

**Petra Zubin Maslov, dr. med.**

Znanstveni novak

Zavod za integrativnu fiziologiju

Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Tel: 021 557 889

E-mail: [petra.zubin@mefst.hr](mailto:petra.zubin@mefst.hr)

## **POVJERENSTVU ZA DOKTORATE**

Predmet: OBRAZLOŽENJE TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

Naslov teme: „**OBRAZAC AKTIVACIJE SIMPATIČKOG ŽIVČANOG SUSTAVA  
U BOLESNIKA SA KRONIČNIM STABILNIM SRČANIM  
ZATAJENJEM I U ZDRAVIH KONTROLNIH ISPITANIKA**“

Mentor: prof. dr. Željko Dujić, dr.med.

Pročelnik Zavoda za integrativnu fiziologiju

Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Tel: 021 557 906

E-mail: [zeljko.dujic@mefst.hr](mailto:zeljko.dujic@mefst.hr)

## 1. UVOD

Simpatički dio živčanog sustava predstavlja važni kontrolni mehanizam u kontroli arterijskog tlaka. Regulirajući stupanj vazokonstrukcije u krvnim žilama, utječe na promjene krvnog protoka, perifernog otpora te konačno na promjene arterijskog tlaka. Mjerenje aktivnosti simpatičkog živčanog sustava je izrazito složeno kod ljudi. Metode mjerenja se mogu podijeliti u dvije skupine: indirektne i direktne. Indirektne metode mjerenja autonomnog živčanog sustava uključuju mjerenje arterijskog tlaka, srčane frekvencije, mjerenje varijabilnost srčane frekvencije, te određivanje protoka krvi. Iako je mjerenje koncentracije adrenalina u plazmi i urinu jedan od direktnijih načina mjerenja simpatičke aktivnosti, metoda se pokazala nepouzdanom zbog niske osjetljivosti i nemogućnosti mjerenja regionalne simpatičke aktivnosti. Zlatni standard u kvantificiranju simpatičkog živčanog sustava je bila metoda praćenja kinetike noradrenalina radionuklidima (engl. *norepinephrine spillover rate*) (1). Osnova ove tehnike je određivanje arteriovenske razlike u razini noradrenalina, korigirana za ekstrakciju arterijskog noradrenalina u organu u kojem se noradrenalin „spillover“ mjeri, pomnožena sa protokom plazme kroz isti organ. Ovom se tehnikom može mjeriti regionalna simpatička aktivnost, npr. u koronarnom sinusu ili u bubrežnim venama (2;3).

Mikroneurografija je za sada jedina direktna metoda snimanja simpatičke živčane aktivnosti u ljudi (4). U navedenoj tehnici se koristi mikroelektroda od volframa sa vrhom promjera 1-5  $\mu\text{m}$ . Najčešće mjesto snimanja je peronealni živac koji zbog anatomske položaja iza glave fibule omogućava istraživaču relativno lagan pristup živcu. Mikroneurografijom se može mjeriti aktivnost postganglijskih simpatičkih vlakana koji inerviraju krvne žile u mišićima (mišićna simpatička živčana aktivnost) ili simpatičkih vlakana koja inerviraju kožu (kožna simpatička živčana aktivnost). Simpatička vlakna zajedno sa motoričkim i senzornim vlaknima čine miješane periferne živce. Za razliku od radionuklidne tehnike određivanja noradrenalina kojom se mjeri regionalna simpatička aktivnost u određenom trenutku, mikroneurografija omogućava kontinuirano praćenje mišićne simpatičke aktivnosti kroz određeno vrijeme i tijekom primjene različitih podražaja (2). Ovom metodom otkriven je karakterističan obrazac izbijanja simpatičkih vlakana koja za razliku od motoričkih živaca, imaju konstantnu toničku aktivnost. Ipak, aktivacija baroreceptora tijekom srčane sistole inhibira okidanje simpatičkih vlakana te je odgovorna za fazički obrazac okidanja sinkroniziran sa frekvencijom rada srca. Istovremena aktivnost više

simpatičkih živaca stvara simpatička izbijanja (engl. „bursts“), a kvantificira se kao broj izbijanja tijekom 100 srčanih otkucaja ili kao broj izbijanja u 1 minuti. Ovaj način kvantificiranja simpatičke aktivnosti zove se integrirani signal jer registrira integriranu aktivnost skupine vlakana unutar simpatičkog izbijanja, a ne pojedinog simpatičkog vlakna.

Drugi način kvantificiranja simpatičke živčane aktivnosti u ljudi je snimanje aktivnosti pojedinačnih simpatičkih vlakana sa mikroelektrodom manjeg otpora ( $10 \Omega$ ) i manje površine snimanja (5-7). Ovim načinom mikroelektroda registrira samo aktivnost najbližeg-jednog simpatičkog neurona, a ne cijele skupine neurona kao što je to kod snimanja integriranog signala sa mikroelektrodom većeg otpora ( $100 \Omega$ ) i veće površine snimanja. Metodom snimanja pojedinačnog simpatičkog neurona otkriveno je da, kod zdravih ispitanika, do porasta simpatičke aktivnosti može doći: 1) porastom frekvencije okidanja pojedinog simpatičkog vlakna u više različitih simpatičkih izbijanja ili 2) ponavljanim okidanjem istog vlakna tijekom jednog simpatičkog izbijanja (5). Nedostatak ove metode je nemogućnost registriranja (većih) simpatičkih neurona koji nisu aktivni tijekom mirovanja, ali postaju aktivni tijekom primjene podražaja (npr. uslijed naglog pada arterijskog tlaka).

Najnovija metoda analize okidanja simpatičkih vlakana koja će biti korištena u ovom istraživanju je identifikacija akcijskih potencijala iz „sirovog“, filtriranog zapisa snimljene aktivnosti mišićnih simpatičkih neurona (8;9). Pomoću tehnike „*continuous wavelet transform*“ se detektiraju akcijski potencijali u snimljenom neurogramu, te se raspoređuju po veličini amplitude u skupove (engl. *clusters*). Ovom metodom mogu se identificirati akcijski potencijali koji pripadaju simpatičkim neuronima različite veličine, te se nedavno pokazalo da je obrazac aktivacije simpatičkog sustava sličan onome koji se javlja u vlaknima motoneurona- prvi se aktiviraju manji, a potom veći neuroni (Hennemanov princip)(10-12).

Povećana aktivnost simpatičkog dijela autonomnog živčanog sustava je povezana sa kardiovaskularnim oboljenjima, prije svega sa pretilošću, arterijskom hipertenzijom, opstruktivnom apnejom u spavanju i srčanim zatajenjem (2;13;14). Smanjeni srčani minutni volumen i slabija krvna opskrba u tkivima su glavni pokretači aktivacije simpatičke aktivnosti u kroničnom srčanom zatajenju. Dosadašnja istraživanja su pokazala da stupanj simpatičke aktivnosti korelira sa težinom srčanog zatajenja, te sa lošijom dugoročnom prognozom ovih bolesnika (14;15). Točan patofiziološki proces koji vodi porastu simpatičke aktivnosti u srčanom zatajenju još uvijek nije u potpunosti jasan. Jedan dio dosadašnjih studija naglašava važnost oslabljene funkcije baroreceptora u aktivaciji simpatičkog sustava, koji se uslijed kronično smanjenog sistoličkog tlaka i smanjenog tlaka pulsa u srčanom zatajenju slabije rastežu i uzrokuju smanjenu inhibiciju simpatičkog živčanog sustava (16). Druge studije

smatraju da su glavna odrednica porasta simpatičke aktivnosti u srčanom zatajenju smanjeni plućni volumeni kao posljedica ponavljanih plućnih edema i postupnog razvoja restriktivnih plućnih smetnji (17). Smanjen respiracijski volumen i povećana frekvencija disanja su karakteristični za srčano zatajenje i uzrokuju smanjenu aktivaciju plućnih aferentnih receptora na istezanje, te smanjenu inhibiciju simpatičkog okidanja. Dosadašnja istraživanja također pokazuju povećani odgovor kemoreceptora na hiperkapniju u pacijenata sa kroničnim srčanim zatajenjem, što vodi povećanoj simpatičkoj aktivnosti (18). Novija istraživanja ukazuju na selektivnost porasta simpatičke aktivnosti u srčanom zatajenju u srcu, bubrezima i mišićima, organima važnim za održavanje kardiovaskularne homeostaze, dok su splahnjički i kožni krvožilni sustav pošteđeni porasta simpatičke aktivnosti (2). Porast srčane simpatičke aktivnosti preko porasta cAMP otvara kalcijске kanale na membrani srčanih stanica, uzrokuje poremećaj u ravnoteži kalcija između izvanstranične tekućine te staničnog citosola i endoplazmatske mrežice, te rezultira pojavom spontanih depolarizacija, prijevremenih ventrikulskih kontrakcija i nagle smrti (2). O važnosti poremećaja simpatičke živčane aktivnosti govori činjenica da je okosnica međunarodnih smjernica za terapiju kroničnog srčanog zatajenja usmjerena na smanjenje simpatičke aktivnosti, te aktivnosti renin-angiotenzin sustava. Navedena terapija pokazala je smanjenje smrtnost u ovih bolesnika za 30-60% (19;20).

Za predloženo istraživanje pretraživala sam bazu medicinskih literaturnih radova PubMed, zadnji put 07.02. 2013. za potrebe Studije II. Pri pretraživanju navedene baze koristila sam ograničenje jezika (engleski jezik), ali nisam koristila ograničenje vrste publikacije. Pojmovi koji se pojavljuju u naslovu ili sažetku publikacija korišteni u traženju literature vezane za temu ovog istraživanja su : 'Chronic heart failure', 'Muscle sympathetic nerve activity', 'Action potential detection', 'Microneurography', 'Continuous positive airway pressure', 'Premature ventricular contractions'. Pojam 'Chronic heart failure' kombinirala sam poveznikom 'AND' sa ostalim navedenim pojmovima. Ovim načinom pretraživanja pronašla sam 323 reference. Čitanjem naslova i sažetaka radova smanjila sam broj istraživanja koja se odnose na moju temu na 114 referenca. Nakon čitanja pronađenih radova odbacila sam još 52 rada zbog drugačijih kriterija uključivanja pacijenata sa srčanim zatajenjem i zbog neodgovarajuće tematike koja je značajno odstupala od predložene teme. Preostala 62 rada citirana su u dvije studije u ovom istraživanju (55 originalnih članaka i 7 preglednih članaka).

## **2. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA**

Iako je povećana aktivnost simpatičkog živčanog sustava kod bolesnika sa srčanim zatajenjem poznati kompenzacijski mehanizam koji naposljetku vodi u pogoršanje srčane funkcije, točan obrazac aktivacije postganglijskih simpatičkih živčanih vlakana nije u potpunosti razjašnjen. Suprotstavljena su saznanja i o utjecaju nefarmakoloških oblika liječenja srčanog zatajenja, kao što je primjena kontinuiranog pozitivnog tlaka, na mehanizam aktivacije simpatičkog sustava (21-24). Nadalje, postavlja se pitanje da li bolesnici sa kroničnim srčanim zatajenjem, zbog konstantno povećane bazalne simpatičke aktivnosti, imaju promijenjen obrazac aktivacije „rezerve“ simpatičkih vlakana koja predstavlja odgovor na kardiovaskularni stres (npr. nagli pad arterijskog tlaka).

## **3. HIPOTEZA**

### **Studija I**

Bolesnici sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem imaju veći broj aktivnih simpatičkih neurona i veću frekvenciju okidanja akcijskih potencijala tijekom sinus ritma u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

U bolesnika sa kroničnim srčanim zatajenjem nagli pad arterijskog tlaka uzrokovan prijevremenskim ventrikulskim kontrakcijama rezultira povećanjem simpatičke aktivnosti kroz sličan obrazac aktivacije simpatičkih postganglijskih neurona kao i u zdravih kontrolnih ispitanika, ali je ukupan simpatički odgovor manji kod bolesnika sa srčanim zatajenjem nego kod zdravih kontrolnih ispitanika.

### **Studija II**

Kratkotrajna primjena kontinuiranog pozitivnog tlaka u bolesnika sa kroničnim srčanim zatajenjem rezultira aktivacijom plućnih aferentnih receptora za istežanje, te refleksnim većim padom simpatičke aktivnosti u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike.

## **4. CILJ ISTRAŽIVANJA**

### **Studija I**

Cilj predloženog istraživanja je utvrditi obrazac simpatičke aktivacije bolesnika sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem koji se javlja uslijed kardiovaskularnog stresa. Metodom mikroneurografije kvantificirali bi refleksni porast simpatičke aktivnosti koji se javlja zbog smanjenog udarnog volumena neposredno nakon prijevremenske ventrikulske kontrakcije srca. Uz pomoć specifične tehnike analize neurograma iz „sirovog“, filtriranog

zapisa simpatičke živčane aktivnosti bi se identificirali akcijski potencijali tijekom sinus ritma i akcijski potencijali neposredno nakon prijevremenske ventrikulske kontrakcije. Izdvojeni akcijski potencijali bi se svrstali u skupine (engl. *cluster-e*) prema veličini amplitude. Rezultate dobivene navedenom analizom u bolesnika sa srčanim zatajenjem usporedili bi sa rezultatima dobivenim istom analizom u zdravih kontrolnih ispitanika.

## Studija II

Cilj u ovom istraživanju je utvrditi utjecaj disanja sa kratkotrajnom primjenom kontinuiranog pozitivnog tlaka na aktivnost mišićnih simpatičkih živčanih vlakana u pacijenata sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem, te napraviti usporedbu sa zdravim, kontrolnim ispitanicima.

## 5. USTROJ ISTRAŽIVANJA

Predloženo znanstveno istraživanje prema pristupu pripada skupini prospektivnih eksperimentalnih istraživanja sa ispitivanom i kontrolnom skupinom ispitanika.

Razina istraživanja je temeljna, ali rezultati istraživanja pridonijeti će boljem razumijevanju patofiziologije srčanog zatajenja u kliničkoj praksi.

Način prikupljanja podataka je intervencijski.

Izvor prikupljanja podataka je primaran-vlastiti podaci prikupljeni i analizirani tijekom ovog istraživanja biti će korišteni u prikazu rezultata.

## 6. ISHOD ISTRAŽIVANJA

Na temelju postojeće literature o povećanoj simpatičkoj živčanoj aktivnosti u bolesnika sa srčanim zatajenjem, očekujemo da će analiza pojedinačnih akcijskih potencijala u ovom istraživanju pokazati veći broj aktivnih simpatičkih vlakana i veću aktivnost pojedinog simpatičkog vlakna u bolesnika sa srčanim zatajenjem u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Kvantificirano metodom integriranog signala očekujemo razliku među skupinama u frekvenciji izbijanja simpatičke živčane aktivnosti od minimalno 50%. Očekujemo i da će bolesnici sa stabilnim srčanim zatajenjem pokazati postojanje „rezerve“ simpatičke aktivnosti kao odgovor na nagli pad arterijskog tlaka ili kroz porast frekvencije okidanja pojedinačnih vlakana ili kroz regrutaciju novih, većih simpatičkih vlakana koji su neaktivni u mirovanju.

Na temelju dosadašnjih istraživanja, u kojima se klinički značajnim smatrao pad frekvencije simpatičkih izbijanja za ~ 20% nakon primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka, u studiji II očekuje se sličan pad simpatičke aktivnosti mjerene integriranim signalom tijekom

primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka (25). Očekuje se i pad frekvencije okidanja pojedinačnih simpatičkih vlakana tijekom primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka, što će se po prvi put kvantificirati posebnom računalnom aplikacijom analize neurograma (Metode istraživanja) u bolesnika sa kroničnim srčanim zatajenjem i zdravih starijih ispitanika.

## **7. METODE ISTRAŽIVANJA**

### **a) Ispitanici**

Ispitivanu skupinu u obje studije će sačinjavati pacijenti sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem. Kontrolna skupina će se sastojati od zdravih kontrolnih ispitanika koji će po spolu i dobi odgovarati ispitnoj skupini.

Kriteriji uključenja ispitanika u ispitivanu skupinu za obje studije su slijedeći: medicinski dokumentirana dijagnoza kroničnog srčanog zatajenja, dob ispitanika od 20 do 70 godina, izbačajna frakcija lijeve klijetke <40%, *New York Heart Association classification (NYHA class)* I-III, stabilna bolest (bez hospitalizacije unatrag 1 mjesec prije studije). Za studiju I dodatni kriterij uključenja će biti pojava prijevremenskih ventrikulskih kontrakcija.

Kriteriji isključenja su slijedeći: atrijska fibrilacija, ugrađeni elektrostimulator srca, pušenje, alkoholizam, te prisutnost komorbiditeta kao što su bubrežno zatajenje, kronične plućne bolesti, preboljeli cerebrovaskularni inzult, opstruktivna apneja u spavanju, hepatitis B i C i imunodeficijencije.

Nekoliko načina će se koristiti za odabir i uvrštavanje ispitivane skupine ispitanika u istraživanje. Za početak će se koristiti Hrvatski registar bolesnika sa srčanim zatajenjem, iz kojega će se tražiti i telefonskim putem kontaktirati bolesnici koji odgovaraju gore navedenim kriterijima uključenja i isključenja. Ipak, zbog nedostupnosti velikog broja bolesnika iz registra (mjesta prebivališta udaljena od Splita), te nemogućnosti pretraživanja registra po određenim kriterijima, drugi način prikupljanja podataka biti će ambulantni bolesnici koji dolaze na kontrolni pregled u Klinički bolnički centar Split u kardiološke ambulante Klinike za unutarnje bolesti. Za ovaj način prikupljanja podataka sastavljen je poseban obrazac za liječnike kardiologe koji rade u ambulantama Klinike za unutarnje bolesti KBC Split, koji bi olakšao prepoznavanje i odabir odgovarajućih ispitanika za predloženo istraživanje. Treći izvor uključivanja bolesnika sa kroničnim srčanim zatajenjem, uz odobrenje Uprave KBC Split, biti će medicinska dokumentacija i kontakti bolesnika hospitaliziranih u Klinici za unutarnje bolesti KBC Split unatrag zadnjih 5 godina.

Kontrolna skupina ispitanika biti će regrutirana među poznanicima sudionika istraživanja, zaposlenog osoblja Medicinskog fakulteta u Splitu i KBC Split koji odgovaraju prema dobi i spolu ispitivanoj skupini, te nemaju kronične plućne ili kardiovaskularne bolesti.

Ovdje predloženo istraživanje je prvo koje će ispitati obrazac aktivacije simpatičkih vlakana niže navedenom metodom u zdravih ljudi starije životne dobi, te u bolesnika sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem. Zbog nedostatnosti podataka u literaturi o obrascu regrutacije simpatičkih vlakana detektirane nedavno razvijenom aplikacijom „*continuous wavelet transform*“ koja će se koristiti u ovom istraživanju, nismo u mogućnosti kvantificirati očekivanu razliku u okidanju i regrutaciji pojedinačnih simpatičkih neurona između skupina.

### **b) Postupci**

1. Povijest bolesti i klinički pregled. Svakom ispitaniku će se ispitati povijest bolesti i farmakološka terapija koju uzima, te napraviti klinički pregled.
2. Antropometrija. Svakom ispitaniku će se izmjeriti tjelesna visina i težina, te na osnovi dobivenih podataka odrediti indeks tjelesne mase.
3. Spirometrija. Ispitanicima će se napraviti dinamička spirometrija u stojećem položaju. Za tu svrhu koristit će se uređaj Quark PFT (Cosmed, Rim, Italija).
4. Ehokardiografija srca. U ležećem položaju na lijevom boku, ispitanicima će se ehokardiografijom procijeniti funkcija rada srca (Vivid Q, GE, Milwaukee, WI SAD).
5. Pulsni oksimetar. Na prst ispitanika će se postaviti infracrveni senzor za mjerenje zasićenosti hemoglobina kisikom u arterijskoj krvi. (Poet II, Criticare Systems, Waukesha, WI, SAD).
6. Srčano-krvožilni parametri. Za kontinuirano mjerenje arterijskog tlaka i frekvencije srčanog rada koristit će se Finometer uređaj (Finapres Medical Systems, Arnhem, Nizozemska).
7. EKG. Ispitanicima će se prije početka pokusa postaviti jedno-kanalni EKG uređaj (Dual Bio Amp/Stimulator, ADInstruments, Castle Hill, Australija).
8. Uzorci krvi. Uzorci krvi za biokemijsku analizu biti će uzeti iz podlaktične vene ispitanika te odneseni na analizu u laboratorij KBC Split.
9. Usnik spojen sa uređajem za primjenu kontinuiranog pozitivnog tlaka (BiPAP Vision, Respironics, Pittsburg, PA, SAD).
10. Snimanje mišićne simpatičke živčane aktivnosti mikroneurografijom. Prije uvođenja mikroelektrode za snimanje u živac, potrebno je odrediti točan tijek peronealnog živca uz pomoć kratkotrajnih impulsa (0.2 ms) električne struje, male voltaže (3-7 V). Za snimanje se koristi mikroelektroda visoke impedancije od volframa, vrha promjera 1 do



5 $\mu$ m (FHC Inc., Bowdoin, ME, SAD) koja se postavi u peronealni živac ispitanika. Druga, referentna elektroda se postavi pod kožu na udaljenosti od 3 cm od mjesta uvođenja prve, aktivne mikroelektrode. S obzirom da je za svrhu ovog istraživanja potrebno snimiti simpatička živčana vlakna, a da je njihov udio u peronealnom živcu ~ 8 %, potrebno je određeno vrijeme (nekada i do sat vremena) do pronalaska odgovarajućih živčanih vlakana karakterističnog zvuka i izgleda na neurogramu. Dobiveni signal će se pojačati 100 000 puta. Takav signal će se potom filtrirati u rasponu od 0,7 do 2,0 Hz, ispraviti, integrirati koristeći vremensku konstantu 0,1 s (662C-4, Nerve traffic analysis system, Bioengineering, The University of Iowa, Iowa City, IA, SAD) i spremiti za naknadnu analizu u osobno računalo.

#### 11. Aplikacija za detekciju pojedinačnih akcijskih potencijala iz sirovog neurograma.

Snimljeni podaci o simpatičkim vlaknima će se analizirati uz pomoć posebno razvijene aplikacije (APD v2, Aryan Samanpour, Neurovascular Research Laboratory, School of Kinesiology, Western Ontario, London, Ontario, Kanada). Ova aplikacija koristi tehniku „*continuous wavelet transform*“ za identifikaciju pojedinačnih akcijskih potencijala iz snimljenog neurograma. Označeni akcijski potencijali se potom raspoređuju u skupine (engl. *clusters*) prema veličini amplitude, te se određuje broj akcijskih potencijala u jednom izbijanju simpatičkih živčanih vlakana.

Signali iz svih uređaja će se povezati na analogno-digitalni pretvarač (Powerlab/16SP, ADInstruments, Castle Hill, Australija), pohraniti na osobno računalo te naknadno analizirati uz pomoć Chart računalnog programa (ADInstruments, verzija 5.5.6.7.).

#### **c) Protokol**

##### Studija I

Protokol pokusa obuhvatit će dolazak ispitanika kroz dva dana za redom u laboratorij Zavoda za integrativnu fiziologiju pri Medicinskom fakultetu u Splitu. Prvi dan ispitanici će biti upoznati sa svrhom i postupcima ovog znanstvenog istraživanja. Uzet će im se povijest bolesti i uzorci krvi za biokemijsku analizu te napraviti klinički pregled, EKG, spirometrija i ehokardiografija za procjenu srčane izbačajne frakcije. Drugi dan protokola će im se snimati mišićna simpatička aktivnost tijekom 10- 15 minuta mirnog disanja.

##### Studija II

Prvi dan protokola biti će isti kao i kod studije I uz dodatno upoznavanje sa disanjem kroz usnik i primjenu kontinuiranog pozitivnog tlaka. Drugi dan protokola nakon postavljanja mjernih uređaja na ispitanika u ležećem položaju, a prije početka snimanja, ispitanici će se odmarati i mirno disati kako bi se prilagodili na uvjete snimanja. Nakon 10 minuta odmora i

stabilizacije srčano-krvožilnih parametara stavit će im se usnik za disanje u usta povezan sa uređajem za primjenu kontinuiranog pozitivnog tlaka te će im se na nos staviti nosna štupaljka. 10 min ispitanici će disati sobni zrak kroz usnik, a nakon toga 5 min kontinuirani pozitivni tlak od 5 H<sub>2</sub>O, te 5 min kontinuirani pozitivni tlak od 10 H<sub>2</sub>O. Planirano je da ispitanik nastavi mirno ležati narednih 15 min za čije bi se vrijeme nastavilo snimanje fizioloških parametara i simpatičkih živčanih vlakana.

#### **d) Statistički postupci i analiza podataka**

Za analizu dobivenog zapisa simpatičke aktivnosti potrebno je identificirati izbijanja simpatičkih vlakana u snimljenom neurogramu. Kriteriji prepoznavanja su slijedeći: 1) omjer signal:šum u zapisu >2:1, 2) izbijanje mora biti sinkrono sa srčanim ciklusom (dijastola), 3) latencija u odnosu na R zubac u EKG zapisu od 0,9 do 1,5 s 4) karakterističan izgled izbijanja sa uzlaznom i silaznom komponentom, 5) porast aktivnosti u obliku porasta izbijanja nakon manevara koji povećavaju intratorakalni tlak (npr. Valsalva manevar), 6) izostanak porasta aktivnosti nakon podražaja glasnim zvukom ili podražajem kože.

Kvantifikacija simpatičke živčane aktivnosti. Na dva načina ćemo kvantificirati simpatičku živčanu aktivnost: 1) iz tradicionalnog, integriranog signala, te 2) analizom „sirovog“ signala iz kojeg ćemo dobiti informacije o aktivnosti pojedinih simpatičkih vlakana. Iz integriranog signala dobit ćemo kvantitativne varijable: 1) *frekvenciju izbijanja*- broj izbijanja u minuti i 2) *incidenciju izbijanja*- broj izbijanja tijekom 100 srčanih otkucaja. Nakon identifikacije akcijskih potencijala iz „sirovog“ zapisa, simpatičku aktivnost ćemo kvantificirati kao 1) *broj akcijskih potencijala u jednom izbijanju*, 2) *broj akcijskih potencijala u jednoj minuti* te 3) *učestalost izbijanja akcijskih potencijala koji prema veličini amplitude pripadaju različitim skupovima* (engl. *clusters*).

U studiji I akcijski potencijali će biti analizirani tijekom 6 srčanih otkucaja u sinus ritmu prije pojave prijevremenske ventrikulske kontrakcije, te će biti uspoređeni sa brojem i veličinom akcijskih potencijala unutar simpatičkog izbijanja neposredno nakon prijevremenske ventrikulske kontrakcije. Podjednak broj prijevremenskih ventrikulskih kontrakcija će biti analiziran u obje skupine.

U studiji II, srčano-krvožilni, ventilacijski parametri te parametri simpatičke aktivnosti će se analizirati tijekom 6 točaka: 1) tijekom 1 minute prije početka primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka, 2) tijekom prve i 3) zadnje minute primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka od 5 H<sub>2</sub>O, 4) tijekom prve i 5) zadnje minute primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka od 10 H<sub>2</sub>O, te 6) tijekom 1 minute oporavka 5 min nakon završetka primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka.

Svi analizom dobiveni podaci će biti prikazani kao aritmetička sredina sa standardnom devijacijom. Vrijednost  $P < 0,05$  će predstavljati granicu statističke značajnosti.

#### Studija I

Bazalne vrijednosti u srčano-krvožilnim, ventilacijskim i simpatičkim parametrima između skupina usporedit će se sa *t-testom* za nezavisne uzorke. Za određivanje efekta simpatičkog izbijanja (izbijanja tijekom sinus ritma vs. izbijanje nakon prijevremenske ventrikulske kontrakcije) i efekta skupine (ispitanici sa srčanim zatajenjem vs. kontrolni ispitanici) upotrijebiti će se *Mixed analysis of variance (ANOVA)*.

#### Studija II

Za određivanje efekta kontinuiranog pozitivnog tlaka na srčano-krvožilne i simpatičke parametre koristit će se *Friedman ANOVA*. Korelacije između promjena u simpatičkom odgovoru na primjenu kontinuiranog pozitivnog tlaka i promjena u srčano-krvožilnim parametrima testirat će se primjenom linearne i multiple regresije.

Statistička analiza svih podataka će se napraviti koristeći aplikaciju Statistica (verzija 7.0; Statsoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

## 8. ORGANIZACIJA ISTRAŽIVANJA

Istraživanje će se provesti u laboratoriju Zavoda za integrativnu fiziologiju pri Medicinskom fakultetu u Splitu. Uz pristupnika, te zaposlenike Zavoda za integrativnu fiziologiju, u istraživanju će sudjelovati i kolege sa Mayo klinike, profesor Bruce D. Johnson sa Zavoda za fiziologiju i biomedicinski inženjering i docent Thomas Olson sa Klinike za unutarnje bolesti-kardiovaskularni odsjek.

Koordinator predloženog istraživanja je prof.dr.sc. Željko Dujić.

## 9. ULOGA PRISTUPNIKA U ISTRAŽIVANJU

Pristupnik će, na temelju kriterija uključenja i isključenja u predloženo istraživanje, pretražiti Hrvatski registar bolesnika sa srčanim zatajenjem i pregledati medicinsku dokumentaciju bolesnika hospitaliziranih sa dijagnozom srčanog zatajenja pri Klinici za unutarnje bolesti KBC Split unatrag 5 godina. Pristupnik će potom telefonskim putem kontaktirati sve potencijalne ispitanike. Pristupnik će zajedno sa liječnicima kardiolozima sudjelovati u probiru bolesnika sa srčanim zatajenjem koji se ambulantno kontroliraju u Klinici za unutarnje KBC Split.

Pristupnik će upoznati svakog ispitanika sa protokolom istraživanja i svim postupcima koji će se u njemu koristiti.

Pristupnik će izvoditi tehniku mikroneurografije tijekom istraživanja za Studiju I i Studiju II.

Pristupnik će pripremiti prostoriju i uređaje za provođenje istraživanja, te pratiti snimanje fizioloških parametara na zaslonu računala tijekom protokola.

Pristupnik će analizirati dobivene podatke zabilježene u računalu tijekom pokusa.

Pristupnik će napraviti statističku analizu i grafičke prikaze izračunatih podataka.

Pristupnik će naknadno kontaktirati sve ispitanike sa povratnim informacijama o nalazima svih pretraga koje će biti napravljene u sklopu ovog znanstvenog istraživanja.

## **10. OČEKIVANI ZNANSTVENI DOPRINOS**

Razina simpatičke aktivnosti u bolesnika sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem je recipročno povezana sa stupnjem težine bolesti i sa konačnom prognozom. Pokazalo se da rizik od nagle srčane smrti raste za 70% u jutarnjim satima kada je simpatička aktivnost najveća zbog ustajanja iz ležećeg položaja (2). Uz pomoć nove, sofisticirane analize zapisa aktivnosti simpatičkih vlakana, predloženim znanstvenim istraživanjem želimo ustanoviti kakav obrazac aktivacije simpatičkog živčanog sustava stoji iza kronično povećane aktivnosti simpatičkih vlakana u srčanom zatajenju. Nadalje, postavlja se pitanje na koji način srčani bolesnici sa kronično povećanom simpatičkom aktivnošću mogu odgovoriti na nagle promjene arterijskog tlaka? Da li se njihov simpatički odgovor sastoji od porasta broja okidanja akcijskih potencijala već aktivnih simpatičkih neurona ili pak od aktivacije (većih?) simpatičkih vlakana, inače neaktivnih u mirovanju kod zdravih mladih ljudi (11)? Pronalazak odgovora na ova pitanja u sklopu predloženog istraživanja pridonijelo bi boljem razumijevanje fiziologije simpatičke aktivnosti u zdravlju i patofiziologije u bolesti.

Ovim se istraživanjem također nastoji bolje razumjeti osnova nefarmakološkog liječenja kroničnog srčanog zatajenja - primjena kontinuiranog pozitivnog tlaka. Pokušat će se odgovoriti na pitanje da li je pozitivan učinak primjene kontinuiranog pozitivnog tlaka posljedica pada prenaplašene simpatičke aktivnosti u kroničnom srčanom zatajenju.

Iako je složenost metode mikroneurografije ograničavajući čimbenik njene primjene u svakodnevnoj kliničkoj praksi, te kao takva pripada metodama pretkliničkih istraživanja, saznanja dobivena ovim putem mogu rasvijetliti patofiziologiju simpatičkog sustava u bolesnika sa srčanim zatajenjem, vodećeg uzroka smrtnosti u ovoj populaciji.

Objavljeni radovi ovog istraživanja:

- I) **Zubin Maslov P**, Breskovic T, Brewer DN, Shoemaker JK, Dujic Z. Recruitment pattern of sympathetic muscle neurons during premature ventricular contractions in heart failure and controls. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Dec;303(11):R1157-64. (*Impact factor 3.34*)
- II) **Zubin Maslov P**, Breskovic T, Shoemaker JK, Olson TP, Johnson BD, Eterovic D, Dujic Z. Firing patterns of muscle sympathetic neurons during short-term use of continuous positive airway pressure in healthy subjects and in chronic heart failure patients. *Respir Physiol Neurobiol* 2013 Jun 15;187(2):149-56. (*Impact factor 2.242*)

## 11. ETIČKA NAČELA

Postupci koji se planiraju koristiti u predloženom istraživanju su opisani u Temeljnomo obrascu za prijavu znanstvenog istraživanja na ljudima pod naslovom projekta: „Utjecaj periodičnog disanja na mišićnu simpatičku živčanu aktivnost u bolesnika sa kroničnim stabilnim srčanim zatajenjem“. Predloženo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Prilozi:

- Preslika potvrdnice Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Splitu
- Preslika potvrdnice Etičkog povjerenstva KBC Split o pristupu medicinskoj dokumentaciji bolesnika liječenih u Klinici za unutarnje bolesti KBC Split
- Preslika Obrasca za prijavu predloženog znanstvenog istraživanja
- Preslika Obavijesti za potencijalne sudionike u znanstvenom istraživanju sa obrascem o informiranom pristanku sudionika znanstvenog istraživanja
- Obrazac za liječnike-kardiologe za uključivanje ispitne skupine u predloženo znanstveno istraživanje
- Objavljeni znanstveni radovi ovog istraživanja

## 12. LITERATURA

- (1) Wallin BG, Sundlof G, Eriksson BM, Dominiak P, Grobecker H, Lindblad LE. Plasma noradrenaline correlates to sympathetic muscle nerve activity in normotensive man. *Acta Physiol Scand* 1981 Jan;111(1):69-73.

- (2) Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2010 Apr;90(2):513-57.
- (3) Wallin BG, Thompson JM, Jennings GL, Esler MD. Renal noradrenaline spillover correlates with muscle sympathetic activity in humans. *J Physiol* 1996 Mar 15;491 ( Pt 3):881-7.
- (4) Vallbo AB, Hagbarth KE, Wallin BG. Microneurography: how the technique developed and its role in the investigation of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol* 2004 Apr;96(4):1262-9.
- (5) Macefield VG, Wallin BG, Vallbo AB. The discharge behaviour of single vasoconstrictor motoneurons in human muscle nerves. *J Physiol* 1994 Dec 15;481 ( Pt 3):799-809.
- (6) Macefield VG, Elam M, Wallin BG. Firing properties of single postganglionic sympathetic neurones recorded in awake human subjects. *Auton Neurosci* 2002 Jan 10;95(1-2):146-59.
- (7) Macefield VG, Rundqvist B, Sverrisdottir YB, Wallin BG, Elam M. Firing properties of single muscle vasoconstrictor neurons in the sympathoexcitation associated with congestive heart failure. *Circulation* 1999 Oct 19;100(16):1708-13.
- (8) Salmanpour A, Brown LJ, Shoemaker JK. Spike detection in human muscle sympathetic nerve activity using a matched wavelet approach. *J Neurosci Methods* 2010 Nov 30;193(2):343-55.
- (9) Salmanpour A, Brown LJ, Steinback CD, Usselman CW, Goswami R, Shoemaker JK. Relationship between size and latency of action potentials in human muscle sympathetic nerve activity. *J Neurophysiol* 2011 Jun;105(6):2830-42.
- (10) Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 1965 May;28:560-80.

- (11) Steinback CD, Salmanpour A, Breskovic T, Dujic Z, Shoemaker JK. Sympathetic neural activation: an ordered affair. *J Physiol* 2010 Dec 1;588(Pt 23):4825-36.
- (12) Breskovic T, Steinback CD, Salmanpour A, Shoemaker JK, Dujic Z. Recruitment pattern of sympathetic neurons during breath-holding at different lung volumes in apnea divers and controls. *Auton Neurosci* 2011 Oct 28;164(1-2):74-81.
- (13) Floras JS. Sympathetic activation in human heart failure: diverse mechanisms, therapeutic opportunities. *Acta Physiol Scand* 2003 Mar;177(3):391-8.
- (14) Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol* 2009 Jul 28;54(5):375-85.
- (15) Lombardi F, Verrier RL, Lown B. Relationship between sympathetic neural activity, coronary dynamics, and vulnerability to ventricular fibrillation during myocardial ischemia and reperfusion. *Am Heart J* 1983 Jun;105(6):958-65.
- (16) Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Lanfranchi A, Vailati S, Giannattasio C, et al. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 1995 Dec 1;92(11):3206-11.
- (17) Goso Y, Asanoi H, Ishise H, Kameyama T, Hirai T, Nozawa T, et al. Respiratory modulation of muscle sympathetic nerve activity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2001 Jul 24;104(4):418-23.
- (18) Narkiewicz K, Pesek CA, van de Borne PJ, Kato M, Somers VK. Enhanced sympathetic and ventilatory responses to central chemoreflex activation in heart failure. *Circulation* 1999 Jul 20;100(3):262-7.
- (19) Packer M. New concepts in the pathophysiology of heart failure: beneficial and deleterious interaction of endogenous haemodynamic and neurohormonal mechanisms. *J Intern Med* 1996 Apr;239(4):327-33.

- (20) Petersson M, Friberg P, Eisenhofer G, Lambert G, Rundqvist B. Long-term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2005 May;26(9):906-13.
- (21) Naughton MT, Liu PP, Bernard DC, Goldstein RS, Bradley TD. Treatment of congestive heart failure and Cheyne-Stokes respiration during sleep by continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Jan;151(1):92-7.
- (22) Naughton MT, Floras JS, Rahman MA, Jamal M, Bradley TD. Respiratory correlates of muscle sympathetic nerve activity in heart failure. *Clin Sci (Lond)* 1998 Sep;95(3):277-85.
- (23) Kaye DM, Mansfield D, Aggarwal A, Naughton MT, Esler MD. Acute effects of continuous positive airway pressure on cardiac sympathetic tone in congestive heart failure. *Circulation* 2001 May 15;103(19):2336-8.
- (24) Heindl S, Dodt C, Krahwinkel M, Hasenfuss G, Andreas S. Short term effect of continuous positive airway pressure on muscle sympathetic nerve activity in patients with chronic heart failure. *Heart* 2001 Feb;85(2):185-90.
- (25) Usui K, Bradley TD, Spaak J, Ryan CM, Kubo T, Kaneko Y, et al. Inhibition of awake sympathetic nerve activity of heart failure patients with obstructive sleep apnea by nocturnal continuous positive airway pressure. *J Am Coll Cardiol* 2005 Jun 21;45(12):2008-11.