Utjecaj alfa2-adrenoreceptora na renalnu simpatičku aktivnost tijekom izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji u štakora

Kraljević, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:878734

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Kraljević

UTJECAJ ALFA2-ADRENORECEPTORA NA RENALNU SIMPATIČKU AKTIVNOST TIJEKOM IZLAGANJA AKUTNOJ PONAVLJANOJ HIPOKSIJI U ŠTAKORA

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

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

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Kraljević

UTJECAJ ALFA2-ADRENORECEPTORA NA RENALNU SIMPATIČKU AKTIVNOST TIJEKOM IZLAGANJA AKUTNOJ PONAVLJANOJ HIPOKSIJI U ŠTAKORA

Diplomski rad

Akademska godina:

2017./2018.

Mentor:

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

Split, srpanj 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1. Autonomni živčani sustav 2

1.2. Simpatički živčani sustav 2

1.3. Adrenergični receptori 4

1.3.1. Uloga alfa1-adrenoreceptora 6

1.3.2. Uloga alfa2-adrenoreceptora 7

1.4. Uloga dopaminskih receptora 8

1.5. Uloga serotoninskih receptora 8

1.6. Antagonisti alfa2-adrenoreceptora 9

1.7. Johimbin 10

1.8. Hipoksija 11

1.9. Plexus renalis 12

2. CILJ ISTRAŽIVANJA **15**

3. MATERIJAL I METODE **17**

3.1. Pokusne životinje 18

3.2. Mjesto istraživanja 18

3.3. Organizacija istraživanja 18

3.4. Opis istraživanja 18

3.5. Metode prikupljanja i obrade podataka 20

3.5.1. Statistička obrada podataka 20

3.5.2. Primarna mjera ishoda 20

3.5.3. Sekundarna mjera ishoda 21

4. REZULTATI **22**

5. RASPRAVA **26**

6. ZAKLJUČAK **30**

7. POPIS CITIRANE LITERATURE **32**

8. SAŽETAK **37**

9. SUMMARY **39**

10. ŽIVOTOPIS **41**

POPIS OZNAKA I KRATICA

A5 – skupina noradrenergičnih neurona

AIH – akutna ponavljana hipoksija (engl. *Acute Intermittent Hypoxia*)

C1R – bubrežni kemoreceptor

C2R – bubrežni kemoreceptor

DRG – ganglij stražnjeg korijena kralježnične moždine

FiO_2 – postotak udahnutog kisika (engl. *Fraction of inspired oxygen*)

IML – intermediolateralni rog kralježnične moždine

pLTF – frenička dugoročna facilitacija (engl. *phrenic Long Term Facilitation)*

sLTF – simpatička dugoročna facilitacija (engl. *sympathetic Long Term Facilitation*)

MR – bubrežni mehanoreceptori

NTS – nucleus tractus solitarius

PVN – paraventrikularna jezgra hipotalamusa

RSNA – bubrežna simpatička živčana aktivnost (engl. *Renal sympathetic nerve activity)*

RVLM – rostro-ventralno-lateralna medula

SFO – subfornikalni organ

Hvala svima s Katedre za neuroznanost na pristupačnosti za moju radoznalost te što su me prihvatili otvorenih ruku kao kolegu od prvog dana. Hvala Katarini Madirazzi bez čije bi neizmjerne pomoći izrada ovog rada bila mnogostruko teža.

Posebno i od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Renati Pecotić na strpljenju, susretljivosti, vodstvu i poticanju želja za istraživanjem akademskih i osobnih nepoznanica, ne samo u izradi ovog rada, nego kroz posljednjih 5 godina poznanstva koje su mi snažno utjecale na život, na školovanje i usmjerile me u bolju budućnost.

Hvala svim prijateljima i kolegama s kojima sam dijelio ovo dugo putovanje ispunjeno radom i frustracijama, ali također srećom i zabavom. Posebno hvala kolegicama Maji Aralici i Doriji Gabrić te kolegi Tinu Vidoviću bez čijeg bi se prijateljstva i društva kasni noćni sati provedeni nad knjigom uz uzajamno jadikovanje i šale pretvorili u usamljena jutra s teškim podočnjacima te još težim knjigama u krevetu.

Najveća hvala mojoj obitelji, široj i užoj, a posebice roditeljima Saši i Suzy, za bezuvjetnu potporu u svim trenutcima, od početka do kraja.

1. UVOD

1.1. Autonomni živčani sustav

Živčani se sustav uobičajeno dijeli na središnji (koji čine mozak i kralježnična moždina) i periferni živčani sustav (neuroni izvan središnjeg). Motorički (eferentni) dio živčanog sustava može se podijeliti na dva glavna dijela: autonomni i somatski. Autonomni dio uvelike je neovisan u smislu da njegova aktivnost nije pod izravnom svjesnom kontrolom (1). Glavna funkcija autonomnog sustava je nadzor nad većinom visceralnih funkcija tijela poput kontrole arterijskog tlaka, pokreta i lučenja probavnog sustava, pražnjenja mokraćnog mjehura, znojenja, tjelesne temperature i mnogih drugih aktivnosti, među kojima neke kontrolira posve, a neke samo djelomice (2).

Autonomni živčani sustav aktiviraju uglavnom središta smještena u kralježničnoj moždini, moždanom deblu i hipotalamusu. Osim toga, dijelovi moždane kore, posebice dijelovi limbičke kore, mogu slati signale u niža moždana središta i tako utjecati na autonomni nadzor. Uz to, često dolazi do djelovanja i pomoću visceralnih refleksa. To znači da nesvjesni osjetilni signali iz visceralnih organa mogu ući u autonomne ganglije, moždano deblo ili hipotalamus, te zatim potaknuti nesvjesne refleksne odgovore koji se izravno vraćaju u taj organ i nadziru njegovu aktivnost (2).

Kako bi se ostvarila visoka razina integracije u mozgu i utjecalo na procese u udaljenim dijelovima tijela te na brojne sustave negativne povratne sprege, autonomni živčani sustav koristi kemijske spojeve, neurotransmitere, za prijenos informacija između živčanih stanica te između živčanih i somatskih stanica koje inerviraju. Neurotransmiteri se otpuštaju u malim količinama iz živčanih okončina u sinaptičke pukotine. Kroz sinaptičke pukotine prolaze difuzijom te dolaze do postsinaptičkih receptorskih molekula (receptora). Postoje i slučajevi retrogradnog prijenosa informacija od postsinaptičke stanice do presinaptičkog živčanog završetka (1).

Eferentni se autonomni signali prenose do pojedinih organa u tijelu dvama glavnim dijelovima autonomnog živčanog sustava – simpatičkim i parasimpatičkim živčanim sustavom (2).

1.2. Simpatički živčani sustav

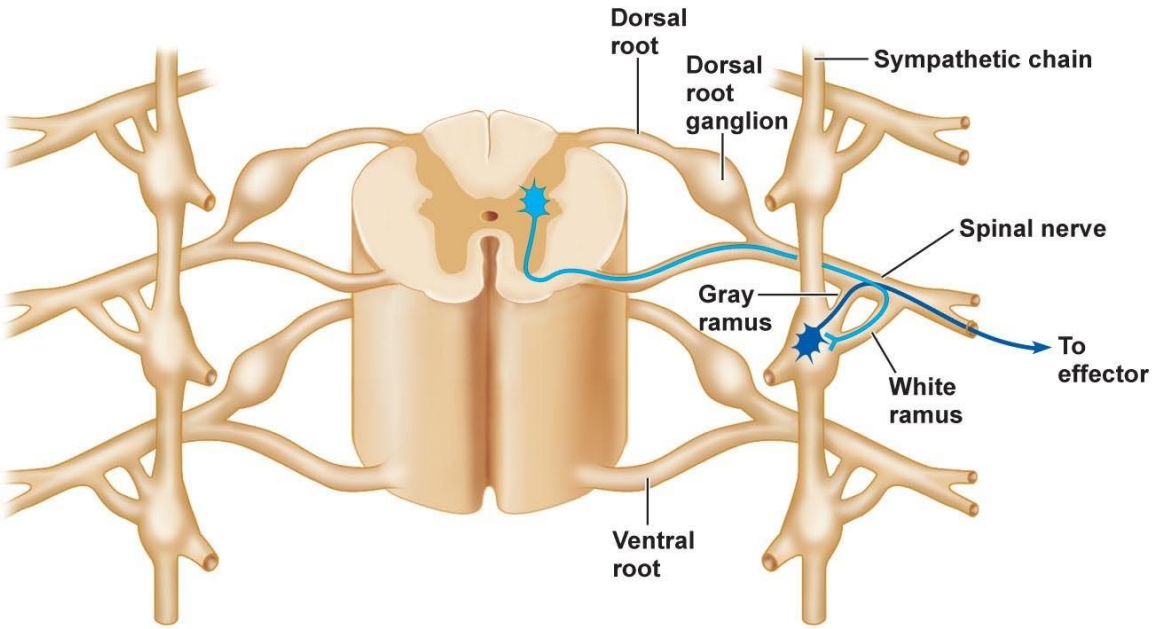
Uloga simpatičkog sustava najbolje je opisana riječju „ergotrofna“ – ona koja pogoduje potrošku energije. Svrha te potrošnje energije aktivacija je za situacije „borbe ili

bijega“. Iako ovakvi opisi ne pružaju gotovo nikakav uvid u uključene mehanizme, ipak daju jednostavan opis mnogih učinaka simpatičkog sustava. Primjerice, stimulacija rada srca, porast koncentracije šećera u krvi i vazokonstrikcija u koži posljedica su aktivacije simpatikusa i prilagodbe borbi ili preživljavanju napada (1).

Takvo istovremeno aktiviranje više organskih sustava naziva se masovnim izbijanjem što znači da dolazi do istodobnog odašiljanja velikog broja impulsa. Najčešći uzroci takve aktivacije su fizički ili psihički stres, odnosno snažna emocionalna stanja poput bijesa. Osim generalizirane reakcije, simpatički sustav može djelovati izolirano na pojedine organe. Primjerice u procesu termoregulacije simpatički živci nadziru znojenje i protok krvi u koži bez utjecaja na druge organe (2).

Međutim, uz povremene reaktivne aktivacije simpatičkog sustava, on ima i svoj „tonus“. Drugim riječima, simpatički sustav stalno je aktivan u određenoj mjeri. To je vrlo važno kako bi omogućio povećanje ili smanjenje razine funkcioniranja podraženog organa. Najbolji primjer za to je tonus sistemnih arteriola. One se održavaju u konstrikciji na polovici svog maksimalnog promjera. Aktivacijom ili supresijom simpatikusa te se žile mogu dodatno suziti ili proširiti, ovisno o stimulacijskom signalu (2).

Kako bi signal uopće došao iz središnjeg živčanog sustava do ciljnog organa treba prijeći put simpatičkim neuronima. Specifičnost autonomnog živčanog sustava je da se taj put sastoji od dva neurona – preganglijskog i postganglijskog. Tijelo preganglijskog neurona nalazi se u intermediolateralnom rogu torakolumbalne kralježnične moždine, a njegova vlakna odlaze kroz prednji korijen moždine u odgovarajući spinalni živac. Neposredno nakon što spinalni živac napusti kralježnički kanal, preganglijska se vlakna od njega odvajaju i odlaze u jedan od ganglija simpatičkog lanca gdje tvore sinapsu s postganglijskim neuronima. Zatim postganglijska vlakna odlaze do svog odredišta u različitim organima (2) (Slika 1).



Slika 1. Put simpatičkog preganglijskog i postganglijskog neurona od intermediolateralnog roga kralježnične moždine do izvršnog organa; svijetlo plavo – preganglijski neuron, tamno plavo – postganglijski neuron

Preuzeto s http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter_11%20Fall%202011.htm

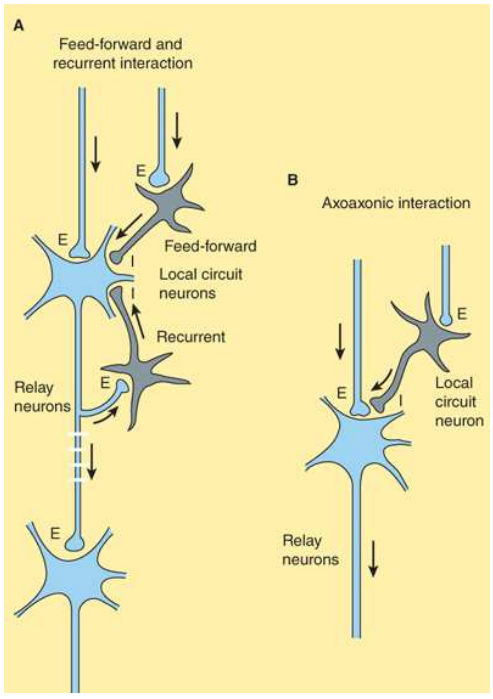
U slučaju simpatičkog sustava, bitno je razlikovati preganglijski od postganglijskog neurona, odnosno sinapse koje oni tvore s drugim stanicama jer se koriste različiti neurotransmiteri pri slanju signala. Tako preganglijski neuroni isključivo luče acetilkolin, dok postganglijski velikom većinom luče noradrenalin, iako ima slučajeva kada i oni luče acetilkolin, kao što je slučaj u inervaciji žlijezda znojnica, piloerekcijskih mišića i vrlo malog broja krvnih žila. Takve neurone koji izlučuju acetilkolin nazivamo kolinergičnim, a one koje izlučuju noradrenalin adrenergičkim. Shodno tome, isto se nazivaju i njihovi tkivni receptori (2).

1.3. Adrenergični receptori

Prije nego što noradrenalin, izlučen na okončinama autonomnih neurona, podraži efektorski organ, mora se najprije vezati na specifične receptore ciljnih stanica. Vezno mjesto receptora nalazi se na vanjskoj strani stanične membrane, vezan kao prostetična skupina za bjelančevinsku molekulu koja prolazi kroz cijelu staničnu membranu. Vezanje

neurotransmitera s receptorom izaziva promjene u smislu aktivacije enzima na suprotnom kraju koji strši u unutrašnjost stanice. Aktivirani enzim započinje kaskadu unutarstaničnih signalnih putova koja dovodi do konačnog učinka noradrenalina (2).

Samo lučenje neurotransmitera može biti nadzirano na dvije razine: na razini presinaptičkog neurona te na razini postsinaptičkog neurona. Na obje razine se može primjetiti izraženost učinka negativne povratne sprege. Povratni inhibicijski nadzorni mehanizmi postoje praktično na svim neuronskim završecima. Dobro je opisan mehanizam koji uključuje alfa2-adrenoreceptore smještene na završetku noradrenergičkih neurona. Njih podražuje noradrenalin, a rezultat je dokidanje daljnjeg otpuštanja noradrenalina iz živčane okončine. Nasuprot tomu, presinaptički beta-receptori pojačavaju otpuštanje noradrenalina. Takvi receptori koji reagiraju na primarni neurotransmiter nazivaju se autoreceptorima. Osim presinaptičkih autoreceptora postoje i heteroreceptori. Ti receptori su regulirani nekom drugom tvari koja potječe iz drugih živčanih završetaka, krvi ili okolnih tkiva (1) (Slika 2).



Slika 2. Putovi u središnjemu živčanom sustavu. **A** pokazuje dijelove triju projekcijskih neurona (plavo) i dva tipa inhibicijskih putova, povratne i one usmjerene unaprijed. Inhibicijski su neuroni prikazani sivo. **B** pokazuje put odgovoran za presinaptičku inhibiciju u kojem akson inhibicijskog neurona (sivo) stvara sinapsu na aksonskom završetku ekscitacijskog vlakna (plavo). Preuzeto iz: Bertram G. Katzung. Basic & Clinical Pharmacology. 12. izdanje. Lange. str. 365.

S druge strane, postsinaptička regulacija ima dva aspekta: regulacija koja je posljedica (ne)aktivnosti primarnog receptora, što može uzrokovati povećanje broja receptora (tzv. up-

regulacija ili regulacija naviše) ili pak smanjenje broja receptora (tzv. down-regulacija ili regulacija naniže) i regulacija posredovana drugim istodobnim događajima. Regulacija broja receptora naviše ili naniže posljedica je ili smanjene ili povećane aktivacije receptora. Ekstremni slučajevi regulacije naviše javljaju se nakon denervacije nekih tkiva koja kao posljedicu imaju denervacijsku superosjetljivost na aktivatore tog tipa receptora. Primjerice, dugotrajna uporaba rezerpina koji smanjuje razinu noradrenalina u presinaptičkim vezikulama može rezultirati povećanjem broja receptora i povećanom osjetljivošću ciljnih tkiva koje takva „osiromašena“ vlakna inerviraju. Drugi mehanizam uključuje moduliranje učinka spajanja primarnog neurotransmitera i receptora događajima koje potiče ili sam primarni neurotransmiter ili pak drugi neurotransmiteri djelujući na neke druge postsinaptičke receptore (1).

Takav mehanizam aktivnosti vrijedi za sve adrenergične receptore. Postoje dvije glavne vrste adrenergičnih receptora: alfa-receptori i beta-receptori. Svaka od ovih skupina ima svoje podskupine. Tako se alfa-receptori dijele na alfa1 i alfa2, dok se beta-receptori dijele na beta1, beta2 i beta3. Zbog različite raspoređenosti u organizmu, te različitog učinka svake podskupine, razne tvari, odnosno neurotransmiteri dovode do različitih učinaka, kako lokalno, tako i sistemski (2).

1.3.1. Uloga alfa1-adrenoreceptora

Alfa1-adrenoreceptori rasprostranjeni su u krvožilnom stablu, a njihova aktivacija uzrokuje arterijsku i vensku kontrakciju. Njihov izravni učinak na srčanu frekvenciju od relativno je malog značenja. Kontrakcija arterija dovodi do povećanja arterijskog otpora, što posljedično poveća arterijski krvi tlak, dok kontrakcija vena dovodi do smanjenja venskog kapaciteta. Kada su kardiovaskularni refleksi očuvani, povećanje krvnog tlaka izaziva baroreceptorima posredovano povećanje tonusa vagusa i usporavanje srčane frekvencije, što može biti vrlo izraženo. No, povećani venski priljev povećava udarni volumen čime se kompenzira smanjenje srčane frekvencije, a srčani minutni volumen ostaje u načelu nepromijenjen (3).

Osim utjecaja na krvožilni sustav, alfa1-adrenoreceptori djeluju i na druge organe. Mišić dilatator zjenice stimuliran adrenergičnim lijekovima biva kontrahiran što dovodi do širenja zjenice. Isto se događa sa glatkom muskulaturom pilomotora dlake što uzrokuje

piloerekciju te s prostatom koja se također kontrahira, a srce se ne kontrahira već snaga kontrakcije biva povećana (3).

1.3.2. Uloga alfa2-adrenoreceptora

Alfa2-adrenoreceptori se također nalaze u krvnim žilama, a njihova aktivacija rezultira vazokonstrikcijom. No to se događa samo kada se agonisti alfa2-adrenoreceptora primjene lokalno, brzom intravenskom injekcijom ili oralno u velikim dozama. Kada se primjeni sistemski, izravni vaskularni učinci prikriveni su središnjim učincima gdje se aktiviraju autoreceptori alfa2-adrenoreceptora na presinaptičkim neuronima koji blokiraju otpuštanje neurotransmitera i time aktivnost simpatičkog sustava. To rezultira smanjenjem tonusa simpatikusa i njegovog učinka na krvni tlak. Zbog toga se, između ostalog agonisti alfa2-adrenoreceptora rabe kao simpatolitici u liječenju hipertenzije. U rijetkim slučajevima u kojima postoji degeneracija postganglijskih noradrenergičkih vlakana, hipotenzija se može tretirati aktivacijom alfa2-adrenoreceptora jer u tom slučaju dolazi samo do vaskularnog odgovora, dok središnji odgovor izostaje (3).

Osim utjecaja na krvožilni sustav, alfa2-adrenoreceptori imaju ulogu u kontroli kardiorespiracijske funckije. U moždanom deblu, u područjima koja su zadužena za te funkcije, receptori se nalaze i postsinaptički i presinaptički kao inhibicijski heteroreceptori i autoreceptori. Rezultat aktivacije tih receptora je tonički inhibicijski utjecaj na respiracijsku aktivnost (4). Shodno tome, blokiranjem navedenih receptora fentolaminom (antagonist alfa2-adrenoreceptora), dolazi do pojačanog respiracijskog odgovora u smislu povećanja frekvencije i respiracijskog volumena. Štoviše, premedikacija fentolaminom dovodi do zaštite od kardiovaskularnog urušaja i apneje, koji se često vide tijekom izlaganja hipoksiji bez CO_2 kompenzacije (5).

Uz kontrolu simpatičke te kardiovaskularne aktivnosti, alfa2-adrenoreceptori pokazali su utjecaj na diurezu i natriurezu. Oboje je potaknuto aktivacijom receptora u rostralnoj ventrolateralnoj produljenoj moždini, ali su regulirani različitim putovima. Mehanizam povećanja natriureze ovisan je o prijenosu signala putem renalnog živca, dok je diureza regulirana drugim neuralnim putevima, odnosno interakcijama s područjima zaduženima za lučenje antidiuretskog hormona (6).

1.4. Uloga dopaminskih receptora

Postoje 2 velike skupine dopaminskih receptora: D_1-skupina koja obuhvaća D_1 i D_5 podskupine receptora i D_2-skupina koja obuhvaća D_2, D_3 i D_4 podskupine. Iako su dokazane razlike između podskupina unutar iste skupine receptora, svi imaju zajednička svojstva signalizacije prema čemu su određene skupine te se jednostavnije može govoriti samo o D_1-skupini i D_2-skupini receptora. Receptori D_1-skupine su isključivo postsinaptički dok receptori D_2-skupine mogu biti i presinaptički i postsinaptički (7).

Zadatak dopaminskih receptora u središnjem živčanom sustavu je kontrola signalnih puteva koji moduliraju važne kognitivne modele ponašanja poput prostorne radne memorije (8). Uz to, sudjeluju u raznim drugim neurološkim procesima kao što su motivacija, zadovoljstvo, spoznaja, sjećanje, učenje, fina motorička kontrola i modulacija neuroendokrine signalizacije. Za potonje su zaduženi receptori D_1-skupine smješteni u arkuatnoj jezgri hipotalamičke *eminentiae medianae*, dok ostale funkcije u središnjem živčanom sustavu kontroliraju receptori D_2-skupine smješteni u ventralnom mezencefalonu (9).

Intravenska primjena dopamina djeluje na sistemskoj razini te potiče vazodilataciju bubrežnih, visceralnih, koronarnih, cerebralnih i vjerojatno drugih arteriola putem aktivacije D_1-like receptora. Njihovom aktivacijom u bubrežnim krvnim žilama može se potaknuti natriureza. Aktivacija presinaptičkih receptora D_2-skupine inhibira otpuštanje noradrenalina, međutim nije jasno pridonosi li taj učinak kardiovaskularnim učincima dopamina (3).

Dopaminski receptori su predmet brojnih neuroloških i farmakoloških istraživanja zbog njihove uloge u raznim neurološkim bolestima poput Parkinskonove bolesti i Huntingtonove bolesti te uloge u stvaranju ovisnosti o određenim egzogenim tvarima (8).

1.5. Uloga serotoninskih receptora

Učinci serotonina posredovani su njegovim vezanjem na iznimno veliki broj membranskih receptora. Do sada su opisani: 5-$HT_{1A,B,D,E,F\ i\ P}$, 5-$HT_{2A,B\ i\ C}$, 5-HT_3, 5-HT_4, 5-$HT5_A$,B te 5-$HT_{6,7}$. Rasprostranjeni su po cijelom organizmu, od mozga (kora, bazalni gangliji, hipokampus, rafe jezgre) do probavnog sustava (fundus želudca, mijenterički splet). Od raznih učinaka serotonina na organizam, najvažniji su oni na središnji živčani, dišni, kardiovaskularni te probavni sustav (10).

Serotoninski neuroni u mozgu uključeni su u brojne funkcije kao što su raspoloženje, spavanje, apetit i regulacija tjelesne temperature, percepcija boli, regulacija krvnog tlaka i povraćanje. Uz to je pokazano da serotonin sudjeluje u kliničkim stanjima kao što su depresija, anksioznost i migrena. Snažno može podraživati osjetne živčane okončine za bol i svrbež, te je odgovoran za neke od simptoma uzrokovanih ubodima kukaca i žarenjem biljaka. Osim toga, snažan je aktivator kemosenzitivnih završetaka lociranih u koronarnim krvnim žilama čijom aktivacijom može doći do kemoreceptorskog refleksa koji se očituje bradikardijom i hipotenzijom (10).

Serotonin izravno kontrahira glatke mišiće krvnih žila, uglavnom putem 5-HT_2 receptora. U ljudi je on snažan vazokonstriktor (posebno u bubregu i plućima) uz iznimku krvnih žila skeletnih mišića i srca koje širi. Međutim, za vazodilataciju je potrebna prisutnost vaskularnih endotelnih stanica. U slučaju njihovog manjka, dolazi do kontrakcije krvnih žila. Uz to, ima mali, izravni pozitivni kronotropni i inotropni učinak na srce, vjerojatno bez kliničkog značenja, iako, njegova dugotrajna povišenost može dovesti do patološke promjene endokarda (10).

U zdravih ljudi, postoji mali izravni stimulacijski učinak serotonina na bronhalne glatke mišiće vjerojatno preko 5-HT_{2A} receptora. Međutim, kao rezultat kemoreceptorskog refleksa ili stimuliranjem osjetnih živčanih završetaka u bronhima može doći do hiperventilacije (10).

1.6. Antagonisti alfa2-adrenoreceptora

S obzirom na način djelovanja na receptor, tvari odnosno lijekove djelimo na agoniste i antagoniste. Agonisti su lijekovi koji se vežu i na neki način aktiviraju receptor, što izravno ili posredno dovodi do učinka. Aktivacija receptora rezultira promjenom konformacije. Neki receptori imaju efektorni mehanizam ugrađen u istoj molekuli, pa vezanje lijeka rezultira izravnim učinkom, primjerice otvaranjem ionskog kanala ili aktivacijom enzima. Lijekovi koji se, vežući na receptor, natječu i otežavaju vezanje drugih molekula te zadržavaju receptor u inaktivnom stanju, nazivaju se farmakološkim antagonistima. Njihov učinak se može nadvladati povećanjem doze agonista. Neki se antagonisti za receptor vežu čvrsto, na ireverzibilan način, i ne mogu se istisnuti povećanjem koncentracije agonista. Lijekovi koji se vežu za neki receptor i ne sprječavaju vezanje agonista djeluju alosterički. Oni mogu povećati

ili inhibirati učinak lijeka koji se veže za receptor. Ukoliko djeluju inhibirajuće, njihov učinak se ne može nadvladati povišenjem doze agonista (11).

Tradicionalno, antagonisti alfa1-adrenoreceptora i alfa2-adrenoreceptora važno su oruđe u znanstvenom istraživanju funkcija autonomnog živčanog sustava. U kliničke svrhe neselektivni se antagonisti alfa-receptora rabe u liječenju feokromocitoma (tumora koji luči katekolamine), a selektivni antagonisti alfa-receptora uporabljuju se u liječenju primarne hipertenzije i benigne hiperplazije prostate. Iako neki lijekovi imaju veći afinitet za alfa1-adrenoreceptore ili alfa2-adrenoreceptore u odnosu na drugi, nijedan nije isključivo selektivnog učinka. No, zbog jednostavnije distinkcije u uporabi lijekova koriste se nazivi „selektivni“ i „neselektivni“. Jedan od lijekova klasificiran kao selektivni antagonist alfa2-adrenoreceptora je johimbin (12).

1.7. Johimbin

Johimbin je indolni alkaloid koji je dobiven ekstrakcijom iz drva johimbe (lat. *Pausinystalia yohimbe*) koje raste u srednjoj i zapadnoj Africi. Ekstrakti kore drva johimbe su odavno korišteni kao pripravci za poboljšanje seksualne potencije (13). Tako se i johimbin početno koristio kao lijek za erektilnu disfunkciju, no pronalaskom novih, potentnijih lijekova, njegova klinička uporaba je drastično ograničena. Postoje radovi koji upućuju na njegovu moguću korisnost kao lijeka za ortostatsku hipotenziju, ali za sada je njegova upotreba ograničena na znanstveno istraživanje (14).

Iako je klasificiran kao selektivni antagonist alfa2-adrenoreceptora, johimbin, više ili manje potentno, djeluje i na druge receptore: alfa1-adrenoreceptore, dopaminske (D_2 i D_3) te serotoninske ($5\text{-}HT_{1A}$, $5\text{-}HT_{1B}$, $5\text{-}HT_{1D}$, $5\text{-}HT_{1F}$, $5\text{-}HT_{2B}$, $5\text{-}HT_{1E}$, $5\text{-}HT_{2A}$, $5\text{-}HT_{5A}$, $5\text{-}HT_{7}$). Osim što ima različit afinitet za različite receptore, na neke djeluje kao antagonist, a na neke kao parcijalni agonist, što znači da receptor biva aktiviran, no bez velikog odgovora čak ni uz najviše koncentracije. Tako za alfa2-adrenoreceptore ima visoki antagonistički afinitet, za alfa1-adrenoreceptore, D_2, $5\text{-}HT_{1B}$, $5\text{-}HT_{1D}$, $5\text{-}HT_{2B}$ umjereno visoki antagonistički, za $5\text{-}HT_{2A}$ niski antagonistički afinitet, te za $5\text{-}HT_{1A}$ umjereno visoki parcijalno agonistički afinitet (15).

Uz činjenicu da djeluje na više različitih receptora drugačijim afinitetom, njegov učinak ovisi o dozi koja je primijenjena. Povećanjem primijenjene doze raste i njegov učinak;

pri malim dozama (1 mg/kg) dovodi samo do povećanja razine noradrenalina u krvi, dok pri većim dozama (3 mg/kg) uzrokuje povećanje adrenalina i renina u krvi. Isto vrijedi za središnji učinak gdje pri većim koncentracijama ostvaruje jači učinak (16). Uz to, tek pri visokim koncentracijama se veže za dopaminske i serotoninske receptore (17).

1.8. Hipoksija

Hipoksija je stanje u kojem tijelo ili određeni dio tijela nema dovoljnu opskrbu kisikom na tkivnoj razini (18). Ako je dovoljno jaka i dovoljno dugo traje, može uzrokovati smrt stanica u čitavom organizmu, a ako je slabija uglavnom uzrokuje smanjenje mentalne aktivnosti (koje katkad završava komom) i smanjenjem radne sposobnosti mišića (19). Hipoksije mogu nastati zbog sniženog parcijalnog tlaka kisika u atmosferskom zraku, zbog poremećaja na putu dopreme kisika iz atmosferskog zraka do mitohondrija u stanicama ili zbog prevelikog iskorištenja kisika u usporedbi s dopremom (20).

Akutni manjak kisika u stanicama dovodi do manjka fosfornih spojeva bogatih energijom. Različitim regulacijskim mehanizmima aerobni metabolizam prelazi u anaerobni. Tada je jedini izvor energije anaerobna glukoliza. Ta je energijska proizvodnja spasonosna u uvjetima relativnog ili apsolutnog manjka kisika, jer omogućuje stvaranje energije dok se kisik ne dopremi do mitohondrija. Međutim, energijska proizvodnja anaerobnom glukolizom ograničena je ne samo svojim malim kapacitetom (manje od 10% u usporedbi s aerobnim energijskim metabolizmom), nego i nakupljanjem mliječne kiseline koja koči daljnju anaerobnu glukolizu. Mliječna kiselina napušta tkiva u kojima je nastala te krvotokom odlazi u jetru gdje glukoneogenezom prelazi u glikogen. No, glukoneogeneza se ne može odvijati u anaerobnim uvjetima pa višak mliječne kiseline dovodi do laktične acidoze (20).

Kako bi se organizam obranio od posljedica hipoksije, aktivira se niz kompenzacijskih mehanizama koji su zaduženi za osiguranje što veće količine kisika: hiperventilacija, sinteza 2,3-difosfoglicerata u eritrocitima, lučenje eritropoetina, te povećanje minutnog volumena srca i skretanje krvi prema vitalno važnim organima (srce i mozak) (20). Tim svim mehanizmima pomaže i nadopunjuje ih pojačana aktivnost simpatičkog sustava kao odgovor na hipoksiju. Ukoliko organizam bude dugotrajno ponavljano ili stalno izložen hipoksiji, dolazi do prekomjerne aktivacije simpatičkog sustava (21).

1.9. Plexus renalis

Bubreg i živčani sustav komuniciraju putem renalnog spleta čija se vlakna protežu uzduž bubrežnih arterija. Formiran je vlaknima celijačnog spleta i ganglija, aortorenalnih ganglija, donjih torakalnih splanhničnih živaca te prvih lumbalnih splanhničnih živaca i aortalnog spleta. Osjetna vlakna iz bubrega odlaze do T10-11 razine kralježnične moždine te se osjet prenosi na odgovarajući dermatom. Bubreg je također inerviran parasimpatičkim vlaknima vagalnog živca, međutim, njihova funckija još nije u potpunosti jasna. Aferentna vlakna simpatičkoga živčanog sustava uzrokuju vazokonstrikciju u bubregu čime smanjuju protok krvi (22, 23) (Slika 3).

Osim inervacije bubrežnih krvnih žila koja dovodi do vazokonstrikcije, simpatička vlakna inerviraju i jukstaglomerularne stanice te tubule. Stoga, ovisno o frekvenciji renalne simpatičke aktivnosti, renalni živci kontroliraju povećanje izlučivanja natrija i vode regulacijom njihove reapsorpcije kroz nefron. Regulacijom konstrikcije krvnih žila mijenja se protok krvi kroz glomerul čime se smanjuje glomerularna filtracija, a regulacijom otpuštanja renina iz jukstaglomerularnih stanica dolazi do promjene aktivnosti u sustavu renin-angiotenzin. Ovim bubrežnim mehanizmima simpatički sustav kontrolira srednji arterijski tlak (24).

Akutno ili kronično ponavljano izlaganje hipoksiji također utječe na srednji areterijski tlak, odnosno na simpatičku aktivnost. Hipoksijskom stimulacijom perifernih receptora dolazi do pojačane simpatičke živčane aktivnosti u nadbrubrežnoj srži, srcu te krvnim žilama što se vidi u povećanju simpatičke živčane aktivnosti mjerene na splanhničnim živcima, te akutnom povećanju srednjeg arterijskog tlaka i srčane frekvencije (25-27).

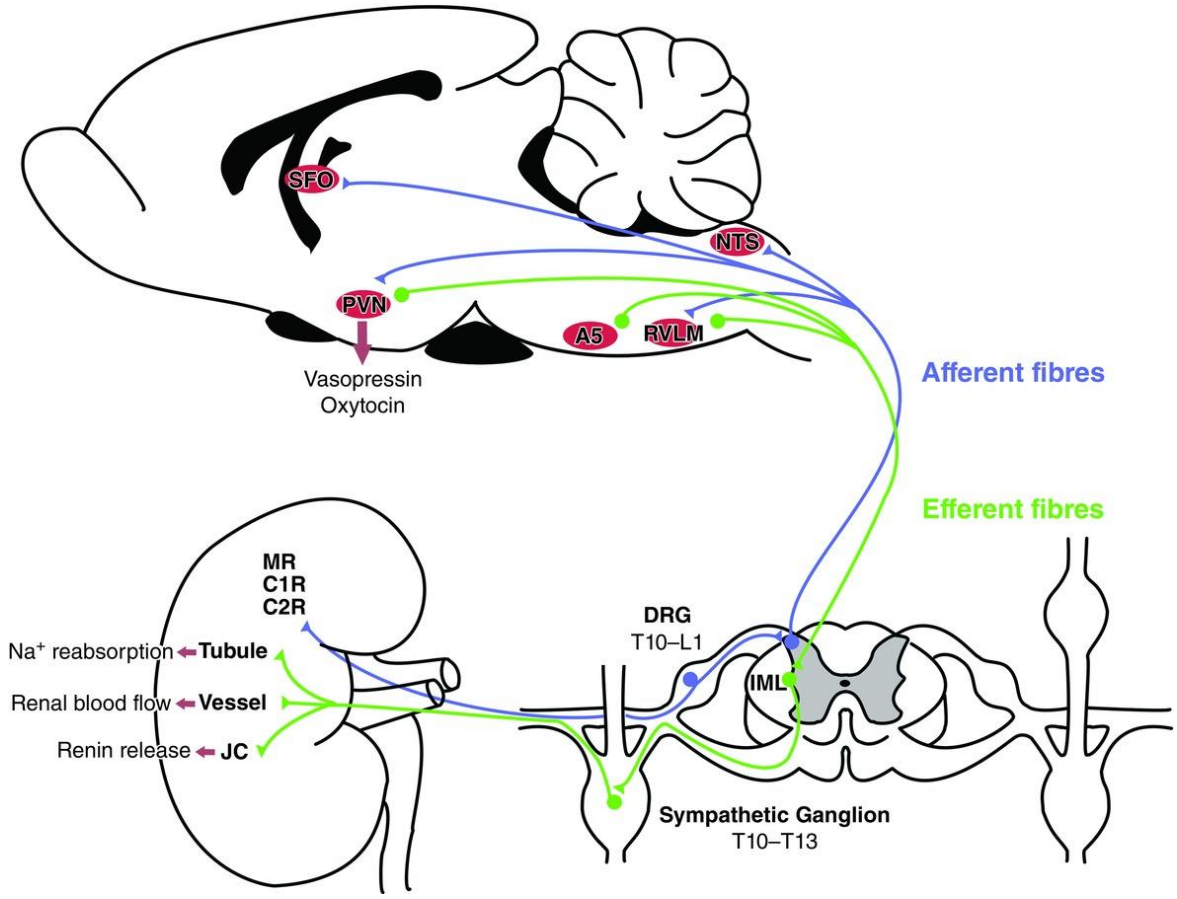
Dosadašnja istraživanja ukazuju nadalje na činjenicu kako izlaganje ponavljanim hipoksijama dovodi do specifičnog oblika neuralne plastičnosti koja se na renalnom živcu očituje kao simpatička dugoročna facilitacija (engl. *sympathetic Long Term Facilitation, sLTF*) ili pak na aktivnosti freničkoga živca kao respiracijska neuralna plastičnost (engl. *phrenic Long Term Facilitation, pLTF)* (28). Ranije je otkriveno kako u respiracijskom LTF važnu ulogu imaju serotoninski receptori kako na spinalnoj tako i supraspinalnoj razini (29, 30). Potencijalna uloga alfa-adrenergičnog sustava na dugoročnu plastičnost još se uvijek istražuje. Serotoninski i noradrenalinski neurotransmiteri mehanizmom „povuci-potegni“, na supraspinalnoj razini, izazivaju različite promjene aktivnosti freničkog živca (31). Njihovom kemijskom modulacijom možemo otkriti utjecaj 5-HT_{1A} i alfa2-adrenoreceptora na razvoj

dugoročnih promjena kako freničkog živca tako i simpatičkog sustava kroz promjene aktivnosti renalnog živca izazvane akutnom ponavljajućom hipoksijom.

Kroničnim izlaganjem ponavljanim epizodama hipoksije dolazi do stalnog povećanja srednjeg arterijskog tlaka. Za to su odgovorna i nadbubrežna žlijezda zbog lučenja adrenalina i bubrežni simpatički sustav zbog aktivacije renin-angiotenzin sustava (32). Međutim, oba utjecaja se mogu dokinuti kemijskom simpatektomijom (33).

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako možda slični mehanizmi pojačanja aktivnosti simpatičkog i respiracijskog sustava postoje i u ljudi koji boluju od poremećaja disanja tijekom spavanja, posebice sindroma opstrukcijske apneje tijekom spavanja, obzirom da su takvi pacijenti izloženi nevoljnim ponavljanim hipoksijama tijekom spavanja. Dugoročna izloženost ponavljanim hipoksijama može doprinijeti nastanku arterijske hipertenzije koja se dovodi u svezu s opstrukcijskom apnejom tijekom spavanja.

S obzirom da renalna simpatička aktivnost može potencijalno predskazati srednji arterijski tlak (34), a mehanizmi koji utječu na njegovu kontrolu su kompleksni, odnosno nisu regulirani samo jednim fiziološkim ili patofiziološkim putem, utjecaj renalnog simpatičkog sustava na kardiovaskularni sustav nedovoljno je istražen, kao i sama reakcija renalnog simpatičkog sustava na stresne stimulanse poput akutne ponavljane hipoksije ili na primjenu simpatomimetičkih, odnosno simpatolitičkih lijekova.



Slika 3. Shematski prikaz potencijalne integracije aferentnih i eferentnih renalnih živčanih vlakana u središnjem živčanom sustavu i bubrezima u štakora;

SFO – subfornikalni organ, PVN – paraventrikularna jezgra hipotalamusa, NTS – nucleus tractus solitarius, A5 – skupina noradrenergičkih neurona, RVLM – rostro-ventralno-lateralna medula, IML – intermediolateralni rog kralježnične moždine, DRG – ganglij stražnjeg korijena kralježnične moždine, MR – bubrežni mehanoreceptori, C1R i C2R – bubrežni kemoreceptori

Preuzeto s
https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/expphysiol.2014.079889

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj sistemske primjene antagonista alfa2-adrenoreceptora, johimbina prilikom izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji na simpatičku aktivnost mjerenu promjenama aktivnosti renalnog živca štakora.

Hipoteza:

Sistemska aplikacija johimbina dovest će do snažnije aktivacije simpatičkog sustava pri izlaganju akutnoj ponavljanoj hipoksiji u odnosu na učinak izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji bez primjene johimbina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na 13 mladih odraslih mužjaka štakora soja Sprague-Dawley, tjelesne mase 300-350 g. Sedam od njih su bili u pokusnoj skupini, a 6 u kontrolnoj. Korištene životinje uzgojene su i bile smještene u Nastambi za pokusne životinje Sveučilišta u Splitu na lokaciji Medicinski fakultet u Splitu.

Na kraju pokusa, štakori su žrtvovani prema europskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja, a sa životinjama su radili kvalificirani istraživači. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu. Financirano je od strane Hrvatske zaklade za znanost – projekt "TIHO2_SLEEP_BREATH" (IP-11-2013-5935).

3.2. Mjesto istraživanja

Istraživanje je provedeno u laboratoriju Zavoda za neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

3.3. Organizacija istraživanja

Temeljno eksperimentalno istraživanje. Istraživanje je prema ustroju kvantitativno, dok je prema intervenciji i obradi podataka analitičko.

3.4. Opis istraživanja

Životinje su prije početka kirurške pripreme za pokusni protokol anestezirane intraperitonealnom injekcijom uretana (20% otopina uretana u 0,9% fiziološkoj otopini; 1,2 g/kg). U slučaju nedovoljno duboke anestezije, životinjama je dana dodatna doza uretana (0,2 g/kg intravenski), sve do postizanja željenoga stupnja anestezije. Kako je uretan anestetik vrlo dugoga vremena djelovanja, životinjama nije bilo potrebno davati dodatne doze uretana.

Nakon postizanja željenoga stupnja anestezije, životinje su postavljene u položaj na leđima na grijaću podlogu kako bi se izbjeglo pothlađivanje tijekom trajanja pokusa. Svim štakorima postavljeni su kateteri u obje femoralne arterije (radi kontinuiranoga praćenja

arterijskoga tlaka i uzimanja uzoraka arterijske krvi za određivanje acidobaznoga statusa) i femoralne vene (radi nadoknade cirkulirajućega volumena fiziološkom otopinom i intravenskoga davanja lijekova). Plinovi (PaO_2 i $PaCO_2$) u arterijskoj krvi i pH održavani su unutar fizioloških granica mijenjanjem parametara disanja i infuzijom otopine bikarbonata (1 mmol/ml) u slučaju potrebe.

Nakon kateteriziranja femoralnih krvnih žila štakorima je napravljena traheotomija i intubacija traheje metalnim tubusom. Životinje su mehanički ventilirane respiratorom za male životinje smjesom kisika (50%) i dušika (50%). Tijekom pokusa postavke respiratora mijenjane su prema nalazima plinova u krvi. Potom su svakoj pokusnoj životinji izolirana oba vagalna živca te su podvezana koncem. Kasnije, prije početka pokusnoga protokola, vagalni živci prekinuti su jednostavnim povlačenjem konaca kako bi se spriječio utjecaj plućnih receptora osjetljivih na istezanje na viša moždana središta.

Životinjama je u visini bubrega učinjena incizija kože leđa, u duljini 2,5 cm, te se nakon razmicanja kože i paravertebralnih mišića pristupilo lijevom renalnom živcu. Renalni živac je izoliran od okolnoga tkiva, postavljen na bipolarnu srebrnu elektrodu te pokriven silikonskim gelom kako bi se spriječilo njegovo isušivanje. Elektroda je putem pojačala spojena s računalom.

Na računalu se tijekom pokusa kontinuirano pratio središnji arterijski tlak te neobrađeni i integrirani signal renalnog živca pomoću programa PowerLab i Chart for Windows verzija 5.4.2.

Nakon pripreme životinja i stabilizacije signala renalnog živca uzet je početni uzorak krvi za acidobazni status te snimljen signal renalnog živca i srednjega arterijskog tlaka. Snimljene vrijednosti smatrane su početnim uvjetima (označeno T0) s kojima su kasnije uspoređivane nastale promjene.

Životinjama u pokusnoj skupini intravenski je injiciran antagonist alfa2-adrenoreceptora johimbin (1 mg/kg) dok je životinjama u kontrolnoj skupini umjesto johimbina intravenski injicirana jednaka količina fiziološke otopine.

Zatim je proveden protokol akutnih ponavljanih hipoksija (engl. *Acute Intermittent Hypoxia, AIH*): pokusne životinje izložene su slijedu od 5 trominutnih hipoksija (FiO_2=0,09), odvojenih trominutnim hiperoksijama (FiO_2=0,5). Točke u kojima su snimani signali renalnog živca (RSNA) te srednjega arterijskog tlaka za analizu bile su 5 hipoksijskih epizoda

(označene H1-H5), te 15 minuta nakon kraja posljednje hipoksije (označeno T15). Uzorci arterijske krvi za acidobazni status nisu uzimani tijekom hipoksija kako bi se smanjio sveukupni gubitak krvi svake pojedine životinje, već samo 15 minuta nakon posljednjeg hipoksijskog podražaja.

3.5. Metode prikupljanja i obrade podataka

Signal renalnog živca pojačan je (Super Z & System 1000 Modular Instrumentation, CWE Inc., Ardmore, SAD), filtriran (pojasni filter 300 Hz–10 kHz) i pročišćen. Prosječne vrijednosti aktivnosti renalnog živca tijekom vremena praćene su s pomoću MA-1000 Moving Averager, System 1000 Modular Instrumentation (CWE Inc., Ardmore, SAD) s vremenskom konstantom 50 ms. Dobiveni signal – renalni neurogram sniman je pomoću PowerLab sustava (ADInstruments, Castle Hill, Australija) i analiziran u PowerLab softveru, Chart for Windows verzija 5.4.2 i Scope for Windows verzija 3.8 (ADI Instruments, Castle Hill, Australija).

3.5.1. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci uneseni su u programske pakete Microsoft Office za obradu teksta te Microsoft Excel za izradu tabličnoga prikaza. Za statističku analizu korišteni su računalni programi Microsoft Excel for Windows version 11.0 (Microsoft Corporation) i MedCalc Statistical Software version 1.9.4 (MedCalc Software, Ostend, Belgija; 2016).

Kvantitativni podaci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike srednjih vrijednosti kvantitativnih podataka unutar skupina testirane su ANOVA testom za ponavljane uzorke, a razlike između skupina Studentovim t-testom. Razina statističke značajnosti za dvostrane testove postavljena je na $p < 0,05$.

3.5.2. Primarna mjera ishoda

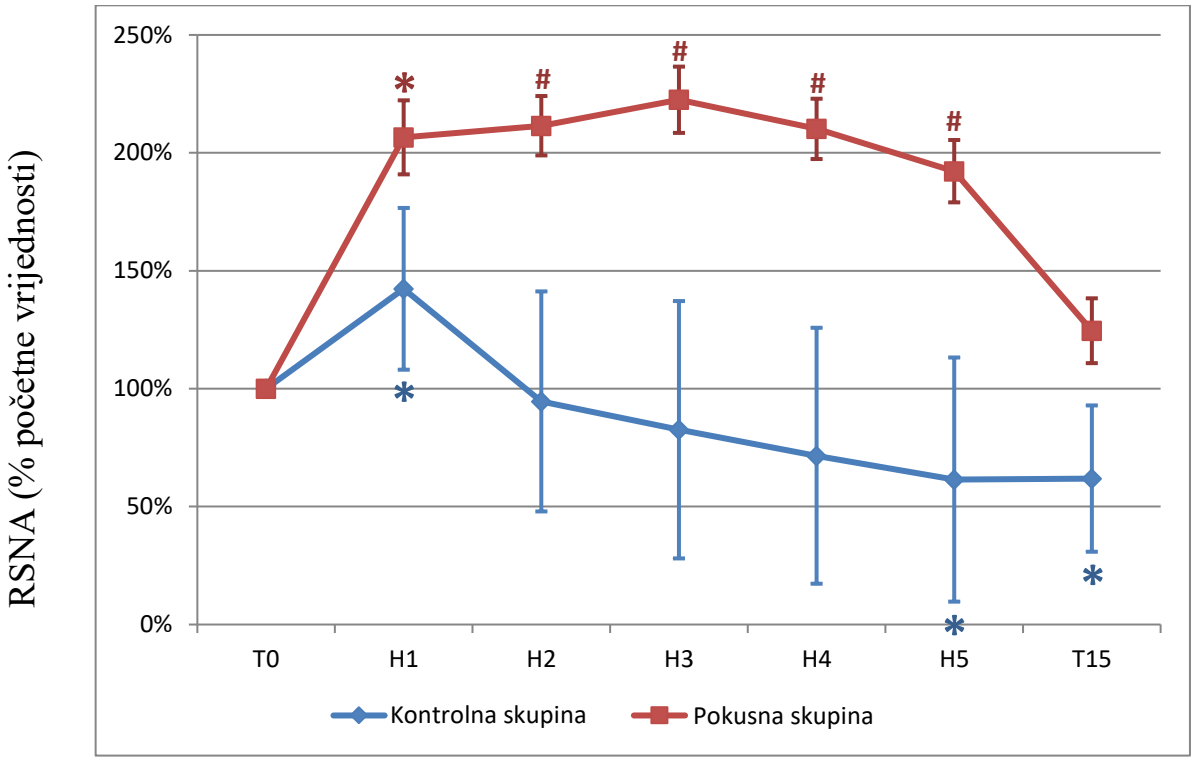
Primarna mjera ishoda bila je razina renalne simpatičke aktivnosti pri izlaganju akutnoj ponavljanoj hipoksiji u skupini životinja kojima je injiciran johimbin u usporedbi sa skupinom kojoj je injicirana fiziološka otopina.

3.5.3. Sekundarna mjera ishoda

Sekundarna mjera ishoda bila je razina arterijskog tlaka pri izlaganju akutnoj ponavljanoj hipoksiji u skupini životinja kojima je injiciran johimbin u odnosu na skupinu kojoj je injicirana fiziološka otopina.

4. REZULTATI

Obradom podataka dobiveni su sljedeći rezultati: u kontrolnoj skupini tijekom AIH protokola dolazi do povećanja RSNA u prvoj hipoksiji (H1) (142,34±38,46%; p=0,043) te značajnog smanjenja u H5 i T15 (61,46±32,39%; p=0,033; 61,88±33,66%; p=0,039) u odnosu na T0 (vrijeme prije izlaganja AIH protokolu). U pokusnoj skupini životinja koje su intravenski primile johimbin prije izlaganja AIH protokolu, značajno povećanje RSNA aktivnosti zabilježeno je samo u H1 (206,56±90,74%, p=0,021, Slika 4.). RSNA aktivnost značajno se razlikuje između kontrolne i pokusne skupine u točkama H2, H3, H4 i H5 (p=0,022; p=0,010; p=0,010; p=0,010).

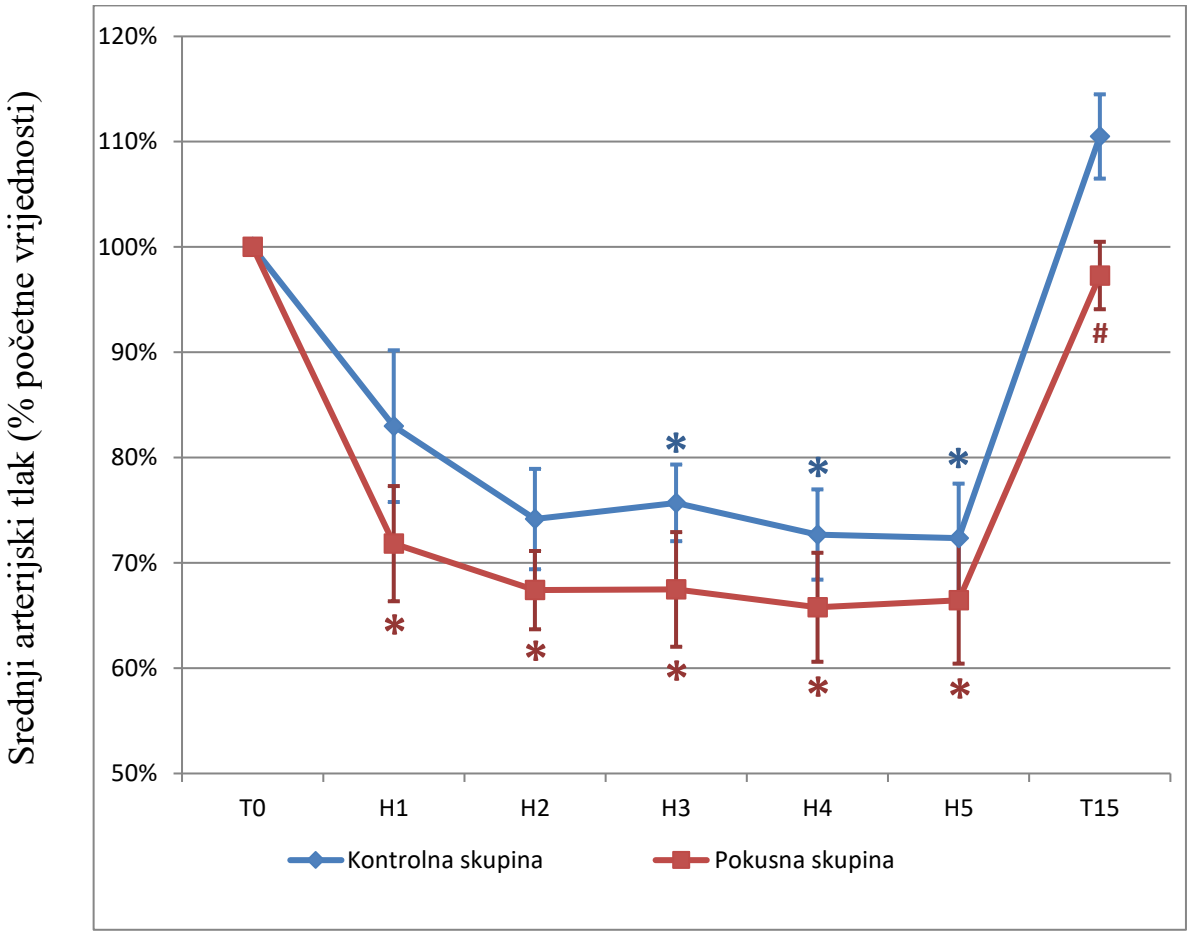


Slika 4. Aktivnost renalnog živca (RSNA) pokusne i kontrolne skupine izražene u postotcima u odnosu na početnu vrijednost (T0) u svim analiziranim točkama (H1-H5, T15). Znakom * označene su točke u kojima postoje značajne razlike u odnosu na početnu vrijednost, a znakom # točke u kojima postoji značajna razlika između pokusne i kontrolne skupine.

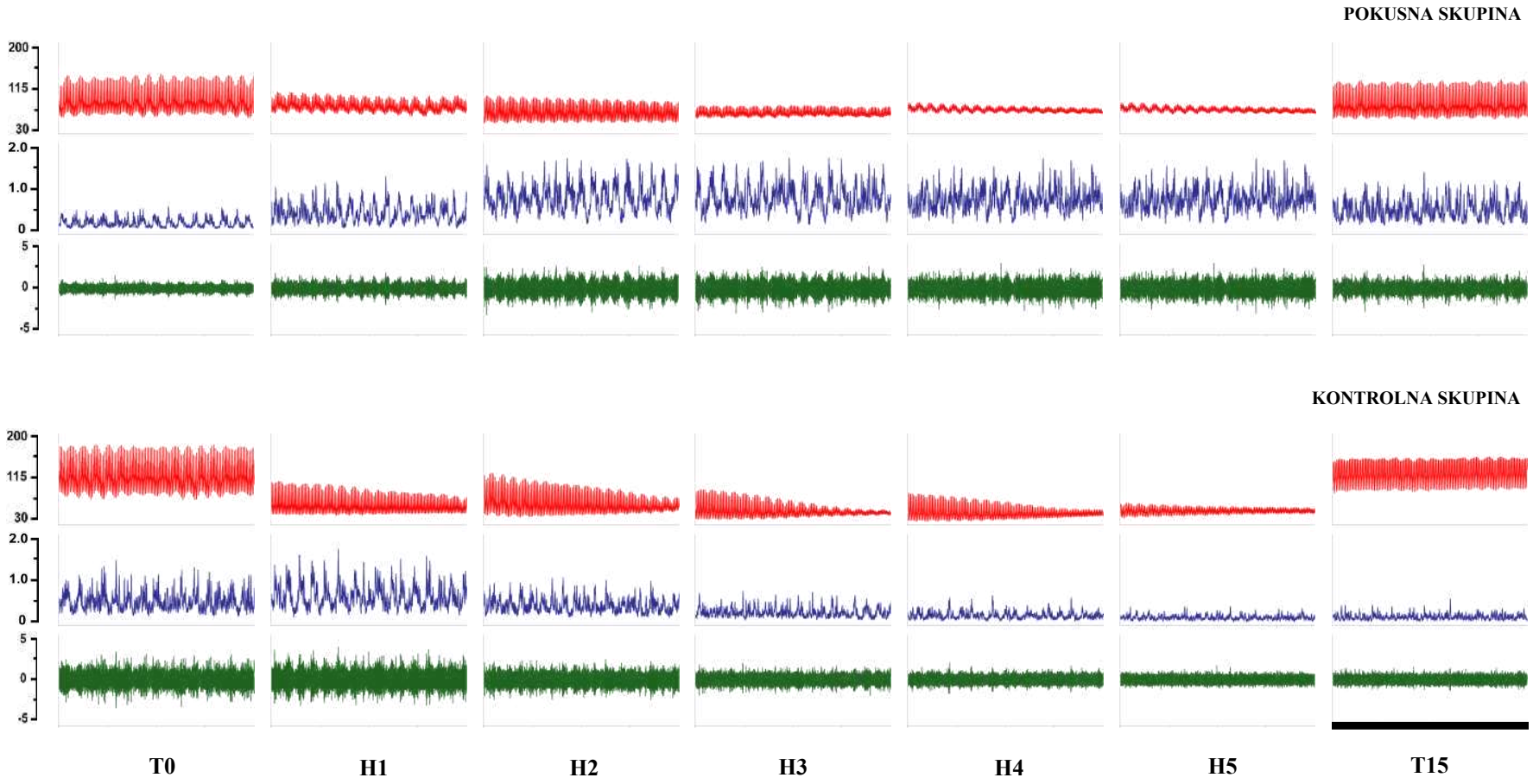
Osim RSNA, analizirani su podaci o srednjim artertijskim tlakovima u obje skupine. Izlaganjem akutnoj ponavljanoj hipoksiji u pokusnoj skupini dolazi do značajnog smanjenja

arterijskog tlaka tijekom svim hipoksija (H1-H5) (71,86±14,47%; p=0,044; 67,41±9,83%; p=0,003; 67,48±14,4%; p=0,021; 65,78±13,69%; p=0,012; 66,46±15,95%; p=0,03) u odnosu na početnu vrijednost. U kontrolnoj skupini također dolazi do značajnog smanjenja tlaka, ali u točkama H3, H4 i H5 (76,7±8,92%; p=0,021; 72,69±10,49; p=0,018; 72,35±12,68%; p=0,041, Slika 5.). Iako u pokusnoj i kontrolnoj skupini dolazi do smanjenja srednjeg arterijskog tlaka u odnosu na početnu vrijednost, nije pokazana značajna razlika između skupina (67,79±13,67% vs. 75,58±12,28%; p=0,195), osim u točki T15 (97,29±8,47% vs. 110,49±9,8%; p=0,023).

Reprezentativni zapisi snimljenih signala arterijskog tlaka i renalne simpatičke aktivnosti prikazani su na slici 6.



Slika 5. Vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka u pokusnoj i kontrolnoj skupini izražene u postotcima u odnosu na početnu vrijednost (T0) u svim analiziranim točkama (H1-H5, T15). Znakom * označene su točke u kojima postoje značajne razlike u odnosu na početnu vrijednost, a znakom # točke u kojima postoji značajna razlika između pokusne i kontrolne skupine.



Slika 6. Uvećani detalj odgovora renalnog živca na ponavljane hipoksije u jednoj pokusnoj i kontrolnoj životinji tijekom 20 sekunda. Od vrha prema dnu na svakom segmentu: srednji arterijski tlak u mmHg (crveni zapis); integrirani signal lijevog renalnog živca (RSNA, proizvoljne jedinice, plavi zapis); neobrađeni signal lijevog renalnog živca (μV, zeleni zapis). Početna vrijednost (T0) i analizirane točke (H1-H5, T15).

5. RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da akutna ponavljana hipoksija dovodi do smanjenja simpatičke aktivnosti mjerene aktivnošću renalnog živca, dok intravenska primjena johimbina uzrokuje povećanje simpatičke aktivnosti prilikom izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji.

Poznato je da simpatički živčani sustav snažno reagira pri izlaganju organizma stresnim podražajima. Njegova zadaća je pripremiti tijelo na rješavanje, odnosno učinkovito reagiranje na stresni podražaj. U ovom istraživanju akutna ponavljana hipoksija korištena je kao podražaj za izazivanje stresa i posljedične aktivacije simpatikusa. Većina dosadašnjih istraživanja pratila je dugoročne posljedice izlaganja protokolu akutne ponavljane hipoksije istražujući plastičnost simpatičkog i respiracijskog sustava koje su poznate kao dugoročna simpatička facilitacija ili pak dugoročna facilitacija disanja. U većini istraživanja u animalnim studijama ne nalazi se opis promjena aktivnosti simpatičkog sustava tijekom izlaganja akutnoj hipoksiji što je bio cilj našeg istraživanja. Isto tako brojna istraživanja pokazuju da nakon izlaganja hipoksiji bez farmakoloških intervencija dolazi do dugoročnog povećanja simpatičke aktivnosti mjerene promjenama aktivnosti perifernih živaca koji inerviraju skeletne mišiće (21, 33, 35). Treba uzeti u obzir da je pri izvođenju potonjih pokusa korištena ili dugotrajna akutna hipoksija u trajanju od 20 minuta (21, 35) ili akutni ponavljani hipoksijski podražaj u trajanju od 3-6 sekunda 2 puta u minuti kroz dugo vremensko razdoblje od 35 dana (33) što je moglo dovesti do određenog oblika neuralne plastičnosti. Uz to, pokazano je da dolazi do promjena u simpatičkoj aktivnosti ovisno u kojem dijelu ciklusa disanja je promjena analizirana. Primjerice hipoksija tijekom ranog inspirija dovodi do smanjenja simpatičke aktivnosti, dok hipoksija tijekom ekspirija dovodi do povećanja simpatičke aktivnosti (36).

Sistemska primjena selektivnog antagonista alfa2-adrenoreceptora johimbina dovela je do snažnije aktivacije simpatičkog sustava pri izlaganju akutnoj ponavljanoj hipoksiji u odnosu na učinak izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji bez primjene johimbina. Ovakav rezultat je u skladu s dosada opisanim učinkom johimbina za kojeg je poznato da dovodi do povećanja aktivnosti simpatikusa u fiziološkim uvjetima (37). Ponavljana hipoksija utječe na noradrenalinski sustav koji je neuroanatomski povezan s rafe serotoninskim neuronima, respiracijskim neuronima i jezgrom freničkoga živca. Serotoninski i noradrenalinski neurotransmiteri mehanizmom „povuci-potegni“ (engl. *push-pull*), na supraspinalnoj razini, izazivaju različite promjene aktivnosti freničkog živca (31). Njihovom kemijskom modulacijom možemo otkriti utjecaj serotoninskih, ali i alfa2-adrenoreceptora na promjene

aktivnosti simpatičkog i respiracijskog sustava izazvane akutnom ponavljanom hipoksijom. Sistemska primjena otežava izvođenje zaključka o mjestu djelovanja johimbina obzirom na široku rasprostranjenost alfa2-adrenoreceptora unutar i izvan središnjeg živčanog sustava.

Akutna hipoksija klinički je važan čimbenik rizika kojem su izloženi ljudi koji boluju od poremećaja disanja tijekom spavanja poput opstrukcijske apneje tijekom spavanja gdje uslijed ponavljanih epizoda hipoksije dolazi do dugoročnih promjena poput kronične hipoksije i hiperkapnije tijekom spavanja, ili pak dugoročne aktivacije simpatičkog sustava koji može dovesti do nastanka kroničnih bolesti poput primjerice arterijske hipertenzije.

Važan čimbenik u procjeni promjene simpatičke aktivnosti je i promjena arterijskog tlaka. U oba slučaja u našem istraživanju u kontrolnoj i pokusnoj skupini tretiranoj johimbinom prije izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji, došlo je do smanjenja srednjeg arterijskog tlaka, međutim, bez značajne razlike između skupina. Brojna dosadašnja istraživanja o promjenama tlaka prilikom izlaganja ponavljanim hipoksijama daju različite rezultate. Neka istraživanja pokazuju da dolazi do povećanja srednjeg arterijskog tlaka (38) ili dolazi do blagog prvotnog povećanja u sistoličkom te kasnijeg smanjenja dijastoličkog tlaka (39) ili pak do smanjenja srednjeg arterijskog tlaka (40).

Treba uzeti u obzir da se pojam akutne ponavljane hipoksije može drastično razlikovati između različitih istraživanja u pogledu težine hipoksije (postotak kisika u udahnutom zraku), trajanja pojedine hipoksijske epizode, broja hipoksijskih i reoksigenacijskih ciklusa, kumulativnog trajanja hipoksija, te drugih relevantnih parametara poput razine ugljikovog dioksida u arterijskoj krvi. Pokazano je da umjerena hipoksija (9 – 16% udahnuti O_2) i mali broj epizoda (3 – 15 epizoda dnevno) najčešće ima blagotvorne učinke na povišeni arterijski tlak bez popratnih patoloških promjena, dok teška hipoksija (2 – 8% udahnuti O_2) i veći broj epizoda (48 – 2400 epizoda dnevno) dovode do izraženijih progresivnih patoloških promjena i povišenog arterijskog tlaka (40). U našem istraživanju korišten je protokol izlaganja 5 trominutnih akutnih hipoksija (FiO_2=0,09) odvojenih trominutnim hiperoksijama (FiO_2=0,5) te je cilj bio opisati akutne promjene nastale u aktivnosti renalnoga živca u pet hipoksijskih epizoda i 15 minuta nakon posljednje hipoksijske epizode.

Nadalje, dobiveni su suprotni rezultati od dosada opisanih o učinku johimbina na arterijski tlak za kojeg je poznato da putem povišene aktivnosti simpatičkog sustava uzrokuje porast arterijskog tlaka (41). Ako se razmotri mogući lokalni antagonistički utjecaj johimbina

na sve prije opisane receptore, dobiveni rezultati smanjenog srednjeg arterijskog tlaka mogu se pripisati vazodilatacijskom učinku blokade alfa1-adrenoreceptora, alfa2-adrenoreceptora te 5-HT_2 receptora.

Ovo istraživanje ima određena ograničenja. Sistemska modulacija alfa-adrenoreceptora s pomoću intravenske primjene johimbina ne dozvoljava mogućnost izvođenja jednoznačnog zaključka o mogućem mjestu modulacije receptora. Ostaje za istražiti radi li se o modulaciji na spinalnoj i/ili supraspinalnoj razini, stoga će u budućim istraživanjima izravnom primjenom lijekova i kemijskom modulacijom receptorske aktivnosti u ciljanim područjima mozga, primjerice *locus coeruleus* području, biti moguće izvesti zaključak o mjestu modulacije receptora kako bi se bolje istražili neuronski krugovi u podlozi promjene simpatičke aktivnosti prilikom izlaganja ponavljanim hipoksijama. Isto tako i ponavljana hiperkapnija ima veliki klinički značaj u promjeni aktivnosti simpatičkog sustava obzirom na dokaze da ponavljana hiperkapnija aktivira noradrenalinski sustav koji djeluje inhibicijski na neuronske krugove produljene moždine uključene u neuralnu kontrolu disanja. Stoga u budućim istraživanjima treba ispitati učinak ponavljanih hipoksija i hiperkapnija na aktivnost simpatičkog sustava u cilju boljeg razumijevanja patofizioloških mehanizama u podlozi razvoja promjena arterijskog tlaka u animalnim modelima opstrukcijske apneje tijekom spavanja.

6. ZAKLJUČAK

Akutna ponavljana hipoksija dovodi do smanjenja simpatičke aktivnosti mjerene aktivnošću renalnog živca, dok intravenska primjena johimbina uzrokuje povećanje simpatičke aktivnosti prilikom izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji.

Za vrijeme hipoksije također dolazi do smanjenja srednjeg arterijskog tlaka u obje ispitivane skupine, dok se 15 minuta nakon izlaganja posljednjoj hipoksiji arterijski tlak sporije vraća na početne vrijednosti u skupini kojoj je primjenjen johimbin.

Sistemska primjena otežava izvođenje zaključka o mjestu djelovanja johimbina obzirom na široku rasprostranjenost alfa2-adrenoreceptora unutar i izvan središnjeg živčanog sustava.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Katzung BG. Uvod u farmakologiju autonomnoga živčanog sustava. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 77-94.

2. Guyton AC, Hall JE. Autonomni živčani sustav i srž nadbubrežne žlijezde. U: Guyton AC, Hall JE, ur. Medicinska fiziologija udžbenik. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 729-41.

3. Biaggioni I, Robertson D. Agonisti adrenergičkih receptora i simpatomimetici. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 127-48.

4. O'Halloran KD, Herman JK, Bisgard GE. Ventilatory effects of alpha2-adrenoceptor blockade in awake goats. Respir Physiol. 2001;126(1):29-41.

5. Lagneaux D, Lecomte J. Alpha 2 adrenergic control of ventilation in the rat. Arch Int Physiol Biochim. 1990;98(6):445-53.

6. Menegaz RG, Kapusta DR, Mauad H, de Melo Cabral A. Activation of alpha(2)-receptors in the rostral ventrolateral medulla evokes natriuresis by a renal nerve mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001;281(1):R98-R107.

7. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. J Recept Signal Transduct Res. 2004;24(3):165-205.

8. Williams GV, Castner SA. Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. Neuroscience. 2006;139(1):263-76.

9. Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. Arch Neurol. 2004;61(5):641-4.

10. Katzung BG. Histamin, serotonin i ergot alkaloidi. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 271-92.

11. Katzung BG. Uvod. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 1-14.

12. Robertson D, Biaggioni I. Antagonisti adrenergičkih receptora. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 149-66.

13. Scientific Opinion on the evaluation of the safety in use of Yohimbe (Pausinystalia yohimbe (K. Schum.) Pierre ex Beille) [Internet]. Parma, Italy: EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food); 2013. str. 46. [citirano 28. svibnja 2018.]. Dostupno na: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3302

14. Lacomblez L, Bensimon G, Isnard F, Diquet B, Lecrubier Y, Puech AJ. Effect of yohimbine on blood pressure in patients with depression and orthostatic hypotension induced by clomipramine. Clin Pharmacol Ther. 1989;45(3):241-51.

15. Millan MJ, Newman-Tancredi A, Audinot V, Cussac D, Lejeune F, Nicolas JP, i sur. Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha(2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)(1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D(2) and D(3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. Synapse. 2000;35(2):79-95.

16. Kuo YJ, Keeton TK. Is the sympathoexcitatory effect of yohimbine determined by brain yohimbine concentration? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1991;344(3):308-13.

17. Zaretsky DV, Zaretskaia MV, DiMicco JA, Rusyniak DE. Yohimbine is a 5-HT1A agonist in rats in doses exceeding 1 mg/kg. Neurosci Lett. 2015;606:215-9.

18. Samuel J, Franklin C. Hypoxemia and Hypoxia. U: Myers JA, Millikan KW, Saclarides TJ, ur. Common Surgical Diseases. New York, NY: Springer; 2008. str. 391-4.

19. Guyton AC, Hall JE. Insuficijencija disanja - patofiziologija, dijagnoza, liječenje kisikom. U: Guyton AC, Hall JE, ur. Medicinska fiziologija udžbenik. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str. 515-23.

20. Gamulin S. Poremećaji energijskog metabolizma. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, ur. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 155-81.

21. Lusina SJ, Kennedy PM, Inglis JT, McKenzie DC, Ayas NT, Sheel AW. Long-term intermittent hypoxia increases sympathetic activity and chemosensitivity during acute hypoxia in humans. J Physiol. 2006;575(Pt 3):961-70.

22. Hallgrímsson B, Benediktsson H, Vize PD. Anatomy and Histology of the Human Urinary System. U: Vize PD, Woolf AS, Bard JBL, ur. The Kidney From Normal Development to Congenital Disease: Academic Press; 1 edition; 2003. str. 149-64.

23. Gray HFRS. The Great Plexuses of the Sympathetic System. U: Gray HFRS, ur. Anatomy of the Human Body. Philadelphia and New York: Lea & Febiger; 1918. str. 984-90.

24. DiBona GF. Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(3):R633-41.

25. Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC 3rd, Stauss H, Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. J Appl Physiol (1985). 1992;72(5):1978-84.

26. Fletcher EC, Bao G. Effect of episodic eucapnic and hypocapnic hypoxia on systemic blood pressure in hypertension-prone rats. J Appl Physiol (1985). 1996;81(5):2088-94.

27. Bao G, Metreveli N, Li R, Taylor A, Fletcher EC. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. J Appl Physiol (1985). 1997;83(1):95-101.

28. Dick TE, Hsieh YH, Wang N, Prabhakar N. Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. Exp Physiol. 2007;92(1):87-97.

29. Bach KB, Mitchell GS. Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. Respir Physiol. 1996;104(2-3):251-60.

30. Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. Respir Physiol. 1980;42(3):171-88.

31. Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS. Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001;130(2):207-18.

32. Fletcher EC, Bao G, Li R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. Hypertension. 1999;34(2):309-14.

33. Fletcher EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. Respir Physiol. 2000;119(2-3):189-97.

34. Burgess DE, Hundley JC, Li SG, Randall DC, Brown DR. Multifiber renal SNA recordings predict mean arterial blood pressure in unanesthetized rat. Am J Physiol. 1997;273(3 Pt 2):R851-7.

35. Xie A, Skatrud JB, Puleo DS, Morgan BJ. Exposure to hypoxia produces long-lasting sympathetic activation in humans. J Appl Physiol (1985). 2001;91(4):1555-62.

36. Mandel DA, Schreihofer AM. Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats. J Physiol. 2009;587(Pt 2):461-75.

37. Murburg MM, Villacres EC, Ko GN, Veith RC. Effects of yohimbine on human sympathetic nervous system function. J Clin Endocrinol Metab. 1991;73(4):861-5.

38. Wszedybyl-Winklewska M, Wolf J, Swierblewska E, Kunicka K, Gruszecka A, Gruszecki M, i sur. Acute hypoxia diminishes the relationship between blood pressure and subarachnoid space width oscillations at the human cardiac frequency. PloS One. 2017;12(2):e0172842.

39. Zhao SM, He XJ, Jin L, Huang LJ, Wang CB, Liang ZR, i sur. Effects of acute hypoxia on the blood pressure heart rate, microvessels response and free radical in rabbit. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 2003;19(4):341-4.

40. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014;307(10):R1181-97.

41. Swann AC, Lijffijt M, Lane SD, Cox B, Steinberg JL, Moeller FG. Norepinephrine and impulsivity: effects of acute yohimbine. Psychopharmacology (Berl). 2013;229(1):83-94.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak blokiranja alfa2-adrenoreceptora na aktivnost simpatičkog autonomnog sustava mjerenu promjenama aktivnosti renalnog živca pri izlaganju akutnim ponavljanim hipoksijama u štakora.

Materijal i metode: Pokusi su izvedeni na 13 uretanom anesteziranih, vagotimiziranih i mehanički ventiliranih mužjaka štakora soja Sprague-Dawley, tjelesne mase 300-350 g. Simpatička aktivnost praćena je snimanjem lijevog renalnog živca. U pokusnoj skupini (N=7) životinjama je 10 minuta prije izlaganja AIH protokolu (5 x 3 min 9% O_2) intravenski injiciran antagonist alfa2-adrenoreceptora johimbin (1 mg/kg). Analizirana je simpatička aktivnost i srednji arterijski tlak tijekom svih pet hipoksija (H1-H5), te 15 minuta (T15) nakon zadnje hipoksije. Promjena aktivnosti živca i vrijednosti tlaka uspoređene su s vrijednostima u bazalnim uvjetima prije izlaganja hipoksiji (T0). Kontrolnoj skupini (N=6) je umjesto johimbina intravenski injicirana ista količina fiziološke otopine te su životinje podvrgnute AIH protokolu.

Rezultati: U kontrolnoj skupini tijekom AIH protokola dolazi do povećanja RSNA u H1 (142,34±38,46%; p=0,043) te značajnog smanjenja u H5 i T15 (61,46±32,39%; p=0,033; 61,88±33,66%; p=0,039) u odnosu na T0. U pokusnoj skupini značajno povećanje RSNA aktivnosti zabilježeno je samo u H1 (206,56±90,74%, p=0,021). RSNA aktivnost značajno se razlikuje između kontrolne i pokusne skupine u točkama H2, H3, H4 i H5 (p=0,022; p=0,010; p=0,010; p=0,010). Izlaganje akutnoj ponavljanoj hipoksiji dovodi do smanjenja srednjeg arterijskog tlaka u pokusnoj i kontrolnoj skupini u odnosu na bazalnu vrijednost (67,79±13,67% vs. 75,58±12,28%; p=0,195).

Zaključci: Akutna ponavljana hipoksija dovodi do smanjenja simpatičke aktivnosti mjerene aktivnošću renalnog živca, dok intravenska primjena johimbina uzrokuje povećanje simpatičke aktivnosti prilikom izlaganja akutnoj ponavljanoj hipoksiji. Sistemska primjena otežava izvođenje zaključka o mjestu djelovanja johimbina obzirom na široku rasprostranjenost alfa2-adrenoreceptora unutar i izvan središnjeg živčanog sustava.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: The effect of alpha2-adrenoreceptors on renal sympathetic activity (RSNA) during exposure to acute intermittent hypoxia (AIH) in rats

Objectives and background: The aim of this research was to determine the effects of alpha2-adrenoreceptors blockade on sympathetic nervous system measured by changes in renal nerve activity during acute intermittent hypoxia in rats.

Material and methods: Experiments were carried out on 13 urethane anesthetized, vagotomized and mechanically ventilated male Sprague-Dawley rats weighing 300-350 g. Sympathetic activity was monitored on the left renal nerve. Ten minutes prior to exposure to the AIH protocol (5 x 3 min 9% O_2) alpha2-adrenergic antagonist yohimbine (1 mg/kg) was intravenously administered in the experimental group (N=7). During all 5 hypoxic events (H1-H5) of the AIH protocol and 15 minutes (T15) after the last hypoxia, sympathetic activity and mean arterial pressure were analyzed. Changes in the activity of the nerve and values of blood pressure were compared to the values of the baseline conditions before exposure to hypoxia (T0). The control group (N=6) received intravenous injection of the saline instead of yohimbine and underwent AIH protocol.

Results: During AIH protocol the control group showed significant increase of RSNA activity in H1 (142.34±38.46%; p=0.043) and decrease in H5 and T15 (61.46±32.39%; p=0.033; 61.88±33.66%; p=0.039) compared to T0. In the experimental group, significant increase of RSNA activity was seen only in H1 (206.56±90.74%; p=0.021). RSNA activity was significantly different between the control and the experimental group in H2, H3, H4 and H5 (p=0.022; p=0.010; p=0.010; p=0.010). Exposure to acute intermittent hypoxia leads to decrease of mean arterial pressure in both experimental and control group compared to the baseline values (67.79±13.67% vs. 75.58±12.28%; p=0.195).

Conclusions: Acute intermittent hypoxia leads to decreased sympathetic nerve activity measured by renal nerve activity, whereas intravenous administration of yohimbine evokes increase of sympathetic nerve activity during exposure to acute intermittent hypoxia. Systemic administration prevented us from drawing conclusions about precise site of action of yohimbine since alpha2-adrenoreceptors are dispersed throughout the central and peripheral nervous system.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Ivan Kraljević

Datum rođenja: 24. listopada 1993.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Domovinskog rata 17, Split, Hrvatska

Mobitel: +385981853969

E-mail: ivan.kraljevic93@gmail.com

OBRAZOVANJE

2000. – 2008.	Osnovna škola „Manuš“, Split
2008. – 2012.	III. gimnazija, Split
2012. – 2018.	Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Medicina

ZNANJA I VJEŠTINE

- aktivno služenje engleskim jezikom (razina B2)
- aktivno služenje talijanskim jezikom (razina B1.2)
- pasivno korištenje njemačkog jezika
- poznavanje latinskog jezika
- vozačka dozvola B kategorije
- osnove programiranja u jezicima C i C++

AKTIVNOSTI

2013. – 2018.	član Povjerenstva za unutarnju prosudbu sustava osiguranja kvalitete Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
2014. – 2018.	demonstrator na Katedri za neuroznanost
2015.	sudjelovanje na FameLab natjecanju
2015.	sudjelovanje na Festivalu znanosti – radionice
2015.	sudjelovanje na 14. Tjednu mozga – predavanja u srednjim školama
2015. – 2016.	član studentske sekcije za neuroznanost NeuroSplit
2016.	aktivno sudjelovanje na 6. studentskom kongresu za neuroznanost NeuRi uz osvajanje nagrade za najbolju oralnu prezentaciju
2016.	sudjelovanje na 15. Tjednu mozga – predavanja u srednjim školama

2016.	praksa na fakultetu „Medical College of Wisconsin“ te u Sveučilišnoj bolnici „Froedtert Hospital“, Milwaukee, Wisconsin, SAD
2017.	praksa u Sveučilišnoj bolnici „Penn State Health Milton S. Hershey Medical Center“, Hershey, Pennsylvania, SAD
2018.	aktivno sudjelovanje na 8. studentskom kongresu za neuroznanost NeuRi
2018.	demonstrator na Katedri za medicinsku propedeutiku
2018.	član udruge CroMSIC