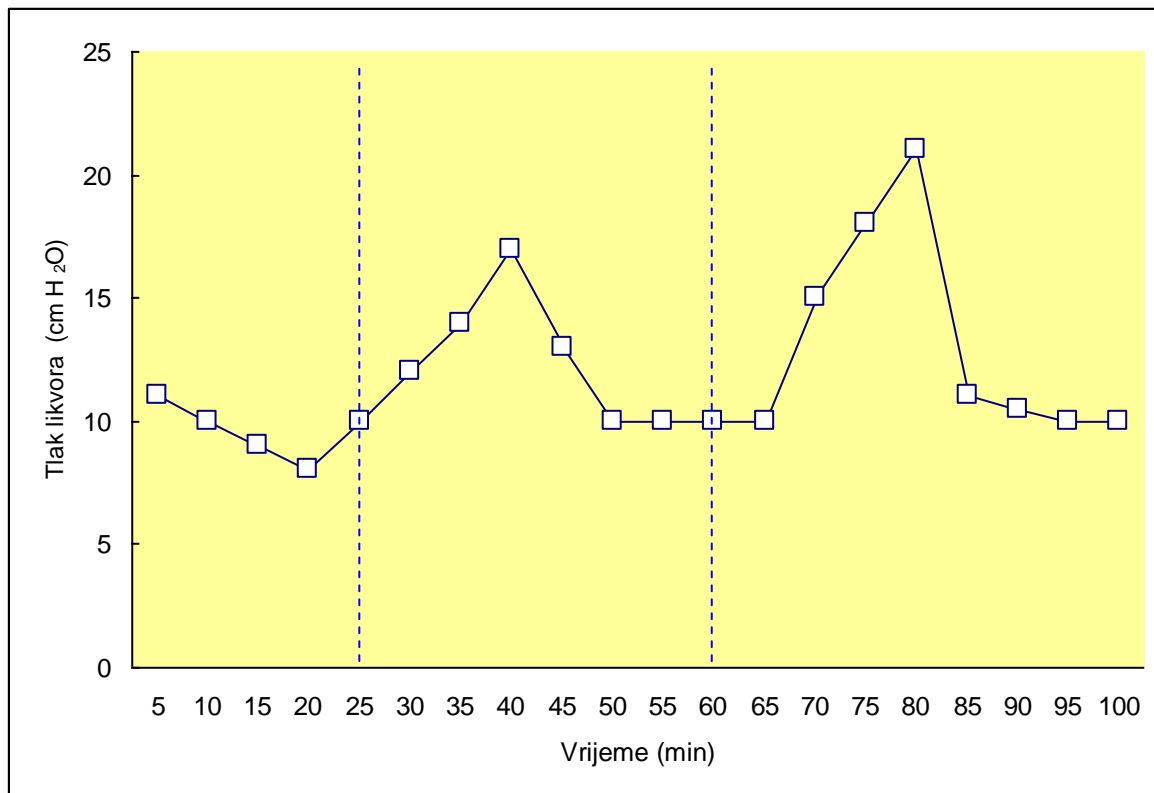
Jasno se vidi (Slika 21) da je došlo do značajnog pada osmolarnosti likvora koje je uzrokovano intraperitonealnom aplikacijom destilirane vode. Opažena hipoosmolarnost likvora je posljedica ulaska vode iz krvi u likvor zbog izazvanog disbalansa osmotskih sila između likvora i krvi (vidi Raspravu). Ta smanjena osmolarnost likvora (uzrokovana ulaskom vode) također se poklapa s opaženim porastom volumena likvora (Slika 18, 19, 20) nakon davanja destilirane vode istraživanim na istom modelu.

Ovim prikazanim pokusima smo jasno pokazali da razlika osmotskih sila između krvi i likvora utječe na volumen likvora i da je osmolarnost jedna od važnih čimbenika u regulaciji ukupnog volumena likvora. Za učinak osmolarnosti na promjenu volumena likvora je pritom ključno postojanje razlike u osmolarnosti između krvi i likvora, s time da će do smanjenja volumena likvora doći u slučaju kad je osmolarnost likvora manja od osmolarnosti krvi, a do povećanja volumena, u slučaju da je osmolarnost likvora veća.

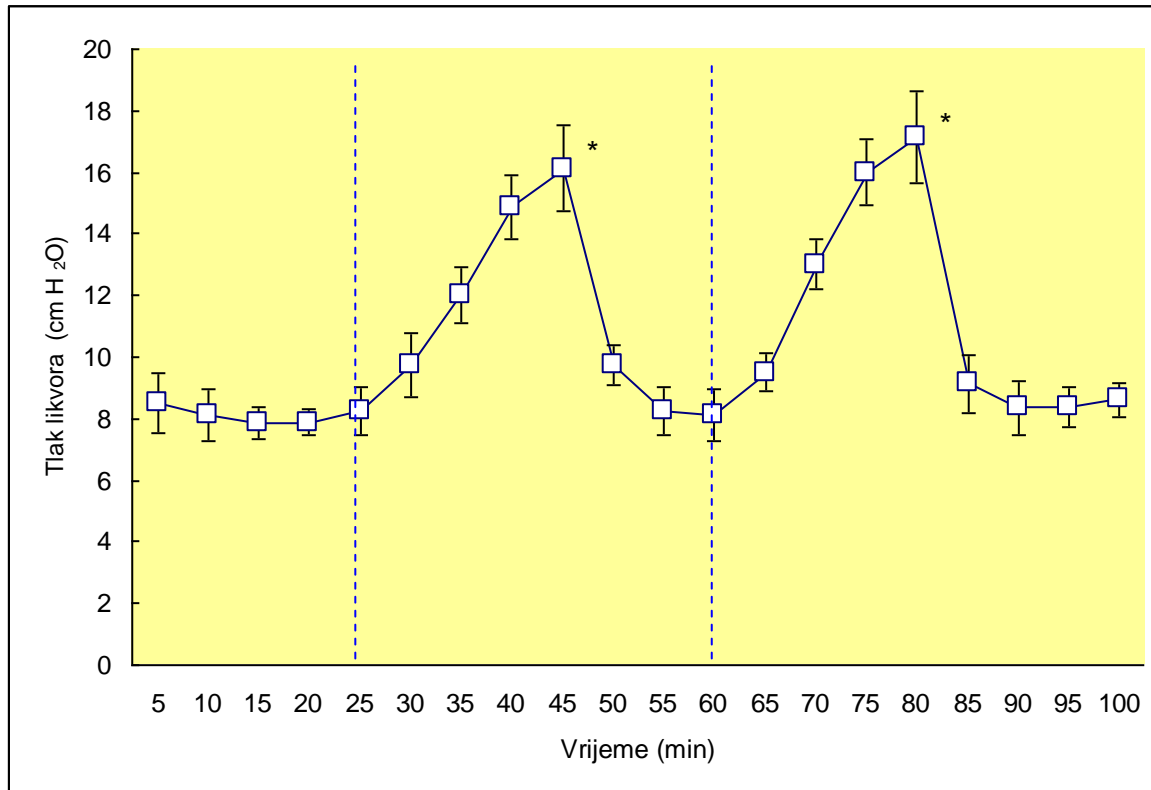
#### **4.4. INTRAKRANIJSKI TLAK NAKON SNIŽENJA OSMOLARNOSTI KRVI IZAZVANE INTRAPERITONEALNOM APLIKACIJOM DESTILIRANE VODE**

Budući da se povišeni intrakranijski tlak terapijski snižava povećanjem osmolarnosti krvi (intravenskom aplikacijom hiperosmolarne tekućine), te da smo pokazali da ta povećana osmolarnost krvi smanjuje volumen likvora (Slike 14, 15, 16), za očekivati je da bi smanjenje osmolarnosti krvi koje je dovelo do povećanja volumena likvora (Slike 18, 19, 20) trebalo rezultirati povišenim intrakranijskim tlakom. Porast intrakranijskog tlaka izazvan na taj način ujedno bi bio još jedan doprinos u razumijevanju uzajamne povezanosti između osmolarnosti likvora, ukupnog volumena likvora i povišenog likvorskog tlaka. U tu svrhu smo na anestetiziranim mačkama pratili tlak cerebrospinalnog likvora prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode koja dovodi do smanjenja osmolarnosti krvi. Rezultati učinka destilirane vode aplicirane intraperitonealno na intrakranijski tlak mačke prikazani su na Slikama 22, 23, 24 i 25. Na Slici 22 je prikazan jedan tipičan pokus, dok su na Slici 23 prikazane srednje vrijednosti kod tri mačke. Na apscisi je prikazano vrijeme u minutama, a na ordinati likvorski tlak u cm H<sub>2</sub>O. Nakon što su izmjerene vrijednosti fiziološkog tlaka (prvih pola sata mjerenja;

kontrolne vrijednosti) aplicirana je destilirana voda (100 mL/kg) i pratile su se vrijednosti likvorskog tlaka nakon aplikacije. Porast intrakranijskog tlaka započinje gotovo odmah nakon aplikacije destilirane vode i svoju najvišu vrijednost postiže oko petnaeste minute. Za otprilike pola sata nakon davanja destilirane vode vrijednosti likvorskog tlaka se spuste na fiziološke (kontrolne) vrijednosti. Budući da se likvorski tlak normalizirao, ponovili smo intraperitonealnu aplikaciju destilirane vode i dobili ponovno isti porast likvorskog tlaka.



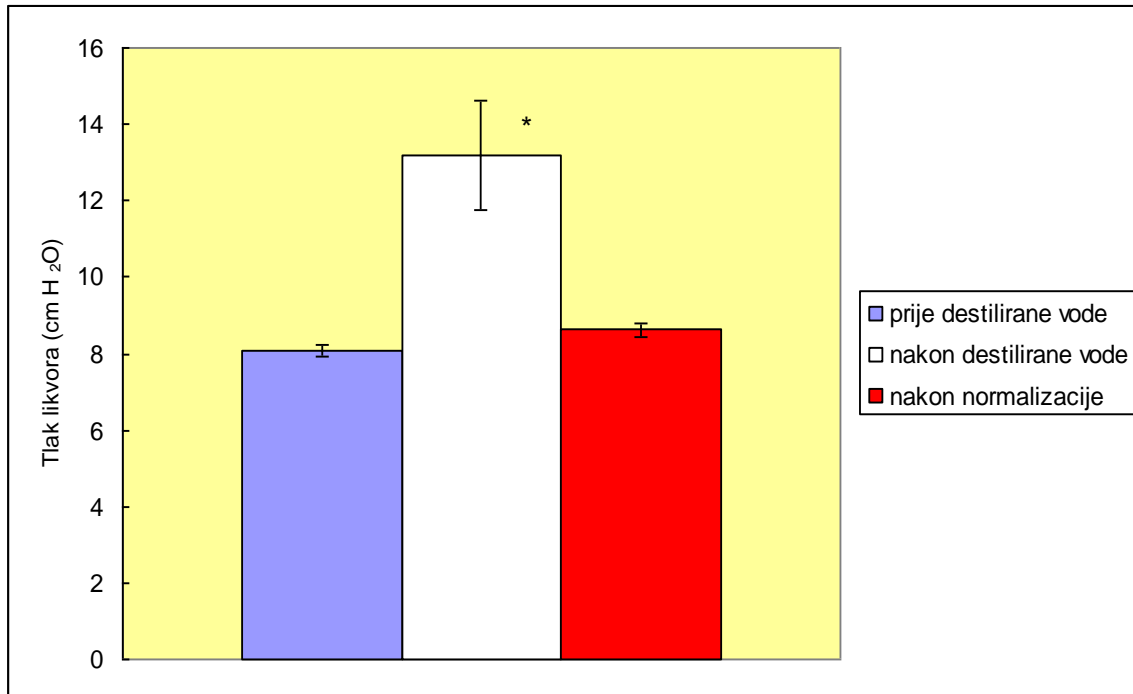
*Slika 22. Tlak cerebrospinalnog likvora kod mačke prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja destilirane vode. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*



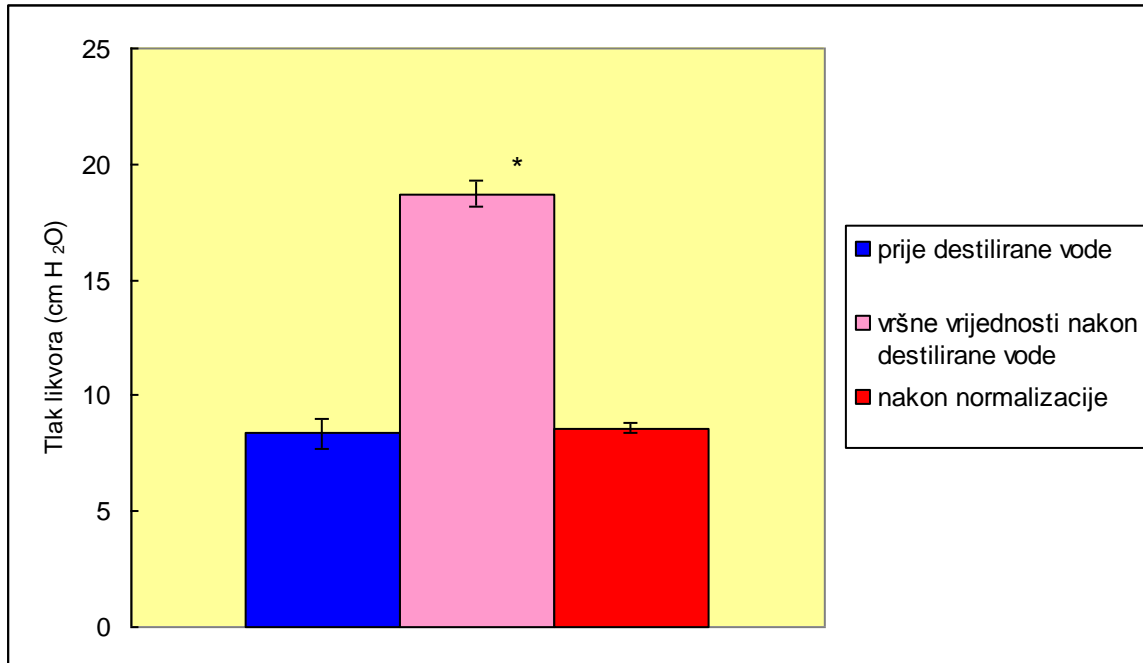
*Slika 23. Tlak cerebrospinalnog likvora kod mačaka (n=3) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidane crte označavaju vrijeme davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između tlaka prije i nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\* $p < 0,05$ ).*

Na Slici 24 i 25 su prikazane samo srednje vrijednosti likvorskog tlaka neposredno prije davanja destilirane vode kao i za vrijeme najviših vrijednosti nakon davanja, te vrijednosti nakon vraćanja na početne vrijednosti. Na ordinati je prikazan tlak likvora (cm H<sub>2</sub>O), dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost tlaka likvora u opisanom vremenu. Slika 25 se razlikuje od Slike 24 samo u tome što predstavlja najviše izmjerene vrijednosti likvorskog tlaka nakon davanja vode bez obzira što izmjerene vrijednosti tlaka nisu pale u točke koje su prikazane na Slikama 22 i 23. Drugim riječima, radi se o apsolutno najvećoj vrijednosti likvorskog tlaka, makar ta vrijednost bila izmjerena u recimo 43 ili na primjer 47 minuta, dakle vrijednosti koja nije izmjerena u intervalu od 5 minuta. Vidimo da je učinak destilirane vode dan intraperitonealno na tlak

likvora vrlo značajan i da dovodi do tranzitornog povećanja tlaka u trajanju od oko 30 minuta. Dakle, destilirana voda dovede do smanjenja osmolarnosti krvi, te tako stvorena razlika u osmolarnosti između likvora i krvi uzrokuje ulazak vode iz krvi prema likvoru i rezultira povećanjem volumena likvora koji se u ovim pokusima očituje porastom likvorskog tlaka.



*Slika 24. Vrijednost tlaka cerebrospinalnog likvora kod mačaka prije intraperitonealnog davanja destilirane vode (0-25 min), povišene vrijednosti nakon davanja destilirane vode (25-45 min) i vrijednost nakon vraćanja na početne vrijednosti (80-100 min). Rezultati prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  SEM. Razlike između tlaka prije i nakon davanja destilirane vode, te tlaka nakon davanja destilirane vode i tlaka nakon vraćanja na početne vrijednosti statistički su značajne (\* $p < 0,05$ ).*



*Slika 25. Vrijednost tlaka cerebrospinalnog likvora kod mačaka prije intraperitonealnog davanja destilirane vode, vršne povišene vrijednosti nakon davanja destilirane vode i vrijednost nakon vraćanja na početne vrijednosti. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između tlaka prije i nakon davanja destilirane vode, te tlaka nakon davanja destilirane vode i tlaka nakon vraćanja na početne vrijednosti statistički je značajna (\* $p < 0,005$ ).*

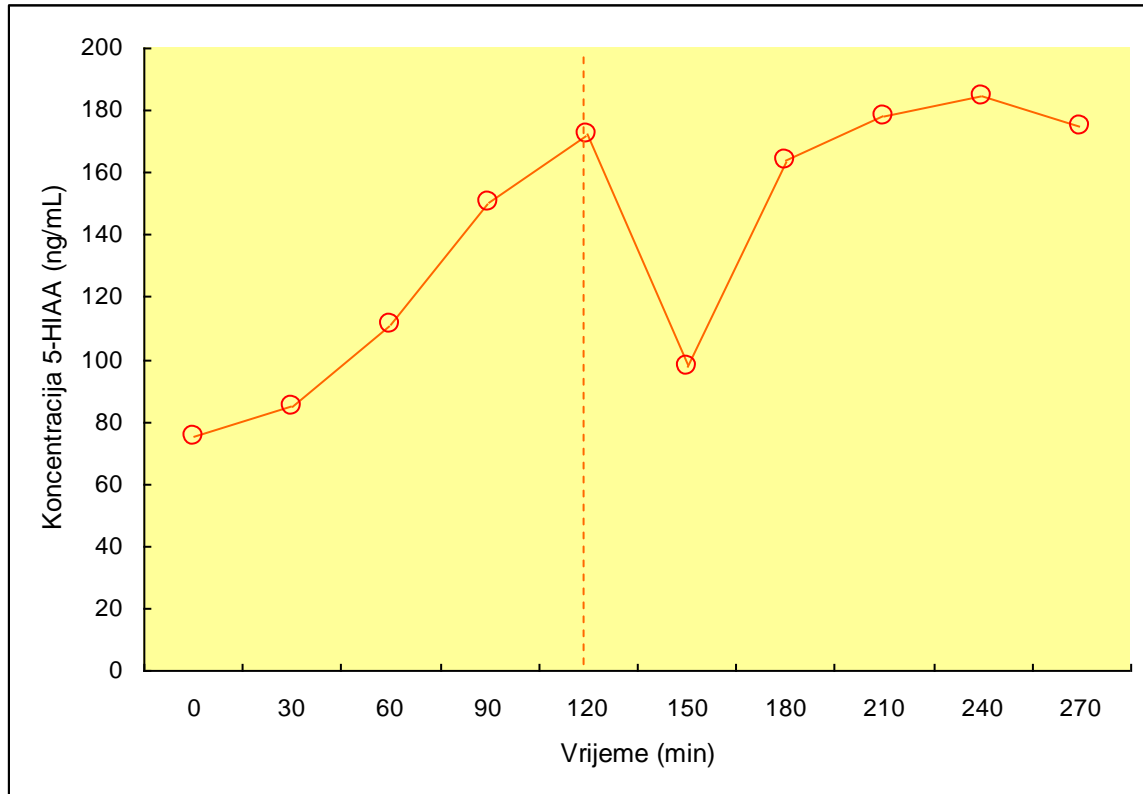
Obzirom da su iste osmotske sile u prethodnom eksperimentu kod otvorenog likvorskog sustava dovele do porasta ukupnog volumena likvora (Slike 18, 19 i 20), kod zatvorenog likvorskog sustava (bez istjecanja likvora) je to povećanje volumena likvora dovelo do povećanja tlaka likvora. Dakle, možemo zaključiti da su tlak likvora i volumen likvora uzročno posljedično vezani te da povećanje volumena likvora dovodi do povećanje tlaka likvora.



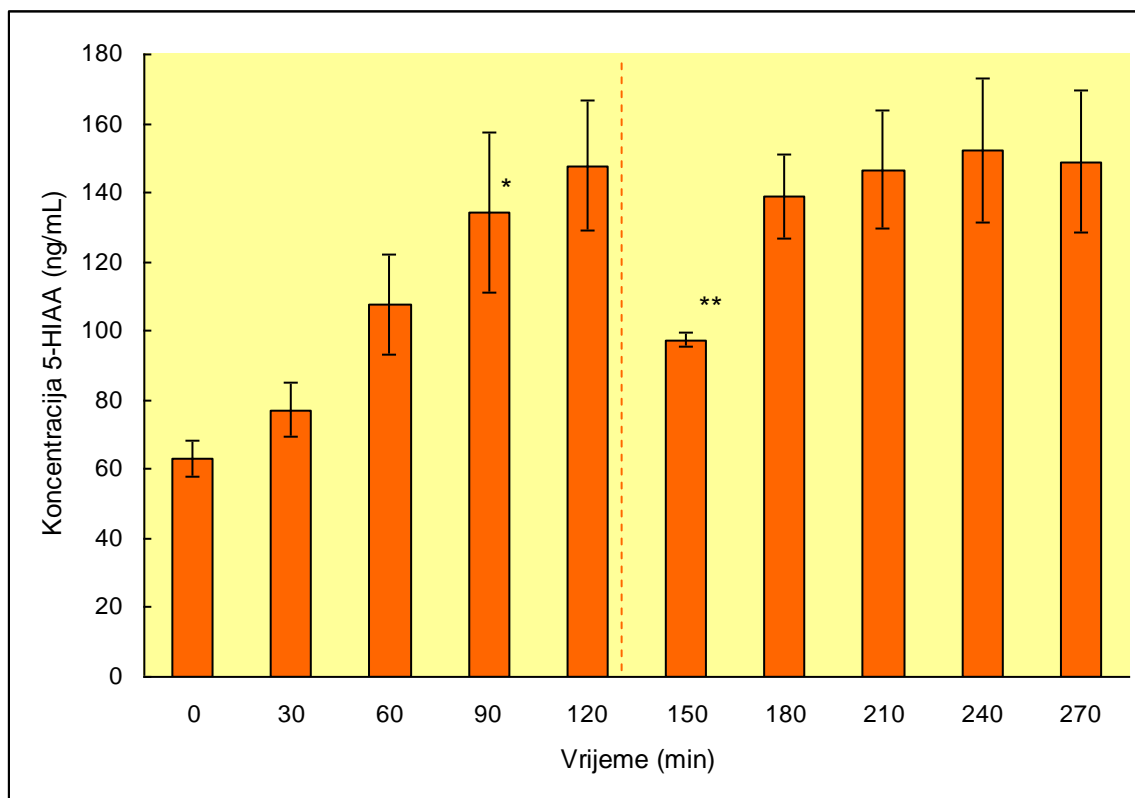
#### **4.5. METABOLITI NEUROTRANSMITERA U CEREBROSPINALNOM LIKVORU KAO BIOLOŠKI POKAZATELJI PROMJENE VOLUMENA LIKVORA**

Nakon pokusa u kojima smo pokazali da je promjena volumena likvora uzrokovana promjenom osmolarnosti likvora ili krvi, očekivali smo da bi kod povećanja volumena likvora, ako je uzrokovan dotokom vode (Slike 18, 19, 20) trebalo doći i do promjene koncentracije tvari fiziološki prisutnih u likvoru. Budući da se metaboliti neurotransmitera serotonina (5-hidroksiindolactena kiselina; 5-HIAA) i neurotransmitera dopamina (homovanilna kiselina; HVA) nalaze u likvoru, pristigli iz središnjeg živčanog sustava, željeli smo ispitati da li dolazi do promjene njihove koncentracije nakon povećanja volumena likvora. U tu svrhu smo kod mačke u sakupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora određivali koncentraciju 5-HIAA i HVA prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode (100 mL/kg).

Na Slikama 26, 27, 28 i 29 su prikazane vrijednosti koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline u uzorcima likvora sakupljenim prilikom slobodnog istjecanja likvora kod negativnog likvorskog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Na Slici 26 je prikazan jedan tipičan pokus, a na Slici 27 zbirni rezultati kod četiri mačke. Na apscisi je prikazano vrijeme u minutama, a na ordinati koncentracija u ng 5-HIAA po mL likvora. Stupići predstavljaju srednju vrijednost kod četiri mačke. Vidimo da u vremenu prije davanja destilirane vode koncentracija 5-HIAA raste u odnosu na kontrolne vrijednosti (0 vrijeme) i da nakon 90 minuta taj porast postaje statistički značajan (vidi Raspravu). Nakon davanja destilirane vode dolazi do pada koncentracije 5-HIAA koji je najveći 30 min od aplikacije destilirane vode, ali se nakon šezdeset minuta vraća na vrijednosti neposredno prije samog davanja destilirane vode.



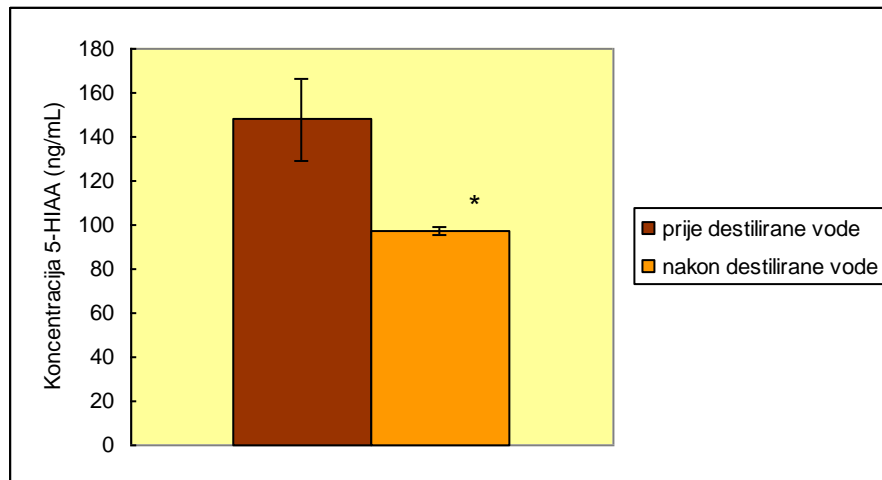
*Slika 26. Koncentracije 5-hidroksiindoloctene kiseline kod mačke u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*



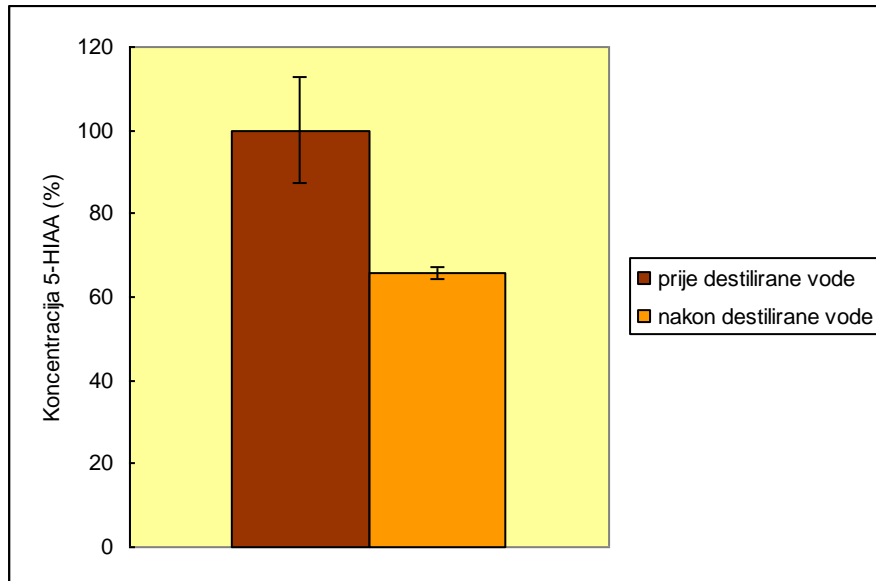
*Slika 27. Koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline kod mačaka (n=4) u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline prije početka istjecanja (0 minuta) i nakon 90 minuta statistički je značajna (\*p<0,05). Razlika koncentracija 5-hidroksiindolactene kiseline prije i nakon davanja destilirane vode nije statistički značajna (\*\*p>0,05).*

Na Slikama 28 i 29 prikazane su samo srednje vrijednosti koncentracije 5-HIAA neposredno prije davanja destilirane vode kao i za vrijeme najniže vrijednosti nakon davanja. Na ordinati je prikazana koncentracija 5-HIAA (ng/mL), dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost koncentracije 5-HIAA u upravo iskazanom vremenu. Slika 29 se razlikuje od Slike 28 samo po tome što su iskazane vrijednosti koncentracije 5-HIAA iskazane kao postotak u kojem su kao stopostotna vrijednost prikazane

vrijednosti koncentracije 5-HIAA neposredno prije davanja destilirane vode. Vidimo da nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode dolazi do smanjenja koncentracije 5-HIAA koje je bilo jasno vidljivo kod svake životinja (n=4), ali vjerojatno zbog veće varijabilnosti vrijednosti među životinjama to smanjenje nije statistički značajno ( $p>0,05$ ). Dakle, iako smanjenje koncentracije nije statistički značajno, ono je na rubu statističke značajnosti i vrlo je uočljivo, pogotovo kada se vrijednosti prikažu u postotku (Slika 29) gdje prikazani pad iznosi 34% (pad sa 100% na 66%).

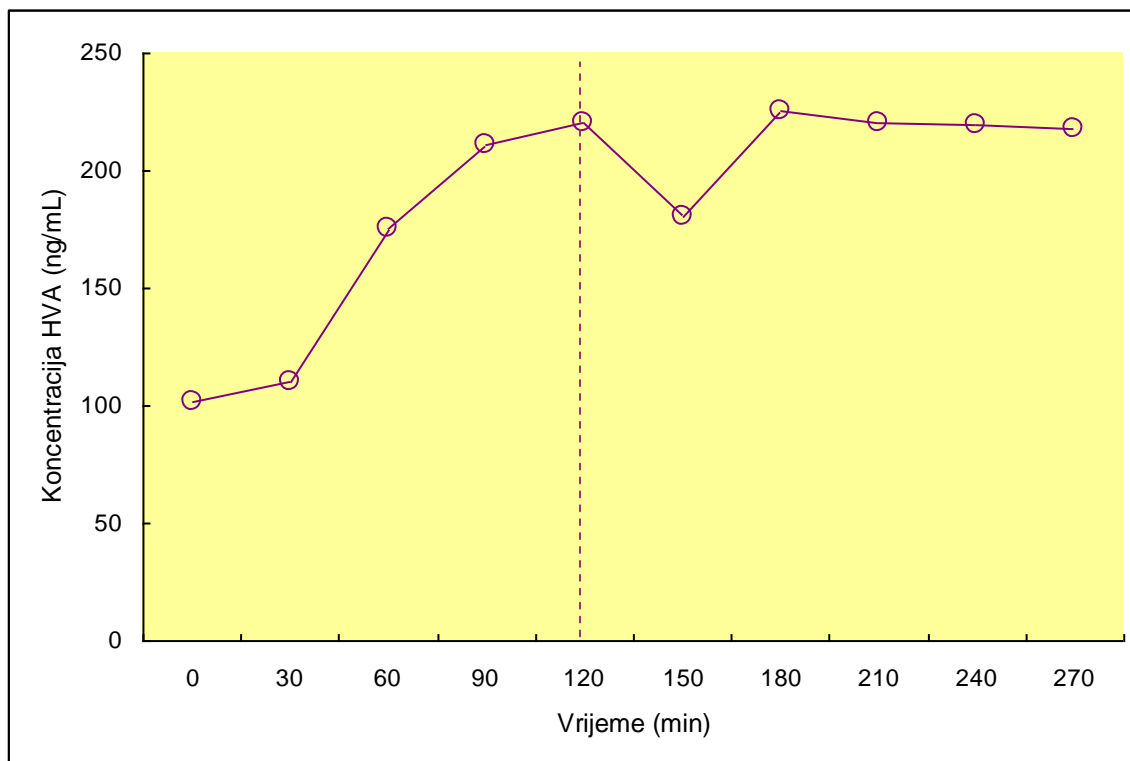


*Slika 28. Koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline kod mačaka (n=4) u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) neposredno prije (90-120 min) i nakon (120-150 min) intraperitonealnog davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika koncentracija 5-hidroksiindolactene kiseline neposredno prije i neposredno nakon davanja destilirane vode nije statistički značajna (\* $p>0,05$ ).*

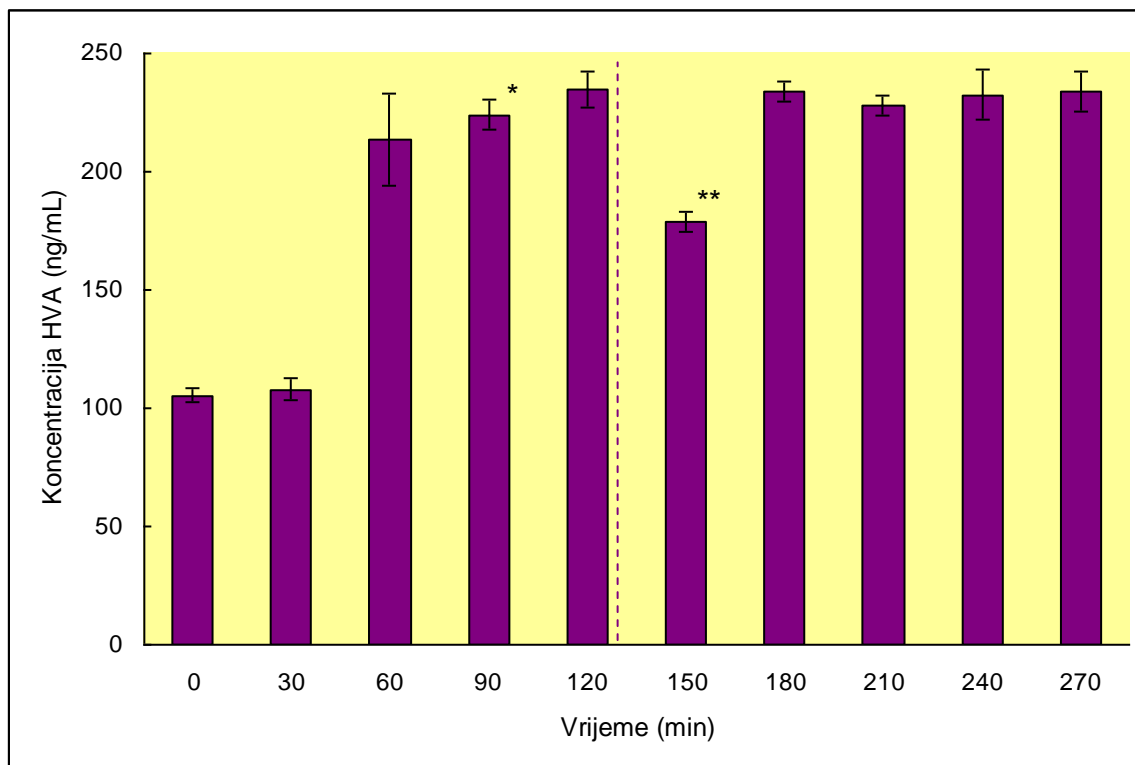


*Slika 29. Koncentracije 5-hidroksiindoloctene kiseline kod mačaka (n=4) u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) neposredno prije (90-120 min) i nakon (120-150 min) intraperitonealnog davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti u postotcima pri čemu je srednja vrijednost koncentracije 5-hidroksiindoloctene kiseline neposredno prije davanja destilirane vode uzeta kao 100%.*

Na Slikama 30, 31 i 32 su prikazane vrijednosti koncentracije homovanilne kiseline u uzorcima likvora sakupljenim prilikom slobodnog istjecanja likvora kod negativnog likvorskog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Na Slici 30 je prikazan jedan tipičan pokus, a na Slici 31 zbirni rezultati kod tri mačke. Na apscisi je prikazano vrijeme u minutama, a na ordinati koncentracija u ng HVA po mL likvora. Stupići predstavljaju srednju vrijednost kod tri mačke. Vidimo da u vremenu prije davanja destilirane vode koncentracija HVA raste u odnosu na kontrolne vrijednosti (0 vrijeme) i da nakon 90 minuta taj porast postaje statistički značajan (vidi Raspravu). Nakon davanja destilirane vode dolazi do pada koncentracije HVA koji je 30 min nakon aplikacije vode, najveći i statistički značajan, ali se nakon šezdeset minuta vraća na vrijednosti neposredno prije samog davanja destilirane vode.

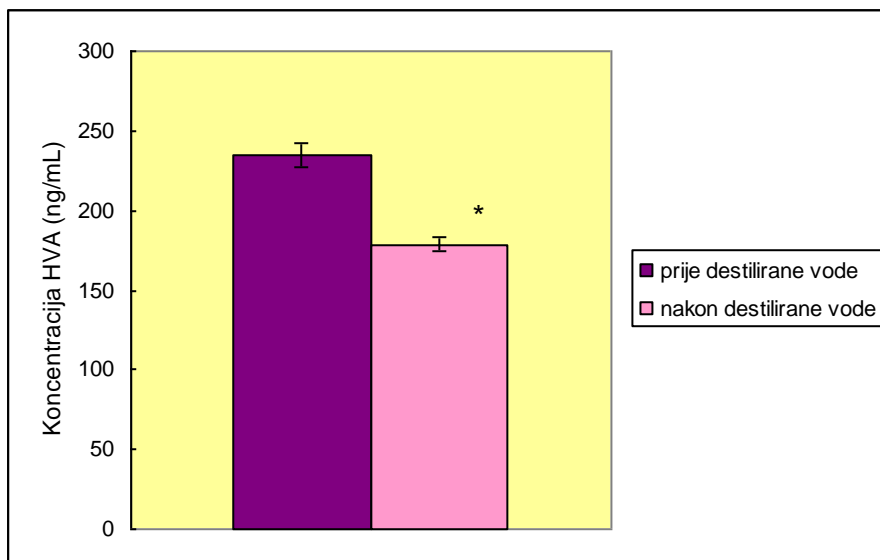


*Slika 30. Koncentracije homovanilne kiseline kod mačke u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Ova slika prikazuje rezultate jednog tipičnog pokusa.*



*Slika 31. Koncentracije homovanilne kiseline kod mačaka (n=3) u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) prije i nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode. Isprekidana crta označava vrijeme davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između koncentracije homovanilne kiseline prije početka istjecanja (0 minuta) i nakon 90 minuta statistički je značajna (\*p<0,05). Razlika koncentracija homovanilne kiseline prije i nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\*\*p<0,005).*

Na Slici 32 prikazane su samo srednje vrijednosti koncentracije HVA neposredno prije davanja destilirane vode kao i za vrijeme najniže vrijednosti nakon davanja. Na ordinati je prikazana koncentracija HVA (ng/mL), dok stupići na apscisi predstavljaju srednju vrijednost koncentracije HVA u upravo iskazanom vremenu. Vidimo da nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode dolazi do smanjenja koncentracije HVA koje je statistički značajno (p<0,005).



*Slika 32. Koncentracije homovanilne kiseline kod mačaka (n=3) u skupljenim uzorcima likvora na modelu spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) neposredno prije (90-120 min) i nakon (120-150 min) intraperitonealnog davanja destilirane vode. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SEM. Razlika između koncentracije homovanilne kiseline neposredno prije i neposredno nakon davanja destilirane vode je statistički značajna (\*p<0,005).*

Dakle i koncentracije 5-hidroksiindolactene kiseline i homovanilne kiseline u cerebrospinalnom likvoru tijekom spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) se ponašaju gotovo identično. Tako je na primjer u prvih 90 minuta došlo do značajnog povećanja koncentracija obje kiseline u odnosu na vrijednosti prije početka istjecanja. Povećanje njihove koncentracije tijekom istjecanja likvora vjerojatno je posljedica dotoka likvora iz moždanih komora u cisternu magnu što je izazvano negativnim tlakom (-10 cm H<sub>2</sub>O), a poznato je da postoji koncentracijski gradijent za te kiseline duž likvorskih prostora, te da je njihova koncentracija u moždanim komorama veća nego u cisterni magni (vidi Raspravu). Nadalje, nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode došlo je do prolaznog smanjenja koncentracije promatranih kiselina da bi jedan sat nakon davanja obje postigle koncentraciju neposredno prije davanja i ostale konstantne do kraja eksperimenta kroz 5 sati (Slike 26, 27, 30 i 31).



To bi značilo da je smanjivanje osmolarnosti plazme nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode dovelo do povećanja volumena likvora (Slike 18, 19, 20) vjerojatno povećanim dotokom same vode što je smanjilo koncentraciju 5-hidroksiindolactene kiseline i homovanilne kiseline. Moglo bi se reći da uočene promjene metabolita neurotransmitera u likvoru (smanjenje koncentracije 5-HIAA i HVA) nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode odražavaju povećanje volumena likvora, te da bi metaboliti mogli poslužiti kao biološki pokazatelj promjene volumena likvora izazvanog dotokom vode u likvorski sustav.

## 5. RASPRAVA

Kao što je već rečeno (vidi Uvod) prema klasičnoj hipotezi likvor se aktivno stvara (secernira) unutar moždanih komora od strane koroidnog plexusa te teče poput spore rijeke do mjesta apsorpcije kroz arahnoidne resice u duralne venske sinuse. Premda rezultati brojnih kasnije provedenih istraživanja i klinička opažanja nisu bili u skladu s klasičnom hipotezom, i dalje je ta hipoteza ostala korištena kao polazna točka u proučavanju dinamike/fiziologije likvora i objašnjavanju dobivenih rezultata [75]. U skladu s tom hipotezom, kao neupitnom činjenicom i danas se tumače fiziološka i patofiziološka stanja likvorskog sustava. Tako se vjeruje da se na taj način (cirkulacijom) vrši distribucija tvari u likvoru, da začepljenje likvorskog puta između mjesta sekrecije i mjesta apsorpcije dovodi do porasta likvorskog tlaka, da likvor koji se secernira protiv povišenog likvorskog tlaka dovodi do proširenja likvorskog sustava (najčešće moždanih komora) i razvoja hidrocefalusa. Također se smatra da stalni volumen likvora ovisi o ravnoteži između secerniranog likvora i apsorbiranog likvora, odnosno o količini likvora koja se stvara na jednom mjestu (moždane komore), a apsorpira na drugom mjestu (duralni venski sinusi).

Prema predloženoj novoj hipotezi o dinamici likvora [75], likvor se ne stvara (secernira) na jednom mjestu i ne apsorpira na drugom, već se stalno stvara i apsorpira duž cijelog likvorskog sustava kao posljedica filtracije i reapsorpcije vode, ovisno o hidrostatskim i osmotskim silama između cijelog likvorskog sustava (sve moždane komore i cijeli subarahnoidni prostor) s jedne strane i onoga što taj prostor okružuje s druge strane. Promjene tih hidrostatskih i osmotskih sila trebale bi dovesti do promjene volumena likvora. Ako se hidrostatske sile ne mijenjaju, kod normalnog likvorskog tlaka, tada će samo o promjenama osmotskih sila i o veličini kontaktne površini na koju te sile djeluju ovisiti promjena volumena likvora. Ukoliko je površina likvorskog sustava koja je izložena djelovanju osmotske sile veća, očekivalo bi se i veća promjena u volumenu likvora. Obzirom na rezultate prethodnih istraživanja u našem laboratoriju željeli smo ispitati je li regulacija volumena cerebrospinalnog likvora u skladu s klasičnom hipotezom ili je u skladu s novopredloženom hipotezom o dinamici cerebrospinalnog likvora.

## 5.1. ODRŽAVANJE VOLUMENA CEREBROSPINALNOG LIKVORA

U prijašnjim eksperimentima jasno je pokazano da promjene osmolarnosti cerebrospinalnog likvora dovode do promjena volumena cerebrospinalnog likvora, ali je bilo teško ta opažanja uklopiti u klasičnu hipotezu o dinamici cerebrospinalnog likvora, naročito u prvu postavku koja govori o aktivnoj sekreciji likvora. Naime, ako je sekrecija likvora aktivan, metabolički proces ovisan o energiji, tada promjene osmolarnosti likvora ne bi trebale utjecati na taj proces. Zbog toga su i objašnjenja utjecaja promjene osmolarnosti likvora na volumen likvora različita.

Promjene osmolarnosti cerebrospinalnog likvora većinom su istraživane metodom ventrikulo-cisternalne perfuzije, koja se koristi kao metoda za određivanje brzine sekrecije i apsorpcije likvora, a razvijena je i opisana 1962. godine od strane Heiseya i Pappenaimera, koji su izračunavanje stvaranja i apsorpcije likvora razvili na temelju razrjeđenja test supstancije u perfuzatu. Dakle, radi se o indirektnoj metodi gdje se vrijednosti izračunavaju temeljem razrjeđenja test supstancije prisutne u likvorskom sustavu, a ne na direktnom mjerenju stvaranja, odnosno apsorpcije likvora. U njihovim eksperimentima s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom na kozama promjene osmolarnosti perfuzata (mijenjanjem koncentracije NaCl u perfuzatu) dovele su do promjena izlaznog volumena, te izračunatih vrijednosti sekrecije likvora i apsorpcije likvora. Oni su zaključili da bi osmotski tok tekućine kroz ependimalni zid mogao uz koroidni plexus sudjelovati u stvaranju likvora, te da se možda mijenja i rezistencija apsorpcije likvora [18].

Slične rezultate u promjeni volumena likvora dobili su Wald i Hochwald u eksperimentima na mačkama s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom s različitim sastavom perfuzata (NaCl, saharoza, urea) i različitim osmolarnostima perfuzata, sa i bez acetazolamida (inhibitora karboanhidraze), ali je zaključeno da bi povećanje toka likvora kod perfuzije hipertoničnom otopinom moglo biti zbog povećanja sekrecije od strane koroidnog plexusa, iako se dio volumena likvora pripisuje ekstracelularnom prostoru okolnog mozga. Znatno teže im je bilo objasniti potpuni prestanak sekrecije likvora i od strane koroidnog plexusa i okolnog mozga kod perfuzije s hipotoničnom (30 mosmol/L) otopinom saharoze [27, 83].

Naime, prijašnji eksperimenti s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom pokazali su različite izračunate brzine sekrecije likvora kod različite brzine perfuzata, izračunatu sekreciju likvora i kod životinje nakon usmrćivanja, a i model u plastičnom cilindru pokazao je da se stvarni i izračunati podaci o sekreciji likvora ne podudaraju [39-41]. Također je poznato da indikator može proći iz likvora u moždani parenhim [42, 43] i time dovesti do razrjeđenja indikatora, što će rezultirati lažno povećanim stvaranjem likvora. I u drugim istraživanjima s ventrikulo-cisternalnom perfuzijom primijećene su neočekivane i neobjašnjive promjene dobivenih rezultata, iako se uvjeti kod provođenja eksperimenata nisu mijenjali [44]. Također su prema literaturi dobivane značajno različite vrijednosti brzine sekrecije likvora za istu vrstu. Za mačku, brzina sekrecije likvora dobivena u jednom istraživanju je oko 15,0  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Lehman i Fitzgerald) [18], u drugom 22,7  $\mu\text{L}/\text{min}$  [82], a u trećem oko 25,0  $\mu\text{L}/\text{min}$  [27, 83], što je čak 66% više od rezultata prvog istraživanja.

Obzirom na sve navedeno očito je da ventrikulo-cisternalna perfuzija s indikatorom kao ključnim parametrom za izračunavanje stvaranja likvora, nije pouzdana metoda, kao što se to smatra i da ne prikazuje rezultate stvorenog likvora.

Zbog svega rečenog mi smo u našim eksperimentima koristili metodu direktne ventrikulo-akveduktalne perfuzije [45] i ventrikulo-cisternalne perfuzije koje smo razvili u našem laboratoriju, gdje smo sekreciju likvora određivali direktno, na temelju razlike volumena ulaznog i volumena izlaznog perfuzata, a ne indirektno, na temelju razrjeđenja indikatora, izračunavajući volumen stvorenog likvora pomoću jednadžbe Heiseya i Pappenhaimera [18], kao što su to radili drugi znanstvenici. Budući da prema novoj hipotezi očekujemo da za tekućine u kraniju vrijedi Starlingova hipoteza kapilarne izmjene tekućina [77] gdje su osmotske sile vrlo važne za tu izmjenu, i znajući da veličina osmoze osim o osmotskom gradijentu ovisi i o površini preko koje se osmoza odvija, očekivali smo da će volumen likvora ovisiti kako o promjeni njegove osmolarnosti tako i o likvorskoj površini na kojoj se ta izmjena događa.

Uspoređujući kod fiziološkog likvorskog tlaka izlazne volumene izoosmolarnog perfuzata kod direktne metode ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije s brzinom perfuzije (koja je prema klasičnoj hipotezi u granicama očekivanog stvaranja likvora; 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), dobili smo iste vrijednosti u kontrolnim pokusima (vrijednosti

protoka same pumpe), kao i u ventrikulo-akveduktalnoj i ventrikulo-cisternalnoj perfuziji (Slika 9). To nam jasno kazuje da smo istu količinu izoosmolarnog perfuzata koju smo infundirali i sakupili, bilo da se radilo o samoj pumpi, ventrikulo-akveduktalnoj ili ventrikulo-cisternalnoj perfuziji. Drugim riječima, nije opaženo stvaranje likvora, jer da se likvor stvarao količina sakupljenog perfuzata bi trebala biti veća upravo za taj stvoreni likvor. Dakle, kod perfuzije s izoosmolarnom otopinom umjetnog likvora pri normalnom intrakranijskom tlaku (bez promjena hidrostatskih sila), neovisno o veličini i dijelu (vrsti) likvorskog prostora koji je perfundiran, bez promjena osmotskih sila nije bilo niti promjene volumena likvora, odnosno nije bilo „čistog“ stvaranja niti apsorpcije likvora, što smo i temeljem dosadašnjih naših istraživanja očekivali. Međutim, kada smo pod istim uvjetima vršili perfuziju hiperosmolarnom otopinom saharoze (400 mosmol/L), dobili smo značajni porast izlaznog volumena perfuzata u odnosu na izoosmolarni perfuzat (Tablice 3 i 4). Ovim rezultatima smo nadopunili i potvrdili prethodne rezultate dobivene u našem laboratoriju i nedvojbeno pokazali da nema „čistog“ stvaranja likvora, a da je regulacija/održavanje ukupnog volumena likvora ovisna o povećanoj osmolarnosti likvora. Također se jasno vidi (Slika 10), što je veća površina likvorskog sustava koja je izložena osmotskom djelovanju, to je i veći volumen dobivenog perfuzata. Dakle, u slučaju kad se poveća osmolarnost likvora, to dovede do nakupljanja tekućine koje nije vezano uz nikakvo stvaranje likvora unutar moždanih komora, već se radi o izmjeni tekućine unutar čitavog likvorskog sustava, kako u komorama (Slika 10), tako i u subarahnoidnom prostoru (Tablica 4 i Slika 10).

Kao što je u našem istraživanju najvjerojatnije došlo do osmotskog pomaka vode iz krvi (plazme) u likvor, osmotski pomaci vode pokazani su kod različitih patoloških stanja kod kojih se javlja hiperosmolarnost određenog dijela središnjeg živčanog sustava. Tako je pokazana hiperosmolarnost središnjih, ali i perifernih dijelova kontuzijskih žarišta mozga nakon traume [93] kao i ishemijskih dijelova mozga nakon cerebrovaskularnog infarkta [94] i posljedično osmotsko nakupljanje vode što se manifestira kao perifokalni edem.

I u svakodnevnoj kliničkoj praksi vidljivo postupno povećanje i dekompenzacija kroničnog subduralnog hematoma objašnjavana je hiperosmolarnošću tekućine hematoma zbog raspadnih produkata krvi (produkti fibrinolize) i osmotskim navlačenjem vode iz

okoline [95, 96]. Iako su kasnija istraživanja osmolarnosti kroničnih subduralnih hematoma pobijala Gardnerovu osmotsku teoriju [97, 98] novija istraživanja pokazala su vrlo visoke koncentracije propeptida tipa I i tipa III protokolagena u tim hematomima, koje bi mogle djelovati osmotski [99, 100].

Slično se događa i kod razvoja osmotskog edema mozga u stanjima hipoosmolarnosti plazme i hiponatrijemije (SIADH, psihogena polidipsija, infuzija hipotonične otopina, brzo snižavanje hiperglikemije davanjem inzulina), kada tekućina (voda) iz područja niže osmolarnosti (plazme) odlazi u područje više osmolarnosti (moždani međustanični prostor i cerebrospinalni likvor, te stanice mozga) [88]. Međutim, pokazano je da u stanjima hipoosmolarnosti plazme osmotski efekt puno značajnije mijenja volumen vode likvora i međustaničnog prostora, nego li moždanih stanica koje su relativno neosjetljive na manje promjene osmolarnosti plazme, te da su izmjene vode između plazme i likvora vrlo brze. Stoga se pretpostavlja kako bi jedna od važnih uloga cerebrospinalnog likvora mogla biti zaštita stanica mozga u stanjima hipoosmolarnosti plazme, preuzimanjem osmotski navučene vode iz međustaničnog prostora [82, 83, 101].

Ukoliko su osmotske sile uključene u održavanje/regulaciju volumena likvora za očekivati je da će i promjena osmolarnosti krvi dovesti do promjene ukupnog volumena likvora. Budući da se u terapiji intrakranijske hipertenzije koristi i.v. davanje 20% manitola, čiji točan mehanizam djelovanja nije ni do danas razjašnjen (vidi Uvod), mi smo kod mačke pratili promjenu volumena likvora nakon istovjetne aplikacije manitola. Očekivali smo da će doći do smanjenja volumena likvora i da je to smanjenje volumena likvora također i razlog terapijskog učinka manitola tj. da je to uzrok smanjenja likvorskog tlaka. Promjenu volumena likvora smo pratili tako da smo vršili direktnu ventrikulo-cisternalnu perfuziju kod fiziološkog likvorskog tlaka i uspoređivali izlazne volumene perfuzata prije i nakon davanja manitola. Nakon i.v. aplikacije manitola učinak osmotskih sila je tako snažan (Slike 11, 12 i 13), da se pola sata nakon aplikacije gotovo obustavi protok (brzina perfuzije 12,96  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). U našim pokusima je smanjenje volumena tranzitorno, s najvećim učinkom nakon pola sata. Nakon normalizacije protoka ponovno davanje hiperosmolarnog manitola rezultiralo je istim učinkom (Slike 11 i 12). Gotovo identičan rezultat se dobije kada se pod istim uvjetima vrši perfuzija brzinom od 65,00  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Slike 14, 15 i 16). Bez obzira što je povećana brzina perfuzije (volumen

perfuzata koji protječe kroz likvorski sustav), osmotska sila (20% manitol) je djelovala istim intenzitetom u obje perfuzije, tj. količina smanjenog volumena izlaznog perfuzata je bila gotovo ista (vidi Rezultate). Nadalje, kako je pokazano [39] da volumen „stvorenog“ likvora izračunatog pomoću jednadžbe Heiseya i sur. [18] ovisi o brzini perfuzije (što je brzina ventrikulo-cisternalne perfuzije veća, stvaranje je manje), provjerili smo hoće li i na modelu direktne ventrikulo-cisternalne perfuzije, povećanje perfuzije također dovesti do dodatnog smanjenja izlaznog volumena uzrokovanog i.v. davanjem 20% manitola. Kako nije bilo značajne razlike u izlaznim volumenima (11,87 odnosno 10,50; Slika 17), to nam dodatno govori o točnosti same metode koja prikazuje iste promjene izlaznog volumena („pad volumena“) bez obzira na korištenu brzinu perfuzije.

Dakle, osim upravo opisanog djelovanja na volumen likvora, djelovanje osmotskih sila izazvanih povećanjem osmolarnosti plazme uzrokovane manitolom se inače tumači i izvlačenjem vode iz vanstaničnog prostora i mozga što smanjuje volumen mozga, a time i intrakranijski tlak. Smatra se da taj osmotski učinak počinje oko 15 do 30 minuta nakon davanja manitola, dok se trenutni (brzi) učinak manitola nakon davanja pripisuje reološkom efektu manitola (smanjivanjem hematokrita i viskoznosti krvi) što povećava cerebralni protok krvi te se autoregulacijom smanjuje volumen krvi u mozgu [79]. To vrijeme osmotskog učinka manitola odgovara i rezultatima našeg eksperimenta, gdje je došlo do značajnog pada izlaznog volumena likvora trideset minuta nakon davanje manitola (Slike 11, 12, 14 i 15).

Najviše kritika za osmotsku teoriju u redukciji intrakranijskog tlaka nakon primjene manitola dali su eksperimentalni podaci o potrebi visokih doza manitola za redukciju sadržaja vode u mozgu, dok su dovoljne manje doze za snižavanje intrakranijskog tlaka [82, 84]. Obzirom da je i u prijašnjim eksperimentima [102], a i u ovom našem eksperimentu jasno pokazano da takve, manje doze manitola dovode do značajne redukcije volumena cerebrospinalnog likvora, možemo zaključiti da je upravo smanjivanje volumena cerebrospinalnog likvora kod primjene hiperosmolarne terapije u terapijskim dozama, ako ne u cijelosti, ali onda velikim dijelom zaslužno za smanjivanje povišenog intrakranijskog tlaka.

Kao dodatni mehanizam djelovanja manitola (uz osmotsko i reološko djelovanje) možemo spomenuti i diuretsko djelovanje manitola, koje dovodi do snižavanja centralnog

venskog tlaka [84]. I ovaj mehanizam djelovanja, je kao i osnovni osmotski mehanizam djelovanja u skladu s predloženom novom hipotezom o dinamici cerebrospinalnog likvora po kojoj je regulacija volumena likvora pod kontrolom osmotskih i hidrostatskih sila. Naime, snižavanje centralnog venskog tlaka snižava hidrostatske sile u venskim kapilarama i postkapilarnim venulama koje su prema novoj hipotezi mjesto konstantne reapsorpcije likvora stvorene filtracijom kroz stijenku arterijskih kapilara.

Dosadašnji rezultati jasno ukazuju, da pod utjecajem osmotskih sila, volumen likvora osim što se može povećati (Slika 10), se također može i smanjiti (Slike 13 i 16), a ta promjena volumena ovisi o razlici osmolarnosti između likvorskog sustava i krvi. Ukoliko je osmolarnost veća unutar likvorskog sustava, volumen će se povećati, a ukoliko je manja, doći će do smanjenja volumena likvora. Taj način regulacije volumena likvora smo također dodatno provjerili na modelu spontanog istjecanja likvora. Kod te metode (vidi Modeli i metode) se likvor iz cisterne magne sakuplja pod negativnim tlakom (-10 cm H<sub>2</sub>O) i kad se istjecanje likvora ujednači, može se nakon aplikacije osmotskih tvari pratiti učinak na promjenu volumena sakupljenog likvora (a ne perfuzata). Budući da smo dosad ispitali učinak povećane osmolarnosti krvi na likvorski sustav, u ovim smo pokusima željeli ispitati kakav je učinak smanjene osmolarnosti krvi. U tu svrhu smo intraperitonealno aplicirali destiliranu vodu (hiposmolarna otopina) i pratili učinak na volumen likvora. Kako se radi o likvoru to nam je omogućilo da mjerimo osmolarnost uzoraka likvora u toku čitavog pokusa. Opaža se da nakon prvih pola sata dolazi do značajnog porasta osmolarnosti likvora, koja se nakon davanja destilirane vode smanjuje (na 270 mosmol/L) za čitavo vrijeme trajanja pokusa (do 270 min; Slika 21). Gotovo identični rezultati osmolarnosti likvora nakon tretmana destiliranom vodom, dobiveni su i na štakorima, a pad osmolarnosti likvora nakon tri sata od aplikacije destilirane vode bio je nešto niži od 270 mosmol/L. Osmolarnost mjerena u plazmi štakora odražavala se kao u ogledalu u odnosu na likvor, s time da je osmolarnost plazme nakon tri sata iznosila 240 mosmol/L [103]. Zašto je osmolarnost likvora u našim pokusima rasla za vrijeme istjecanja likvora prije davanja destilirane vode (Slika 21), teško je odgovoriti. Ukoliko aktivni transporti koji unose tvari u likvorski sustav, rade istim kapacitetom, a volumen likvora/vode se zbog istjecanja smanjuje, to bi možda moglo dovesti do porasta osmolarnosti likvora. Međutim, iako je trend porasta



osmolarnosti u likvoru opažen i kod štakora [103], da bi se objasnio opaženi učinak trebalo bi napraviti dodatna istraživanja.

Uspoređujući izlazne volumene likvora prije i nakon i.p. aplikacije destilirane vode jasno se vidi (Slike 18, 19 i 20) da dolazi do statistički značajnog povećanja volumena likvora koji je najviši pola sata nakon aplikacije, a nakon sat vremena se spusti na početne (kontrolne) vrijednosti. Dakle, smanjenje osmolarnosti krvi je stvorilo osmotsku razliku između krvi (plazme) i likvora, te je tekućina (likvor/voda) iz sustava niže osmolarnosti (plazma) prelazila u sustav više osmolarnosti (likvor) što je rezultiralo povećanim izlaznim volumenom likvora. I u ovim pokusima s istjecanjem likvora smo dobili isti odgovor kao i u pokusima s hiperosmolarnom perfuzijom likvorskog sustava (Tablice 3 i 4), tj. veća osmolarnost likvora u odnosu na plazmu je rezultirala povećanim izlaznim volumenom perfuzata, odnosno likvora.

Na kraju možemo reći da je u sve tri vrste eksperimenata; i perfuzije s hiperosmolarnim perfuzatom kod modela direktne ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije; i kod modela direktne ventrikulo-cisternalne perfuzije s i.v. hiperosmolarnom aplikacijom manitola; i kod modela spontanog istjecanja likvora nakon i.p. davanja hipoosmolarnе otopine, uvijek došlo do značajnih promjena izlaznog volumena. Dakle, bez obzira koju smo vrstu eksperimenta koristili i na koji način smo mijenjali osmolarnost krvi ili likvora, uvijek je ta promjena osmolarnosti dovela do promjene ukupnog volumena u likvorskom sustavu. Ovi pokusi nedvojbeno pokazuju da ukoliko dođe do osmotskih razlika između krvi/plazme i likvora, to će rezultirati promjenom ukupnog volumena likvora, a ta će se izmjena likvora/vode odvijati unutar čitavog likvorskog sustava, kako unutar moždanih komora, tako i unutar subarahnoidnog likvorskog prostora. Ovo također znači da održavanje/regulacija volumena likvora u likvorskom sustavu nije rezultat aktivnog stvaranja likvora unutar komora i pasivne apsorpcije na površini mozga, već dinamičke izmjene likvora uzduž čitavog likvorskog sustava s međustaničnom tekućinom i krvnom cirkulacijom, ovisne o razlici osmotskih sila, ali i ostalih hidrodinamskih čimbenika koji vladaju unutar tih sustava, odnosno da se odvija u skladu sa Starlingovom hipotezom kapilarne izmjene tekućina [77]. Drugim riječima, ovi rezultati čvrsto podupiru novu hipotezu, a ne uklapaju se u klasičnu hipotezu o hidrodinamici (fiziologiji) likvora.

## **5.2. MEĐUSOBNA POVEZANOST PROMJENE OSMOLARNOSTI KRVI S PROMJENAMA VOLUMENA I TLAKA CEREBROSPINALNOG LIKVORA**

Već smo diskutirali moguću povezanost osmotskih sila, volumena likvora i likvorskog tlaka kod eksperimenata s 20% manitolom (Slike 11, 12, 13, 14, 15 i 16) prilikom razmatranja terapijskog djelovanja hiperosmolarnog manitola na intrakranijsku hipertenziju. Iako nismo mjerili intrakranijski/likvorski tlak, došli smo do zaključka da je sniženje intrakranijske hipertenzije kod pacijenata nakon i.v. aplikacije 20% manitola, vrlo vjerojatno uzrokovano i smanjenjem volumena likvora. Zbog želje da uočimo povezanost tlaka likvora, osmotskih sila i volumena likvora, vršili smo mjerenje tlaka u eksperimentima u kojima smo nakon i.p. aplikacije hipoosmolarnе otopine destilirane vode (na modelu spontanog istjecanja likvora) pokazali povećanje volumena likvora. Dakle, na identičan način smo aplicirali destiliranu vodu i umjesto da smo sakupljali likvor, mi smo u zatvorenom likvorskom sustavu mjerili likvorski tlak. Na taj način smo mogli prikazati izravnu povezanost, ukoliko ona postoji, između osmotskih sila, promjene volumena likvora i likvorskog tlaka. Naime, ukoliko sniženje osmolarnosti plazme koje je s jedne strane dovelo do povećanja volumena likvora (Slike 18, 19 i 20), s druge strane dovede do povećanja intrakranijskog/likvorskog tlaka, jasno je da je to povećanje tlaka likvora posljedica opaženog povećanog volumena likvora. Destilirana voda je dana u dva navrata, te je u oba navrata odmah nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode došlo do značajnog porasta tlaka cerebrospinalnog likvora. Ako analiziramo dobivene rezultate mjerenja tlaka nakon i.p. aplikacije destilirane vode (Slike 22, 23, 24 i 25), vidimo da se likvorski tlak upravo ponaša kao i volumen likvora (Slike 18, 19 i 20), tj. porast volumena likvora se preklapa s porastom likvorskog tlaka. Neposredno nakon i.p. aplikacije destilirane vode počinje istovremeni porast i tlaka i volumena, a najviše vrijednosti tlaka postignute su oko dvadesete minute. Ovi eksperimentalni rezultati jasno upućuju na međusobnu povezanost osmotskih sila, održavanje odnosno regulaciju ukupnog volumena likvora i likvorskog tlaka. Oni također upućuju na opravdanost tumačenja terapijskog djelovanja osmotske terapije kod intrakranijske hipertenzije, kod koje je terapijski učinak bez sumnje zasnovan i na smanjenju ukupnog volumena likvora. Sva ova opažanja je teško protumačiti u skladu s klasičnim konceptom, prema kojem

ukupni volumen likvora kao i tlak likvora ovise (gotovo isključivo) o njegovom aktivnom stvaranju (sekreciji likvora), začepljenju likvorskih puteva ili začepljenju mjesta pasivne apsorpcije.

Liječenje intrakranijske hipertenzije je i dalje složen problem i osmotska terapija vrlo često ne daje zadovoljavajuće rezultate. U kliničkoj praksi se kao najčešći problem navodi ponovni porast likvorskog tlaka (tzv. „rebound“ fenomen) koji se javlja kod ponavljanog i prolongiranog davanja osmoterapeutika (manitola) uzrokovan osmotskim silama koje sada djeluju suprotno, a nastaju zbog nakupljanja osmoterapeutika unutar središnjeg živčanog sustava (uključujući i likvorske prostore) i njihovog sporog odstranjivanja, te uzrokuju pomake vode iz plazme u središnji živčani sustav i porast intrakranijskog tlaka [84]. Iako smo mi u ovom radu pokazali da je smanjenje volumena likvora vjerojatno jedan od važnih razloga koji dovodi do smanjenja likvorskog tlaka, to je još uvijek nedovoljno za razumijevanje svih procesa koji su u podlozi nastanka intrakranijske hipertenzije. Pogotovo se to odnosi na liječenje ozljeda mozga kod kojih je porast tlaka značajan problem. Međutim, i tu se događaju novi terapijski pristupi koji su vrlo lako uklopivi u našu hipotezu o hidrodinamici likvora. Riječ je o tzv. „Lundovom konceptu“ koji je predstavljen 1994. godine od strane Sveučilišta Lund u Švedskoj kao alternativni koncept liječenja teške ozljede mozga.

Općeprihvaćeni, klasični protokol liječenja teške ozljede mozga, prema preporukama „US Brain Trauma Foundation“ i „European Brain Injury Consortium“ primarno je usmjeren na održavanje cerebralnog perfuzijskog tlaka (CPP) snižavanjem povišenog intrakranijskog tlaka (vanjska drenaža likvora, osmoterapija, mehanička ventilacija, barbituratna koma i dr.), te održavanjem srednjeg arterijskog tlaka (MAP) nadoknadom volumena i po potrebi vazopresorima. Preporuka je da se srednji arterijski tlak održava na 80 do 90 mm Hg s minimalnim cerebralnim perfuzijskom tlakom od 60 do 70 mm Hg [78, 104]. Kao osnovna kritika klasičnog koncepta liječenja teške kranio cerebralne ozljede je održavanje visokog cerebralnog perfuzijskog tlaka što najvjerojatnije povećava hidrostatski vazogeni edem [84].

Suprotno tome, „Lund koncept“ temelji se na pretpostavci da je kod teške ozljede mozga krvno-moždana barijera oštećena, a time i cerebralna vaskularna autoregulacija, te da je stoga transkapilarna izmjena vode određena razlikom u hidrostatskom i koloidno-

osmotskom tlaku između intrakapilarnog i ekstrakapilarnog odjeljka. Disbalans tih tlakova koji nastaje kod traume dovodi do razvoja edema što povisuje intrakranijski tlak i smanjuje perfuziju i oksigenaciju tkiva. Stoga se nastoji reducirati kapilarni hidrostatski tlak hipotenzivnom terapijom (beta-1 antagonisti–metoprolol, alpha-2 agonisti–klonidin, potencijalni prekapilarni vazokonstriktor i venski konstriktor–dihidroergotamin). Koloidni osmotski tlak se održava infuzijom albumina, uz održavanje normovolemije nadoknadom eritrocita. Može se pretpostaviti da ovi nabrojani procesi također djeluju i na likvorski sustav kao neraskidivi dio središnjeg živčanog sustava. Za razliku od klasičnog koncepta hiperosmolarna terapija, kao i vanjska drenaža likvora (osim kod kritično visokog intrakranijskog tlaka) se ne preporučaju [105-107].

Iako se klinički rezultati ovog koncepta pokazuju dobrim, ovaj koncept se još uvijek koristi u manjem broju medicinskih centara [107, 108], za razliku od klasičnog koncepta, ali vjerojatno značajan broj ustanova u liječenju teške kranio cerebralne ozljede koristi protokole koji se zapravo nalaze na sredini (između) ova dva suprotstavljena koncepta.

Također možemo reći da kod oba koncepta nalazimo više ili manje elemenata koji su u skladu s predloženom novom hipotezom o dinamici cerebrospinalnog likvora po kojoj je regulacija volumena likvora, a time i intrakranijskog tlaka, pod kontrolom osmotskih i hidrostatskih sila.

### **5.3. PONAŠANJE METABOLITA NEUROTRANSMITERA U CEREBROSPINALNOM LIKVORU NAKON PROMJENE VOLUMENA LIKVORA**

Kao što je već rečeno 99% likvora predstavlja voda (vidi Uvod), a 1% sve ostale tvari prisutne u likvoru. Među 1% tih tvari spadaju i metaboliti neurotransmitera koji nastaju raspadom neurotransmitera u mozgu i kralješničnoj moždini te putem međustanične tekućine dolaze i u likvor. Mi smo u ovom radu mjerili koncentraciju 5-hidroksiindolactene kiseline (5-HIAA), koja je glavni metabolit neurotransmitera serotonina (5-hidroksitriptofana; 5-HT) i koncentraciju homovanilne kiseline (HVA), koja je glavni metabolit neurotransmitera dopamina. Očekivali smo da će, ukoliko zbog osmotskih sila dođe do povećanja ukupnog volumena likvora, to rezultirati promjenom

koncentracije spomenutih metabolita, odnosno ukoliko se volumen likvora povećava zbog ulaska vode, taj povećani volumen vode bi trebao smanjiti koncentracije 5-HIAA i HVA.

Koncentracije 5-HIAA i HVA smo ispitivali u uzorcima likvora dobivenim na modelu spontanog istjecanja likvora i promatrali kakav učinak će izazvati i.p. davanja destilirane vode (hiposmolarna otopina). Model spontanog istjecanja smo koristili jer se kod tog modela (vidi Modeli i metode) radi o sakupljanju likvora (a ne perfuzata), što nam omogućava da u sakupljenim uzorcima određujemo točnu koncentraciju metabolita i eventualne fine promjene njihove koncentracije. Da smo vršili istraživanje pomoću direktne ventrikulo-cisternalne perfuzije, sakupljeni uzorci bi bili značajno razrijeđeni perfuzatom (umjetnim likvorom) i određivanje željenih metabolita i njihovih promjena u koncentraciji bi bilo onemogućeno. Kao što smo i očekivali, ulazak volumena tekućine/vode u likvorski sustav na modelu spontanog istjecanja likvora nakon i.p. aplikacije destilirane vode (Slike 18, 19 i 20) je rezultirao smanjenjem koncentracije 5-HIAA (Slike 26, 27, 28 i 29) i HVA (Slike 30, 31, 32) u sakupljenim uzorcima likvora. Način na koji razrijeđenje metabolita korespondira s ulaskom vode/likvora u likvorski sustav pruža mogućnost da bi metaboliti neurotransmitera mogli poslužiti kao biološki pokazatelji takvog ulaska vode/likvora u likvorski sustav.

Promatramo li dobivene rezultate za vrijeme čitavog trajanja eksperimenta, vidimo da se koncentracije 5-HIAA i HVA u cerebrospinalnom likvoru tijekom spontanog istjecanja likvora ponašaju gotovo identično (Slike 26, 27, 28, 29, 30, 31 i 32). Pri tome želimo napomenuti da iako je smanjenje za 5-HIAA iznosilo 34% (Slika 29), zbog manjeg broja eksperimenata i varijabilnosti rezultata smanjenje nije bilo statistički značajno. Opažamo da metaboliti za vrijeme eksperimenta prvo s kontrolnih vrijednosti (vrijeme 0) rastu u toku dva sata sve do trenutka aplikacije destilirane vode i to povećanje je već nakon 90 minuta bilo statistički značajno (Slike 27 i 31). Nakon aplikacije destilirane vode koncentracije padnu u sljedećih pola sata, a nakon sat vremena se vrate na vrijednosti koncentracije postignute neposredno prije aplikacije destilirane vode i ostaju uravnotežene na toj višoj razini za čitavo vrijeme trajanja pokusa (do 270 min; Slike 26, 30, 27 i 31). Dakle, koncentracije 5-HIAA i HVA u cerebrospinalnom likvoru tijekom spontanog istjecanja likvora kod negativnog tlaka (-10 cm H<sub>2</sub>O) su se značajno povećale

nakon 90 minuta u odnosu na vrijednosti prije početka istjecanja i potom su ostale konstantne do kraja eksperimenta kroz 5 sati, osim što su se smanjile neposredno nakon intraperitonealnog davanja destilirane vode.

Takvo ponašanje ovih metabolita tijekom eksperimenta moglo bi se objasniti na sljedeći način. Naime, poznato je da postoji koncentracijski gradijent za ove metabolite u likvorskim prostorima, iako sam razlog postojanja gradijenta nije u potpunosti razjašnjen. Najveća koncentracija je u moždanim komorama, manja u kranijalnom subarahnoidnom prostoru, a najmanja u lumbalnom subarahnoidnom prostoru [8, 9]. Drugim riječima, opaženo povećanje koncentracije tih metabolita u likvoru dobivenom iz cisterne magne tijekom spontanog istjecanja, moglo bi biti kao posljedica postojanja koncentracijskog gradijenta između cisterne magne i drugih likvorskih prostora, uključujući i moždane komore. Naime, istjecanje likvora pod negativnim tlakom uzrokuje dotok likvora iz moždanih komora s većom koncentracijom 5-HIAA i HVA, što povećava koncentraciju likvora u cisterni magni (0 vrijeme; Slike 26, 27, 30 i 31), odnosno u sakupljenom uzorku likvora. Međutim takvo objašnjenje nije u skladu s klasičnim konceptom vezanim uz cirkulaciju likvora.

Pravo je pitanje kako se u skladu s klasičnim konceptom uopće može dobiti takav porast koncentracije metabolita, ukoliko u likvorskom sustavu postoji stalna cirkulacija likvora koja već teče (prije uspostavljenog spontanog istjecanja) jednosmjerno od mjesta stvaranja (koroidni pleksusi; moždane komore) preko cisterne magne na površinu mozga do mjesta apsorpcije (vili arahnoidales). Treba naglasiti da je u našim eksperimentima uspostavljen protok (cirkulacija; Slike 18 i 19) sukladan izračunanim vrijednostima cirkulacije kod klasične hipoteze (14-21  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) [75], što znači da je eksperimentalno izazvana cirkulacija (spontano istjecanje) likvora upravo jednaka „zamišljenoj cirkulaciji“. Dakle, ukoliko stvarno postoji cirkulacija likvora unutar likvorskog sustava koja teče od moždanih komora prema cisterni magni, povećana koncentracija metabolita iz moždanih komora bi bila nošena prema cisterni magni čitavo vrijeme, i nema razloga da eksperimentalno izazvano istjecanje likvora istom brzinom kao i zamišljena cirkulacija izazove značajan porast koncentracije 5-HIAA i HVA u sakupljenim uzorcima (Slike 26, 27, 30 i 31). Ovako dobiven porast koncentracije metabolita nam samo govori da u fiziološkim uvjetima nema cirkulacije likvora što dodatno potvrđuje novu hipotezu o

hidrodinamici/fiziologiji likvora [75]. Daljnji doprinos toj tvrdnji je ponašanje koncentracije metabolita nakon i.p. aplikacije hipoosmolarne otopine. Naime, čim prestane učinak osmotskih sila, koncentracija metabolita (Slike 26, 27, 30 i 31) se vrati na značajno više vrijednosti od kontrolnih (0 vrijeme), koje su postignute prije aplikacije hipoosmolarne otopine (90 min) i ostanu ujednačeno povišene za čitavo vrijeme trajanja pokusa (do 270 min). Dakle, kad stvarno postoji cirkulacija (eksperimentalno izazvana ujednačenim spontanom istjecanjem) onda likvor iz moždanih komora (s povećanom koncentracijom metabolita) stvarno dotiče u cisternu magnu donoseći (zbog koncentracijskog gradijenta) veću koncentraciju metabolita nego što je u cisterni magni i na taj način podiže njihovu koncentraciju u sakupljenim uzorcima likvora. Nakon što protok (cirkulacija) traje određeno vrijeme (90 min; Slike 26, 27, 30 i 31) dolazi trajno do ujednačeno povišene koncentracije 5-HIAA i HVA u uzorcima sakupljenog likvora. Drugim riječima, ukoliko u fiziološkom stanju nema cirkulacije likvora u tom slučaju je moguće postojanje koncentracijskog gradijenta u likvoru (većeg u komorama, manjeg u cisterni magni), što će nakon uspostave eksperimentalno izazvane cirkulacije (spontanom istjecanjem likvora iz cisterne magne) uzrokovati postupni porast koncentracije metabolita u sakupljenim uzorcima likvora, koji će zbog cirkulacije postati ujednačen (90 min; Slike 26, 27, 30 i 31) i značajno viši od razine koja je fiziološki prisutna u cisterni magni.

Dakle, osim što smo pokazali da bi metaboliti mogli poslužiti kao biološki pokazatelj ulaska vode/likvora u likvorski sustav, također smo ponovno potvrdili opažanja koja se ne mogu objasniti u skladu s klasičnom hipotezom o fiziologiji/dinamici cerebrospinalnog likvora [7].

#### **5.4. NOVIJE SHVAĆANJE FIZIOLOGIJE CEREBROSPINALNOG LIKVORA**

Naši rezultati su potkrijepili od prije opažene činjenice koje govore protiv klasične hipoteze o hidrodinamici/fiziologiji likvora (vidi Uvod), prema kojoj likvor aktivno nastaje unutar moždanih komora i jednosmjerno cirkulira duž čitavog likvorskog sustava od mjesta stvaranja (koroidni pleksusi) do mjesta apsorpcije (duralni sinusi). Ponovno je potvrđeno da aktivno stvaranje likvora u likvorskom sustavu ne postoji, da

regulacija/održavanje ukupnog volumena likvora nije posljedica s jedne strane aktivnog stvaranja likvora i s druge strane pasivne apsorpcije likvora. Pokazano je da se ukupni volumen likvora održava unutar čitavog likvorskog sustava, kako unutar moždanih komora, tako i unutar subarahnoidnih prostora, i da u tim procesima vrlo važnu ulogu igraju osmotske sile.

Ovi rezultati su u suprotnosti s općeprihvaćenom hipotezom o sekreciji, cirkulaciji i apsorpciji likvora, a u skladu su s novoiznesenom hipotezom prema kojoj bi volumen likvora bio reguliran hidrostatskim i osmotskim silama kao što je reguliran volumen ekstracelularne tekućine u ostalim organima [75]. Za te izmjene su najvažnija zbivanja na razini kapilara sukladno Starlingovoj hipotezi kapilarne izmjene tekućina, a ne pojedinačna mjesta za koja se vjeruje da likvor aktivno nastaje (koroidni pleksusi) ili se apsorpira (vili arahnoidales) [77]. Likvorski sustav predstavlja stalni kompleksni dinamički sustav u kojem (pato)fiziološko stanje ovisi o interakciji likvorskog sustava s (pato)fiziološkim promjenama koje se zbivaju unutar stanica živčanog tkiva i međustaničnog prostora, kao i o stalnoj (pato)fiziološkoj izmjeni tvari između krvi, središnjeg živčanog sustava i likvora. Drugim riječima likvor nastaje i nestaje unutar čitavog likvorskog sustava ovisno o odnosu osmotskih i hidrostatskih sila koje vladaju između likvora i priležćih struktura. Iako prema novoj hipotezi likvor ne nastaje, zatim teče i apsorpira se poput spore rijeke, likvor se uistinu neprestano giba, ali to gibanje nije jednosmjerno već pulzatorno, kranijo-kaudalno, a izazvano sistoličko-dijastoličkim gibanjem krvi kroz krvne žile središnjeg živčanog sustava.

Temeljem rečenog, trebalo bi napustiti razmišljanje u okvirima klasične hipoteze o dinamici/fiziologiji likvora i početi razmišljati u sklopu s novopredloženom hipotezom koja je iznesena u skladu s eksperimentalnim rezultatima. Također bi trebalo pristupiti na novi način i patofiziološkim mehanizmima koji rezultiraju patološkim stanjima vezanim uz likvorski sustav, kao npr. hidrocefalus, hidromijelija, povišeni likvorski tlak, periventrikularni edem [76]. Naime, trebalo bi istražiti kakva i kolika je uloga/uzrok u nastanku tih patoloških stanja u navedenim patofiziološkim čimbenicima (osmotske i hidrostatske sile, oštećena kapilarna funkcija, odstranjivanje tvari itd.), a ne ih promatrati kao posljedicu poremećene sekrecije, cirkulacije i apsorpcije likvora.



## 6. ZAKLJUČCI

Na kraju na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata na mačkama možemo zaključiti sljedeće:

1) Kod modela direktne ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije s izoosmolarnim perfuzatom pokazano je da nema sekrecije i apsorpcije likvora, tj. koliko se perfuzata infundira, toliko se perfuzata i sakupi. Isti je učinak opažen bilo da se radi samo o moždanim komorama, bilo da se radi o čitavom likvorskom sustavu (moždane komore i subarahnoidni prostor zajedno).

2) Kod modela direktne perfuzije likvorskog prostora kao i kod modela ujednačenog spontanog istjecanja likvora jasno je pokazano da održavanje/regulacija ukupnog volumena likvora ovisi o osmotskim silama koje vladaju u likvorskom sustavu. Ukoliko je osmotski tlak u likvorskom sustavu viši od ostalog dijela središnjeg živčanog sustava, volumen likvora će se povećati, dok će se u slučaju niže osmotske sile u likvorskom sustavu, volumen likvora smanjiti.

3) Eksperimentalno je pokazano da osmotski uzrokovano povećanje volumena likvora dovodi do povećanja likvorskog tlaka, tj. da su osmotske sile, volumen likvora i likvorski tlak međusobno povezani. Ti se pato/fiziološki odnosi nalaze i u podlozi kod osmotske terapije intrakranijske hipertenzije kod koje zbog, u ovom slučaju smanjenja volumena likvora, posljedično dolazi i do smanjenja likvorskog tlaka.

4) Pomoću modela direktne perfuzije je pokazano da ukoliko je veća površina likvorskog sustava izložena povećanom osmotskom djelovanju, to rezultira većim volumenom sakupljenog perfuzata (veća površina, veći volumen). Rezultate u kojima bi volumen likvora ovisio o površini likvorskog sustava, nije moguće objasniti u skladu sa sekrecijom likvora koja se odvija unutar moždanih komora.

Sve navedeno govori kako unutar likvorskog sustava ne postoji sekrecija, cirkulacija i apsorpcija likvora i kako samim tim stalni volumen likvora ne ovisi o ravnoteži između secerniranog likvora i apsorbiranog likvora već je regulacija volumena likvora, a time i intrakranijskog tlaka, pod kontrolom osmotskih i hidrostatskih sila što je u skladu s predloženom novom hipotezom o dinamici/fiziologiji cerebrospinalnog likvora.

## 7. SAŽETAK

U konzervativnom liječenju povišenog intrakranijskog tlaka već dugo se koriste hiperosmolarne otopine (najviše manitol) koje se daju intravenski, ali točan mehanizam njihovog djelovanja na snižavanja intrakranijskog tlaka nije u potpunosti razjašnjen. Stoga je u ovom radu eksperimentalno, na mačkama proučavan utjecaj promjene osmolarnosti krvi i cerebrospinalnog likvora na volumen cerebrospinalnog likvora, te povezanost tih promjena volumena likvora s intrakranijskim tlakom. U tu svrhu korišteni su modeli direktne ventrikulo-akveduktalne i ventrikulo-cisternalne perfuzije s izoosmolarnom i hiperosmolarnom otopinom umjetnog likvora, spontanog istjecanja likvora iz cisterne magne i mjerenja tlaka likvora u lateralnoj moždanoj komori. Promjene osmolarnosti krvi vršene su intravenskim davanjem 20% manitola, te intraperitonealnim davanjem destilirane vode. Dobiveni rezultati pokazali su da promjene osmotskih sila u likvorskom sustavu dovode do promjena ukupnog volumena cerebrospinalnog likvora i da su promjene tlaka likvora (intrakranijskog tlaka) direktno povezane s tim promjenama volumena likvora. Veličina promjene volumena likvora ovisi o površini likvorskog sustava koja je izložena promjenama osmotskih sila. Također je pokazano da pri fiziološkom tlaku likvora, bez promjena osmotskih sila nema „čistog“ stvaranja niti apsorpcije likvora. Svi dobiveni rezultati nisu u skladu s klasičnom hipotezom o sekreciji, cirkulaciji i apsorpciji likvora, ali su u skladu s predloženom novom hipotezom o dinamici cerebrospinalnog likvora.

## **8. SUMMERY**

### **EFFECT OF CHANGES IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OSMOLARITY ON CEREBROSPINAL FLUID VOLUME AND PRESSURE**

**Jurica Maraković, 2013**

Hyperosmolar solutions (mostly mannitol) have long been used in clinical practice to reduce intracranial pressure, but the exact mechanism by which this effect occurs is still unclear. So, in this study we wanted to investigate experimentally, on cats, the effect of changes in serum and CSF osmolality on CSF volume and how this changes of CSF volume influence on intracranial pressure. For this purpose we used experimental models of direct ventriculo-aqueductal and ventriculo-cisternal perfusion with both isoosmolar and hyperosmolar aCSF, the free drainage of CSF from a cannula put into the cisterna magna and the measuring of CSF pressure by the cannula put into the lateral ventricle of the brain. Serum osmolality was changed by intravenous application of 20% mannitol or intraperitoneal administration of distilled water. Obtained result showed that the changes of osmotic forces in CSF compartments leads to changes of total CSF volume and that changes of CSF pressure are directly connected with this changes of CSF volume. The extent of CSF volume changes depends on the size of contact area of CSF system that was exposed to the changes of osmotic forces. It was also shown that with physiological intracranial pressure, without changes of osmotic forces, there was no “net” CSF formation or absorption. All obtained results contradict the classic hypothesis of secretion, circulation and absorption of CSF, but support proposed new hypothesis of CSF hydrodynamics.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Brown, P.D., et al., *Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production*. Neuroscience, 2004. 129(4): p. 957-70.
2. Brodbelt, A. and M. Stoodley, *CSF pathways: a review*. Br J Neurosurg, 2007. 21(5): p. 510-20.
3. Cushing, H., *Studies on the Cerebro-Spinal Fluid : I. Introduction*. J Med Res, 1914. 31(1): p. 1-19.
4. Dandy, W.E., *Experimental Hydrocephalus*. Ann Surg, 1919. 70(2): p. 129-42.
5. O'Connell, J.E., *Cerebrospinal fluid mechanics*. Proc R Soc Med, 1970. 63(5): p. 507-18.
6. Greenberg, M.S., *Handbook of neurosurgery*. 1997.
7. Oreskovic, D., *Physiological Characteristics of Some Monoamine Metabolites in Cat Cerebrospinal Fluid*. Croat Chem Acta, 1995. 68: p. 511-520.
8. Sjostrom, R., J. Ekstedt, and E. Anggard, *Concentration gradients of monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1975. 38(7): p. 666-8.
9. Garelis, E. and T.L. Sourkes, *Sites of origin in the central nervous system of monoamine metabolites measured in human cerebrospinal fluid*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1973. 36(4): p. 625-9.
10. Leger, L., et al., *Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat*. J Comp Neurol, 2001. 433(2): p. 157-82.
11. Klarica, M., *Fiziologija cerebrospinalnog likvora i intrakranijski tlak*, in *Temelji neuroznanosti.*, Judas, M and Kostovic, I, Editor. 1997, MD: Zagreb. p. 334-342.
12. Johanson, C.E., et al., *Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease*. Cerebrospinal Fluid Res, 2008. 5: p. 10.
13. Davson, H., *Physiology of the Cerebrospinal Fluid*. 1967, London: Churchill.
14. McComb, J.G., *Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption*. J Neurosurg, 1983. 59(3): p. 369-83.

15. Davson, H., *The physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid* . 1987, Edimburgh: Churchill Livingston.
16. Pollay, M., et al., *Choroid plexus Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase and cerebrospinal fluid formation*. *Neurosurgery*, 1985. 17(5): p. 768-72.
17. Segal, M.B. and M. Pollay, *The secretion of cerebrospinal fluid*. *Exp Eye Res*, 1977. 25 Suppl: p. 127-48.
18. Heisey, S.R., D. Held, and J.R. Pappenheimer, *Bulk flow and diffusion in the cerebrospinal fluid system of the goat*. *Am J Physiol*, 1962. 203: p. 775-81.
19. Rubin, R.C., et al., *The production of cerebrospinal fluid in man and its modification by acetazolamide*. *J Neurosurg*, 1966. 25(4): p. 430-6.
20. Cutler, R.W., et al., *Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man*. *Brain*, 1968. 91(4): p. 707-20.
21. Sklar, F.H. and D.M. Long, *Recirculatory spinal subarachnoid perfusions in dogs: a method for determining CSF dynamics under non-steady state conditions*. *Neurosurgery*, 1977. 1(1): p. 48-56.
22. Sklar, F.H., et al., *Effects of pressure on cerebrospinal fluid formation: nonsteady-state measurements in dogs*. *Am J Physiol*, 1980. 239(3): p. R277-84.
23. Welch, K., *Secretion of Cerebrospinal Fluid by Choroid Plexus of the Rabbit*. *Am J Physiol*, 1963. 205: p. 617-24.
24. Ames, A., 3rd, K. Higashi, and F.B. Nesbett, *Effects of Pco<sub>2</sub> acetazolamide and ouabain on volume and composition of choroid-plexus fluid*. *J Physiol*, 1965. 181(3): p. 516-24.
25. Carrion, E., et al., *Use of acetazolamide to decrease cerebrospinal fluid production in chronically ventilated patients with ventriculopleural shunts*. *Arch Dis Child*, 2001. 84(1): p. 68-71.
26. Pollay, M., *Formation of cerebrospinal fluid. Relation of studies of isolated choroid plexus to the standing gradient hypothesis*. *J Neurosurg*, 1975. 42(6): p. 665-73.
27. Wald, A., G.M. Hochwald, and C. Malhan, *The effects of ventricular fluid osmolality on bulk flow of nascent fluid into the cerebral ventricles of cats*. *Exp Brain Res*, 1976. 25(2): p. 157-67.

28. Bering, E.A., Jr., *Choroid plexus and arterial pulsation of cerebrospinal fluid; demonstration of the choroid plexuses as a cerebrospinal fluid pump*. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1955. 73(2): p. 165-72.
29. Weed, L.H., *Forces concerned in the absorption of the cerebrospinal fluid*. Am. J. Physiol., 1935. 114: p. 40-45.
30. Weed, L.H., *Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. III : The pathways of escape from the Subarachnoid Spaces with particular reference to the Arachnoid Villi*. J Med Res, 1914. 31(1): p. 51-91.
31. Johnston, M., et al., *Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species*. Cerebrospinal Fluid Res, 2004. 1(1): p. 2.
32. Koh, L., et al., *Development of cerebrospinal fluid absorption sites in the pig and rat: connections between the subarachnoid space and lymphatic vessels in the olfactory turbinates*. Anat Embryol (Berl), 2006. 211(4): p. 335-44.
33. Dodge, P.R. and M.A. Fishman, *The choroid plexus--two-way traffic?* N Engl J Med, 1970. 283(6): p. 316-7.
34. Thomas, W.S., *Experimental Hydrocephalus*. J Exp Med, 1914. 19(1): p. 106-20.
35. Dandy, W.E., *Extirpation of the Choroid Plexus of the Lateral Ventricles in Communicating Hydrocephalus*. Ann Surg, 1918. 68(6): p. 569-79.
36. Dandy, W.E., *The Operative Treatment of Communicating Hydrocephalus*. Ann Surg, 1938. 108(2): p. 194-202.
37. Anei, R., et al., *Hydrocephalus due to diffuse villous hyperplasia of the choroid plexus*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2011. 51(6): p. 437-41.
38. Lorenzo, A.V., L.K. Page, and G.V. Watters, *Relationship between cerebrospinal fluid formation, absorption and pressure in human hydrocephalus*. Brain, 1970. 93(4): p. 679-92.
39. Oreskovic, D., et al., *Evaluation of ventriculo-cisternal perfusion model as a method to study cerebrospinal fluid formation*. Croat Med J, 2003. 44(2): p. 161-4.

40. Marakovic, J., et al., *Potential error in ventriculocisternal perfusion method for determination of cerebrospinal fluid formation rate in cats*. Coll Antropol, 2011. 35 Suppl 1: p. 73-7.
41. Oreskovic, D., et al., *Fluid perfusion as a method of cerebrospinal fluid formation rate--critical appraisal*. Coll Antropol, 2008. 32 Suppl 1: p. 133-7.
42. Curran, R.E., et al., *Cerebrospinal fluid production rates determined by simultaneous albumin and inulin perfusion*. Exp Neurol, 1970. 29(3): p. 546-53.
43. Vlastic, A., M. Klarica, and M. Bulat, *Dynamics of distribution of 3H-inulin between the cerebrospinal fluid compartments*. Brain Res, 2009. 1248: p. 127-35.
44. Martins, A.N., N. Newby, and T.F. Doyle, *Sources of error in measuring cerebrospinal fluid formation by ventriculocisternal perfusion*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1977. 40(7): p. 645-50.
45. Oreskovic, D., M. Klarica, and M. Vukic, *The formation and circulation of cerebrospinal fluid inside the cat brain ventricles: a fact or an illusion?* Neurosci Lett, 2002. 327(2): p. 103-6.
46. Flexner, L.B. and H. Winters, *The rate of formation of cerebrospinal fluid in etherized cats*. Am. J. Physiol., 1932. 101: p. 697-710.
47. Oreskovic, D., M. Klarica, and M. Vukic, *Does the secretion and circulation of the cerebrospinal fluid really exist?* Med Hypotheses, 2001. 56(5): p. 622-4.
48. Oreskovic, D., et al., *The investigation of cerebrospinal fluid formation by ventriculo-aqueductal perfusion method in cats*. Acta Neurochir. (Suppl), 2005. 95: p. 433-436.
49. Potts, D.G. and R.M. Bergland, *Roentgenologic studies of cerebrospinal fluid formation in the dog*. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1969. 105(4): p. 756-62.
50. Pollay, M., et al., *Extracorporeal perfusion of choroid plexus*. J Appl Physiol, 1972. 32(5): p. 612-7.
51. Bradley, W.G., Jr., K.E. Kortman, and B. Burgoyne, *Flowing cerebrospinal fluid in normal and hydrocephalic states: appearance on MR images*. Radiology, 1986. 159(3): p. 611-6.

52. de Rougemont, J. et al., *Fluid formed by choroid plexus; a technique for its collection and a comparison of its electrolyte composition with serum and cisternal fluids.* J Neurophysiol, 1960. 23: p. 485-95.
53. Miner, L.C. and D.J. Reed, *Composition of fluid obtained from choroid plexus tissue isolated in a chamber in situ.* J Physiol, 1972. 227(1): p. 127-39.
54. Foley, F., *Resorption of cerebrospinal fluid by the choroid plexuses under the influence of intravenous injection of hypertonic salt solution.* Arch, Neurol. Psychiatry, 1921. 5(744-745).
55. Hassin, G.B., *Notes on the nature and origin of the cerebrospinal fluid.* J. Nerv. Ment. Di., 1924. 59: p. 113-121.
56. Bering, E.A., Jr., *Water exchange of central nervous system and cerebrospinal fluid.* J Neurosurg, 1952. 9(3): p. 275-87.
57. Bering, E.A., Jr., *Water exchange in the brain and cerebrospinal fluid; studies on the intraventricular instillation of deuterium (heavy water).* J Neurosurg, 1954. 11(3): p. 234-42.
58. Sweet, W.H., et al., *The formation, flow and absorption of cerebrospinal fluid; newer concepts based on studies with isotopes.* Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 1955. 34: p. 101-59.
59. Sato, O. and E.A. Bering, *Extra-ventricular formation of cerebrospinal fluid.* No To Shinkei, 1967. 19(9): p. 883-5.
60. Sato, O., et al., *Extraventricular origin of the cerebrospinal fluid: formation rate quantitatively measured in the spinal subarachnoid space of dogs.* J Neurosurg, 1972. 36(3): p. 276-82.
61. Sato, O., et al., *Bulk flow in the cerebrospinal fluid system of the dog.* Acta Neurol Scand, 1975. 51(1): p. 1-11.
62. Milhorat, T.H., *Choroid plexus and cerebrospinal fluid production.* Science, 1969. 166(3912): p. 1514-6.
63. Milhorat, T.H., et al., *Normal rate of cerebrospinal fluid formation five years after bilateral choroid plectomy. Case report.* J Neurosurg, 1976. 44(6): p. 735-9.



64. Milhorat, T.H., *The third circulation revisited*. J Neurosurg, 1975. 42(6): p. 628-45.
65. Pople, I.K. and D. Ettles, *The role of endoscopic choroid plexus coagulation in the management of hydrocephalus*. Neurosurgery, 1995. 36(4): p. 698-701; discussion 701-2.
66. Enchev, Y. and S. Oi, *Historical trends of neuroendoscopic surgical techniques in the treatment of hydrocephalus*. Neurosurg Rev, 2008. 31(3): p. 249-62.
67. Holtzer, G.J. and S.A. de Lange, *Shunt-independent arrest of hydrocephalus*. J Neurosurg, 1973. 39(6): p. 698-701.
68. Yoshii, Y., et al., *Slow reduction in ventricular size after removal of choroid plexus papilloma--case report*. Neurol Med Chir (Tokyo), 1988. 28(6): p. 604-9.
69. Sahar, A., M. Feinsod, and A.J. Beller, *Choroid plexus papilloma: hydrocephalus and cerebrospinal fluid dynamics*. Surg Neurol, 1980. 13(6): p. 476-8.
70. Oreskovic, D., P.S. Whitton, and V. Lupret, *Effect of intracranial pressure on cerebrospinal fluid formation in isolated brain ventricles*. Neuroscience, 1991. 41(2-3): p. 773-7.
71. Klarica, M., et al., *New experimental model of acute aqueductal blockage in cats: effects on cerebrospinal fluid pressure and the size of brain ventricles*. Neuroscience, 2009. 158(4): p. 1397-405.
72. Zmajevic, M., et al., *Elimination of phenolsulfonphthalein from the cerebrospinal fluid via capillaries in central nervous system in cats by active transport*. Neurosci Lett, 2002. 321(1-2): p. 123-5.
73. Bulat, M., et al., *Transventricular and transpial absorption of cerebrospinal fluid into cerebral microvessels*. Coll Antropol, 2008. 32 Suppl 1: p. 43-50.
74. Bulat, M., *Dynamics and statics of the cerebrospinal fluid: the classic and a new hypothesis*, in *Intracranial Pressure VIII*, v.E.J. Avezaat C, Maas A, Tans J, Editor. 1993, Springer-Verlag: Berlin. p. 731-734.
75. Oreskovic, D. and M. Klarica, *The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations*. Brain Res Rev, 2010. 64(2): p. 241-62.

76. Oreskovic, D. and M. Klarica, *Development of hydrocephalus and classical hypothesis of cerebrospinal fluid hydrodynamics: facts and illusions*. Prog Neurobiol, 2011. 94(3): p. 238-58.
77. Bulat, M. and M. Klarica, *Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid*. Brain Res Rev, 2011. 65(2): p. 99-112.
78. Bullock, R., et al., *Guidelines for the management of severe head injury*. Brain Trauma Foundation. Eur J Emerg Med, 1996. 3(2): p. 109-27.
79. Knapp, J.M., *Hyperosmolar therapy in the treatment of severe head injury in children: mannitol and hypertonic saline*. AACN Clin Issues, 2005. 16(2): p. 199-211.
80. Weed, L.H. and P.S. McKibben, *Experimental alteration of brain bulk*. Am J Physiol 1919. 48: p. 531-558.
81. Foley, F.E. and T.J. Putnam, *The effect of salt ingestion on cerebro-spinal fluid pressure and brain volume*. Am. J. Physiol., 1920. 53: p. 464-476.
82. DiMattio, J., et al., *Effects of changes in serum osmolarity on bulk flow of fluid into cerebral ventricles and on brain water content*. Pflugers Arch, 1975. 359(3): p. 253-64.
83. Hochwald, G.M., A. Wald, and C. Malhan, *The sink action of cerebrospinal fluid volume flow. Effect on brain water content*. Arch Neurol, 1976. 33(5): p. 339-44.
84. Nau, R., *Osmotherapy for elevated intracranial pressure: a critical reappraisal*. Clin Pharmacokinet, 2000. 38(1): p. 23-40.
85. Pollay, M., et al., *Effect of mannitol and furosemide on blood-brain osmotic gradient and intracranial pressure*. J Neurosurg, 1983. 59(6): p. 945-50.
86. Thenuwara, K., M.M. Todd, and J.E. Brian, Jr., *Effect of mannitol and furosemide on plasma osmolality and brain water*. Anesthesiology, 2002. 96(2): p. 416-21.
87. Odland, R.M. and R.L. Sutton, *Hyperosmosis of cerebral injury*. Neurol Res, 1999. 21(5): p. 500-8.
88. Verbalis, J.G., *Brain volume regulation in response to changes in osmolality*. Neuroscience, 2010. 168(4): p. 862-70.
89. Hartwell, R.C. and L.N. Sutton, *Mannitol, intracranial pressure, and vasogenic edema*. Neurosurgery, 1993. 32(3): p. 444-50; discussion 450.

90. Albright, A.L., R.E. Latchaw, and A.G. Robinson, *Intracranial and systemic effects of osmotic and oncotic therapy in experimental cerebral edema*. J Neurosurg, 1984. 60(3): p. 481-9.
91. Reed, D.J. and D.M. Woodbury, *Effect of hypertonic urea on cerebrospinal fluid pressure and brain volume*. J Physiol, 1962. 164: p. 252-64.
92. Merlis, J.K., *The effect of changes in the calcium content of the cerebrospinal fluid on spinal reflex activity in the dog*. Am J Physiol 1940. 131: p. 64-72.
93. Kawamata, T., et al., *Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion*. Neurosurg Focus, 2007. 22(5): p. E5.
94. Hossman, K.A., *The pathophysiology of ischemic brain swelling*, in *Brain Edema*, K.I. Inaba Y, Spatz M, Editor. 1985, Springer-Verlag: Berlin. p. 367-384.
95. Gardner, W.J., *Traumatic Subdural Hematoma, with Particular Reference to the Latent Interval*. Arch Neurol Psychiatr 1932. 27: p. 847-858.
96. Zollinger, R. and R.E. Gross, *Traumatic subdural hematoma. An explanation of the late onset of pressure symptoms*. JAMA, 1934. 103: p. 245-249.
97. Weir, B., *The osmolality of subdural hematoma fluid*. J Neurosurg, 1971. 34(4): p. 528-33.
98. Weir, B., *Oncotic pressure of subdural fluids*. J Neurosurg, 1980. 53(4): p. 512-5.
99. Sajanti, J. and K. Majamaa, *High concentrations of procollagen propeptides in chronic subdural haematoma and effusion*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. 74(4): p. 522-4.
100. Santarius, T., et al., *Working toward rational and evidence-based treatment of chronic subdural hematoma*. Clin Neurosurg, 2010. 57: p. 112-22.
101. Law, R.O., *Regulation of mammalian brain cell volume*. J Exp Zool, 1994. 268(2): p. 90-6.
102. Donato, T., et al., *Effect of mannitol on cerebrospinal fluid dynamics and brain tissue edema*. Anesth Analg, 1994. 78(1): p. 58-66.
103. Melton, J.E. and E.E. Nattie, *Brain and CSF water and ions during dilutional and isosmotic hyponatremia in the rat*. Am J Physiol, 1983. 244(5): p. R724-32.
104. *Guidelines for the management of severe head injury*. Brain Trauma Foundation. J Neurotrauma, 2000. 17(6-7): p. 457-62.

105. Asgeirsson, B., P.O. Grande, and C.H. Nordstrom, *A new therapy of post-trauma brain oedema based on haemodynamic principles for brain volume regulation*. Intensive Care Med, 1994. 20(4): p. 260-7.
106. Nordstrom, C.H., *Physiological and biochemical principles underlying volume-targeted therapy--the "Lund concept"*. Neurocrit Care, 2005. 2(1): p. 83-95.
107. Grande, P.O., *The "Lund Concept" for the treatment of severe head trauma--physiological principles and clinical application*. Intensive Care Med, 2006. 32(10): p. 1475-84.
108. Eker, C., et al., *Improved outcome after severe head injury with a new therapy based on principles for brain volume regulation and preserved microcirculation*. Crit Care Med, 1998. 26(11): p. 1881-6.

## ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1. studenog 1972. u Sisku, gdje sam završio osnovnu i srednju školu (matematičko-informatički smjer), te glazbenu školu (klavir).

Godine 1991. upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te sam diplomirao 1997. godine s prosjekom ocjena 4,92. Tijekom studija više godina bio sam demonstrator na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Katedri za patofiziologiju, te Katedri za histologiju i embriologiju. Također sam sudjelovao u znanstveno-istraživačkom radu iz područja imunologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Filipa Čule, te sam dobio Rektorsku nagradu za najbolji studentski rad u 1997. godini.

Godine 1998., nakon provedenog jednogodišnjeg pripravničkog staža, položio sam državni ispit, a 1999. započeo sam specijalizaciju iz neurokirurgije za Kliničku bolnicu Dubrava u Zagrebu.

Godine 2000. boravio sam mjesec dana na stručnom usavršavanju u Klinici za neurokirurgiju Sveučilišne bolnice Eppendorf u Hamburgu, SR Njemačka, kod Dr. D. K. Ludecke. Godine 2004. završio sam jednodnevni "Salzburg-Weill Cornell" seminar iz neurokirurgije u Salzburgu, pod vodstvom prof. dr. Philip Stieg sa Weill Medical College, New Yorka, SAD, a godine 2009. i 2012. drugi i treći jednodnevni "Salzburg-Weill Cornell" seminar pod vodstvom prof. dr. Roger Hartl, također sa Weill Medical College.

Godine 2000. upisao sam doktorski poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji sam završio 2004. godine položivši sve ispite s prosjekom ocjena 4,9. Od 2001. godine sudjelujem u znanstvenom istraživanju hidrodinamike likvora na Institutu "Ruđer Bošković" pod mentorstvom dr. sc. Darka Oreškovića, a jedan klinički dio tog istraživanja izvodi se na Odjelu za neurokirurgiju Kliničke bolnice Dubrava.

Godine 2006. završio sam specijalizaciju iz neurokirurgije i položio specijalistički ispit u Klinici za neurokirurgiju KBC Zagreb. Od tada radim na Odjelu za neurokirurgiju Kliničke bolnice Dubrava.

Član sam Hrvatskog neurokirurškog društva, Hrvatskog društva za neuroznanost, EANS-a, WFNS-a, te ISHCSF-a.

Autor sam i koautor ukupno 8 znanstvenih i stručnih radova objavljenih u domaćim i međunarodnim indeksiranim časopisima, od kojih je 6 objavljeno u časopisima indeksiranim u CC-u, te redovito aktivno sudjelujem na domaćim i inozemnim kongresima i drugim stručnim skupovima iz područja neurokirurgije i neuroznanosti.

Aktivno se služim engleskim jezikom, a pasivno i njemačkim jezikom.

Oženjen sam i otac dvije kćeri.