

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Adriana Banožić

**PONAŠANJA POVEZANA S BOLI NAKON
EKSPERIMENTALNO IZAZVANOG INFARKTA MIOKARDA
U ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Split, 2014.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje boli pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Damir Sapunar

Zahvaljujem svom mentoru profesoru Sapunaru na podršci i savjetima tijekom izrade ove disertacije .

Zahvaljujem svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju koji su mi na razne načine pomogli u izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci.

SADRŽAJ PREMA POGLAVLJIMA

Stranica

1. POPIS OZNAKA I KRATICA	v
--	----------

2. UVOD

2.1. Bol	1
2.2. Visceralna bo	1
2.3. Mehanizmi srčane boli	2
2.3.1. Inervacija srca	2
2.3.2. Mehanizam nastanka prenesene boli	8
2.4. Uzroci srčane boli	9
2.4.1. Patofiziologija ishemije	9
2.4.2. Drugi izvori boli	11
2.5. Životinjski modeli visceralne boli	11
2.5.1. Eksperimentalni modeli srčane ishemije-infarkta	12
2.6. Ponašajne mjere bol	15

3. CILJEVI I HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja	18
3.2. Hipoteze	18

4. METODE I MATERIJALI

4.1 Pokusne životinje	19
4.2. Postupci	19
4.2.1 Infarkt miokarda: podvezivanje lijeve koronarne arterije	19
4.2.2. Ponašajni testovi i eksperimentalni nacrt	23
4.2.3. Primjena lijekova	25
4.2.4. Uzimanje i procesiranje tkiva	26
4.3 Statistička analiza	26

5. REZULTATI

5.1. Histološka potvrda infarkta miokarda.....	28
5.2. Ponašajne promjene povezane s AMI.....	29
5.3. Efekti morfija na ponašanje štakora nakon AMI.....	35
6. RASPRAVA.....	38
7. ZAKLJUČCI.....	46
8. SAŽETAK.....	47
9. SUMMARY.....	48
10. POPIS LITERATURE.....	49
11. ŽIVOTOPIS.....	63

POPIS OZNAKA I KRATICA

AMI	- akutni infarkt miokarda (<i>acute myocardial infarction</i>)
DBTC	- dibutiltin diklorid (<i>dibutyltin dichloride</i>)
EPM	- uzdignuti križni labirint (<i>elevated plus maze</i>)
IASP	- međunarodno udruženje za istraživanje boli (<i>International Association for the Study of Pain</i>)
Kont	- pokusna skupina s podvezanom lijevom koronarnom arterijom
LAD	- lijeva spuštajuća koronarna (arterija) (<i>lijeva spuštajuća koronarna arterija</i>)
L-kont	- lažno pokusna skupina s oštećenim perikardom
L-kont.P	- lažno pokusna skupina s neoštećenim perikardom
OFT	- test otvorenog polja (<i>open field test</i>)
STT	- stanice spinotalamičkog puta (<i>spinothalamic tract cells</i>)

1. UVOD

1.1. Bol

Prema definiciji Međunarodnog udruženja za proučavanje boli (engl. International Association for the Study of Pain – IASP), bol je neugodan emocionalni i osjetni doživljaj povezan sa stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (1). Po svojoj patofiziologiji bol se može podijeliti u nociceptivnu i neuropatsku. Nociceptivna bol nastaje nakon podražaja perifernih živčanih vlakana (nociceptora), a neuropatska nakon oštećenja somatosenzornog živčanog sustava. Nociceptivna bol se dalje može podijeliti u somatsku i visceralnu (2).

1.2. Visceralna bol

Suočen sa štetnim podražajem, čovjek nastoji lokalizirati štetni podražaj, udaljiti se od njega i time smanjiti vjerojatnost daljnjeg oštećenja. Lokalizirati i procijeniti intenzitet podražaja najlakše je na koži i zglobovima, nešto manje u mišićima i najteže u unutarnjim organima. Bolnim podraživanjem unutarnjih organa ne dobivaju se precizne informacije o lokalizaciji i intenzitetu podražaja. Primjerice, bolno širenje jednjaka balonom ili nekog drugog šupljeg organa izaziva jaku bol koja se može projicirati u vrat, ramena ponekad i čeljust te izazvati simptome slične onima u pacijenata s ishemijskom bolesti srca(3). Međutim, iako širenje balonom šupljih unutarnjih organa može biti bolno vrlo rijetko će izazvati ozbiljnu ozljedu tkiva. Suprotno tome, ozljede tkiva poput porezotina ili nagnječenja unutarnjih organa, ponekad uopće nisu bolna (4). Prema tome, visceralna bol može se okarakterizirati kao bol koja proizlazi iz unutarnjih organa, za razliku od somatske boli čiji su receptori uglavnom smješteni u koži (5).

Visceralna bol ima još nekoliko važnih karakteristika. Najčešće je difuzna i slabo lokalizirana što je dijelom posljedica širokog intraspinalnog grananja visceralnih aferentnih završetaka i konvergencije somatskih i visceralnih živčanih vlakana na spinalne neurone drugog reda (6). Također, povezana je s emocionalnim i autonomnim odgovorima koji su mnogo naglašeniji nego kod somatske boli.

Prenešena bol, karakteristična za visceralnu bol, nastaje kad se aktiviraju nociceptori u unutarnjim organima, a bol se osjeća na površini tijela. Jedan od mogućih mehanizma

prenesene boli jest da se različita nociceptivna osjetna (aferentna) vlakna spajaju na jedan neuron spinothalamičkog puta (osjetnog puta koji počinje u kralježničkoj moždini, a završava u talamusu). Zbog ove konvergencije signala mozak informaciju koja dolazi iz visceralnih receptora interpretira kao da dolazi s površine tijela, budući da se na površini tijela nociceptivni podražaji javljaju češće. Izazivaju je specifični podražaji poput širenja šupljih organa, rastezanja mezenterija, ili ishemije. Najčešći je primjer bol zbog infarkta srca koja se osjeća kao bol u lijevoj ruci.

1.3. Mehanizmi srčane boli

Razumijevanje specifičnosti nastanka i doživljaja srčane boli zahtijeva poznavanje srčane inervacije i putova koji u mozak šalju informaciju o štetnim podražajima u srcu.

1.3.1. Inervacija srca

Srce je bogato inervirano heterogenom populacijom neurona. Parasimpatički i simpatički neuroni u srcu (1) oblikuju srčani živčani splet (lat. *plexus cardiacus*) koji je smješten ispred račvanja dušnika i iza luka aorte, te iznad račvanja plućne arterije (2).

Vlakna za inervaciju srca najvećim dijelom dolaze iz neurona autonomnog živčanog sustava koji su smješteni dijelom u produljenoj moždini unutar jezgara X. moždanog živca, nervusa vagusa (parasimpatički neuroni), a dijelom u srednjem cervikalnom i stelatnom gangliju (simpatički neuroni) (3). Tijela simpatičkih eferentnih neurona koji inerviraju srce smještena su u intermediolateralnoj kolumni torakalnog segmenta kralježničke moždine (1. - 5. segment) otkud vlakna preganglijskih neurona dolaze do paravertebralnih simpatičkih ganglija (lat. *truncus sympathicus*) gdje se „prekapčaju“ (najčešće u stelatnom, a u manjoj mjeri u srednjem i donjem cervikalnom gangliju), na drugi neuron i kao postganglijsko vlakno dolaze do srca (4). U većine sisavaca najveći broj parasimpatičkih eferentnih neurona za inervaciju srca smješten je u ventro-lateralnom dijelu *nucleusa ambiguusa*, dok je znatno manji broj ovih neurona smješten u dorzalnu jezgru živca nervusa vagusa (lat. *nucleus dorsalis nervi vagi*) i u intermedijarnoj zoni između ove dvije jezgre (3, 5). Postganglijski parasimpatički neuroni smješteni su u intrinzičnim srčanim ganglijima (1, 2), koji se nalaze u

području pretklijetki (na njihovoj epikardijalnoj površini) te oko izlaznih dijelova obje klijetke i u unutarnjem dijelu luka aorte (6). Intrinzični srčani gangliji osim postganglijskih parasimpatičkih neurona sadrže i postganglijske simpatičke neurone, lokalne osjetne neurone kao i interneurone (5). Postganglijski simpatički eferentni srčani neuroni nalaze se još i u medijastinalnim ganglijima u neposrednoj blizini srca (5).

Rad motoričkih neurona koji inerviraju srce dijelom ovisi o osjetnim neuronima koji prenose informacije o kardiovaskularnom sustavu (5). Glavni izvori aferentne inervacije srca su neuroni smješteni u nodoznom gangliju i spinalnim ganglijima (C7-T7) (7). Osjetna inervacija srca odvija se preko nodoznog ganglija (osjetni ganglij nervusa vagusa) te donjih cervikalnih i gornjih torakalnih spinalnih ganglija (7, 8).

Tijela osjetnih neurona koji se nalaze unutar nodoznog ganglija šalju centralna vlakna u *nucleus tractus solitarii* (u 5% slučajeva u prva dva segmenta cervikalnog dijela kraljezničke moždine (9)) u dorzalnu jezgru nervusa vagusa. Tijela spinalnih aferentnih neurona smještena su u spinalnom gangliju; periferni nastavak tog pseudounipolarnog neurona polazi od pojedine srčane regije dok centralni nastavak ulazi kroz stražnje korjenove spinalnih živaca u stražnje robove sive tvari kraljezničke moždine od C6 do T6 razine (1). Relativno mali broj neurona unutar nodoznog ganglija (2-5%) zadužen je za osjetnu inervaciju srca (10), i oni se s obzirom na svoje neurokemijske karakteristike razlikuju se od srčanih neurona u spinalnim ganglijima (spinalni aferentni neuroni).

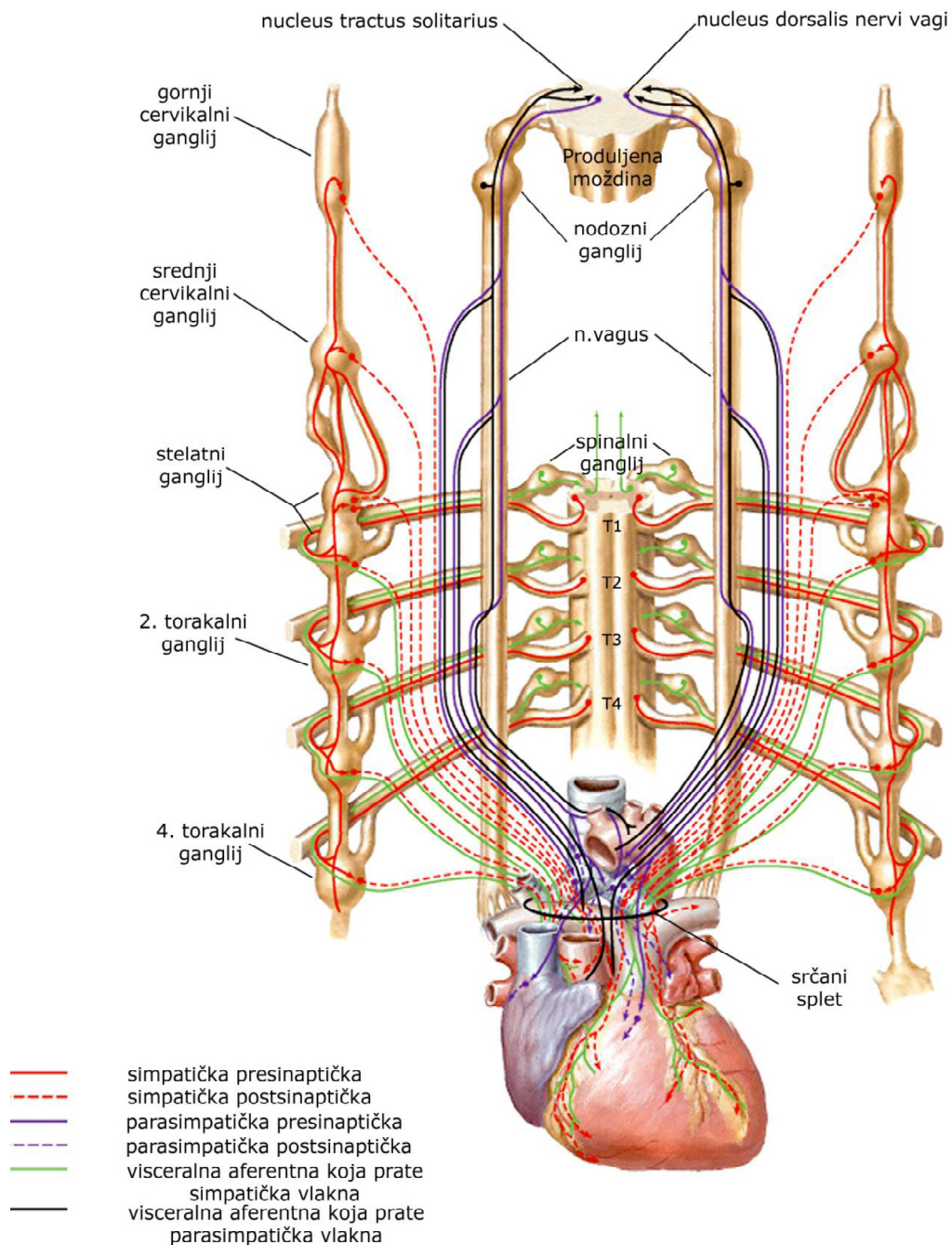
Periferna vlakna osjetnih neurona spuštaju se vagusom do srčanog pleksusa na bazi srca. Srčani pleksus smješten je između luka aorte i račvanja dušnika a čine ga splet vagalnih i simpatičkih vlakana. Unutar pleksusa vlakna se miješaju i gube svoju prepoznatljivost, ali s težnjom da se podijele u desnu i lijevu polovicu i tako pristupe srčanoj površini i koronarnim arterijama(11). Aferentni srčani neuroni opisani su još i u intratorakalnim ekstrakardijalnim kao i u intrinzičkim srčanim ganglijima (5).

Prema modelu srčane "neuralne hijerarhije" inervacija srca funkcionira na tri anatomske i funkcionalne razine: prvu razinu čine intrinzični srčani gangliji, drugu čine intratorakalni ekstrakardijalni gangliji dok zadnju razinu tvori središnji živčani sustav (kraljeznička i produljena moždina) gdje završavaju centralni nastavci neurona iz nodoznog i spinalnih ganglija (12). Neuroni intrakardijalnih ganglija zajedno s vezama među neuronima pojedinih ganglija tvore složenu živčanu mrežu koja se sastoji od prostorno raspoređenih osjetnih neurona, interneurona i motornih (adrenergičkih i kolinergičkih) neurona koji mogu biti ekscitacijski i inhibicijski (1). Ovi neuroni komuniciraju s neuronima smještenim u

drugim intratorakalnim ekstrakardijalnim ganglijima, a svi se nalaze pod toničkim utjecajem nadređenog središnjeg živčanog sustava te cirkulirajućih kateholamina (5). „Srčani mozak“ predstavlja završnog koordinatora centripetalnih i centrifugalnih informacija koje utječu na srce, a sam naziv ukazuje na njegovu mogućnost samostalnog funkcioniranja. Ovaj složeni intrakardijalni živčani sustav zajedno s ekstrakardijalnim autonomnim neuronima koji inerviraju srce osigurava modulaciju srčane aktivnosti u fiziološkim i patološkim stanjima (1) (Slika 1).

Sve do nedavno smatralo se da su intratorakalni gangliji samo jednostavna eferentna prijenosna stanica koja obuhvaća oba kraka autonomnog živčanog sustava. Temeljem brojnih radova u posljednjem desetljeću pokazalo se da se kardiovaskularne osjetne informacije također procesuiraju i unutar intratorakalnog živčanog sustava (13). Rezultati istraživanja pokazuju da je srčana neuronalna hijerarhija organizirana na način da što bolje koordinira lokalne srčane parametre povratnom spregom s različitim latencijama (5).

Udaljenost između osjetnih živčanih završetaka smještenih u ciljnom organu i njihovih tijela dijelom određuje latenciju aktivacije neurona drugog reda koji je uključen u kardiovaskularne refleksne (13). Refleksi s kratkotrajnom latencijom (30-80 ms) odvijaju se preko intrinzičnih srčanih ganglija, a utječu na frekvenciju srca djelujući na sinatrijski čvor u svakom srčanom ciklusu („od otkucaja do otkucaja“) (14). Refleksi s latencijom srednjeg trajanja (koja se odvija preko intratorakalnih ekstrakardijalnih ganglija) te latencijom relativno dugog trajanja (koja se odvija preko kraljezničke moždine i mozga) moduliraju funkciju srca tijekom nekoliko minuta ili čak sati i na neki način ublažuju pretjerani utjecaj različitih podražaja posredstvom interneurona te održavaju tonus perifernog živčanog sustava (14).



Slika 1. Shematski prikaz inervacije srca; prilagođeno prema: „Netter,F.H. Interactive Atlas of Human Anatomy. 3rd ed. New Jersey, Icon Learning Systems, 2003, ISBN: 1-29007-15-9“.

Tihi nociceptori i senzitivacija receptora u srcu

Aktivacija tihih nociceptora također doprinosi nastanku srčane boli. Tihi nociceptori su nađeni u zglobovima, mokraćovodu (15) i odnedavno u srcu (16), a osnovna im je karakteristika da se ne aktiviraju sve dok je tkivo zdravo.

Prema preliminarnim podatcima tihi receptori u lijevoj klijetki reagiraju na ishemiju i bradikinin (17). Prema tome, moguće je da se populacija vlakana u srcu aktivira samo u upali koja je posljedica ishemije miokarda (17). Senzitivacija nociceptora nakon ozljede ili upale javlja se kada se prostaglandini, tvar P i drugi kemijski medijatori otpuštaju iz ozlijeđenog tkiva. Moguće je da rupture ili erozije aterosklerotičnog plaka otpuštaju kemijske tvari koji aktiviraju tihe nociceptore (18, 19).

Visceralna bol izazvana kemijskom stimulacijom osjetnih završetaka

Nemijelinizirana simpatička aferentna vlakna u srcu trenutno reagiraju na kemijske tvari kao što je bradikinin, adenzin te kiseline aplicirane na površinu epikarda i ubrizgane u koronarne arterije (20, 21). Bradikinin je najčešće korištena algogena tvar u eksperimentalnim istraživanjima nocicepcije srca (22, 23). Raniji eksperimentalni nalazi pokazali su da se koncentracija bradikinina poveća u koronarnim sinusima nakon podvezivanja koronarne arterije (24). Istraživanja na ljudima i životinjama (25) pokazala su da bradikinin sam po sebi možda nije dovoljan za izazivanje ili oponašanje angine pektoris. Intrakoronarna injekcija bradikinina u pacijenata ne dovodi do boli tipične za anginu pektoris već pacijenti opisuju nespecifičnu nelagodu ili bol koja se osjeća u cijelom tijelu. Samo nekoliko pacijenata je nakon injekcije bradikinina doživjelo pravu „srčanu bol“ (26). Vjerojatnije je da postoji više tvari kao što su adenzin i kalij koji pobuđuju srčane receptore. Adenzin izaziva osjećaj boli sličan angini pektoris u zdravih ispitanika (27). Povezanost ovisna o dozi uočena je između adenzina i intenziteta boli (28). Intrakoronarna injekcija adenzina u pacijenata sa stabilnom kroničnom anginom izaziva bol koja uvelike slični boli koju izaziva angina pektoris u pacijenata koji boluju od ishemije miokarda (29). Ova bol se percipira kao da potječe iz srca jer slična doza adenzina koja je ubrizgana u desnu klijetku srca ne izaziva bol. Postoje suprotstavljeni dokazi o ekscitacijskom utjecaju adenzina na aferentne stanice simpatičkog lanca prema kojima adenzin aktivira aferentna vlakna koja su važna za prijenos signala koji

dovode do percepcije boli, kao i to da se aferentna vlakna ne mogu aktivirati adenozinom već samo bradikininom (30). Varijabilnost doživljaja boli i nepostojanje izravne povezanosti s ishemijom miokarda pokazuje da još uvijek vrlo malo znamo o karakteristikama srčanih receptora i kako na njih djeluje okolina.

Mehanizmi koji dovode do boli uslijed ishemije

Rasprave o mehaničkim i kemijskim mehanizmima koji aktiviraju osjetne receptore u srcu i generiraju simptome srčane boli traju već godinama. Prema mehaničkoj hipotezi rastezanje zida pretkljetke uzrok je boli povezane s ishemijom miokarda (31). Međutim, kliničke studije su pokazale da brojna stanja u kojima dolazi do proširenja pretkljetki ne dovode nužno do boli (31).

Miokard sadržava i mehanosenzitivna i kemosenzitivna simpatička aferentna vlakna. Mehanosenzitivni živčani završetci se aktiviraju sa svakom srčanom kontrakcijom i trenutno reagiraju na svaki podražaj u receptivnom polju (32), dok kemosenzitivni živčani završetci reagiraju u nepravilnim razmacima i ne ovise o radu srca (31). Mehanosenzitivni živčani završetci su osjetljivi i na kemijske podražaje i stoga se mogu nazvati i polimodalnim receptorima (33). Njihova aktivnost se pojača ukoliko dođe do začepjenja koronarne arterije ili nakon injekcije male količine bradikinina u eksperimentalnim uvjetima. Malliani je pokazao da se nocicepcija u srcu događa kad je pobuđena prostorno ograničena populacija polimodalnih nociceptora (34). Na osnovu postojećih rezultata čini se da na pojavu angine pektoris više djeluju kemijski čimbenici nego mehanički.

Bol zbog ishemije miokarda po svojim karakteristikama (duboka, difuzna i tupa bol) može se usporediti s mišićnom boli. Sličnost mišićne i visceralne boli bila je očigledna u pacijenata koji boluju od angine pektoris koja se prenosi na prsa i na donji dio lijeve ruke (35).

Zaključno, podražaji iz mišića i visceralna aferentna vlakna najčešće konvergiraju na iste STT stanice što objašnjava zašto se visceralna bol najčešće percipira kao duboka, difuzna bol slična mišićnoj boli. Također objašnjava ideju da se hiperalgezija može zadržati nakon epizode angine pektoris (31).

1.3.2. Mehanizam nastanka prenesene boli

Prenesena bol je bol iz unutarnjih organa koju osjećamo na površini tijela. Visceralna osjetna vlakna koja putuju u kralježničku moždinu završavaju na stanicama dorsalnog roga i često dijele iste stanice kao i vlakna iz somatskih nociceptora. Aksoni ovih stanica prolaze anteriornim lateralnim putovima prema talamusu i drugim moždanim strukturama (9).

Nakon stimulacije nociceptora u srcu, crijevima i drugim unutarnjim organima bol se ne osjeća na anatomskoj lokaciji na kojoj je izazvana, već se prenosi na određenu lokaciju na površini tijela (36). Mjesto na koje se bol projicira manje je specifično od somatske boli i postoji niz individualnih razlika s obzirom na to gdje se prenesena bol osjeća. Anatomska osnova prenesene boli nije sasvim poznata, međutim, postoji nekoliko hipoteza. Prema jednoj hipotezi, prenesena bol nastaje jer iste stanice u dorzalnom rogu primaju informacije i iz unutarnjih organa i iz receptora u koži. Prenesena bol također može biti posljedica promjena receptivnog polja neurona s aktivacijom sinapsi koje su dotad bile neaktivne (37).

Otpriblike 80% vlakana u *nervusu vagusu* su osjetna vlakna koja završavaju u *nucleusu solitariusu* i mogu djelovati na obradu boli u mozgu, iako se vrlo malo zna o specifičnim neuralnim krugovima uključenima u taj proces. Novija istraživanja pokazala su da osjetna vlakna *nervusa vagusa* iz tankog crijeva inhibiraju središnji prijenos informacija u predganglijske neurone koji inerviraju nadbubrežne žlijezde i moduliraju osjet boli iz probavnog sustava. Između ostalog, *nervus vagus* doprinosi i kompleksnijim oblicima ponašanja osim same boli uključujući i afektivne promjene (38).

Simpatički živčani sustav također je uključen u nastanak prenesene boli jer ima važnu ulogu u povećanju osjetljivosti receptora na koži. Posredovanjem simpatičkog sustava može nastati aktivacija alfa motoneurona i uzrokovati kontrakcije skeletnih mišića koji uzrokuju bol. Prenesena bol može također biti uzrokovana konvergencijom impulsa boli na centralnoj lokaciji kao što je talamus. Dijagnosticiranje poremećaja na temelju boli teže je za visceralnu bol nego somatsku bol zbog varijabilnosti lokacije boli. Činjenica da lokacija nije izravno povezana s anatomskom lokacijom organa koji je pogođen doprinosi ambivalenciji simptoma i znakovima iz unutarnjih organa (39).

Elektrofiziološka istraživanja su pokazala da električna stimulacija kardiopulmonalnih aferentnih vlakana ekscitiraju STT stanice u T1 do T6 segmentima kralježničke moždine (40). Otpriblike 80% stanica snimljenih u tom segmentu su bile aktivirane kardiopulmonalnom

aferentnom stimulacijom. Kardiopulmonalna aferentna stimulacija malo djeluje na aktivaciju stanica u C7 i C8 segmentima koje uglavnom inerviraju ruke. To se uklapa u kliničko opažanje da se bol angine pectoris ne prenosi u ruku i distalne udove (35). STT stanice C5 i C6 segmenta su primarno ekscitirane kardiopulmonarnom simpatičkom aferentnim i somatskom stimulacijom. Ovi segmenti kralježničke moždine ne reagiraju na podražaje izravno iz stanica dorsalnog roga. Konvergencija visceralnih i somatskih podražaja u skup STT stanica naziva se viscerosomatska konvergencija i objašnjava prenošenje boli na somatske strukture (31).

1.4. Uzroci srčane boli

Bol u prsištu jedan je od najčešćih simptoma koji pacijente dovodi k obiteljskom liječniku ili na hitni prijem, a u gotovo polovini slučajeva bol u prsištu je posljedica ishemijske ili ne-ishemijske srčane bolesti (41). Ishemijska srčana bolest nastaje zbog smanjene opskrbe srca krvlju, odnosno smanjenog protoka kroz koronarne arterije. Uzrok ishemijske bolesti su u 90% slučajeva aterosklerotične naslage koje sužavaju lumen krvnih žila i tako dovode do smanjene opskrbe srca kisikom i hranjivim tvarima, što oštećuje miokard i funkciju srca. U manjem broju slučajeva ishemijska bolest srca može nastati zbog tromboze, embolije ili spazma koronarnih krvnih žila. Ishemijska bolest srca još se naziva i koronarna bolest ili koronarna srčana bolest (42). Osim koronarne srčane bolesti, u ishemijske uzroke srčane boli ubrajaju se još i aortna stenoza, koronarni arterijski spazam i hipertrofična kardiomiopatija. Ne-ishemijski uzroci srčane boli su perikarditis, pucanje aneurizme aorte i prolaps mitralne valvule (43).

1.4.1. Patofiziologija ishemije

Ishemija miokarda posljedica je neravnoteže između potrebe miokarda za kisikom i opskrbe miokarda kisikom (44). U normalnim uvjetima, epikardijalne koronarne arterije funkcioniraju kao „cjevovod“ koji pruža samo minimalan otpor protoku krvi. U tim uvjetima, potreba miokarda za kisikom je uravnotežena s odgovarajućim protokom krvi (45). Čimbenici koji utječu na opskrbu miokarda kisikom i koronarni protok su: frekvencija rada srca, kontraktilnost miokarda te sistolički tlak (45-47). Manjak kisika u miokardu najčešće je

posljedica nedostatnog protoka krvi, jer nije moguće povećati korištenje kisika iz krvi i tako kompenzirati manjak koji se pojavio (48).

Glavna osobina metabolizma miokarda je podmirivanje velikih energijskih potreba aerobnim procesima. Bogata kapilarna mreža omogućuje laku difuziju kisika iz krvi u kardiomiocite. Međutim, kad nastupi ishemija dolazi do brojnih promjena u metabolizmu miokarda kao posljedice manjka kisika. Iznenađna potreba za dodatnom energijom podmiruje se pojačanim korištenjem glukoze kao izvora energije (48).

Kad hipoksija miokarda dulje traje, aerobni metabolizam prelazi u anaerobni, koji oslobađa mnogo manje energije pa je u ishemiji otežana i relaksacija i kontrakcija miokarda. U opsežnoj ishemiji, kad su koronarne arterije toliko sužene da je samo u opterećenju nedostatna opskrba miokarda kisikom, kontraktilnost miokarda nije smanjena. U opskrbenoj ishemiji koja nastaje zbog potpunog začepjenja koronarne arterije kontrakcije u dijelu miokarda trenutno prestaju. Išemija miokarda može uzrokovati preusmjeravanje krvi iz područja čija je vlastita energetska pričuva već iscrpljena u područje u kojima je još donekle održana, ali jedino ako oba područja primaju krv iz iste krvne žile (48).

U fiziološkim uvjetima tonus epikardijalnih arterija nije bitan za regulaciju koronarnog protoka. Međutim uz koronarnu bolest i male promjene u tonusu epikardijalnih arterija mogu imati dramatične posljedice (48).

Smanjenje protoka, obično je posljedica patološkog sužavanja koronarnih arterija. Ono može biti organsko (aterosklerotična ploča, tromb), funkcijsko (grč koronarnih arterija) ili združeno (49).

Koronarne arterije promijenjene zbog ateroskleroze gube normalnu vazodilatacijsku rezervu, pa kako aterosklerotski proces napreduje, povećava se količina aterosklerotskog plaka koji dodatno sužava arteriju, onemogućuje koronarni protok te postupno dovodi do ishemije miokarda (fiksna stenoza) (48). Išemija miokarda može biti izazvana i koronarnim spazmom (dinamička stenoza) koja je posljedica disfunkcije endotela u susjednim zdravim segmentima arterije(49).

Bez kolateralne cirkulacije, nekroza se počinje širiti od subendokardijalnih slojeva prema epikardijalnim. Brzina širenja nekroze ovisi o postojećem kolateralnom krvotoku u ishemijskom području, trajnoj ili intermitentnoj okluziji koronarne arterije i osjetljivosti miocita na ishemiju (50).

Infarkt najčešće zahvaća lijevu klijetku, čije su potrebe za energijom i kisikom najveće. Infarkt miokarda ovisno o krvnoj žili koja je začepljena može zahvatiti dio stijenke ili sva tri sloja srca kada govorimo o transmuralnom infarktu (48).

1.4.2. Drugi izvori boli

Različite bolesti perikarda, kao što je perikarditis, mogu dovesti do nastanka srčane boli. Perikarditis je upala perikarda, odnosno srčane ovojnice koja se može manifestirati kao akutna ili kronična bolest. Najčešće je uzrokovana različitim virusima, može nastati kao posljedica upale koja izaziva nakupljanje tekućine u prostoru između perikarda i srca; taj tzv. perikardijalni izljev može stvarati nove komplikacije. Akutni perikarditis je iznenadni napadaj perikarditisa. Obično ga uzrokuje virusna infekcija, ali mogu i reumatska groznica, bolesti vezivnog tkiva te kronična insuficijencija bubrega. Akutni perikarditis može, premda vrlo rijetko, uslijediti nakon koronarne tromboze ili tjelesne ozljede grudnog koša. Može biti i eksudativan zbog oštećenja perikarda. U tom slučaju izljev se nakuplja u perikardijalnoj šupljini i izlazi iz žila koje se nalaze na upaljenim perikardijskim listovima. Karakteriziran je intenzivnom boli u području srca koja se pojačava kašljanjem i dubokim disanjem. Kronični perikarditis je uzrokovan stvaranjem čvrstog, fibroznog perikarda koji ograničava pokrete srca, popraćen je tahikardijom, povećanim volumenom jetre i u težim slučajevima edemima donjih udova(48).

1.5. Životinjski modeli visceralne boli

Životinjski modeli visceralne boli iznimno su klinički važni i njihovi rezultati su izravno primjenjivi u potrazi za djelotvornim analgeticima. Idealni životinjski model trebao bi biti valjan, pouzdan te uspješno replicirati simptome bolesti (51).

Životinjski modeli visceralne boli mogu se podijeliti ovisno o vrsti bolnog podražaja koji se primjenjuje pa tako postoje modeli koji uključuju primjenu kemijskih iritansa, mehaničku distenziju i upalu (51). Klasični model istraživanja visceralnih aferentnih vlakana uključuju širenje mokraćnog mjehura, debelog crijeva, uretre, dvanaesnika ili jednjaka (52-55). U modelima kemijske iritacije gušterača, mjehur, debelo crijevo i druga visceralna tkiva

izlažu se tvarima poput terpentina (25%), ulja gorušice (2.5%), kapsaicina (1%) i bradikinina (56, 57). Pokazalo se da primjena ulja gorušice u debelom crijevu gotovo trenutno izaziva hiperalgezijske promjene u ponašanju miševa koje su najintenzivnije tri dana nakon primjene iritansa (58). Bradikinin je peptid koji uzrokuje dilataciju krvnih žila te se izlučuje za vrijeme upalnih procesa i ekscitacijom nociceptora (57), a pouzdani je pokazatelj upalnih procesa u eksperimentalnom modelu pankreatitisa (59). Direktna aplikacija bradikinina u gušteraču pokazala se efikasnim bolnim podražajem (60-62). Nakon infuzije bradikinina izravno u kanale gušterače, opažena su karakteristična bolna ponašanja u eksperimentalnih životinja (60).

Životinjski model upale mokraćnog mjehura sastoji se od aplikacije kemijskih iritansa u mokraćni mjehur. U akutnom modelu boli mokraćnog mjehura koristili su se još i ulje gorušice i terpentin koji trenutno aktiviraju aferentna živčana vlakna (53). Kronični model sastojao se od kontinuirane iritacije mokraćnog mjehura primjenom ciklofosfamida tijekom dva tjedna (63, 64).

Model akutne boli kod pankreatitisa izaziva se injektiranjem dibutyltin diklorida (engl. dibutyltin dichloride – DBTC) u repnu venu štakora (65). Drugi modeli pankreatitisa uključivali su injekciju kapsaicina (66) ili injekciju l-arginina (67). Kronični pankreatitis moguće je izazvati hranjenjem štakora alkoholom i mastima (68).

1.5.1. Eksperimentalni modeli srčane ishemije-infarkta

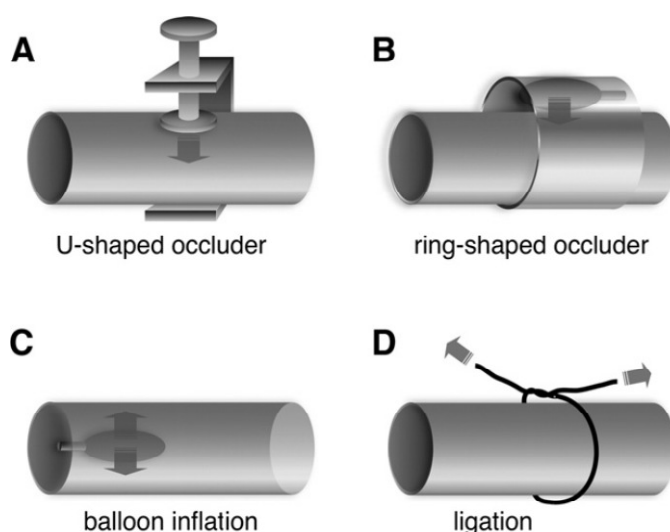
Ishemija je poznat uzrok boli u visceralnim tkivima, a budući da može izazvati pseudoafektivni odgovor u životinja u eksperimentalnim modelima infarkta, ispunjava osnovni kriterij da bi se mogla smatrati prikladnim bolnim podražajem. Opstrukcija u normalnoj opskrbi krvi većine unutarnjih tkiva i organa može izazvati bol. Međutim, ishemija nije pouzdan bolni podražaj, jer je često „tiha“ i može se prepoznati samo na elektrokardiogramu. Refleksni i neuralni odgovori na ishemiju također variraju unutar eksperimenta. Dio varijabilnosti možda je posljedica kompenzacijskih mehanizama koji su aktivirani samim podražajem (npr. otvaranje kolateralnih putova), ali i zbog nepouzdanog odgovora na taj podražaj, vaskularna okluzija nije idealan visceralni bolni podražaj. Moguće je da ishemija funkcionira samo kao modulator mehanoreceptivnih visceralnih podražaja, a varijabilnost opažena u odgovorima na ishemiju može biti posljedica već postojeće patologije

ili mehaničkog rastezanja unutarnjih organa koja je posljedica lokalizirane promjene u skladu sa žarištem ishemije (51).

Osnovni zadatak valjanog životinjskog modela je uspješna replikacija strukturalnih i funkcionalnih karakteristika bolesti koja se modelira, imajući na umu etiologiju te bolesti. U slučaju koronarnih bolesti uglavnom se radi o sužavanju koronarnih arterija zbog aterosklerotskog plaka ili akutne okluzije koja je nastala zbog tromboze. U istraživanjima su se do sada koristile različite tehnike kojima se nastojalo postići sužavanje koronarnih arterija u životinja (69).

Indukcija hiperkolesterolemije pomoću masne hrane pokazala se efikasnim načinom indukcije infarkta miokarda u svinja (70), štakora (71) i dviju vrsta nižih primata (72). Međutim ovaj je model bio vrlo nepouzdan i teško je bilo predvidjeti točnu lokaciju koronarne okluzije. Isti nedostatak imale su i tehnike koje su se fokusirale na transgenetske manipulacije (73). Međutim, njihov nedostatak je bio u tome što je njihova etiologija često potpuno različita od etiologija koronarne bolesti koja se prirodno razvije (74).

Stoga su kirurške metode indukcije ishemije u životinjskim modelima (Slika 2) mnogo pouzdanije jer omogućuju precizno određivanje mjesta i veličine koronarnog oštećenja (75).



Slika 2. Shematski prikaz različitih tehnika indukcije srčane ishemije. A: Okluzija koronarne arterije korištenjem konstriktora u obliku slova U. zakretanjem vijka i pomicanjem pločice možemo inducirati postepenu okluziju. B: Konstrikcija inducirana prstenom. C: Uvodi se kateter intrakoronarno kojim se inducira embolija

D: Ligacija koronarne arterije .Prilagođeno prema Klocke et al Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. Cardiovascular Research. 2007; 29–38

Podvezivanje koronarne arterije

Prvi eksperimentalni model infarkta koji uključuje podvezivanje lijeve koronarne arterije (LAD) u malih životinja opisan je 1954. godine. Taj model omogućio je vrijedne spoznaje o ventrikularnoj funkciji srca, čime su objašnjene brojne strukturalne, funkcionalne i biokemijske karakteristike ishemijske (76). Za pristup LAD-u korištena je sternotomija ili torakotomiju kroz 4. interkostalni prostor (77). Temeljem tog modela utvrđeno je da pokusne životinje i ljudi imaju vrlo usporediv histološki tijek cijeljenja infarkta i formiranja ožiljka.

Kirurška procedura za podvezivanje lijeve koronarne arterije u štakora i miša je vrlo slična (78). Smrtnost povezana s indukcijom MI u miša je 37–50% otprilike jedna sat nakon podvezivanja, vjerojatno kao posljedica ventrikularne fibrilacije i teškog akutnog zatajenja srca (79), ali može se smanjiti uzimanjem nitroglicerina (10–50 µg) nakon operacije. Ovaj model postao je izrazito popularan zbog svoje ekonomičnosti i sličnosti u patofiziologiji i kliničkim karakteristikama zatajenja srca u ljudi (80).

Huikshoven je predstavio alternativu tradicionalnom kirurškom pristupu podvezivanja lijeve koronarne arterije koji je uključivao jednostavan transabdominalni pristup srcu. Povlačenjem ksifoidne kosti, i rezom oblika T na dijafragmi omogućen je pristup torakalnoj šupljini i srcu. Životinje koje su bile podvrgnute ovom operativnom zahvatu imale su dobar poslije-operativan oporavak dok je mortalitet bio minimalan (81). Daljnja modifikacija ovog pristupa korištena je u ovom istraživanju, pristup srcu u velikoj mjeri je smanjio traumu, umjesto T-reza, jednostrukim rezom u ravnini simetrije i uz pomoć ekspandera omogućen je pristup srcu koji ne oštećuje živčana vlakna niti krvne žile, krvarenje je bilo minimalno, te je omogućena odlična vizualizacija srca. Endotrahealna intubacija daje eksperimentatoru dovoljno vremena za izvođenje operacije. Poslije-operativni oporavak je bio iznimno brz (82)

1.6. Ponašajne mjere boli

Dosadašnja istraživanja boli u životinja uglavnom su bila fokusirana na osjetnu komponentu boli (83). Međutim, mjerenje jednostavnih refleksnih uzmicanja u životinja pokazalo se nedostatno jer se ne podudara sa simptomima bolesti u pacijenata, a može postojati značajna pristranost znanstvenika koji tumači rezultate ponašanja (84).

Jedna od važnih funkcija životinjskih modela bolesti je otkrivanje novih terapijskih metoda, stoga translacija novih rezultata nije moguća sve dok životinjski modeli ne uzmu u obzir sve komponente boli (85).

U slučaju infarkta miokarda u ljudi pokazalo se da čak i nakon terapije i oporavka pacijenti još uvijek imaju brojne teškoće u svakodnevnom životu koje za posljedicu imaju smanjenu kvalitetu života: anksioznost/depresivnost, gubitak interesa za okolinu i socijalne interakcije (86). Prema tome, valjani životinjski model boli treba uzeti u obzir i afektivnu komponentu boli.

Pokušaji mjerenja emocionalnog stanja u životinja nisu specifični samo za istraživanje boli. U istraživanju i razvoju novih lijekova su anksioznost, depresivnost i bol često korištene mjere ishoda. Primjerice, procjena apstinencijske krize u miševa velikim se dijelom temelji na opisu afekta (87).

U životinja samoprocjene nisu moguće i stoga se koriste posredne mjere afektivnog stanja s pretpostavkom da će sve eventualne promjene u fiziologiji ili ponašanju korelirati s promjenama u emocijama. U tu svrhu koriste se različiti testovi ponašanja kao što su test otvorenog polja, križni labirint i test prisilnog plivanja.

Test otvorenog polja (engl. *open field test*) najčešće se koristi za procjenu mobilnosti te anksioznosti povezane s boli. Štakori koji su anksiozniji i osjećaju više boli provode značajno manje vremena u središnjem dijelu testa te su općenito manje aktivni (88). U modelu periferne ozljede živca, parametri kao što su broj ulazaka u središnji kvadrant testa otvorenog polja i timarenje omogućili su uspješno razlikovanje eksperimentalne i kontrolne skupine (89).

Test prisilnog plivanja (engl. *forced swim test*) najčešće se koristi za procjenu depresivnosti, a najčešće korišteni parametri su vrijeme mobilnosti koje je značajno kraće za životinje s ozljedom (90-92). Ovaj test koristi se i u procjeni motivacije u osnovi nekog ponašanja te se može smatrati i korelatom afektivno-motivacijske komponente boli u

životinja. Budući da se kretanje koristi kao posredna mjera depresivnosti povezane s boli u svim navedenim ponašajnim testovima važno je isključiti motoričko oštećenje, tako da se smanjeno kretanje može stvarno pripisati afektu (93).

Test križnog labirinta (eng. *elevated plus maze, EPM*) često se koristi za procjenu anksioznosti životinje i anksiolitičkih svojstava testiranih lijekova. Ovaj test zasniva se prirodnoj averziji glodavaca prema otvorenim površinama. Averzija prema otvorenim površinama povezana je s tigmotaksijom (grčki. *thigmotaxis*) koja uključuje izbjegavanje otvorenih površina te kretanje uz periferne rubove testa ili u zatvorenim dijelovima testa. U EPM-u to znači da se životinje uglavnom kreću u zatvorenim dijelovima EPM-a. Smanjenje anksioznosti u EPM-u obilježeno je povećanim brojem ulazaka u otvoreni dio testa, duljim boravkom u otvorenim dijelovima instrumenta. Ukupan broj ulazaka u zatvoreni i otvoreni dio testa interpretira se kao ukupna razina aktivnosti (94). Budući da su anksiozna ponašanja povezana s boli, tako se bol životinje očituje u smanjenom broju izlazaka na otvoreni dio križnog labirinta i smanjeni broj uzdizanja (parametar koji se odnosi na istraživanje okoline u štakora) (95.815).

Prvi modeli „kvalitete života“ u štakora nakon infarkta miokarda uzeli su u obzir upravo ponašanje u testu otvorenog polja. Naime, pokazalo se da štakori s infarktom uglavnom preferiraju rubne dijelove instrumenta ili nisu uopće izlazili iz kaveza; suočeni s izborom vrlo rijetko istražuju novu okolinu i manje se kreću unutar testa (96). Također se uočilo da je socijalno ponašanje štakora s infarktom uglavnom izbjegavajuće (86, 96).

Drugi testovi koji se baziraju na opažanju ponašanja uključuju korištenje intradermalnih ili intraperitonealnih injekcija iritansa koji imaju funkciju bolnog podražaja i često se primjenjuju u visceralnim modelima boli. Primjena intraperitonealnih iritansa izaziva stereotipno ponašanje koje se očituje u abdominalnim kontrakcijama, micanju prednjih udova ili cijelog tijela te smanjenom motoričkom aktivnosti (97). Aplikacija algogenih tvari (najčešće formalina) u šuplje organe kao što je primjerice debelo crijevo izaziva kompleksne oblike bolnog ponašanja koji se u prvoj fazi sastoje od rastezanja tijela i kontrakcija bokova ili cijelog tijela te u posljednjoj fazi ližu i grizu abdomen (98). Giamberdino i sur. 1995 su modelirali bol koja je posljedica mokraćnog kamenca koji također predstavlja i prenesenu bol. Grčenje tijela opaženo je do četiri dana nakon indukcije uz hiperalgeziju abdominalnih mišića (56).

Ovi modeli često su kritizirani zbog nedostatka pojavne valjanosti. Iritansi kao što je formalin i karagenin ili kirurška ozljeda živca umjetni su i ne odražavaju simptome bolesti

pacijenta. Noviji modeli poslije-operativne (99), tumorske (100) i neuropatske boli kao posljedice kemoterapije (101) značajno su povećali vanjsku valjanost.

Mogući nedostatak korištenja ovih mjera je u tome što su višestruko uvjetovane i zbog toga istraživači nastoje kontrolirati druge čimbenike koji bi potencijalno mogli djelovati na rezultate testa, primjerice privremeno uzbuđenje životinje zbog izloženosti novom podražaju ili mjernom instrumentu (102).

U novije vrijeme istraživanja se fokusiraju na složenije, spontane mjere ponašanja kao što su greške u mišljenju koje se odnose na promjene u procesiranju informacija koje su posljedica negativnog afekta (103).

Spontane mjere ponašanje pokazale su se važnima u modeliranju ponašanja, međutim parametri kojima ih opisujemo su vrlo problematični s obzirom na njihovu učestalost i specifičnost (104). Pri analizi ponašanja glodavaca (štakora, miševa, zamoraca) treba uzeti u obzir da je etološka karakteristika vrste prikrivanje ozljede i boli zbog straha od predatora (105). Moguće rješenje su kompleksni etogrami normalnog ponašanja i ponašanja povezanog uz bol.

Aktivacijske kutije i različiti računalni programi kao što su AnyMaze, Phenotyper i Ethovision u tom su smislu omogućili značajan napredak. Korištenjem računalnih programa značajno se proširio vremenski interval u kojem se bilježi ponašanje, prikupljanje podataka je standardizirano, smanjen je utjecaj istraživača i drugih okolišnih čimbenika pri analizi ponašanja, omogućeno je trajno praćenje unosa hrane i vode, uzoraka kretanja, socijalnih interakcija te praćenje više životinja istovremeno (106).

Kako bi životinjski model u potpunosti odražavao ljudsko iskustvo boli, potrebno je prepoznati i suptilne promjene u ponašanju povezane s boli. Prepoznavanje tih obrazaca zahtijeva detaljnu i složenu analizu cjelokupnog repertoara ponašanja štakora kako bi se identificirala ponašanja povezana s nocicepcijom te prateći afekt kako bismo ga mogli nazvati bol (104).

3. CILJEVI I HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

1. Istražiti ponašanja povezana s boli te razviti pouzdanu metodu procjene ponašanja štakora u akutnoj fazi infarkta miokarda.
2. Istražiti postoji li korelacija između ponašanja povezanog s boli i veličine eksperimentalno izazvanog infarkta.
3. Istražiti mogu li se ponašanja povezana s boli koje smo utvrdili u prvoj fazi poništiti morfijem i onda ponovno vratiti primjenom naloksona.

3.2. Hipoteze

1. Očekujemo, općenito nižu razinu aktivnosti, štakora u skupini u kojoj je izazvan infarkt miokarda kroz cijelu bateriju testova u usporedbi s lažno pokusnom i kontrolnom skupinom.
 - Očekujemo da će štakori kojima je izazvan infarkt miokarda provesti manje vremena u otvorenim, središnjim dijelovima testa kod skupina koje su podvrgnute kirurškom postupku, u usporedbi sa lažno pokusnom i kontrolnom skupinom u oba korištena testa (OFT i EPM).
 - Očekujemo, manje rotacija tijela, manje timarenja te manje uzdizanja štakora u skupini kojoj je izazvan infarkt miokarda u cijeloj testnoj bateriji.
2. Veličina infarkta pozitivno će korelirati s ponašanjem povezanim s boli.
3. Očekujemo da ćemo oblike ponašanja karakteristične za životinje s eksperimentalno izazvanim infarktom miokarda poništiti primjenom morfija i ponovo aktivirati primjenom naloksona.

4. METODE I MATERIJALI

4.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni odrasli mužjaci štakora soja Sprague Dawley, mase od 190 do 240 grama, uzgojeni u Nastambi za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu. Štakori su smješteni u odvojene plastične kaveze s mekom podlogom te su imali slobodan pristup hrani i vodi. Nakon dolaska u pričuvenu nastambu životinje su se prilagođavale na novu nastambu najmanje dva dana prije početnog testiranja. Uz dvanaestosatni ciklus svjetla i tame temperatura u nastamba iznosila je 22 ± 2 °C.

Svi su eksperimenti provedeni u aktivnoj fazi štakora. U prvom eksperimentu upotrijebljene su tri skupine štakora. Životinje su nasumično raspoređene u jednu od slijedećih skupina: kontrolna skupina (n=8), lažna pokusna skupina (bez podvezivanja lijeve koronarne arterije) (n=7), pokusna skupina (AMI (prema eng. acute myocardial infarction) (podvezana lijeva koronarna arterija) (n=8) te lažna pokusna skupina s očuvanim perikardom (n=4). Kontrolna skupina je imala samo rez na koži kako bi osigurali nepristrano testiranje i analiziranje ponašanja svih skupina štakora. U drugom eksperimentu korištene su samo dvije skupine štakora, kontrolna skupina (n=4) i AMI skupina (n=4) kojima je dan morfij.

Svi eksperimentalni postupci temeljeni su na etičkim smjernicama Svjetskog udruženja za istraživanje boli (IASP). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Splitu.

4.2. Infarkt miokarda: podvezivanje lijeve koronarne arterije

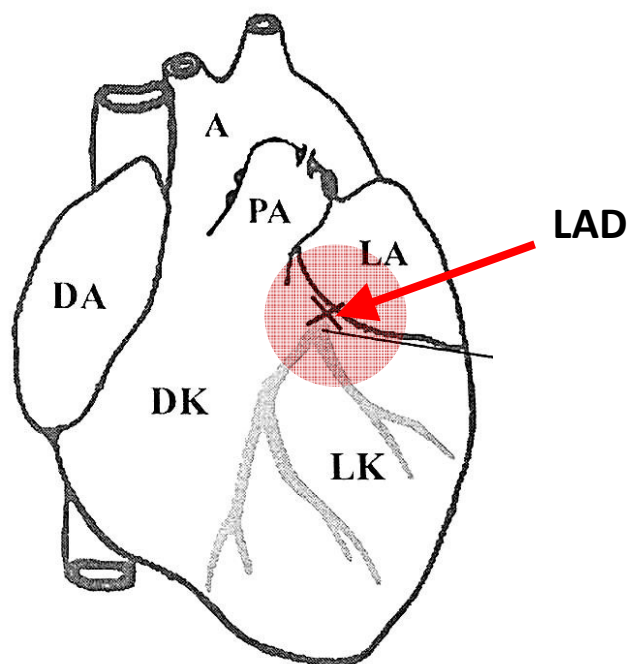
Sve su životinje anestetizirane inhalacijskim anestetikom (5%-tni izofluran u kisiku; Forane, Abbott laboratories, Queenborough, UK). Anestezija je kasnije održavana 2%-tnim izofluranom. Lijeva koronarna arterija je podvezana kako bi se inducirao infarkt miokarda prema prethodno opisanoj metodologiji (81, 107). Početni rez kože napravljen je u središnjoj liniji gornjeg dijela abdomena, a nakon toga je napravljen uzdužni rez, prateći lineu albu. Tupom sekcijom prikazan je ksifoidni nastavak prsne kosti oko kojeg smo zavezali čvor. Natežući konac prikazana je donja površina ošita. Nastavak operacije izvodi se pod neurokirurškim mikroskopom (Leica, M520 MCI, Švicarska, Slika 3).



Slika 3. Neurokirurški mikroskop Leica M520 MC1

Rez na ošitu u obliku slova „I“ se u 1/3 proteže kroz središnji tetivni dio, a 2/3 kroz mišićni dio. Odmah po rasijecanju ošita životinje su spojene na respirator (SAR 830, CWE Inc, USA) postavljen na 56 udisaja u minuti i udisajni tlak od 784 do 980 Pa (8 do 10 cm/H₂O) koji ih je održavao stabilnim.

Zbog boljeg uvida u prsnu šupljinu rez je proširen retraktorom. Perikard se pažljivo oljušti kako bi se jasno prikazala površina srca. Podizanjem lijeve aurikule (ružičaste boje za razliku od desne koja je modre boje) nalazi se polazište lijeve silazne koronarne arterije koje je smješteno na polovici linije između lijeve aurikule i početka zajedničkog debla plućnih arterija (truncus pulmonalis). Sama arterija nije vidljiva na površini srca dok je jasno vidljiva vena koja prolazi točno iznad nje. Mjesto podvezivanja je uvijek bilo isto: u razini donjeg ruba lijeve aurikule što prema literaturi odgovara udaljenosti od 2-3 mm od njenog početka (Slika 4).



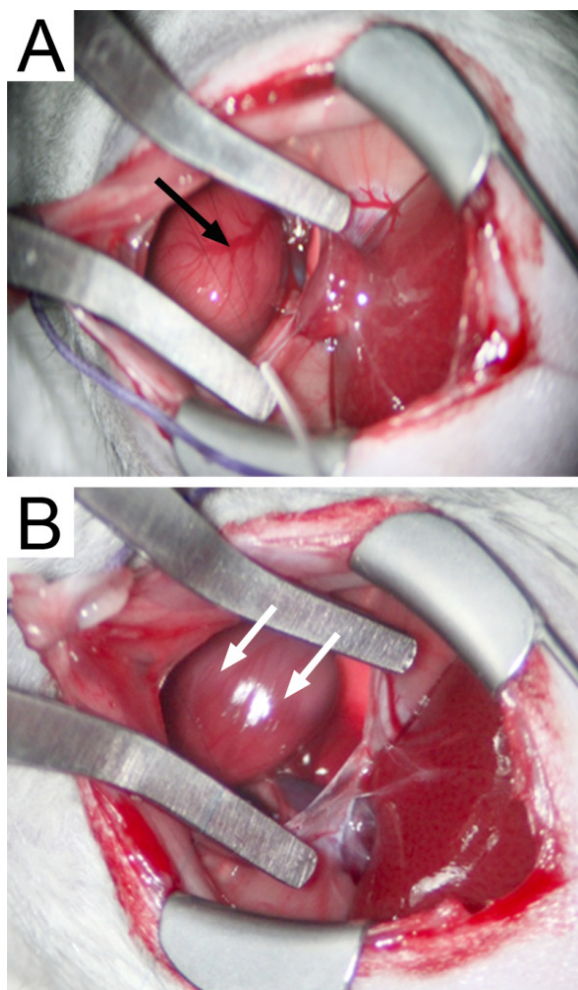
Slika 4. Shematski prikaz podvezivanja prednje lijeve silazne koronarne arterije u štakora (LAD). Desna klijetka (DK), desna aurikula (DA), lijeva klijetka (LK), lijeva aurikula (LA), aorta (A), plućna arterija (PA)

Za podvezivanje lijeve silazne koronarne arterije koristio se atraumatski, neresorptivni kirurški konac 8-0 (Prolene, 8-0, 6.5 mm, 3/8c, 8732H, Ethicon INC, New Jersey, USA). Formirani čvor je dodatno učvršćen tkivnim ljepilom (Superattak, Henkel Loctite, Irska). Površinsko bljedilo srca, bilo je znak uspješnog podvezivanja koronarne arterije (Slika 5). Rez na ošitu zašiven je s neresorptivnim kirurškim koncem oznake 7-0 (Prolene, 7-0, 8.0 mm, 3/8c, 8735H, Ethicon INC, New Jersey USA) i to od mišićnog prema tetivnom dijelu.

Neposredno prije posljednjeg šava u ošitu, reekspandiraju se pluća i upuše se zrak pod tlakom. Širenjem pluća izbacuje se preostali zrak iz prsne šupljine i učvrsti posljednji šav. U tom trenutku životinja se isključuje s respiratora, te kroz 30 sekundi počne samostalno disati. Nakon šivanja mišića i kože životinja se drži na toplom dok se sasvim ne probudi iz anestezije.

U istraživanju su upotrijebljene i dvije lažne pokusne skupine. U prvoj lažnoj pokusnoj skupini životinje su podvrgnute postupku identičnom onom prethodno opisanom osim što se štakorima nije podvezala lijeva koronarna arterija. U drugoj lažnoj pokusnoj skupini, osim što štakorima nije podvezana lijeva koronarna arterija nije im ni otvorena

perikardijalna šupljina. Štakorima te skupine učinjen je samo mali rez na ošitu koji je neposredno nakon toga zašiven, bez dodatnih manipulacija perikarda.



Slika 5. Srce štakora: A) prije podvezivanja i B) nakon podvezivanja lijeve silazne koronarne arterije (LAD). Crno obojene strelice označavaju lijevu silaznu koronarnu arteriju, dok bijele strelice označavaju granicu između zdravog miokarda i blijedog tkiva koje odgovara području uspješno inducirano infarkta miokarda

4.3. Ponašajni testovi i eksperimentalni nacrt

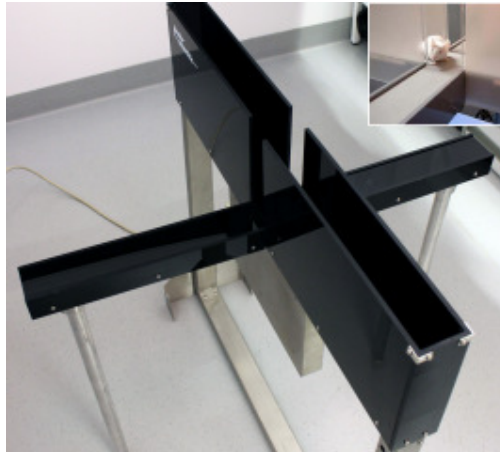
Kako bismo identificirali parametre koji najbolje razlikuju AMI skupinu od ostalih skupina, koristili smo bateriju ponašajnih testova na način prikazan na Slici 2.

Test otvorenog polja (OFT prema eng. *Open Field Test*) najčešće se koristi za mjerenje lokomotornog ponašanja i motivacije u podlozi tog ponašanja. OFT se sastoji od tamne četvrtaste kutije od pleksiglasa (100x100 cm) (Slika 6). Testiranje počinje nakon što se štakor položi u središnji kvadrant OFT. Mjereni ponašajni parametri bili su: vrijeme provedeno na periferiji, vrijeme provedeno u središnjem kvadrantu, parametri povezani sa spontanom lokomotornom aktivnosti, brzina kretanja, rotacije tijela, frekvencija uzdizanja i timarenja. Opažanje ponašanja trajalo je 10 minuta za svaku životinju.



Slika 6. Fotografija testa otvorenog polja

Uzdignuti križni labirint (EPM prema eng. *Elevated Plus Maze*) sastoji se od dva ukrižena dijela (50x10 cm) od kojih je jedan zatvoren zidom visine 40 cm. Labirint se sastoji od crne plastike i podignut je na visinu od 50 cm iznad poda. Prije početka testiranja štakor se postavi na križište labirinta. Ponašanje se snima 10 min. U OFT-u bilježili smo sljedeće parametre: ukupan broj ulazaka u otvorene i zatvorene dijelove labirinta, vrijeme provedeno u tim dijelovima i parametre povezane sa spontanom lokomotornom aktivnosti, brzinu kretanja, te frekvenciju rotacije tijela, uzdizanja i timarenja (Slika 7).



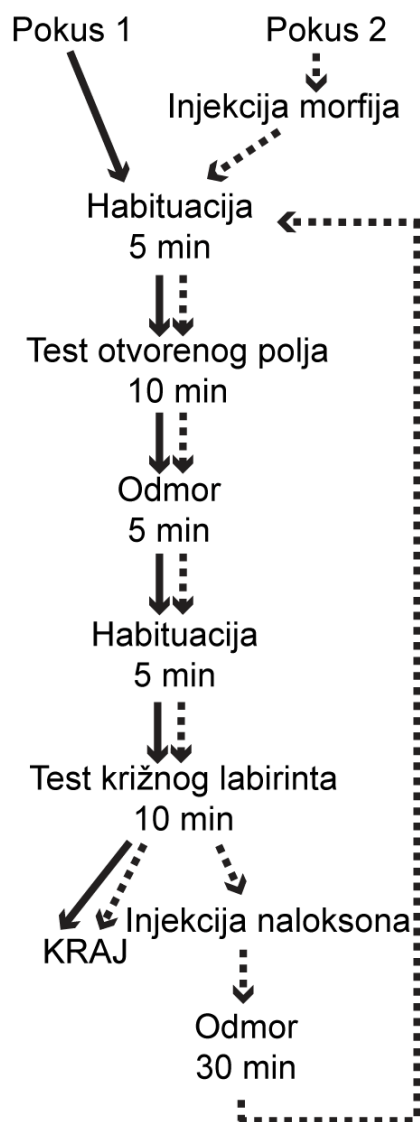
Slika 7. Fotografija testa uzdignutog križnog labirinta. Strelice prikazuju otvorene i zatvorene dijelove labirinta

Svi ponašajni testovi su provedeni u izoliranoj prostoriji osvijetljenoj crvenim svjetlom koje je najmanje stresno za štakore (97). Nakon svakog testa, instrumenti su očišćeni vodom, a potom 70% alkoholom. Cjelokupna baterija testova je snimljena kamerom visoke rezolucije (Logitech Webcam C905, Logitech, Moulin du Choc, Switzerland), a video zapisi su učitani u AnyMaze program (AnyMaze Inc., Wood Dale, IL, USA) kojim su dalje analizirani.

U prvom eksperimentu provedeno je jedno početno i četiri poslije-operativna testiranja. Prvo poslije-operativno testiranje počelo je neposredno nakon indukcije infarkta kada se životinja probudila iz anestezije (otprilike nakon 20 do 30 minuta). Testiranje je ponovljeno treći, sedmi i četrnaesti dan nakon operacije.

U drugom eksperimentu provedeno je jedno početno i dva poslije-operativna testiranja, a kirurška procedura je bila identična prethodno opisanoj, osim u primjeni morfija neposredno prije prvog testiranja ponašanja. Životinje su testirane istim, prethodno utvrđenim redoslijedom (Slika 8). Drugo testiranje ponašanja provedeno je nakon injekcije naloksona.

U oba eksperimenta testiranje ponašanja provedeno je istim redoslijedom bez promjene redoslijeda testiranja budući da postojeća istraživanja pokazuju pouzdanije rezultate kad se najprije primijeni najmanje invazivan test a potom više invazivan test (108).



Slika 8. Redoslijed testiranja ponašanja u prvom eksperimentu (puna linija) i drugom eksperimentu (isprekidana linija). Ukupno trajanje testiranja ponašanja je bilo 35-45 minuta

4.4. Primjena lijekova

Štakori su primili intraperitonealnu injekciju morfija (Morphini Hydrochloridum, Alkaloid, Makedonia) (5 and 10 mg/kg, razrijeđen u fiziološkoj otopini) 30 min prije testiranja ponašanja (drugo testiranje u kontrolnoj skupini i prvo testiranje u pokusnoj skupini). Nakon testiranja ponašanja, primijenjen je antagonist morfija nalokson (0.1 mg/kg,

razrijeđen u fiziološkoj otopini, Naloxon Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Germany) primijenjen intraperitonealno. Nakon 30 minuta ponovljena je ista baterija testova.

Točnu dozu koja izaziva anesteziju štakora nije moguće utvrditi pa smo dozu prikladnu za ovaj eksperiment odredili temeljem krivulje ponašanja u prethodno opisanim modelima (109, 110), interpolacijom doza koje se primjenjuju u ljudi (85), te prema Smjernicama za anesteziju i analgeziju laboratorijskih životinja (111).

4.5. Uzimanje i procesiranje tkiva

Po završetku eksperimenta, štakori su anestezirani kao što je prethodno opisano i žrtvovani dekapitacijom. Izvađena su im srca i fiksirana u 4% paraformaldehidu u 0,01 M fosfatnom puferu. Nakon tri dana fiksacije, srce je izrezano na tri dijela; prvi rez napravljen je u visini donjeg dijela lijeve aurikule a drugi rez 4 mm ispod prvog reza. Tkivo je dehidrirano u nizu rastućih koncentracija alkohola i potom uklopljeno u parafin. Serijski parafinski rezovi debljine 10 μm postavljeni su na silanizirana stakla. Za histološku analizu rezovi srca bojani su hemaloun-eozinom i trobojnim bojanjem po Malloryu. Obojani rezovi fotografirani su digitalnim fotografskim aparatom Canon A480, (Lake Success, NY, USA). Veličina infarkta je mjerena koristeći Adobe Photoshop CS3 Magic wand opciju (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Infarcirano područje je označeno i izračunato kao postotak površine lijeve klijetke, potom je računat prosjek iz postotka infarcirane površine svakog 10-og reza srca. Prosječan broj rezova koji je evaluiran je bio $5,3 \pm 1,4$.

4.6. Statistička analiza

Mjere ponašanja povezanog s boli (apsolutne vrijednosti) analizirane su složenom ANOVOM i Newman-Keulsovim post hoc testom. Jednostavne usporedbe između skupina u drugom eksperimentu su učinjene t-testom. Za svaku od usporedbi navedene su prikladne mjere veličine efekta. Za usporedbu dviju aritmetičkih sredina (kod usporedbi učinaka morfija i naloksona) prikazat će se Cohenov d (d).

Za prikaz stupnja povezanosti između sistematskog izvora varijance i zavisne varijable u provedenim analizama varijance (za rezultate ponašajnih testova u prvom eksperimentu gdje su postojale tri skupine i pet točaka mjerenja) prikazat će se kvadrirana eta (η^2).

Rezultati na slikovnim prikazima su izraženi kao aritmetičke sredine i pogreške aritmetičke sredine. Rezultati su bili statistički značajni ako je $p < 0,05$

5. REZULTATI

5.1. Kirurški pristup

U ovom istraživanju primijenjen je inovativan kirurški pristup. Kirurška procedura opisana u ovom radu pokazala se pouzdanom i ponovljivom metodom eksperimentalne indukcije infarkta miokarda u štakora (112, 113). Modificirali smo tradicionalnu kiruršku proceduru koja obično uključuje lijevu torakotomiju (114) ili medijalnu sternotomiju (115) koja među ostalim uključuje i rizik od slučajnog oštećenja drugih torakalnih organa (82). Rez u ravnini simetrije izazvao je minimalno oštećenje tetivnog središta ošita a produžetak reza prema ksifoidnom nastavku išao je paralelno s mišićnim vlaknima sternalnog segmenta ošita. Relativno mali početni rez (1-1.5 cm) omogućio je odličnu vizualizaciju srca te pristup kirurškim instrumentima kojima je manipulirano srce.

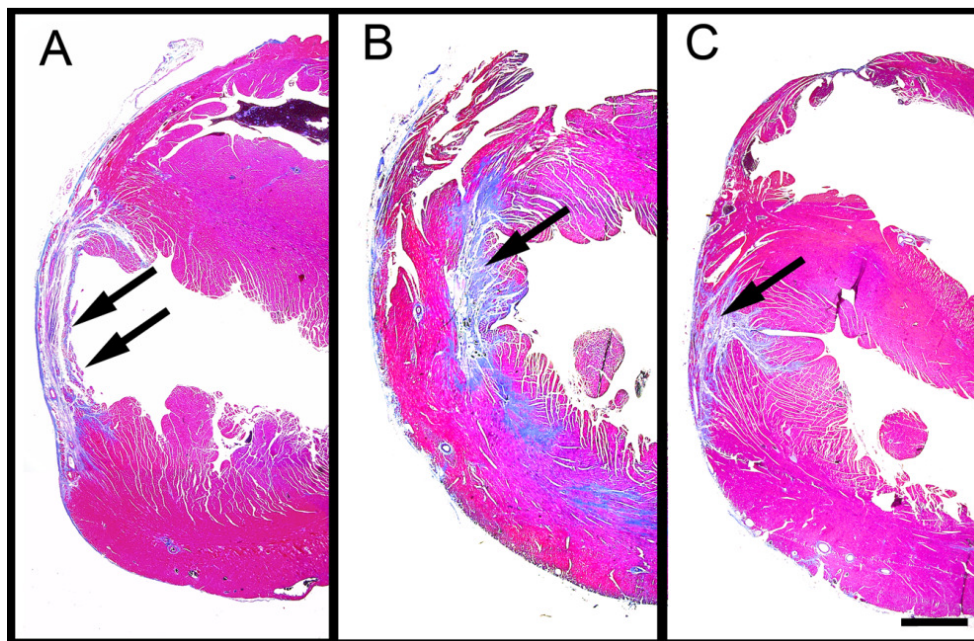
Nakon zahvata na srcu, prerezani dijelovi ošita šivani su gustim, kontinuiranim šavom od središta prema sternalnom dijelu i na taj način je u potpunosti zatvorena torakalna šupljina. Kroz prostor između dva zadnja šava uvučena je mala sonda priključena na špricu kojom je u potpunosti evakuiran zrak iz prsišta a pluća su u potpunosti re-ekspandirana. U roku od 30 sekundi, životinja nastavlja disati potpuno samostalno u normalnom ritmu. Kirurški pristup koji se zasniva na dijafragmektomiji omogućuje primjenu svih eksperimentalnih protokola za istraživanje ishemijske i reperfuzijske miokarda. Ligacija lijeve silazne koronarne arterije ovim kirurškim pristupom izaziva oštećenje od otprilike 10% lijevog ventrikla te trenutno bljedilo miokarda koje je bilo vidljivo odmah prilikom operacije.

Nadalje, endotrahealna intubacija štakora ostavlja dovoljno vremena eksperimentatorima da dovrše operaciju. Ova operacija je vrlo fleksibilna te ju je moguće modificirati ovisno o vrsti zahvata koji se planira te prema tome prilagoditi i anesteziju.

5.2. Histološka potvrda infarkta miokarda

Infarkt je utvrđen nakon obdukcije, histološkom obradom srca. Ožiljkasto infarcirano tkivo uočeno je na prednjem dijelu granice između lijeve i desne klijetke te se protezalo dalje na lijevu klijetku u svih štakora s induciranim infarkt. Nađene su tri vrste ožiljaka nakon infarkta; submuralni, subendokardijalni i subepikardijalni (Slika 9). U svim opisanim

oblicima rubni pojas ožiljkastog tkiva nastavlja se na središnji dio infarciranog zida. Prosječna veličina infarkta u AMI skupini izražena je kao postotak oštećenja površine presjeka lijeve klijetke i iznosila je $10 \pm 6,4\%$. ($M \pm SD$)



Slika 9. Trobojno bojanje po Malloryu, prikaz poprečnih rezova: a) transmuralni, b) subendokardijalni i c) subepikardijalni infarkt. Strelice označavaju ožiljak infarciranog tkiva koje je karakteristične plave boje za razliku od zdravog tkiva miokarda. Ljestvica: 1 mm; primjenjiva na sve

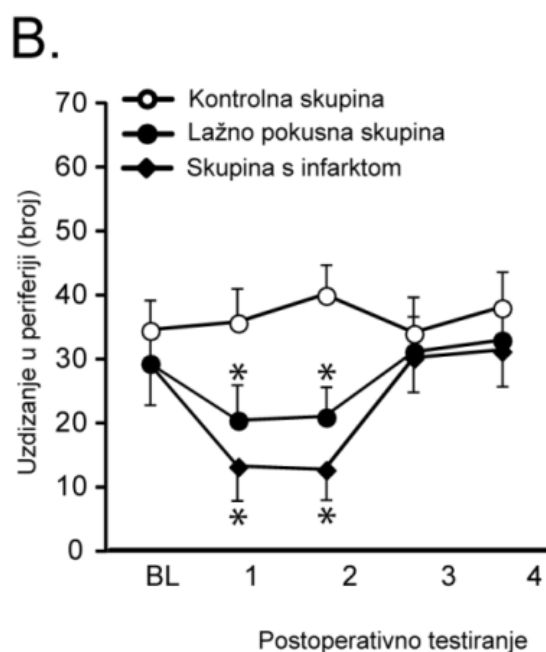
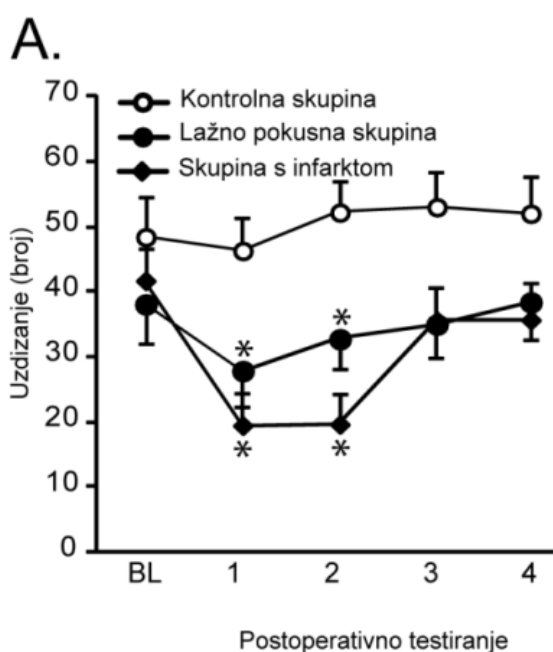
5.3. Ponašajne promjene povezane s AMI

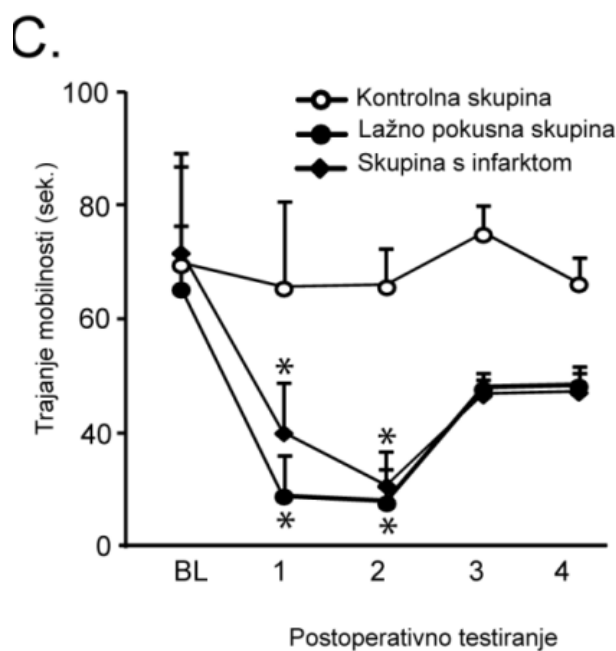
Iako je 48 ponašajnih parametara bilježeno i analizirano u OFT, broj uzdizanja i trajanje kretanja su bili jedini ponašajni parametri u kirurškim skupinama (AMI i lažno pokusna skupina) koji su pokazali značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu. Broj rotacija tijela, prijeđena udaljenost, brzina ili parametri karakteristični za određene dijelove OFT-a nisu statistički značajno razlikovali skupine.

Štakori u AMI skupini su se značajno manje uzdizali u usporedbi s lažno pokusnom skupinom u prvom i drugom poslije-operativnom testiranju u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 10A, $F_{2,17}=9,85$, $p<0,001$, $\eta_p^2=0,54$). Kada usporedimo frekvenciju uzdizanja između skupina u različitim zonama OFT, pokazalo se da se štakori u AMI i lažno pokusnoj skupini značajno manje uzdižu u perifernoj zoni OFT u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 10B, $F_{2,17}=5,27$, $p<0,05$, $\eta_p^2=0,38$). Utvrđene razlike su bile uočljive sve do drugog poslije-operativnog testiranja.

Trajanje kretanja u središnjem kvadrantu OFT-a (Slika 10C) je bilo značajno kraće u AMI i lažno pokusnoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom ($F_{2,17}=4,66$ $p<0,05$, $\eta_p^2=0,35$). Takav uzorak razlika bio je prisutan do drugog poslije-operativnog testiranja.

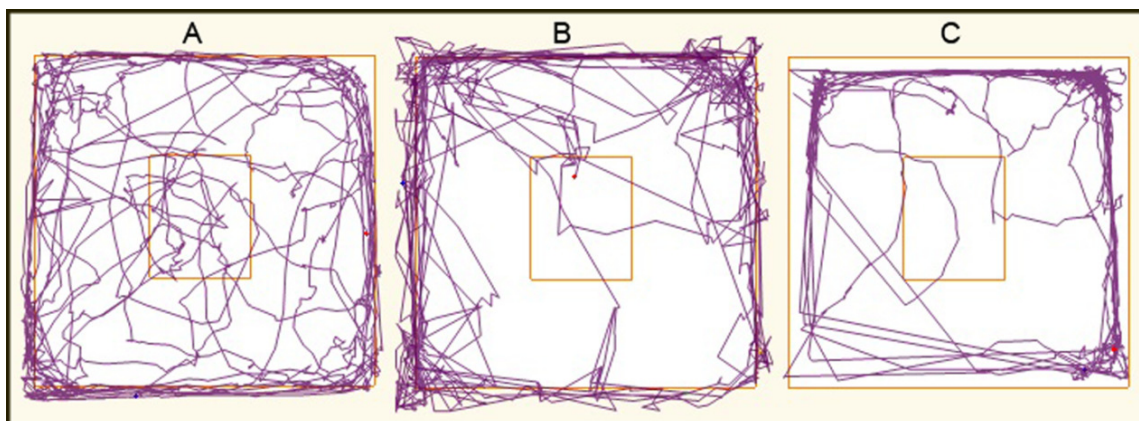
Ovi rezultati pokazuju kako su štakori u obje kirurške skupine (AMI i lažno pokusna skupina) bili više inhibirani u svom ponašanju u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora. Smanjenje sveukupne razine aktivnosti bilo je izraženije u AMI skupini štakora, iako ta razlika između AMI i lažno pokusne skupine nije bila statistički značajna.





Slika 10. Ponašajni parametri mjereni u testu otvorenog polja, kirurške skupine (AMI i lažna pokusna skupina) pokazuju značajno smanjenje frekvencije uzdizanja i opće mobilnosti u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora. A) Kirurške skupine pokazuju smanjenu frekvenciju uzdizanja u odnosu na kontrolnu skupinu, AMI skupina pokazuje najveće smanjenje u prvom poslije-operativnom testiranju u odnosu na kontrolnu skupinu. B) Frekvencija uzdizanja u periferiji je bila značajno snižena u kirurških skupinama u usporedbi s kontrolnim štakorima. C) Vrijeme mobilnosti u centralnom kvadrantu se značajno razlikuje između skupina, kirurške skupine se razlikuju od kontrola u prve dvije točke mjerenja. Zvijezdica označava značajne razlike između skupina u određenoj točki mjerenja. Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina \pm SEM

Kad usporedimo uzorke kretanja u OFT između različitih skupina, očigledno je da su se štakori u AMI skupini manje kretali u središnjem kvadrantu u usporedbi s kontrolnom i lažno pokusnom skupinom štakora (Slika 11).

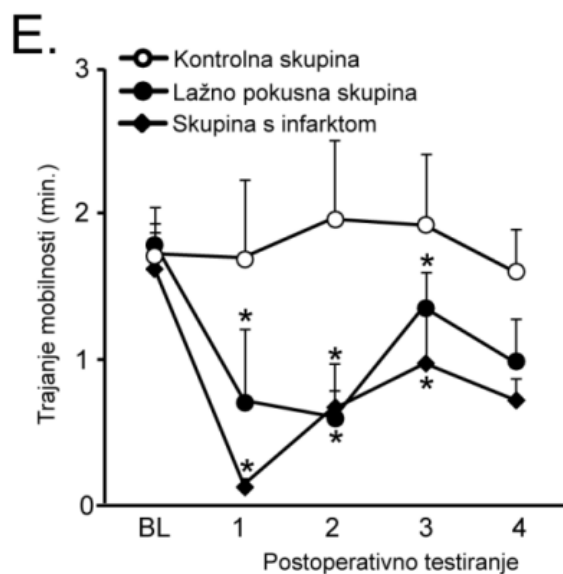
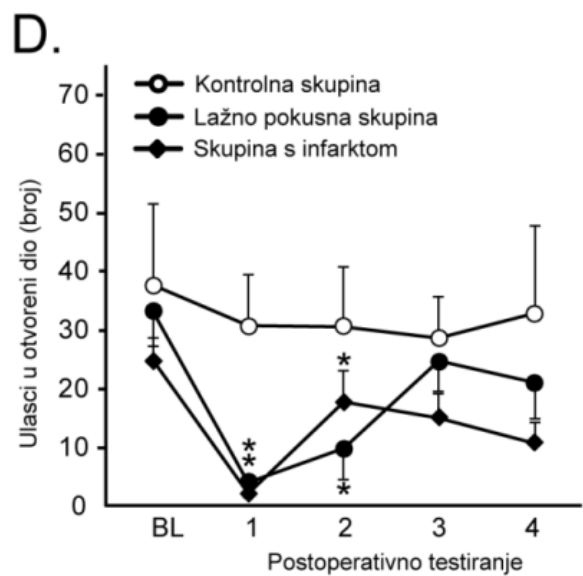
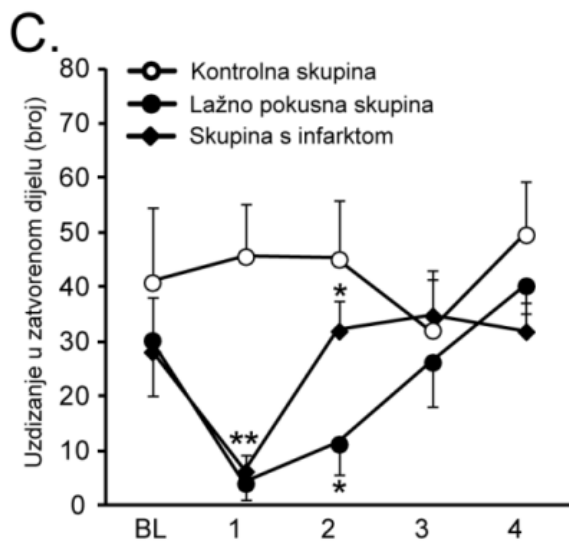
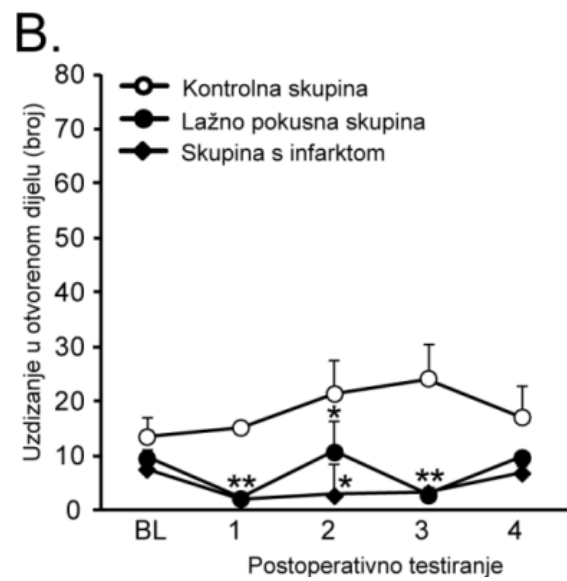
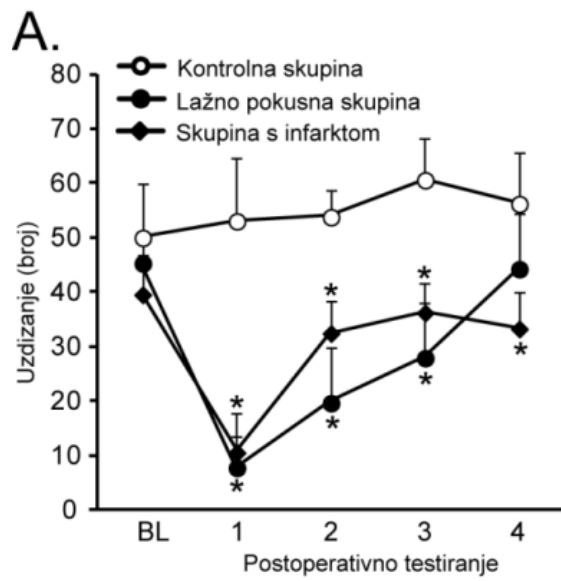


Slika 11. Reprezentativni primjer uzorka kretanja u testu otvorenog polja tijekom prvog poslije-operativnog testiranja za A) kontrole, B) lažnu pokusnu skupinu i C) štakore s akutnim infarktom miokarda. Iz prikaza je vidljivo da su kontrolni štakori skloniji istraživati centralni kvadrant testa otvorenog polja u usporedbi s lažno pokusnom skupinom i AMI skupinom koje su se uglavnom kretali u perifernom dijelu testa.

U EPM-u se ponovno pokazalo značajno smanjenje u broju uzdizanja (Slika 12A) u AMI i lažno pokusnoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora ($F_{2,17}=17,20$ $p<0,001$, $\eta_p^2=0,67$). Ove razlike bile su očite sve do trećeg poslije-operativnog testiranja. Također u usporedbi s kontrolnom skupinom, pokusna i lažno pokusna skupina se manje uzdizala i na taj način istraživala okolinu na otvorenim dijelovima EPM (Slika 12B) ($F_{2,17}=24,18$ $p<0,001$, $\eta_p^2=0,89$). Isto smanjenje u broju uzdizanja opaženo je u zatvorenim dijelovima EPM-a (Slika 12C) ($F_{2,17}=14,94$, $p<0,001$, $\eta_p^2=0,64$) sve do drugog poslije-operativnog testiranja.

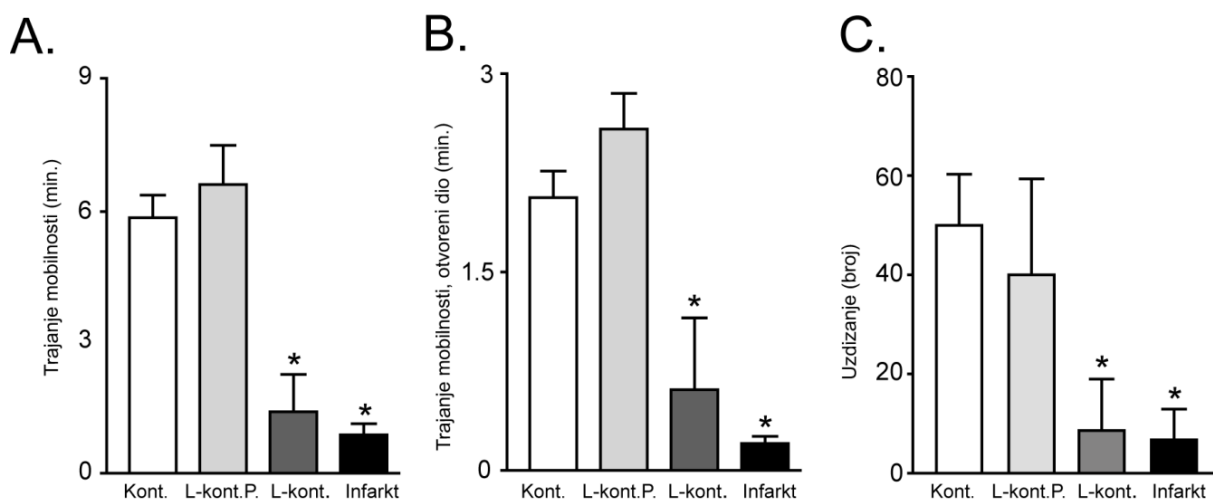
Štakori u AMI i lažno pokusnoj skupini su manje izlazili na otvorene dijelove labirinta ($F_{2,17}=61,68$ $p<0,001$, $\eta_p^2=0,89$; Slika 12D) te provodili manje vremena u tim dijelovima EPM-a ($F_{2,17}=6,74$, $p<0,001$, $\eta_p^2=0,44$; Slika 12E) u usporedbi s kontrolnom skupinom sve do trećeg poslije-operativnog testiranja.

Drugi ponašajni parametri bilježeni i analizirani u EPM-u uključivali su brzinu kretanja, udaljenost, rotacije tijela, timarenje te identični parametri u svakoj zasebnoj zoni koji su se pokazali neuspješnima u razlikovanju skupina.



Slika 12. Ponašajni parametri mjereni u križnom labirintu. A) kirurške skupine štakora pokazuju značajno smanjenje u frekvenciji uzdizanja. AMI i lažna pokusna skupina (kirurške skupine) su imale nižu frekvenciju uzdizanja u B) otvorenom i C) zatvorenom dijelu labirinta u usporedbi s kontrolnim štakorima. Kirurške skupine ponovno pokazuju značajno manji broj uzdizanja osobito na prvom i drugom poslije-operativnom testiranju. D) Štakori u kirurškoj skupini imaju smanjen broj ulazaka u otvoreni dio križnog labirinta u usporedbi s kontrolnim štakorima na prvom i drugom poslije-operativnom testiranju. E) Štakori u kirurškim skupinama su proveli mnogo manje vremena u otvorenim dijelovima labirinta u usporedbi s kontrolnim štakorima. Zvijezdica označava značajne razlike između skupina u određenoj točki mjerenja. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost±SEM

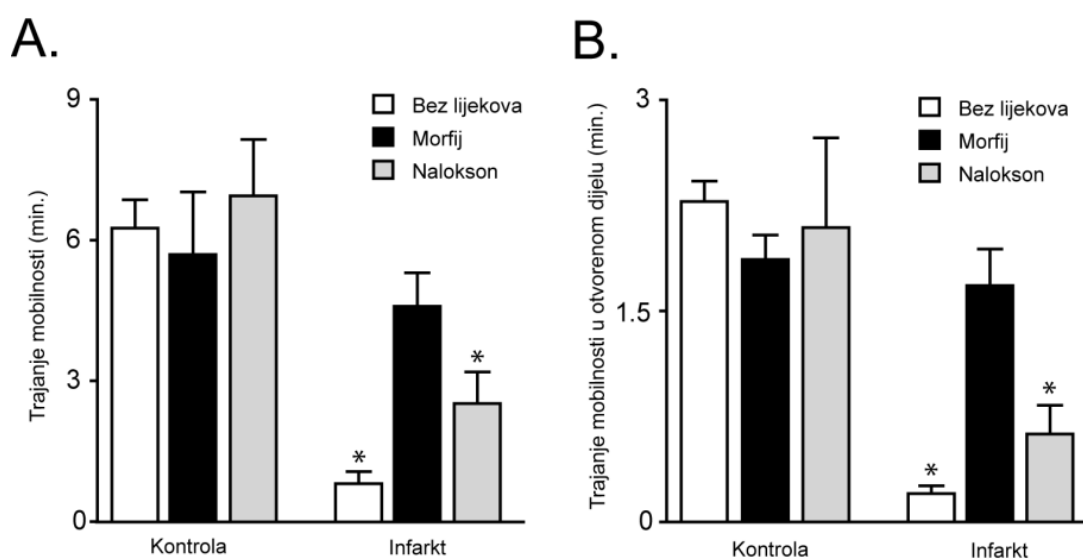
Kako bismo istražili razloge neočekivanog ponašanja lažno pokusne skupine uveli smo dodatnu lažno pokusnu skupinu s neoštećenim perikardom. Usporedbom podataka prvog poslije-operativnog testiranja ove skupine štakora s kontrolnom, lažno pokusnom i AMI skupinom štakora iz prvog eksperimenta koristeći samo one ponašajne parametre koji su najbolje razlikovali kontrolnu skupinu od ostalih, pokazalo se da nije bilo statistički značajne razlike u ponašanju štakora iz lažno pokusne skupine s neoštećenim perikardom i kontrolnih štakora ($t=0.75$, $p>0.05$, $d'=0.47$), dok su se pokazali statistički značajne razlike lažno pokusne skupine s neoštećenim perikardom i skupine s infarktom ($t=9.04$, $p<0.01$, $d'=4.40$), kao i lažno pokusne skupine s neoštećenim perikardom i lažno pokusne skupine s oštećenim perikardom ($t=4.07$, $p<0.01$, $d'=2.57$) (Slika 13).

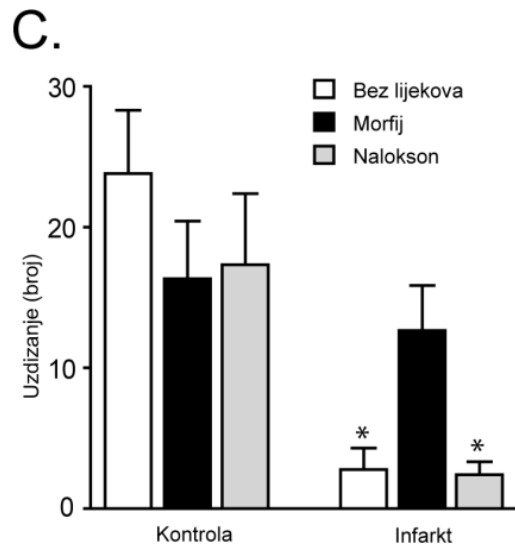


Slika 13. Usporedba ponašajnih parametara lažno pokusne skupine štakora s neoštećenim osrčjem s drugim skupinama; A) trajanje mobilnosti u testu otvorenog polja, B) trajanje mobilnosti u otvorenim dijelovima križnog labirinta (EPM) i C) frekvencija uzdizanja u EPM. Lažno pokusna skupina štakora s neoštećenim perikardom (L-kont.P) je pokazala sličan uzorak kretanja kao i kontrolna skupina štakora (Kont.) Lažno pokusna skupina (L-kont.) i skupina s infarktom (Infarkt) su pokazali značajne razlike u usporedbi s kontrolnim štakorima. Zvezdica označava značajne razlike u usporedbi s kontrolnim štakorima (t-test). Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM

5.3. Efekti morfija na ponašanje štakora nakon AMI

U drugom eksperimentu upotrijebljen je isti skup ponašajnih parametara koji se u prethodnom eksperimentu pokazao uspješnim u razlikovanju kontrolne od drugih skupina (trajanje kretanja i uzdizanje). Primjena morfija u kontrolnoj skupini nije rezultirala promjenom u ponašanju niti je sedirala životinje. Različite doze morfija su imale sličan efekt na ponašanje tako da su ove skupine spojene u jedinstvenu kontrolnu i AMI skupinu (Slika 14).





Slika 14. Efekt morfija i naloksona na štakore s akutnim infarktomiokarda (AMI). A) U testu otvorenog polja morfij je djelovao na povišenu razinu aktivnosti u štakora s AMI dok je injekcija naloksona promijenila ponašanje štakora na način da je bilo slično ponašanju AMI štakora bez farmakološke intervencije. Sličan uzorak ponašanja opažen je u križnom labirintu (EPM) dok je nalokson smanjio B) vrijeme provedeno u otvorenim dijelovima labirinta i C) frekvenciju uzdizanja. U kontrolnim štakora primjena morfija i naloksona nije utjecala na promjene u ponašanju. Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina i SEM. Zvijezdica označava statistički značajne razlike u usporedbi s kontrolnim štakorima (t-test).

Opća razina aktivnosti AMI štakora u OFT-u je bila značajno smanjena ($t=8,40$, $p<0,01$) u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora bez primjene lijekova kako smo i pokazali u prvom eksperimentu. Nakon injekcije morfija razina aktivnost se gotovo u potpunosti vratila na kontrolne vrijednosti ($t=0,76$, $p>0,05$) da bi se ponovno smanjila primjenom naloksona ($t=3,09$, $p<0,05$, $d'=2,53$) (Slika 14A). Sličan uzorak aktivnosti opažen je i u EPM-u gdje je vrijeme provedeno u otvorenom dijelu EPM-a ($t=13,49$, $p<0,001$) (Slika 14B) i broj uzdizanja ($t=4,57$, $p<0,01$, $d'=3,74$) (Slika 14C) bilo značajno smanjeno u AMI

skupini štakora u usporedbi s kontrolama bez primjene lijekova. Nakon primjene morfija ponašanje AMI štakora je bilo slično kontrolnim vrijednostima.

Analgetski efekt morfija poništen je nakon primjene naloksona i s obzirom na vrijeme provedeno na otvorenom dijelu EPM testa ($t= 2,56$ $p<0,05$ $d'=2,09$) i s obzirom na frekvenciju uzdizanja ($t= 2,87$ $p<0,05$ $d'=2,36$) u EPM testu (Slika 14). Ovakav slijed zbivanja sugerira da su opažene promjene ponašanja zaista posljedica boli a ne nekog drugog čimbenika.

6. RASPRAVA

Kirurški pristup

Štakori s eksperimentalno izazvanim akutnim infarktom miokarda su klinički važan model zatajenja srca. Podvezivanje lijeve koronarne arterije štakora je najčešće korištena i pouzdana kirurška metoda kojom se modelira infarkt miokarda koji je po svojim karakteristikama najbliži ljudskom infarktu miokarda (112, 113). Eksperimentalni modeli infarkta miokarda nakon ligacije koronarne arterije su često problematični zbog velikog mortaliteta te velikih varijacija u veličini infarkta (4–59%) (116). Kirurške tehnike korištene do sada su bile ili preinvazivne ili nedovoljno precizne u manipulaciji srca, osobito atrijski. Tradicionalni kirurški pristup uglavnom uključuje lijevu torakotomiju ili presijecanje sternuma.

Transdijafragmalni kirurški pristup korišten u ovom istraživanju ima nekoliko prednosti. Središnji rez kroz trbušnu stjenku i ošit izazvao je minimalno krvarenje jer u središnjoj liniji nema većih krvnih žila i živaca. Ovaj pristup također ostavlja rebra netaknutima. Također, podizanje zida torakalne šupljine i ksifoidnog nastavka omogućava bolju vidljivost srca.

Unatoč velikom oštećenju srčanog tkiva u ovim eksperimentima, životinje su se gotovo u potpunosti opravile unutar dva tjedna. Također, ovu proceduru moguće je modificirati s obzirom na vrstu anestetika koji se koristi (isoflurane or ketamine/xylazine) ovisno o tome koliko vremena će biti potrebno za operaciju što joj daje i značajnu fleksibilnost.

Ponašajne promjene povezane s AMI

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ponašajne promjene povezane s boli u štakora nakon infarkta miokarda. Pokazalo se da nakon LAD-a kojom je uzrokovana ishemija i lažno pokusne operacije koja je uključivala sve dijelove kirurškog postupka osim LAD-a se pokazala smanjena pokretljivost životinje i smanjenje eksploratornog ponašanja.

Test otvorenog polja općenito se koristi za istraživanje eksploratornog ponašanja, procjene reakcija na novost, procjenu anksioznosti i pamćenja. Ponašanje štakora u otvorenom prostoru izaziva isti uzorak odgovora koje možemo očekivati od ljudskih ispitanika u otvorenom prostoru u usporedbi sa zatvorenim prostorom. Strah od otvorenog prostora istovremeno sadrži i tendenciju za istraživanjem i približavanje prijetećem podražaju. Ovaj test može se koristiti za ispitivanje nemira, nesigurnosti i straha koji je posljedica predviđanja stvarne ili potencijalne prijetnje (117).

U testu otvorenog polja (OFT), obje skupine (AMI i lažno pokusna) provele su više vremena na periferiji otvorenog polja i imale su nižu frekvenciju uzdizanja. Preferencija perifernih zona testa otvorenog polja u poslije-operativnoj fazi opažena je i u drugim životinjskim modelima boli (118, 119). Smanjena aktivnost i istraživanje u OFT-u odražava značajnu promjenu u prirodnom ponašanju štakora i može se interpretirati kao posljedica poslije-operativne boli (120).

Test križnog labirinta (EPM) dio je već poznate paradigme za procjenu anksioznog ponašanja u štakora (121). Test se zasniva na prirodnoj tendenciji štakora za istraživanjem nove okoline, suočeni s izborom: otvoreni, nezaštićeni dio križnog labirinta naspram zatvorenog dijela labirinta najčešće će izabrati zatvoreni, tamniji dio prostora. Ovaj sukob istovremenog približavanja i izbjegavanja rezultira ambivalentnim ponašanjem koje je povezano s povećanim indikatorima fiziološkog stresa (121). Nasuprot tome, primjena benzodiazepina i drugih anksiolitika rezultira pojačanim istraživanjem otvorenih dijelova križnog labirinta, bez smanjenja opće razine motivacije i lokomocije (122).

Rezultati na EPM testovima su pokazali još jednom da su štakori iz obje kirurške skupine (AMI i lažno pokusna skupina) manje pokretni u poslijeoperativnom razdoblju, primjerice rjeđe su ulazili u otvorene dijelove labirinta i manje vremena su provodili u otvorenim dijelovima labirinta.

Štakori s infarktom i lažne kontrolne skupine preferiraju zatvorene dijelove labirinta što se može interpretirati kao povećana anksioznost, što je u skladu i s rezultatima drugih istraživanja koja pokazuju da štakori u poslije-ishemijskom periodu pokazuju više anksioznosti (123).

Opis ponašanja životinje u akutnom stanju bolesti uključuje anksioznost u kombinaciji s gubitkom interesa za okolinu i novosti (124), to odgovara promjeni u ponašanju štakora u

poslije-infarktnom periodu. Dokazi o povezanosti između ponašanja povezanog s anksioznosti i boli nađeni su u različitim životinjskim modelima boli. Ove pseudoafektivne promjene koriste se kao implicitne mjere boli (125).

Prethodna istraživanja su pokazala da štakori nakon infarkta miokarda pokazuju niz ponašajnih promjena koji uključuju povećanu anksioznost, depresivnost, gubitak interesa za okolinu i promijenjeni uzorak kretanja (86, 96). Doduše, svi ovi nalazi su vezani uz kronične promjene koje su vidljive četiri do pet tjedana nakon infarkta. Translacijska vrijednost ovih rezultata ograničena je dijelom zbog toga što je u kliničkim uvjetima oporavak definitivno završen u tom periodu (126) (126). Najraniji nalazi o ponašanju štakora u poslije-infarktnom periodu su tri dana nakon operacije (127), međutim, u ovom specifičnom slučaju infarkt je induciran privremenim podvezivanjem lijeve silazne koronarne arterije LAD i nije bio histološki potvrđen.

Iznenadjući rezultat ovog istraživanja su identični uzorci ponašanja u lažno kontrolnoj i AMI skupini štakora. Dodavanje nove lažno kontrolne skupine s netaknutim osrčjem imalo je funkciju objasniti izvor boli u lažno kontrolnoj skupini kao i razloge zašto opažena bolna ponašanja u AMI skupini se ne mogu pripisati samo boli koja je posljedica ishemije. Nadalje, eksperimentalni modeli koji su koristili injektiranje algogenih tvari u osrčje imaju slične ishode kao oni modeli koji koriste podvezivanje koronarne arterije (25).

Povezanost između ishemije miokarda i srčane boli nije sasvim dokazana, budući da se srčana bol može javiti i bez ishemije, kao i to da epizode ishemije miokarda mogu biti potpuno bezbolne (prikazano u (8)). Osrčje se često pogrešno prezentira kao neosjetljivo na bol (osim u donjem segmentu) (128), međutim, osrčje je inervirano vagusnim, freničnim i simpatičkim živcima koja prolaze kroz srčani pleksus (129). Frenični neuroni povezani su vlaknima iz cervikalnog simpatičkog ganglija (130) koji također inerviraju parijetalni segment osrčja (131). Parijetalno (132, 133) i visceralno osrčje (134, 135) je osjetljivo na kemijske i mehaničke podražaje.

Među ostalim smo prikazali i trajektorije kretanja AMI i kontrolnih štakora. Takav oblik prikaza daje jasnu informaciju o prostornoj organizaciji aktivnosti i njegove prednosti su u tome da iako se ukupna aktivnost mjerena u testu ne mijenja u ovisnosti o vrsti intervencije, uzorak kretanja je potpuno drukčiji i ima sasvim drukčije etološko značenje. Prema tome, procjena lokomocije, geometrijskih uzoraka kretanja kao i prostorno-vremenske organizacije

kretanja (136) može biti bogat izvor informacija o bihevioralnoj neuroznanosti i genetici u eksperimentalnih životinja (137), primata (138) kao i u ljudi (139).

U našem istraživanju se pokazalo da se ponašajna strategija i uzorci aktivnosti značajno razlikuju između kontrolnih i AMI štakora na način da se AMI štakori uglavnom fokusiraju na zidove i periferiju testa otvorenog polja, manje rotiraju tijelo, kretanje je uglavnom pravocrtno za razliku od kontrolne skupine. Tako možemo utvrditi da bol izaziva neku vrstu spacijalne reorganizacije, smanjenje kretanja u poslije-operativnoj fazi i izbjegavanje potencijalno ugrožavajućih zona kao što je središnji kvadrant u OFT-u. Kako navodi Horev i sur. (140), zid OFT ima dvojaku ulogu u analizi eksploratornog ponašanja štakora: jedna se odnosi na navođenje, druga na privlačenje. Prva funkcija podrazumijeva da se životinja lakše kreće i snalazi u prostoru kada se kreće paralelno zidovima OFT-a. Druga funkcija odnosi se na prirodnu tendenciju glodavaca da se kreću u blizini zida, i istražuje okolinu u blizini zida što je također jedan od aspekata tigmotaksije. Tigmotaksija se odnosi na prirodnu tendenciju štakora da budu u blizini vertikalnih površina i na taj način se štite od predatora (141).

Procjena boli u ovom istraživanju se velikim dijelom odnosi na procjenu lokomotorne aktivnosti pa tako možemo jasno primijetiti rjeđi slijed linija koje su pratile kretanje u AMI štakora za razliku od kontrola što pokazuje kraći prijeđeni put. Budući da su ponašajna ekspresija boli, anksioznost i lokomocija domene koje se očigledno preklapaju, analiziranje prostorne strategije kretanja potencijalno može poslužiti kao metoda razlikovanja anksioznosti od hipolokomocije.

Primjena morfija

Morfij se smatra zlatnim standardom opioidnih analgetika koji se koriste za ublažavanje boli (142). Morfij kao i drugi opiodi (oksikodon, hidromorfin i diacetilmorfin) djeluju izravno na središnji živčani sustav u ublažavanju boli, primjenjuje se i u eksperimentalnim uvjetima (životinjskim modelima) kao i u kliničkoj praksi gdje ima vrlo široku primjenu. Iako navedeni opiodni agonisti ublažavaju bol bez značajnog onemogućivanja drugih osjetilnih funkcija, primjena morfija u životinjskim modelima može

izazvati blažu respiratornu depresiju u dozama većim od 10mg/kg (143) i ponašajne promjene (ekscitaciju ili sedaciju) čiji intenzitet ovisi o nizu čimbenika među ostalim o dozi te općem afektivnom stanju životinje (144). Niske doze morfija inhibiraju izbjegavajuće oblike ponašanja, dijelom kroz aktivaciju μ -receptora, dok više doze morfija aktiviraju izbjegavajuće oblike ponašanja koje ne posreduju opioidni receptori (145).

Kao što smo naveli, morfij se koristi za kontrolu boli kod akutnog infarkta miokarda u ljudi (146) kao i za smanjenje boli te ublažavanja ponašanja povezanog s boli u različitim životinjskim modelima neuropatske boli (88, 118, 147).

Svjesni popratnih pojava svake farmakološke intervencije odabirom odgovarajuće doze morfija (pri čemu je bilo važno izbjeći potencijalni sedacijski efekt) i pridržavajući se uputa o primjeni inhalatornih analgetika i opioida cilj je bio izbjeći rezidualno djelovanje izoflourana te preklapanje efekata s morfijem.

Također, važno je naglasiti da smo željeli i zbog usporedivosti naših rezultata s drugim istraživanjima koristiti morfij u standardiziranim dozama. Osim toga pokazalo se da se ova skupina lijekova tipično primjenjuje u liječenju tupe boli umjesto oštre boli (143).

U ovom eksperimentu primijenjen je morfij kako bismo testirali hipotezu o stabilnosti parametara ponašanja koji su specifično vezani za bol. Štakori nakon AMI-a su bili manje aktivni, pokazali su manje eksploratornog ponašanja i nižu frekvenciju uzdizanja nakon AMI-a. Ovi oblici ponašanja su bili uspješno poništeni injekcijom morfija, čime je značajno povećan stupanj aktivnosti životinje. Brojni životinjski modeli (148, 149) su pokazali promjenu u ponašanju životinje nakon primjene morfija. Razayof i sur. 2009 su pokazali anksiolitičko djelovanje morfija (mjereno povećanim brojem ulazaka u otvoreni dio križnog labirinta) koje je uspješno poništeno mikroinjekcijom naloksona u ventralnom hipokampusu(150). U modelu upalne boli pokazalo se i statistički značajno smanjenje lokomotoričke aktivnosti u eksperimentalnoj skupini, koja se vratila na preoperativnu razinu nakon primjene morfija (151). U modelu kancerogene boli, skupina štakora tretirana morfijem je zadržala preoperativne parametre kretanja mjerene na rotirajućem cilindru (152).

U ovom istraživanju se pokazalo da nema razlike između kontrolne skupine štakora i skupine štakora kojima je injektiran morfij s obzirom na bilo koji ponašajni parametar. Također nismo opazili sedacijski efekt životinje u OFT-u koji može maskirati efekt ponašanja povezanog s boli. Sedacijski efekt ovisi o brojnim čimbenicima: različitoj farmakokinetici, načinima aplikacije morfija i doza morfija (111).

Primjena morfija u AMI štakora je opću razinu aktivnosti gotovo u potpunosti vratila na početne vrijednosti. Sličan uzorak aktivnosti opažen je i u EPM-u. Budući da se EPM temelji na kretanju životinja, važno je isključiti sedacijski efekt morfija. Na osnovu predtestiranja u OFT-u i procjeni uzorka kretanja utvrdili smo odgovarajuću dozu koja omogućuje procjenjivanje ponašanja povezanog uz bol bez smanjenja lokomotorne aktivnosti.

Morfij među ostalim ima i anksiolitičko djelovanje (88, 153). U istraživanju Roeska i sur. se pokazalo da morfij smanjuje mehaničku preosjetljivost bez umanjivanja motoričke aktivnosti, čime su dokazali analgetski efekt morfija. Također, taj efekt je uvelike ovisio o dozi jer pri 3mg/kg vodi smanjenju anksioznog ponašanja u kontrolnih životinja ali ne uz više doze. Time su pokazali da je anksioznost kao prateća afektivna komponenta doživljaja boli bila umanjena analgeticima (88).

Broj uzdizanja i vrijeme provedeno na otvorenom dijelu križnog labirinta bilo značajno smanjeno u AMI skupini štakora. Analgetski efekt morfija poništen je nakon primjene naloksona pa ove promjene dijelom možemo pripisati boli.

Histološka procjena infarciranog ožiljkastog tkiva utvrdila je prosječnu veličinu infarkta srca u uzorku analiziranih životinja od 10% površine lijeve klijetke. Nema konzistentnih podataka o povezanosti veličine infarkta i promjena u ponašanju u životinjskim modelima. Dio istraživanja upućuje na ponašajne razlike (anhedonija, snižena razina aktivnosti) neovisno o veličini infarkta (154) ili utjecaj emocionalnog stresa koji povećava veličinu infarkta (155) kao i fiziološki parametri (sistolčki tlak) koji je u obrnuto proporcionalnom odnosu s obzirom na veličinu infarkta kao i to da lokomotorička aktivnost nije povezana s veličinom infarkta i posljedičnim oštećenjem srca (156). Međutim, koliko nam je poznato nema istraživanja koje se specifično orijentiralo na ponašajne promjene s obzirom na različite veličine infarkta, pa s obzirom na to nismo mogli formirati naša očekivanja o utjecaju veličine infarkta koju bi eventualno imao na promjene u ponašanju.

Nedostaci istraživanja

Model infarkta koji smo koristili uključuje pouzdani kirurški postupak izazivanja infarkta međutim manjka u pojavnosti jer se infarkt kod inače zdrave životinje javlja trenutno što je kod ljudi iznimno rijetko, veća je vjerojatnost da se infarkt razvije kao posljedica

dugotrajnih promjena u krvnim žilama. Nadalje, zbog dostupnih količina anestetika i životinja nije bilo moguće povećati veličinu uzorka u posljednjem eksperimentu. Također, u posljednjem dijelu eksperimenta se povećao mortalitet životinja uslijed komplikacija s inhalatornim anestetikom. Sam kirurški zahvat je bio iznimno kompleksan i bilo nam je teško utvrditi izvor mortaliteta koji se iznenadno pojavio. Međutim, treba uzeti u obzir da je broj životinja inicijalno određen izračunom veličine uzorka. U prvom eksperimentu smo imali odgovarajući broj životinja, a u susljednim eksperimentima se pokazalo da postoji dosta veliki mortalitet pa smo imali nešto manje životinja ali smo i dalje uspjeli razlikovati kirurške skupine od kontrola (sve daljnje analize u drugom eksperimentu odnosile su se na parametre koji su u prvom eksperimentu razlikovali kontrolnu skupinu od kirurških skupina) pa u tom smislu nismo utvrdili pad snage istraživanja.

Daljnji nedostaci odnose se na odabir ponašajnih parametara korištenih u istraživanju. U postojećoj literaturi koliko nam je poznato nismo našli ikakav postupak koji se odnosi na analizu kompleksnog ponašanja štakora u akutnoj postoperativnoj fazi. S obzirom na to odlučili smo se fokusirati na ponašajne parametre koji su nam bili poznati iz kroničnog modela. U dosadašnjim istraživanjima je jedna od alternativnih mjera povezanih s boli bio korišteni test socijalnih interakcija koji se koristio samo kao test kojim bi isključili lokomotornu disfunkciju u standardiziranim testovima kao što je test otvorenog polja i križni labirint (86, 96). Međutim u ovom istraživanju je korišten automatizirani sustav koji omogućuje provjeru razine i karakteristike kretanja životinja prije konačnog testiranja ponašanja. Mjerenja socijalnog ponašanja kao što je majčinsko ponašanje, mjerenje agresivnosti i seksualno ponašanje zahtijevaju nekoliko metodoloških pretpostavki kojima nije bilo moguće udovoljiti zbog dinamike eksperimenta. Naime životinje koje su naručene iz Nastambe za male eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu bile su individualno smještene u kavezu i kao takve su korištene dalje u eksperimentu. Osobito je bilo važno izbjeći interakcije ozlijeđenih i neozlijeđenih životinja i nije bilo moguće zadržavati ih u priručnoj nastambi toliko dugo da bi se socijalno ponašanje razvilo te ih podvrgnuti operaciji u istom navratu. Također, mjere socijalnog ponašanja do sada su se pokazale nepouzdanima u visceralnim modelima boli upravo zbog neadekvatnog kvantificiranja tog ponašanja (157, 158). Nadalje, ishemija srca temeljito promijeni sve aspekte ponašanja pa tako primjerice mjerenje spavanja, hranjenja i vokalizacije loše diskriminiraju skupine s različitim razinama intervencije.

Nastojali smo razmotriti i potencijalno djelovanje placebo efekta. Uzeli smo u obzir da je placebo efekt moguć kod bilo koje farmakološke intervencije, i s tim na umu je računato da su obje skupine (infarkt i kontrola) podjednako izložene placebo efektu. Osim toga kontrola za farmakološke intervencije je bila skupina koja je imala samo površinski rez i isti protokol testiranja i primjene farmakoloških intervencija koje su primijenjene jednokratno pa smo reducirali mogućnost uvjetovanja, očekivanja ili drugih faktora koji su mogli doprinijeti analgeziji, također primjena naloksona je uspješno poništila analgetski efekt a pokazano je da nalokson uspješno može poništiti i placebo efekte (159).

7. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je ponašanje povezano s boli u akutnom poslije-infarktnom periodu karakterizirano smanjenom mobilnosti i eksplorativnim ponašanjem
2. Srčana ishemija koja je posljedica eksperimentalno izazvanog infarkta je manje važan izvor boli od manipulacije osrčja.
3. Novi kirurški pristup omogućio je odličnu vizualizaciju srca, minimalno krvarenje te brzi postoperativni oporavak što je omogućilo analiziranje ponašanja odmah nakon operacije

SAŽETAK

Štakori s eksperimentalno izazvanim infarktom miokarda su se pokazali klinički važnim modelom visceralne boli. Budući da ima vrlo malo podataka o ponašanju štakora u poslije-infarktom periodu željeli su identificirati specifična ponašanja povezana s AMI kako bi povećali valjanost modela. Podvezivanjem lijeve koronarne arterije induciran je AMI i ponašanje povezano s boli koristeći test otvorenog polja i test križnog labirinta. Uvođenje inovativnog kirurškog pristupa omogućio je odličnu vizualizaciju srca, pouzdanu ligaciju lijeve koronarne arterije, minimalno krvarenje te minimalno oštećenje mišićnog i vezivnog tkiva što je značajno ubrzalo postoperativni oporavak. Morfij je primijenjen nakon indukcije AMI-ja kako bi razlikovali promjene povezane s boli od onih koje su nespecifične globalne promjene. AMI je histološki potvrđen. Smanjena pokretljivost je kontinuirano bila prisutna u svim testovima ponašanja i u grupi štakora s infarktom i u lažno kontrolnoj skupini. U testu otvorenog polja AMI i lažno kontrolna skupina štakora su pokazali manje istraživačkog ponašanja i općenito manje aktivnosti. Sličan uzorak ponašanja opažen je u testu križnog labirinta gdje su obje kirurške skupine manje ulazile u otvorene dijelove labirinta i općenito manje vremena provodile u otvorenim dijelovima labirinta. Lažno kontrolna skupina s neoštećenim osrčejm pokazala je isti uzorak aktivnosti kao kontrolni štakori. Smanjenje aktivnosti i uzdizanja opaženo nakon AMI je uspješno obrnuto nakon injekcije morfija. Ovaj efekt je umanjen nakon primjene naloksona što nam je omogućilo da se specifične promjene u ponašanju pripišu boli. Ovo istraživanje je pokazalo da ponašanje povezano s boli u akutnom poslije-infarktnom periodu općenito je obilježeno smanjenom mobilnosti i istraživačkim ponašanjem. Ovi rezultati pokazuju da je srčana ishemija manje važan izvor boli od manipulacije osrčja.

SUMMARY

Purpose: Rats with experimentally induced acute myocardial infarction (AMI) have proven to be a clinically relevant model for visceral pain. As there are no behavioral data available on rats in post-infarction period we aimed to identify specific pain-related behavioral changes following AMI to increase the validity of the model.

Methods: AMI was induced by the left coronary artery ligation and pain-related behavior was analyzed using the open field test (OFT) and elevated plus maze (EPM). Surgical technique used in this study enabled adequate visualization of the beating heart with only minimal bleeding, rib cage was left intact causing only minimal trauma to the skin and muscles which facilitated faster recovery Morphine was applied following AMI induction to differentiate pain-related changes from those related to nonspecific global changes in responsiveness. AMI was histologically confirmed.

Results: Hypolocomotion was consistently evident in all behavioral tests for both infarcted and sham group. In OFT, both AMI and sham rats exhibited less exploratory behavior and less activity. Similar pattern of behavior was observed in EPM, where both surgical groups showed fewer entries to the open arms and spent less time in the open arms. Sham group with intact pericardium showed the same pattern of activity as control rats. The reduction in activity and rearing observed following AMI was successfully reversed following morphine injection. This effect was abolished after naloxone application allowing us to attribute observed changes specifically to pain.

Conclusions: This study demonstrates that pain-related behavior in acute post-infarction period is generally characterized by reduced mobility and explorative behavior. Our results showed that cardiac ischemia as a consequence of experimentally induced infarction is less important source of pain behavior than manipulation of the pericardium.

POPIS LITERATURE

1. Armour JA. Anatomy and function of peripheral autonomic neurones involved in cardiac regulation. In: Shepherd JT, Vatner, S.F., editor. *Nervous Control of the Heart*. Amsterdam: Harvard Academic; 1996. p. 29-47.
2. Krmpotić-Nemanić J MA. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
3. Hopkins DA, Gootman PM, Gootman N, Armour JA. Anatomy of medullary and peripheral autonomic neurons innervating the neonatal porcine heart. *Journal of the autonomic nervous system*. 1997;64(2-3):74-84. Epub 1997/06/06.
4. Hopkins DA, Armour JA. Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *The Journal of comparative neurology*. 1984;229(2):186-98. Epub 1984/10/20.
5. Armour JA. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. *Experimental physiology*. 2008;93(2):165-76. Epub 2007/11/06.
6. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ, 3rd. Vagal afferent innervation of the atria of the rat heart reconstructed with confocal microscopy. *The Journal of comparative neurology*. 1997;381(1):1-17. Epub 1997/04/28.
7. Hopkins DA, Armour JA. Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves. *Journal of the autonomic nervous system*. 1989;26(3):213-22. Epub 1989/04/01.
8. Cervero F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiological reviews*. 1994;74(1):95-138. Epub 1994/01/01.
9. Bielefeldt K, Gebhart, G.F. Visceral pain: basic mechanisms. In: McMahon SB, Koltzenburg, M., editor. *Wall and Melzack`s Textbook of Pain*: Elsevier Churchill Livingstone; 2006.
10. Hoover DB, Shepherd AV, Southerland EM, Armour JA, Ardell JL. Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2008;141(1-2):38-45. Epub 2008/06/19.
11. White JC. Cardiac pain: anatomic pathways and physiologic mechanisms. *Circulation*. 1957;16(4):644-55. Epub 1957/10/01.

12. Armour JA. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;287(2):R262-71. Epub 2004/07/24.
13. Armour JA, Kember, G.C. Cardiac sensory neurons. In: Armour JA, Ardell, J.L., editor. *Basic and clinical neurocardiology*. New York: Oxford University Press, Inc; 2004. p. 79-117.
14. Armour JA. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovascular research*. 1999;41(1):41-54. Epub 1999/05/18.
15. Schmidt RF. Silent Nociceptor. In: Schmidt RF, Willis WD, editors. *Encyclopedia of Pain*: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 2171-3.
16. Pan HL, Chen SR. Myocardial ischemia recruits mechanically insensitive cardiac sympathetic afferents in cats. *Journal of neurophysiology*. 2002;87(2):660-8. Epub 2002/02/05.
17. Qin C, Du JQ, Tang JS, Foreman RD. Bradykinin is involved in the mediation of cardiac nociception during ischemia through upper thoracic spinal neurons. *Current neurovascular research*. 2009;6(2):89-94. Epub 2009/05/16.
18. Gaspardone A, Crea F, Tomai F, Iamele M, Crossman DC, Pappagallo M, et al. Substance P potentiates the algogenic effects of intraarterial infusion of adenosine. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24(2):477-82. Epub 1994/08/01.
19. Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1997;80(5A):10E-6E. Epub 1997/09/20.
20. Baker DG, Coleridge HM, Coleridge JC, Nerdrum T. Search for a cardiac nociceptor: stimulation by bradykinin of sympathetic afferent nerve endings in the heart of the cat. *The Journal of physiology*. 1980;306:519-36. Epub 1980/09/01.
21. Uchida Y, Murao S. Bradykinin-induced excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers. *Japanese heart journal*. 1974;15(1):84-91. Epub 1974/01/01.
22. Guzman F, Braun C, Lim RK. Visceral pain and the pseudoaffective response to intra-arterial injection of bradykinin and other algescic agents. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1962;136:353-84. Epub 1962/04/01.
23. Beers R, and Bassett, E. (eds),. *Mechanisms of pain and analgesic compounds*. New York: Raven Press,; 1981.

24. Kimura E, Hashimoto K, Furukawa S, Hayakawa H. Changes in bradykinin level in coronary sinus blood after the experimental occlusion of a coronary artery. *Am Heart J.* 1973;85(5):635-47. Epub 1973/05/01.
25. Euchner-Wamser I, Meller ST, Gebhart GF. A model of cardiac nociception in chronically instrumented rats: behavioral and electrophysiological effects of pericardial administration of algogenic substances. *Pain.* 1994;58(1):117-28. Epub 1994/07/01.
26. Schaefer S, Valente RA, Laslett LJ, Longhurst JC. Cardiac reflex effects of intracoronary bradykinin in humans. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research.* 1996;44(4):160-7. Epub 1996/04/01.
27. Sylven C, Edlund A, Brandt R, Beermann B, Jonzon B. Angina pectoris-like pains provoked by intravenous adenosine. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986;293(6553):1027-8. Epub 1986/10/18.
28. Sylven C, Borg G, Brandt R, Beermann B, Jonzon B. Dose-effect relationship of adenosine provoked angina pectoris-like pain--a study of the psychophysical power function. *Eur Heart J.* 1988;9(1):87-91. Epub 1988/01/01.
29. Crea F, Pupita G, Galassi AR, el-Tamimi H, Kaski JC, Davies G, et al. Role of adenosine in pathogenesis of anginal pain. *Circulation.* 1990;81(1):164-72. Epub 1990/01/01.
30. Uchida Y, Murao S. Acid-induced excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol.* 1975;228(1):27-33. Epub 1975/01/01.
31. Foreman RD. Mechanisms of cardiac pain. *Annual review of physiology.* 1999;61:143-67. Epub 1999/04/01.
32. Malliani A, Pagani M, Pizzinelli P, Furlan R, Guzzetti S. Cardiovascular reflexes mediated by sympathetic afferent fibers. *Journal of the autonomic nervous system.* 1983;7(3-4):295-301. Epub 1983/03/01.
33. Malliani A. Cardiovascular sympathetic afferent fibers. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 94: Springer Berlin Heidelberg; 1982.* p. 11-74.
34. Malliani A, Lombardi F. Consideration of the fundamental mechanisms eliciting cardiac pain. *Am Heart J.* 1982;103(4 Pt 1):575-8. Epub 1982/04/01.
35. Harrison TR RT. Patterns and causes of chest pain. *Principles and Problems of Ischemic Heart Disease. Chicago: Year Book Med; 1968.*

36. Braz JM, Nassar MA, Wood JN, Basbaum AI. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron*. 2005;47(6):787-93. Epub 2005/09/15.
37. Arle JE, Shils JL. Motor cortex stimulation for pain and movement disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2008;5(1):37-49. Epub 2008/01/01.
38. Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;126(1):56-68. Epub 2010/02/02.
39. Moller AR. Pain its anatomy, physiology and treatment. Stockholm: CreateSpace Independent Publishing Platform; 2011. 362 p.
40. Hobbs SF, Chandler MJ, Bolser DC, Foreman RD. Segmental organization of visceral and somatic input onto C3-T6 spinothalamic tract cells of the monkey. *Journal of neurophysiology*. 1992;68(5):1575-88. Epub 1992/11/01.
41. Lenfant C. Chest pain of cardiac and noncardiac origin. *Metabolism: clinical and experimental*. 2010;59 Suppl 1:S41-6. Epub 2010/09/21.
42. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995;91(11):2844-50. Epub 1995/06/01.
43. Karnath BH, M.D.; Hussain, N. Chest Pain: Differentiating cardiac from noncardiac causes. *Hospital Physician*. 2004.
44. Shah PKF, E. Pathophysiology of Myocardial Ischemia. In: Michael H. Crawford JPD, Walter J. Paulus editor. *Cardiology*. Maryland Heights, Missouri: Mosby; 2003. p. 1728.
45. Detry JM. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Eur Heart J*. 1996;17 Suppl G:48-52. Epub 1996/12/01.
46. Sonnenblick EH, Ross J, Jr., Braunwald E. Oxygen consumption of the heart. Newer concepts of its multifactoral determination. *Am J Cardiol*. 1968;22(3):328-36. Epub 1968/09/01.
47. Kitamura K, Jorgensen CR, Gobel FL, Taylor HL, Wang Y. Hemodynamic correlates of myocardial oxygen consumption during upright exercise. *J Appl Physiol*. 1972;32(4):516-22. Epub 1972/04/01.
48. Marušić MK, Z; Gamulin, S. *PATHOPHYSIOLOGY*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
49. Petrač D. *Interna medicina*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
50. Damjanov IJ, S. *Opća patologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.

51. Ness TJ, Gebhart GF. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*. 1990;41(2):167-234. Epub 1990/05/01.
52. Cervero F, Laird JM. Visceral pain. *Lancet*. 1999;353(9170):2145-8. Epub 1999/06/26.
53. Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *The Journal of physiology*. 1990;425:545-62. Epub 1990/06/01.
54. Ness TJ, Gebhart GF. Acute inflammation differentially alters the activity of two classes of rat spinal visceral nociceptive neurons. *Neurosci Lett*. 2000;281(2-3):131-4. Epub 2000/03/08.
55. Sengupta JN, Gebhart GF. Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. *Journal of neurophysiology*. 1994;71(6):2046-60. Epub 1994/06/01.
56. Wesselmann U, Czakanski PP, Affaitati G, Giamberardino MA. Uterine inflammation as a noxious visceral stimulus: behavioral characterization in the rat. *Neurosci Lett*. 1998;246(2):73-6. Epub 1998/06/17.
57. Kress KR, P.W. Chemical excitation and sensitization in nociceptors. In: Belemonte CC, F., editor. *Neurobiology of Nociceptors*. New York: Oxford University Press; 1996.
58. Kimball ES, Palmer JM, D'Andrea MR, Hornby PJ, Wade PR. Acute colitis induction by oil of mustard results in later development of an IBS-like accelerated upper GI transit in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(6):G1266-73. Epub 2005/02/05.
59. Yotsumoto F, Manabe T, Ohshio G. Bradykinin involvement in the aggravation of acute pancreatitis in rabbits. *Digestion*. 1993;54(4):224-30. Epub 1993/01/01.
60. Houghton AK, Wang CC, Westlund KN. Do nociceptive signals from the pancreas travel in the dorsal column? *Pain*. 2001;89(2-3):207-20. Epub 2001/02/13.
61. Ordway GA, Mitchell JH, Longhurst JC. Bradykinin stimulates pancreatic afferents to activate the cardiovascular system. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1982;95:229-36. Epub 1982/01/01.
62. Wang CC, Westlund KN. Responses of rat dorsal column neurons to pancreatic nociceptive stimulation. *Neuroreport*. 2001;12(11):2527-30. Epub 2001/08/10.
63. Bon K, Lanteri-Minet M, Michiels JF, Menetrey D. Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats: a c-fos and Krox-24 study at telencephalic levels, with a

- note on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Exp Brain Res.* 1998;122(2):165-74. Epub 1998/10/17.
64. Yoshimura N, de Groat WC. Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci.* 1999;19(11):4644-53. Epub 1999/05/26.
 65. Merkord J, Jonas L, Weber H, Kroning G, Nizze H, Hennighausen G. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. *Pancreas.* 1997;15(4):392-401. Epub 1997/11/15.
 66. Westlund KN. *Animal Models of Visceral Pain. Animal Models of Pain*2010. p. 41-68.
 67. Hegyi P, Rakonczay Z, Jr., Sari R, Gog C, Lonovics J, Takacs T, et al. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2004;10(14):2003-9. Epub 2004/07/09.
 68. Yang H, McNearney TA, Chu R, Lu Y, Ren Y, Yeomans DC, et al. Enkephalin-encoding herpes simplex virus-1 decreases inflammation and hotplate sensitivity in a chronic pancreatitis model. *Mol Pain.* 2008;4:8. Epub 2008/03/01.
 69. Balakumar P, Singh AP, Singh M. Rodent models of heart failure. *Journal of pharmacological and toxicological methods.* 2007;56(1):1-10. Epub 2007/03/30.
 70. Lee KT, Jarmolych J, Kim DN, Grant C, Krasney JA, Thomas WA, et al. Production of advanced coronary atherosclerosis, myocardial infarction and "sudden death" in swine. *Experimental and molecular pathology.* 1971;15(2):170-90. Epub 1971/10/01.
 71. Wilson RB, Hartroft WS. Pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Archives of pathology.* 1970;89(5):457-69. Epub 1970/05/01.
 72. Bond MG, Bullock BC, Bellinger DA, Hamm TE. Myocardial infarction in a large colony of nonhuman primates with coronary artery atherosclerosis. *The American journal of pathology.* 1980;101(3):675-92. Epub 1980/12/01.
 73. Chu G, Haghghi K, Kranias EG. From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *Journal of cardiac failure.* 2002;8(6 Suppl):S432-49. Epub 2003/01/30.
 74. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovascular research.* 2007;74(1):29-38. Epub 2006/12/26.
 75. Monnet E, Chachques JC. Animal models of heart failure: what is new? *The Annals of thoracic surgery.* 2005;79(4):1445-53. Epub 2005/03/31.

76. Johns TNO, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of surgery*. 1954;140(5):675-82. Epub 1954/11/01.
77. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *The American journal of pathology*. 1978;90(1):57-70. Epub 1978/01/01.
78. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular research*. 2000;45(2):330-8. Epub 2000/03/23.
79. Gehrmann J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, et al. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic research in cardiology*. 2001;96(3):237-50. Epub 2001/06/14.
80. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *Journal of cardiac failure*. 1995;1(2):169-77. Epub 1995/03/01.
81. Huikeshoven M, van den Brink A, Beek JF. Alternative surgical exposure of the rat heart in vivo using a simple abdominal approach. *Eur Surg Res*. 2000;32(6):368-73. Epub 2001/02/22.
82. Banozic A, Sapunar, D., Puljak, L. i Grkovic, I. Transdiaphragmal Approach for Coronary Artery Ligation in Rats. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;submitted.
83. Auvray MM, E.; Spence, C. The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. *Neuroscience Biobehavioral Review*. 2010;34(2):214-23.
84. Mogil JS, Davis KD, Derbyshire SW. The necessity of animal models in pain research. *Pain*. 2010;151(1):12-7. Epub 2010/08/11.
85. Flecknell P, Leach M, Bateson M. Affective state and quality of life in mice. *Pain*. 152(5):963-4.
86. Schoemaker RG, Kalkman EA, Smits JF. 'Quality of life' after therapy in rats with myocardial infarction: dissociation between hemodynamic and behavioral improvement. *Eur J Pharmacol*. 1996;298(1):17-25. Epub 1996/02/29.
87. Blackburn-Munro G. Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(6):299-305. Epub 2004/05/29.
88. Roeska K, Doods H, Arndt K, Treede RD, Ceci A. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. *Pain*. 2008;139(2):349-57. Epub 2008/06/21.

89. Grégoire S, Michaud V, Chapuy E, Eschalier A, Ardid D. Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: Effect of duloxetine and gabapentin. *Pain*. 2012;153(8):1657-63.
90. Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pêgo JM, Bessa JM, Pertovaara A, et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Experimental Neurology*. 2008;213(1):48-56.
91. Suzuki T, Amata M, Sakaue G, Nishimura S, Inoue T, Shibata M, et al. Experimental neuropathy in mice is associated with delayed behavioral changes related to anxiety and depression. *Anesth Analg*. 2007;104(6):1570-7, table of contents. Epub 2007/05/22.
92. Zeng Q, Wang S, Lim G, Yang L, Mao J, Sung B, et al. Exacerbated mechanical allodynia in rats with depression-like behavior. *Brain Research*. 2008;1200:27-38.
93. Hu B, Doods H, Treede R-D, Ceci A. Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833. *Pain*. 2009;143(3):206-12.
94. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1193-205. Epub 2005/08/09.
95. Roeska K, Ceci A, Treede RD, Doods H. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. *Neurosci Lett*. 2009;464(3):160-4. Epub 2009/08/22.
96. Schoemaker RG, Smits JF. Behavioral changes following chronic myocardial infarction in rats. *Physiol Behav*. 1994;56(3):585-9. Epub 1994/09/01.
97. Ian Q. Whishaw IQK, Bryan. *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*: Oxford University Press (OUP); 2004.
98. Miampamba M, Chery-Croze S, Gorry F, Berger F, Chayvialle JA. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. *Pain*. 1994;57(3):327-34. Epub 1994/06/01.
99. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996;64(3):493-501. Epub 1996/03/01.
100. Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci*. 1999;19(24):10886-97. Epub 1999/12/14.
101. Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(4):283-94. Epub 2009/03/05.

102. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):3-33. Epub 2003/02/26.
103. Mendl M, Burman OH, Paul ES. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society.* 2010;277(1696):2895-904. Epub 2010/08/06.
104. Mogil JS, Cragger SE. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain.* 2004;112(1-2):12-5. Epub 2004/10/21.
105. Fraser D. *Understanding Animal Welfare: The Science in its Cultural Context.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.
106. Calatayud F, Belzung C, Aubert A. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Behav Processes.* 2004;67(2):195-206. Epub 2004/07/09.
107. Guic MM, Kosta V, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Characterization of spinal afferent neurons projecting to different chambers of the rat heart. *Neurosci Lett.*469(3):314-8. Epub 2009/12/19.
108. Blokland A, Ten Oever S, van Gorp D, van Draanen M, Schmidt T, Nguyen E, et al. The use of a test battery assessing affective behavior in rats: order effects. *Behav Brain Res.* 2012;228(1):16-21. Epub 2011/12/17.
109. Honore P, Chandran P, Hernandez G, Gauvin DM, Mikusa JP, Zhong C, et al. Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. *Pain.* 2009;142(1-2):27-35. Epub 2009/01/13.
110. Joshi SK, Hernandez G, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, Salyers A, et al. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience.* 2006;143(2):587-96. Epub 2006/09/12.
111. Kohn DF, Wixson, S.K., White, W.J., Benson, G.J. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.* London: Academic Press; 1997.
112. Aljinovic J, Vukojevic K, Kosta V, Guic MM, Saraga-Babic M, Grkovic I. Histological differences in healing following experimental transmural infarction in rats. *Histology and histopathology.* 2010;25(12):1507-17. Epub 2010/10/05.

113. Guic MM, Runtic B, Kosta V, Aljinovic J, Grkovic I. Age-related changes of neurochemically different subpopulations of cardiac spinal afferent neurons in rats. *Experimental gerontology*. 2013;48(8):774-7. Epub 2013/04/30.
114. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiemermann C. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(9):2276-80. Epub 1999/09/10.
115. Iwakura A, Tabata Y, Miyao M, Ozeki M, Tamura N, Ikai A, et al. Novel method to enhance sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries with use of basic fibroblast growth factor. *Circulation*. 2000;102(19 Suppl 3):III307-11. Epub 2000/11/18.
116. Ye J, Yang L, Sethi R, Copps J, Ramjiawan B, Summers R, et al. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997;176(1-2):227-33. Epub 1997/12/24.
117. Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL. Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res*. 2006;171(1):26-49. Epub 2006/05/09.
118. Wallace VC, Segerdahl AR, Blackbeard J, Pheby T, Rice AS. Anxiety-like behaviour is attenuated by gabapentin, morphine and diazepam in a rodent model of HIV anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2008;448(1):153-6. Epub 2008/10/18.
119. Narita M, Kaneko C, Miyoshi K, Nagumo Y, Kuzumaki N, Nakajima M, et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(4):739-50. Epub 2005/08/27.
120. Bailey A. Risk factors for low back pain in women: still more questions to be answered. *Menopause*. 2009;16(1):3-4. Epub 2008/11/13.
121. Roy V, Chapillon P, Jeljeli M, Caston J, Belzung C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. *Psychopharmacology*. 2009;203(1):131-41. Epub 2008/11/11.
122. Bailey KRC, J.N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press 2009.
123. Dhooper A, Young C, Reid KH. Ischemia-induced anxiety following cardiac arrest in the rat. *Behav Brain Res*. 1997;84(1-2):57-62. Epub 1997/03/01.

124. Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev.* 1988;12(2):123-37. Epub 1988/01/01.
125. Prickaerts J, Raaijmakers W, Blokland A. Effects of myocardial infarction and captopril therapy on anxiety-related behaviors in the rat. *Physiol Behav.* 1996;60(1):43-50. Epub 1996/07/01.
126. Junehag L, Asplund K, Svedlund M. Perceptions of illness, lifestyle and support after an acute myocardial infarction. *Scandinavian journal of caring sciences.* 2013. Epub 2013/06/15.
127. Macit C, Mercanoglu, G., Safran, N.,Gungor, M. and Eroglu L. Time to onset of anxiety- and depression-like behaviors in rats after myocardial infarction and association with autonomic control of heart. *Neuroanatomy.* 2009;8(1):20-5.
128. Lee TH. Chest discomfort. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 18 ed. New York: McGraw Hill Medical. p. 102-8.
129. Mitchell GAG. *Cardiovascular innervation.* Edinburgh and London: E. & S. Livingstone; 1956.
130. Pearson AA, Sauter RW. The internal thoracic (mammary) nerve. *Thorax.* 1971;26(3):354-6. Epub 1971/05/01.
131. Smith RB. Innervation of the parietal pericardium in the human infant, various mammals and birds. *Journal of anatomy.* 1971;108(Pt 1):109-13. Epub 1971/01/01.
132. Sleight P, Widdicombe JG. Action potentials in afferent fibres from pericardial mechanoreceptors in the dog. *The Journal of physiology.* 1965;181(2):259-69. Epub 1965/11/01.
133. Staszewska-Woolley J, Nolan PN, Luk DE. Studies of reflexogenic effects of capsaicin and neuropeptides on neural afferents in the dog parietal pericardium. *Neuropeptides.* 1991;20(3):191-200. Epub 1991/11/01.
134. Staszewska-Woolley J, Woolley G. Effects of neuropeptides, ruthenium red and neuraminidase on chemoreflexes mediated by afferents in the dog epicardium. *The Journal of physiology.* 1991;436:1-13. Epub 1991/05/01.
135. Armour JA, Huang MH, Pelleg A, Sylven C. Responsiveness of in situ canine nodose ganglion afferent neurones to epicardial mechanical or chemical stimuli. *Cardiovascular research.* 1994;28(8):1218-25. Epub 1994/08/01.

136. Kalueff AV, Jensen CL, Murphy DL. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res.* 2007;1169:87-97. Epub 2007/08/19.
137. Paulus MP, Geyer MA. Quantitative assessment of the microstructure of rat behavior: I, f(d), the extension of the scaling hypothesis. *Psychopharmacology.* 1993;113(2):177-86. Epub 1993/01/01.
138. Isbell LA, Pruett JD, Nzuma BM, Young TP. Comparing measures of travel distances in primates: methodological considerations and socioecological implications. *American journal of primatology.* 1999;48(2):87-98. Epub 1999/05/20.
139. Uetake T. Can we really walk straight? *American journal of physical anthropology.* 1992;89(1):19-27. Epub 1992/09/01.
140. Horev G, Benjamini Y, Sakov A, Golani I. Estimating wall guidance and attraction in mouse free locomotor behavior. *Genes Brain Behav.* 2007;6(1):30-41. Epub 2007/01/20.
141. Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al].* 2008;41(2):135-40. Epub 2008/02/26.
142. Schumacher MAB, A.I.; Way, W.L. Opioid Analgesics & Antagonists. In: Katzung BGM, S.B.; Trevor, A.J. , editor. *Basic and Clinical Pharmacology.* New York: McGraw-Hill Medical; 12 edition 2012.
143. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia.* Jamestown Road London NW1 7BY, UK: Academic Press; 2 edition (May 2, 1996); 1996.
144. D'Amato FR, Castellano C. Behavioral effects of morphine in mice: role of experimental housing. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989;34(2):361-5. Epub 1989/10/01.
145. Motta V, Brandao ML. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;44(1):119-25. Epub 1993/01/01.
146. Gupta R, Haydock T. Analgesia for acute myocardial infarction pain. *Ann Emerg Med.* 2003;41(5):753-4. Epub 2003/05/15.
147. Vonsy JL, Ghandehari J, Dickenson AH. Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. *Eur J Pain.* 2009;13(8):786-93. Epub 2008/10/29.

148. Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK. The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res Bull.* 2002;57(5):689-94. Epub 2002/04/03.
149. Pattij T, Schetters D, Janssen MC, Wiskerke J, Schoffelmeer AN. Acute effects of morphine on distinct forms of impulsive behavior in rats. *Psychopharmacology.* 2009;205(3):489-502. Epub 2009/05/14.
150. Rezaeifard A, Hosseini SS, Zarrindast MR. Effects of morphine on rat behaviour in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. *Behav Brain Res.* 2009;202(2):171-8. Epub 2009/05/26.
151. Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ. Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats: long-term behavioral effects. *Physiol Behav.* 2001;73(1-2):51-8. Epub 2001/06/12.
152. Urch CE, Donovan-Rodriguez T, Gordon-Williams R, Bee LA, Dickenson AH. Efficacy of Chronic Morphine in a Rat Model of Cancer-Induced Bone Pain: Behavior and in Dorsal Horn Pathophysiology. *The Journal of Pain.* 2005;6(12):837-45.
153. Shin IC, Kim HC, Swanson J, Hong JT, Oh KW. Anxiolytic effects of acute morphine can be modulated by nitric oxide systems. *Pharmacology.* 2003;68(4):183-9. Epub 2003/07/03.
154. Wang Y, Liu X, Zhang D, Chen J, Liu S, Berk M. The effects of apoptosis vulnerability markers on the myocardium in depression after myocardial infarction. *BMC medicine.* 2013;11:32. Epub 2013/02/12.
155. Mercanoglu G, Safran N, Uzun H, Eroglu L. Chronic emotional stress exposure increases infarct size in rats: the role of oxidative and nitrosative damage in response to sympathetic hyperactivity. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology.* 2008;30(10):745-52. Epub 2009/03/10.
156. Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J, Massie BM. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circulation research.* 1996;79(1):128-36. Epub 1996/07/01.
157. Vissers K, De Jongh R, Hoffmann V, Heylen R, Crul B, Meert T. Internal and external factors affecting the development of neuropathic pain in rodents. Is it all about pain? *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain.* 2003;3(4):326-42. Epub 2006/12/15.

158. Jourdan D, Ardid D, Eschalier A. Analysis of ultrasonic vocalisation does not allow chronic pain to be evaluated in rats. *Pain*. 2002;95(1-2):165-73. Epub 2002/01/16.
159. Benedetti F. The opposite effects of the opiate antagonist naloxone and the cholecystinin antagonist proglumide on placebo analgesia. *Pain*. 1996;64(3):535-43. Epub 1996/03/01.

ŽIVOTOPIS

Adresa: Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Šoltanska 2, 21 000 Split

E-mail: adriana.banozic@mefst.hr

Obrazovanje:

2003-2009 Odsjek za psihologiju, Filozofski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2010-2013 Poslijediplomski studij „Istraživanja u biomedicini i zdravstvu“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Zaposlenja:

2009 Razvojni program Ujedinjenih Naroda (UNDP)- Junior consultant

2009-2010 Psihijatrijska bolnica Vrapče, Odjel za forenzičku psihijatriju (vježbenički staž)

2010- Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Nagrade:

2012 International Association for the Study of Pain Conference Travel Award

2012 Committee for Postgraduate Education of the City of Posega Research Scholarship

2010 Measuring Behaviour Eindhoven Travel Grant

2010. 2nd Croatian congress on pain treatment Poster Award

2008. Rektorova nagrada, Sveučilište u Zagrebu

Publikacije:

1. Banozic A, Grkovic I, Puljak L, Sapunar D. Behavioral changes following experimentally induced acute myocardial infarction in rats. *Int. Heart J.* (prihvaćen).
2. Kraljevic S, **Banozic A**, Maric A, Cosic A, Sapunar D, Puljak L. Parents' pain catastrophizing is related to pain catastrophizing of their adult children. *International Journal of Behavioral Medicine.* 2012; 19:115-119.
3. Sapunar D, Kostic S, **Banozic A**, Puljak L. Dorsal root ganglion – a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *Journal of Pain Research.* 2012;5:31-38.
4. Maslov Kruzicevic S, Barisic KJ, **Banozic A**, Sapunar D, Esteban CD, Puljak L. Predictors of attrition and academic success of medical students: a 30-year retrospective study. *PLoS ONE* 2012;7(6): e38567

5. Klinar I, Ferhatovic L, **Banozic A**, Raguz M, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Physicians' attitudes about interprofessional treatment of chronic pain: family physicians are considered the most important collaborators. *Scandinavian Journal of Caring Sciences*. 2013;27(2):303-10
6. Ferhatovic L, **Banozic A**, Kostic S, Ticinovic Kurir T, Novak A, Vrdoljak L, Heffer M, Sapunar D, Puljak L. Expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and pain-related behavior in rat models of type 1 and type 2 diabetes. *Anesthesia & Analgesia*. 2013; 116(3):712-21
6. Ferhatovic L, Banozic A, Kostic S, Sapunar D, Puljak L. Sex differences in pain-related behavior and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dorsal root ganglia of rats with diabetes type 1 and type 2. *Acta Histochemica*. 2013;115(5):496-504
7. Markotic F, Cerni Obrdalj E, Zalihic A, Pehar R, Hadziosmanovic Z, Pivic G, Durasovic S, Grgic V, **Banozic A**, Sapunar D, Puljak L. Adherence to pharmacological treatment of chronic nonmalignant pain in individuals aged 65 and older. *Pain Medicine*. Accepted November, 2012.
8. Cosic A, Ferhatovic L, **Banozic A**, Kraljevic S, Maric A, Sapunar D, Puljak L. Pain catastrophizing changes during menstrual cycle. *Psychology, Health & Medicine*. Accepted January, 2013.
9. Jelcic Kadic A, Boric M, Ferhatovic L, Banozic A, Sapunar D, Puljak L. Intrathecal inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in diabetic neuropathy adversely affects painrelated behavior. *Neuroscience Letters*. Accepted. 2013.
10. Tesija RA, Maslov Kruzicevic S, Banozic A, Esteban CD, Sapunar D, Puljak L. Extension of the course duration and stricter study organisation have positive impact on attrition and academic performance of medical students. *Croatian Medical Journal*. 2013;54:192-7

Stipendije:

- 04/2011. Create Visiting Scholar Grant, European Health Psychology Association
- 05/2011. UKF Gaining Experience Grant, Croatian Unity through Knowledge Fund
- 06/2011. KAAD Scholarship, Deutsches Katholischen Akademischen Ausländer-Dienst Fund
- 08/2011. - 10/2011. Gothenburg University Fellowship "Influence of experimentally induced anxiety on placebo efficiency in pain experiment"