

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina B. Lazić

**Uticaj opšte anestezije na spavanje u  
eksperimentalnom modelu holinergičke  
neuropatologije Parkinsonove bolesti –  
mogući rizici postoperativnog oporavka**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina B. Lazić

**Impact of general anesthesia on sleep in the  
experimental model of Parkinson's disease  
neuropathology – possible risks of  
postoperative recovery**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

**Mentori:**

Dr Jasna Šaponjić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,

Dr Pavle Anđus, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

**Članovi komisije:**

Dr Jasna Šaponjić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”,

Dr Pavle Anđus, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet,

Dr Tihomir Ilić, redovni profesor, Univerzitet odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije u Beogradu,

Dr Sanja Dacić, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet,

Dr Jelena Petrović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja” (projekat OI 173022), koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.*

*Svom mentoru, dr Jasni Šaponjić, izražavam najdublje reči zahvalnosti na prenetom znanju, neizmernoj podršci, beskrajnom strpljenju, dragocenom vremenu i neprocenjivoj pomoći koje mi je pružila tokom svih faza izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Neizmerno sam joj zahvalna na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se bavim naukom.*

*Veliku zahvalnost upućujem profesorima dr Pavlu Anđusu i dr Tihomiru Iliću, kao i docentu dr Sanji Dacić i dr Jeleni Petrović na veoma korisnim korekcijama i sugestijama koje su doprinele konačnom obliku ove doktorske disertacije.*

*Koleginicama dr Jeleni Ćirić i dr Jeleni Petrović bih želela da zahvalim na pomoći tokom eksperimentalnog rada, prijateljstvu i iskrenoj podršci.*

*Zahvaljujem se dr Aleksandru Kalauziju za programe koji su korišćeni u analizi spavanja i respiratornog signala.*

*Želim da se zahvalim svim dragim prijateljima i kolegama što su imali razumevanja, strpljenja i vremena za mene. Puno vam hvala za pruženu podršku kada mi je bila najpotrebnija!*

*Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojoj majci i Laslu, koji su moj najznačajniji oslonac i podrška. Hvala vam što ste verovali u mene i bodrili me tokom svih ovih godina.*

*Na kraju, želim da zahvalim mom Vladi, koji je podneo najveći teret tokom pisanja ove doktorske disertacije. Hvala na strpljenju, razumevanju i podršci.*

## **Uticaj opšte anestezije na spavanje u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti – mogući rizici postoperativnog oporavka**

### Sažetak

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije na EEG mikrostrukturu i obrazac disanja tokom anestezije, kao i na arhitekturu spavanja i strukturu prelaznih stanja, EEG mikrostrukturu i dinamiku epizoda svih faza spavanja nakon anestezije, kako u fiziološkim kontrolama, tako i u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti (bilateralna lezija PPT jedra).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa izazvala ozbiljan poremećaj respiratornog obrasca i EEG mikrostrukture tokom anestezije. Međutim, jednako vreme potrebno za uspostavljanje stabilne anestezije u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra kao i dugotrajni suprimirajući efekti na povećanu NREM beta i teta amplitudu (elektrofiziološki markeri deficita holinergičkih neurona PPT jedra) nakon anestezije, ukazuju da je ova anestezija potencijalno povoljnija, kako za ulazak u anesteziju, tako i za NREM fazu spavanja nakon operativnih zahvata kod gerijatrijskih pacijenata, kao i pacijenata obolelih od Parkinsonove i Alchajmerove bolesti.

Nasuprot ketamin/diazepam anesteziji, pentobarbital anestezija ima povoljnije dejstvo na REM fazu spavanja nakon anestezije, kako kod fizioloških kontrola, tako i u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti na osnovu: dugotrajnih poremećaja REM spavanja i strukture prelaznih stanja kod fizioloških kontrola koje izaziva ketamin/diazepam anestezija; suprimirajućih efekata obe anestezije operativnog nivoa na produženu REM/REM1 fazu spavanja i poremećaj njihove EEG mikrostrukture kod bilateralne lezije PPT jedra; suprimirajućeg efekta pentobarbital anestezije na povećani broj NREM/REM/NREM prelaza uzrokovanih lezijom PPT jedra; kao i na osnovu EEG mikrostrukture tokom stabilne pentobarbital anestezije, koja se ne razlikuje u poređenju PPT lezije i fiziološke kontrole.

KLJUČNE REČI: anestezija, poremećaj spavanja, REM faza spavanja, spavanje nakon anestezije, pedunkulopontinsko tegmentalno jedro, ketamin/diazepam, pentobarbital, elektroencefalografija, respiratorni obrazac, pacov.

NAUČNA OBLAST: Neuronauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurofiziologija sa biofizikom

## **Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery**

### **Abstract**

The aim of this doctoral dissertation was to follow the impact of ketamine/diazepam and pentobarbital anesthesia on the EEG microstructure and respiratory pattern during anesthesia, and on the post-anesthesia sleep/wake states architecture and transition structure, EEG microstructure across sleep, and all the sleep state episodes dynamics in the physiological condition, as well as during the PPT cholinergic neuropathology (the experimental model of Parkinson's disease cholinergic neuropathology).

Ketamine/diazepam anesthesia induces more alterations in the EEG microstructure and respiratory pattern than does the pentobarbital anesthesia in the PPT lesioned rats. In addition, the equal time required to establish an anesthetized state in the PPT lesioned vs. control rats, and the long-term suppressive effect on augmented NREM beta and theta amplitudes (the hallmarks of PPT cholinergic neuronal loss in rat) suggest ketamine/diazepam anesthesia as potentially more beneficial both for anesthesia induction and for post-anesthesia NREM sleep in the surgical procedures of the elderly, and Parkinson's, and Alzheimer's patients.

In contrast to the ketamine/diazepam anesthesia the pentobarbital anesthesia is much more beneficial for the post-anesthesia REM sleep in physiological conditions as well as during the PPT cholinergic neuropathology on the basis of: the long-lasting REM sleep and transition structure disorders in physiological controls, induced by the ketamine/diazepam; the abolishing effects of both anesthetic regimens on the post-anesthesia prolonged REM/REM1 sleep and on their EEG microstructure disorders in the PPT lesioned rats; the abolishing effect of pentobarbital on the increased NREM/REM/NREM transitions, caused by the PPT lesion; and the equal EEG microstructure during stable pentobarbital anesthesia in the PPT lesioned rats versus controls.

**KEY WORDS:** anesthesia, sleep disorder, REM sleep, post-anesthesia sleep, pedunculo pontine tegmental nucleus, ketamine/diazepam, pentobarbital, electroencephalography, respiratory pattern, rat.

**RESEARCH AREA:** Neuroscience

**RESEARCH FIELD:** Neurophysiology and Biophysics



## Skraćenice

5-HT – serotonin  
5n – n. trigeminus  
6-OHDA – 6-hidroksidopamin  
7 – nc. facialis  
7n – n. facialis  
A5 – A5 noradrenergička neuronska grupa  
Ach – acetilholin  
AmbC – nc. ambiguus pars compacta  
AP – area postrema  
BB intervali – „breath-to-breath” intervali  
BCIP – 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat  
BötC – Becingerov kompleks  
CV – koeficijent varijacije  
cVRG – kaudalni deo ventralne respiratorne grupe  
DB – stria diagonalis  
DMSO – dimetil sulfoksid  
DR – nc. raphe dorsalis  
DRG – dorzalna respiratorna grupa  
EEG – elektroencefalografija  
EMG – elektromiografija  
GABA –  $\gamma$  aminobuterna kiselina  
Gal – galanin  
Glut – glutamat  
His – histamin  
I5 – intertrigeminalna regija  
IBO – ibotenična kiselina  
KF – Kölliker-Fuse jedro  
LC – nc. locus coeruleus  
LDT – nc. tegmentum laterodorsalis  
LH – lateralni hipotalamus

LPBr – lateralni parabrahijalni region  
LPS – lipopolisaharid  
LPT – laterodorzalni pontinski tegmentum  
LRt – lateralno retikularno jedro  
MCx – motorna kora  
MnR – nc. raphe medianus  
Mo5 – nc. motorius nervi trigemini  
MPBr – medijalni parabrahijalni region  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin  
MRF – formatio reticularis mesencephali  
MS – nc. septalis medialis  
mss – monotoni signalni segment  
NB – nc. basalis  
NBT – nitro blue tetrazolium hlorid  
NE – norepinefrin  
NK1 – Neurokinin 1  
NMDA – N-metil-D-aspartat  
NREM – Non Rapid Eye Movement  
OX – oreksin  
PB – Parkinsonova boleest  
PBS – fosfatni pufer  
PC – precoeruleus region  
PDE – Probability Density Estimation  
PeF – perifornikalna regija  
PET – pozitron emisijska tomografija  
pFRG – parafacijalna respiratorna grupa  
PPT – nc. pedunculo-pontinus tegmentalis  
pre-BötC – pre-Becingerov kompleks  
PRG – pontinska respiratorna grupa  
PVP40 – polivinilpirolidon  
Ref – referentna elektroda  
REM – Rapid Eye Movement

RT – retrotrapezoidno jedro  
rVRG – rostralni deo ventralne respiratorne grupe  
scp – superior cerebellar peduncle  
SEM – standard error of mean, standardna greška  
SI – substantia innominata  
SLD – nc. sublaterodorsalis  
SMCx – senzomotorna kora  
SN – nc. substantia nigrae  
SO – nc. olivaris superior  
SRBD – sleep-related breathing disorders  
TM – nc. tuberomamillaris  
TS – nc. tractus solitarii  
vIPAG – ventrolateralna periakveduktna siva masa  
VLPO – ventrolateralno preoptičko jedro  
VRC – ventralna respiratorna kolumna  
VRG – ventralna respiratorna grupa  
xscp – decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum  
 $\beta$ -NADPH –  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-Na-4 so

## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Uvod</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Opšta anestezija  | 2         |
| 1.2. Mehanizmi regulacije spavanja i opšte anestezije  | 4         |
| 1.3. Uticaj opšte anestezije na postoperativno spavanje  | 8         |
| 1.4. Opšta anestezija i postoperativni rizici - uticaj anestetika na holinergički sistem             | 10        |
| 1.5. Holinergički sistem sisara i uloga PPT jedra  | 11        |
| 1.6. Parkinsonova bolest i eksperimentalni modeli  | 13        |
| 1.7. Centralna regulacija disanja  | 15        |
| 1.8. Poremećaji disanja u toku spavanja  | 21        |
| <b>2. Ciljevi istraživanja</b>   | <b>24</b> |
| <b>3. Materijal i metode</b>   | <b>26</b> |
| 3.1. Eksperimentalne životinje   | 27        |
| 3.2. Eksperimentalne grupe i protokol  | 27        |
| 3.3. Operativna procedura za hroničnu implantaciju elektroda za registrovanje spavanja               | 30        |
| 3.4. Procedura registrovanja spavanja, EEG aktivnosti i respiratornih pokreta tokom opšte anestezije | 33        |
| 3.5. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija PPT lezije  | 33        |
| 3.6. Analiza EEG signala   | 35        |
| 3.7. Analiza respiratornog signala   | 39        |
| 3.8. Statistička obrada podataka   | 41        |
| <b>4. Rezultati</b>  | <b>43</b> |
| 4.1. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija lezije holinergičkih neurona PPT jedra            | 44        |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Respiratorni obrazac i EEG mikrostruktura za vreme opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa _____  | 46 |
| 4.2.1. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na respiratorni obrazac u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole _____  | 48 |
| 4.2.2. EEG mikrostruktura za vreme stabilne opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole _____  | 52 |
| 4.2.2.1. EEG mikrostruktura senzomotorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa _____  | 52 |
| 4.2.2.2 EEG mikrostruktura senzomotorne kore za vreme stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa _____  | 53 |
| 4.2.2.3. EEG mikrostruktura motorne kore u toku opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa kod fizioloških kontrola _____   | 54 |
| 4.2.2.4. EEG mikrostruktura motorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra _____  | 55 |
| 4.3. Uticaj stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu senzomotorne kore nakon anestezije u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole _____                 | 57 |
| 4.3.1. Arhitektura spavanja i EEG mikrostruktura senzomotorne kore nakon ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa _____   | 57 |
| 4.3.2. Arhitektura spavanja i EEG mikrostruktura senzomotorne kore nakon pentobarbital anestezije operativnog nivoa _____  | 58 |
| 4.4. Poremećaj REM spavanja u motornoj kori nakon stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa _____   | 62 |
| 4.4.1. Arhitektura spavanja, dinamika budnost/NREM/REM/REM1/REM2 epizoda spavanja i struktura prelaznih stanja u toku spavanja u motornoj kori nakon anestezije kod fizioloških kontrola – poređenje ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije _____ | 62 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.2. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na EEG mikrostrukturu REM faze spavanja nakon anestezije u motornoj kori fizioloških kontrola _____  | 70         |
| 4.4.3. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja, i dinamiku budnost/NREM/REM/REM1/REM2 epizoda spavanja, strukturu prelaznih stanja u toku spavanja i EEG mikrostrukturu svih REM faza spavanja u motornoj kori nakon anestezije kod pacova sa lezijom PPT jedra _____ | 74         |
| <b>5. Diskusija _____</b>  | <b>77</b>  |
| 5.1. Respiratorni obrazac i EEG mikrostruktura za vreme opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa _____  | 78         |
| 5.2. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu senzomotorne kore u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra _____  | 81         |
| 5.3. Poremećaj REM spavanja u motornoj kori nakon opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa kod fizioloških kontrola i bilateralne lezije PPT jedra _____  | 82         |
| <b>6. Zaključci _____</b>  | <b>87</b>  |
| <b>7. Literatura _____</b>   | <b>91</b>  |
| <b>8. Prilozi _____</b>  | <b>107</b> |

## ***1. Uvod***

Progresivan i konstantan porast prosečne dužine životnog veka uvećava broj starih ljudi kojima su neophodne hirurške intervencije u opštoj anesteziji. Fiziološke promene koje nastaju sa starenjem svrstavaju gerijatrijske pacijente u grupu pacijenata sa većim rizikom za pojavu kardioloških, respiratornih i neuroloških komplikacija tokom i nakon opšte anestezije (Pratico i sar., 2005). Pored toga, u ovoj grupi pacijenata dodatni rizik predstavljaju nedijagnostikovane neurodegenerativne bolesti, pre svega Alchajmerova i Parkinsonova bolest, kao najčešće neurodegenerativne bolesti starenja, obzirom da mnogi gerijatrijski pacijenti budu podvrgnuti hirurškim intervencijama u opštoj anesteziji pre postavljanja dijagnoze neurodegenerativne bolesti. Mnoge studije su ukazale na štetne posledice opšte anestezije, kao i na moguću povezanost anestetika i patogeneze neurodegenerativnih bolesti (Fodale i sar., 2006, 2010). Međutim, usled mnogih ograničenja, rezultati ovih kliničkih studija su često nekonzistentni i kontradiktorni (Papon i sar., 2011). Eksperimentalni modeli neuropatologije humanih bolesti pružaju mogućnost za razjašnjavanje efekata anestezije i posledica hirurških intervencija, i u tome se ogleda njihov značaj.

### **1.1. Opšta anestezija**

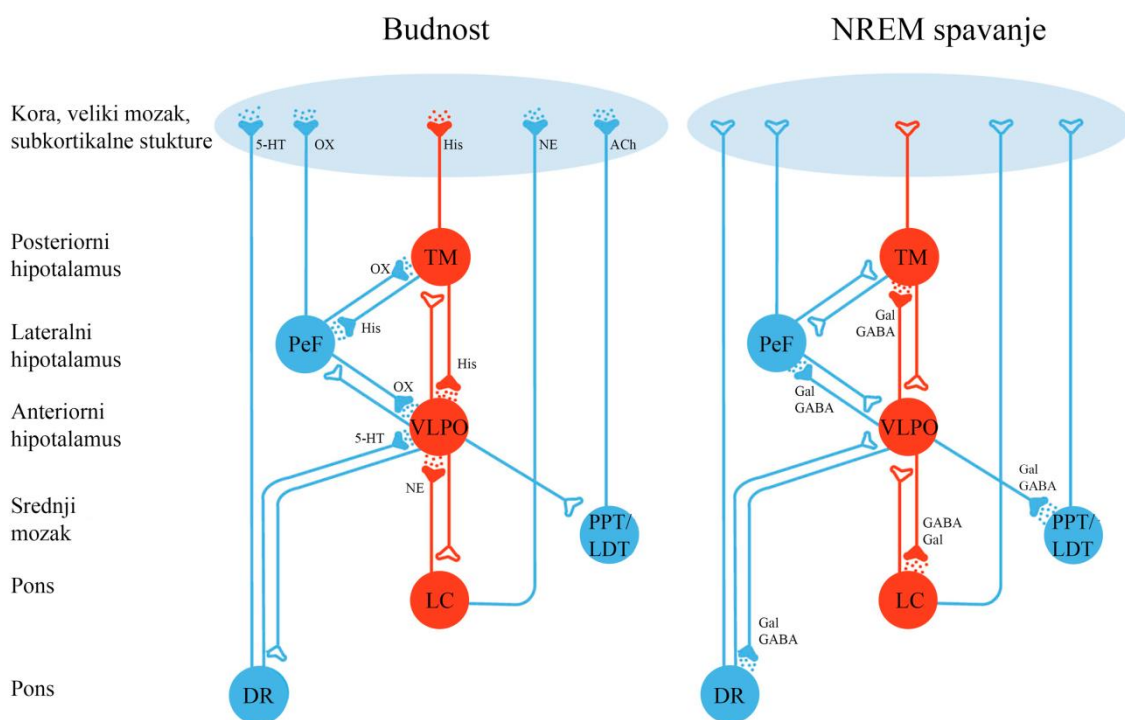
Stanje opšte anestezije predstavlja farmakološki izazvan reverzibilan gubitak svesti, analgeziju, amneziju, gubitak senzornih i autonomnih refleksa, kao i relaksaciju skeletne muskulature (Lydic i Baghdoyan, 2005). Mehanizam delovanja anestetika koji dovodi do besvesnog stanja i analgezije nije u potpunosti razjašnjen. U principu, opšti anestetici deluju tako što generalno povećavaju inhibitorne signale ili blokiraju ekscitatorne signale (Garcia i sar., 2010).

Ketamin, kao nekompetitivni NMDA (N-metil-D-aspartat) antagonist, kombinacijom analgetičkog i hipnotičkog dejstva obezbeđuje sedaciju i analgeziju supresijom ekscitacije (Eikermann i sar., 2012), što se na elektroencefalografskom (EEG) nivou odražava pojavom bržeg teta ritma (Lu i sar., 2008). U toku opšte anestezije indukovane ketaminom održani su neki aspekti svesti (ketamin je disocijativni anestetik), kao i tonus simpatičkog sistema (Lu i sar., 2008). Takođe, u toku ketaminske anestezije očuvani su i mnogi protektivni refleksi (faringealni, laringealni, kornealni i palpebralni) (Canet i Castillo, 2012). Klinički gledano, ovaj anestetik ima izuzetno povoljan efekat na respiratorni sistem i ne dovodi do depresije



disanja (Canet i Castillo, 2012). Mehanizam delovanja ketamina je značajno drugačiji u odnosu na druge anestetike. Naime, za razliku od drugih anestetika, ketamin aktivira subkortikalna jedra koja regulišu budno stanje (Lu i sar., 2008). Rezultati istraživanja na pacovima i miševima su pokazali da ketamin povećava neuronsku aktivnost u predelu limbičkog sistema, talamusa i kore velikog mozga. Poznato je da ketamin menja neuromodulaciju raznih neurotransmiterskih sistema, pre svega holinergičkog (Yamakura i sar., 2000) i noradrenergičkog (Kubota i sar., 1999a) sistema. Smatra se da se ketaminom indukovani gubitak svesti karakteriše disocijacijom holinergičke transmisije i kortikalne aktivacije, najverovatnije posredstvom istovremene supresije NMDA receptora, kako na piramidnim, tako i na inhibitornim neuronima prefrontalne kore (Li i Vlisides, 2016).

Nasuprot ketaminu, pentobarbital, kao agonist GABA<sub>A</sub> ( $\gamma$  aminobuterna kiselina) receptora, primarno dejstvo ostvaruje potenciranjem inhibicije, koja za ishod ima gubitak svesti i pojavu delta ritma u EEG zapisu (Lu i sar., 2008). U opštoj pentobarbitalskoj anesteziji smanjena je aktivnost neurona kore velikog mozga i tuberomamilarnog (TM) jedra, a povećana aktivnost neurona ventrolateralnog preoptičkog (VLPO) jedra (Nelson i sar., 2002; Lu i sar., 2008), ključnog jedra odgovornog za inhibiciju struktura koje regulišu budno stanje. Naime, pokazano je da opšti anestetici, čiji se mehanizam delovanja zasniva na aktivaciji GABA receptora, ne izazivaju sedaciju putem generalizovane inhibicije, već aktiviranjem endogenog puta za regulaciju spavanja, posebno u hipotalamusu, tačnije u TM jedru (**Slika 1.1**; Nelson i sar., 2002; Lu i sar., 2008).



**Slika 1.1. Šema endogenog puta za regulaciju NREM spavanja koji aktivira anestezija.** Inhibirani neuroni LC jedra oslobađaju VLPO jedro tonične inhibicije. VLPO jedro dovodi do inhibicije svih jedara (PPT, LDT, LC, DR, PeF, TM) koja učestvuju u regulaciji budnosti. Smatra se da inhibicija TM jedra, ključne strukture za regulaciju budnog stanja, inhibira oslobađanje histamina u kori velikog mozga i dovodi do besvesnog stanja. Ach – acetilholin; GABA -  $\gamma$  aminobuterna kiselina; Gal – galanin; His – histamin; 5-HT – serotonin; NE – norepinefrin; OX – oreksin; DR – *nc. raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; LDT – *nc. tegmentum laterodorsalis*; PeF – perifornikalna regija; TM – *nc. tuberomamillaris*; PPT – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; VLPO – ventrolateralno preoptičko jedro. Preuzeto i modificirano uz dozvolu izdavača Nature Publishing Group; Nelson i sar., 2002; ©2002.

## 1.2. Mehanizmi regulacije spavanja i opšte anestezije

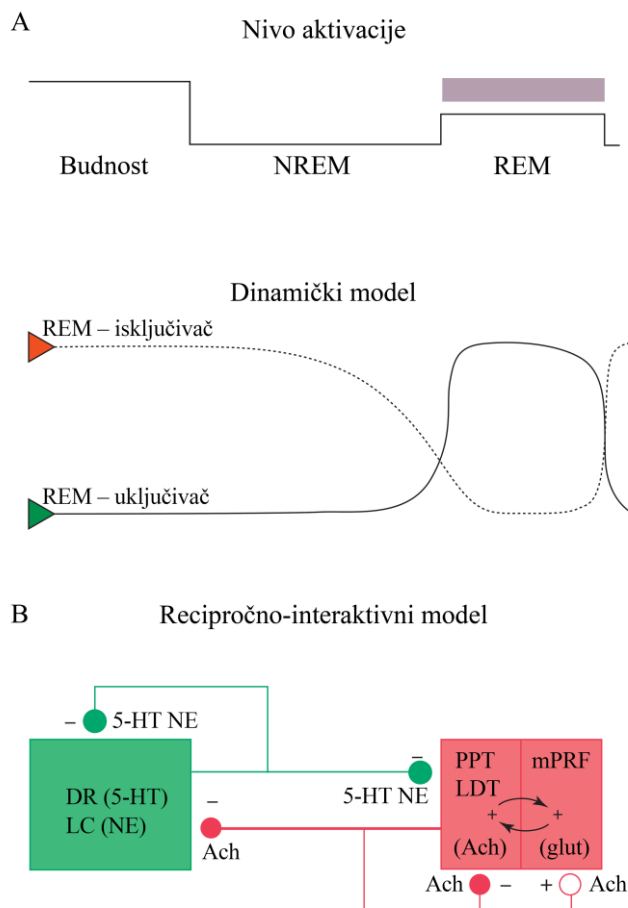
Spavanje je kompleksno, globalno stanje u ponašanju svih sisara, koje je homeostatski regulisano (Datta i MacLean, 2007). Spavanje predstavlja reverzibilno periodično stanje smanjenog odgovora na senzorne stimuluse (Siegel, 2008) i vremenski je organizovano u različite faze. Na osnovu fizioloških karakteristika i ponašanja, kod sisara su definisane dve osnovne faze spavanja: NREM spavanje („Non Rapid Eye Movement”) i REM spavanje („Rapid Eye Movement”). Regulacija budnosti i spavanja je veoma kompleksna i odvija se na više nivoa.

Budnost predstavlja složen koordinisani izraz ponašanja koje se konstantno menja kao odgovor na različite stimulse (Datta i MacLean, 2007). Grupe neurona koje učestvuju u regulaciji budnosti su: noradrenergički *locus coeruleus* (LC) neuroni, serotonergički *nc. raphe dorsalis* (DR) neuroni, holinergički *nc. pedunculopontinus tegmentalis* (PPT) neuroni i *nc. tegmentum laterodorsalis* (LDT) neuroni. Dorzalne projekcije PPT neurona aktiviraju talamo-kortikalni sistem, dok ventralne projekcije aktiviraju hipotalamo-kortikalne i bazalo-kortikalne sisteme. Aktivnost ovih neurotransmiterskih sistema dovodi do kortikalne aktivacije, neophodne za održavanje budnog stanja. Pored pontinskih, strukture koje učestvuju u regulaciji budnosti su: histaminergički neuroni posteriornog hipotalamusa, hipokretinski (oreksinski) neuroni lateralnog hipotalamusa (LH), holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga i neuroni suprahijazmatskog jedra (Datta i MacLean, 2007).

Kao posledica akumulacije endogenih metabolita čija se sinteza odvija u toku budnosti, dolazi do prelaska budnosti u NREM spavanje. Ovo je pasivan proces, za razliku od održavanja NREM spavanja, koji je aktivan proces. Povećana aktivnost GABAergičkih i galaninskih neurona VLPO jedra anteriornog hipotalamusa dovodi do inhibicije glavnih struktura koje regulišu budnost (TM, LH, LC, DR, PPT, LDT), čime započinje NREM spavanje (Datta i MacLean, 2007).

Tokom spavanja se javlja regularno i periodično smenjivanje NREM i REM faze spavanja. REM spavanje obuhvata oko 20% noćnog spavanja, dok preostalih 80% pripada NREM fazi. EEG zapis REM faze spavanja sastoji se od visokofrekventne niskovoltazne aktivnosti slične budnosti (aktivirani EEG), tako da se ova faza spavanja smatra aktivnim spavanjem. Regulacija ciklične pojave i održavanja REM spavanja je složena i podrazumeva aktivnost specifičnih populacija neurona kaudalnog srednjeg mozga i ponsa. U osnovi regulacije NREM/REM ciklusa spavanja nalaze se recipročne i inhibitorne interakcije između holinergičkih (PPT i LDT) i monoaminergičkih neurona (LC i DR). Prema staroj interaktivnoj teoriji (**Slika 1.2.**) PPT i LDT neuroni su predstavljeni kao „REM-uključivači” koji mogu biti inhibirani ili dezinhbirani od strane LC i DR neurona, definisanih kao „REM-isključivači”. Holinergički neuroni su najaktivniji tokom budnosti i REM faze, dok aktivnost monoaminergičkih neurona

opada od budnog stanja do REM faze, kada nastupa „monoaminska tišina” (McCarley i Hobson, 1975).



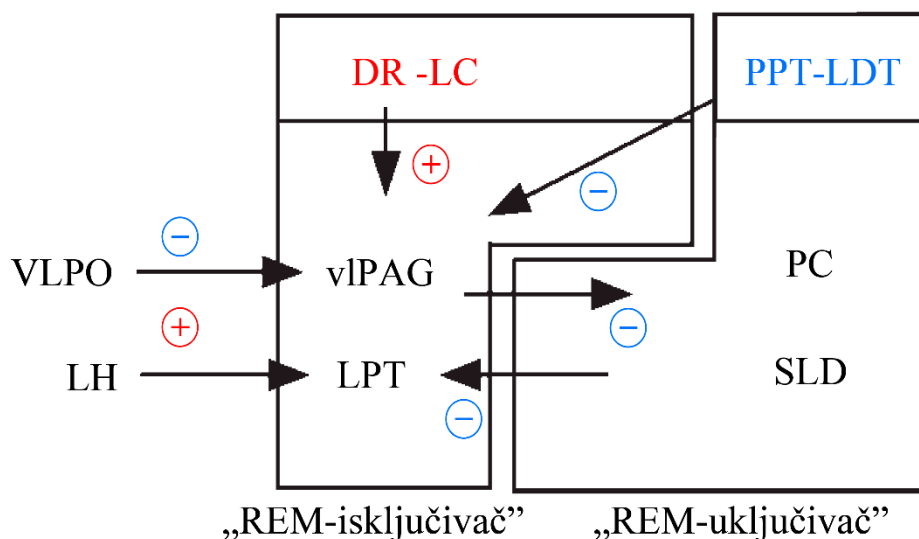
**Slika 1.2. Recipročno-interaktivni model regulacije REM spavanja.** (A) Nivo aktivacije prikazuje smenu NREM i REM faze spavanja i dinamički model aktivnosti neurona „REM-uključivača” i „REM-isključivača” u pontinskim jedrima. (B) Recipročno-interaktivni model regulacije REM spavanja. DR – *nc. raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nc. tegmentum laterodorsalis*; MRF – *formatio reticularis mesencephali*; Ach – acetilholin; 5-HT – serotonin; NE – norepinefrin; Glut – glutamat.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevir; Pace-Schott i Hobson., 2013; ©2013.

Prema novijem „flip-flop” modelu (Slika 1.3; Lu i sar., 2006), REM prekidački sistem je sastavljen od dva GABAergička neuronska regiona, „REM-isključivača” i „REM-uključivača”, koji su međusobno povezani i jedan drugog inhibiraju. Strukture koje čine zonu koja isključuje REM su ventrolateralna periakveduktna siva masa (vlPAG) i laterodorzalni pontinski tegmentum (LPT) koje primaju signale

konvergentnih projekcija oreksinskih LH neurona i GABA/galanin VLPO neurona. Strukture koje čine „REM-uključivač” su *nc. sublaterodorsalis* (SLD) i *precoeruleus* region (PC).

Prema ovom modelu, holinergička (PPT i LDT) i monoaminergička (DR i LC) jedra predstavljaju inhibitorne, odnosno ekscitatorne modulatore „REM-isključivača”.



**Slika 1.3. „Flip-flop” model regulacije REM spavanja.** Šematski prikaz regulacije REM spavanja prema „flip-flop” modelu sa međusobno inhibitornim „REM-uključivač” i „REM-isključivač” regionima GABAergičkih neurona. VLPO – ventrolateralni preoptički region; LH – lateralni hipotalamus; vIPAG – ventrolateralna periakveduktna siva masa; LPT – laterodorzalni pontinski tegmentum; PC – *precoeruleus* region; SLD – *nc. sublaterodorsalis*; DR – *nc. raphe dorsalis*; LC – *locus coeruleus*; PPT – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nc. tegmentum laterodorsalis*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Nature Publishing Group; Lu i sar., 2006; ©2006.

Iako naizgled različiti, anestezija i spavanje su stanja koja imaju veoma značajne zajedničke fiziološke i bihevioralne osobine. Uspostavljanje anesteziranog stanja, kao i spavanja ne mogu se objasniti jednim jedinstvenim mehanizmom. Spavanje i anestezija podrazumevaju veoma kompleksne mehanizme regulacije koji zavise od mnogobrojnih moždanih struktura, različitih neurotransmitera i neuromodulatora, gde holinergički sistem zauzima najvažnije mesto (Lydic i Baghdoyan, 1999; Lydic i Baghdoyan, 2005). Oslobođenje acetilholina je znatno veće u toku budnosti i REM spavanja, nego u toku NREM spavanja ili anestezije, što i odgovara aktiviranom EEG-u, karakterističnom za budnost i REM spavanje (Lydic i Baghdoyan, 2005).

Pozitron emisijske tomografske (PET) studije na ljudima pokazale su da između stanja mozga u anesteziji i tokom dubokog NREM spavanja postoje očigledne sličnosti (Braun i sar., 1997; Kajimura i sar., 1999; Maquet, 2000), i to pre svega na nivou talamusa (Franks, 2008). Talamus predstavlja glavnu strukturu zaduženu za prenos ascendentnih senzornih informacija i deaktiviran je tokom anestezije. Sa druge strane, nasuprot budnom stanju, NREM spavanje takođe pokazuje deaktivaciju talamusa, kao i moždanog stabla, bazalnog prednjeg mozga, bazalnih ganglija, zajedno sa deaktivacijom regiona parijetalne i frontalne kore (Franks, 2008). Stanja najmanje moždane aktivnosti su treći i četvrti stadijum NREM spavanja, kada je prenos signala kroz talamus suspendovan. Talamo-kortikalni sistem kontroliše EEG ritmove, EEG aktivaciju i deaktivaciju, a deaktivacija talamusa koja se može uočiti tokom prelaska iz budnosti u duboko NREM spavanje je visoko korelisana najpre sa pojavom vretena spavanja, pa sa delta talasima u EEG-u (Franks, 2008). Iako talamus može da kontroliše stanje svesti, obrada informacija u kori je odgovorna za detaljan sadržaj svesti. U toku dubokog spavanja i stanja anestezije kora je potpuno deaktivirana. Inhibicija kortikalnih neurona favorizuje aktivaciju talamo-kortikalnih neurona i stanje nalik spavanju (Franks, 2008). Obzirom da anestezija i spavanje predstavljaju stanja redukovane pobuđenosti, smatra se da koriste zajedničke regulacione neuronske mreže.

Na primer, uprkos tome što ketamin ima potpuno drugačiji mehanizam delovanja na ćelijskom nivou u odnosu na druge anestetike, ipak postoje zajednički efekti na nivou neuronskih mreža koje mogu objasniti sličnosti u funkcionalnom ishodu anestezije. Ketamin remeti funkcionalno povezivanje kortiko-kortikalnih veza u anestetskim dozama i to po frontalno – posteriornom obrascu (Lee i sar., 2013). Humane i elektrofiziološke studije su dokazale da ketamin dovodi do prekida kortiko-kortikalnog prenosa informacija dok je očuvana funkcija senzorne mreže u toku anestezije (Bonhomme i sar., 2016; Schroeder i sar., 2016).

### **1.3. Uticaj opšte anestezije na postoperativno spavanje**

Brojne studije su pokazale da spavanje može imati veliki uticaj na tok postoperativnog oporavka (Rosenberg, 2001; Hodor i sar., 2015). Naime, eksperimentalno je pokazano da kvalitet spavanja nakon moždanog oštećenja veoma

utiče na oporavak moždanih funkcija (Hodor i sar., 2015) i da bilo kakav poremećaj spavanja može imati štetnu ulogu u postoperativnom oporavku (Rosenberg, 2001).

Postoperativni poremećaji spavanja mogu dovesti do: promena u mentalnom statusu (Helton i sar., 1980), pojave postoperativnih epizoda hipoksemije (Rosenberg i sar., 1994), hemodinamske nestabilnosti (Knill i sar., 1990), kao i pojave ranog postoperativnog zamora (Rosenberg-Adamsen i sar., 1996). Obrazac spavanja najviše je ugrožen u prvoj postoperativnoj nedelji (Knill i sar., 1990). Istraživanja pokazuju da se u prvim postoperativnim danima poremećaji spavanja generalno karakterišu padom ukupnog vremena spavanja, skoro potpunom eliminacijom REM faze spavanja, smanjenjem sporotalasnog i povećanjem drugog stadijuma NREM spavanja (Rosenberg, 2001). Kao posledica ovih promena, postoperativno spavanje postaje izrazito fragmentisano, sa velikim brojem noćnih buđenja i dugim periodima budnosti koji onemogućavaju uspostavljanje normalnih ciklusa NREM i REM spavanja (Rosenberg, 2001).

Poseban oblik poremećaja postoperativnog spavanja predstavlja poremećaj REM spavanja označen kao „REM rebound”. Naime, nakon inicijalne postoperativne eliminacije REM faze spavanja dolazi do ponovnog uspostavljanja REM spavanja, čije se trajanje značajno povećava. Poremećaj REM spavanja predstavlja stanje pojačane simpatičke aktivacije, odnosno fiziološki stres, i javlja se najčešće između drugog i petog postoperativnog dana, onda kada druge abnormalnosti u postoperativnom obrascu spavanja nestanu (Knill i sar., 1990). U toku REM spavanja disanje i srčani rad su prirodno iregularni (Carley i Radulovacki, 1999, 2003), a izmenjeno postoperativno REM spavanje, sa značajno dužim trajanjem, može doprineti pojavi poremećaja disanja u toku spavanja, noćne hipoksemije, hemodinamske nestabilnosti i porasta krvnog pritiska (Knill i sar., 1990). Poseban rizik predstavlja razvoj miokardijalne ishemije i aritmije u toku postoperativnog REM spavanja, jer može dovesti do neočekivanog postoperativnog morbiditeta (Rosenberg, 2001).

#### **1.4. Opšta anestezija i postoperativni rizici - uticaj anestetika na holinergički sistem**

Kod gerijatrijskih pacijenata, godine predstavljaju najveći faktor rizika za pojavu postoperativnih neuroloških komplikacija kao što su kognitivna disfunkcija, konfuzija i delirijum (Papon i sar., 2011). Pored godina pacijenata, trajanje anestezije, postoperativne infekcije, kao i respiratorne komplikacije samo su neki od faktora rizika koji mogu u manjoj ili većoj meri doprineti pojavi postoperativnih neuroloških komplikacija (Xie i Tanzi, 2006; Papon i sar., 2011). Naime, poznato je da nakon hirurških intervencija u opštoj anesteziji kod 25% pacijenata starijih od 65 godina dolazi do razvoja kratkotrajnih i dugotrajnih poremećaja sličnih delirijumu koji, kod nekih pacijenata, mogu biti prisutni mesecima i godinama (Papon i sar., 2011).

Mnoga klinička i epidemiološka istraživanja su ukazala na potencijalno negativne posledice opšte anestezije, kao i na moguću povezanost sa promenama u proteinima uključenim u patogenezu Alchajmerove bolesti (Fodale i sar., 2006, 2010). Naime, predkliničke studije su pokazale da određeni anestetici mogu da izazovu promene u ekspresiji proteina (Fodale i sar., 2010), kao i pojavu oligomerizacije amiloid beta peptida i hiperfosforilaciju tau proteina, što za posledicu ima smanjenje sinaptičke plastičnosti i neurodegeneraciju (Papon i sar., 2011). Međutim, ne postoje dokazi koji dovode u direktnu vezu neurodegenerativne bolesti i izloženost anesteziji u periodu od jedne do pet godina pre pojave simptoma bolesti (Fodale i sar., 2006), kao ni dokazi o povezanosti neurodegenerativnih bolesti i broja hirurških intervencija (Fodale i sar., 2006).

Opšta anestezija utiče na moždane funkcije na svim nivoima, od ćelijskih membrana i receptora, preko jonskih kanala i neurotransmitera, do metabolizma. Jedan od mehanizama kojim opšti anestetici izazivaju gubitak svesti jeste i inhibicija centralne holinergičke neurotransmisije, koja može biti dodatno ugrožena kao posledica prirodnog procesa starenja (Pratico i sar., 2005). Acetilholin je jedan od glavnih neurotransmitera u velikom mozgu i holinergička neurotransmisija je esencijalna za održavanje budnosti i normalnih kognitivnih funkcija putem aktivacije kore velikog mozga (Krnjevic, 1967). Pretpostavlja se da patogeneza postoperativnih disfunkcija i delirijum mogu nastati kao posledica interakcije anestetika i holinergičkih receptora (Pratico i sar., 2005). Obzirom

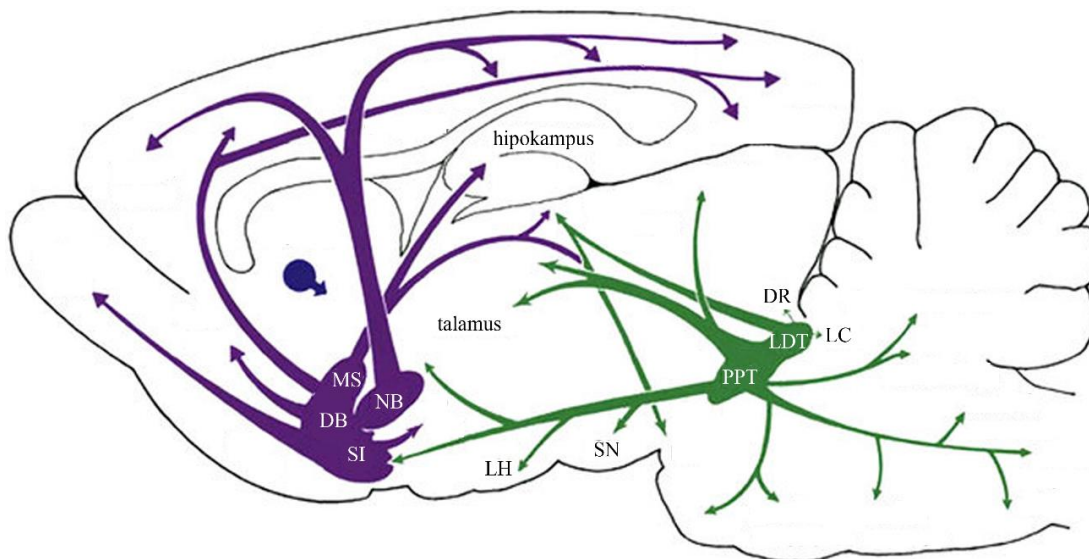


da acetilholin učestvuje u regulaciji kognitivnih funkcija kao što su pamćenje i učenje, kao i arborizaciji dendrita i diferencijaciji neurona (Fodale i sar., 2006), prekid centralne holinergičke transmisije, kao jedan od mehanizama opšte anestezije, može dovesti do disfunkcija u čitavom spektru mentalnih, emocionalnih i kognitivnih aktivnosti (Richardson i sar., 1985; Pratico i sar., 2005).

Senzitivnost holinergičkih receptora na anestetike ima ključnu ulogu u određivanju različitih stanja izmenjene svesti, kao što su amnezija, gubitak pažnje i hipnoza (Pratico i sar., 2005). Tokom opšte anestezije, smanjeno oslobađanje acetilholina i supresija septo-hipokampalne holinergičke transmisije, omogućava sve željene efekte opšte anestezije, kao što su gubitak svesti, bola, voljnih pokreta i pamćenja (Ma i sar., 2002).

### 1.5. Holinergički sistem sisara i uloga PPT jedra

Holinergički sistem mozga sisara (**Slika 1.4.**) čine dva glavna sistema: kortikalni sistem koji čine strukture bazalnog prednjeg mozga i subkortikalni holinergički sistem koji čine strukture moždanog stabla (Semba i Fibiger, 1989; Semba 1993; Rye, 1997).



**Slika 1.4. Kortikalni i subkortikalni holinergički sistem mozga sisara sa svojim projekcijama.** Kortikalni holinergički sistem (ljubičasto): NB – *nc. basalis*; DB – *stria diagonalis*; MS – *nc. septalis medialis*; SI – *substantia innominata*; Subkortikalni holinergički sistem (zeleno): PPT – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; LDT – *nc. tegmentum laterodorsali*; LH – lateralni hipotalamus; SN – *nc. substantia nigrae*; LC – *locus coeruleus*; DR – *nc. raphe dorsalis*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevir; Woolf i Butcher, 2011; ©2011.

Holinergički sistem bazalnog prednjeg mozga čine *nc. septalis medialis*, *stria diagonalis*, *substantia innominata* i *nc. basalis* (Perez-Lloret i Barrantes, 2016). Ovaj sistem predstavlja glavni kortikalni izvor holinergičke inervacije mozga i ima važnu ulogu u aktivaciji kore velikog mozga i homeostazi spavanja (Schliebs i Arendt, 2006). Pored toga, holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga su uključeni u kognitivne funkcije i usko su povezani sa različitim kognitivnim procesima, posebno onim vezanim za učenje i pamćenje (Fodale i sar., 2006). Tokom starenja holinergički neuroni bazalnog prednjeg mozga prirodno podležu degenerativnim promenama. Nastala holinergička hipofunkcija povezana je sa progresivnim kognitivnim poremećajima i patogenezom Alchajmerove bolesti (Fodale i sar., 2006).

Holinergički sistem moždanog stabla čine jedra PPT i LDT. PPT jedro je heterogena struktura, koju čine holinergički i neholinergički (GABAergički i glutamatergički) neuroni organizovani u dva dela: *pars compacta* deo koji dominantno sadrži holinergičke neurone, i *pars dissipata* deo koji dominantno sadrži glutamatergičke neurone (Rye, 1997).

PPT jedro ima važnu ulogu u regulaciji REM spavanja (Lu i sar., 2006), pobuđivanju (Datta i MacLean, 2007), motornoj kontroli (Takakusaki i sar., 2004) i kontroli disanja (Lydic i Baghdoyan, 1993; Saponjic i sar., 2003, 2005a, 2005b, 2006). Ovo jedro predstavlja glavnu strukturu odgovornu za regulaciju REM spavanja, odnosno REM fenomena koji podrazumeva istovremenu pojavu aktivacije kore velikog mozga, teta ritma u hipokampusu, atonije antigravitacionih mišića, brzih pokreta očiju, ponto-genikulo-okcipitalnih talasa i iregularnih autonomnih funkcija (Vertes, 1984). Svaka od komponenti REM fenomena može biti izazvana ili modulirana aktivacijom PPT jedra, ali se konačno ostvaruje aktivacijom različitih neuronskih grupa moždanog stabla (Garcia-Rill, 1991; Datta, 1995, 1997). Anatomske studije su potvrdile da svaka od ovih neuronskih subpopulacija moždanog stabla, koje su generatori pojedinačnih komponenti REM fenomena, prima aferentna vlakna iz PPT jedra, čime je potvrđena centralna uloga PPT jedra u kontroli REM fenomena (Semba, 1993; Rye, 1997).

PPT jedro se široko projektuje i inerviše mnoge moždane strukture. Ovo jedro čini glavnu vezu između talamusa, bazalnih ganglija i moždanog stabla (Mena-Segovia i sar., 2004; Winn, 2006). Neuroni jedara subkortikalnog holinergičkog sistema

predstavljaju najveći izvor holinergičke inervacije talamusa (**Slika 1.4**; Franks, 2008). Ascendentna holinergička vlakna PPT jedra, projektujući se ka talamusu, bilo direktno, ekscitacijom talamo-kortikalnih neurona, bilo indirektno, inhibicijom GABAergičkih retikulotalamičkih neurona, doprinose generalizovanoj aktivaciji kore velikog mozga (Franks, 2008). Projektujući se istovremeno i ka bazalnom prednjem mozgu i ka talamusu, PPT ostvaruje ulogu glavnog kontrolnog relejnog jedra odgovornog za integraciju funkcija oba holinergička sistema na aktivaciju kore velikog mozga (Dringenberg i Olmsted, 2003). Sa druge strane, descendentne projekcije PPT jedra inervišu retikularnu formaciju, produženu i kičmenu moždinu (Semba i sar., 1990; Semba i Fibiger, 1992). Pored toga, PPT jedro ostvaruje i recipročne veze sa izlaznim jedrima bazalnih ganglija: *substantiae nigrae pars reticulata* i *globus pallidus internus* (Mena-Segovia i sar., 2004), što je od izuzetne važnosti za normalnu funkciju kako bazalnih ganglija, tako i PPT jedra.

Degeneracija PPT holinergičkog sistema, kao i smanjena holinergička inervacija na nivou talamusa, povezana je sa neurodegenerativnim bolestima iz grupe sinukleinopatija, kao i sa poremećajima u toku REM faze spavanja (Boeve i sar., 2007).

## **1.6. Parkinsonova bolest i eksperimentalni modeli**

Parkinsonova bolest (PB) je multisistemska neurodegenerativna bolest koja se najčešće manifestuje motornim poremećajima, ali pored motornih, bolest često karakterišu i ne-motorni poremećaji poput poremećaja psihičkih funkcija u vidu depresije, intelektualnog propadanja, poremećaja spavanja. Etiologija PB nije u potpunosti poznata (Nicholson i sar., 2002) i smatra se da ova bolest pogađa oko 3% populacije starije od 66 godina (Moghal i sar., 1994).

Kliničku sliku PB sindroma karakterišu sledeći znaci: hipo- i bradikinezija, rigor, tremor u miru i oštećenje posturalnih refleksa (Nicholson i sar., 2002). Kod ovih bolesnika česti su i razni poremećaji vegetativnih funkcija (ortostatska hipotenzija, poremećaj funkcije mokraćne bešike, poremećaj erekcije kod muškaraca, opstipacija). Obzirom da kod ovih pacijenata postoji čitav niz poremećaja respiratornog, kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sistema, hirurško lečenje i izbor anestetika iziskuje posebnu pažnju (Nicholson i sar., 2002). Usled poremećaja u ekstrapiramidnom

sistemu, kod ovih pacijenata se javljaju abnormalnosti u kontroli i funkciji gornjih disajnih puteva koje mogu biti odgovorne za ograničenu prohodnost vazduha ili prekid disanja u toku spavanja (Nicholson i sar., 2002). Generalno, respiratorne komplikacije, nastale kao posledica depresije mišićne aktivnosti gornjeg disajnog trakta usled dejstva anestetika, mogu biti bitan uzrok perioperativnog morbiditeta u pacijenata sa PB (Nicholson i sar., 2002).

Osnovni uzrok PB je nedostatak dopamina usled oštećenja nigro-strijatnog dopaminergičkog sistema, ali i drugi neurotransmiterski sistemi, uključujući holinergički, mogu biti ozbiljno ugroženi (Boeve, 2013). Histopatološko obeležje PB predstavljaju unutarćelijske inkluzije označene kao Luvijeva tela i Luvijevi neuriti sačinjeni od abnormalne akumulacije  $\alpha$ -sinukleina u neuronima (Boeve, 2013). Prema Braak-vom sistemu, progresija patologije  $\alpha$ -sinukleina je vremenski i topografski definisana određenim stadijumima (1-6) i kliničkim manifestacijama (Braak i sar., 2003). Naime, prema ovom sistemu propagacija patologije  $\alpha$ -sinukleina ima ascendentni obrazac širenja od produžene moždine i olfaktornih struktura do limbičkih struktura i neokorteksa (Braak i sar., 2003). Poremećaji ponašanja tokom REM faze spavanja („REM behavior disorder”) javljaju se kada su ovom patologijom zahvaćene strukture moždanog stabla, veoma važne u regulaciji spavanja (Braak i sar., 2003). Ovi poremećaji ponašanja tokom REM faze spavanja mogu prethoditi godinama i decenijama kliničkoj manifestaciji PB (Boeve i sar., 2007; Whitwell i sar., 2007).

Humane neuropatološke studije su pokazale da kod osoba obolelih od PB degeneriše oko 50% holinergičkih neurona lateralnog dela PPT jedra (*pars compacta*) (Bohnen i Albin, 2011). Kortikalna i talamo-kortikalna denervacija, nastala kao posledica degeneracije PPT jedra, vezuje se za pojavu poremećaja ponašanja tokom REM faze spavanja i motornog deficita kod pacijenata sa PB (Bohnen i sar., 2009; Kotagal i sar., 2012). Naime, degeneracija PPT jedra, koje ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže, posledično dovodi do poremećaja posturalne kontrole i hoda, a samim tim i padova kod ljudi (Bohnen i sar., 2009; Bohnen i Albin, 2011). Disfunkcija PPT jedra potvrđena je kod akinezije rezistentne na terapiju dopaminom (Stein, 2009). Kliničke studije su potvrdile da upotreba Ach esteraza inhibitora, donepezila, redukuje i do 50% padova kod pacijenata sa PB (Chung i sar., 2009).

Ipak za naše razumevanje uloge PPT jedra u patogenezi PB je neophodan odgovarajući eksperimentalni model holinergičke denervacije PPT jedra. Adekvatni eksperimentalni modeli patologije humanih bolesti su od velike važnosti u biomedicinskim istraživanjima jer pre svega omogućavaju istraživanja koja nisu moguća na ljudima. Do sada korišćeni eksperimentalni modeli u istraživanjima patogeneze i patofiziologije PB su se većinom bazirali na sistemskoj ili lokalnoj primeni neurotoksina selektivnih za dopaminergičke neurone *substantia nigrae* ili nigrostrijatnog puta kao što su 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), 6-hidroksidopamin (6-OHDA), lipopolisaharid (LPS), inhibitori proteozoma, rotenon, parakvat, kao i na farmakološkim i transgenim eksperimentalnim modelima (Baladini i sar., 2008; Bezard i Przedborski, 2011; Duty i Jenner, 2011; Baladini i Armentero, 2012). Svi ovi eksperimentalni modeli imaju svoje specifičnosti, prednosti ili ograničenja, u odnosu na PB kod ljudi.

S druge strane, PB je multisistemska bolest, multifaktorijalne patogeneze i predstavlja sinukleinopatiju, sinaptopatiju i holinopatiju (Perez-Lloret i Barrantes, 2016). U okviru naše laboratorije ustanovljen je eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB (Petrovic i sar., 2013a; Saponjic i sar., 2016). Model holinergičke neuropatologije PB, prouzrokovan selektivnom bilateralnom lezijom PPT jedra, dao je potpuno nov uvid u značaj uloge talamo-kortikalnog holinergičkog sistema u spavanju i motornoj kontroli u PB (Saponjic i sar., 2016).

### **1.7. Centralna regulacija disanja**

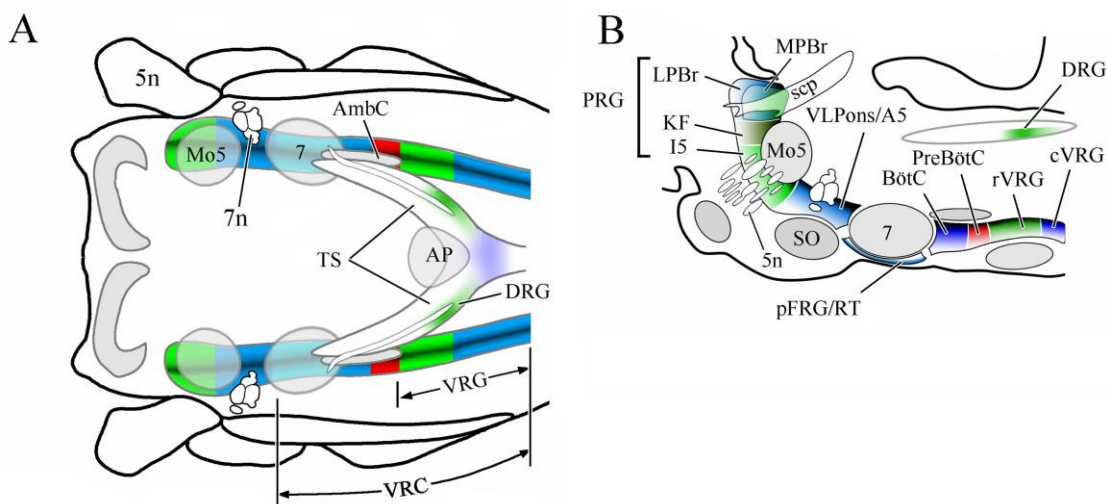
Disanje je esencijalno regulatorno ponašanje, konstantno prisutno od rođenja do smrti. Respiratorni ciklus čine udah (inspirijum) i izdah (ekspirijum). Opšte je prihvaćeno da respiratorni ciklus i kod ljudi i kod pacova čini inspirijum, u trajanju od jedne trećine, i ekspirijum koji traje preostale 2/3 respiratornog ciklusa. Detaljnijim ispitivanjem mišićne aktivnosti u toku inspirijuma (dijafragma) i ekspirijuma (spoljni međurebarni mišići), pokazano je da se ekspiracija sastoji od najmanje dve faze: post-inspirijuma i ekspirijuma (Alheid i McCrimmon, 2008). Početak ekspiratorne faze respiratornog ciklusa karakteriše nizak nivo post-inspiratorne aktivnosti dijafragme, zatim se prekida relaksacija ovog glavnog inspiratornog mišića i izdisanje se usporava. Porast aktivnosti ekspiratornih mišića označava početak druge faze ekspirijuma i ovu

fazu karakteriše aktivna kontrakcija ekspiratornih mišića (Feldman i McCrimmon, 2008).

Različiti respiratorni neuroni centralnog generatora disanja su aktivni u različitim fazama respiratornog ciklusa po kojima su i dobili svoje nazive (Feldman i McCrimmon, 2008). Pored respiratornih neurona koji su tonično aktivni, neuroni koji generišu respiratorni ritam funkcionalno su podeljeni po fazama respiratornog ciklusa u kojima su aktivni na: inspiratorne, post-inspiratorne ili ekspiratorne neurone (Ezure i sar., 1988; Sun i sar., 1998; Guyenet i Wang, 2001). Neuroni koji su aktivni u više od jedne faze respiratornog ciklusa su označeni kao neuroni koji obuhvataju više faza („phase-spanning” respiratorni neuroni). Takođe, aktivnost svake od ovih pojedinačnih grupa neurona može tokom faze respiratornog ciklusa da raste odnosno opada (Ezure i sar., 1988; Sun i sar., 1998; Guyenet i Wang, 2001).

Respiratorni neuroni centralnog generatora disanja pored glavnih neurotransmitera (glutamat, GABA i glicin) kolokalizuju i mnoge druge neurotransmitere (Stornetta, 2008). Za sve respiratorne neurone uključujući motoneurone, neuromodulatori određuju obrazac njihove aktivnosti i modulišu respiratorni odgovor (Feldman i McCrimmon, 2008; Stornetta, 2008; Koch i sar., 2015).

Neuroni respiratornog generatora su grupisani u tri glavne regije moždanog stabla (**Slika 1.5**): **dorzalna respiratorna grupa** neurona unutar jedra *nc. tractus solitarii*, **ventrolateralna respiratorna grupa** neurona, koja se prostire od nivoa spino-medularnog spoja do nivoa jedra *nc. facialis* i **pontinska respiratorna grupa** neurona u dorzolateralnom pontisu (Alheid i McCrimmon, 2008). Respiratorni neuroni ove tri grupe su međusobno povezani i međusobno kontinuirano interaguju i zajedno sa respiratornim senzornim aferentnim signalima su odgovorni za automatsku kontrolu disanja, kao i za sve adaptivne promene disanja uslovljene homeostazom disanja i promenama sredinskih faktora. Postoji i niz dodatnih neuronskih grupa moždanog stabla i velikog mozga koje učestvuju u centralnoj regulaciji disanja (serotonergički neuroni, kateholaminergički neuroni, neuroni periakveduktne sive mase srednjeg mozga i prednje-moždani neuroni u hipotalamusu, amigdaloidnom jedru i kori velikog mozga) (Alheid i McCrimmon, 2008).



**Slika 1.5. Strukture u moždanom stablu zadužene za automatsku regulaciju disanja.** Šematski prikaz u horizontalnoj (A) i sagitalnoj (B) ravni. 5n – *n. trigeminus*; 7 – *nc. facialis*; 7n – *n. facialis*; A5 – A5 noradrenergička neuronska grupa; AmbC – *nc. ambiguus pars compacta*; AP – *area postrema*; BötC – Becingerov kompleks; cVRG – kaudalni deo ventralne respiratorne grupe; DRG – dorzalna respiratorna grupa; I5 – intertrigeminalna regija; KF – Kölliker-Fuse jedro; LPBr – lateralni parabrahijalni region; Mo5 – *nc. motorius nervi trigemini*; MPBr – medijalni parabrahijalni region; TS – *nc. tractus solitarii*; pFRG – parafacijalna respiratorna grupa; pre-BötC – pre-Becingerov kompleks; PRG – pontinska respiratorna grupa; RT – retrotrapezoidno jedro; rVRG – rostralni deo ventralne respiratorne grupe; VRC – ventralna respiratorna kolumna; VRG – ventralna respiratorna grupa; scp – *superior cerebellar peduncle*; SO – *nc. olivaris superior*.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevir; Alheid i McCrimmon, 2008; ©2008.

Aktivnost neurona **dorzalne respiratorne grupe (DRG)**, grupisanih unutar jedra *nc. tractus solitarii* (TS), najveća je tokom inspirijuma (**Slika 1.5.**). Neuroni DRG su aktivni nezavisno od aferentnog ulaza (Alheid i McCrimmon, 2008). Jedro TS predstavlja mesto završetaka aferentnih vlakana koja putem *n. vagus*-a i *n. glossopharyngeus*-a prenose informacije o stanju pluća i disajnih puteva (Kubin i sar., 2006), kao i senzornih vlakana perifernih hemoreceptora karotidnog telašca koji obezbeđuju važan homeostatski odgovor na status kiseonika u arterijskoj krvi (Lahiri i sar., 2006). Neuroni jedra TS predstavljaju izvor tonične ekscitacije dorzalne respiratorne grupe i ventralne respiratorne kolumnne, kao i retrotrapezoidnog (RT) jedra (Takakura i sar., 2006).

**Pontinska respiratorna grupa (PRG)** uključuje neurone ventrolateralnog ponsa, intertrigeminalne regije, Kölliker-Fuse jedra, lateralnog i medijalnog parabrahijalnog kompleksa (**Slika 1.5**; Alheid i McCrimmon, 2008). Populacija neurona pontinske respiratorne grupe nije fiziološki i neurohemijski homogena (Alheid i McCrimmon, 2008). Aktivnost PRG neurona je raznolika, tako da su u okviru ove grupe identifikovani fazični inspiratorni (I, E-I, I-E), ekspiratorni, kao i tonično aktivni neuroni (Ezure i Tanaka, 2006; Song i sar., 2006).

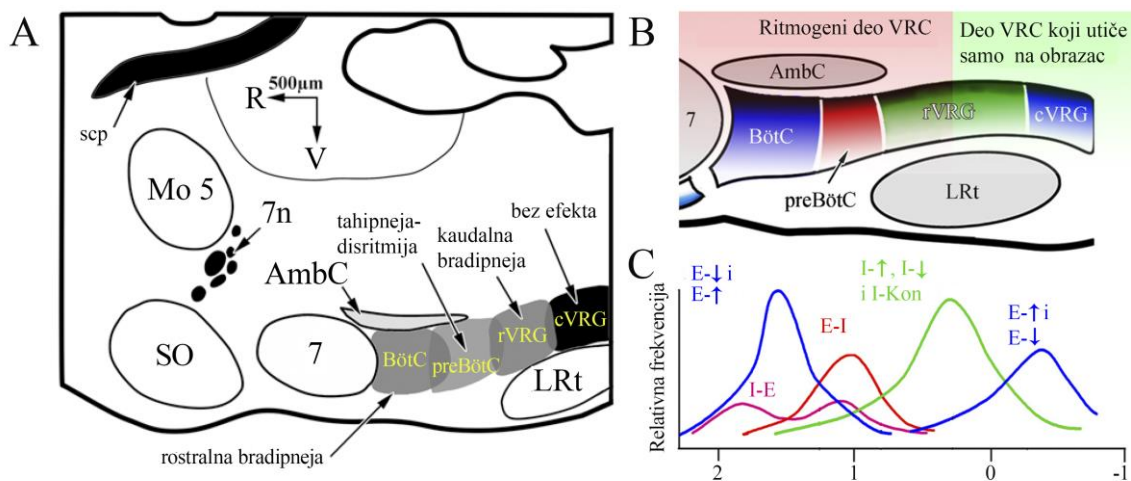
PPT jedro ima važnu ulogu u kontroli generatora respiratornog ritma u produženoj moždini (Lydic i Baghdoyan, 1993; Lydic i Baghdoyan, 2005; Saponjic i sar., 2003, 2005a, 2005b, 2006). Farmakološke stimulacije holinergičkih neuronskih subpopulacija PPT jedra glutamatom, mogu dovesti do ozbiljnog poremećaja respiratornog ritma u vidu smene spontanijih apneja, perioda tahipneje/hiperventilacije i bradipneje kod anesteziranih pacova (Saponjic i sar., 2003). Iako PPT jedro ima veoma heterogene funkcionalne uloge, poremećaji disanja izazvani farmakološkom stimulacijom mogu se javiti nazasvisno od drugih komponenti REM fenomena (Saponjic i sar., 2005b). Takođe, eksperimentalne studije su pokazale da se posredstvom NMDA receptora respiratorne zone PPT jedra moduliše respiratorni ritam i tonus mišića gornjih disajnih puteva (Saponjic i sar., 2006).

**Ventralna respiratorna kolumna (VRC; Slika 1.6.)** zauzima ventrolateralnu produženu moždinu celom njenom dužinom i ispunjena je različitim tipovima neurona identifikovanih na osnovu njihovih aktivnosti tokom faza respiratornog ciklusa. Ventralnu respiratornu kolumnu čine: rostralna i kaudalna respiratorna grupa (rVRG i cVRG), Becingerov (BötC), pre-Becingerov kompleks (pre-BötC), RT jedro i parafacijalna respiratorna grupa (pFRG) (Alheid i McCrimmon, 2008).

Rostralnu i kaudalnu VRG predstavlja agregacija inspiratornih, odnosno ekspiratornih ekscitatornih bulbospinalnih neurona (**Slika 1.6. B**; Monnier i sar., 2003; Feldman i McCrimmon, 2008). Ove dve grupe neurona ekscitacijom motoneurona kičmene moždine dovode do aktivacije inspiratornih, odnosno ekspiratornih mišića (Alheid i McCrimmon, 2008). Praćenjem neuronske aktivnosti pokazano je da nakon ubrizgavanja mikroinjekcije ekscitatornih amino-kiselina u anterioni deo VRG usporava



respiratornu frekvenciju, dok mikroinjekcija ubrizgana u posteriorni deo VRG ne dovodi do promena u respiratornom ritmu (Slika 1.6. A; Monnier i sar., 2003).



**Slika 1.6. Identifikacija glavnih funkcionalnih delova ventralne respiratorne kolumne.** Šematski prikaz sagitalnog preseka moždanog stabla pacova 1,9 mm lateralno (A); 7n – n. *facialis*; 7 – n. *facialis*; Mo5 – n. *motorius nervi trigemini*; AmbC – n. *ambiguus pars compacta*; scp – *superior cerebellar peduncle*; SO – n. *olivaris superior*; LRt – lateralno retikularno jedro; Distribucija podtipova inspiratornih i ekspiratornih neurona ventralne respiratorne kolumne (B-C). E – ekspirijum; I – inspirijum; Strelica pokazuje da li aktivnost neurona u toku faze respiratornog ciklusa raste ili opada.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača John Wiley and Sons; Monnier i sar., 2003; ©2003; Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevir, Alheid i McCrimmon, 2008; ©2008.

Osnovni ritam disanja u najvećoj meri je rezultat spregnute interakcije neurona rostralne polovine ventrolateralne respiratorne grupe, posebno neurona pre-BötC i BötC i dela RT jedra (Smith i sar., 1991; Feldman i Del Negro, 2006). U okviru BötC dominira prisustvo ekspiratornih neurona čijom se lokalnom farmakološkom stimulacijom produžava ekspiratorna faza i izaziva bradipneja (Monnier i sar., 2003).

Pre-BötC je identifikovan u *in vitro* studijama kao medularni region esencijalan za generisanje respiratornog ritma (Smith i sar., 1991) i ima važnu ulogu u modulaciji respiratornog odgovora. Pre-BötC predstavlja populaciju neurona čija aktivnost je u rasponu između ekspiratorne i inspiratorne faze respiratornog ciklusa, odnosno identifikovani su kao E-I neuroni (Sun i sar., 1998; Guynet i Wang, 2001). Stimulacijom ovog regiona, korišćenjem homocisteinske kiseline, izaziva se tahipneja i

disritmija (**Slika 1.6. A**; Monnier i sar., 2003). Ovaj region predstavlja glavni izvor ekscitatornih eferentnih vlakana ventralne respiratorne kolumne (Alheid i McCrimmon, 2008). Naime, prema trenutnoj hipotezi, neuroni pre-BötC generišu inspiratorni ritam, dok aktivni ekspirijum generišu neuroni RT jedra (Feldman i Del Negro, 2006).

Neuroni RT jedra se nalaze duž ventralne površine mozga ispod jedra *nc. facialis* i pružaju se kaudalno do BötC (**Slika 1.5. B**). Svojom pozicijom na ventralnoj površini produžene moždine, neuroni RT jedra identifikovani su kao hemosenzitivni neuroni, odnosno kao centralni hemoreceptori (Alheid i McCrimmon, 2008). Integracija centralnih i perifernih hemoreptornih aferentnih signala se u izvesnoj meri vrši u RT jedru (Rosin i sar., 2006). Neurokinin 1 (NK1) receptori su kolokalizovani na neuronima RT jedra i selektivnom lezijom ovih neurona, slabi centralni odgovor na ugljen dioksid (Nattie i Li, 2002). Sindrom centralne hipoventilacije i sindrom iznenadne smrti novorođenčeta mogli bi se objasniti gubitkom NK1 neurona u RT jedru, jer je njihov patološki supstrat u regionu jedra *nc. arcuatus* koje je homolog humanom RT jedru (Weese-Mayer i sar., 2008).

Neuroni pre-BötC, takođe eksprimiraju visok nivo NK1 receptora (Gray i sar., 1999). Eksperimentalne studije su pokazale da selektivna farmakološka ablacija NK1 neurona pre-BötC dovodi do poremećaja disanja (Gray i sar., 1999). Ovi poremećaji su najpre prisutni u toku spavanja, naročito u REM fazi, dok obimne lezije u okviru pre-BötC izazivaju poremećaje disanja i u toku budnosti (Gray i sar., 1999). Zato se smatra da manji poremećaji funkcije pre-BötC leže u osnovi poremećaja disanja u toku spavanja (McKay i sar., 2005). Takođe, ablacija NK1 neurona pre-BötC je dovela do smanjenja frekvencije uzdaha, što ukazuje na inhibiciju regulatornih odgovora na hipoksiju i hiperkapniju (McKay i sar., 2005). Kod ljudi bi ovaj fenomen mogao da objasni povećanje praga pobuđivanja koji je izazvan hipoksijom: u slučaju kada se centralna apneja ne prekida pobuđivanjem ona postaje terminalna, rezultujući anoksijom i smrću (McKay i sar., 2005). Ovakav sled događaja može se javiti kod starih ljudi, obzirom da prevalenca centralne apneje raste sa godinama, usled kumulativnog gubitka neurona pre-BötC tokom života (McKay i sar., 2005).

## 1.8. Poremećaji disanja u toku spavanja

Iako je postignut veliki napredak na polju istraživanja i razumevanja poremećaja disanja u toku spavanja („sleep-related breathing disorders” – SRBD), mehanizmi koji leže u osnovi ovih poremećaja nisu u potpunosti razjašnjeni. Naime, postoji čitav spektar različitih poremećaja disanja u toku spavanja, koji se mogu manifestovati u vidu (The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force, 1999):

- centralne apneje – definiše se kao prekid respiratornog napora duži od 10 s kod ljudi, a 2-2,5 s kod pacova;
- opstruktivne apneje – karakteriše se neprekidnim inspiratornim naporom nasuprot okluziji gornjeg disajnog puta;
- mešovite apneje – predstavlja mešavinu centralne komponente kojoj neposredno sledi opstruktivna komponenta apneje;
- hipopneje – definiše se kao parcijalni kolaps gornjeg disajnog puta;
- razbuđivanja povezana sa respiratornim događajem – karakterišu se otežanim inspiratornim naporom koji dovodi do razbuđivanja.



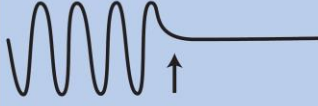

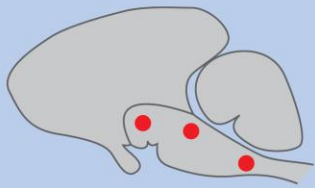
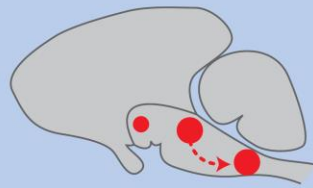
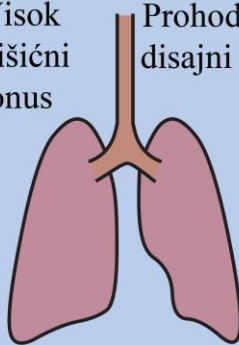
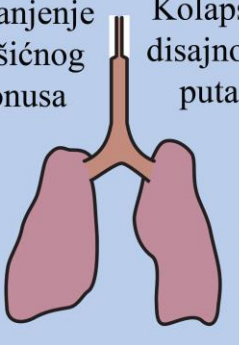
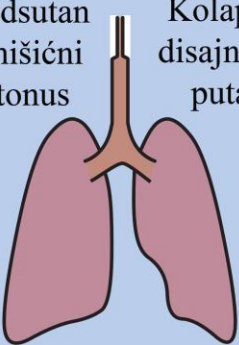
Poremećaji disanja u toku spavanja mogu normalno biti prisutni na prelasku budnosti u spavanje, kao i u toku REM faze spavanja kod ljudi, ali njihova učestalost retko premašuje pet događaja na sat kod zdravih ljudi (Carley i Radulovacki, 2003; Neikrug i Ancoli-Israel, 2010).

Prekomerna dnevna pospanost prisutna je kod većine pacijenata sa ovim poremećajem (Feldman i McCrimmon, 2008), a pretpostavlja se da ovaj simptom nastaje kao rezultat narušenog kontinuiteta spavanja usled čestog razbuđivanja u toku noći. Poremećaji memorije, raspoloženja, stepena budnosti, motorne koordinacije takođe se dovode u vezu sa SRBD (Carley i Radulovacki, 2003) i mogu značajno uticati na kvalitet života. Pored kognitivnih poremećaja, SRBD značajno povećava i rizik od pojave hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (Launois i sar., 2007).

Kako kod ljudi tako i kod pacova, disanje je iregularnije i pojava spontanih apneja je najučestalija u toku REM faze spavanja (Carley i Radulovacki, 1999, 2003).

Opstruktivna apneja nastaje kao posledica delimične ili potpune opstrukcije faringealnog puta u toku spavanja u ljudi sa prirodno uskim disajnim putem (**Slika 1.7.**). „Apneja u spavanju – razbuđivanje – ventilacija” predstavljaju ključne elemente ovog sindroma (Carley i Radulovacki, 2003). Pored anatomske predispozicije, patogenezi SRBD podjednako doprinosi i uticaj faze spavanja na funkciju respiratornih mišića (Carley i Radulovacki, 2003). Ipak, kod većine pacijenata sa SRBD primećena je kombinacija centralnih, mešovityh i opstruktivnyh događaja u okviru samo jednog perioda spavanja (Carley i Radulovacki, 2003; Launois i sar., 2007).

Centralnom apnejom naziva se prekid disanja u toku spavanja koji nastaje kada centralni generator obrasca disanja ne dovede do generisanja ritmične motorne komande (**Slika 1.7;** Feldman i McCrimmon, 2008). Učestalost centralnyh apneja u toku NREM i REM spavanja je u pozitivnoj korelaciji sa starenjem i pratilac je mnogih neurodegenerativnyh bolesti (McKey i sar., 2005). Poremećaj disanja tokom spavanja dovodi do intermitentne hipoksije, a kumulativni efekat je uzrok oslabljenih kognitivnyh funkcija, oštećenja sive moždane mase i povećanja mortaliteta u staryh ljudi (McKey i sar., 2005).

| Budnost   | NREM spavanje  | REM spavanje   |
|---|--|--|
| <p>Eupneja/hiperpneja</p>  <p>↑<br/>Voljni ili metabolički odgovor</p> | <p>Hipopneja/apneja</p>  <p>↑<br/>Opstrukcija</p>   | <p>Hiperpneja/apneja</p>  <p>↑<br/>Desinhronizacija respiratornog oscilatora</p> |
|  <p>Jak tonični nadražaj</p>   |  <p>Smanjenje toničnog nadražaja</p>  |  <p>Povećan tonični i fazični nadražaj</p>                                       |
| <p>Visok mišićni tonus</p> <p>Prohodan disajni put</p>                | <p>Smanjenje mišićnog tonusa</p> <p>Kolaps disajnog puta</p>  <p>Forsirana ekspiracija</p> | <p>Odsutan mišićni tonus</p> <p>Kolaps disajnog puta</p>                       |

**Slika 1.7. Mehanizam nastanka centralne i opstruktivne apneje.** U toku **budnosti**, jak tonični nadražaj na respiratorni oscilator u produženoj moždini održava tonus mišića i prohodnost disajnog puta. Obrazac disanja se prilagođava voljnim i metaboličkim potrebama. U toku **NREM** spavanja smanjuje se nadražaj na respiratorni oscilator, tako da se smanjuje dubina i broj respiracija. Ako je ovaj pad intezivan javlja se centralna apneja. Ukoliko dođe do kolapsa orofaringealnog puta, javlja se opstruktivna apneja. U toku **REM** spavanja, aktivacija pontinskog neuronskog generatora utiče na respiratorni oscilator. Tako nastala desinhronizacija može izazvati ili pojačan respiratorni napor koji je frekventniji ili intenzivniji (hiperpneja) ili izaziva zastoj disanja (apneja). Takođe, tokom ove faze spavanja respiratorni oscilator ne reaguje na metaboličke signale.

Preuzeto i modifikovano uz dozvolu izdavača Elsevir; Pace-Schott i Hobson, 2013; ©2013.

## ***2. Ciljevi istraživanja***

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije na EEG mikrostrukturu i obrazac disanja tokom anestezije, kao i na arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja, dinamiku epizoda i EEG mikrostrukturu svih osnovnih faza spavanja nakon anestezije u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti.

Selektivna bilateralna lezija PPT jedra, kao glavnog izvora talamo-kortikalne holinergičke inervacije velikog mozga, je predstavljala model holinergičke neuropatologije PB, tj. njen teži oblik, odnosno kasniji stadijum. Uticaj anestezije operativnog nivoa sa različitim mehanizmom delovanja na spavanje praćen je ukupno 6 dana.

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje uticaja ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije operativnog nivoa na EEG mikrostrukturu i respiratorni obrazac u toku anestezije, kao i na spavanje nakon opšte anestezije, sa mogućnošću primene ovih rezultata u proceni rizika same opšte anestezije, kao i rizika za postoperativni oporavak kod: pacijenata sa težim oblikom Parkinsonove bolesti, koja obuhvata oštećenje holinergičke transmisije, drugih multisistemskih neurodegenerativnih bolesti i gerijatrijskih pacijenata.

Na osnovu prethodno opisanog cilja definisani su sledeći neposredni zadaci:

- Ispitivanje uticaja opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije na respiratorni obrazac i EEG mikrostrukturu motorne i senzomotorne kore za vreme opšte anestezije operativnog nivoa kod fizioloških kontrola i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra.
- Ispitivanje uticaja stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu senzomotorne kore nakon anestezije kod pacova sa lezijom PPT jedra u poređenju sa fiziološkim kontrolama.
- Ispitivanje uticaja opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na poremećaj REM spavanja u motornoj kori nakon anestezije kod fizioloških kontrola i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra, analizom arhitekture spavanja, strukture prelaznih stanja u toku spavanja, dinamike epizoda i EEG mikrostrukture svih osnovnih faza spavanja.

### ***3. Materijal i metode***



### 3.1. Eksperimentalne životinje

Eksperimentalni protokol i upotreba životinja za izradu ove doktorske disertacije bili su u skladu sa Evropskom direktivom o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe (Direktiva 2010/63/EU) i odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” (broj rešenja: 02-21/10).

Za potrebe eksperimenata ove doktorske disertacije, korišćeni su mužjaci pacova Wistar soja, starosti 2,5 meseca i prosečne težine između 250 i 290 g, sa očuvanim spontanom disanjem. Pacovi su uzgajani i čuvani u toku eksperimentalnog protokola u odgajalištu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, pri standardnim uslovima (temperatura:  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; relativna vlažnost vazduha: 60 – 70%, pristup vodi i briketiranoj hrani *ad libitum*, svetlosni režim 12 časova dan/12 časova noć).

Tokom eksperimenata, pacovi su bili pojedinačno smešteni u providne kaveze od pleksiglasa (dimenzija 30 x 30 x 30 cm).

### 3.2. Eksperimentalne grupe i protokol

U eksperimentima vezanim za ovu doktorsku disertaciju kod ukupno 53 korišćena pacova, implantirane su EEG i elektromiografske (EMG) elektrode za hronično registrovanje spavanja. Istovremeno, tokom operativne procedure za implantaciju elektroda, odgovarajućoj eksperimentalnoj grupi pacova, bilateralno je lediran *nc. pedunculopontinus tegmentalis* (PPT).

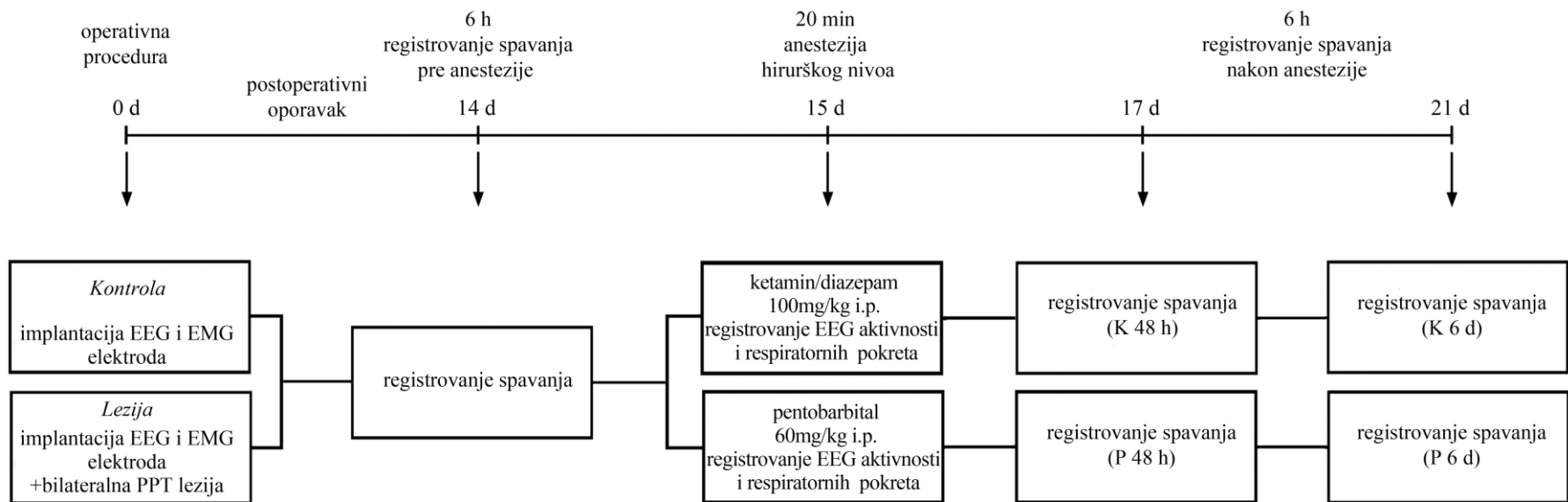
Eksperimenti su rađeni prema protokolu prikazanom na **slici 3.1**. Naime, nakon dve nedelje postoperativnog oporavka, kako u grupi fizioloških kontrola ( $n = 28$ ), tako i u grupi pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra ( $n = 25$ ), registrovano je spavanje u trajanju od 6 sati. Nakon 24 sata od prvog registrovanja spavanja, obe eksperimentalne grupe su podeljene na još dve grupe, radi dalje intraperitonealne (i.p.) administracije jednog od dva anestetika sa različitim mehanizmom delovanja. Jednoj grupi fizioloških kontrola i jednoj grupi pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra dat je ketamin/diazepam u dozi od 100 mg/kg, i.p. (Zoletil 50, VIRBAC, Francuska), dok je

drugoј grupi fizioloških kontrola i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra dat pentobarbital u dozi od 60 mg/kg, i.p. (Nembutal, Natrijum-pentobarbital, Penton, Serva, Heidelberg, Nemačka).

Efekti anestezije operativnog nivoa i njen uticaj na spavanje nakon anestezije praćen je 6 dana u sledećim eksperimentalnim grupama:

1. Fiziološka kontrola anestezirana mešavinom ketamina i diazepama (n = 14);
2. Fiziološka kontrola anestezirana pentobarbitalom (n = 10);
3. Pacovi sa bilateralnom lezijom PPT jedra anestezirani mešavinom ketamina i diazepama (n = 12);
4. Pacovi sa bilateralnom lezijom PPT jedra anestezirani pentobarbitalom (n = 9).

U svim eksperimentalnim grupama, spavanje je registrovano pre anestezije operativnog nivoa, 48 h i 6 dana nakon anestezije. Na ovaj način praćen je efekat opšte anestezije operativnog nivoa na spavanje.



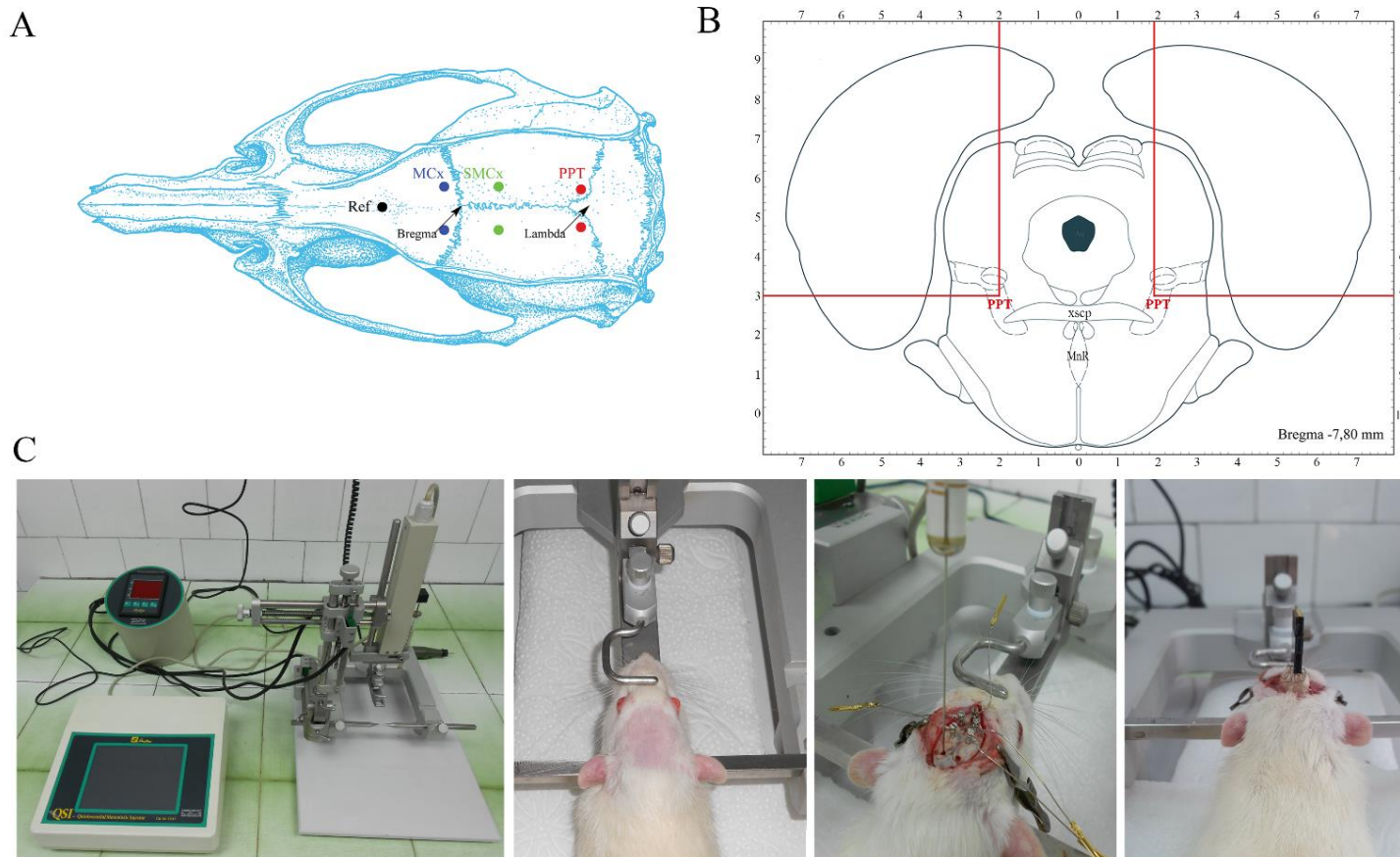
**Slika 3.1. Šematski dijagram eksperimentalnog protokola.** K 48 h, K 6 d – 48 sati ili 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije; P 48 h, P 6 d – 48 sati ili 6 dana nakon pentobarbital anestezije.

Selektivna bilateralna lezija PPT jedra, odnosno lezija jedinog izvora holinergičke talamo-kortikalne inervacije velikog mozga pacova, predstavlja „*in vivo*” model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB (Petrovic i sar., 2013a, 2013b, 2014; Petrović, 2014; Lazic i sar., 2015, 2017; Ciric i sar., 2016; Saponjic i sar., 2016).

### **3.3. Operativna procedura za hroničnu implantaciju elektroda za registrovanje spavanja**

U toku operativne procedure implantirane su EEG i EMG elektrode za hronično registrovanje spavanja, kao i moždane aktivnosti u toku stabilnog stanja opšte anestezije operativnog nivoa, dok je u odgovarajućoj eksperimentalnoj grupi izvršena i bilateralna ekscitotoksična lezija PPT jedra (**Slika 3.2**; Petrovic i sar., 2013a, 2014; Saponjic i sar., 2016). Pacovi su najpre anestezirani ketamin/diazepam anestezijom (Zoletil 50; 50 mg/kg; i.p.), krzno glave je obrijano i glava potom fiksirana u stereotaksički ram (Stoelting Co, SAD). Nakon incizije duž sagitalnog šava lobanje, uklonjeni su koža i potkožno tkivo, kako bi se oslobodio pristup orijentacionim tačkama za dalja stereotaksička razmeravanja (bregma i lambda). Sve koordinate za postavljanje EEG elektroda, kao i koordinate za postavljanje mikroinfuzione igle u PPT jedro, određene su prema stereotaksičkom atlasu za pacove (Paxinos i Watson, 2005). Naime, za implantaciju EEG elektroda izbušeni su okruglim borerom otvori u lobanji za epiduralno postavljanje pet šraf-elektroda od nerđajućeg čelika (Model broj 2035, O.D. 1,4 mm; dužina 3,5 mm; Professional Logistic, Beograd, Srbija). Referentna šraf-elektroda implantirana je u nazalnu kost pacova. Za implantaciju parnih šraf-EEG-elektroda u region motorne kore, stereotaksički razmerene koordinate su iznosile: 1 mm rostralno od bregme, medio-lateralno 2 mm, ventralno 1 mm od površine lobanje. Koordinate za postavljanje elektroda u region senzomotorne kore su bile: 3 mm kaudalno od bregme, medio-lateralno 2 mm, ventralno 1 mm od površine lobanje (Paxinos i Watson, 2005). Parne žičane elektrode obložene teflonom, (Medwire, SAD) postavljene su u dorzalnu vratnu muskulaturu za registrovanje mišićne aktivnosti. Izvodi svih elektroda skupljeni su u plastični konektor, koji je pričvršćen za lobanju pomoću dentalnog cementa i autopolimerizujućeg akrilata (Simgal, Galenika a.d., Beograd, Srbija).

Istovremeno, tokom hirurške intervencije kod odgovarajuće eksperimentalne grupe, izvršena je selektivna bilateralna lezija PPT jedra stereotaksički navođenom mikroinfuzijom ibotenične kiseline (IBO, pH = 7,4; Sigma Aldrich, Nemačka), korišćenjem digitalizovanog stereotaksičkog aparata sa injektorom (Stoelting Co, SAD). Mikroinfuzija 0,1 M IBO u 0,1 M Na-fosfatnom puferu (PBS) ubrizgana je u volumenu od 100 nl, korišćenjem 1 µl Hamiltonovog šprica (igla 26 ga) u jednom pulsu, u trajanju od 60 s. Ekscitotoksični efekat usled visoke vanćelijske koncentracije glutamata posledično dovodi do odumiranja neurona, a ovaj efekat ibotenična kiselina ostvaruje kao agonist svih glutamatskih receptora, kako jonotropnih tako i metabotropnih (Inglis i Semba, 1997). Volumen mikroinfuzije kao i koncentracija IBO, izabrani su na osnovu prethodnih studija (Inglis i Semba, 1997; Bjelobaba i Saponjic, 2013). Koordinate za pozicioniranje mikroinfuzione igle u PPT jedro, određene prema stereotaksičkom atlasu za pacove (Paxinos i Watson, 2005), bile su: 7,80 mm kaudalno od bregme, medio-lateralno 1,9 mm, ventralno 7,0 mm od površine mozga. Nakon mikroinfuzije igla je ostavljena na mestu ubrizgavanja narednih 5 minuta, kako bi rastvor difundovao u okolno tkivo. Nakon izvlačenja, mikroinfuzionu iglu je ispirana destilovanom vodom i stereotaksički postavljena u kontralateralno PPT jedro za sledeću mikroinfuziju. Na kraju operativne procedure, ivice rane su reponirane i ušivene neresoptivnim hirurškim koncem.



**Slika 3.2. Prikaz operativne procedure.** Šematski prikaz pozicije orijentacionih tačaka (bregma i lambda) i otvora na lobanji za postavljanje bilateralnih šraf-elektroda, kao i otvora za pozicije mikroinfuzione igle (A). Šematski prikaz tipične stereotaksičke koordinate korišćene za bilateralnu leziju PPT jedra (B). Prikaz operativne procedure (C). MCx – motorna kora, SMCx – senzomotorna kora, Ref – referentna elektroda; PPT – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; xscp – *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR – *nc. raphe medianus*. Preuzeto i modificovano iz Paxinos i Watson, 2005.

### **3.4. Procedura registrovanja spavanja, EEG aktivnosti i respiratornih pokreta tokom opšte anestezije**

Nakon 14 dana postoperativnog oporavka registrovano je spavanje u trajanju od 6 sati, da bi već narednog dana bila registrovana EEG aktivnost i respiratorni pokreti tokom 20 minuta stabilne opšte anestezije operativnog nivoa. Spavanje je uvek registrovano u periodu od 9 do 15 h, odnosno u vreme neaktivne cirkadijalne faze za pacove. Takođe, svi akutni eksperimenti su registrovani sa početkom od 9 h.

Nakon uobičajenog pojačanja (pojačivač sa 16 kanala, model 3600, A–M System Inc. Carlborg, SAD) i filtriranja (pojasni filter 0,3 – 100 Hz) signali su digitalizovani (frekvencija uzorkovanja 256/s) i snimljeni korišćenjem akvizicionog softvera DataWave SciWorks Experimenter 8.0 (Datawave Technologies, Longmont, SAD).

Disanje tokom opšte anestezije je registrovano korišćenjem piezoelektričnog senzora (Infant-Ped Sleepmate Technologies, Midlothain, VA, SAD). Ovaj sistem čini kristal veličine 1 cm<sup>2</sup> i elastična traka koja, obavijena oko grudnog koša pacova, omogućava da senzor bude adekvatno pozicioniran i pričvršćen neposredno ispod grudne kosti (Saponjic i sar., 2003, 2005a, 2005b, 2006; Lazic i sar., 2015). Ovako registrovani respiratorni pokreti se konvertuju u električne impulse. Piezoelektrični senzor daje mogućnost kvantitativnog merenja vremena trajanja respiracija i relativnog merenja respiratornog volumena. Naime, ovaj način registrovanja respiracija daje mogućnost praćenja promena u disanju samo u vremenskom domenu.

Stabilnost anestezije operativnog nivoa je procenjivana na osnovu gubitka svesti, atonije mišića, odsustva kornealnog refleksa i odsustva reakcije na bolni nadražaj (analgezija – „ear – pinch” i „tail – pinch” refleksi), kao i na osnovu stabilnog i regularnog obrasca disanja u toku poligrafskog zapisa.

### **3.5. Histoheмиjska identifikacija i kvantifikacija PPT lezije**

Po završetku eksperimentalnog protokola, lezije PPT jedra su identifikovane NADPH – diaforaza histoheмиjskim bojenjem i kvantifikovane u celokupnoj rostro-

kaudalnoj dimenziji oba PPT jedra (Hope i sar., 1991; Sabbatini i sar., 1999; Paxinos i sar., 2009).

Pacovi su žrtvovani u ketamin/diazepam anesteziji (50 mg/kg i.p.). Transkardijalnom perfuzijom moždano tkivo je najpre isprano od krvi fiziološkim rastvorom (200 ml 0,9% NaCl, brzina perfuzije 40 ml/min), zatim 4% rastvorom paraformaldehida u 0,1 M PBS (pH = 7,4; 100 ml rastvora brzinom perfuzije 40 ml/min, a zatim 30 ml/min) i na kraju rastvorom 10% saharoze u 0,1 M PBS (brzinom perfuzije 30 ml/min). Nakon dekapitacije, mozgovi su izolovani, uklonjeni su zaostali krvni sudovi i moždane ovojnice, a zatim postfiksirani u 4% paraformaldehydu preko noći na temperaturi + 4°C. Fiksativ je potom zamenjen rastvorom 30% saharoze u 0,1 M PBS, radi dehidracije i krioprotekcije.

Moždano tkivo je sečeno na kriotomu (Leica), na temperaturi od – 20°C. Koronalni preseki debljine 40 µm skupljani su u dve serije kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra, a potom čuvani u antifrizu (40% rastvor etilen-glikola u 0,1 M kalijum-acetatu, koji sadrži 1% polivinilpirolidon (PVP40, Sigma Aldrich, Nemačka)) na temperaturi od – 20°C do NADPH – diaforaza histohemijskog bojenja.

Verifikacija oštećenja holinergičkih neurona PPT jedra vršena je NADPH – diaforaza histohemijskim bojenjem (Hope i sar., 1991; Sabbatini i sar., 1999; Paxinos i sar., 2009). Nefiksirani, slobodno plutajući kriopreseki isprani su 3 puta po 10 minuta u 0,1 M PBS, a zatim inkubirani u rastvoru za bojenje 1 h na temperaturi od 37°C. Rastvor za bojenje sadržao je supstratni rastvor u koji je dodata β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-Na-4 so (β-NADPH, Serva, Nemačka) i dimetil sulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich, Nemačka). Supstratni rastvor činio je nitro blue tetrazolium hlorid (NBT, Serva, Nemačka) i 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP, Serva, Nemačka) u supstratnom puferu pH = 9,5 (0,1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Specifičan inhibitor levamizol (Sigma Aldrich, Nemačka) u 2 mM koncentraciji (Bjelobaba i Saponjic, 2013) dodat je u rastvor za bojenje kako bi se inhibirala aktivnost endogene alkalne fosfataze prisutne u tkivu. Po završetku inkubacije, preseki su nanovo isprani 3 puta po 10 minuta na sobnoj temeperaturi u 0,1 M PBS. Nakon toga, preseki su postavljeni na predmetna stakla i ostavljeni da se osuše preko noći. Sutradan su pločice sa presecima potopljene u ksilol (Zorka, Šabac, Srbija) na 24 h. Da bi preparati postali



trajni, na pločice sa preseccima stavljan je DPX medijum (Sigma Aldrich, Nemačka) i presecci su prekriveni pokrovnim staklima. Presecci su dalje analizirani i slikani na Zeiss Axiovert mikroskopu.

Deficit holinerških neurona izazvan lezijom PPT jedra kvantifikovan je korišćenjem ImageJ 1.46 programa (NIH, SAD). Broj holinerških neurona prebrojan na ovaj način predstavljao je više procenu veličine oštećenja, nastalih mikroinfuzijom IBO ekscitotoksina, nego utvrđivanje apsolutnog broja holinerških neurona PPT jedra. Iz tog razloga su prethodno odabrani i slikani presecci obe grupe kontrola i obe grupe PPT lezija raspoređeni u tri prethodno definisana stereotaksička opsega celokupne rostro-kaudalne dimenzije PPT jedra. Definisani stereotaksički opsezi za PPT jedro su bili: 6,90 – 7,40 mm; 7,50 – 8,00 mm; 8,10 – 8,60 mm kaudalno od bregme. NADPH – diaforaza – pozitivno obojeni neuroni su prebrojani za svaku stranu mozga zasebno, a zatim je u okviru svakog od tri stereotaksička opsega svake eksperimentalne grupe izračunata srednja vrednost broja holinerških neurona (Petrovic i sar., 2013a, 2014; Saponjic i sar., 2016; Lazic i sar., 2017).

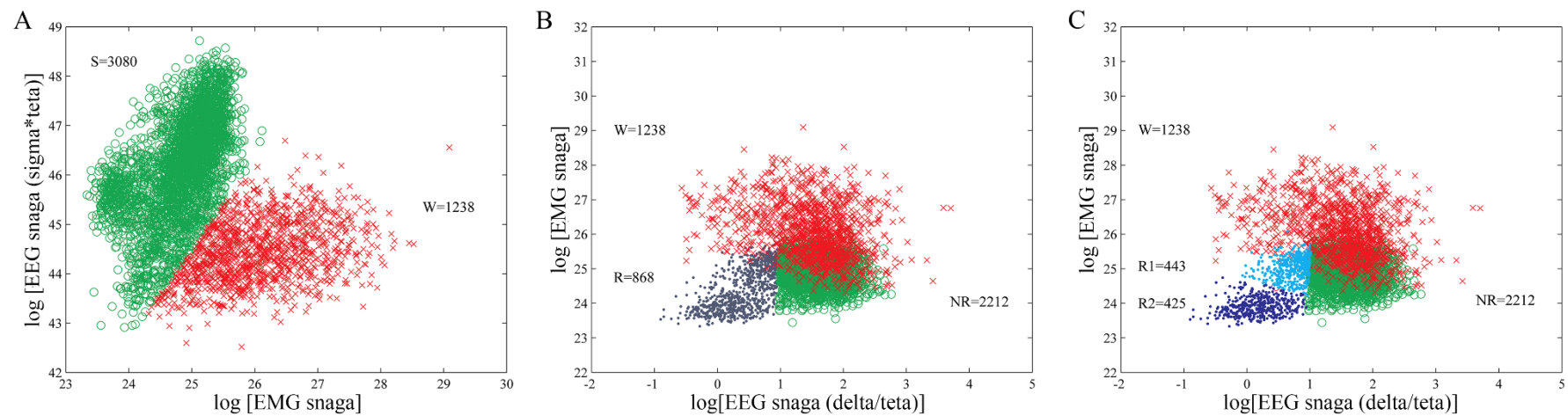
Za određivanje holinerškog deficita PPT lezije najpre su određene srednje kontrolne vrednosti apsolutnog broja holinerških neurona obe kontrolne grupe za svaki stereotaksički opseg koje su smatrane kao 100%. Potom je holinerški deficit PPT lezija izražen kao razlika procenata NADPH – diaforaza pozitivnih neurona u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrednosti za svaki stereotaksički opseg.

### **3.6. Analiza EEG signala**

Za analizu signala korišćen je originalni analizni paket, razvijen u MATLAB 6.5 programu (Petrovic i sar., 2013a, 2013b, 2014; Saponjic i sar., 2013; Lazic i sar., 2015, 2017). Analiza EEG signala obuhvatala je arhitekturu spavanja, strukturu prelaznih stanja, dinamiku epizoda spavanja i EEG mikrostrukturu.

Prvi korak u analizi je bila primena Furijeove transformacije na sve EEG i EMG signale u trajanju od 6 sati, kao i na EEG signale registrovane u toku 20 minuta stabilne anestezije operativnog nivoa. Nakon toga je svaka od Furijeovih 2160 epoha (dužina epohe 10 s), odnosno 4320 epoha (dužina epohe 5 s), na osnovu svojih EEG i EMG karakteristika diferencirana kao jedna od tri osnovne faze spavanja, odnosno na

budnost, NREM i REM fazu (Petrovic i sar., 2013a). Najpre su epohe budnosti izdvojene od epoha spavanja na osnovu proizvoda snaga sigma i teta frekventnog opsega na y-osi i ukupne snage EMG-a na x-osi (**Slika 3.3. A**). Dalja diferencijacija epoha spavanja na NREM i REM spavanje, vršena je na osnovu ukupne snage EMG-a na y-osi i količnika snaga delta i teta frekventnog opsega na x-osi, dok su epohe budnosti na ovaj grafik prenete iz prethodnog razdvajanja (**Slika 3.3. B**). Diferencijacija epoha budnosti od epoha spavanja, kao i dalja diferencijacija epoha na NREM i REM spavanje vršena je korišćenjem algoritma K – sredina za dva grupisanja, a radi boljeg razdvajanja, vrednosti na osama su logaritmovane. Za potrebe dalje analize poremećaja REM faze spavanja (**Slika 3.3. C**), REM epohe su dodatno razdvojene na osnovu snage EMG-a, takođe pomoću algoritma K – sredina za dva grupisanja, na REM stanje sa većim tonusom mišića (REM1) i REM stanje sa mišićnom atonijom (REM2) (Petrovic i sar., 2014; Lazic i sar., 2017).



**Slika 3.3. Primer grafika razdvajanja grupisanja faza budnosti i spavanja.** Razdvajanja grupisanja 5 s epoha budnosti, NREM, REM, REM1 i REM2 faze tokom 6 sati spavanja. Razdvajanje epoha budnosti (W grupisanje – crveni krstići) i spavanja (S grupisanje – zeleni kružići) (A); razdvajanje NREM (NR grupisanje – zeleni kružići) i REM (R grupisanje – plave tačke) epoha (B); razdvajanje REM1 (R1 grupisanje – svetloplave tačke) i REM2 (R2 grupisanje – tamnoplave tačke) epoha (C). Svaki simbol predstavlja jednu 5 s epohu. Epohu budnosti na finalnim graficima razdvajanja spavanja (B, C) prenete su iz razdvajanja budnosti i spavanja.

Za analizu arhitekture spavanja, najpre je za svakog pojedinačnog pacova definisan ukupan broj 10 s, odnosno 5 s epoha budnosti, NREM, REM stanja, kao i REM1 i REM2 stanja. Potom je za svaku eksperimentalnu grupu izračunata srednja vrednost broja epoha za svaku fazu spavanja i na taj način je određeno trajanje svake faze spavanja u okviru 6 h.

Za analizu strukture prelaznih stanja, najpre je određen broj svih osnovnih tipova prelaza (budnost/NREM, NREM/budnost; budnost/REM, REM/budnost; NREM/REM, REM/NREM) u toku 6 sati spavanja za svaku pojedinačnu životinju, a potom je određena srednja vrednost broja prelaza u okviru svake eksperimentalne grupe. Za potrebe ove analize definisanje budnosti, NREM i REM faze spavanja je rađeno na epohama dužine 5 s (Yan i sar., 2011; Petrovic i sar., 2013a, 2013b; Lazic i sar., 2017). Tako dobijen niz od 4320 Furijeovih 5 s epoha je potom preveden u jednodimenzionu matricu kodova od 0 do 2, pri čemu je 0 definisana kao budnost, 1 kao NREM i 2 kao REM. Broj svih tipova prelaza (0/1 – budnost/NREM; 1/0 – NREM/budnost; 0/2 – budnost/REM; 2/0 – REM/budnost; 1/2 – NREM/REM; 2/1 – REM/budnost) određen je korišćenjem jednostavnog algoritma koji je vršio identifikaciju i prebrojavanje parova kodova (Petrovic i sar., 2013a, 2013b; Lazic i sar., 2017).

Za potrebe analize dinamike epizoda, diferenciranje epoha budnosti/NREM/REM/REM1/REM2 je takođe urađeno na epohama dužine 5 s. U ovoj analizi, epizodom je smatrana svaka pojedinačna 5 s epoha (5 s epizoda) ili više uzastopnih 5 s epoha istog stanja budnosti/NREM/REM/REM1/REM2 (10 s, 15 s... epizoda). Broj i trajanje epizoda u okviru 6 h spavanja je najpre izračunato za svaku pojedinačnu životinju, a potom je izračunat srednji broj i trajanje epizoda svakog stanja za svaku eksperimentalnu grupu (Lazic i sar., 2017).

Za analizu promene EEG amplituda (EEG mikrostruktura) svih konvencionalnih frekventnih opsega ( $\delta = 0,3\text{--}4$  Hz;  $\theta = 4,1\text{--}8$  Hz;  $\sigma = 10,1\text{--}15$  Hz;  $\beta = 15,1\text{--}30$  Hz;  $\gamma = 30,1\text{--}50$  Hz), kako u toku svih faza spavanja, tako i u toku 20 min opšte anestezije operativnog nivoa, računata je grupna gustina raspodele verovatnoće relativnih amplituda na 6 sati, odnosno na 20 min u toku svake anestezije, korišćenjem PDE funkcije („Probability Density Estimation”) u MATLAB 6.5 programu. Uticaj individualnih variranja apsolutnih amplituda eliminisan je tako što su za svaki

frekventni opseg izračunate relativne Furijeove amplitude (Petrovic i sar., 2013a, 2013b; Saponjic i sar., 2013, 2016; Lazic i sar., 2015, 2017):

$$(RA)_b = \frac{\sum_b \text{Amp}}{\sum_{tot} \text{Amp}}, \quad b = \{ \delta, \theta, \sigma, \beta, \gamma \}.$$

Za svako stanje i svaki frekventni opseg, relativne amplitude svih 10 s epoha svih pacova koji pripadaju odgovarajućoj kontrolnoj ili lediranoj grupi objedinjene su u jedinstveni ansambl na koji je potom primenjena PDE analiza. Za statističku analizu grupne raspodele gustine verovatnoće na 6 sati, srednje vrednosti relativnih amplituda računane su za budnost i NREM na 60 minuta, dok su za REM, REM1 i REM2 stanje računane na 30 minuta (Petrovic i sar., 2013a, 2013b, 2014; Saponjic i sar., 2013, 2016). U slučaju grupne raspodele gustine verovatnoće u toku 20 minuta stabilnog stanja anestezije, srednje vrednosti relativnih amplituda računane su na 5 minuta (Lazic i sar., 2015, 2017).

EEG aktivnost u toku opšte anestezija operativnog nivoa, kao i u toku faza spavanja, prikazana je i EEG spektrogramima, koji su crtani korišćenjem istih parametara Furijeove analize: 10 s Furijeova epoha, koja rezultira frekventnom rezolucijom y-ose od 0,1 Hz; i sa korakom od 10 s, koji daje vremensku rezoluciju x-ose od 10 s.

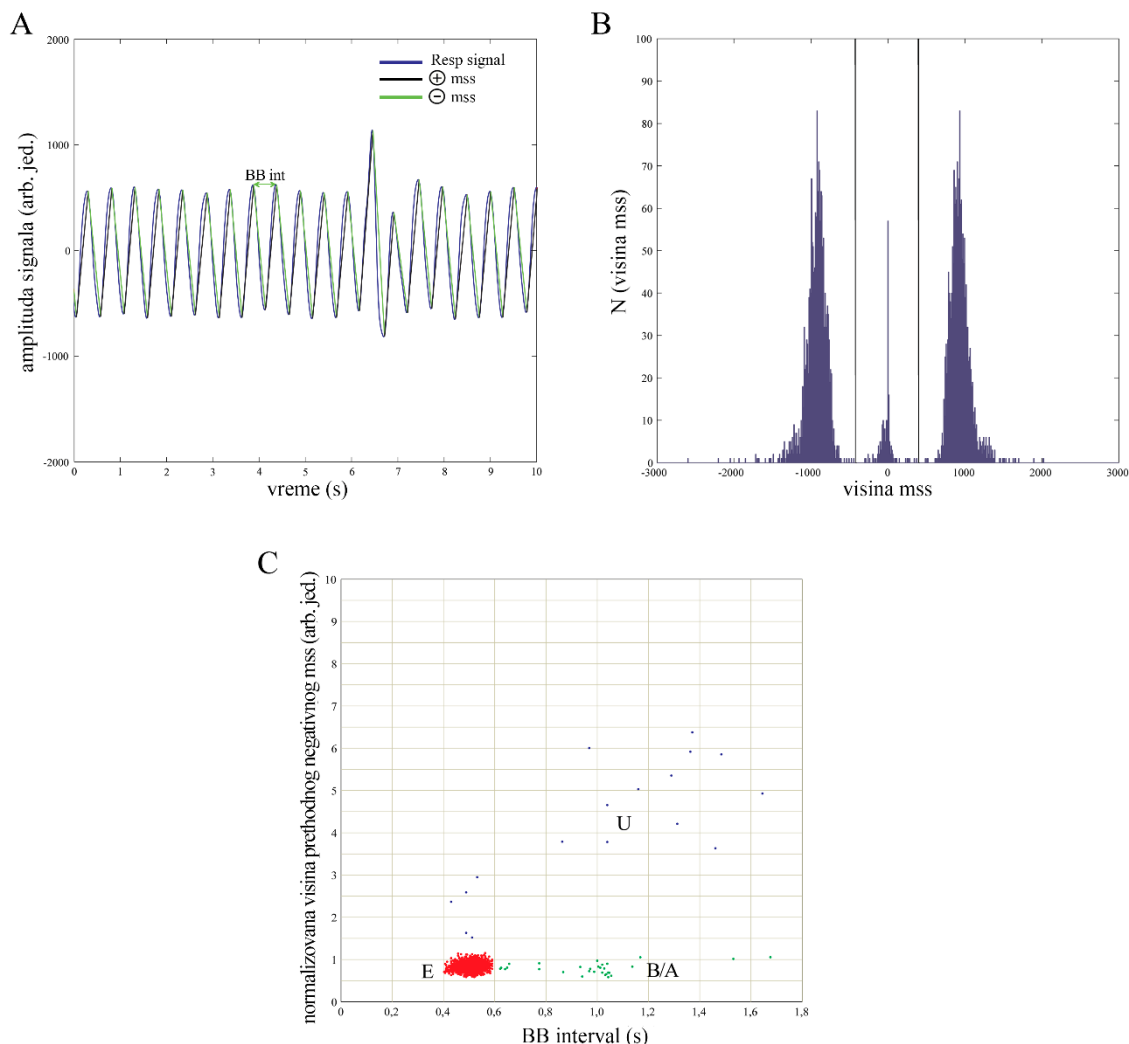
### 3.7. Analiza respiratornog signala

Respiratorni signali registrovani u toku opšte anestezije prvo su filtrirani uskopropusnim filterom 0,5 – 5 Hz, kako bi se uklonile visokofrekventne smetnje. Za detekciju respiratornih ciklusa (BB intervali, „breath-to-breath” intervali), diferencijaciju i kvantifikaciju eupnejičnih, bradipnejičnih/apnejičnih BB intervala, kao i BB intervala uzdaha u respiratornom signalu, korišćena je analiza monotonih signalnih segmenata (mss) (Bojic i sar., 2008; Lazic i sar., 2015).

Prvi korak u ovoj analizi je određivanje lokalnih ekstrema u filtriranom respiratornom signalu kako bi se definisale visine svih mss (**Slika 3.4. A**). Visina pozitivnog i negativnog mss računata je kao razlika između susednog lokalnog minimuma i maksimuma za pozitivne mss ili maksimuma i minimuma za negativne

mss. Trajanje inspirijuma definisano je trajanjem pozitivnih, ushodnih mss, dok je trajanje ekspirijuma definisano trajanjem negativnih, nishodnih mss. Kako bi se odvojili funkcionalni respiratorni ciklusi od artefakata prisutnih u respiratornom signalu, određena je kritična visina mss (kritični volumen disanja) za svaku životinju pojedinačno. Naime, najpre su konstruisani histogrami svih detektovanih visina mss (**Slika 3.4. B**). Tipični mss histogrami filtrovanog respiratornog signala su imali 3 grupisanja mss, odnosno sadržali su 3 histograma pika. Središnji pik pozicioniran je iznad malih visina mss i odgovara šumu, dok druga 2 pika predstavljaju grupisanja mss, koji potiču od faza respiratornog ciklusa, inspirijuma (pozitivnih mss) i ekspirijuma (negativnih mss). Zatim je određena kritična visina mss, odnosno granična visina mss, koja razdvaja funkcionalne mss, koji pripadaju fazama respiratornog ciklusa, od smetnji prisutnih u respiratornom signalu. Za dalju analizu BB intervala i konstruisanje grafika za razdvajanje grupisanja svih kategorija BB intervala, korišćeni su negativni mss, tj. rastojanje između njihova dva susedna lokalna maksimuma. Na graficima razdvajanja grupisanja kategorija BB intervala disanja (**Slika 3.4. C**) prikazane su normalizovane visine prethodnog negativnog mss na y-osi i trajanja BB intervala (s) na x-osi. Na bazi grupisanja BB intervala na grafiku razdvajanja, određene su granice BB intervala i njihovih normalizovanih visina kako bi se razdvojile sve kategorije BB intervala (eupneja, bradipneja/apneja i uzdasi) u okviru respiratornog obrasca. Pored analize frekvencije disanja, računati su i srednje vrednosti trajanja BB intervala, inspirijuma ( $T_I$ ) i ekspirijuma ( $T_E$ ), kao i koeficijenti varijacije (CV) obe faze respiratornog ciklusa svake kategorije BB intervala. Svi respiratorni parametri računati su na 5 minuta za dalju statističku analizu.

Pored parametara respiratornog ciklusa, izračunavano je takođe i efektivno inspiratorno vreme („duty cycle”), koje predstavlja meru stabilnosti gornjeg disajnog puta (povećanje efektivnog inspiratornog vremena može da nadomesti delimičnu opstrukciju disajnog puta). Efektivno inspiratorno vreme je računato kao količnik vremena trajanja inspirijuma i BB intervala (Eikermann i sar., 2012; Lazić i sar., 2015).



**Slika 3.4. Analiza respiratornog signala.** Određivanje pozitivnih i negativnih monotonih signalnih segmenata (mss) iz filtriranog respiratornog (Resp) signala (**A**); tipičan primer histograma broja i visina mss sa prikazom izdvajanja kritičnih visina mss (**B**); grafik razdvajanja grupisanja kategorija BB intervala: E – eupneja, B/A – bradipneja/apneja, U – uzdasi (**C**).

### 3.8. Statistička obrada podataka

Kako u prethodnim istraživanjima (Petrovic i sar, 2013a) nije bilo statistički značajnih razlika u arhitekturi spavanja i EEG mikrostrukturi svih faza spavanja u poređenju fizioloških kontrola i unilateralnih i bilateralnih lažnih lezija (unilateralna i bilateralna mikroinfuzija 100 nl 0,1 M PBS u PPT jedro), sva poređenja efekata lezije vršena su u odnosu na fiziološku kontrolu.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM („Standard error of mean” – standardna greška). Za statističku obradu podataka korišćena je neparametarska jednofaktorska analiza varijanse – „Kruskal-Wallis ANOVA” test, sa „Mann-Whitney-U” kontrastnim testom, korišćenjem SPSS softvera 19.0 (IBM Corporation, SAD). U svim slučajevima, razlike na nivou  $p \leq 0,05$  smatrane su statistički značajne.



## ***4. Rezultati***

#### 4.1. Histochemijska identifikacija i kvantifikacija lezije holinergičkih neurona PPT jedra

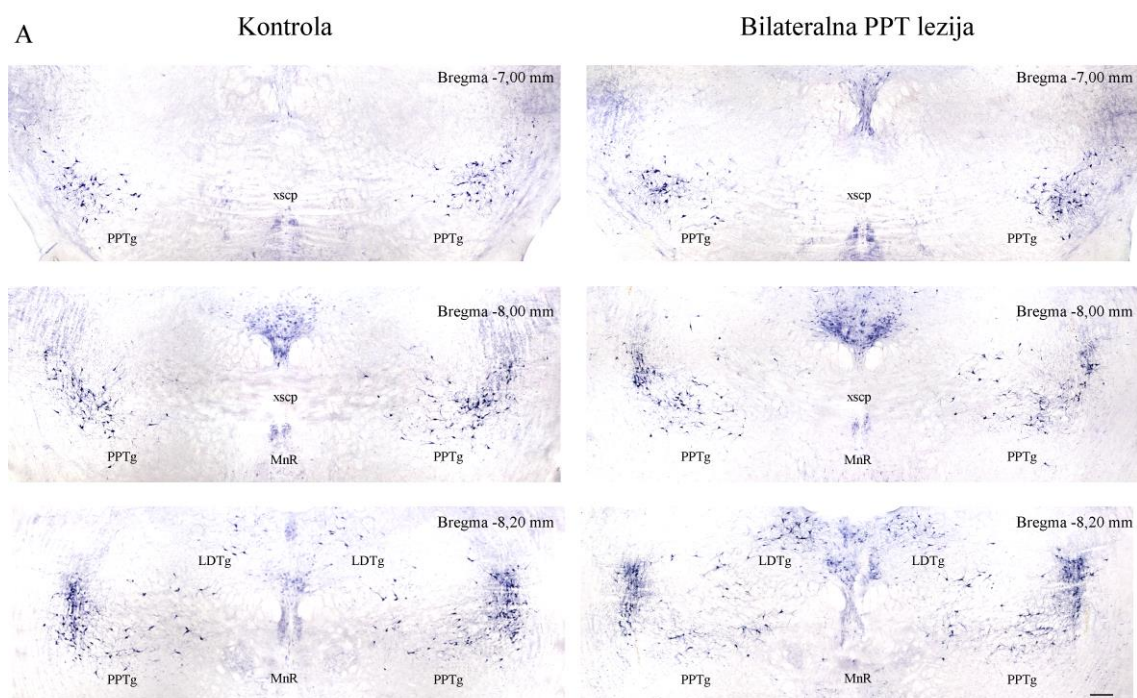
Za određivanje holinergičkog deficita PPT jedra najpre je određen kontrolni apsolutni broj NADPH – pozitivno obojenih neurona za svaki od definisanih stereotaksičkih opsega. Srednje vrednosti apsolutnog broja holinergičkih neurona PPT jedra fizioloških kontrola, koje su predstavljale 100% , bile su za stereotaksičke opsege 6,90 – 7,40; 7,50 – 8,00 i 8,10 – 8,60 mm kaudalno od bregme:  $47,70 \pm 1,12$ ;  $81,25 \pm 2,52$ ;  $103,72 \pm 2,37$  za ketamin/diazepam anesteziju, a  $51,00 \pm 1,34$ ;  $78,00 \pm 2,40$ ;  $108,62 \pm 1,67$  za pentobarbital anesteziju. Pri poređenju broja PPT holinergičkih neurona obe grupe fizioloških kontrola, korišćenih za testiranje efekta anestetika, nije bilo statistički značajnih razlika kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra ( $z \geq -1,81$ ;  $p \geq 0,07$  za sve stereotaksičke opsege).

Holinergički deficit kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra je bio jednak u obe grupe PPT lezija korišćenih za testiranje uticaja ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije (**Slika 4.1. B**;  $z \geq -1,05$ ;  $p \geq 0,29$  za sve stereotaksičke opsege).

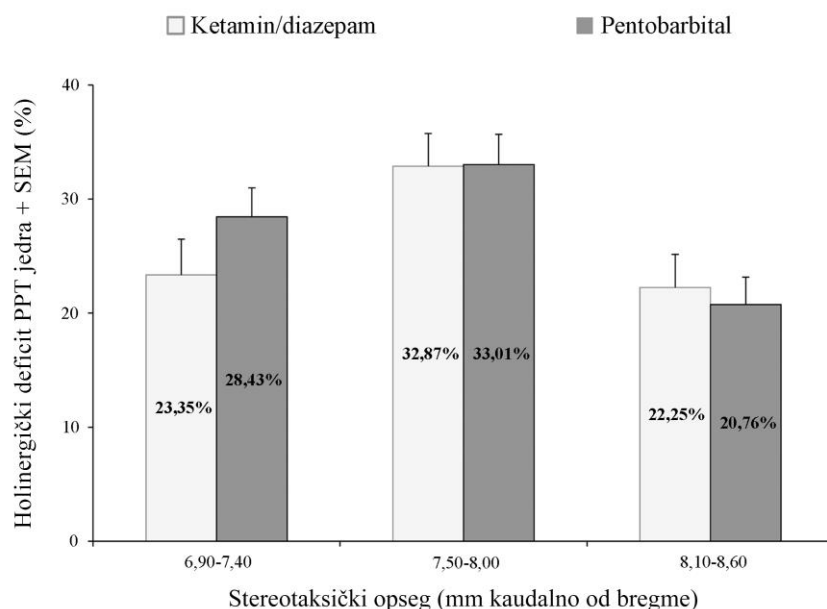
Deficit holinergičkih neurona PPT jedra kod pacova korišćenih za ispitivanje uticaja ketamin/diazepam anestezije je bio veći od  $22,25 \pm 2,89\%$  kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra, sa najvećim deficitom od  $32,87 \pm 2,88\%$  7,50 – 8,00 mm kaudalno od bregme.

Deficit holinergičkih neurona PPT jedra kod pacova korišćenih za ispitivanje uticaja pentobarbital anestezije bio je veći od  $20,76 \pm 2,39\%$  kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra, sa najvećim deficitom od  $33,01 \pm 2,66\%$  takođe 7,50 – 8,00 mm kaudalno od bregme.

**Slika 4.1. A** prikazuje tipične individualne primere histochemijske identifikacije bilateralne lezije PPT jedra u poređenju sa kontrolnim PPT jedrom u tri stereotaksička opsega, kao i grupne rezultate kvantifikacije holinergičkog deficita kroz celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju PPT jedra (**Slika 4.1. B**).



**B**

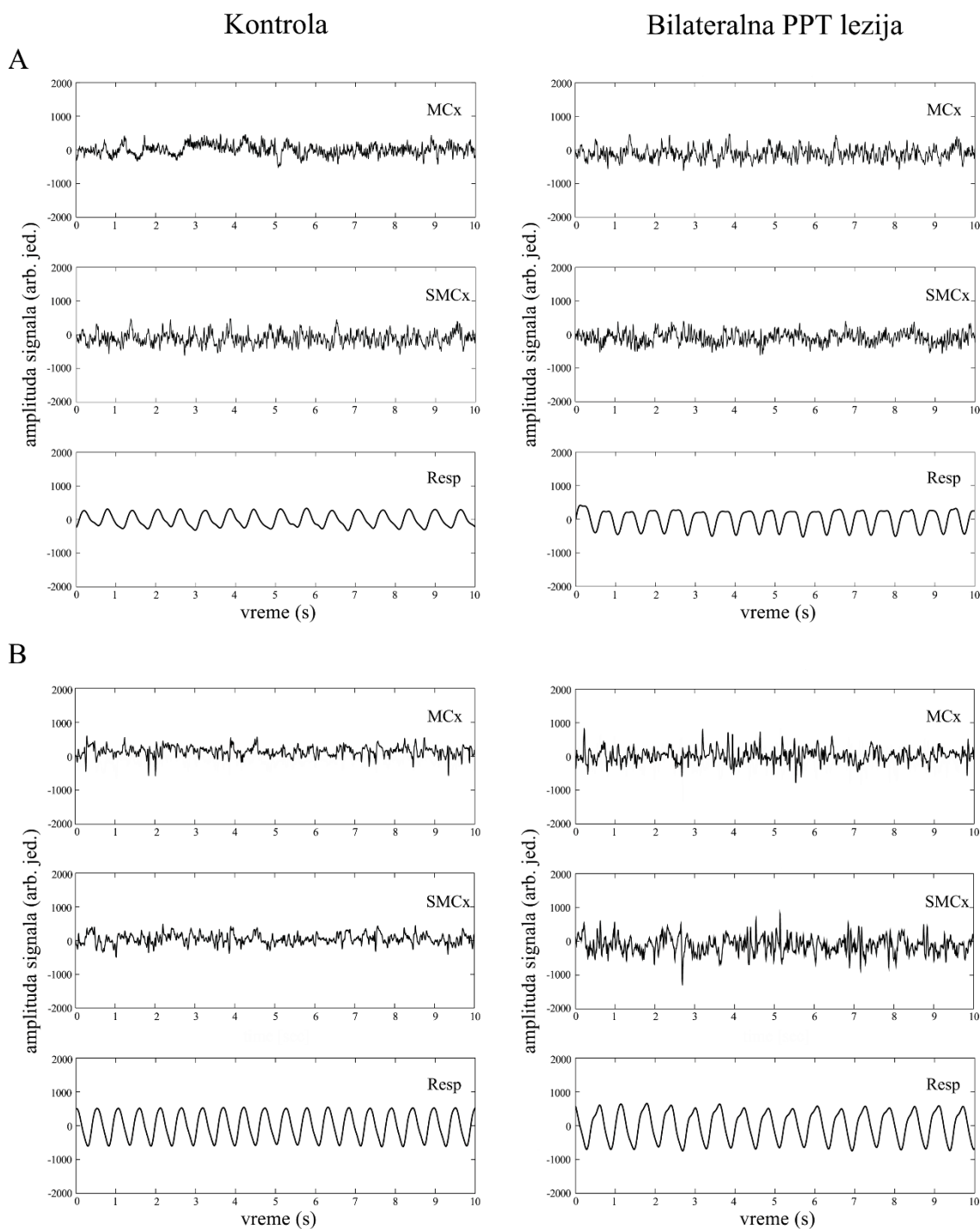


**Slika 4.1. Histohemijska identifikacija i kvantifikacija bilateralne lezije PPT jedra.** Tipičan primer histohemijske identifikacije bilateralne lezije PPT jedra u odnosu na kontrolno PPT jedro (A) i kvantifikacija holinergičkog deficita (B) u tri stereotaksička opsega. PPTg – *nc. pedunculopontinus tegmentalis*; LDTg – *nc. tegmentum laterodorsalis*; xscp – *decussatio pedunculorum cerebellarium superiorum*; MnR – *nc. raphe medianus*. Fiziološka kontrola: n = 11 za ketamin/diazepam i n = 7 za pentobarbital; Bilateralna lezija PPT jedra: n = 12 za ketamin/diazepam i n = 8 za pentobarbital. Skala 200  $\mu$ m.

## 4.2. Respiratorni obrazac i EEG mikrostruktura za vreme opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa

Petnaest dana nakon operativne procedure, istovremeno su registrovani respiratorni pokreti i EEG aktivnost tokom 20 minuta opšte ketamin/diazepam ili pentobarbital anestezije operativnog nivoa (**Slika 4.2.**). Za analizu EEG mikrostrukture korišćeni su signali motorne (MCx) i senzomotorne (SMCx) kore svih eksperimentalnih grupa: a) fiziološka kontrola za vreme ketamin/diazepam anestezije (n = 14 za MCx; n = 10 za SMCx); b) fiziološka kontrola za vreme pentobarbital anestezije (n = 10 za MCx; n = 8 za SMCx); c) bilateralna lezija PPT jedra za vreme ketamin/diazepam anestezije (n = 12 za MCx; n = 10 za SMCx); i d) bilateralna lezija PPT jedra za vreme pentobarbital anestezije (n = 9 za MCx; n = 8 za SMCx).

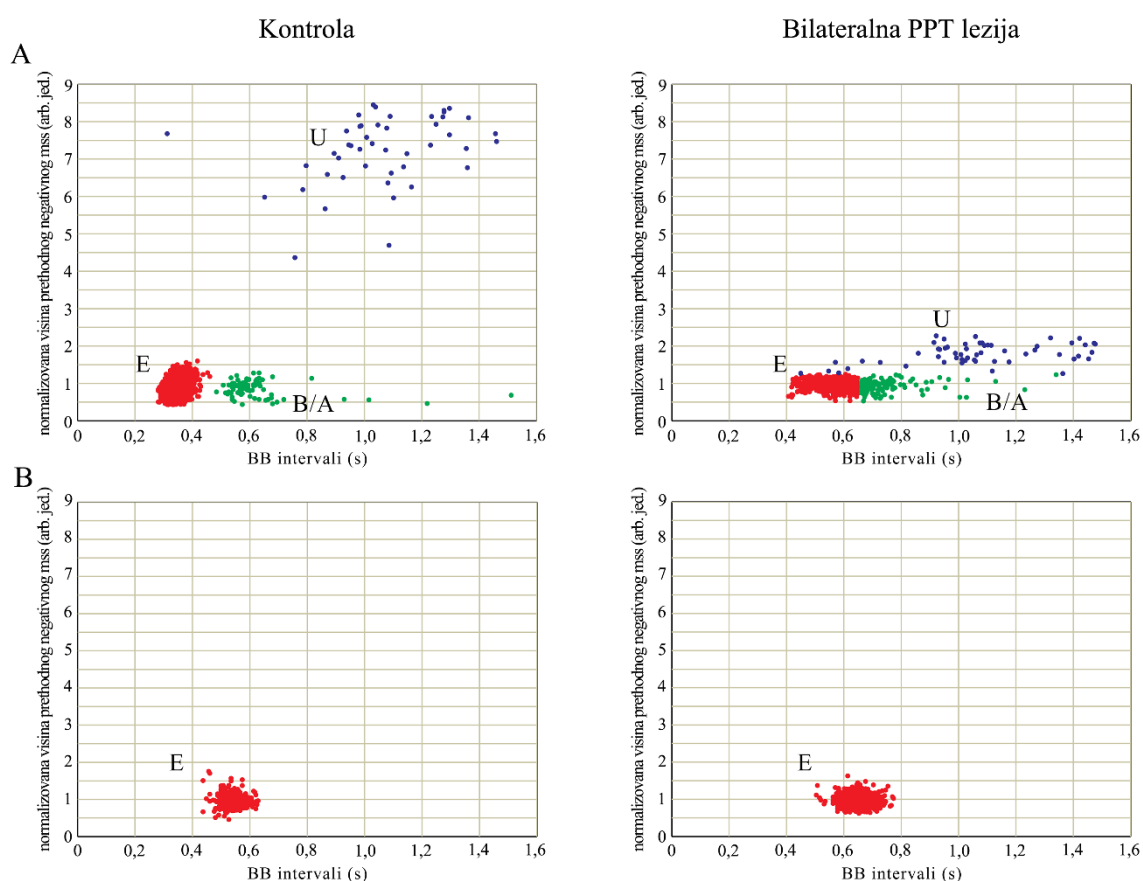
Srednje vreme  $\pm$  SEM potrebno za uspostavljanje stabilnog operativnog nivoa opšte anestezije je bilo kraće u kontrolnoj grupi sa ketamin/diazepam anestezijom ( $13,40 \pm 1,81$  min) u odnosu na kontrolne životinje sa pentobarbital anestezijom ( $24,50 \pm 3,61$  min) ( $z = -2,54$ ;  $p = 0,01$ ). Kod bilateralnih PPT lezija, vreme potrebno za uspostavljanje stabilne anestezije operativnog nivoa ketamin/diazepam anestezije se nije razlikovalo u odnosu na odgovarajuću (ketamin/diazepam) kontrolnu grupu ( $13,40 \pm 1,81$  min za kontrolu i  $12,29 \pm 12,15$  min za leziju;  $z = -0,44$ ;  $p = 0,66$ ), dok je vreme uspostavljanja stabilnog nivoa opšte pentobarbital anestezije bilo značajno produženo kod grupe sa bilateralnom lezijom PPT jedra ( $42,43 \pm 5,56$  min) u poređenju sa odgovarajućom (pentobarbital) grupom fizioloških kontrola ( $24,50 \pm 3,61$  min) ( $z = -2,20$ ;  $p = 0,03$ ).



**Slika 4.2. Primeri 10 s analognih signala u toku stabilne anestezije operativnog nivoa.** Analogni signali registrovani iz motorne (MCx) i senzomotorne (SMCx) kore i respiratorni obrazac u toku stabilne ketamin/diazepam (**A**) i pentobarbital (**B**) opšte anestezije operativnog nivoa u fiziološkoj kontroli (levi paneli) i bilateralnoj leziji PPT jedra (desni paneli). Karakterističan apneustički obrazac disanja (**A**, desni donji panel) je prisutan samo za vreme ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa.

#### 4.2.1. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na respiratorni obrazac u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole

Ketamin/diazepam anestezija je izazvala ozbiljan poremećaj respiratornog obrasca u PPT leziji (Slike 4.2. i 4.3.). U PPT leziji ketamin/diazepam anestezija je povećala broj apneustičkih bradipneja/apneja respiratornih ciklusa u poređenju sa fiziološkom kontrolom (Slika 4.4. Ba;  $z = -2,07$ ;  $p = 0,04$ ).



**Slika 4.3.** Tipični individualni primeri grafika razdvajanja grupisanja kategorija BB intervala u toku ketamin/diazepam (A) i pentobarbital (B) anestezije operativnog nivoa kod kontrole i bilateralne PPT lezije. Visina mss – volumen respiratornog ciklusa; E – grupisanje BB intervala eupneje; B/A – grupisanje BB intervala bradipneja/apneje; U – grupisanje BB intervala uzdaha.

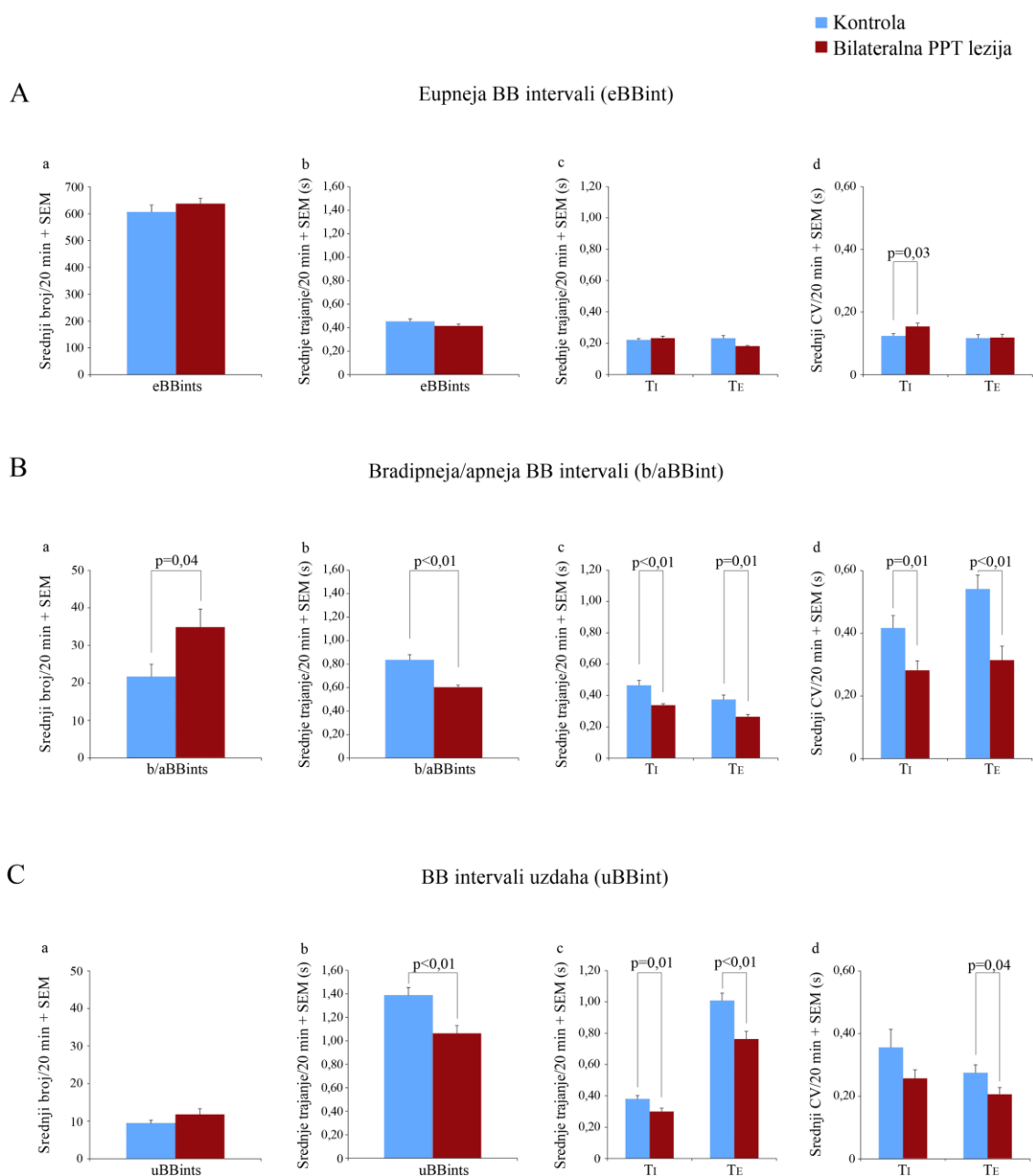
U toku 20 minuta stabilne ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa, srednji broj eupnejičnih respiratornih ciklusa, kao i srednje trajanje BB intervala,

inspirijuma ( $T_I$ ) i ekspirijuma ( $T_E$ ) eupnejičnih respiratornih ciklusa se nije razlikovalo između PPT lezije i kontrole (**Slika 4.4. Aa-c**;  $z \geq -1,12$ ;  $p \geq 0,26$ ), ali je PPT lezija izazvala povećanu varijabilnost trajanja inspirijuma (**Slika 4.4. Ad**;  $z = -2,19$ ;  $p = 0,03$ ) usled prisustva apneustičkih respiratornih ciklusa unutar eupnejične kategorije BB intervala (**Slika 4.3. A**). Srednje efektivno inspiratorno vreme („duty cycle”), koje predstavlja meru stabilnosti gornjeg disajnog puta, nije bilo različito između PPT lezije i kontrole u kategoriji eupnejičnih BB intervala (rezultati nisu prikazani;  $z = -1,12$ ;  $p = 0,26$ ).

Nasuprot eupnejičnim, u kategoriji bradipnejičnih BB intervala, lezija PPT jedra je pored povećanja broja bradipneja/apneja BB intervala, izazvala i skraćenje njihovog srednjeg trajanja zajedno sa skraćanjem srednjeg vremena trajanja i varijabilnosti obe faze respiratornog ciklusa (**Slika 4.4. Bb-d**;  $z \geq -3,57$ ;  $p \leq 0,01$ ). Sve ove promene ukazuju na stabilno uspostavljen bradipneja/apneja respiratorni obrazac u pacova sa lezijom PPT jedra, sačinjen od kraćih respiratornih ciklusa ili stabilno skraćenim trajanjem  $T_I$  i  $T_E$  (**Slika 4.4. Bc**), bez promene srednjeg efektivnog inspiratornog vremena (rezultati nisu prikazani;  $z = -1,21$ ;  $p = 0,12$ ).

PPT lezija je takođe izazvala i skraćenje srednjeg trajanja BB interavala uzdaha zajedno sa skraćanjem trajanja njihovih  $T_I$  i  $T_E$  (**Slika 4.4. Cb,c**;  $z \geq -2,97$ ;  $p \leq 0,01$ ), iako se srednji broj BB intervala uzdaha nije menjao (**Slika 4.4. Ca**;  $z = -0,55$ ;  $p = 0,58$ ). Ovo skraćenje respiratornih ciklusa uzdaha tokom ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra, bilo je praćeno stabilnim, značajno kraćim trajanjem  $T_E$  (**Slika 4.4. Cd**;  $z = -2,02$ ;  $p = 0,04$ ), ali bez promena u srednjem efektivnom inspiratornom vremenu (rezultati nisu prikazani;  $z = 0,00$ ;  $p = 1,00$ ).

## Respiratorni obrazac



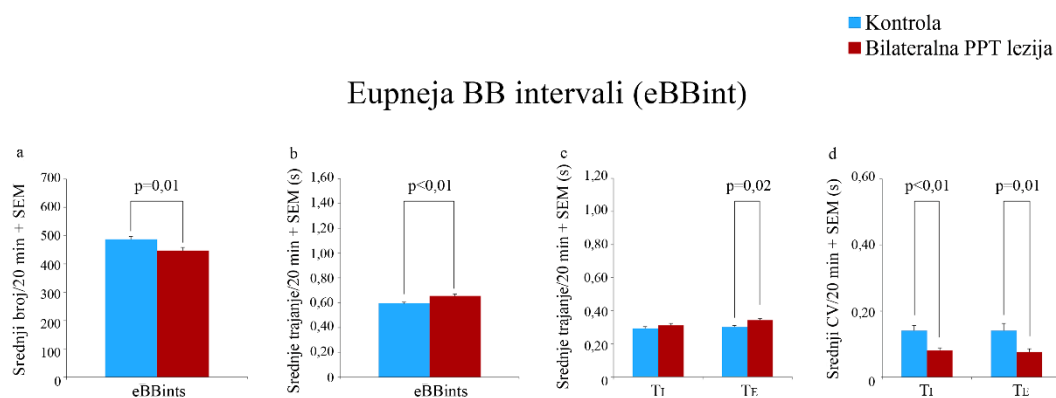
**Slika 4.4. Poremećaj respiratornog obrasca u toku ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa kod pacova sa lezijom PPT jedra.** Srednje vrednosti + SEM respiratornih parametara: broj BB intervala (a), trajanje BB intervala (b),  $T_I$  i  $T_E$  trajanje (c) i koeficijenti varijacije (CV) (d) za eupneju (A), bradipneja/apneju (B) i uzdahe (C) u toku 20 minuta opšte ketamin/diazepam anestezije u kontrolnih pacova i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (n = 10 za kontrolne pacove; n = 10 za pacove sa bilateralnom lezijom PPT jedra). p – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



Analiza respiratornog obrasca je pokazala da je za vreme pentobarbital anestezije operativnog nivoa prisutno isključivo eupnejično disanje (**Slika 4.3. B**). Nasuprot ketamin/diazepam anesteziji, pentobarbital anestezija je u PPT leziji izazvala smanjenje broja eupnejičnih respiratornih ciklusa sa produženim srednjim trajanjima BB intervala i  $T_E$ , paralelno sa padom varijabilnosti trajanja  $T_I$  i  $T_E$  (**Slika 4.5. a-d**;  $z \geq -3,11$ ;  $p \leq 0,02$ ).

Pentobarbital anestezija nije promenila srednje efektivno inspiratorno vreme kod pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na kontrole (rezultati nisu prikazani;  $z = 1,00$ ;  $p = 1,00$ ). Takođe, efektivno inspiratorno vreme se nije promenilo ni kod kontrolnih grupa (rezultati nisu prikazani;  $z = -4,29$ ;  $p = 0,67$ ). Ipak, kod pacova sa lezijom PPT jedra srednje efektivno inspiratorno vreme bilo je značajno skraćeno za vreme pentobarbital anestezije u odnosu na ketamin/diazepam anesteziju operativnog nivoa ( $0,47 \pm 0,03$  za pentobarbital;  $0,56 \pm 0,02$  za ketamin/diazepam; rezultati nisu prikazani;  $z = -2,07$ ;  $p = 0,04$ ).

## Respiratorni obrazac

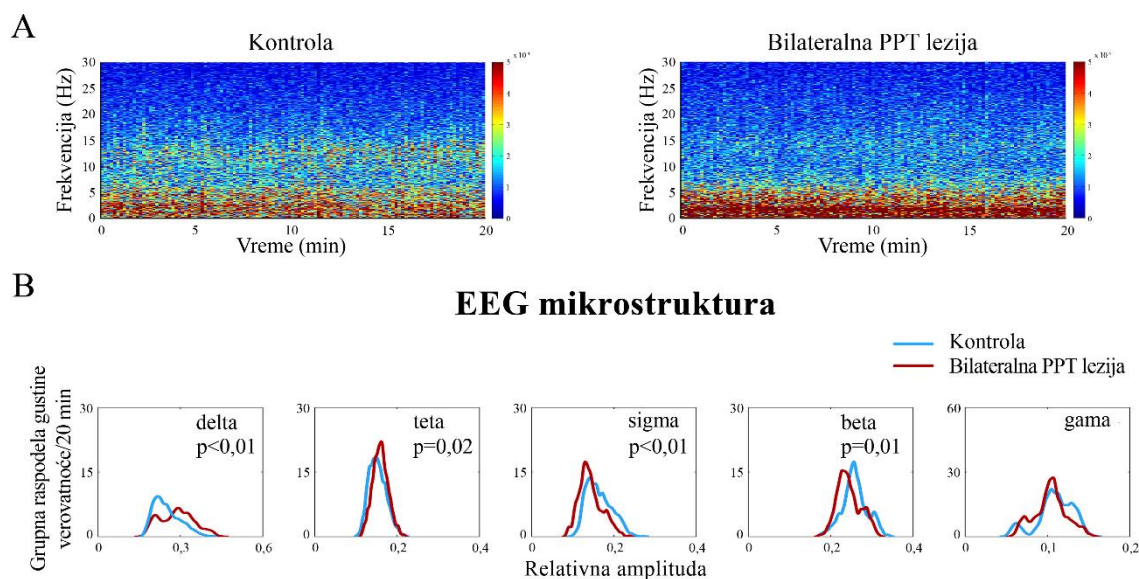


**Slika 4.5. Poremećaj respiratornog obrasca u toku pentobarbital anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra.** Srednje vrednosti + SEM respiratornih parametara: broj BB intervala (**a**), trajanje BB intervala (**b**),  $T_I$  i  $T_E$  trajanje (**c**) i koeficijenti varijacije (CV) (**d**) za eupneju u toku 20 minuta opšte pentobarbital anestezije operativnog nivoa u kontrolnih pacova i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra ( $n = 8$  za kontrolne pacove;  $n = 8$  za pacove sa bilateralnom lezijom PPT jedra).  $p$  – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

## 4.2.2. EEG mikrostruktura za vreme stabilne opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole

### 4.2.2.1. EEG mikrostruktura senzomotorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa

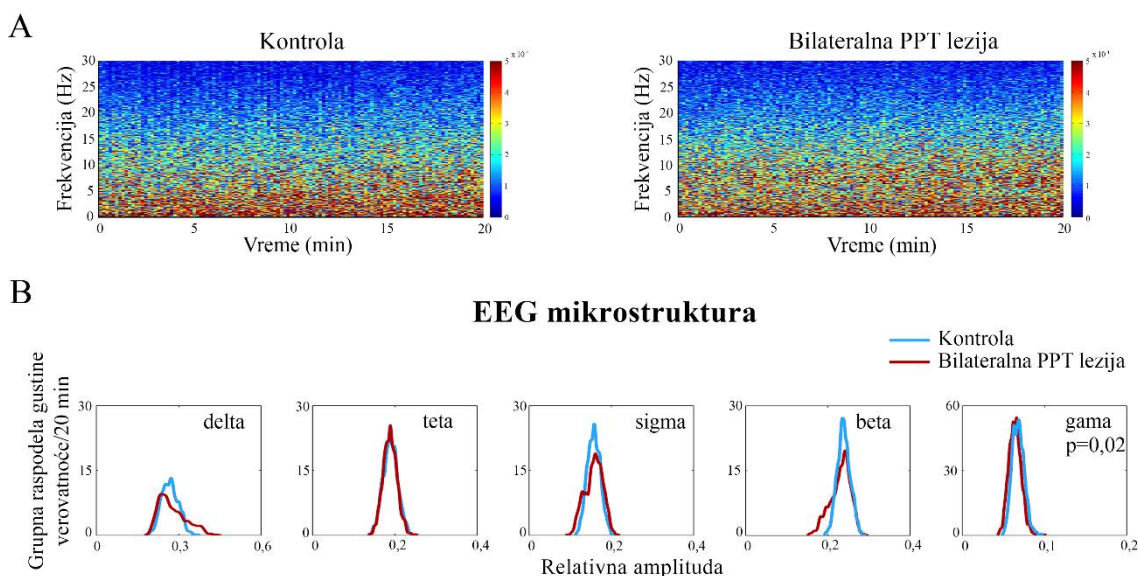
Pored promena u respiratornom obrascu (Slika 4.4.), ketamin/diazepam anestezija je značajno izmenila EEG mikrostrukturu senzomotorne kore (Slika 4.6.) kod pacova sa lezijom PPT jedra. Ketamin/diazepam anestezija je kod ovih pacova povećala delta i teta relativne amplitude (Slika 4.6. B;  $z \geq -2,87$ ;  $p \leq 0,02$ ) i smanjila sigma i beta relativne amplitude (Slika 4.6. B;  $z \geq -3,16$ ;  $p \leq 0,01$ ). Tipični individualni primeri EEG spektrograma senzomotorne kore u fiziološkoj kontroli i kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra u toku 20 minuta stabilne ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa su prikazani na slici 4.6. A.



**Slika 4.6. EEG aktivnost senzomotorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa.** Individualni primeri EEG spektrograma za vreme ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa u kontrolnog pacova i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (A), kao i grupni rezultati EEG mikrostrukture (B) u toku 20 minuta opšte ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa ( $n = 10$  za kontrolne pacove;  $n = 10$  za pacove sa bilateralnom lezijom PPT jedra).  $p$  – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

#### 4.2.2.2. EEG mikrostruktura senzomotorne kore za vreme stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa

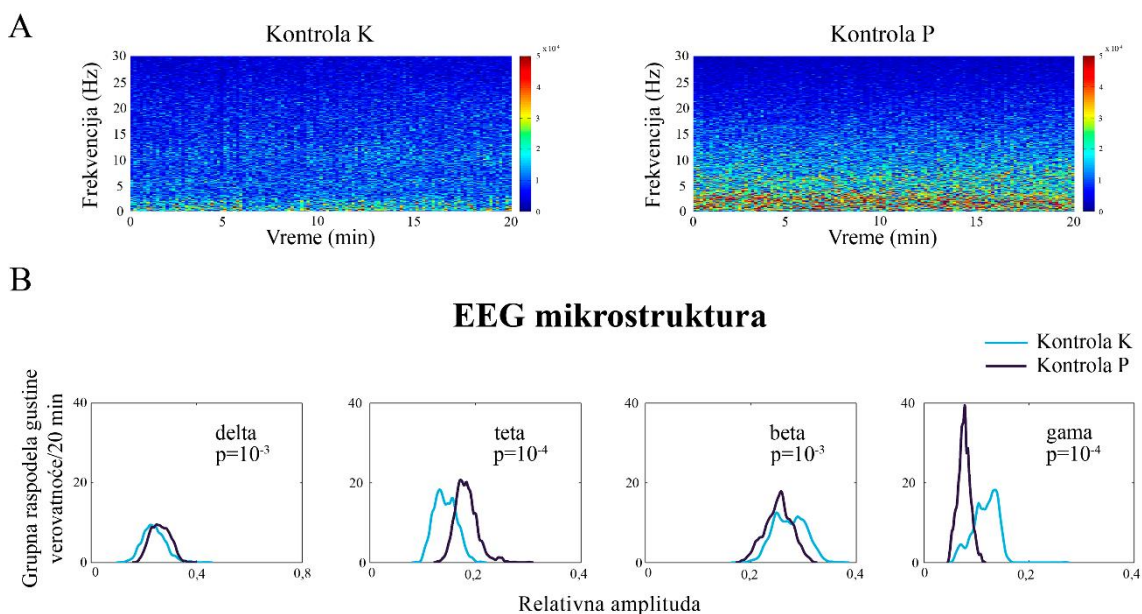
Analiza EEG mikrostrukture senzomotorne kore u toku opšte pentobarbital anestezije je pokazala da je istovremeno sa promenama u respiratornom obrascu (Slika 4.5.) pentobarbital anestezija izazvala smanjenje gama relativne amplitude kod pacova sa lezijom PPT jedra (Slika 4.7. B;  $z = -2,39$ ;  $p = 0,02$ ). Tipični individualni primeri EEG spektrograma senzomotorne kore fiziološke kontrole i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra za vreme 20 minuta stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa su prikazani na slici 4.7. A.



**Slika 4.7. EEG aktivnost senzomotorne kore za vreme stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa.** Individualni primeri EEG spektrograma kore za vreme pentobarbital anestezije operativnog nivoa u kontrolnog pacova i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (A), kao i grupni rezultati EEG mikrostrukture kore (B) u toku 20 minuta opšte pentobarbital anestezije operativnog nivoa ( $n = 8$  za kontrolne pacove;  $n = 8$  za pacove sa lezijom PPT jedra).  $p$  – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

### 4.2.2.3. EEG mikrostruktura motorne kore u toku opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa kod fizioloških kontrola

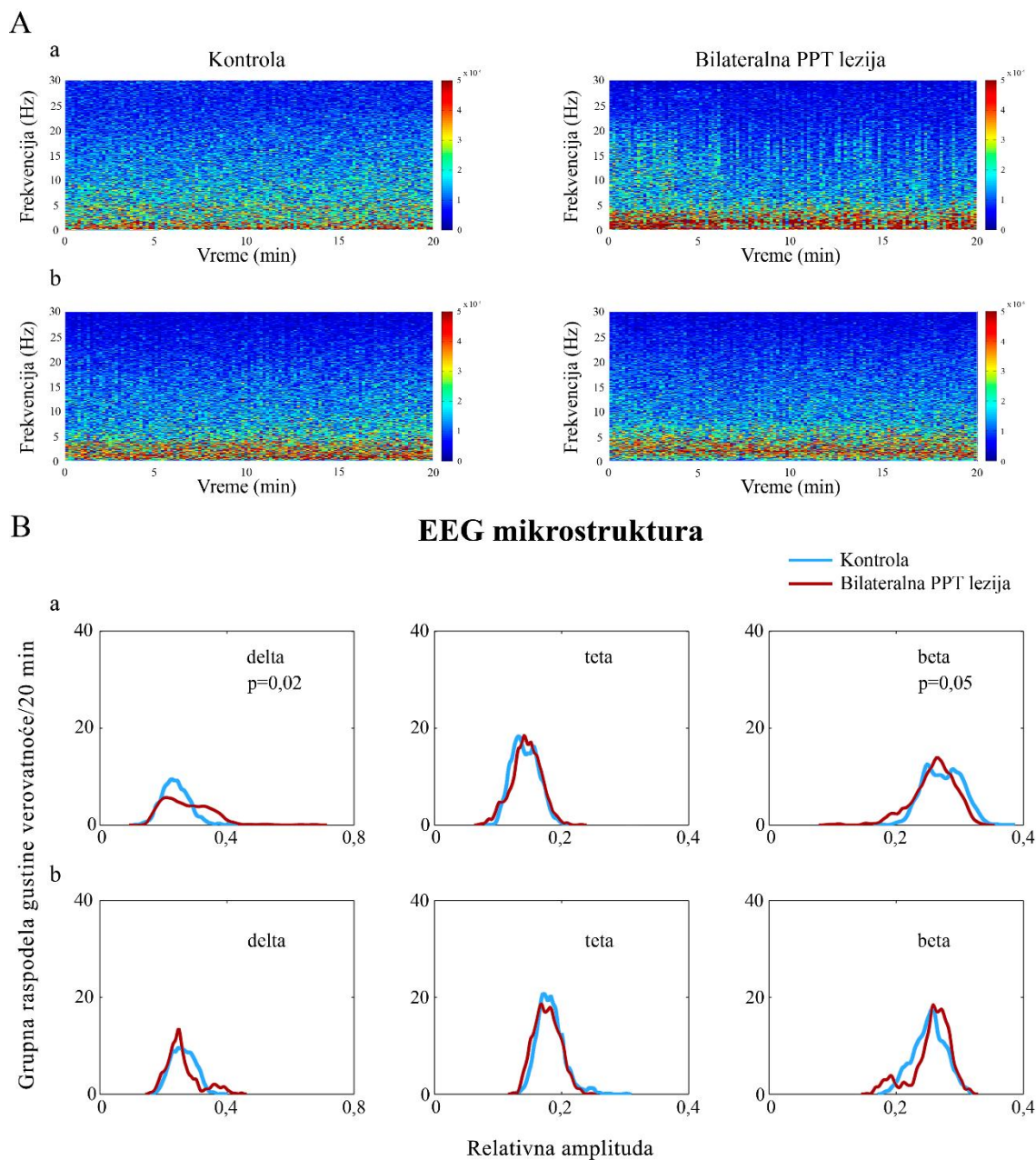
EEG mikrostruktura motorne kore fizioloških kontrola se značajno razlikovala u toku ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije. Relativne amplitude delta i teta frekventnog opsega su bile veće ( $z \geq -7,71$ ;  $p \leq 10^{-3}$ ), dok su beta i gama relativne amplitude bile manje ( $z \geq -6,95$ ;  $p \leq 10^{-3}$ ) u toku opšte pentobarbital anestezije u odnosu na ketamin/diazepam opštu anesteziju operativnog nivoa (Slika 4.8. B). Ove razlike u EEG mikrostrukturi prikazane su na tipičnim primerima spektrograma motorne kore (Slika 4.8. A), kao i grupnim rezultatima (Slika 4.8. B) za obe anestezije.



**Slika 4.8. EEG aktivnost motorne kore fizioloških kontrola tokom različitih stabilnih anestezija operativnog nivoa.** Stabilno stanje opšte anestezije prikazano je tipičnim individualnim spektrogramima (A) grupnih rezultata (B). Grupna raspodela gustine verovatnoće delta, teta, beta i gama relativnih amplituda/20 min opšte anestezije (B) u kontrolnih pacova za vreme ketamin/diazepam (Kontrola K;  $n = 14$ ) i pentobarbital (Kontrola P;  $n = 10$ ) anestezije. Izmeštanje distribucije u desnu stranu prikazuje statistički značajno povećanje delta i teta amplitude, dok izmeštanje distribucije u levu stranu prikazuje statistički značajno smanjenje beta i gama relativnih amplituda.  $p$  – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

#### **4.2.2.4. EEG mikrostruktura motorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra**

U toku 20 minuta opšte pentobarbital anestezije, EEG mikrostruktura motorne kore kontrolnih pacova i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra se nije razlikovala (**Slika 4.9. Bb**;  $z \geq -1,53$ ;  $p \geq 0,13$  za delta, teta i beta relativnu amplitudu). Sa druge strane, u toku 20 minuta opšte ketamin/diazepam anestezije u pacova sa PPT lezijom je došlo do povećanja delta amplitude (**Slika 4.9. Ba**;  $z = -2,38$ ;  $p = 0,02$ ) i smanjenja beta amplitude (**Slika 4.9. Ba**;  $z = -1,97$ ;  $p = 0,05$ ). Tipični individualni primeri EEG spektrograma motorne kore fiziološke kontrole i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra u toku 20 minuta stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa prikazani su na **Slici 4.9. Aa,b**.



**Slika 4.9. EEG aktivnost motorne kore za vreme stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa.** Tipični individualni primeri EEG spektrograma motorne kore, kao i grupni rezultati EEG mikrostrukture motorne kore kontrolnih pacova ( $n = 14$  za ketamin/diazepam;  $n = 10$  za pentobarbital) i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra ( $n = 12$  za ketamin/diazepam;  $n = 9$  za pentobarbital) u toku 20 minuta ketamin/diazepam (**Aa**, **Ba**) i pentobarbital (**Ab**, **Bb**) anestezije. Izmeštanje distribucije u desnu stranu prikazuje statistički značajno povećanje delta amplitude, dok izmeštanje distribucije u levu stranu prikazuje statistički značajno smanjenje beta relativne amplitude za vreme ketamin/diazepam anestezije u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra.  $p$  – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

### **4.3. Uticaj stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu senzomotorne kore nakon anestezije u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na fiziološke kontrole**

#### **4.3.1. Arhitektura spavanja i EEG mikrostruktura senzomotorne kore nakon ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa**

Iako je arhitektura spavanja senzomotorne kore bila nepromenjena, kako pre uvođenja u anesteziju, tako i 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije između kontrolnih pacova i pacova sa lezijom PPT jedra (rezultati nisu prikazani;  $\chi^2 \geq 3,83$ ;  $p \geq 0,12$ ;  $z \geq -1,64$ ;  $p \geq 0,10$ ), EEG mikrostruktura senzomotorne kore za vreme NREM faze spavanja se razlikovala pre uvođenja u anesteziju (**Slika 4.10.** kolona Pre). Do promena u NREM mikrostrukturi pre anestezije doveo je holinergički deficit iz PPT jedra, odnosno došlo je do pada NREM delta ( $z = -4,18$ ;  $p < 0,01$ ) i porasta NREM teta, sigma i beta relativnih amplituda ( $z \geq -4,54$ ;  $p \leq 0,04$ ).

U senzomotornoj kori, ketamin/diazepam anestezija nije promenila EEG mikrostrukturu budnosti, ali je dovela do poremećaja NREM i REM EEG mikrostrukture od 48 h do 6 dana nakon anestezije kod bilateralne lezije PPT jedra (**Slike 4.10.** i **4.11.**).

Sve promene u NREM EEG mikrostrukturi prouzrokovane lezijom PPT jedra poništene su već 48 h nakon ketamin/diazepam anestezije (**Slika 4.10.** kolona K 48 h;  $z \geq -1,94$ ;  $p \geq 0,05$ ), odnosno došlo je do smanjenja teta, sigma i beta relativnih amplituda i do povećanja delta relativne amplitude. Iako se vrednosti NREM delta i sigma amplitude vraćaju na vrednosti koje su imale pre anestezije (**Slika 4.10.** kolona K 6 d;  $z \geq -4,27$ ;  $p \leq 0,01$ ), smanjenje teta i beta relativnih amplituda se održalo 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa (**Slika 4.10.** kolona K 6 d;  $z \geq -1,50$ ;  $p \geq 0,14$ ) u PPT leziji.

Sa druge strane, nakon 48 h od ketamin/diazepam anestezije REM EEG mikrostruktura je bila promenjena kod bilateralne lezije PPT jedra (**Slika 4.11.**), odnosno došlo je do porasta sigma, a smanjenja beta i gama relativnih amplituda (**Slika 4.11.** kolona K 48 h;  $z \geq -3,35$ ;  $p \leq 0,01$ ). Međutim, sve promene u REM EEG

mikrostrukturni se vraćaju na vrednosti koje su imale pre anestezije, 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije (**Slika 4.11.** kolona K 6 d;  $z \geq -1,85$ ;  $p \geq 0,07$ ), kada je takođe došlo i do povećanja teta amplituda (**Slika 4.11.** kolona K 6 d;  $z = -1,98$ ;  $p = 0,04$ ).

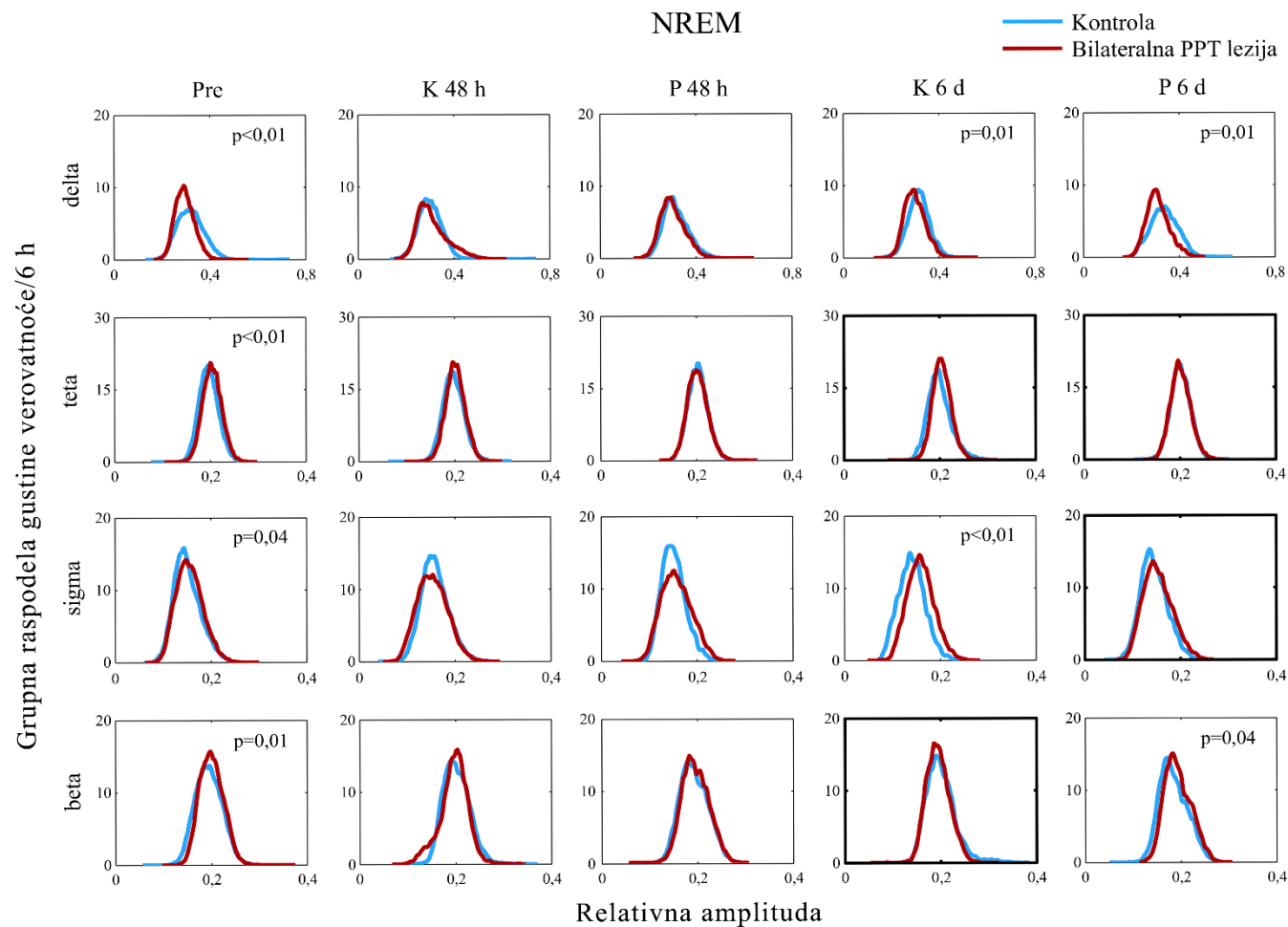
Na **slici 4.12.** prikazani su tipični individualni primeri EEG spektrograma šestočasovnog spavanja pre (**Slika 4.12. Aa, Ba**) i 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije operativnog nivoa (**Slika 4.12. Ca, Da**) u kontroli (**Slika 4.12. Aa, Ca**) u poređenju sa PPT lezijom (**Slika 4.12. Ba, Da**). Takođe su na ovoj slici prikazane i odgovarajuće 10 s epohe budnosti, NREM i REM stanja (**Slika 4.12. Ab, Bb, Cb, Db**) koje su izdvojene i objedinjene u spektrogramima istim redosledom kako su se pojavljivale u šestočasovnom signalu.

#### **4.3.2. Arhitektura spavanja i EEG mikrostruktura senzomotorne kore nakon pentobarbital anestezije operativnog nivoa**

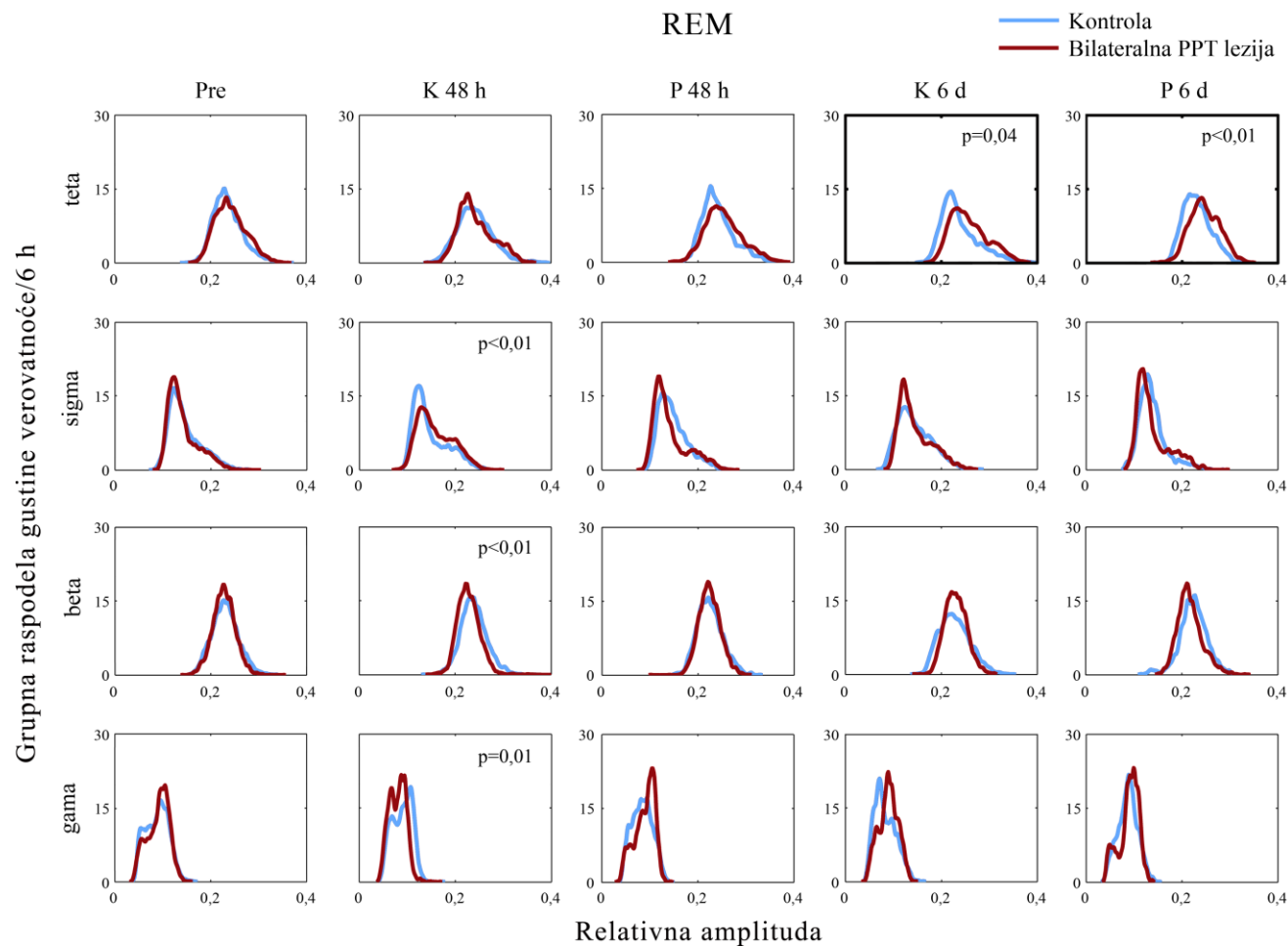
Poređenjem rezultata kontrolne grupe i grupe sa lezijom PPT jedra ustanovljeno je da se arhitektura spavanja nakon pentobarbital anestezije nije menjala 48 h i 6 dana nakon anestezije (rezultati nisu prikazani;  $\chi^2 \geq 6,24$ ;  $p \geq 0,12$ ;  $z \geq 1,87$ ;  $p \geq 0,06$ ). Pentobarbital anestezija je privremeno (48 h nakon anestezije) smanjila teta amplitudu budnosti (rezultati nisu prikazani;  $z = -3,12$ ;  $p < 0,01$ ) i poništila sve razlike u NREM EEG mikrostrukturni između kontrole i PPT lezije koje su bile prisutne pre anestezije (**Slika 4.10.** kolona P 48 h;  $z \geq -1,48$ ;  $p \geq 0,14$ ). Supresivni efekat pentobarbitala na teta i sigma relativnu amplitudu trajao je sve do 6 dana nakon anestezije (**Slika 4.10.** kolone Pre, P 48 h i P 6 d;  $z \geq -1,68$ ;  $p \geq 0,06$ ), dok su se vrednosti NREM delta i beta relativnih amplituda vratile na vrednosti koje su imale pre anestezije (**Slika 4.10.** P 6 d kolona;  $z \geq -2,45$ ;  $p \leq 0,04$ ).

Pentobarbital anestezija je izazvala povećanje REM teta amplitude kod PPT lezije tek nakon 6 dana (**Slika 4.11.** P 6 d kolona;  $z = -3,06$ ;  $p < 0,01$ ).

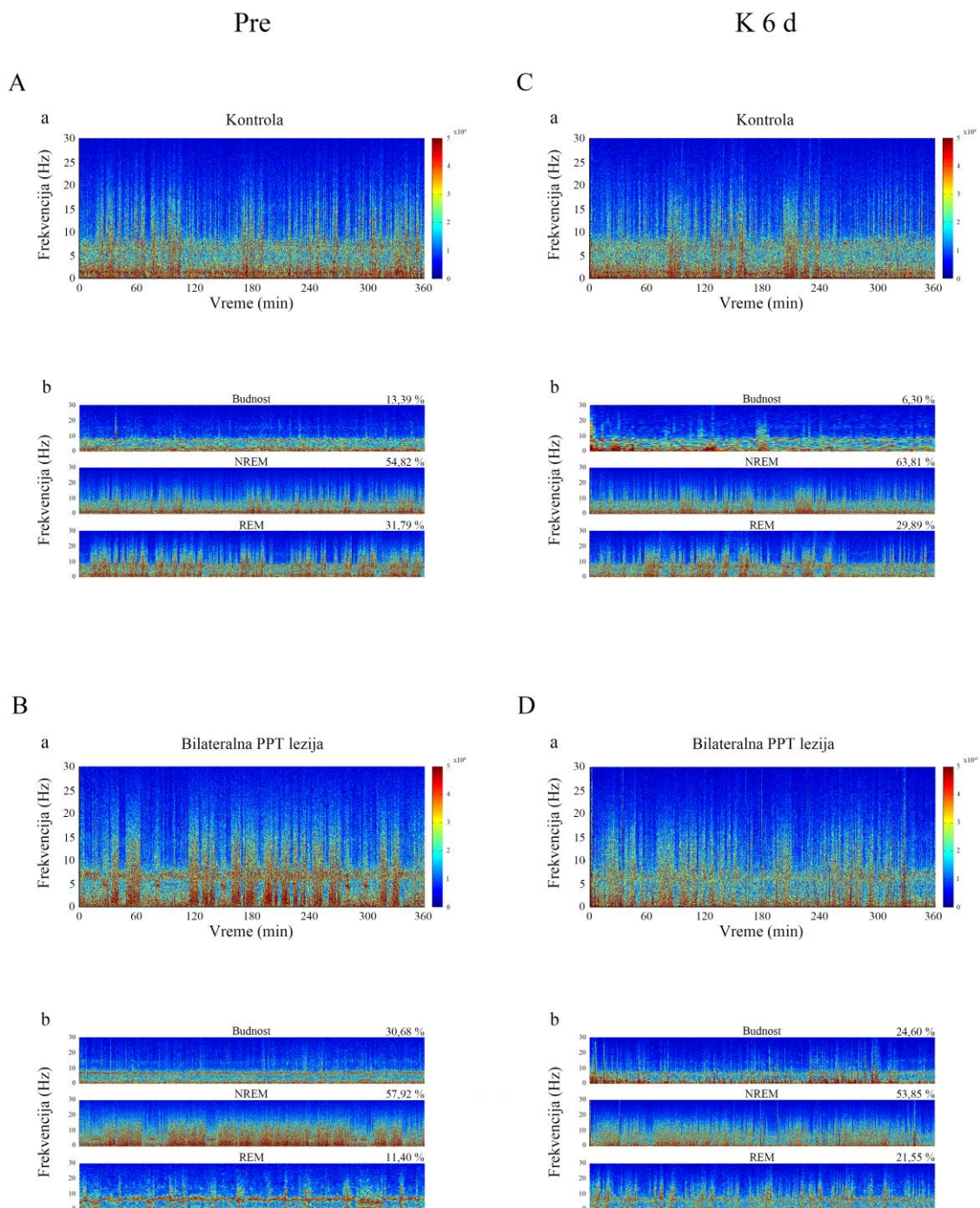




**Slika 4.10. EEG mikrostruktura NREM spavanja pre i nakon anestezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih amplituda/6 h pre (Pre), 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam (K 48 h i K 6 d) ili pentobarbital (P 48 h i P 6 d) anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra (n = 10 za ketamin/diazepam; n = 8 za pentobarbital) u odnosu na fiziološke kontrole (n = 10 za ketamin/diazepam; n = 10 za pentobarbital). p – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



**Slika 4.11. EEG mikrostruktura REM spavanja pre i nakon anestezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih amplituda/6 h pre (Pre), 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam (K 48 h i K 6 d) ili pentobarbital (P 48 h i P 6 d) anestezije operativnog nivoa u pacova sa lezijom PPT jedra (n = 10 za ketamin/diazepam; n = 8 za pentobarbital) u odnosu na fiziološke kontrole (n = 10 za ketamin/diazepam; n = 10 za pentobarbital). p – vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

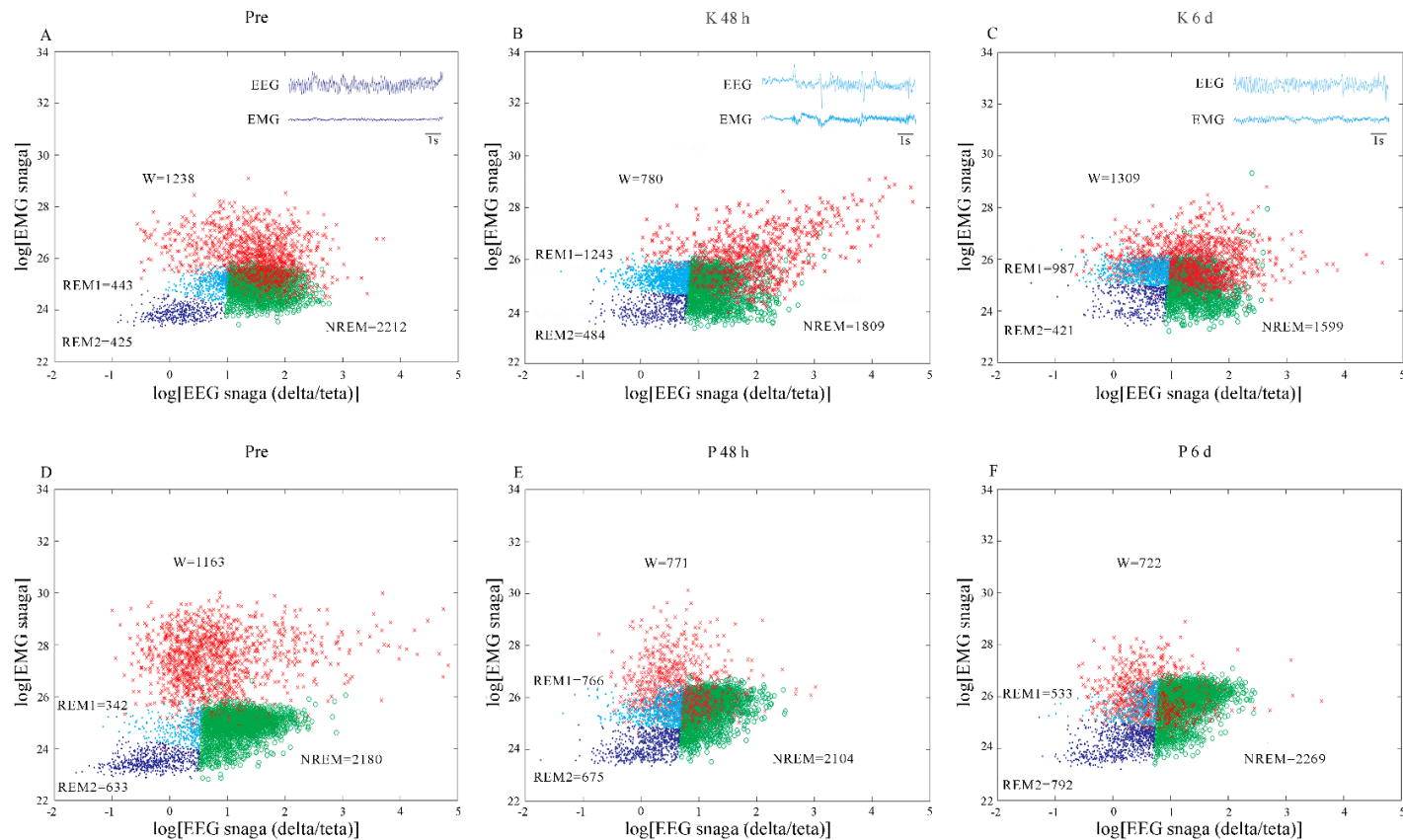


**Slika 4.12. Spektrogrami šestočasovnog spavanja pre i nakon ketamin/diazepam anestezije.** Tipični individualni spektrogrami spavanja pre (**Pre**, **Aa**, **Ba**) i 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije (**Ca**, **Da**) u kontrolnog pacova (**Aa**, **Ca**) i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (**Ba**, **Da**). Odgovarajuće 10 s epohe budnosti, NREM i REM stanja su izdvojene i objedinjene istim redosledom kako su se pojavljivale u šestočasovnom signalu sa procentualno izraženim trajanjem budnosti, NREM i REM stanja (**Ab**, **Bb**, **Cb**, **Db**).

#### **4.4. Poremećaj REM spavanja u motornoj kori nakon stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa**

##### **4.4.1. Arhitektura spavanja, dinamika budnost/NREM/REM/REM1/REM2 epizoda spavanja i struktura prelaznih stanja u toku spavanja u motornoj kori nakon anestezije kod fizioloških kontrola – poređenje ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije**

Ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa je i nakon 48 sati i nakon 6 dana izazvala produženje REM1 stanja (REM sa većim tonusom mišića) u motornoj kori (Slika 4.13. B, C). Na slici 4.13. A-C pored finalnih grafika razdvajanja grupisanja faza spavanja, pre i nakon ketamin/diazepam anestezije, prikazani su i tipični primeri 10 s analognih EEG i EMG signala koji predstavljaju dominantno REM stanje.



**Slika 4.13. Tipični primeri finalnih grafika razdvajanja grupisanja faza spavanja pre i nakon anestezije.** Diferencijacija budnosti/NREM/REM/REM1/REM2 tokom 6 sati spavanja iz motorne kore fizioloških kontrola pre, 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam (A, B, C; K) ili pentobarbital anestezije (D, E, F; P). Epohe budnosti prenete su u finalni grafik razdvajanja grupisanja iz prethodnog razdvajanja budnost/spavanje. Svaki simbol predstavlja jednu epohu trajanja 5 s: budnost W grupisanje – krstići, NREM grupisanje – kružići; REM1/REM2 grupisanje – tačke. EEG i EMG analogni signali trajanja 10 s prikazuju REM2 stanje (REM sa atonijom) pre ketamin/diazepam anestezije (A) i 10 s REM1 stanja (REM sa većim mišićnim tonusom) 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije (B, C).

Ketamin/diazepam anestezija je produžila trajanje REM faze spavanja ( $\chi^2 = 8,71$ ;  $p = 0,01$ ) na račun konzistentnog produženja trajanja REM1, odnosno REM stanja sa većim mišićnim tonusom (**Tabela 1**;  $\chi^2 = 12,71$ ;  $p = 0,002$ ;  $z \geq -2,83$ ;  $p \leq 0,01$ ). Ove promene REM faze spavanja praćene su skraćanjem NREM faze spavanja (**Tabela 1**;  $\chi^2 = 6,08$ ;  $p = 0,05$ ;  $z = -2,12$ ;  $p = 0,03$ ) 6 dana nakon anestezije.

Pored promena u arhitekturi spavanja, dugotrajni efekat ketamin/diazepam anestezije na REM spavanje naglašen je promenama u dinamici REM epizoda (**Tabela 1**; **Slika 4.14.**). Obzirom da broj REM epizoda konstantno raste sve do 6 dana nakon anestezije ( $\chi^2 = 10,25$ ;  $p = 0,01$ ;  $z \geq -2,69$ ;  $p \leq 0,02$ ), do produženja REM faze spavanja 48 h nakon anestezije došlo je samo usled povećanja broja REM1 epizoda ( $\chi^2 = 9,00$ ;  $p = 0,01$ ;  $z = -2,44$ ;  $p = 0,02$ ). Sa druge strane, 6 dana nakon anestezije produženje REM faze spavanja je bilo uslovljeno povećanjem broja ( $\chi^2 = 9,00$ ;  $p = 0,01$ ;  $z = -2,26$ ;  $p = 0,02$ ) REM1 epizoda dužeg trajanja ( $\chi^2 = 10,52$ ;  $p = 0,01$ ;  $z = -2,67$ ;  $p = 0,01$ ). Dugotrajne promene u REM spavanju nakon ketamin/diazepam anestezije praćene su istovremeno konstantnim povećanjem broja NREM epizoda (**Tabela 1**;  $\chi^2 = 13,67$ ;  $p = 10^{-3}$ ;  $z \geq -3,12$ ;  $p \leq 0,01$ ), i to NREM epizoda kraćeg trajanja (**Tabela 1**;  $\chi^2 = 13,02$ ;  $p = 10^{-3}$ ;  $z \geq -2,84$ ;  $p \leq 0,01$ ). Iako nije bilo promene u broju REM2 epizoda (**Tabela 1**; **Slika 4.14. A**;  $\chi^2 = 1,80$ ;  $p = 0,41$ ), one su bile skraćene 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije ( $\chi^2 = 6,99$ ;  $p = 0,03$ ;  $z = -2,56$ ;  $p = 0,01$ ).

Sa druge strane, do produženja REM faze spavanja 48 sati nakon pentobarbital anestezije operativnog nivoa (**Tabela 1**; **Slika 4.13**;  $\chi^2 = 7,47$ ;  $p = 0,02$ ;  $z = -2,44$ ;  $p = 0,02$  za 48 h) došlo je na račun produženja REM1 faze spavanja ( $\chi^2 = 9,61$ ;  $p = 0,01$ ;  $z = -2,71$ ;  $p = 0,01$  za 48 h) i povećanog broja REM epizoda ( $\chi^2 = 6,43$ ;  $p = 0,04$ ;  $z = -2,28$ ;  $p = 0,02$ ), a naročito REM1 epizoda ( $\chi^2 = 5,61$ ;  $p = 0,06$ ;  $z = -2,06$ ;  $p = 0,04$ ). Zapravo, 48 sati nakon pentobarbital anestezije, došlo je do značajnog produženja trajanja REM1 epizoda (**Tabela 1**; **Slika 4.14. B**;  $\chi^2 = 5,92$ ;  $p = 0,05$ ;  $z = -2,28$ ;  $p = 0,02$ ), koje je bilo praćeno skraćanjem REM2 epizoda (**Tabela 1**; **Slika 4.14. B**;  $\chi^2 = 5,85$ ;  $p = 0,05$ ;  $z = -2,30$ ;  $p = 0,02$ ). Šest dana nakon pentobarbital anestezije, sve promene u REM spavanju su se vratile na vrednosti koje su imale pre anestezije (**Tabela 1**;  $z \geq -1,84$ ;  $p \geq 0,07$ ), ali je došlo do povećanja broja NREM epizoda kraćeg

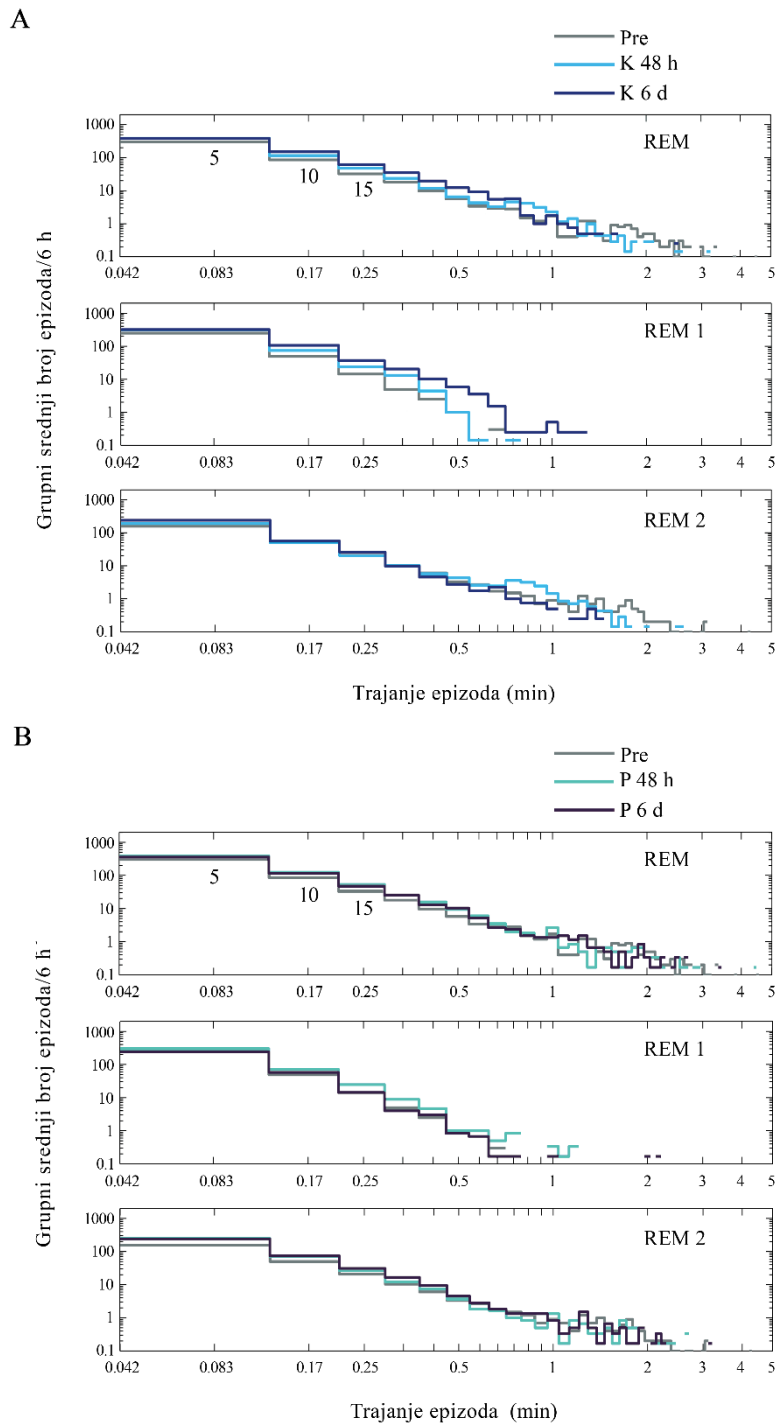
trajanja (**Tabela 1**;  $z = -2,50$ ;  $p = 0,01$ ), bez promene u trajanju NREM faze spavanja (**Tabela 1**;  $z = -1,30$ ;  $p = 0,19$ ).

**Tabela 1. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i dinamiku budnost/NREM/REM/REM1/REM2 epizoda u motornoj kori nakon anestezije.** Uticaj anestezije na arhitekturu spavanja i dinamiku svih epizoda spavanja u fizioloških kontrola (Kontrola) i u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (Lezija) pre, 48 h i 6 dana (6 d) nakon opšte anestezije. Srednje trajanje svih faza spavanja, srednji broj i srednje trajanje epizoda u toku 6 sati  $\pm$  SEM (min). K – ketamin/diazepam; P – pentobarbital.

Statistički značajne srednje vrednosti  $p \leq 0,05$  označene su crvenom bojom.

|                 | <b>Srednje trajanje/6h <math>\pm</math> SEM (min)</b>         |                                      |                                      |                                      |                                      |
|-----------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                 | Budnost   | NREM                                 | REM                                  | REM1                                 | REM2                                 |
| <b>Kontrola</b> |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | 95,77 $\pm$ 5,80  | 172,71 $\pm$ 7,57                    | 91,26 $\pm$ 4,54                     | 35,74 $\pm$ 2,60                     | 55,52 $\pm$ 4,22                     |
| K 48 h          | 91,80 $\pm$ 12,96   | 160,87 $\pm$ 8,27                    | 107,00 $\pm$ 6,98                    | <b>51,00 <math>\pm</math> 4,47</b>   | 56,00 $\pm$ 5,76                     |
| K 6 d           | 107,79 $\pm$ 16,81  | <b>130,73 <math>\pm</math> 14,91</b> | <b>121,15 <math>\pm</math> 4,65</b>  | <b>72,44 <math>\pm</math> 4,85</b>   | 48,71 $\pm$ 5,46                     |
| P 48 h          | 86,26 $\pm$ 12,37   | 159,32 $\pm$ 12,56                   | <b>114,08 <math>\pm</math> 5,13</b>  | <b>51,18 <math>\pm</math> 3,30</b>   | 62,90 $\pm$ 6,69                     |
| P 6 d           | 98,90 $\pm$ 10,28   | 154,36 $\pm$ 8,74                    | 106,40 $\pm$ 7,34                    | 37,83 $\pm$ 1,70                     | 68,57 $\pm$ 8,21                     |
| <b>Lezija</b>   |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | <b>76,44 <math>\pm</math> 5,37</b>                            | 164,43 $\pm$ 4,00                    | <b>118,86 <math>\pm</math> 6,22</b>  | <b>58,93 <math>\pm</math> 4,49</b>   | 59,94 $\pm$ 5,22                     |
| K 48 h          | 85,67 $\pm$ 6,40  | 159,58 $\pm$ 7,23                    | 114,42 $\pm$ 4,79                    | 63,24 $\pm$ 4,55                     | 51,18 $\pm$ 4,54                     |
| K 6 d           | 91,21 $\pm$ 11,07   | 132,68 $\pm$ 14,53                   | 135,78 $\pm$ 11,74                   | 71,46 $\pm$ 9,64                     | 64,32 $\pm$ 7,34                     |
| P 48 h          | 90,56 $\pm$ 6,18  | 165,75 $\pm$ 8,74                    | 103,36 $\pm$ 8,71                    | 50,29 $\pm$ 8,44                     | 53,07 $\pm$ 3,04                     |
| P 6 d           | 120,50 $\pm$ 20,49  | 140,27 $\pm$ 13,15                   | 98,90 $\pm$ 11,17                    | 48,88 $\pm$ 8,26                     | 50,02 $\pm$ 6,05                     |
|                 | <b>Srednji broj epizoda/6h <math>\pm</math> SEM</b>           |                                      |                                      |                                      |                                      |
|                 | Budnost   | NREM                                 | REM                                  | REM1                                 | REM2                                 |
| <b>Kontrola</b> |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | 302,50 $\pm$ 30,93  | 535,40 $\pm$ 31,89                   | 478,70 $\pm$ 37,83                   | 319,90 $\pm$ 25,02                   | 263,20 $\pm$ 37,42                   |
| K 48 h          | 397,00 $\pm$ 59,20  | <b>741,71 <math>\pm</math> 33,56</b> | <b>625,71 <math>\pm</math> 39,92</b> | <b>427,29 <math>\pm</math> 29,92</b> | 300,57 $\pm$ 39,06                   |
| K 6 d           | 443,50 $\pm$ 91,08  | <b>794,75 <math>\pm</math> 30,25</b> | <b>688,50 <math>\pm</math> 37,01</b> | <b>505,00 <math>\pm</math> 53,41</b> | 344,00 $\pm$ 30,14                   |
| P 48 h          | 337,83 $\pm$ 34,75  | 627,50 $\pm$ 48,09                   | <b>645,50 <math>\pm</math> 34,09</b> | <b>413,67 <math>\pm</math> 23,25</b> | 380,00 $\pm$ 44,09                   |
| P 6 d           | 442,33 $\pm$ 71,04  | <b>668,50 <math>\pm</math> 24,71</b> | 595,00 $\pm$ 53,24                   | 323,50 $\pm$ 22,74                   | 392,33 $\pm$ 55,28                   |
| <b>Lezija</b>   |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | 241,89 $\pm$ 15,28  | <b>706,33 <math>\pm</math> 36,98</b> | <b>643,22 <math>\pm</math> 45,73</b> | <b>432,11 <math>\pm</math> 38,40</b> | 319,00 $\pm$ 33,71                   |
| K 48 h          | 373,50 $\pm$ 44,54  | 794,83 $\pm$ 60,96                   | 684,67 $\pm$ 35,00                   | 494,67 $\pm$ 20,71                   | 323,33 $\pm$ 27,38                   |
| K 6 d           | 462,83 $\pm$ 60,50  | 775,17 $\pm$ 58,27                   | 739,00 $\pm$ 26,50                   | 482,50 $\pm$ 33,74                   | 406,67 $\pm$ 40,88                   |
| P 48 h          | 367,29 $\pm$ 68,83  | 684,29 $\pm$ 59,50                   | 521,57 $\pm$ 67,34                   | 382,71 $\pm$ 57,42                   | <b>238,43 <math>\pm</math> 28,45</b> |
| P 6 d           | 449,80 $\pm$ 99,22  | 738,60 $\pm$ 47,96                   | 563,00 $\pm$ 73,47                   | 376,20 $\pm$ 60,42                   | 298,20 $\pm$ 42,24                   |
|                 | <b>Srednje trajanje epizoda/6h <math>\pm</math> SEM (min)</b> |                                      |                                      |                                      |                                      |
|                 | Budnost   | NREM                                 | REM                                  | REM1                                 | REM2                                 |
| <b>Kontrola</b> |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | 0,35 $\pm$ 0,04   | 0,33 $\pm$ 0,03                      | 0,20 $\pm$ 0,01                      | 0,11 $\pm$ 0,00                      | 0,24 $\pm$ 0,03                      |
| K 48 h          | 0,24 $\pm$ 0,03   | <b>0,22 <math>\pm</math> 0,02</b>    | 0,17 $\pm$ 0,01                      | 0,12 $\pm$ 0,00                      | 0,20 $\pm$ 0,03                      |
| K 6 d           | 0,25 $\pm$ 0,02   | <b>0,16 <math>\pm</math> 0,02</b>    | 0,18 $\pm$ 0,00                      | <b>0,15 <math>\pm</math> 0,01</b>    | <b>0,14 <math>\pm</math> 0,01</b>    |
| P 48 h          | 0,25 $\pm$ 0,03   | <b>0,26 <math>\pm</math> 0,03</b>    | 0,18 $\pm$ 0,01                      | <b>0,12 <math>\pm</math> 0,01</b>    | <b>0,17 <math>\pm</math> 0,01</b>    |
| P 6 d           | 0,24 $\pm$ 0,04   | <b>0,23 <math>\pm</math> 0,02</b>    | 0,18 $\pm$ 0,01                      | 0,12 $\pm$ 0,01                      | 0,18 $\pm$ 0,02                      |
| <b>Lezija</b>   |   |                                      |                                      |                                      |                                      |
| Pre             | 0,31 $\pm$ 0,02   | <b>0,24 <math>\pm</math> 0,02</b>    | 0,19 $\pm$ 0,01                      | <b>0,14 <math>\pm</math> 0,01</b>    | 0,19 $\pm$ 0,01                      |
| K 48 h          | 0,26 $\pm$ 0,06   | 0,21 $\pm$ 0,02                      | 0,17 $\pm$ 0,01                      | 0,13 $\pm$ 0,01                      | 0,16 $\pm$ 0,01                      |
| K 6 d           | 0,20 $\pm$ 0,01   | 0,17 $\pm$ 0,01                      | 0,18 $\pm$ 0,01                      | 0,15 $\pm$ 0,01                      | 0,16 $\pm$ 0,01                      |
| P 48 h          | 0,28 $\pm$ 0,03   | 0,26 $\pm$ 0,04                      | 0,21 $\pm$ 0,02                      | 0,13 $\pm$ 0,01                      | <b>0,24 <math>\pm</math> 0,03</b>    |
| P 6 d           | 0,30 $\pm$ 0,05   | 0,19 $\pm$ 0,02                      | 0,18 $\pm$ 0,01                      | 0,13 $\pm$ 0,01                      | 0,17 $\pm$ 0,01                      |





**Slika 4.14. Dinamika epizoda REM/REM1/REM2 spavanja u motornoj kori pre i nakon anestezije operativnog nivoa.** Grupna distribucija srednjeg broja REM/REM1/REM2 epizoda i njihovog trajanja (min) pre, 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam (**A**; Pre, 48 h K i 6 d K,  $n = 14$ ) ili pentobarbital (**B**; Pre, 48 h P i 6 d P,  $n = 10$ ) anestezije kod fizioloških kontrola. U ovim log-log distribucijama svaki „horizontalni stepenik” postavljen je iznad njegovog trajanja (npr. grupni srednji broj epizoda/6 h od 5 s postavljen je iznad  $5/60=0,0833$  min itd.), a na gornjim panelima označene su epizode od 5, 10, 15 s. Prekide u distribucijama uzrokuju srednje vrednosti broja epizoda koje su jednake nuli, a čije logaritmovane vrednosti nisu brojevi.

Ketamin/diazepam anestezija od samog početka dovodi do povećanja broja svih prelaza ( $\chi^2 \geq 12,42$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ), a zajednički i dugotrajni efekat oba anestetika iskazao se kao porast broja budnost/NREM/budnost i budnost/REM/budnost prelaza (**Tabela 2**;  $\chi^2 \geq 12,42$ ;  $p \leq 10^{-4}$ ) u toku spavanja nakon anestezije kod fizioloških kontrola.

**Tabela 2. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na strukturu prelaznih stanja u motornoj kori u toku spavanja nakon anestezije.** Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije na strukturu prelaznih stanja u toku 6 h spavanja pre, 48 h i 6 dana (6 d) nakon anestezije u kontrolnih pacova (Kontrola) i pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (Lezija). Grupna srednja vrednost broja budnost/NREM/REM prelaza merenih na sat vremena u toku 6 h spavanja  $\pm$  SEM. K – ketamin/diazepam; P – pentobarbital anestezija.

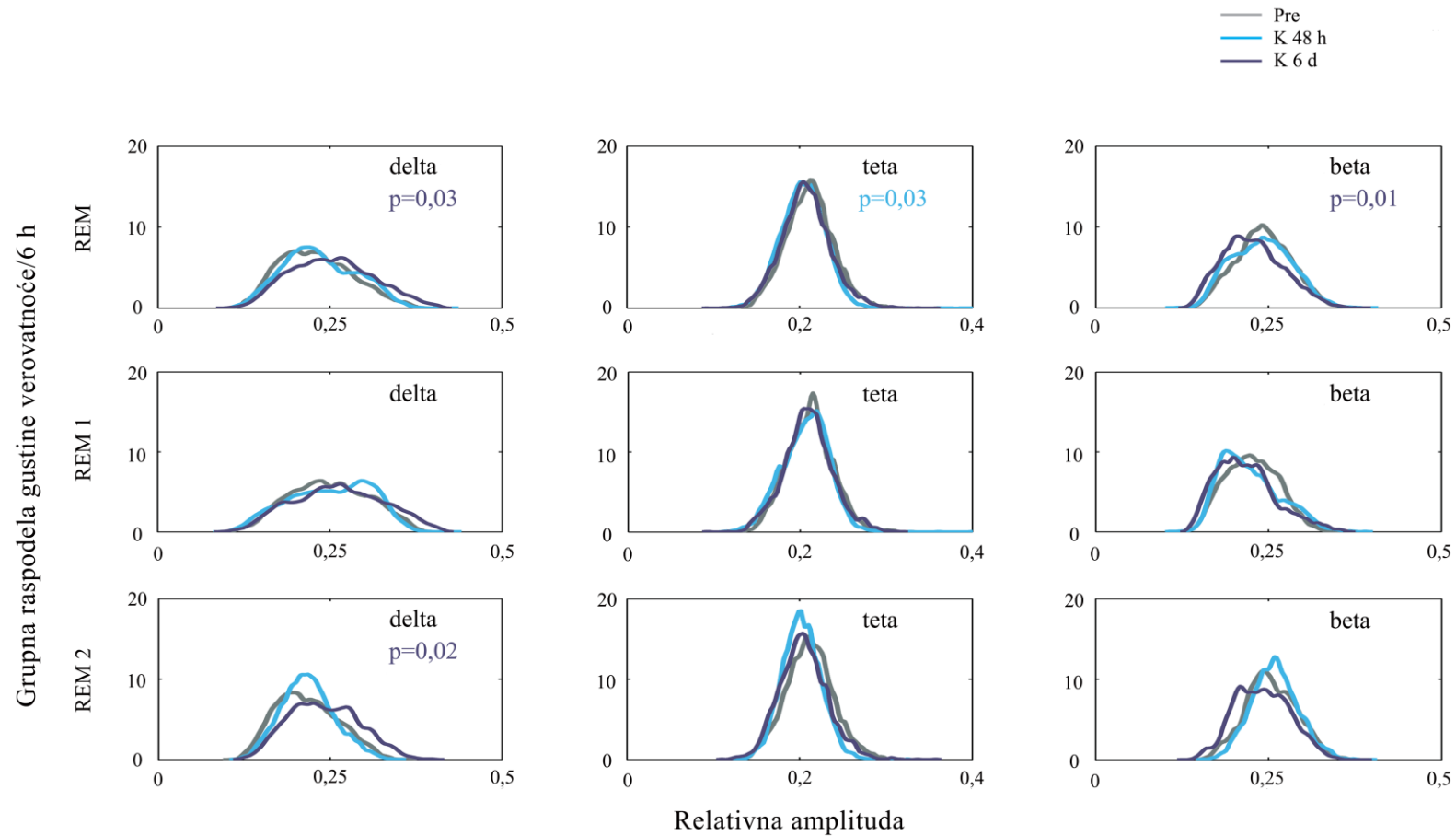
Statistički značajne srednje vrednosti  $p \leq 0,02$  označene su crvenom bojom.

|                        | Budnost/NREM                       | NREM/Budnost                       | Budnost/REM                        | REM/Budnost                        | NREM/ REM                          | REM /NREM                          |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b><i>Kontrola</i></b> |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |
| Pre                    | 31,42 $\pm$ 1,96                   | 31,08 $\pm$ 1,84                   | 14,17 $\pm$ 0,92                   | 13,88 $\pm$ 0,93                   | 63,43 $\pm$ 2,29                   | 63,90 $\pm$ 2,29                   |
| K 48 h                 | <b>43,83 <math>\pm</math> 3,16</b> | <b>41,62 <math>\pm</math> 3,05</b> | <b>22,31 <math>\pm</math> 1,60</b> | <b>24,50 <math>\pm</math> 1,72</b> | <b>81,93 <math>\pm</math> 3,25</b> | <b>79,71 <math>\pm</math> 3,30</b> |
| K 6 d                  | <b>56,47 <math>\pm</math> 4,36</b> | <b>53,86 <math>\pm</math> 4,42</b> | <b>31,57 <math>\pm</math> 2,62</b> | <b>34,27 <math>\pm</math> 2,52</b> | 68,08 $\pm$ 6,45                   | 64,50 $\pm$ 6,16                   |
| P 48 h                 | 31,58 $\pm$ 2,46                   | 30,22 $\pm$ 2,36                   | <b>25,03 <math>\pm</math> 1,98</b> | <b>25,72 <math>\pm</math> 1,94</b> | <b>76,45 <math>\pm</math> 2,99</b> | <b>75,83 <math>\pm</math> 2,91</b> |
| P 6 d                  | <b>49,10 <math>\pm</math> 4,15</b> | <b>48,80 <math>\pm</math> 3,84</b> | <b>30,44 <math>\pm</math> 2,39</b> | <b>31,00 <math>\pm</math> 2,33</b> | 68,72 $\pm$ 3,42                   | 68,14 $\pm$ 3,53                   |
| <b><i>Lezija</i></b>   |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |
| Pre                    | 28,98 $\pm$ 1,92                   | 26,56 $\pm$ 1,74                   | 13,44 $\pm$ 0,86                   | 14,91 $\pm$ 0,88                   | <b>91,95 <math>\pm</math> 2,92</b> | <b>90,38 <math>\pm</math> 3,01</b> |
| K 48 h                 | 43,53 $\pm$ 2,12                   | 41,42 $\pm$ 1,91                   | 22,22 $\pm$ 1,55                   | 23,89 $\pm$ 1,59                   | <b>94,33 <math>\pm</math> 2,91</b> | <b>92,79 <math>\pm</math> 2,83</b> |
| K 6 d                  | <b>43,79 <math>\pm</math> 2,67</b> | <b>42,75 <math>\pm</math> 2,59</b> | 26,22 $\pm$ 1,44                   | 27,33 $\pm$ 1,52                   | <b>84,00 <math>\pm</math> 3,85</b> | <b>82,94 <math>\pm</math> 3,81</b> |
| P 48 h                 | 39,47 $\pm$ 3,40                   | 36,90 $\pm$ 3,20                   | <b>13,53 <math>\pm</math> 0,88</b> | <b>15,64 <math>\pm</math> 0,93</b> | 71,07 $\pm$ 4,25                   | 68,67 $\pm$ 4,26                   |
| P 6 d                  | 60,63 $\pm$ 5,70                   | 57,54 $\pm$ 6,03                   | <b>18,46 <math>\pm</math> 1,95</b> | <b>21,92 <math>\pm</math> 1,96</b> | 72,60 $\pm$ 5,57                   | 69,37 $\pm$ 5,25                   |

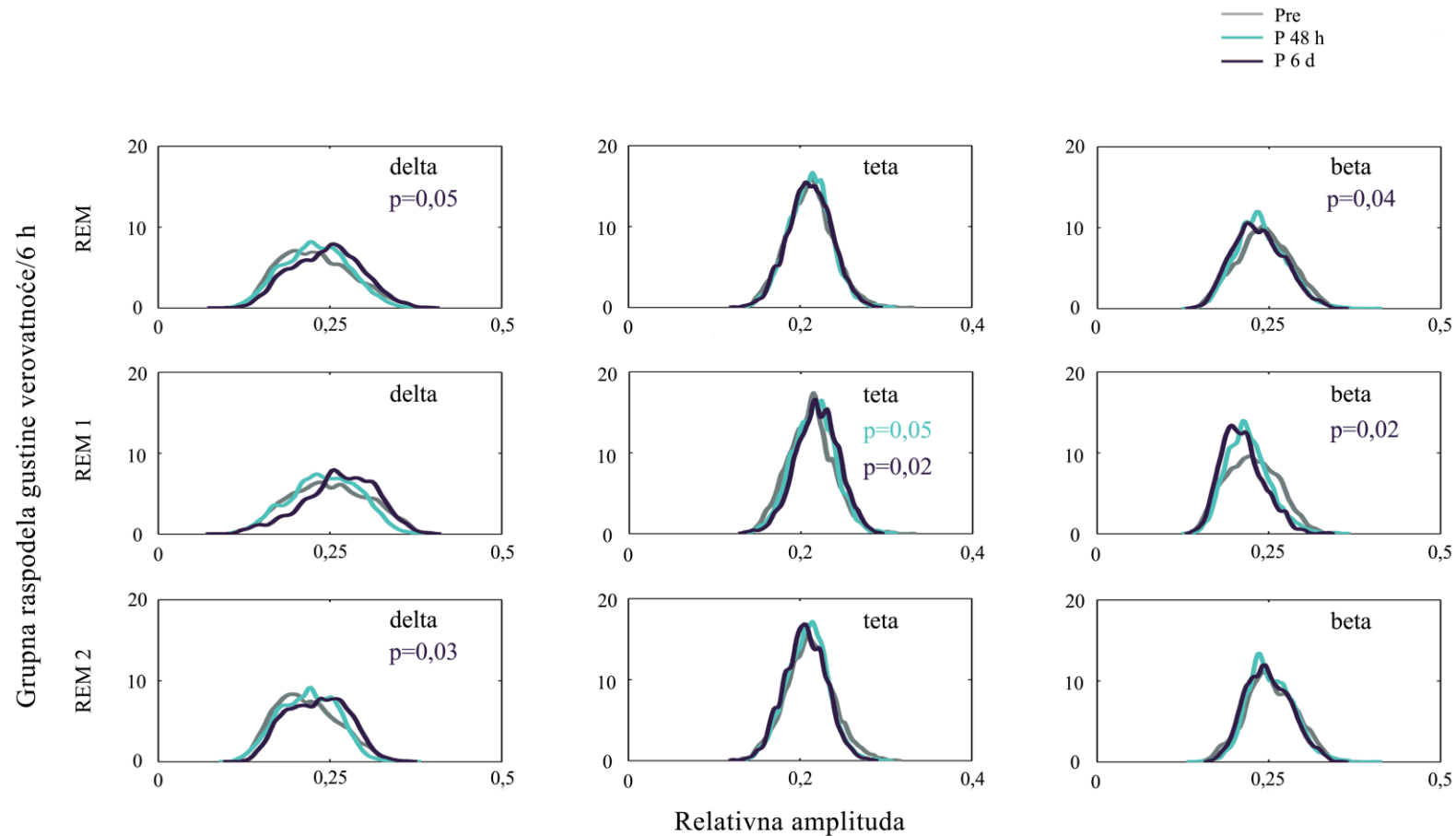
#### 4.4.2. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na EEG mikrostrukturu REM faze spavanja nakon anestezije u motornoj kori fizioloških kontrola

Analiza EEG mikrostrukture REM faze spavanja je obuhvatila sva diferencirana REM stanja, celokupno REM, REM1 i REM2 stanje, koja su praćena u periodu od 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije kod fizioloških kontrola (**Slike 4.15. i 4.17. A**). Ketamin/diazepam anestezija je povećala delta i smanjila beta relativnu amplitudu 6 dana nakon anestezije u toku celokupnog REM stanja (**Slike 4.15. i 4.17. A** gornji red;  $z \geq -2,61$ ;  $p \leq 0,03$ ). Mada se EEG mikrostruktura REM1 stanja nije menjala, REM2 delta amplituda se povećala 6 dana nakon anestezije (**Slike 4.15. i 4.17. A** donji red;  $z = -2,28$ ;  $p = 0,02$ ) i tako doprinela povećanju delta relativne amplitude celokupnog REM spavanja (**Slike 4.15. i 4.17. A** gornji red). U toku celokupnog REM stanja, teta amplituda opada, dok sigma relativna amplituda raste samo 48 h nakon anestezije ( $z \geq -3,32$ ;  $p \leq 0,03$ ; rezultati za sigmu nisu prikazani), ali se njihove vrednosti nakon 6 dana izjednačavaju sa vrednostima koje su imale pre anestezije (za tetu **Slika 4.15.** gornji red;  $z \geq -1,13$ ;  $p \geq 0,26$ ; podaci za sigmu nisu prikazani).

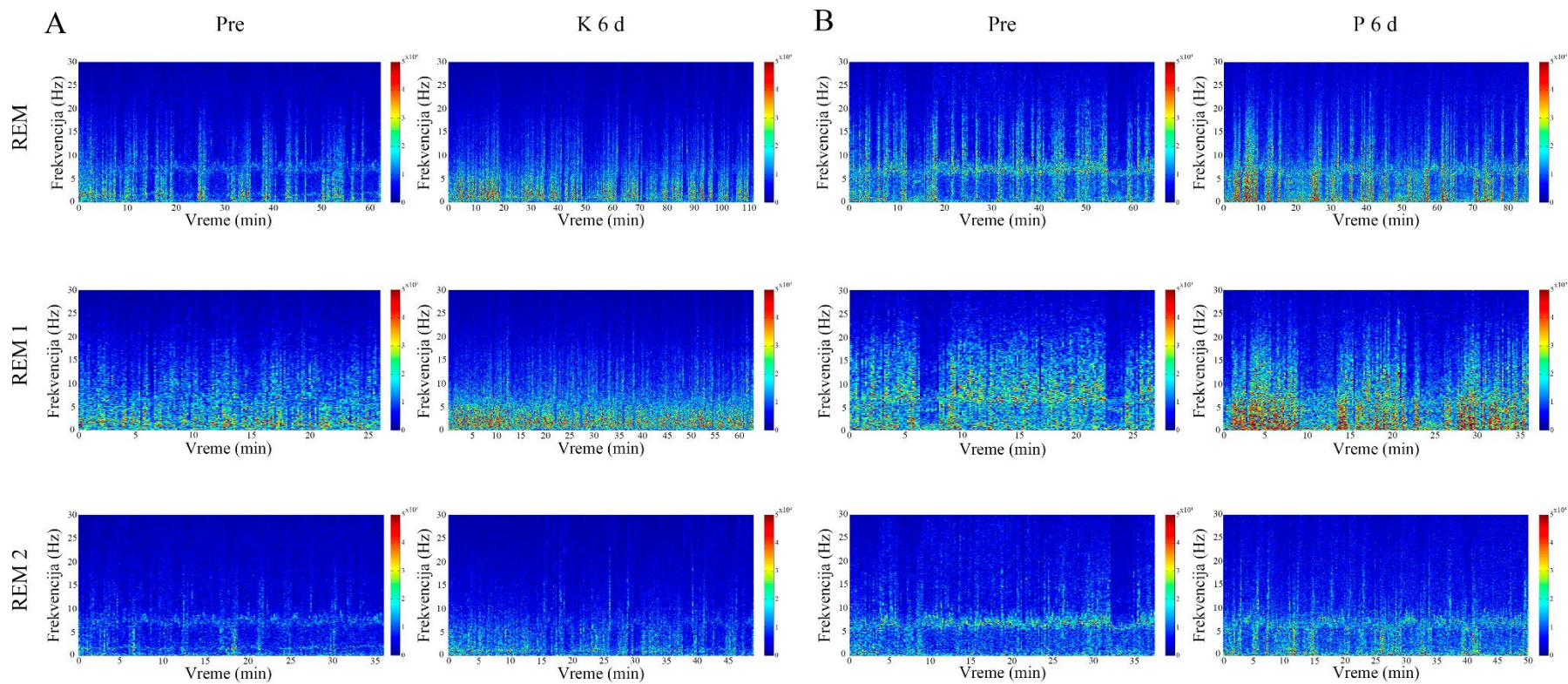
Pentobarbital anestezija je takođe izmenila EEG mikrostrukturu motorne kore tokom REM faze spavanja (**Slike 4.16. i 4.17. B**). Ova anestezija je kod fizioloških kontrola povećala delta, dok je smanjila beta relativnu amplitudu 6 dana nakon anestezije (**Slika 4.16. i Slika 4.17. B** gornji red;  $z \geq -2,02$ ;  $p \leq 0,05$ ). Mada do porasta delta amplitude dolazi usled povećanja delta amplitude tokom REM2 stanja (**Slika 4.16.** donji red;  $z = -2,20$ ;  $p = 0,03$ ), beta amplituda opada usled pada beta amplitude u toku REM1 stanja (**Slika 4.16.** srednji red;  $z = -2,40$ ;  $p = 0,02$ ). Najkonzistentniji i najdugotrajniji efekat pentobarbital anestezije je bio povećanje teta amplitude tokom REM1 faze spavanja (**Slika 4.16. i Slika 4.17. B** srednji red;  $\chi^2 = 8,43$ ;  $p = 0,02$ ;  $z \geq -2,31$ ;  $p \leq 0,05$ ).



**Slika 4.15. REM/REM1/REM2 EEG mikrostrukture motorne kore pre i nakon ketamin/diazepam anestezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih amplituda/6 h pre, 48 h i 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije (Pre, K 48 h, K 6 d; n=14) kod fizioloških kontrola. Desno izmeštena distribucija prikazuje statistički značajno povećanje EEG delta relativne amplitude (REM/REM2), dok levo izmeštena distribucija prikazuje statistički značajno smanjenje (REM teta i beta) EEG relativne amplitude. p - vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



**Slika 4.16. REM/REM1/REM2 EEG mikrostrukture motorne kore pre i nakon pentobarbital anestezije.** Grupna raspodela gustine verovatnoće relativnih amplituda/6 h pre, 48 h i 6 dana nakon pentobarbital anestezije (Pre, P 48 h, P 6 d; n=10) kod fizioloških kontrola. Desno izmeštena distribucija prikazuje statistički značajno povećanje EEG relativne amplitude (REM/REM2 delta i REM1 teta), dok levo izmeštena distribucija prikazuje statistički značajno smanjenje (REM/REM1 beta) EEG relativne amplitude. p - vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.



**Slika 4.17. Individualni primeri REM/REM1/REM2 spektrograma motorne kore pre i 6 dana nakon ketamin/diazepam (A; Pre, K 6 d) ili pentobarbital anestezije (B; Pre, P 6 d) operativnog nivoa u fizioloških kontrola, koji predstavljaju grupni rezultat dobijen sa REM/REM1/REM2 grupnom raspodelom gustine verovatnoće relativnih amplituda/6 h svih konvencionalnih frekventnih opsega prikazanih na slikama 4.15. i 4.16.**

#### 4.4.3. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja, dinamiku budnost/NREM/REM/REM1/REM2 epizoda spavanja, strukturu prelaznih stanja u toku spavanja i EEG mikrostrukturu svih REM faza spavanja u motornoj kori nakon anestezije kod pacova sa lezijom PPT jedra

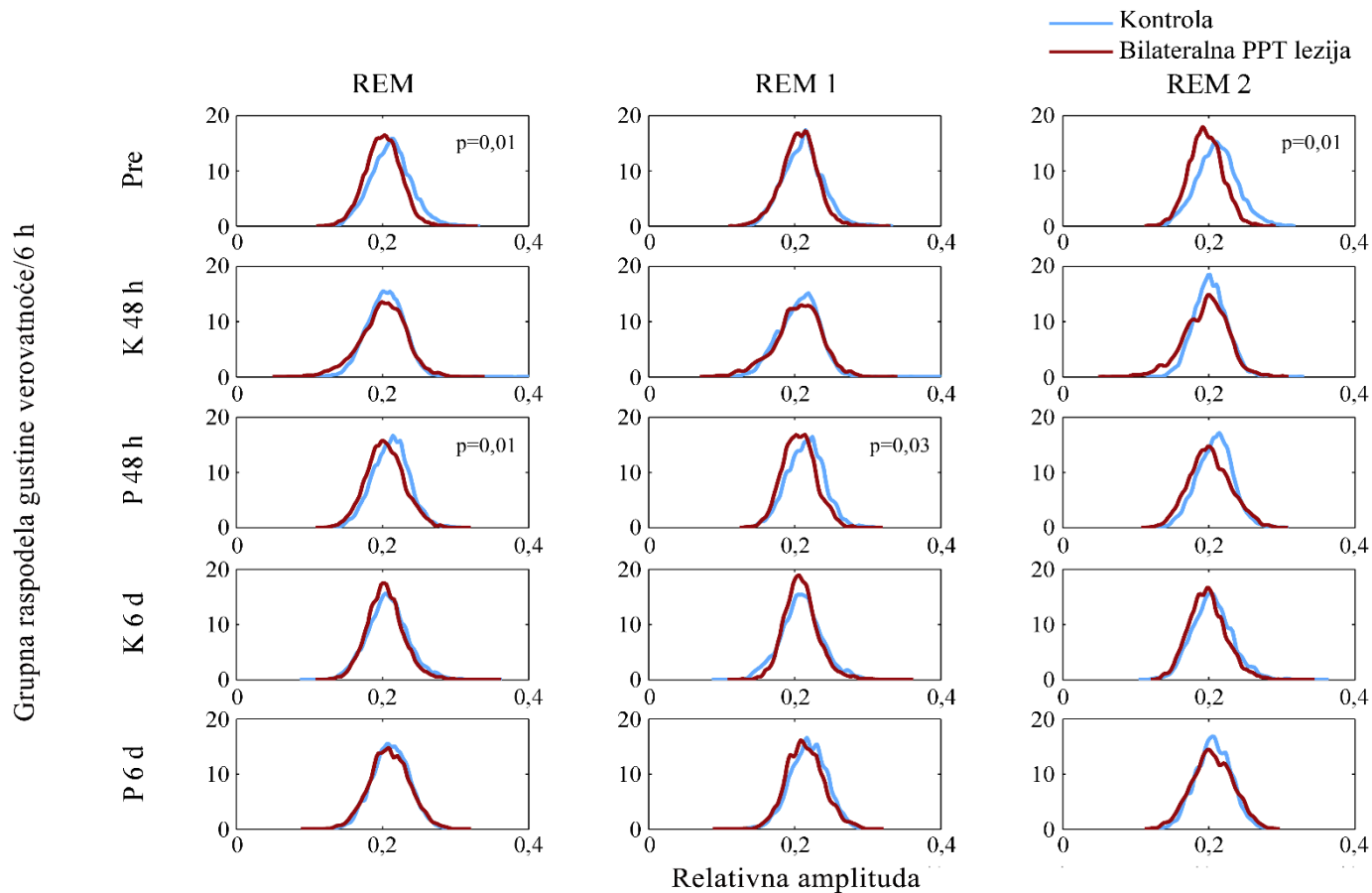
Pre bilo kakve anestezije bilateralna lezija PPT jedra je dovela do produženja celokupne REM faze motorne kore (**Tabela 1**;  $z = -2,98$ ;  $p = 0,003$ ), usled produženja REM1 faze ( $z = -3,02$ ;  $p = 0,002$ ), naročito zbog povećanja broja i trajanja REM1 epizoda ( $z \geq -3,09$ ;  $p \leq 0,03$ ). Takođe, bilateralna lezija PPT jedra je skratila trajanje budnosti (**Tabela 1**;  $z = -2,08$ ;  $p = 0,04$ ), iako se broj i trajanje epizoda budnosti nisu promenili ( $z \geq -1,10$ ;  $p \geq 0,27$ ). Pored toga PPT lezija je povećala broj ( $z = -2,86$ ;  $p = 0,004$ ) skraćenih NREM epizoda (**Tabela 1**;  $z = -2,58$ ;  $p = 0,01$ ), bez promene u trajanju same NREM faze spavanja ( $z = -1,39$ ;  $p = 0,17$ ).

Oba anestetika su već nakon 48 h dugotrajno poništila produženo REM/REM1 spavanje motorne kore prouzrokovano bilateralnom lezijom PPT jedra (**Tabela 1**;  $z \geq -1,43$ ;  $p \geq 0,15$ ). Bilateralna PPT lezija je izazvala povećanje broja NREM/REM/NREM prelaza (**Tabela 2**;  $z \geq -6,53$ ;  $p \leq 0,02$ ), dok se efekat ketamin/diazepam anestezije u PPT leziji ispoljio kao pad broja budnost/NREM/ budnost prelaza ( $z \geq -2,70$ ;  $p \leq 0,02$ ) 6 dana nakon anestezije. Sa druge strane, pentobarbital anestezija je već nakon 48 h dugotrajno poništila efekte PPT lezije (ponišćavanje porasta broja NREM/REM/NREM prelaza;  $z \geq -0,94$ ;  $p \geq 0,35$ ) i smanjila broj budnost/REM/budnost prelaza (**Tabela 2**;  $z \geq -4,62$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Pre uvođenja u anesteziju, EEG mikrostruktura motorne kore u toku celokupne REM kao i REM2 (REM sa atonijom) faze se razlikovala u pacova sa lezijom PPT jedra u odnosu na kontrolne pacove. Naime, teta relativna amplituda je bila smanjena u PPT leziji u toku celokupne REM kao i REM2 faze (**Slika 4.18. red Pre**;  $z \geq -2,81$ ;  $p \leq 0,01$ ). Oba anestetika su poništila ove promene teta amplitude u toku celokupne REM kao i REM2 faze, koje su nastale kao posledica holinergičke denervacije iz PPT jedra ( $z \geq -0,96$ ;  $p \geq 0,34$ ). Izmenjenu teta amplitudu ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa je trajno uklonila već nakon 48 h (**Slika 4.18. redovi K 48 h i K 6 d**), dok je pentobarbital anestezija ovaj efekat imala tek nakon 6 dana (**Slika 4.18. redovi P 48 h i**



P 6 d). Zapravo, 48 h nakon pentobarbital anestezije, celokupna REM kao i REM1 faza su imale manju teta amplitudu (**Slika 4.18.** red P 48 h;  $z \geq -2,66$ ;  $p \leq 0,03$ ).



**Slika 4.18. Efekti ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije na REM/REM1/REM2 teta amplitudu motorne kore u bilateralnoj leziji PPT jedra.** Ketamin/diazepam (n = 14 za kontrolu i n = 12 za leziju) je već 48 h nakon anestezije dugotrajno poništio efekat lezije, dok je pentobarbital anestezija (n = 10 za kontrolu i n = 9 za leziju) takođe poništila efekat lezije, ali tek 6 dana nakon anestezije. Izmeštanje distribucije u desnu stranu prikazuje statistički značajno povećanje teta relativne amplitude, dok izmeštanje distribucije u levu stranu prikazuje statistički značajano smanjenje teta relativne amplitude. p - vrednosti za Mann-Whitney U kontrastni test.

## ***5. Diskusija***

## 5.1. Respiratorni obrazac i EEG mikrostruktura za vreme opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa

Analiza EEG mikrostrukture senzomotorne kore u toku stabilnog stanja opšte anestezije operativnog nivoa je pokazala da je ketamin/diazepam anestezija izazvala više promena u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra nego pentobarbital anestezija (**Slike 4.6. i 4.7.**). Uticaj ketamin/diazepam anestezije u ovih pacova se iskazao kao povećanje relativnih amplituda nižih (delta i teta) i smanjenje relativnih amplituda viših (sigma i beta) frekventih opsega (**Slika 4.6.**). Istovremeno, ketamin/diazepam anestezija je daleko više uticala na respiratorni obrazac u odnosu na pentobarbital anesteziju u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra. Naime, opšta ketamin/diazepam anestezija je u ovih pacova izazvala ozbiljan poremećaj respiratornog obrasca (**Slike 4.2. i 4.3.**) koji se iskazao pre svega kao porast broja apneustičkih bradipneja/apneja BB intervala kraćeg trajanja (**Slika 4.4. Ba-c**). Pored toga, ketamin/diazepam anestezija je izazvala i pojavu uzdaha u respiratornom obrascu čiji su respiratorni ciklusi takođe bili značajno kraćeg trajanja (**Slike 4.3. i 4.4. Ca-c**).

U toku opšte pentobarbital anestezije, analiza EEG mikrostrukture senzomotorne kore pokazala je samo smanjenje gama relativne amplitude u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra u poređenju sa fiziološkim kontrolama (**Slika 4.7.**). Ova promena EEG mikrostrukture je bila praćena eupnejičnim respiratornim obrascem, bez prisustva uzdaha. Naime, obrazac disanja tokom ove anestezije kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra je karakterisao manji broj stabilno produženih eupnejičnih BB intervala, nastalih usled produženja vremena trajanja ekspiratorne faze respiratornog ciklusa (**Slika 4.5. a-c**).

Efekti opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa su se razlikovali i kod fizioloških kontrola. Pentobarbital anestezija je dovela do porasta delta i teta relativnih amplituda, i pada beta i gama relativnih amplituda (**Slika 4.8.**).

Nakon lezije PPT jedra ketamin/diazepam anestezija je značajno izmenila i EEG mikrostrukturu motorne kore (**Slika 4.9.**) tako što je povećala delta i smanjila beta relativnu amplitudu, dok se EEG mikrostruktura motorne kore u toku pentobarbital anestezije nije razlikovala od fizioloških kontrola.

Iako je za eksperimentalne potrebe ove doktorske disertacije korišćen ketamin/diazepam, a nije paralelno registrovana aktivnost genioglosnih mišića (mišići

gornjeg respiratornog puta koji nisu u atoniji za vreme opšte anestezije), dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studije koja je pokazala da ketamin istovremeno dovodi do povećanja aktivnosti genioglosnog mišića, ali i prekida veze između gubitka svesti i aktivnosti dilatatornih mišića gornjeg disajnog puta, čime je potvrđena moguća upotreba ketamina kao respiratornog stimulansa (Eikermann i sar., 2012).

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali razliku u efektivnom inspiratornom vremenu, kao ustanovljene mere stabilnosti gornjeg disajnog puta, tokom eupnejičnog obrasca disanja između ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra. Iako je ketamin/diazepam anestezija kod ovih pacova povećala EEG delta i teta amplitudu, a smanjila sigma i beta amplitudu (**Slika 4.6. B**), povećano prisustvo uzadaha u respiratornom obrascu, kao i povećano efektivno inspiratorno vreme ukazuju na kompenzatorni odgovor na parcijalnu opstrukciju u ketamin/diazepam u odnosu na pentobarbital anesteziju, najverovatnije kao posledicu ketaminskog antagonizma prema NMDA receptorima. Ipak, ketamin/diazepam anestezija dovodi do ozbiljnog poremećaja respiratornog obrasca u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra (**Slika 4.2.**).

Postoje eksperimentalni dokazi koji ukazuju na povećanu aktivnost genioglosnog mišića i mišića vrata (mišića koji nisu respiratorni mišići) u disanju, u toku ketaminske u odnosu na propofol anesteziju, kao i za vreme sporotalasnog i REM spavanja, kako u dozi od 60 mg/kg, tako i u dozi od 125 mg/kg (Eikermann i sar., 2012). Pored toga, ketamin dovodi do dozno-zavisnog porasta u efektivnom inspiratornom vremenu, frekvenciji disanja, disajnom volumenu, minutnom volumenu ventilacije, što za posledicu ima smanjenje vrednosti parcijalnog pritiska ugljen dioksida, odnosno maksimalne koncentracije ugljen dioksida na kraju ekspiratorne faze respiratornog ciklusa (Eikermann i sar., 2012).

U ovoj doktorskoj disertaciji nisu poređeni čisti efekti GABA anestetika i NMDA anestetika već je poređenje vršeno između pentobarbitala i mešavine ketamin/diazepama. Međutim, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je vreme potrebno za uspostavljanje stabilne ketamin/diazepam opšte anestezije operativnog nivoa bilo jednako u fizioloških kontrola i u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra. Nasuprot tome, vreme za uspostavljanje stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa je bilo značajno produženo kod pacova sa lezijom PPT jedra. Na

osnovu vremena potrebnog za ulazak u anesteziju, u ovoj doktorskoj disertaciji je dokazano da je mešavina ketamin/diazepam mnogo povoljnija u uslovima postojanja neurodegeneracije holinergičkih neurona PPT jedra.

Međutim, pored glavnog mehanizma, dejstvo ketamina i pentobarbitala je daleko kompleksnije. Dobro je poznato da je ketamin antagonist NMDA receptora preko kojih i ostvaruje generalnu supresiju ekscitacije, dok se glavni mehanizam dejstva pentobarbitala zasniva na potenciranju inhibitornih signala putem GABA<sub>A</sub> receptora (Garcia i sar., 2010). Sa druge strane, suprotni efekti ketamina i pentobarbitala pokazani su kroz oslobađanje acetilholina u mozgu pacova. Nasuprot ketaminu, koji povećava oslobađanje acetilholina u hipokampusu i frontalnoj kori ali nema efekta na oslobađanje acetilholina u strijatumu, pentobarbital smanjuje oslobađanje acetilholina u svim moždanim strukturama (Sato i sar., 1996). Pored toga, važna uloga ketamina u oslobađanju acetilholina u hipokampusu objašnjava se činjenicom da je u pacova najveća gustina NMDA receptora upravo u hipokampusu (Brockmeyer i Kendig, 1995). Ketamin je jedinstveni anestetik koji interaguje sa NMDA, opioidnim, monoaminskim i muskarinskim receptorima, kao i sa voltažno – senzitivnim Ca<sup>++</sup> kanalima, ali ne i sa GABA<sub>A</sub> receptorima (Kubota i sar., 1999a; Nelson i sar., 2002). Sa druge strane, non-NMDA mehanizam ketamina se ostvaruje kroz povećano oslobađanje noradrenalina i acetilholina, dok pentobarbital nema taj efekat (Sato i sar., 1996; Kubota i sar., 1999a, 1999b). Karakteristično povećano oslobađanje noradrenalina nakon ketaminske anestezije može takođe doprineti pojavi psihomimetskih efekata kao što su živi snovi, agitacija i iluzije (Kubota i sar., 1999b). Generalno, antagonizam NMDA ili aktivacija GABA<sub>A</sub> receptora su mesta delovanja kada je reč o ulasku u opštu anesteziju (Bovil, 1997). Dok kora velikog mozga predstavlja mesto delovanja opšte anestezije (Spasic i sar., 2011a, 2011b), medijalna prefrontalna kora predstavlja najvažniju strukturu za manifestaciju emocionalnog ponašanja (Korf i sar., 1973).

Sa druge strane, postoje eksperimentalni dokazi koji ukazuju da opšti anestetici koji aktiviraju GABA<sub>A</sub> receptore, poput propofola i pentobarbitala, ne izazivaju sedaciju putem generalizovane inhibicije, već putem aktiviranja endogenog puta za regulaciju spavanja, posebno u hipotalamusu, tačnije u tuberomamilarnom jedru (Nelson i sar., 2002). Eksperimentalna studija u kojoj je poređen efekat dva GABA<sub>B</sub> agonista na

ponašanje, EEG i spavanje dokazala je da jedino baklofen konsoliduje spavanje i dovodi do pojave delta talasa u EEG-u (Hodor i sar., 2015).

## **5.2. Uticaj ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije operativnog nivoa na arhitekturu spavanja i EEG mikrostrukturu senzomotorne kore u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra**

Opšta anestezija operativnog nivoa indukovana i ketamin/diazepamom i pentobarbitalom je imala dugotrajan supresivan efekat na poremećaj NREM EEG mikrostrukture senzomotorne kore, koji je uzrokovan samom lezijom PPT jedra (**Slika 4.10.**). Naime, oba anestetika su poništila povećanje teta amplitude izazvano PPT lezijom. Pored toga, ketamin/diazepam anestezija je smanjila PPT lezijom povećanu EEG beta (**Slike 4.10. i 4.12.**), dok je pentobarbital anestezija smanjila PPT lezijom povećanu EEG sigma relativnu amplitudu (**Slika 4.10.**). Nasuprot izmenama u NREM EEG mikrostrukтури nakon anestezije, oba anestetika su povećala REM teta amplitudu u pacova sa PPT lezijom 6 dana nakon anestezije (**Slike 4.11. i 4.12.**).

Prethodne studije su dokazale da bilateralna lezija PPT jedra (eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB) nije promenila arhitekturu spavanja, ali je izmenila strukturu prelaznih stanja i EEG mikrostrukturu svih faza spavanja (Petrovic i sar. 2013a). Bilateralna PPT lezija je u periodu od 5 nedelja izazvala povećanje broja budnost/REM i REM/budnost prelaza, koji je bio praćen smanjenjem broja NREM/REM i REM/NREM prelaza od 28 dana. Takođe bilateralna lezija PPT jedra je izazvala povećanje beta relativne amplitude u toku budnosti, NREM i REM faze spavanja, kao i povećanje gama amplitude u toku REM spavanja, koje je bilo istovremeno praćeno smanjenjem delta relativne amplitude u toku budnosti i NREM stanja (Petrovic i sar., 2013a). Pored povećane kortikalne aktivacije tokom svih faza spavanja, bilateralna PPT lezija je dodatno uslovlila izdvajanje dva različita REM stanja i promenila kontrolu dorzalne vratne muskulature (Petrovic i sar., 2014). Svi ovi poremećaji spavanja bili su izazvani holinergičkim deficitom PPT jedra većim od  $23,33 \pm 10,03\%$  sa svake strane mozga kroz njegovu celokupnu rostro-kaudalnu dimenziju (Petrovic i sar., 2013a, 2013b, 2014).

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da je deficit holinergičkih neurona u pacova koji su anestezirani pentobarbitalom bio veći od  $20,76 \pm 2,39\%$ , dok

je u pacova koji su anestetizirani ketamin/diazepamom bio veći od  $22,25 \pm 2,89\%$  sa svake strane mozga i u celoj rostro-kaudalnoj dimenziji PPT jedra (**Slika 4.1.**). Treba napomenuti da u ovoj studiji holinergički deficit nije praćen kroz medio-lateralnu već samo kroz rostro-kaudalnu dimenziju.

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su po prvi put pokazala da oba anestetika dugotrajno smanjuju NREM teta amplitudu, ali povećavaju REM teta amplitudu nakon anestezije u pacova sa deficitom holinergičkih neurona PPT jedra (eksperimentalni model težeg oblika holinergičke neuropatologije PB).

Ovi rezultati su ukazali na ključnu ulogu neurohemijske osnove regulacije NREM i REM spavanja u holinergičkoj kontroli EEG teta amplitude. Naime, ove inverzne promene teta amplitude, zavisne od faze spavanja, nastaju verovatno zbog prirodnog smanjenja aktivnosti monoaminergičkih neurona od budnosti ka NREM spavanju, sve do REM faze spavanja kada su ovi neuroni skoro neaktivni (Aston-Jones i Bloom, 1981; Leonard i Llinas, 1994). U toku REM spavanja, odnosno u toku „monoaminske tišine”, oslabljena holinergička kontrola iz PPT jedra je ključni mehanizam odloženog povećanja teta relativne amplitude 6 dana nakon obe opšte anestezije. U toku NREM spavanja (kada je prirodno prisutna visoka aktivnost monoaminergičkih neurona, dok je nivo aktivnosti holinergičkih neurona PPT jedra nizak), gubitak holinergičkih neurona PPT jedra dovodi do trenutnog i dugotrajnog pada teta amplitude nakon obe anestezije. Pored toga, nasuprot pentobarbital anesteziji, koja je neodložno i dugotrajno dovela do smanjenja NREM sigma relativne amplitude, ketamin/diazepam anestezija je neodložno i dugotrajno dovela do smanjenja NREM beta relativne amplitude u PPT leziji.

### **5.3. Poremećaj REM spavanja u motornoj kori nakon opšte ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije operativnog nivoa kod fizioloških kontrola i bilateralne lezije PPT jedra**

Pored različite EEG mikrostrukture motorne kore fizioloških kontrola u toku stabilne ketamin/diazepam i pentobarbital anestezije, rezultati ove doktorske disertacije su ukazali na različit uticaj ovih anestetika na REM spavanje nakon anestezije. U odnosu na pentobarbital anesteziju, ketamin/diazepam anestezija je prouzrokovala dugotrajno REM1 stanje, odnosno REM stanje sa višim tonusom mišića (**Slika 4.13. B,**



C). Iako su obe anestezije produžile trajanje REM spavanja nakon anestezije, jedino je ketamin/diazepam anestezija konzistentno produžila REM1 stanje (**Tabela 1**). Do produženja REM1 stanja najpre je došlo na račun povećanja broja REM1 epizoda (nakon 48 sati), a zatim zbog povećanja broja produženih REM1 epizoda (nakon 6 dana) (**Tabela 1; Slika 4.14. A**). Sve ove dugotrajne promene REM spavanja kod fizioloških kontrola nakon ketamin/diazepam anestezije istovremeno su praćene povećanjem broja skraćenih NREM epizoda. Pored toga, broj REM2 epizoda se nije menjao, ali se njihovo trajanje skratilo 6 dana nakon ketamin/diazepam anestezije (**Tabela1; Slika 4.14. A**).

Mnoge studije su pokazale da se u prvoj nedelji, odnosno u periodu od dva do četiri dana nakon operativnog zahvata, celokupno noćno spavanje značajno skraćuje. Ovo skraćenje nastaje kao posledica skoro potpune eliminacije REM spavanja, koje je praćeno značajnim skraćanjem sporotalasnog NREM spavanja i povećanjem drugog stadijuma NREM spavanja (Knill i sar., 1990; Rosenberg i sar., 1994; Rosenberg, 2001). Nakon toga, REM spavanje se ponovo javlja, i to veće gustine i dužeg trajanja kod većine pacijenata (Rosenberg i sar., 1994). Ovako izmenjeno REM spavanje prvenstveno nastaje kao posledica produženja pojedinačnih epizoda pre nego povećanja broja REM epizoda (Knill i sar., 1990). Postoperativni poremećaj REM spavanja („REM rebound”), koji generalno predstavlja stanje pojačane simpatičke aktivacije, je takođe izvor fiziološkog stresa, koji doprinosi pojavi određenih kasnih postoperativnih komplikacija, koje su od izuzetne kliničke važnosti (Knill i sar., 1990; Rosenberg, 2001).

Obzirom da su i ketamin/diazepam i pentobarbital anestezija već nakon 48 sati produžile trajanje REM faze spavanja u motornoj kori, i to usled povećanja broja REM1 epizoda (**Tabela 1; Slika 4.14.**), ovu izmenu dinamike REM epizoda možemo pripisati GABA<sub>A</sub> efektu obe anestezije. Sa druge strane, dugotrajno produženje REM1 stanja nakon ketamin/diazepam anestezije, najpre usled porasta broja REM1 epizoda, a kasnije zbog porasta broja REM1 epizoda dužeg trajanja, praćeno skraćanjem REM2 epizoda (**Tabela 1; Slika 4.14.**), moglo bi se pripisati NMDA efektu ketamina.

Dugotrajne promene u EEG mikrostrukturi celokupnog REM stanja, kao i REM2 stanja (REM sa atonijom) fizioloških kontrola, su bile istovetne nakon obe anestezije: u toku celokupnog REM stanja došlo je do povećanja delta i pada beta

relativnih amplituda 6 dana nakon anestezije, istovremeno sa povećanjem delta amplitude u REM2 stanju (**Slike 4.15, 4.16. i 4.17.**). Stabilno produženje REM1 stanja nakon ketamin/diazepam anestezije (**Tabela 1.**) nisu pratile izmene u REM1 EEG mikrostrukturi motorne kore fizioloških kontrola u narednih 6 dana posle anestezije (**Slike 4.15. i 4.17. A**). Nasuprot tome, privremeno produženo REM1 stanje nakon pentobarbital anestezije bilo je praćeno dugotrajnim promenama u REM1 EEG mikrostrukturi motorne kore. Promene u REM1 EEG mikrostrukturi su se dominantno iskazale kao povećanje teta amplitude praćeno padom beta amplitude, 6 dana nakon anestezije (**Slike 4.16. i 4.17. B**).

Iako su inverzne promene teta amplitude u senzomotornoj kori nakon obe anestezije, koje su zavisne od faze spavanja, ukazale na ključnu ulogu neurohemijske regulacije NREM i REM spavanja u holinergičkoj kontroli EEG teta amplitude (**Slike 4.10. i 4.11.**), prvenstveno zbog prirodne, stanjem-zavisne razlike u aktivnosti monoaminergičkih neurona (Lazic i sar., 2015), analiza EEG mikrostrukture motorne kore kod fizioloških kontrola je pokazala da je jedino pentobarbital anestezija povećala teta amplitudu nakon anestezije, i to samo u toku REM1 faze spavanja (**Slika 4.16.**). Ovi rezultati su u skladu sa eksperimentalnim dokazima koji govore o topografski specifičnim promenama u arhitekturi spavanja, EEG mikrostrukturi svih faza spavanja i strukturi prelaznih stanja u poređenju senzomotorne i motorne kore, kako kod fizioloških kontrola, tako i u funkcionalno različitim poremećajima holinergičke inervacije (Petrovic i sar., 2013a, 2013b; Saponjic i sar., 2013). Naime, permanentno veća teta amplituda je dokazana poređenjem motorne i senzomotorne kore kod pacova, kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima mozga, kroz sve faze spavanja (Saponjic i sar., 2013).

Brojni eksperimentalni rezultati govore u prilog specifične topografije spavanja. Bilateralna lezija PPT jedra dovodi do pojave dva različita REM stanja, naročito u motornoj kori (Petrovic i sar., 2014). Pored toga, starenje prouzrokuje promene kontrole vratnih mišića u toku spavanja iz senzomotorne i motorne kore, kako kod kontrolnih (Ciric i sar., 2015), tako i kod pacova sa različitim holinergičkim neuropatologijama (Ciric i sar., 2016).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je ketamin/diazepam anestezija prouzrokovala više promena u EEG mikrostrukturi senzomotorne kore,

zajedno sa ozbiljnim poremećajem obrasca disanja (Lazic i sar., 2015). Međutim, jednako vreme potrebno za uspostavljanje stabilnog stanja anestezije, kao i dugotrajni suprimirajući efekti na poremećaje spavanja nakon anestezije u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije PB ukazuju da je ovaj anestetik potencijalno povoljniji za ulazak u anesteziju i sa povoljnijim efektom na spavanje nakon operativnih zahvata kod starih pacijenata, kao i pacijenta obolelih od Parkinsonove i Alchajmerove bolesti (Lazic i sar., 2015).

Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazan suprimirajući efekat pentobarbital anestezije na povećan broj prelaza NREM/REM/NREM nakon anestezije, uzrokovanih bilateralnom lezijom PPT jedra, nasuprot ketamin/diazepam anesteziji (Lazic i sar., 2017).

Pored toga i ketamin/diazepam i pentobarbital anestezija su poništile efekat lezije PPT jedra na EEG mikrostrukturu u toku REM spavanja (smanjena teta amplituda) koji je bio prisutan pre uvođenja u anesteziju (**Slika 4.18.**). Obe anestezije su izazvale povećanje teta amplitude u toku REM spavanja. Ovaj efekat se javio već 48 h nakon ketamin/diazepam anestezije i bio je dugotrajan, dok se ovaj isti efekat nakon pentobarbital anestezije javio kasnije, odnosno tek nakon 6 dana.

Ipak, u ovu studiju nije bila uključena ledirana grupa sa kontrolnim tretmanom (bez anestetika), s toga se ne može sa apsolutnom sigurnošću isključiti mogućnost da je povećanje REM teta amplitude nakon anestezije posledica spontanog oporavka. Međutim, naša prethodna istraživanja su pokazala da teta amplituda pada u toku REM spavanja 21 dan nakon bilateralne lezije PPT jedra, naročito u motornoj kori (Petrovic 2013b). Takođe, postoje dokazi da nema progresije holinergičkog deficita u periodu od 14 do 91 dan nakon ekscitotoksične bilateralne lezije PPT jedra izazvane mikroinfuzijom ibotenične kiseline (Ciric i sar., 2016). Međutim, treba napomenuti da su svi rezultati bilateralne lezije PPT jedra poređeni sa fiziološkom kontrolom, obzirom da prethodne studije (Petrovic i sar., 2013a; Saponjic i sar., 2013) nisu pokazale razlike između lažnih lezija i fizioloških kontrola na funkcionalnom nivou (arhitektura spavanja, EEG mikrostruktura) 14 dana nakon mikroinfuzije rastvarača (100 nl 0,1 M PBS). Takođe, u ovoj studiji nije praćen uticaj mehaničke lezije na ćelijskom nivou, kao posledica proboda mikroinfuzione igle u PPT jedro, a mikroinfuzija rastvarača nije pokazala efekte na funkcionalnom nivou (Petrovic i sar., 2013a; Saponjic i sar., 2013).

Svi navedeni dokazi, zajedno sa rezultatima ove doktorske disertacije, ukazuju da poništavanje razlike u REM teta amplitudi 48 h (ketamin/diazepam) i 6 dana (pentobarbital) nakon anestezije kod PPT lezije, predstavljaju uticaj anestezije. Dokazani suprimirajući efekat ketamin/diazepam anestezije na izmene u teta amplitudi za vreme REM faze spavanja, koje su izazvane lezijom PPT jedra (smanjenje teta amplitude), paralelno sa jednakim vremenom potrebnim za uspostavljanje stabilne anestezije kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra i fizioloških kontrola, govori u prilog da ova anestezija može biti anestezija izbora za uvođenje u anesteziju kao i za postoperativno REM spavanje u odnosu na pentobarbital anesteziju u bolestima vezanim za holinergičku neuropatologiju PPT jedra kao što je PB (Lazic i sar., 2017).

Ipak, rezultati ove doktorske disertacije su takođe pokazali da pentobarbital anestezija ima mnogo povoljnije dejstvo na REM fazu spavanja nakon anestezije u motornoj kori, kako kod fizioloških kontrola, tako i u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti na osnovu:

- dugotrajnih poremećaja REM faze spavanja i strukture prelaznih stanja kod fizioloških kontrola koje izaziva ketamin/diazepam anestezija;
- suprimirajućih efekta obe anestezije operativnog nivoa na produženu REM/REM1 fazu spavanja i poremećaj EEG mikrostrukture za vreme REM faze spavanja kod bilateralne lezije PPT jedra;
- suprimirajućeg efekta pentobarbital anestezije na povećani broj NREM/REM/NREM prelaza, uzrokovanih lezijom PPT jedra.

## ***6. Zaključci***

Na osnovu zadatih ciljeva i dobijenih rezultata ove doktorske disertacije možemo izvući sledeće zaključke o uticaju ketamin/diazepam i pentobarbital opšte anestezije operativnog nivoa na EEG mikrostrukturu i obrazac disanja u toku same anestezije, kao i na promene spavanja nakon anestezije, kako kod fizioloških kontrola tako i u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije PB (pacovi sa bilateralnom lezijom PPT jedra):

- Vreme neophodno za uspostavljanje stabilne pentobarbital anestezije operativnog nivoa bilo je značajno produženo u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra;
- Pentobarbital anestezija nije izmenila EEG mikrostrukturu motorne kore ali je dovela do smanjenja gama relativne amplitude u senzomotornoj kori kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra;
- Stabilnu pentobarbital anesteziju operativnog nivoa karakterisao je isključivo eupnejčni respiratorni obrazac. Ova anestezija je smanjila broj stabilno produženih eupnejčnih respiratornih ciklusa, usled produženja trajanja ekspiratorne faze respiratornog ciklusa, kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra;
- Stabilna ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa je izazvala ozbiljan poremećaj EEG mikrostrukture i motorne i senzomotorne kore u toku anestezije. Naime, ova anestezija je povećala relativne amplitude niskih (delta i teta u senzomotornoj kori, odn. samo delta relativna amplituda u motornoj kori) i smanjila relativne amplitude viših (sigma i beta u senzomotornoj kori, odn. samo beta relativna amplituda u motornoj kori) frekventnih opsega u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije PB;
- Ketamin/diazepam anestezija je daleko više uticala na respiratorni obrazac u odnosu na pentobarbital anesteziju kod pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra. Stabilna ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa je izazvala veoma ozbiljan poremećaj respiratornog obrasca koji se karakterisao povećanim brojem apneustičkih bradipneja/apneja respiratornih ciklusa kraćeg trajanja, usled skraćivanja obe faze respiratornog ciklusa (inspirijum i ekspirijum). Pored toga, ova anestezija je uslovlila pojavu uzdaha u respiratornom obrascu, kako kod kontrolnih, tako i kod pacova sa

lezijom PPT jedra. Respiratorni ciklusi uzdaha su takođe bili skraćenog trajanja, usled skraćenja i inspirijuma i ekspirijuma, kod pacova sa lezijom PPT jedra;

- Oba režima opšte anestezije su imala dugotrajne suprimirajuće efekte (od 48 h do 6 dana nakon anestezije) na poremećaj EEG mikrostrukture senzomotorne kore za vreme NREM faze spavanja, koji je bio uzrokovan lezijom PPT jedra. Dok je ketamin/diazepam anestezija suprimirala povećane EEG beta i teta, pentobarbital anestezija je suprimirala povećane EEG sigma i teta relativne amplitude, prouzrokovane lezijom PPT jedra;
- Iako su oba režima opšte anestezije smanjila EEG teta amplitudu senzomotorne kore u toku NREM faze spavanja nakon anestezije, njihov efekat na teta amplitudu je bio inverzan u toku REM faze spavanja, 6 dana nakon anestezije (povećanje EEG teta amplitude), u modelu holinergičke neuropatologije PB;
- Ketamin/diazepam opšta anestezija je nakon anestezije dugotrajno produžila REM stanje sa većim tonusom mišića u motornoj kori fizioloških kontrola, usled povećanja broja dužih REM1 epizoda;
- Ketamin/diazepam opšta anestezija je nakon anestezije povećala broj svih prelaznih stanja u motornoj kori kod fizioloških kontrola. Pored toga, zajednički i dugotrajni efekat oba režima opšte anestezije u fizioloških kontrola se iskazao kao porast broja budnost/NREM/budnost i budnost/REM/budnost prelaza;
- Iako je pentobarbital anestezija samo privremeno produžila REM1 fazu spavanja u motornoj kori fizioloških kontrola (48 h nakon anestezije), EEG mikrostruktura ove faze spavanja je bila dugotrajno izmenjena, i ogledala se u povećanju teta i smanjenju beta amplitude;
- Oba režima opšte anestezije su u motornoj kori kod fizioloških kontrola dugotrajno izmenile EEG mikrostrukturu (povećanje delta i smanjenje beta relativnih amplituda) celokupnog REM stanja, kao i REM stanja sa atonijom (povećanje delta relativne amplitude);

- Oba režima opšte anestezije su već nakon 48 h dugotrajno poništila sve promene arhitekture spavanja kao i dinamike epizoda svih faza spavanja u motornoj kori, koje su bile prouzrokovane lezijom PPT jedra;
- Pentobarbital anestezija je pored suprimiranja efekata lezije PPT jedra na strukturu prelaznih stanja u motornoj kori (smanjenje broja NREM/REM/NREM prelaza) smanjila i broj budnost/REM/budnost prelaza;
- Oba režima opšte anestezije su poništila efekat lezije PPT jedra na EEG mikrostrukturu motorne kore u toku REM faze spavanja, nakon anestezije, tj. povećala su lezijom smanjenu teta amplitudu.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je ketamin/diazepam anestezija operativnog nivoa izazvala ozbiljan poremećaj respiratornog obrasca i EEG mikrostrukture tokom anestezije. Međutim, jednako vreme potrebno za uspostavljanje stabilne anestezije operativnog nivoa u pacova sa bilateralnom lezijom PPT jedra, kao i dugotrajni suprimirajući efekti na povećanu NREM beta i teta amplitudu (elektrofiziološki markeri deficita holinergičkih neurona PPT jedra) nakon anestezije, ukazuju da je ova anestezija povoljniji izbor za uvod u anesteziju kao i za postoperativnu NREM fazu spavanja kod gerijatrijskih pacijenata, i pacijenata obolelih od Parkinsonove i Alchajmerove bolesti.

Takođe, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je pentobarbital anestezija povoljniji izbor za postoperativnu REM fazu spavanja, kako kod fizioloških kontrola, tako i u eksperimentalnom modelu holinergičke neuropatologije Parkinsonove bolesti na osnovu: dugotrajnih poremećaja REM faze spavanja i strukture prelaznih stanja kod fizioloških kontrola, koje izaziva ketamin/diazepam anestezija; suprimirajućih efekata obe anestezije operativnog nivoa na produženu REM/REM1 fazu spavanja i poremećaj EEG mikrostrukture za vreme REM faze spavanja kod bilateralne lezije PPT jedra; suprimirajućeg efekata pentobarbital anestezije na povećani broj NREM/REM/NREM prelaza, uzrokovanih lezijom PPT jedra; kao i na osnovu EEG mikrostrukture tokom stabilne pentobarbital anestezije, koja se ne razlikuje između fizioloških kontrola i pacova sa lezijom PPT jedra.



## ***7. Literatura***

Alheid G.F., McCrimmon D.R. (2008) The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 3–11.

Aston–Jones G., Bloom F.E. (1981) Activity of norepinephrine–containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep–waking cycle. *J Neurosci*, 1: 876–886.

Baladini F., Armentero M.T. (2012) Animal models of Parkinson’s disease. *FEBS J*, 279: 1156–1566.

Balandini F., Armentero M.T., Martignoni E. (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*, 14(Suppl. 2): S124–129.

Bezard E., Przedborski S. (2011) A tale on animal model of Parkinson’s disease. *Mov Disord*, 26: 993–1002.

Bjelobaba I., Saponjic J. (2013) High volume microinfusion suppresses local astrocytes response within the nucleus basalis of rat. *Arch Ital Biol*, 151: 24–32.

Boeve B. F. (2013) Idiopathic REM sleep behaviour disorder in the development of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol*, 12: 469–482.

Boeve B.F., Silber M.H., Saper C.B., Ferman T.J., Dickson D.W., Parisi J.E., Benarroch E.E., Ahlskog J.E., Smith G.E., Caselli R.C., Tippman-Peikert M., Olson E.J., Lin S.C., Young T., Wszolek Z., Schenck C.H., Mahowald M.W., Castillo P.R., Del Tredici K., Braak H. (2007) Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease. *Brain*, 130: 2770–2788.

Bohnen N.I., Müller M.I., Koeppe R.A., Studenski S.A., Kilbourn M.A., Fey K.A., Albin R.L. (2009) History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology*, 73: 1670–1676.

Bohnen N.I., Albin R.L. (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res*, 221: 564–573.

Bojic T., Saponjic J., Radulovacki M., Carley D.W., Kalauzi A. (2008) Monotone Signal Segments Analysis as a novel method of breath detection and breath-to-breath interval analysis in rat. *Respir Physiol Neurobiol*, 161: 273–280.

Bonhomme V., Vanhaudenhuyse A., Demertzi A., Bruno M.A., Jaquet O., Bahri M.A., Plenevaux A., Boly M., Boveroux P., Soddu A., Brichant J.F., Maquet P., Laureys S. (2016) Resting-state network-specific breakdown of functional connectivity during ketamine alteration of consciousness in volunteers. *Anesthesiology*, 125: 873–888.

Bovill J.G. (1997) Mechanisms of intravenous anesthesia. In: *Textbook of Intravenous Anesthesia*. (White P.F. ed), Baltimore: Williams & Wilkins. pp 27–46.

Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol aging*, 24: 197–211.

Braun A.R., Balkin T.J., Wesensten N.J., Carson R.E., Varga M., Baldwin P., Selbie S., Belenky G., Herscovitch P. (1997) Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle. An H<sub>2</sub><sup>15</sup>O PET study. *Brain*, 120: 1173–1197.

Brockmeyer D.M., Kendig J.J. (1995) Selective effects of ketamine on amino acid-mediated pathways in neonatal rat spinal cord. *Br J Anaesth*, 74: 79–84.

Canet J., Castillo J. (2012) Ketamine: a familiar drug we trust. *Anesthesiology*, 116: 6–8.

Carley W.D., Radulovacki M. (1999) REM sleep and apnea. In: Rapid eye movement sleep. (Mallick B., Inoue S. eds), New Delhi, India: Narosa Publishing House; pp 286–300.

Carley W.D., Radulovacki M. (2003) Pathophysiology of sleep-related breathing disorders: unanswered questions. In: Sleep-related breathing disorders: experimental models and therapeutic potential. (Carley W.D., Radulovacki M. eds), New York: Marcel Dekker Inc; pp 3–11.

Chung K.A., Lobb B.M., Nutt J.G., Horak F. (2009) Cholinergic augmentation in frequently fallings subjects with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 24(Suppl 1): S259.

Ciric J., Lazic K., Petrovic J., Kalauzi A., Saponjic J. (2015) Aging induced cortical drive alterations during sleep in rats. *Mech Ageing Dev*, 146–148: 12–22.

Ciric J., Lazic K., Petrovic J., Kalauzi A., Saponjic J. (2016) Age-related disorders of sleep and motor control in the rat models of functionally distinct cholinergic neuropathology. *Behav Brain Res*, 301: 273–286.

Datta S. (1995) Neuronal activity in the peribrachial area: relationship to behavioral state control. *Neurosci Biobehav Rev*, 19: 67–84.

Datta S. (1997) Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell Mol Neurobiol*, 17: 341–365.

Datta S., MacLean R.R. (2007) Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev*, 31: 775–824.

Dringenberg H.C., Olmstead M.C. (2003) Integrated contributions of basal forebrain and thalamus to neocortical activation elicited by pedunculopontine tegmental stimulation in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience*, 119: 839–853.

Duty S., Jenner P. (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, 164: 1357–1391.

Eikermann M., Grosse-Sundrup M., Zaremba S., Henry M.E., Bittner E.A., Hoffmann U., Chamberlin N.L. (2012) Ketamine activates breathing and abolishes the coupling between loss of consciousness and upper airway dilator muscle dysfunction. *Anesthesiology*, 116: 35–46.

Ezure K., Manabe M., Yamada H. (1988) Distribution of medullary respiratory neurons in the rat. *Brain Res*, 455: 262–270.

Ezure K., Tanaka I. (2006) Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat. *Neuroscience*, 141: 1011–1023.

Feldman J.L., Del Negro C.A. (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7: 232–242.

Feldman J.L., McCrimmon D.R. (2008) Neural Control of Breathing. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd ed. (Squire L., Berg D., Bloom F., du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. eds), Elsevier, Academic Press, London UK. pp 855–872

Fodale V., Quattrone D., Trecroci C., Caminiti V., Santamaria L.B. (2006) Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br J Anaesth*, 97: 445–452.

Fodale V., Ritchie K., Rasmussen L.S., Mandal P.K. (2010) Anesthetics and Alzheimer's disease: background and research. Preface *J Alzheimers Dis*, 22 Suppl 3: 1–3.

Franks N.P. (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*, 9: 370–386.

Garcia-Rill E. (1991) The pedunclopontine nucleus. *Prog Neurobiol*, 36: 363–389.

Garcia P.S., Kolesky S.E., Jenkins A. (2010) General anesthetic actions on GABA(A) receptors. *Curr Neuropharmacol*, 8: 2–9

Gray P.A., Rekling J.C., Bocchiaro C.M., Feldman J.L. (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzing complex. *Science*, 286: 1566–1568.

Guyenet P.G., Wang H. (2001) Pre-Bötzing neurons with preinspiratory discharges “in vivo” express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol*, 86: 438–446.

Helton M.C., Gordon S.H., Nunnery S.L. (1980) The correlation between sleep deprivation and the intensive care unit syndrome. *Heart Lung*, 9: 464–468.

Hodor A., Palchykova S., Gao B., Bassetti C.L. (2015) Baclofen and gamma-hydroxybutyrate differentially altered behavior, EEG activity and sleep in rats. *Neuroscience*, 284: 18–28.

Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R. (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 2811–2814.

Inglis W. L., Semba K. (1997) Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res*, 755: 17–27.

Krnjevic K. (1967) Chemical transmission and cortical arousal. *Anesthesiology*, 28: 100–105.

Kajimura N., Uchiyama M., Takayama Y., Uchida S., Uema T., Kato M., Sekimoto M., Watanabe T., Nakajima T., Horikoshi S., Ogawa K., Nishikawa M., Hiroki M., Kudo Y., Matsuda H., Okawa M., Takahashi K. (1999) Activity of midbrain reticular formation and neocortex during the progression of human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci*, 19: 10065–10073.

Knill R.L., Moote C.A., Skinner M.I., Rose E.A. (1990) Anesthesia with abdominal surgery leads to intense REM sleep during the first postoperative week. *Anesthesiology*, 73: 52–61.

Koch H., Caughie C., Elsen F.P., Doi A., Garcia A.J. 3rd, Zanella S., Ramirez J.M. (2015) Prostaglandin E2 differentially modulates the central control of eupnoea, sighs and gasping in mice. *J Physiol*, 593: 305–319.

Korf J., Aghajanian G.K., Roth R.H. (1973) Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of locus coeruleus. *Neuropharmacology*, 12: 933–938.

Kotagal V., Albin R.L., Müller M.L.T.M., Koeppe R.A., Chervin R.D., Frey K.A., Bohnen N.I. (2012) Symptoms of rapid eye movement sleep behavior disorder are associated with cholinergic denervation in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 7: 560–568.

Kubin L., Alheid G.F., Zuperku E.J., McCrimmon D.R. (2006) Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol*, 101: 618–627.

Kubota T., Anzawa N., Hirota K., Yoshida H., Kushikata T., Matsuki A. (1999a) Effects of ketamine and pentobarbital on noradrenaline release from the medial prefrontal cortex in rats. *Can J Anesth*, 46: 388–392.

Kubota T., Hirota K., Anzawa N., Yoshida H., Kushikata T., Matsuki A (1999b) Physostigmine antagonizes ketamine-induced noradrenaline release from the medial prefrontal cortex in rats. *Brain Res*, 840: 175–178.

Lahiri S., Roy A., Baby S.M., Hoshi T., Semenza G.L., Prabhakar N.R. (2006) Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol*, 91: 249–286.

Launois S.H., Pepin J.L., Levy P. (2007) Sleep apnea in the elderly: a specific entity? *Sleep Med Rev*, 11: 87–97.

Lazic K., Petrovic J., Ciric J., Kalauzi A., Saponjic J. (2015) Impact of anesthetic regimen on the respiratory pattern, EEG microstructure and sleep in the rat model of cholinergic Parkinson's disease neuropathology. *Neuroscience*, 304:1–13.

Lazic K., Petrovic J., Ciric J., Kalauzi A., Saponjic J. (2017) REM sleep disorder following general anesthesia in rats. *Physiol Behav*, 168: 41–54.

Lee U., Ku S., Noh G., Baek S., Choi B., Mashour G.A. (2013) Disruption of frontal–parietal communication by ketamine, propofol and sevoflurane. *Anesthesiology*, 118: 1264–1275.

Leonard C.S., Llinás R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 59: 309–330.



Li L., Vlisides P.E. (2016) Ketamine: 50 Years of Modulating the Mind. *Front Hum Neurosci*, 10:612.

Lu J., Nelson L.E., Franks N., Maze M., Chamberlin N.L., Saper C.B. (2008) Role of endogenous sleep-wake and analgesic systems in anesthesia. *J Comp Neurol*, 508: 648–662.

Lu J., Sherman D., Devor M., Saper C.B. (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*, 441: 589–594.

Lydic R., Baghdoyan H.A. (1993) Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases Ach release in the pontine reticular formation. *Am J Physiol*, 264: R544–554.

Lydic R., Baghdoyan H.A. (1999) Cellular and Molecular Mechanisms. In: *Handbook of Behavioral State Control*. Boca Raton, CRC.

Lydic R., Baghdoyan H.A. (2005) Sleep, anesthesiology, and the neurobiology of arousal state control. *Anesthesiology*, 103: 1268–1295.

Ma J., Shen B., Stewart L.S., Herrick I.A., Leung L.S. (2002) The septohippocampal system participates in general anesthesia. *J Neurosci*, 22:RC200.

Maquet P. (2000) Functional neuroimaging of normal human sleep by positron emission tomography. *J Sleep Res*, 9: 207–231.

McCarley R.W., Hobson J.A. (1975) Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*, 189: 58–60.

McKay L.C., Janczewski W.A., Feldman J.L. (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzinger complex neurons. *Nat Neurosci*, 8: 1142–1144.

Mena-Segovia J., Bolam J.P., Magill P.J. (2004) Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci*, 27: 585–588.

Moghal S., Rajput A.H., D'Arcy C., Rajput R. (1994) Prevalence of movement disorders in elderly community residents. *Neuroepidemiology*, 13: 175–178.

Monnier A., Alheid G.F., McCrimmon D.R. (2003) Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat. *J Physiol*, 548: 859–874.

Nattie E.E., Li A. (2001) CO<sub>2</sub> dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J Appl Physiol*, 90: 1247–1257.

Neikrug A.B., Ancoli-Israel S. (2010) Sleep disorders in the older adult - a mini-review. *Gerontology*, 56: 181–189

Nelson L.E., Guo T.Z., Lu J., Saper C.B., Franks N.P., Maze M. (2002) The sedative component of anesthesia is mediated by GABA(A) receptors in an endogenous sleep pathway. *Nat Neurosci*, 5: 979–984.

Nicholson G., Pereira A.C., Hall G.M. (2002) Parkinson's disease and anaesthesia. *Br J Anaesth*, 89: 904–916.

Pace-Schott E.F., Hobson J. A. (2013) The Neurobiology Of Sleep And Dreaming. In: *Fundamental Neuroscience*, 4rd ed. (Squire L., Berg D., Bloom F., du Lac S., Ghosh A., Spitzer N. eds), Elsevier, Academic Press, London UK. pp 847–869.

Papon M.A., Whittington R.A., El-Khoury N.B., Planel E. (2011) Alzheimer's disease and anesthesia. *Front Neurosci* 4: 272, 1–7.

Paxinos G., Watson C. (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, US.

Paxinos G., Watson C., Carrive P., Kirkcaldie M., Ashwell K. W. S. (2009) *Chemoarchitectonic Atlas of The Rat Brain*, 2nd ed. Academic Press, London, UK.

Perez-Lloret S., Barrantes F.J. (2016) Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *Npj Parkinson's disease*, 2: 16001.

Petrovic J., Ciric J., Lazic K., Kalauzi A., Saponjic J. (2013a) Lesion of the pedunculopontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure. *Exp Neurol*, 247: 562–571.

Petrovic J., Lazic K., Ciric J., Kalauzi A., Saponjic J. (2013b) Topography of the sleep/wake states related EEG microstructure and transitions structure differentiates the functionally distinct cholinergic innervation disorders in rat. *Behav Brain Res*, 256: 108–118.

Petrovic J., Lazic K., Kalauzi A., Saponjic J. (2014) REM sleep diversity following the pedunculopontine tegmental nucleus lesion in rat. *Behav Brain Res*, 271: 258–268.

Petrović J. (2014) Spavanje i elektroencefalografski ritmovi kao indikatori poremećaja funkcionalno različitih holinergičkih inervacija velikog mozga pacova. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Praticò C., Quattrone D., Lucanto T., Amato A., Penna O., Roscitano C., Fodale V. (2005) Drugs of anesthesia acting on central cholinergic system may cause post-operative cognitive dysfunction and delirium. *Med Hypotheses*, 65: 972–982.

Richardson J.S., Miller P.S., Lemay JS, Jyu C.A., Neil S.G., Kilduff C.J., Keegan D.L. (1985) Mental dysfunction and the blockade of muscarinic receptors in the brains of the normal elderly. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 9: 651–654.

Rosenberg J., Wildschiodtz G., Pedersen M.H., von Jessen F., Kehlet H. (1994) Late postoperative nocturnal episodic hypoxaemia and associated sleep pattern. *Br J Anaesth*, 72: 145–150.

Rosenberg-Adamsen S., Kehlet H., Dodds C., Rosenberg J. (1996) Postoperative sleep disturbances – mechanisms and clinical implications. *Br J Anaesth*, 76: 552–559.

Rosenberg J. (2001) Sleep disturbances after non-cardiac surgery. *Sleep Med Rev*, 5: 129–137.

Rosin D.L., Chang D.A., Guyenet P.G. (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol*, 499: 64–89.

Rye D.B. (1997) Contributions of the pedunculopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep*, 20: 757–788.

Sabbatini M., Bronzetti E., Felici L., Fringuelli C., Sagratella S., Amenta, F. (1999) NADPH-diaphorase histochemistry in the rat cerebral cortex and hippocampus: effect of electrolytic lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Mech Ageing Dev*, 107: 147–157.

Saponjic J., Radulovacki M., Carley D.W. (2003) Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. *Respir Physiol Neurobiol*, 138: 223–237.

Saponjic J., Cvorovic J., Radulovacki M., Carley D.W. (2005a) Serotonin and noradrenaline modulate respiratory pattern disturbance evoked by glutamate injection into pedunculopontine tegmentum of anesthetized rats. *Sleep*, 28: 560–570.

Saponjic J., Radulovacki M., Carley D.W. (2005b) Injection of glutamate into the pedunculopontine tegmental nuclei of anesthetized rat causes respiratory dysrhythmia and alters EEG and EMG power. *Sleep Breath*, 9: 82–91.

Saponjic J., Radulovacki M., Carley D.W. (2006) Modulation of respiratory pattern and upper airway muscle activity by the pedunculopontine tegmentum: Role of NMDA receptors. *Sleep Breath*, 10: 195–202.

Saponjic J., Petrovic J., Kalauzi A., Ciric J., Lazic K., Radulovacki M., Carley D.W. (2013) Sleep–state related EEG amplitude distribution in the rat model of cortical cholinergic innervation disorder. *Sleep Biol Rhythms*, 11: 105–115.

Saponjic J., Petrovic J., Ciric J., Lazic K. (2016) Disorders of sleep and motor control during the impaired cholinergic innervation in rat – relevance to Parkinson's disease. In: *Challenges in Parkinson's Disease*. (Dorszewska J., Kozubski W. eds), InTech Rijeka, Croatia, Ch. 7, pp 135–153.

Sato K., Wu J., Kikuchi T., Wang Y., Watanabe I., Okumura F. (1996) Differential effects of ketamine and pentobarbitone on acetylcholine release from the rat hippocampus and striatum. *Br J Anaesth*, 77: 381–384.

Schliebs R., Arendt T. (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 113: 1625–1644.

Schroeder K.E., Irwin Z.T., Gaidica M., Bentley J.N., Patil P.G., Mashour G.A., Chestek C.A. (2016) Disruption of corticocortical information transfer during ketamine anesthesia in the primate brain. *Neuroimage*, 134: 459–465.

Semba K., Fibiger H.C. (1989) Organization of central cholinergic systems. *Prog Brain Res*, 79: 37–63

Semba K., Reiner P.B., Fibiger H.C. (1990) Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience*, 38: 643–654.

Semba K., Fibiger H.C. (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and anterograde transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 323: 387–410.

Semba K. (1993) Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J Comp Neurol*, 330: 543–556.

Siegel J.M. (2008) Do all animals sleep? *Trends Neurosci*, 31: 208–213.

Smith J.C., Ellenberger H.H., Ballanyi K., Richter D.W., Feldman J.L. (1991) Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254: 726–729.

Song G., Yu Y., Poon C.S. (2006) Cytoarchitecture of pneumotaxic integration of respiratory and nonrespiratory information in the rat. *J Neurosci*, 26: 300–310.

Spasic S., Kalauzi A., Kesic S., Obradovic M., Saponjic J. (2011a) Surrogate data modeling the relationship between high frequency amplitudes and Higuchi fractal dimension of EEG signals in anesthetized rats. *J Theor Biol*, 289: 160–166.

Spasic S., Kesic S., Kalauzi A., Saponjic J. (2011b) Different anaesthesia in rat induces distinct inter-structure brain dynamic detected by Higuchi fractal dimension. *Fractals*, 19: 113–123.

Stein J.F. (2009) Akinesia, motor oscillations and the pedunculopontine nucleus in rats and men. *Exp Neurol*, 215: 1–4.

Stornetta R.L. (2008) Identification of neurotransmitters and co-localization of transmitters in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 18–27.

Sun Q.J., Goodchild A.K., Chalmers J.P., Pilowsky P.M. (1998) The pre-Bötzinger complex and phase-spanning neurons in the adult rat. *Brain Res*, 809: 204–213.

Takakura A.C., Moreira T.S., Colombari E., West G.H., Stornetta R.L., Guyenet P.G., (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *J Physiol*, 572: 503–523.

Takakusaki K., Habaguchi T., Saitoh K., Kohyama J. (2004) Changes in the excitability of hindlimb motoneurons during muscular atonia induced by stimulating the pedunculopontine tegmental nucleus in cats. *Neurosci*, 124: 467–480.

The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. (1999) Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep*, 22: 667–689.

Vertes R.P. (1984) Brainstem control of the events of REM sleep. *Prog Neurobiol*, 22: 241–288.

Weese-Mayer D.E., Berry-Kravis E.M., Ceccherini I. (2008) Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and sudden infant death syndrome (SIDS): kindred disorders of autonomic regulation. *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 38–48.

Whitwell J.L., Weigand S.D., Shiung M.M., Boeve B.F., Ferman T.J., Smith G.E., Knopman D.S., Petersen R.C., Benarroch E.E., Josephs K.A., Jack C.R. (2007) Focal atrophy in dementia with Lewy bodies on MRI: a distinct pattern from Alzheimer's disease. *Brain*, 130: 708–719.

Winn P. (2006) How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. *J Neurol Sci*, 248: 234–250.

Woolf N.J., Butcher L.L. (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness *Behav Brain Res*, 221: 488–498.

Xie Z., Tanzi R.E. (2006) Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. *Exp Gerontol*, 41: 346–359.

Yamakura T., Chavez-Noriega L.E., Harris R.A. (2000) Subunit-dependent inhibition of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors and other ligand-gated ion channels by dissociative anesthetics ketamine and dizocilpine. *Anesthesiology*, 92: 1144–1153.

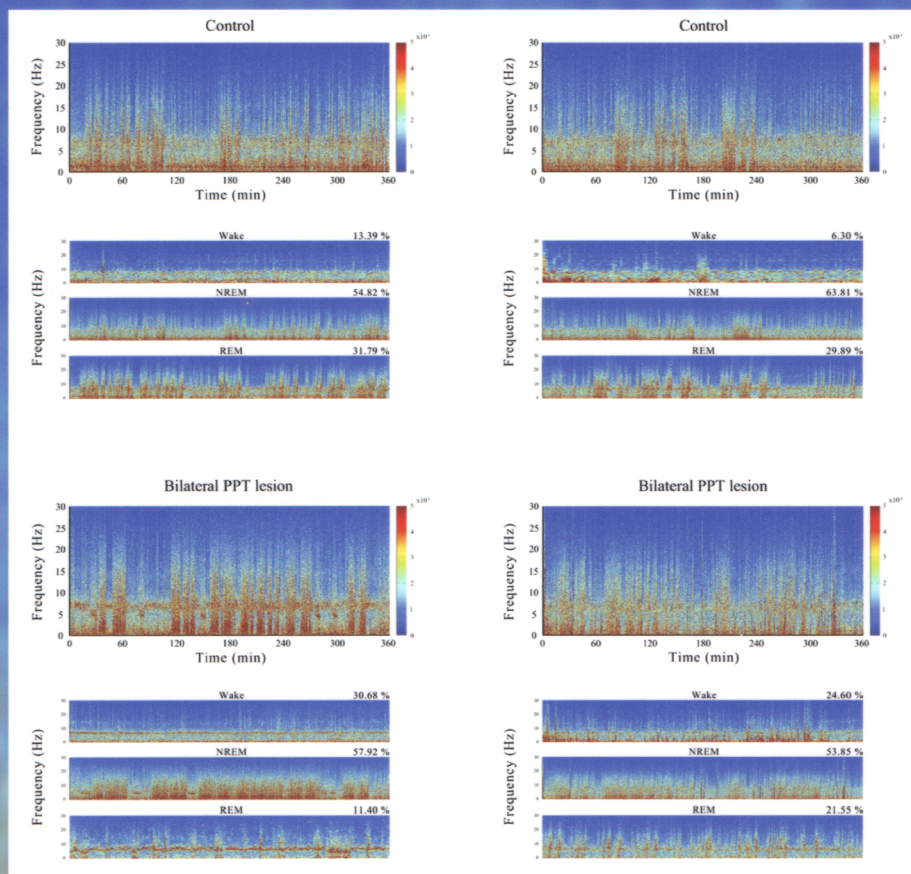
Yan M.M., Xu X.H., Huang Z.L., Yao M.H., Urade Y., Qu W.M. (2011) Selection of optimal epoch duration in assessment of rodent sleep–wake profiles. *Sleep Biol Rhythms*, 9: 46–55.



## ***8. Prilozi***

# NEUROSCIENCE

Volume 304, September 24, 2015  
ISSN 0306-4522



## Impact of Anesthetic Regimen on the Respiratory Pattern, EEG Microstructure and Sleep in the Rat Model of Cholinergic Parkinson's Disease Neuropathology

K. Lazic, J. Petrovic, J. Ciric, A. Kalauzi and J. Saponjic

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

May 15, 2017

---

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

[License Number](#)

4106460766129

[License date](#)

[Licensed Content Publisher](#)

Nature Publishing Group

[Licensed Content Publication](#)

Nature Neuroscience

[Licensed Content Title](#)

The sedative component of anesthesia is mediated by GABAA receptors in an endogenous sleep pathway

[Licensed Content Author](#)

L. E. Nelson, T. Z. Guo, J. Lu, C. B. Saper, N. P. Franks et al.

[Licensed Content Date](#)

Aug 26, 2002

[Licensed Content Volume](#)

5

[Licensed Content Issue](#)

10

[Type of Use](#)

reuse in a dissertation / thesis

[Requestor type](#)

academic/educational

[Format](#)

print and electronic

[Portion](#)

figures/tables/illustrations

[Number of figures/tables/illustrations](#)

1

[High-res required](#)

no

[Figures](#)

Fig. 1. Simplified NREM sleep-promoting pathway.

[Author of this NPG article](#)

no

[Your reference number](#)

[Title of your thesis / dissertation](#)

Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery

[Expected completion date](#)

Sep 2017

[Estimated size \(number of pages\)](#)

110

[Requestor Location](#)

Katarina Lazic

Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic

Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, 11060

Serbia

Attn: Katarina Lazic

[Billing Type](#)

Invoice

[Billing Address](#)

Katarina Lazic  
Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic  
Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, Serbia 11060  
Attn: Katarina Lazic  
[Total](#)  
0.00 USD  
[Terms and Conditions](#)

### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

**Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.**

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:  
  
Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

**Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

**Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

---

## NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 15, 2017

---

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

[License Number](#)

4106461110264

[License date](#)

Licensed Content Publisher

Nature Publishing Group

[Licensed Content Publication](#)

Nature

[Licensed Content Title](#)

A putative flip-flop switch for control of REM sleep

[Licensed Content Author](#)

Jun Lu, David Sherman, Marshall Devor, Clifford B. Saper

[Licensed Content Date](#)

May 10, 2006

[Licensed Content Volume](#)

441

[Licensed Content Issue](#)

7093

[Type of Use](#)

reuse in a dissertation / thesis

[Requestor type](#)

academic/educational

[Format](#)

print and electronic

[Portion](#)

figures/tables/illustrations

[Number of figures/tables/illustrations](#)

1

[High-res required](#)

no

[Figures](#)

Figure 3 The interrelationship of the two halves of the REM switch.

[Author of this NPG article](#)

no

[Your reference number](#)

[Title of your thesis / dissertation](#)

Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery

[Expected completion date](#)

Sep 2017

[Estimated size \(number of pages\)](#)

110

[Requestor Location](#)

Katarina Lazic

Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic

Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, 11060

Serbia

Attn: Katarina Lazic

[Billing Type](#)

Invoice

[Billing Address](#)

Katarina Lazic  
Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic  
Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, Serbia 11060  
Attn: Katarina Lazic  
[Total](#)  
0.00 USD  
[Terms and Conditions](#)

### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

**Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.**

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:  
  
Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

**Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

**Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 15, 2017

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|  |  |
|--|--|
| License Number                               | 4106480804120  |
| License date                                 |  |
| Licensed Content Publisher                   | Elsevier   |
| Licensed Content Publication                 | Behavioural Brain Research   |
| Licensed Content Title                       | Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness   |
| Licensed Content Author                      | Nancy J. Woolf,Larry L. Butcher  |
| Licensed Content Date                        | 10 August 2011   |
| Licensed Content Volume                      | 221  |
| Licensed Content Issue                       | 2  |
| Licensed Content Pages                       | 11   |
| Start Page                                   | 488  |
| End Page                                     | 498  |
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation   |
| Intended publisher of new work               | other  |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations   |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1  |
| Format                                       | both print and electronic  |
| Are you the author of this Elsevier article? | No   |
| Will you be translating?                     | Yes  |
| Number of languages                          | 1  |
| Languages                                    | Serbian  |
| Order reference number                       |  |
| Original figure numbers                      | Figure 1   |
| Title of your thesis/dissertation            | Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery |
| Expected completion date                     | Sep 2017   |
| Estimated size (number of pages)             | 110  |
| Elsevier VAT number                          | GB 494 6272 12   |
| Requestor Location                           | Katarina Lazic<br>Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic   |

Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, 11060  
Serbia  
Attn: Katarina Lazic

Total

0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

### **INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### **GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and

shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**17. For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access

articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the

user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.9

Questions? [customer care@copyright.com](mailto:customer care@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 15, 2017

---

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number

4106480454007

License date

Licensed Content Publisher

Elsevier

Licensed Content Publication

Respiratory Physiology & Neurobiology

Licensed Content Title

The chemical neuroanatomy of breathing

Licensed Content Author

George F. Alheid, Donald R. McCrimmon

Licensed Content Date

10 December 2008

Licensed Content Volume

164

Licensed Content Issue

1-2

Licensed Content Pages

9

Start Page

3

End Page

11

Type of Use

reuse in a thesis/dissertation

Intended publisher of new work

other

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

2

Format

both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article?

No

Will you be translating?

Yes

Number of languages

1

Languages

Serbian

Order reference number

Original figure numbers

Figures 1, 3

Title of your thesis/dissertation

Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery

Expected completion date

Sep 2017

Estimated size (number of pages)

110

Elsevier VAT number

GB 494 6272 12

[Requestor Location](#)

Katarina Lazic  
Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic  
Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, 11060  
Serbia  
Attn: Katarina Lazic

[Total](#)

0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows: "Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the



scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to

bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as

endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.9

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

---

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

May 15, 2017

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| License Number                        | 4107590844341  |
| License date                          |  |
| Licensed Content Publisher            | John Wiley and Sons  |
| Licensed Content Publication          | Journal of Physiology  |
| Licensed Content Title                | Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat   |
| Licensed Content Author               | A. Monnier,G.F. Alheid,D.R. McCrimmon  |
| Licensed Content Date                 | May 1, 2003  |
| Licensed Content Pages                | 16   |
| Type of use                           | Dissertation/Thesis  |
| Requestor type                        | University/Academic  |
| Format                                | Print and electronic   |
| Portion                               | Figure/table   |
| Number of figures/tables              | 1  |
| Original Wiley figure/table number(s) | Figure 1. Subregions of the ventral respiratory group(VRG) identified by the cardiorespiratory responsepatterns to DLH injection                 |
| Will you be translating?              | Yes, without English rights  |
| Number of languages                   | 1  |
| Languages                             | serbian  |
| Title of your thesis / dissertation   | Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery |
| Expected completion date              | Sep 2017   |
| Expected size (number of pages)       | 110  |
| Requestor Location                    | Katarina Lazic<br>Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic<br>Despot Stefan Blvd. 142<br><br>Belgrade, 11060<br>Serbia<br>Attn: Katarina Lazic       |
| Publisher Tax ID                      | EU826007151  |
| Billing Type                          | Invoice  |

Billing Address

Katarina Lazic  
Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic  
Despot Stefan Blvd. 142

Belgrade, Serbia 11060  
Attn: Katarina Lazic

Total

0.00 USD

Terms and Conditions

### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

#### Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such**

**editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL

APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service



of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

## **WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS**

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

### **The Creative Commons Attribution License**

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

### **Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

### **Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License**

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

### **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online

Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

## **Other Terms and Conditions:**

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customer care@copyright.com](mailto:customer care@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

## ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 24, 2017

---

---

This Agreement between Katarina Lazic ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|  |  |
|--|--|
| License Number                               | 4115311314103  |
| License date                                 | May 24, 2017   |
| Licensed Content Publisher                   | Elsevier   |
| Licensed Content Publication                 | Elsevier Books   |
| Licensed Content Title                       | Fundamental Neuroscience   |
| Licensed Content Author                      | Edward F. Pace-Schott, J. Allan Hobson   |
| Licensed Content Date                        | Jan 1, 2013  |
| Licensed Content Pages                       | 23   |
| Start Page                                   | 847  |
| End Page                                     | 869  |
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation   |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations   |
| Number of figures/tables/illustrations       | 2  |
| Format                                       | both print and electronic  |
| Are you the author of this Elsevier chapter? | No   |
| Will you be translating?                     | Yes  |
| Number of languages                          | 1  |
| Languages                                    | Serbian  |
| Order reference number                       |  |
| Original figure numbers                      | Figures 40.10 and 40.13  |
| Title of your thesis/dissertation            | Impact of general anesthesia on sleep in the experimental model of Parkinson's disease neuropathology – possible risks of postoperative recovery |
| Expected completion date                     | Sep 2017   |
| Estimated size (number of pages)             | 110  |
| Elsevier VAT number                          | GB 494 6272 12   |
| Requestor Location                           | Katarina Lazic<br>Inst for Biol Res - Sinisa Stankovic<br>Despot Stefan Blvd. 142<br><br>Belgrade, 11060<br>Serbia<br>Attn: Katarina Lazic       |

Total

0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
- Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on

ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing.

Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant

DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.9

Questions? [customer care@copyright.com](mailto:customer care@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

---

## Biografija autora

Katarina Lazić je rođena 23.04.1985. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije na Stomatološkom fakultetu u Pančevu, Univerziteta u Novom Sadu, završila je 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,60 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na smeru Neurobiologija, modul Neurofiziologija sa biofizikom je upisala 2011. godine. Od 2011. godine zaposlena je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”. Zvanje istraživač saradnik stiče 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Neurobiologija spavanja u starenju i bolesti – elektroencefalografski markeri i modeliranje u proceni poremećaja” (projekat OI 173022), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Jasne Šaponjić, naučnog savetnika.

U toku dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada Katarina Lazić je publikovala 9 radova u časopisima međunarodnog značaja, 1 poglavlje u međunarodnoj monografiji, 11 radova štampanih u izvodu kao saopštenja sa međunarodnih i 5 radova štampanih u izvodu kao saopštenja sa domaćih kongresa.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Катарина Б. Лазић

Број индекса Б3034/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај опште анестезије на спавање у експерименталном моделу холинергичке неуропатологије Паркинсонове болести – могући ризици постоперативног опоравка

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 16.05.2017.

Катарина Лазић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Б. Лазић

Број индекса Б3034/2011

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај опште анестезије на спавање у експерименталном моделу холинергичке неуропатологије Паркинсонове болести – могући ризици постоперативног опоравка

Ментор др Јасна Шапоњић, проф. Павле Анђус

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 16.05.2017.

Катарина Лазић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај опште анестезије на спавање у експерименталном моделу холинергичке неуропатологије Паркинсонове болести – могући ризици постоперативног опоравка

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 16.05.2017.

Камиљанка Лазути

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.