Spektroskopsko istraživanje utjecaja inhalacijskih anestetika na strukturu plućnog surfaktanta

Vrbanović Mijatović, Vilena

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:114532

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Vilena Vrbanović Mijatović

SPEKTROSKOPSKO ISTRAŽIVANJE UTJECAJA INHALACIJSKIH ANESTETIKA NA STRUKTURU PLUĆNOG SURFAKTANTA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Vilena Vrbanović Mijatović

SPECTROSCOPIC RESEARCH OF THE EFFECT OF INHALATIONAL ANESTHETICS ON THE STRUCTURE OF PULMONARY SURFACTANT

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ozrena Gamulina i prof. dr. sc. Ljiljane Šerman, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prije svega želim zahvaliti svojim mentorima doc. dr. sc. Ozrenu Gamulinu i prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na podršci i pomoći, stručnim savjetima i raspravama tijekom pisanja znanstvenog rada i disertacije te na vođenju kroz sve ove godine.

Veliku zahvalnost osjećam prema doc. dr. sc. Maji Balarin koja, na žalost, više nije s nama, na uvijek nesebičnoj pomoći, savjetima i pozitivnom pristupu.

Veliko hvala i doc. dr. sc. Sanji Dolanski Babić na svim savjetima koje mi je dala tijekom pisanja disertaciji te dr. sc. Kristini Serec i dr. sc. Marinu Kosoviću na pomoći oko snimanja spektara i raspravama vezanim za rezultate istraživanja.

Zahvaljujem prim. dr. Milivoju Novaku na pomoći pri nabavi Curosurfa.

Mojoj Ivani veliko hvala na svim savjetima i što mi je ukazala na ono što nam je svima nekako uspjelo promaći.

Hvala mom Davoru na svim savjetima i pomoći.

Na kraju, ogromno hvala mojim voljenim roditeljima na bezuvjetnoj podršci u svemu, uvijek, pa i kada se nisu slagali s mojim izborima. Njima posvećujem ovaj rad.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

SPEKTROSKOPSKO ISTRAŽIVANJE UTJECAJA INHALACIJSKIH ANESTETIKA NA STRUKTURU PLUĆNOG SURFAKTANTA

VILENA VRBANOVIĆ MIJATOVIĆ

Zavod za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 3, 10 000 Zagreb

Plućni surfaktant čiji sastav čine fosfolipidi i četiri proteina specifična za surfaktant, jedna je od prvih struktura izloženih utjecaju inhalacijskih anestetika. Promjene uzrokovane utjecajem anestetika mogle bi biti jedan od mehanizama nastanka respiratornih komplikacija nakon dugotrajnih anesteziooloških postupaka. U ovom je radu uporabom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) istraživan utjecaj anestetika izoflurana i sevoflurana na plućni surfaktant. Snimljeni spektri su analizirani metodom analize glavnih komponenti, a proveden je i Studentov *t*-test. Najizraženiji učinak opažen je u području polarnih glava molekula fosfolipida gdje uslijed djelovanja anestetika dolazi do prekidanja vodikovih veza, dok promjene intenziteta vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupine govore u prilog porastu nereda u području hidrofobnih repova fosfolipida. Naposlijetku, rezultati istraživanja pokazuju da se FTIR spektroskopija može s uspjehom primjenjivati u istraživanjima utjecaja anestetika na plućni surfaktant.

(91 stranica, 30 slika, 15 tablica, 160 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: inhalacijski anestetici, izofluran, sevofluran, plućni surfaktant, FTIR spektroskopija, analiza glavnih komponenti

Mentori: doc. dr.sc. Ozren Gamulin i prof. dr. sc. Ljiljana Šerman

Ocjenjivači:

prof. dr. sc. Jasna Lovrić, Medicinski fakultet Zagreb

izv. prof. dr. sc. Vesna Benković, PMF Zagreb

dr. sc. Vlasta Mohaček Grošev, viša znan. sur., IRB Zagreb

Rad prihvaćen

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

SPECTROSCOPIC RESEARCH OF THE EFFECT OF INHALATIONAL ANESTHETICS ON THE STRUCTURE OF PULMONARY SURFACTANT

VILENA VRBANOVIĆ MIJATOVIĆ

Department of Physics and Biophysics, Medical School, University of Zagreb
Šalata 3, 10 000 Zagreb

Pulmonary surfactant, consisting of phospholipids and four surfactant specific proteins is among the first structures exposed to inhalational anesthetics. Changes due to this exposure could be one of the reasons for respiratory complications after long anesthetic procedures. In this doctoral thesis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to explore the effects of isoflurane and sevoflurane on pulmonary surfactant. Recorded spectra were analysed using Principal Component Analysis and an additional Student's *t*-test was performed. The most pronounced effect was to the polar head group of phospholipids, which is in agreement with the disruption of the hydrogen bond, caused by the anesthetics. A change in the band intensities of the CH_2 stretching vibrations, indicative of a disordering effect of anesthetics on the hydrophobic tails of phospholipids was also observed. Furthermore, our results suggest that FTIR spectroscopy is a promising tool in research of anesthetic effect on pulmonary surfactant.

(91 pages, 30 figures, 15 tables, 160 references, original in Croatian)

Keywords: inhalational anesthetics, isoflurane, sevoflurane, pulmonary surfactant, FTIR spectroscopy, principal component analysis

Supervisors: doc. dr. sc. Ozren Gamulin i prof. dr. sc. Ljiljana Šerman

Reviewers:

Prof. Jasna Lovrić, PhD, Medical School Zagreb

Assoc. Prof. Vesna Benković, PhD, PMF Zagreb

Vlasta Mohaček Grošev, PhD, senior research associate, IRB Zagreb

Thesis accepted

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Literaturni pregled 3
2.1 Plućni surfaktant 3
2.1.1 Povijest istraživanja plućnog surfaktanta 3
2.1.2 Pluća i površinska napetost 4
2.1.3 Sastav plućnog surfaktanta 5
2.1.3.1 Lipidi 5
2.1.3.2 Proteini 7
2.1.4 Sinteza i sekrecija plućnog surfaktanta 8
2.1.5 Poremećaji plućnog surfaktanta 9
2.1.5.1 Sindrom respiratornog distresa novorođenčeta (IRDS) 9
2.1.5.2 Akutni sindrom respiratornog distresa (ARDS) 10
2.1.6 Liječenje surfaktantom 10
2.1.7 Ostali utjecaji na plućni surfaktant 11
2.2 Anesteziološki postupak i inhalacijski anestetici 11
2.2.1 Izofluran 12
2.2.2 Sevofluran 13
2.2.3 Utjecaj anesteziološkog postupka na pluća i plućni surfaktant 15
2.3 Osnove infracrvene spektroskopije 15
2.3.1 Vibracije fosfolipida 17
2.4 Istraživanja vezana uz inhalacijske anestetike 19
2.4.1 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na kulturu alveolarnih stanica 20
2.4.2 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipide 20
2.4.2.1 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant 20

2.4.2.2 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipidne modele 22
2.5 Primjena FTIR spektroskopije u istraživanju plućnog surfaktanta 26
3. Materijali i metode 28
3.1 Materijali 28
3.2 Priprema uzoraka 29
3.3 Metode i obrada rezultata 31
3.3.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom 31
3.3.2 Obrada spektara 32
3.3.3 Analiza glavnih komponenti (PC analiza) 32
3.3.4 Statistička obrada spektara Studentovim *t*-testom 33
4. Rezultati 34
4.1 Karakteristične vibracije u FTIR spektru Curosurfa 34
4.2 Spektri izoflurana i sevoflurana 36
4.3 Vibracije tankih filmova tretiranih uzoraka 37
4.3.1 Vibracije hidrofobnog dijela molekule fosfolipida 37
4.3.1.1 Uzorci tretirani izofluranom 37
4.3.1.2 Uzorci tretirani sevofluranom 40
4.3.2 Vibracije karbonilne skupine 43
4.3.2.1 Uzorci tretirani izofluranom 43
4.3.2.2 Uzorci tretirani sevofluranom 44
4.3.3 Vibracije polarnog dijela molekule fosfolipida 46
4.3.3.1 Uzorci tretirani izofluranom 46
4.3.3.2 Uzorci tretirani sevofluranom 48
4.3.4 Vibracije OH skupine 49
4.4 PC analiza FTIR spektara tankih filmova uzoraka 51
4.4.1 Uzorci tretirani izofluranom 52
4.4.2 Uzorci tretirani sevofluranom 53
4.5 Studentov *t*-test 55
4.5.1 Uzorci tretirani izofluranom 56
4.5.2 Uzorci tretirani sevofluranom 58
5. Rasprava 63
6. Zaključak 74
Popis literature 76
Životopis 91

Popis kratica

ARDS - akutni sindrom respiratornog distresa (engl. *acute respiratory distress syndrome*)

BAL - bronhoalveolarni lavat

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

DMPC - dimiristoilglicerofosforilkolin

DPPC - dipalmitoilfosfatidilkolin

ESR - elektronska spinska rezonancija

FTIR spektroskopija - spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

HFIP - heksafluoroizopropanol

IR - infracrveni (engl. *infrared*)

IRDS - sindrom respiratornog distresa novorođenčeta (engl. *infant respiratory distress syndrome*)

LB - lamelarno tjelešce (engl. *lamellar body*)

LPC - lizofosfatidilkolin

MAC - minimalna alveolarna koncentracija (engl. *minimal alveolar concentration*)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

NOE - nuklearni Overhauserov efekt

PC - glavna komponenta (engl. *principal component*)

PE - fosfatidiletanolamin

PG - fosfatidilglicerol

PI - fosfatidilinozitol

PS - fosfatidilserin

SM - sfingomijelin

TM - tubularni mijelin

1. UVOD

Velika je vjerojatnost da će svaki čovjek barem jednom u životu biti podvrgnut anesteziološkom postupku koji uključuje manipulaciju s mehanikom disanja i primjenu inhalacijskih anestetika čija je funkcija održavanje opće anestezije kako za kratkotrajne zahvate, tako i za zahvate koji mogu potrajati i više od 20 sati. Nepovoljan utjecaj anesteziološkog postupka na disanje posljedica je mnogih čimbenika, a neki bi mogli biti vezani uz poremećaj plućnog surfaktanta uzrokovan izlaganjem inhalacijskim anesteticima. Plućni surfaktant je površinski aktivna tvar koja se nalazi u plućnim alveolama svih sisavaca. Glavnina plućnog surfaktanta se u obliku fosfolipidnog jednosloja rasprostire duž granice zraka i vode gdje, snižavajući površinsku napetost, izravno omogućuje proces disanja. Usprkos tome, istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant iznimno su slabo zastupljena u literaturi. Dosadašnja istraživanja govore u prilog destabilizirajućem učinku inhalacijskih anestetika na fosfolipidni film plućnog surfaktanta (Enhorning i sur., 1986., Lalchev i sur., 1992.), dok se posljednjih godina govori i o utjecaju anestetika na promjenu sastava surfaktanta kao jednom od uzroka pogoršanja mehanike disanja i nastanka alveolarnog kolapsa (Malacrida i sur., 2014.). Značajno veći broj istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipide proveden je na membranama (Trudell i Hubbell, 1976., Koehler i sur., 1977., Franks i Lieb, 1979., Simon i sur., 1979., Yoshida i sur., 1984. i 1989., Craig i sur., 1987., Tsai i sur., 1987 i 1990., Baber i sur., 1995., North i Cafiso, 1997., Tang i sur., 1997., Tu i sur., 1998., Ueda i Yoshida, 1999., Koubi i sur., 2000. i 2001., Pickholz i sur., 2005.). Membrane su sastavom slične plućnom surfaktantu pa se spoznaje proizašle iz tih istraživanja mogu djelomično primjeniti i na plućni surfaktant. Rezultati ovih istraživanja su, međutim, oprečni, a među istraživačima još uvijek ne postoji konsenzus o načinu i mjestu djelovanja inhalacijskih anestetika na fosfolipide.

Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj dva, u današnje vrijeme najčešće primjenjivana inhalacijska anestetika, izoflurana i sevoflurana na fosfolipidnu komponentu plućnog

surfaktanta, budući da upravo ta komponenta nosi glavni dio odgovornosti za površinsku aktivnost plućnog surfaktanta.

Hipoteza ovog istraživanja, temeljena na rezultatima dosadašnjih istraživanja i na preliminarnim rezultatima ovog istraživanja na modelu plućnog surfaktanta jest da inhalacijski anestetici imaju utjecaj na strukturu plućnog surfaktanta.

U istraživanju je primjenjena infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared*, FTIR), metoda koja omogućava identifikaciju tvari usporedbom spektara, izravno svjedočenje o strukturi tvari kao i kvantitativnu analizu uzorka (Günzler i Gremlich, 2003.), a uspješno je primjenjivana u istraživanjima plućnog surfaktanta (Mautone i sur., 1987., Dluhy i sur., 1989., Das i sur., 1995., Das i sur., 1997., Knells i sur., 1995., McCrae i sur. 2001.). Rezultati su obrađeni na dva načina: metodom analize glavnih komponenti i Studentovim *t*-testom.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Plućni surfaktant

Plućni surfaktant je površinski aktivan lipoproteinski kompleks koji se nalazi u plućnim alveolama na granici zraka i vode. Njegova uloga je snižavanje površinske napetosti u alveolama pluća čime se sprječava njihovo kolabiranje na kraju izdisaja te olakšava prijenos plinova (Bourbon, 1991.). Sinteza plućnog surfaktanta odvija se u alveolarnim stanicama tipa II. U plućima fetusa prisutnost surfaktanta neophodna je za izvođenje prvog udisaja. Njegova deficijencija, često prisutna u nerazvijenim plućima nedonoščadi, može dovesti do sindroma respiratornog distresa novorođenčeta, dok je u odraslih sindrom respiratornog distresa uzrokovan s više čimbenika koji mogu uključivati i poremećaj plućnog surfaktanta uslijed dugotrajne mehaničke ventilacije i opće inhalacijske anestezije. Pluća, čija respiratorna površina iznosi čak do 80 m^2 (Weibel, 1963.), jedna su od prvih struktura koja dolazi u doticaj s plinovima iz okoliša pa tako i s inhalacijskim anesteticima koji, da bi ušli u krvotok, moraju prijeći i sloj plućnog surfaktanta.

2.1.1 Povijest istraživanja plućnog surfaktanta

Plućni surfaktant je predmet proučavanja već gotovo 90 godina. Počeci istraživanja sežu u 1929. godinu kada je von Neergard objavio znanstvene rezultate o razlici tlaka potrebnoj da se ekspandiraju pluća ispunjena zrakom odnosno tekućinom, donoseći zaključak da plućne alveole posjeduju sposobnost snižavanja prirodno velike površinske napetosti na granici zraka i vode (von Neergaard, 1929.). Thannhauser i suradnici su 1946. godine objavili da tkivo pluća ima visok sadržaj lipida dipalmitil lecitina (Thannhauser i sur., 1946.) kojeg danas nazivamo DPPC. Pattle je 1955. godine predložio da mjehur sastavljen od materijala iz pluća održava stabilnost pomoću površinski aktivnog materijala (Pattle, 1955.). Nekoliko godina kasnije Clements i suradnici teoretiziraju o ulozi surfaktanta kod stabilizacije pluća (Clements i sur., 1958.).

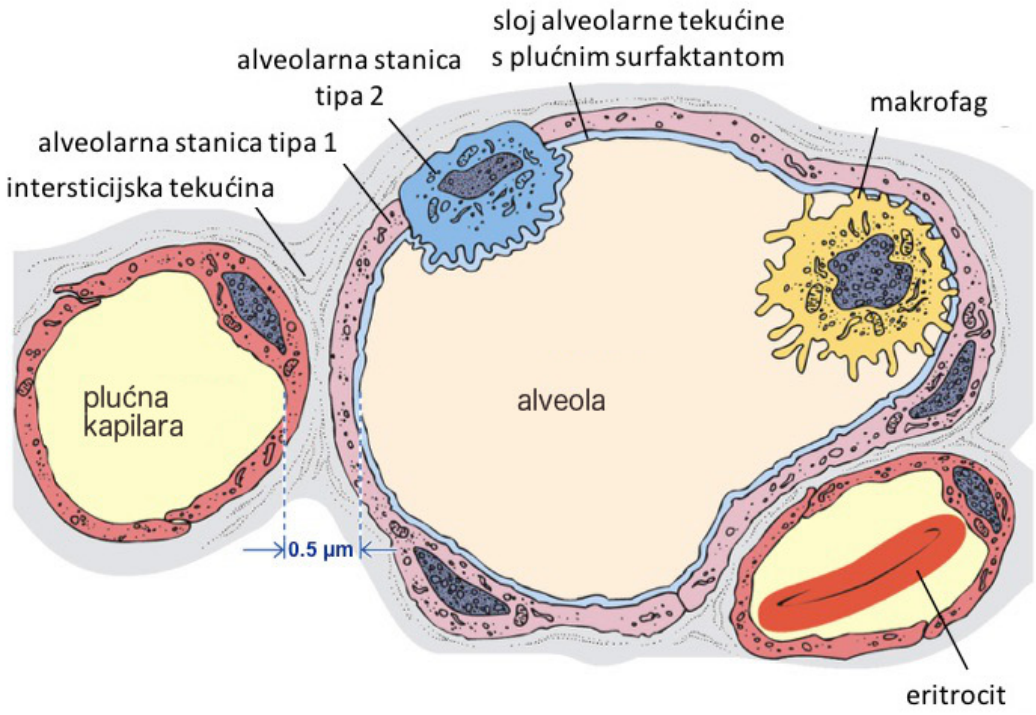
Clementsova je grupa također prvi put istraživala svojstvo snižavanja površinske napetosti nekih lipida te otkrila da je frakcija lipida koja u tome sudjeluje fosfolipidna. Objavili su i da je sintetski DPPC sličan fosfolipidima izoliranim iz goveđih pluća (Klaus i sur., 1961.).

Avery i Mead su 1959. godine objavili istraživanje o povezanosti visoke površinske napetosti u alveolama pluća s nastankom bolesti hijalinih membrana (danas poznate kao respiratorni distresni sindrom novorođenčadi) u prijevremeno rođene djece (Avery i Mead, 1959.). Mjereći površinsku napetost ekstrakta pluća nedonoščadi i djece koja su bolovala od bolesti hijalinih membrana dolaze do podatka da je ona viša od očekivane. Zaključuju da bi deficijencija površinski aktivnog materijala u plućima te djece mogla biti značajna za patogenezu bolesti hijalinih membrana. 1967. godine dokazano je da se DPPC stvara tijekom razvoja pluća te izlučuje u alveolarni prostor (Gluck i sur., 1967.), a 1973. godine objavljeno je istraživanje koje govori o mogućoj važnosti proteina kao dijelova plućnog surfaktanta (King i sur., 1973.). Dvije godine kasnije ukazuje se na važnost fosfatidilglicerola kao sastavnog dijela surfaktanta te govori o njegovom manjku u djece koja boluju od IRDS-a (Hallman i sur., 1975.). Nomenklatura proteina surfaktanta predložena je 1988. godine: SP-A, SP-B i SP-C (Possmayer, 1988.). Ubrzo je otkriven i četvrti protein surfaktanta nazvan, u skladu s nomenklaturom, SP-D (Persson i sur., 1989.). Prekretnicu predstavlja 1980. godina kada je provedeno prvo uspješno ispitivanje primjene surfaktanta u terapiji IRDS-a (Fujiwara i sur., 1980.). Od tada je primjena surfaktanta vrlo uspješno uvedena kao terapijski postupak (Schwartz i sur., 1994.), a koristi se i danas.

2.1.2 Pluća i površinska napetost

Izmjena plinova u plućima događa se u alveolama (Slika 2.1). Tkivo pluća obujma 1 cm^3 ima 300 cm^2 površine dostupne za izmjenu plinova (Creuwels i sur., 1997). Kisik difundira iz alveola u plućne kapilare, a ugljični dioksid napušta kapilare i difundira u alveole. Alveole imaju oblik mjehura čija je unutarnja površina dijelom obložena slojem tekućine. Privlačne sile vodikovih veza među molekulama unutarnje vlažne površine alveole stvaraju površinsku napetost zbog koje alveola ima tendenciju kolabiranja na kraju izdisaja. Ovu tendenciju značajno umanjuje prisutnost plućnog surfaktanta, površinski aktivne tvari koja, snižavajući površinsku napetost, omogućava udisaj, a nalazimo ga u plućima svih sisavaca. Snižavajući površinsku napetost, plućni surfaktant značajno smanjuje rad uložen u proces disanja i povećava plućnu popustljivost čime izravno utječe na mehaniku disanja. Također, održava

veliku unutarnju površinu pluća (oko 1 m^2 na 1 kg tjelesne mase) čime se postiže kvalitetnija izmjena plinova u plućima te stabilizira iznimno tanku (1 μm) barijeru krv-plin. Snižavajući permeabilnost pluća smanjuje mogućnost nastanka plućnog edema. Plućni surfaktant sudjeluje i u obrani pluća od mikrobioloških organizama.



Slika 2.1 Ilustracija presjeka kroz plućnu alveolu.

(slika preuzeta s http//:images.slideplayer.us/1/225701/slide/slide_26.jpg**)**

2.1.3 Sastav plućnog surfaktanta

Evolucijski gledano, molekulski sastav surfaktanta visoko je homologan u svih vrsta koje ga posjeduju (Possmayer i sur., 1984.; Cockshutt i Possmayer, 1992.). Sastoji se od dvije skupine makromolekula: lipida i proteina specifičnih za surfaktant (engl. *surfactant proteins,* SP).

2.1.3.1 Lipidi

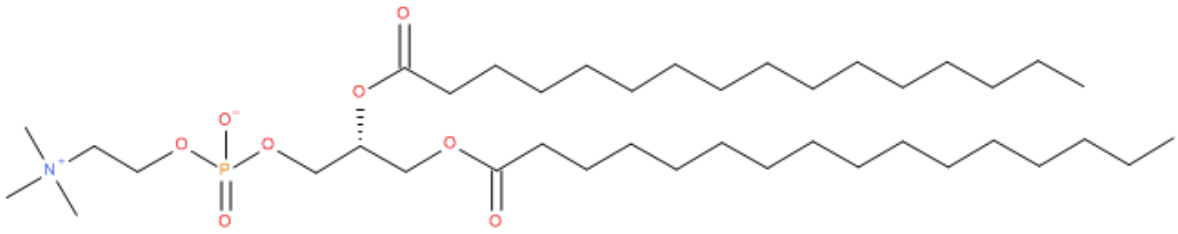
Lipidi čine približno 90 % sastava surfaktanta, a većinom su fosfolipidi. Ostali lipidi koje nalazimo u surfaktanu su: kolesterol čiji je udio 2,4 % masenog udjela ukupnog sastava surfaktanta (Possmayer i sur., 1984.), triacilglicerol i slobodne masne kiseline.

Fosfatidilkolin je najzastupljenija komponenta surfaktanta s udjelom od 70 - 80 % od ukupne količine lipida. On je svojim većim udjelom prisutan u obliku dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) (Slika 2.2). DPPC je glavna površinski aktivna komponenta plućnog surfaktanta (Batenburg, 1992.; Holm i sur., 1996), primarno odgovoran za sudjelovanje u smanjivanju površinske napetosti na vrlo niske vrijednosti.

Fosfatidilglicerol (PG) čini 7 - 15 % ukupne količine fosfolipida, pri čemu je 17 - 38 % u obliku dipalmitoila (Funkhouser i sur., 1981.; Veldhuizen i sur., 2004.; Possmayer, 2004.). Njegova uloga nije sasvim pojašnjena no pretpostavlja se da sudjeluje u održanju stabilnosti alveole, a novija istraživanja govore da regulira prirođeni imuni odgovor te da posjeduje antiviralnu aktivnost (Numata i sur., 2010.; Kandasamy i sur. 2011.; Numata i sur., 2012.; Kuronuma i sur., 2009).

Preostali fosfolipidi su fosfatidiletanolamin (PE, oko 5 %), fosfatidilinozitol (PI, oko 3 %) te fosfatidilserin (PS), lizofosfatidilkolin (LPC) i sfingomijelin (SM) koji zajedno čine manje od 2 % (Cockshutt i sur., 1992.; Goerke, 1974).

Fosfolipidi su amfifilne molekule građene od hidrofilnog (tzv. glave) i hidrofobnog dijela (tzv. repa) zajedno vezanih molekulom glicerola. Hidrofobni rep je građen od dva lanca masnih kiselina, a hidrofilna glava od fosfatne skupine na koju se dalje mogu vezati jednostavne molekule, pa je tako kod fosfatidilkolina na nju vezan kolin. Glicerol je za lance masnih kiselina vezan esterskim vezama i to se područje u literaturi na engleskom naziva *interfacial region*. Rep fosfolipida je najčešće građen od jedne zasićene i jedne nezasićene masne kiseline. Molekula DPPC-a je iznimka od ovog pravila budući da sadrži dva lanca palmitinske kiseline koja je zasićena masna kiselina.



Slika 2.2 Molekula dipalmitoilfosfatidilkolina

2.1.3.2 Proteini

Proteini čine približno 10 % sastava surfaktanta. Opisana su četiri proteina specifična za surfaktant (Johansson i sur., 1994.), a dijelimo ih u dvije skupine. Prvu skupinu predstavljaju hidrofilni proteini SP-A i SP-D čija je uloga pretežno imunološka, dok oni druge skupine, hidrofobni proteini SP-B i SP-C, sudjeluju u stvaranju i održavanju filma surfaktanta. Proteine surfaktanta nalazimo gotovo isključivo u plućima.

SP-A je glikoprotein iz porodice kolektina i najzastupljeniji je protein surfaktanta. Molekulska masa monomera ovog proteina iznosi 28 – 36 kDa, dok SP-A izoliran iz bronhoalveolarnog lavata (BAL) ima molekulsku masu 650 kDa (McCormack i sur., 1997.; Hawgood i Shiffer, 1991.). Funkcije su mu raznovrsne pa tako sudjeluje u formaciji tubularnog mijelina (TM) te posreduje unos i ponovno iskorištavanje surfaktanta u alveolarnim stanicama tipa II (Rooney i sur., 1994.). Također djeluje kao sudionik u negativnoj povratnoj sprezi inhibirajući sintezu fosfolipida (Wright i sur., 1991.). Sudjeluje i u prirođenom imunom odgovoru (Wright, 2004.) te potencijalno ima zaštitnu ulogu u održavanju integriteta surfaktanta kod ozljede pluća (Chabot i sur., 2003.).

SP-D je glikoprotein molekulske mase 43 kDa. Regulira metabolizam surfaktanta u alveolarnim stanicama tipa II. Kao i SP-A, također je protein prirođenog imunog odgovora organizma. Pospješuje endocitozu patogenih organizama putem makrofaga (Hogenkamp i sur., 2007.), stimulira fagocitozu i kemotaksiju te regulira citokine i proizvodnju slobodnih radikala (Wright, 2004.).

SP-B je homodimer molekulske mase 18 kDa koji pospješuje brzu disperziju lipida u jednosloj na granici tekućine i zraka (Kuroki i sur., 1988.), a sudjeluje i u stvaranju TM-a (deMello i sur., 1994.; Scott, 2004.). Mutacija gena odgovornog za sintezu ovoga proteina kao i prirođeni nedostatak proteina SP-B onemogućuju proces stvaranja komponenti surfaktanta i u ljudi su smrtonosni (Cutz i sur., 2000.).

SP-C je nepolarni protein sekundarne strukture alfa-zavojnice molekulske mase 4,2 kDa, a sudjeluje u stvaranju i održavanju filma surfaktanta.

2.1.4 Sinteza i sekrecija plućnog surfaktanta

Sinteza plućnog surfaktanta u ljudi započinje oko 26. i traje do 35. tjedna trudnoće. Sazrijevanje pluća kao i proizvodnja plućnog surfaktanta stimulirana je raznim čimbenicima poput glukokortikoida, hormona štitnjače, estrogena i drugih čimbenika rasta (Ballard, 1986.; Post i van Golde, 1988.).

Surfaktant se sintetizira, pohranjuje, izlučuje i reciklira u alveolarnim stanicama – pneumocitima tipa II. Sinteza započinje na slobodnim ribosomima u citoplazmi i nastavlja se u lumenu endoplazmatskog retikuluma nakon čega surfaktant biva transportiran i skladišten u lamelarnim tjelešcima (engl. *lamellar body*, LB). LB sadrži koncentrične, gusto pakirane lamele sačinjene od DPPC-a u čijem pakiranju važnu ulogu ima SP-B. Fosfolipidni sastav LB-a vrlo je sličan sastavu međustaničnog matriksa (Adachi i sur., 1989.; Jobe i sur., 1980.; Oulton i sur., 1986.). U membranama pneumocita tipa II odgovornih za sintezu LB-a nalaze se transmembranski proteini koje svrstavamo u ABC (engl. *ATP binding cassete*) transportere. Ove molekule imaju domenu na koju se vezuje adenozin-trifosfat (ATP) što osigurava energiju potrebu za transport lipida koji ulaze u sastav ovih tjelešaca (Yamano i sur., 2001.). Proteini SP-B i SP-C se nakon obrade u Golgijevom tjelešcu prenose do LB-a multivezikularnim tjelešcima dok se fosfolipidi do LB-a prenose direktno (Veldhuizen i Possmayer, 2004.), a jedan od predloženih mehanizama je autofagija (Lajoie i sur., 2005.).

Spajanjem LB-a sa staničnom membranom započinje egzocitoza surfaktanta iz alveolarnih stanica tipa II u izvanstanični prostor plućne alveole. Ovaj proces također pospješuju ABC prijenosnici prvenstveno ABCA3 (engl. *ATP-binding cassette sub-family A member 3*) koji se nalazi na vanjskoj membrani LB-a alveolarnih stanica tipa II (Cheong i sur., 2006.; Kaltenborn i sur. 2012.). Mutacije gena za ABCA3 uzrokuju poremećaje u sintezi i obradi surfaktanta (Fitzgerald i sur. 2007.) te posljedično, zbog njegova nedostatka, dovode do smrti novorođenčadi.

S prvim udahom nakon rođenja naglo se povećava sekrecija surfaktanta. Nakon izlučivanja iz alveolarnih stanica tipa II, LB se u prisustvu SP-A velikom brzinom transformira u TM, jedinstvenu rešetkastu strukturu koja na granici zraka i tekućine također velikom brzinom formira površinski aktivan film (Metcalfe i sur., 1980.; Enhorning i Possmayer, 1980.; Williams, 1982.).

Iskorišteni surfaktant stanica razgrađuje na gradivne komponente. Dio tih makromolekula se endocitozom vraća u alveolarne stanice tipa II te, ili ponovo ugrađuje u LB i iskorištava (Zimmermann i sur., 2005.), ili biva razgrađen pomoću makrofaga (Zimmermann i sur., 2005.; Wright i Dobbs, 1991.).

2.1.5 Poremećaji plućnog surfaktanta

Avery i Mead (1959.) su prvi opazili da nedostatan površinski aktivan materijal uzrokuje previsoku površinsku napetost na granici tekućine i zraka u alveolama pluća novorođenčadi oboljele od bolesti tada poznate kao bolest hijalinih membrana. Danas znamo da poremećaje koji dovode do nedostatka u sintezi plućnog surfaktanta možemo povezati s patofiziologijom nekoliko plućnih bolesti.

2.1.5.1 Sindrom respiratornog distresa novorođenčeta (IRDS)

U djece rođene prije termina, zbog nerazvijenosti alveolarnih stanica tipa II može doći do nedostatne proizvodnje plućnog surfaktanta što uzrokuje bolest koju nazivamo sindromom respiratornog distresa novorođenčeta (engl. *infant respiratory distress syndrome*, IRDS).

Vjerojatnost nastanka IRDS-a može se predvidjeti mjerenjem plućne popustljivosti u odnosu na dob trudnoće (Bhutani i Abbasi, 1992.; Silver i sur., 1993.) kao i analizom surfaktanta u amnionskoj tekućini (Gluck i sur., 1967.; Gluck i sur., 1971.).

Genetički čimbenici također igraju značajnu ulogu kod nastanka IRDS-a (Lankenau, 1976.) što i terminsku djecu čini podložnom razvoju IRDS-a. Većina genetičkih poremećaja surfaktanta vezana je uz mutacije gena za proteine SP-B i SP-C te prijenosnik fosfolipida ABCA3. Mutacije gena za SP-B su povezane s fatalnim IRDS-om (Nogee, 2004.), a one za SP-C s intersticijskom bolesti pluća (Nogee i sur., 2002.; Nerelius i sur., 2008.; Zarbock i sur., 2012.).

Do nerazvijenosti pluća, pa samim time i nedostatne proizvodnje surfaktanta, mogu dovesti i neka stanja uslijed kojih dolazi do kompresije pluća poput dijafragmalne hernije ili kroničnog oligohidramniona (Wilcox i sur., 1996.).

2.1.5.2 Akutni sindrom respiratornog distresa (ARDS)

Poremećaji u sintezi surfaktanta mogu se naći i u odraslih, najčešće u sklopu akutnog sindroma respiratornog distresa (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) te akutne ozljede pluća (Cogo i sur., 2007.). Najčešći uzroci ARDS-a su upala pluća i sepsa.

U bolesnika s ARDS-om zamjećen je manjak fosfatidilkolina i PG-a te povećanje količine PI-a, PE-a, LPC-a i SM-a (Gregory i sur., 1991.).

Kod respiratornih infekcija, promjena u sastavu surfaktanta posljedica je razgradnje surfaktanta i inhibicije njegove biosinteze ili poremećene sekrecije (Alcorn i Wright, 2004.; Wright, 2004.; Henderson i sur., 2006.; Wu i sur., 2007.; Miakotina i sur., 2007.; Glasser i Mallampalli, 2012.). *P. aeruginosa* negativno utječe na funkciju surfaktanta bilo da stimulira razgradnju SP-A i SP-D ili inhibira transkripciju gena *CCTα* (engl. *choline-phosphate cytidylyltransferase A*) uključenog u proces sinteze fosfatidilkolina (Glasser i sur., 2012.). Adenovirusi uzrokuju promjene u fosfolipidnom sastavu surfaktanta (Glasser i sur., 2012.). Negativan utjecaj patogenih organizama na stvaranje plućnog surfaktanta mogao bi biti i putem aktivacije imunog odgovora i otpuštanja citokina domaćina (Agassandian i Mallampalli, 2013.).

Poremećena funkcija surfaktanta prisutna je i kod drugih bolesti pluća poput cistične fibroze, kronične opstruktivne bolesti pluća i astme (Kurashima i sur., 1991.; Hull i sur., 1997.).

2.1.6 Liječenje surfaktantom

Meta analiza randomiziranih istraživanja egzogenog surfaktanta je pokazala da on dramatično poboljšava ili prevenira respiratorno zatajenje nakon što je primijenjen u dišni put kod IRDS-a ili kod djece rođene značajno prije termina (Merritt i sur., 1993.).

Istraživanja su također pokazala da surfaktant životinjskog podrijetla koji sadrži SP-B i SP-C učinkovitije snižava mortalitet nego komercijalno dostupni sintetski surfaktanti koji ne sadrže proteine (Halliday, 1997.).

Kod ARDS-a, egzogeni surfaktant ublažava kliničku sliku respiratornog zatajenja (Hartog i sur., 1999.).

Primjena surfaktanta koji sadrži hidrofobne proteine snižava mortalitet od ARDS-a (Gregory i sur., 1997.).

2.1.7 Ostali utjecaji na plućni surfaktant

Duhanski dim ima negativan utjecaj na fosfolipide surfaktanta budući da sadrži između 2000 i 4000 spojeva među kojima su organski i anorganski toksini koji mogu vršiti toksični učinak na pluća i uzrokovati promjene surfaktanta (Scott, 2004.). Komponente dima mijenjaju sposobnost surfaktanta da snižava površinsku napetost, reduciraju količinu DPPC-a i povećavaju količinu PE-a i SM-a. Duhanski dim utječe i na razvoj pluća, sintezu i sekreciju surfaktanta (Scott, 2004.).

Aerosolni detergenti kao i produžena izloženost visokim koncentracijama kisika mogu također povećati permeabilnost bioloških membrana (Tobin i sur., 2000.).

2.2 Anesteziološki postupak i inhalacijski anestetici

Počeci primjene anestezije sežu u 1846. godinu kada je američki stomatolog William Morton bolesniku bezbolno izvadio zub dajući mu da prethodno udiše eter (Morton, 1850.). Spoj je otprije bio poznat, a do tada se koristio u razonodne svrhe. Počeci primjene anestezije nisu bili samo začeci anesteziološke struke, već su bili prekretnica u razvoju kirurške struke koja je do tada bila vrlo ograničenih mogućnosti.

Anesteziju dijelimo na tri vrste: lokalnu, regionalnu i opću anesteziju. Opća anestezija je promijenjeno fiziološko stanje koje podrazumijeva reverzibilno oduzimanje bolesnikove svijesti, amneziju, analgeziju te određeni stupanj mišićne relaksacije (Butterworth, 2013.). Tijek opće anestezije se dijeli u tri dijela: uvod u anesteziju, održavanje anestezije i buđenje. Uvod u anesteziju se najčešće postiže intravenskim anesteticima a nešto rjeđe inhalacijskim anesteticima. Održavanje anestezije se najčešće postiže inhalacijskim, a puno rjeđe intravenskim anesteticima.

Inhalacijski anestetici su lako hlapljive tekućine koje na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku prelaze u pare. Inhalacijski anestetici uključuju inertne elemente poput ksenona, jednostavne anorganske spojeve poput dušičnog oksidula, halogenirane ugljikohidrate poput halotana te etere kao što su desfluran, izofluran i sevofluran. Putem posebnih raspršivača koji su sastavni dijelovi anesteziooloških strojeva dodaju se u smjesu plinova koja se zatim sustavom cijevi dovodi do pluća bolesnika gdje udisanjem ulaze u organizam. Prelaskom alveolo-kapilarne membrane ulaze u krvotok kojim dolaze u sva tkiva, a posebno u središnji živčani

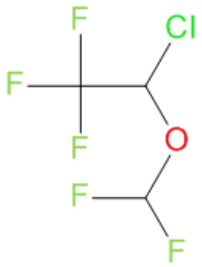
sustav koji je ciljno mjesto djelovanja. Djeluju sistemski izazivajući depresiju središnjeg živčanog sustava, kardiovaskularnog sustava i disanja te hipotenziju i miorelaksaciju (Butterworth, 2013.). Točan mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika još uvijek nije do kraja razjašnjen. Novija istraživanja potvrđuju pretpostavke o molekulskom utjecaju anestetika na sinapsu i protok neurotransmitera (Baumgart i sur., 2015.).

Volumni udio inhalacijskog anestetika potreban da bolesnika održi u anesteziji izražava se kao minimalna alveolarna koncentracija (engl. *minimal alveolar concentration*, MAC). MAC je onaj volumni udio inhalacijskog anestetika u smjesi plinova pri kojoj 50 % osoba neće odgovoriti na standardni kirurški podražaj (Goodman i sur., 2006.). MAC je različit za različite anestetika, a ovisi o dobi bolesnika te raznim promjenama fiziologije bolesnika. Na MAC utječe i kombiniranje inhalacijskih anestetika s drugim anesteziološkim lijekovima.

Inhalacijski anestetici se iz organizma izlučuju većinom nepromijenjeni u smjesi izdahnutih plinova.

2.2.1 Izofluran

Izofluran je inhalacijski opći anestetik, nezapaljiv u koncentracijama koje se primjenjuju za anesteziranje. Po kemijskom je sastavu 1-kloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil eter (Slika 2.3).



Slika 2.3 Strukturna formula izoflurana

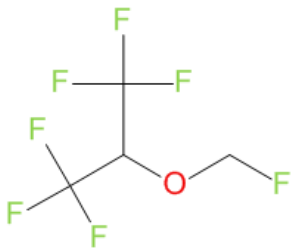
Primjenjuje se u djece i odraslih za uvod i održavanje opće anestezije. Doza se određuje individualno za svakog bolesnika ovisno o bolesnikovoj dobi i kliničkom stanju, a anestezija se postiže unutar 7 do 10 minuta. Za održavanje kirurške anestezije primjenjuju se doze od 0,5 do 2,5 % u smjesi s dušikovim oksidulom i kisikom ili u smjesi sa zrakom i kisikom. Buđenje nastupa oko deset minuta nakon prestanka primjene izoflurana.

Izofluran se vrlo malo metabolizira u organizmu, u mokraći prethodno anesteziranih bolesnika se u obliku metabolita nađe tek oko 0,17 % apsorbirane doze izoflurana (Sažetak opisa svojstava lijeka Foranea).

U usporedbi sa sevofluranom uzrokuje nešto izraženiju, o dozi ovisnu, depresiju kardiovaskularnog i dišnog sustava. Može izazvati oštećenje jetre, a kod bolesnika s neuromuskularnim bolestima porast kalija u serumu i aritmiju. Uzrokuje preosjetljivost miokarda na adrenalin. Uočeno je i povećanje broja bijelih krvnih stanica. Sa suhim ugljičnim dioksidom može ući u interakciju uz stvaranje ugljičnog monoksida. Tijekom anestezije izofluranom dolazi do minimalnog povišenja serumskih koncentracija anorganskog fluorida (Sažetak opisa svojstava lijeka Foranea) .

2.2.2 Sevofluran

Sevofluran je inhalacijski opći anestetik. Nezapaljiva je, kemijski stabilna, lako hlapljiva tekućina. Po kemijskom je sastavu 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-fluorometoksipropan (Slika 2.4).



Slika 2.4 Strukturna formula sevoflurana

Primjenjuje se u djece i u odraslih za uvod i održavanje opće anestezije. Doza se određuje individualno za svakog bolesnika ovisno o bolesnikovoj dobi i kliničkom stanju, a anestezija se postiže unutar nekoliko minuta. Za održavanje kirurške anestezije primjenjuju se doze od 0,5 do 3 % u smjesi s dušičnim oksidulom i kisikom ili u smjesi sa zrakom i kisikom. Buđenje također nastupa unutar nekoliko minuta nakon prestanka primjene sevoflurana.

Sevofluran se najvećim dijelom izlučuje putem pluća. U ljudskom se organizmu metabolizira manje od 5 % sevoflurana. Defluorira se posredstvom citokromnog izoenzima p450(CYP)2E1

uz posljedično stvaranje heksafluoroizopropanola (HFIP) i oslobađanje anorganskog fluorida te ugljikova dioksida. HFIP se zatim konjugira s glukuronskom kiselinom i izlučuje mokraćom.

Sevofluran u velikog broja bolesnika uzrokuje o dozi ovisnu depresiju kardiovaskularnog i dišnog sustava dok su ostale nuspojave poput mučnine, povraćanja i drhtavice te aritmija rjeđe (Sažetak opisa svojstava lijeka Sevoranea).

Najvažnije fizikalne konstante inhalacijskih anestetika izoflurana i sevoflurana su navedene u Tablici 2.1 (preuzeto iz Sažetaka opisa svojstava lijekova Foranea i Sevoranea).

Tablica 2.1 Najvažnije fizikalne konstante izoflurana i sevoflurana (preuzeto iz Sažetaka svojstava lijekova Foranea i Sevoranea)

	izofluran	sevofluran
relativna molekulska masa	184,5	200,5
vrelište pri 760 mmHg	48,5 °C	58,6 °C
specifična masa pri 20 °C	1,5	1,520 - 1,525
tlak para (mmHg)		
pri 20 °C	238	157
pri 25 °C	295	197
pri 35 °C	450	
pri 36 °C		317
koeficijent razdvajanja faza (srednja vrijednost) pri 37 °C		
voda / plin	0,61	0,36
krv / plin	1,43	0,63 - 0,69
ulje / plin	90,8	47,2 - 53,9

2.2.3 Utjecaj anesteziološkog postupka na pluća i plućni surfaktant

Dugotrajna mehanička ventilacija koja se primjenjuje tijekom opće anestezije može, zbog svoje nesavršenosti u oponašanju fiziologije disanja, dovesti do ozljede plućnog tkiva. Najčešći mehanizam nastanka ozljede je naprezanje dišnih putova i prejako otvaranje dijela plućnih alveola s posljedičnim kolabiranjem preostalih alveola što dovodi do pojave plućnih atelektaza. Ozljeda može nastupiti i kao posljedica aktivacije imunološkog odgovora tkiva. Osim nastanka atelektaza, u plućima uslijed ozljede dolazi i do nastanka plućnog edema te gubitka plućnog surfaktanta (Lachmann i Verbrugge, 1998).

Procesi peroksidacije fosfolipida uslijed visokih koncentracija kisika u smjesi plinova koji se primjenjuju tijekom anestezije te kemijska priroda inhalacijskih anestetika bi također mogli biti jedan od mehanizama nastanka oštećenja plućnog surfaktanta (Lalchev i sur., 1992.).

Utjecaj inhalacijskih anestetika na fosfolipide membrana predmet je većeg broja istraživanja dok je broj istraživanja provedenih na plućnom surfaktantu značajno manji. Usprkos tome, do danas ne postoji konsenzus o mjestu njihova vezanja kao ni o mehanizmu djelovanja na plućni surfaktant. Najveći broj istraživanja podržava teoriju da anestetici djeluju na vodikove veze hidrofilnog dijela fosfolipidne molekule (Yoshida i sur., 1984., i 1989., Craig i sur., 1987., Tsai i sur., 1987. i 1990., Xu i Tang, 1997.,). To bi moglo imati nepovoljan utjecaj na vodeni matriks koji stabilizira membransku strukturu te posljedično tome dovesti do destabilizacije membrane (Ueda i Yoshida, 1999.).

2.3 Osnove infracrvene spektroskopije

Infracrvena spektroskopija je moćan alat u istraživanjima vibracijskih svojstava bioloških molekula. Njena primjena je gotovo neograničena jer omogućava istraživanje vrlo malih količina raznih uzoraka gotovo svih agregatnih stanja, a njeno veliko značenje temelji se na visokoj informacijskoj vrijednosti spektra (Günzler i Gremlich, 2006.; Stuart, 1997.).

Spektar je prikaz ovisnosti intenziteta promatranog snopa elektromagnetskog zračenja o valnoj duljini fotona koji su sadržani u snopu (Brnjas-Kraljević, 2001.). Elektromagnetski val je prijenos energije elektromagnetskog polja kroz prostor. Očituje se kao sinusna promjena jakosti električnog i magnetskog polja u vremenu i u prostoru (Brnjas-Kraljević, 2001.). Električno i magnetsko polje titraju u fazi i vektori polja su međusobno okomiti. Period titranja je vremenski

interval između dvaju susjednih maksimuma. Valna duljina je udaljenost između dviju susjednih točaka koje titraju u fazi te je ovisna o mediju kojim se val širi (Brnjas-Kraljević, 2001.). S obzirom na valnu duljinu, elektromagnetsko zračenje je podjeljeno na nekoliko područja. Infracrveno zračenje se nalazi u području valnih duljina između 700 nm i 1 mm, a vrsta interakcije koja se odvija unutar čestica su vibracije. U vibracijskoj spektroskopiji je uobičajeno umjesto valne duljine rabiti valni broj. Valni broj predstavlja recipročnu vrijednost valne duljine.

U strukturnim istraživanjima makromolekula na temelju interakcija s infracrvenim zračenjem najčešće se primjenjuje apsorpcijska spektroskopija (Brnjas-Kraljević, 2001.). Prilikom interakcije infracrvenog zračenja i tvari, do izmjene energije može doći samo ako molekula apsorbira foton energije jednak razlici dva vibracijska nivoa čestice tvari. Apsorpcija kvanta infracrvenog zračenja uzrokovat će prelazak u više vibracijsko stanje. Mjeriti se mogu samo one vibracije koje uzrokuju promjenu električnog dipolnog momenta molekule (Brnjas-Kraljević, 2001.). Za takvu vibraciju kažemo da je infracrveno aktivna. Infracrveni spektar dobivamo promatrajući ovisnost intenziteta zračenja o frekvenciji, odnosno valnoj duljini ili valnom broju nakon što promatrani uzorak izložimo infracrvenom zračenju izvora. Intenzitet spektralnih vrpci ovisi o vjerojatnosti prijelaza između vibracijskih energetskih nivoa, njihovoj popunjenosti česticama i ukupnom broju čestica u kontaktu sa zračenjem.

Vibracije molekula uključuju promjenu duljine kemijskih veza pa tada govorimo o vibracijama istezanja, ili promjenu kuteva između kemijskih veza pa govorimo o vibracijama savijanja. Vibracije istezanja mogu biti u fazi pa govorimo o simetričnim vibracijama istezanja, ili izvan faze pa govorimo o asimetričnim vibracijama istezanja (Stuart, 1997.). Dvoatomske molekule mogu vibrirati samo na jedan način, istezanjem, pa kažemo da imaju jedan stupanj slobode. Troatomske nelinearne molekule poput molekule vode imaju 3 stupnja slobode od kojih dva odgovaraju istezanju, a jedan savijanju molekule. Troatomske linearne molekule poput ugljičnog dioksida imaju 4 stupnja. Poliatomska nelinearna molekula koja sadrži N atoma ima $3N$-6 vibracijskih stupnjeva slobode, a linearna $3N$-5 (sa 6, odnosno s 5 stupnjeva su opisane translacija i rotacija molekule) (Stuart, 1997.). Vibracije koje se mogu pobuditi neovisno jedna od druge i u kojima atomi istovremeno prolaze kroz položaj ravnoteže zovu se normalni modovi. Konačna vibracija molekule može se prikazati kao linearna kombinacija normalnih modova. Mogu se podijeliti u dvije kategorije: skeletni modovi u kojima sudjeluju gotovo svi atomi u molekuli i grupne vibracije koje uključuju samo mali dio molekule, najčešće samo dva

ili tri atoma. Grupne vibracije su neovisne od ostatka molekule i korisne su za identifikaciju spojeva u spektru a među one od posebne važnosti možemo ubrojiti C=O vibracije. Ova je veza sklona intermolekulskom i intramolekulskom djelovanju čime utječe na molekulsku strukturu, a zbog visoke polarnosti koja znači i veliku promjenu dipolnog momenta, često je jedna od najintenzivnijih vrpci u spektru (Serec, 2016.).

2.3.1 Vibracije fosfolipida

Tipičan infracrveni spektar fosfolipida se može podijeliti u tri osnovna dijela: vibracije hidrofobnog dijela molekule, vibracije karbonilnih skupina uključenih u stvaranje esterskih veza i vibracije polarnog dijela molekule fosfolipida (Fringeli i Gunthard, 1981.; Casal i Mantsch, 1984.; Lee i Chapman, 1986.; Mantsch i McElhaney, 1991.). Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpci spektra fosfolipida je navedena u Tablici 2.2.

Vibracijske vrpce koje odgovaraju hidrofobnom dijelu molekule proizlaze prvenstveno iz C-H vibracija i nalaze se u području između 3100 i 2800 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Vibracijske vrpce asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine su najdominantnije vrpce spektra fosfolipida i javljaju se na 2920, odnosno 2850 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Vibracijske vrpce koje odgovaraju vibracijama terminalnih CH_3 skupina se javljaju na 2956 cm^{-1} za vibraciju asimetričnog istezanja i na 2870 cm^{-1} za vibraciju simetričnog istezanja, a javljaju se u obliku ramena većih vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupine (Arrondo i Goñi, 1998.). Položaji vrpci istezanja CH_2 i CH_3 skupina su osjetljivi na promjene u konformaciji lanaca masnih kiselina. Vibracijska vrpca istezanja nezasićenih lanaca masnih kiselina (=C-H) se javlja na 3012 cm^{-1} (Stuart, 1997.). Vibracijska vrpca savijanja CH_2 skupine se javlja oko 1470 cm^{-1} i prekriva vibracijsku vrpcu asimetričnog savijanja CH_3 skupine (Stuart, 1997.). Vibracijska vrpca simetričnog savijanja CH_3 skupine se javlja na 1378 cm^{-1} (Stuart, 1997.).

Vibracijske vrpce koje proizlaze iz vibracije istezanja karbonilne skupine se javljaju u području između 1750 i 1700 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Kada promatramo spektar DPPC-a, u ovom se području javlja široka vibracijska vrpca koja je, najvjerovatnije, zbroj dvije vibracijske vrpce koje odgovaraju vibracijama istezanja karbonilnih skupina na položajima *sn*-1 i *sn*-2 lanaca masnih kiselina (Arrondo i Goñi, 1998.). Vibracijska vrpca koja se javlja na 1742 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja C=O skupine na položaju *sn*-1 lanca, dok se vibracijska vrpca istezanja C=O skupine na položaju *sn*-2 lanca javlja na 1728 cm^{-1}.

Najizraženije vibracijske vrpce koje proizlaze iz vibracija polarne glave molekule fosfolipida su one koje odgovaraju vibracijama fosfatne skupine i javljaju se u području valnih brojeva između 1300 i 1000 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Budući da je ovaj dio molekule izrazito osjetljiv na hidrataciju, vrpce koje se javljaju u ovome području će također ovisiti o hidrataciji. Kada promatramo spektar DPPC-a, vrpca koja odgovara vibraciji asimetričnog istezanja PO_2^- skupine se kod nehidratiranog DPPC-a javlja oko 1240 cm^{-1}, a kod hidratiranog čini pomak na 1220 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Vrpca koja kod hidratiranog DPPC-a odgovara vibraciji simetričnog istezanja PO_2^- se javlja oko 1086 cm^{-1} (Arrondo i Goñi, 1998.). Vibracijska vrpca koja odgovara vibraciji asimetričnog istezanja kolina $(CH_3)_3N^+$ se nalazi na 972 cm^{-1} (Stuart, 1997.).

Tablica 2.2 Asignacija vibracijskih vrpci fosfolipida (Stuart, 1997., Arrondo i Goñi, 1998.)

valni broj (cm^{-1})	asignacija
3012	=C-H istezanje
2956	CH_3 istezanje, asimetrično
2920	CH_2 istezanje, asimetrično
2870	CH_3 istezanje, simetrično
2850	CH_2 istezanje, asimetrično
1742	C=O istezanje, *sn*-1
1728	C=O istezanje, *sn*-2
1485	$(CH_3)_3N^+$ savijanje, asimetrično
1473, 1472, 1468, 1463	CH_2 sjeckanje (engl. *scissoring*)
1405	$(CH_3)_3N^+$ savijanje, simetrično
1378	CH_3 savijanje, simetrično
1240	PO_2^- istezanje, asimetrično
1159	C-C istezanje, skeletno
1085	PO_2^- istezanje, simetrično
972	$(CH_3)_3N^+$ istezanje, asimetrično

2.4 Istraživanja vezana uz inhalacijske anestetike

Usprkos svakodnevnoj primjeni inhalacijskih anestetika, točan mehanizam njihova djelovanja još uvijek nije do kraja razjašnjen. Jedan od najranijih predloženih mehanizama bio je interakcija s membranskim lipidima. Još u 19. stoljeću, botaničar Charles Ernest Overton i farmakolog Hans Horst Meyer su neovisno došli do istog otkrića poznatog kao Meyer-Overtonova korelacija prema kojoj učinak anestetika ovisi o njegovoj topljivosti u maslinovom ulju (Arcario i sur, 2014). Unatoč do sada uglavnom usuglašenom prihvaćanju ove teorije, neki znanstvenici vjeruju da joj treba pristupiti kritički jer smatraju da se radi o klasičnoj reverzibilnoj reakciji između liganda i receptora u membrani (Abraini i sur., 2014.).

Novija istraživanja potvrđuju pretpostavke o molekulskom utjecaju anestetika na sinapsu i protok neurotransmitera. Smatra se da djeluju presinaptički, smanjujući otpuštanje neurotransmitera te postsinaptički, modulirajući funkciju receptora (Baumgart i sur., 2015.). Inhalacijski anestetik izofluran inhibira egzocitozu u presinaptičkim neuronima smanjujući koncentraciju iona kalcija (Baumgart i sur., 2015.). Jedan od mehanizama je i ograničavanje ulaska izvanstaničnog kalcija kroz kanale aktivirane karbaholom smještene distalno od muskarinskih receptora u membrani neurona (Corrales i sur., 2004.). Pinheiro je sa suradnicima dokazala da se radi o intracelularnom kalciju koji se u stanici pohranjuje u glatkom endoplazmatskom retikulumu, a njegovo je oslobađanje posredovano aktivacijom receptora za inozitol 3-fosfat (IP3) (Pinheiro i sur., 2006.). Ovaj učinak na koncentraciju slobodnog kalcija protektivno djeluje na ishemiju srca (Lemoine i sur., 2016.), dok se istovrsni učinak na hipoperfuziju i ishemiju renalnog tkiva postiže djelovanjem na hipoksijom inducirani faktor 2α (engl. *hypoxia-inducible factor 2α (HIF-2α)*) (Zheng i sur., 2015.).

Ksenon i dušični oksidul najvjerojatnije inhibiraju N-metil D-aspartat (NMDA) receptore (Yamakura i Harris, 2000.). NMDA su ekscitatorni receptori u mozgu. Drugi inhalacijski anestetici najvjerojatnije djeluju na drugim receptorima poput GABA-e. Neka istraživanja predlažu da inhalacijski anestetici djeluju na nespecifičan način, djelovanjem na membranski dvosloj (Butterworth, 2013.).

2.4.1 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na kulturu alveolarnih stanica

Saznanja o utjecaju inhalacijskih anestetika na kulturu alveolarnih stanica su oskudna. Istraživanja provedena na inhalacijskom anestetiku halotanu pokazuju da on inhibira sposobnost primarne kulture pneumocita tipa II štakora da sintetizira fosfolipide (Molliex i sur., 1994.) te modulira razinu mRNA za protein SP-C (Paugam-Burtz i sur., 2000.). Ovisno o primjenjenoj dozi, halotan može imati različit učinak na staničnu liniju karcinoma pluća A549 koju odlikuje sposobnost proizvodnje glavnih komponenti surfaktanta (Li i sur., 2002.) i stoga se već više od 40 godina koristi kao *in vitro* model za ispitivanje alveolarnih stanica tipa II (Lieber i sur., 1976.). Taj učinak je prvenstveno citostatičan, citotoksičan i genotoksičan (Stephanova i sur., 2007.). Subtoksične koncentracije do 1,05 nM utječu na proizvodnju surfaktanta kao i na kapacitet snižavanja površinske napetosti. Doze između 1,2 i 2,1 nM induciraju oštećenje svih membrana, supresiju proliferativne aktivnosti kao i oštećenje DNA dok one više od 2,1 nM rezultiraju smanjenjem ili gubitkom adhezijskih svojstava, smanjenom sintezom fosfolipida te programiranom smrti stanice u jednom dijelu stanične populacije (Stephanova i sur., 2007.).

2.4.2 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipide

Proteklih godina objavljen je značajan broj istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipide. Najčešće istraživani anestetik je halotan koji se u kliničkoj praksi danas rijetko koristi jer je zamijenjen novijim anesteticima izofluranom, sevofluranom i desfluranom. Većina ovih istraživanja temelji se na spoznajama dobivenim proučavanjem raznih fosfolipidnih modela dok je znatno manji broj studija proveden na plućnom surfaktantu izoliranom iz bronhoalveolarnog lavata životinja. Usprkos tome, do danas ne postoji konsenzus o mjestu njihova vezanja kao ni o mehanizmu djelovanja na plućni surfaktant.

2.4.2.1 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant

Još su 1969. godine Woo i suradnici objavili da halotan smanjuje plućnu popustljivost te da anestetici topljivi u lipidima mogu mijenjati funkciju surfaktanta tijekom mehaničke ventilacije (Woo i sur., 1969).

Enhorning i suradnici su 1986. godine proveli istraživanje utjecaja kloroforma, enflurana i halotana na plućni surfaktant dobiven lavažom pluća zeca (Enhorning i sur., 1986.). Istraživanje je provedeno uporabom surfaktometra pulsirajućeg mjehura (engl. *pulsating bubble surfactometer*), instrumenta kojim se mjerenjem razlike tlaka preko površine mjehura određuje površinska napetost tekućine u kojoj je mjehur formiran. Ustanovljeno je da kloroform te halotan u koncentraciji znatno višoj od one koja se primjenjuje za anesteziju imaju destabilizirajući utjecaj na surfaktant, dok je utjecaj enflurana bio nešto slabije izražen.

Temeljeno na hipotezi da bi proces peroksidacije fosfolipida uslijed visokih koncentracija kisika te kemijska priroda inhalacijskih anestetika također mogli biti jedan od mehanizama nastanka oštećenja plućnog surfaktanta, provedeno je *in vitro* istraživanje dvosloja lipidnog filma dobivenog iz pulmonalne lavaže štakora izloženih inhalacijskim anesteticima halotanu i metoksifluranu (Lalchev i sur., 1992.). Rezultati su pokazali da ovi anestetici dižu prag vrijednosti razrjeđenja lavaže što je glavni pokazatelj sposobnosti fosfolipida da stvaraju stabilan film. Eksperimenti rađeni na pulmonalnoj lavaži izoliranoj iz štakora koji su bili izlagani halotanu i kisiku pokazali su povećanu količinu fosfolipida, ali i promijenjen sastav fosfolipida lavaže. Koncentracija nezasićenog fosfatidilkolina bila je blago snižena dok je koncentracija produkata razgradnje lizo-fosfatidilkolina i lizo-fosfatidiletanolamina bila udvostručena nakon polusatnog izlaganja.

Jedan od predloženih mehanizama utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant jest da halotan, enfluran i sevofluran snižavaju kooperativne interakcije fosfolipida u jednosloju plućnog surfaktanta te da prekidaju vezanje plućnog surfaktanta za alveolarnu membranu (Tobin i sur., 2000).

Malacrida i suradnici su istraživali nepovoljan utjecaj sevoflurana na sastav i funkciju plućnog surfaktanta kao mogući razlog nastanka plućnih atelektaza (Malacrida i sur., 2014.). U sastavu plućnog surfaktanta Sprague-Dawley štakora izloženih 30 minutnoj anesteziji sevofluranom pronađena je povišena koncentracija lizo-fosfatidilkolina te snižena koncentracija fosfatidilkolina što se dovodi u vezu sa značajnim pogoršanjem plućne mehanike i alveolarnim kolapsom. Navode kako opažane promjene sastava surfaktanta upućuju prvenstveno na direktan utjecaj sevoflurana na funkciju surfaktanta.

2.4.2.2 Istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na fosfolipidne modele

U istraživanjima utjecaja anestetika na razne fosfolipidne modele dominiraju prvenstveno metode NMR (nuklearna magnetska rezonancija), ESR (elektronska spinska rezonancija) te Ramanova i FTIR spektroskopija. NMR je spektroskopska tehnika koja se temelji na magnetskim svojstvima jezgre. Nakon izlaganja jakom magnetskom polju, neke jezgre rezoniraju na karakterističnim frekvencijama čije varijacije daju detaljne informacije o molekulskoj strukturi promatranog spoja (Jacobsen, 2007.) Ovisno o promatranim jezgrama, istraživači su primjenjivali nekoliko vrsta NMR-a, ^{1}H, ^{2}H (deuterij) i ^{19}F. ESR, zvana još i elektronska paramagnetska rezonancija, metoda je slična NMR-u s razlikom što se, umjesto jezgre, temelji na prijelazima između spinskih stanja elektrona u vanjskom magnetskom polju.

Određen broj studija proveden je i uporabom metode simulacije molekulske dinamike. Istraživanja su većinom provedena na starijim anesteticima kloroformu, halotanu i enfluranu, a njihov detaljniji pregled je naveden u daljnjem tekstu.

Koehler i suradnici su još 1977. objavili da halotan uzrokuje perturbacije membrane, a istraživanje je provedeno primjenom NMR-a (Koehler i sur., 1977.). Rani radovi, temeljeni na studijama difrakcije rendgenskih i neutronskih zraka kroz anestetike u dvosloju sačinjenom od dimiristoila, lecitina i kolesterola, doveli su, međutim, istraživače do zaključka kako nema značajne promjene u strukturi dvosloja (Franks i Lieb, 1979.). Iste godine, Simon i suradnici su, na temelju neosjetljivosti particijskih koeficijenata na duljinu lanca masne kiseline, zaključili da anestetici ne mogu prodrijeti u područje lipidne jezgre (Simon i sur., 1979.).

Suezaki i suradnici su 1985. godine objavili da molekule kloroforma i halotana preferiraju visoko komprimirane jednoslojeve fosfatidilkolina dok enfluran ima najveći afinitet za srednje komprimirane jednoslojeve uz zaključak da ne postoji direktno vezanje anestetika za molekule DPPC-a te da anestetici prodiru u šupljine jednosloja i zauzimaju mjesta fosfatidilkolina na granici zrak-tekućina (Suezaki i sur., 1985.).

Dio istraživača podržava stav da je preferirano mjesto lokalizacije anestetika na granici voda-membrana tj. u području hidrofilne glave fosfolipida (Lieb i sur., 1982., Yoshida i sur., 1984., Craig i sur., 1987., Yoshida i sur., 1989., Tsai i sur., 1987., Tsai i sur., 1990., Ueda i Yoshida, 1999.). Ovu ideju, da je hidrofilni dio primarno mjesto lokalizacije anestetika podržao je Shieh sa suradnicima još 1976. godine u istraživanju liposoma 1,2-diheksadecil-*sn*-glicero-3-fosforilkolina primjenom ^{1}H NMR-a (Shieh i sur., 1976.).

Sposobnost anestetika da prekidaju vodikove veze su predložili Eyring i Jhon još 1969. godine (Eyring i Jhon, 1969.), a nekoliko godina kasnije to je potvrđeno spektroskopskim istraživanjem fluorougljičnih anestetika (di Paulo i Sandorfy, 1974). Prisutnost vodika kao kiseline u molekuli kao i njegova relativno visoka polarizabilnost navode se kao uvjet anestetskog djelovanja (Hobza i Sandorfy, 1984).

Yoshida i suradnici su primjenom ^{1}H NMR-a proveli istraživanje utjecaja enflurana na otpuštanje vode kod sustava obrnute micele. Rezultati istraživanja su na temelju rasta pokretljivosti vezane vode pokazali da je anestetik smanjio broj molekula vode vezanih za površinu membrane (Yoshida i sur., 1984.). Ovaj su rezultat potvrdili u istraživanju primjenom ^{2}H NMR-a nekoliko godina kasnije (Yoshida i sur., 1989.). Isti autori govore i o postojanju površinski vezanih molekula vode u dvije forme, one vezane primarno i one vezane sekundarno za primarno vezane molekule. Istraživanjem su pokazali da je anestetik povećao pokretljivost samo sekundarno vezanih molekula vode.

Yoshino i suradnici su primjenom NMR-a na jezgre ^{19}F istraživali dubinu prodiranja halotana u micele natrij dodecilsulfata (Yoshino i sur., 1994.). Zaključili su da anestetici prodiru samo do druge razine CH_2 . Da bi potvrdili ove rezultate proveli su istraživanje kombinirajući metode ^{1}H i ^{19}F NMR-a s metodom nuklearnog Overhauserovog efekta (NOE) (Yoshino i sur., 1998.). Istu su metodu primjenili i Xu i Tang u istraživanju mjesta vezanja ksenona na vezikule sačinjene od lecitina i kolesterola dispergirane u $^{2}H_2O$. Pronašli su da su mjesta međudjelovanja ksenona s ispitivanim lipidima usmjerena prema glavama lipida te da međudjeluju s vodom (Xu i Tang, 1997.). Ksenon je anestetik novije generacije. Iste godine, Tang i suradnici su primjenom ^{19}F NMR-a proveli i istraživanje utjecaja izoflurana na vezikule sačinjene od fosfatidilkolina kojim su pokazali da se ovaj anestetik raspoređuje u područja membrane koja dopuštaju kontakt s vodom dok su se ne-anestetici smjestili duboko u jezgru lipida (Tang i sur., 1997.).

Lieb i suradnici su istraživanjem utjecaja halotana na lipide primjenom Ramanove spektroskopije zaključili da pri kliničkim koncentracijama halotan nema utjecaja na konformaciju lanca masne kiseline multilamelarnih suspenzija izgrađenih od dimiristoilglicerofosforilkolina (DMPC) i kolesterola (Lieb i sur., 1982.).

Slične rezultate dobila je i skupina znanstvenika okupljenih oko Craiga koji su primjenom iste metode istraživali utjecaj halotana na DPPC te svojim istraživanjem podupiru interpretaciju da molekule halotana obitavaju u području fosfatnih glava fosfolipida te značajno povećavaju

pokretljivost te skupine (Craig i sur., 1987). Zaključuju i da se Ramanova spektroskopija može uspješno primjeniti na istraživnje utjecaja halotana na karakteristike lanaca masnih kiselina dvosloja DPPC-a odraženog u promjenama intenziteta vibracija istezanja C-H i C-C.

Polazeći od premise da je PO_4 skupina glavno mjesto vezanja vode na fosfolipid, Tsai i suradnici su proveli istraživanje utjecaja anestetika infracrvenom spektroskopijom na međudjelovanje vode i lipida DMPC-a (Tsai i sur., 1987.). Istraživanje je uključivalo polarne spojeve halotan, kloroform i enfluran, anestetike tada primjenjivane u svakodnevnoj kliničkoj praksi te nepolarni ugljikov tetraklorid (CCl_4). Kada je molarni omjer vode i DMPC-a prešao 18, vibracijska vrpca istezanja OH skupine koja predstavlja vodu pomakla se s 3369 cm^{-1} na stalnih 3430 cm^{-1}, a vibracijska vrpca slobodne vode se počela javljati na 3490 cm^{-1} pri omjeru 30. Vibracijska vrpca istezanja P=O skupine nehidratiranog DMPC-a se nakon dodavanja vode u omjeru 9 : 1 prema DMPC-u pomakla s 1262 cm^{-1} na stalnih 1238 cm^{-1}. Vibracijske vrpce istezanja CH_2 skupine ugljikovodičnih repova, C=O skupine esterskih veza i $(CH_3)_3N^+$ skupine su promijenile položaj prema višim valnim brojevima nakon dodavanja jedne molekule vode na jednu molekulu fosfolipida. Dodavanje više od jedne molekule nije rezultiralo daljnjom promjenom položaja ovih vibracijskih vrpci. Kod dodavanja CCl_4 ovakav rezultat je izostao. Istraživanje je provedeno na micelama DMPC-a s obrnutim odnosom hidrofilnog i hidrofobnog dijela. Ovaj se rezultat slaže s rezultatima istraživanja kojeg su dvije godine ranije proveli Buchet i suradnici objavljujući o razlici u sposobnosti kidanja vodikovih veza CCl_4 i anestetika (Buchet i sur., 1985.).

Tsai i suradnici su istom metodom istraživali utjecaj halotana i enflurana na DPPC (Tsai i sur., 1990.). U visokim koncentracijama anestetik je potaknuo značajne promjene u položajima vibracijskih vrpci istezanja fosfatnih glava u molekuli fosfolipida, što podržava rezultate njihovog ranijeg istraživanja da je primarna lokalizacija anestetika fosfatna skupina lipida te da su molekule vode vezane za fosfatnu skupinu zamijenjene molekulama anestetika.

Istraživanje primjenom ESR spektroskopije koje su proveli Gulfo i suradnici, pokazalo je da se anestetici poput halotana i kloroforma koji su proton donori vežu blizu fosfatne grupe DPPC-a te remete ravnotežu vezivanja vodika (Gulfo i sur., 1988.).

Suprotno rezultatima navedenih istraživanja, druga skupina istraživača podržava stav da je preferirano mjesto lokalizacije anestetika u području hidrofobnih repova fosfolipida. Još 1976. godine objavljeno je istraživanje molekulskog kretanja i raspodjele halotana u modelu fosfolipidnog dvosloja provedeno ^{19}F NMR-om (Trudell i Hubbell, 1976.). Rezultat je pokazao

da anestetik velikom brzinom prelazi iz vodene faze u fazu lipidnog dvosloja i obrnuto te da ima jednak pristup i polarnim glavama i lancima masnih kiselina.

Istraživanjem utjecaja inhalacijskih anestetika halotana, enflurana i izoflurana na dvosloj palmitoiloleoilfosfatidilkolina (POPC) primjenom ^{2}H NMR-a, Baber i suradnici su zaključili da je lokalizacija anestetika prvenstveno u području lanaca masnih kiselina te da nije nađen u visokim koncentracijama unutar područja polarnih glava što su za halotan potvrdili i primjenom NOE-a (Baber i sur., 1995). Do sličnog su zaključka došli i North i Cafiso dvije godine kasnije istraživajući primjenom ^{19}F-NMR-a lokalizaciju djelomično halogeniranog ciklobutana u POPC-u. (North i Cafiso, 1997.). Navode da se anestetik ne nalazi unutar područja polarne glave lipida.

Tu i suradnici su metodom simulacije molekulske dinamike (engl. *molecular dynamics simulations*) proveli istraživanje utjecaja halotana na dvosloj DPPC-a (Tu i sur., 1998.). Istraživali su učinak halotana u koncentraciji koja se upotrebljava u kliničkim uvjetima, a rezultat je pokazao da nije došlo do uočljive promjene u strukturi lipidnog dvosloja te da halotan ne pokazuje sklonost vezanju za polarnu glavu kao niti specifičnu orijentaciju u odnosu prema granici lipid-voda.

Ista skupina istraživača je dvije godine kasnije ponovila istraživanje primjenjujući znatno višu koncentraciju halotana, onu u omjeru 1 : 2 u odnosu na DPPC (Koubi i sur., 2000.). Pronašli su da se molekule halotana segregiraju u gornjim dijelovima lanaca masnih kiselina s maksimalnom vjerojatnosti segregacije u blizini C5 razine CH_2 skupine uz povećanje nereda u repovima fosfolipida osim u području koje je ograničeno prisutnošću anestetika (Koubi i sur., 2000.). Ove su rezultate potvrdili istraživanjem kojim se uspoređivao utjecaj anestetika s utjecajem heksafluoroetana na DPPC (Koubi i sur., 2001.).

Istražujući mehanizam djelovanja halotana na model membrane metodom simulacije molekulske dinamike, Pickholz i suradnici su zaključili da molekule anestetika povećavaju segmentalni red lipida u području lanaca masnih kiselina koje je bliže polarnoj glavi. Istraživanje su proveli sa šest različitih koncentracija anestetika uključujući i koncentracije znatno više od onih koje se primjenjuju u kliničkoj praksi te pronašli da s porastom koncentracije anestetika raste i segmentalni red (Pickholz i sur., 2005.).

2.5 Primjena FTIR spektroskopije u istraživanju plućnog surfaktanta

Mautone i suradnici su 1987. godine istraživali površinski aktivan materijal prikupljen iz BAL-a zeca. FTIR spektroskopija je s uspjehom primijenjena u istraživanju termotropnih svojstava ovog materijala temeljenog na promjenama položaja vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupine (Mautone i sur., 1987.).

Dluhy i suradnici su 1989. godine proveli FTIR spektroskopsko istraživanje molekulske strukture fosfolipidne komponente plućnog surfaktanta izoliranog iz BAL-a goveda. Istraživali su dva različita stanja surfaktanta dvijema različitim spektroskopskim metodama. Metodu transmisije su primijenili na opažanje promjena surfaktanta u "bulk" fazi, a metodu vanjske refleksije (engl. *external reflection infrared spectroscopy*) na opažanje promjena filma surfaktanta na granici zrak-voda. Pratili su promjene položaja vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupine lanaca masnih kiselina fosfolipida u odnosu na promjenu temperature u prvom dijelu istraživanja, odnosno tlaka u drugom dijelu istraživanja. Zaključuju da se infracrvena (engl. *infrared*, IR) spektroskopija uspješno može primijeniti u istraživanju strukture plućnog surfaktanta (Dluhy i sur., 1989.).

Vođeni činjenicom da se FTIR spektroskopija godinama uspješno primjenjuje za karakterizaciju i identifikaciju strukturnih promjena kemijskih spojeva, Das i suradnici su ovu metodu primijenili na istraživanje sastava i strukture lipida i proteina dobivenih iz BAL-a miševa izloženih metil-živinom kloridu (engl. *methylmercurychloride (MMC)*). Usporedba spektara kontrolne s tretiranom skupinom uzoraka pokazala je promjene u intenzitetima i položajima vibracijskih vrpci lipida, a istraživači su zaključili da se FTIR spektroskopija može uspješno primjenjivati u otkrivanju malih promjena bioloških komponenti BAL-a izloženih utjecaju lijeka (Das i sur., 1995.).

Ista skupina je dvije godine kasnije provela istraživanje utjecaja MMC-a na funkciju plućnog surfaktanta analizom BAL-a izoliranog iz miševa izloženih MMC-u. Uz analizu BAL-a elektronskom mikroskopijom i surfaktometrom mjehura proveli su i FTIR spektroskopsku analizu koja je pokazala promjene i lipidne i proteinske komponente BAL-a. Uspoređujući rezultate ove tri metode zaključuju da izlaganje MMC-u može značajno utjecati na sastav BAL-a kao i na njegova svojstva vezana uz površinsku napetost (Das i sur., 1997.).

Knells i suradnici su proveli spektroskopsko istraživanje plućnog surfaktanta izoliranog iz BAL-a zeca. Istraživali su tri podfrakcije surfaktanta temeljene na karakteristikama sedimentacije koje se, osim po morfologiji i sadržaju, međusobno razlikuju i po sposobnosti snižavanja površinske napetosti. Uspoređujući rezultate dobivene metodom biokemijskog eseja s rezultatima dobivenim FTIR spektroskopijom zaključili su da se oni podudaraju te da se spektroskopska metoda može uspješno primijeniti u kliničke svrhe za ispitivanje plućnog surfaktanta. Poseban značaj su dali istražujući dotada slabo istraživano područje valnih brojeva vibracija istezanja fosfatne glave fosfolipida plućnog surfaktanta (Knells i sur., 1995.).

McCrae i suradnici su proveli FTIR spektroskopsko istraživanje utjecaja izlaganja plućnog surfaktanta miševa sporama *Strachyobotrys chartaruma*. Rezultati su pokazali sveukupnu redukciju fosfolipida u sve tri subfrakcije surfaktanta te povećanu razinu lizofosfolipida. Istraživači su na temelju rezultata zaključili da izlaganje sporama uzrokuje promjene regulacije sekrecije i sinteze surfaktanta (McCrae i sur. 2001.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

U ovom istraživanju koristili smo inhalacijske anestetike Forane i Sevorane proizvođača Abbot Laboratories Ltd. Forane para inhalata je bezbojna tekućina koja sadrži samo djelatnu tvar izofluran bez dodanih drugih sastojaka. Sevorane para inhalata je, također, bezbojna tekućina koja sadrži samo djelatnu tvar sevofluran bez dodanih drugih sastojaka. Izofluran i sevoflurane su polarne tvari. Oba anestetika su primjenjena u svom komercijalnom obliku.

Kao plućni surfaktant odabrali smo komercijalni preparat Curosurf 120 mg/1,5 mL ukapnu tekućinu za dušnik i pluća koji je za potrebe ovog istraživanja donirao distributer za Hrvatsku. Curosurf je sterilni, prirodni surfaktant podrijetla iz alveola pluća svinje, proizvođača Chiesi Farmaceutici S.p.A. Parma, Italija. Kako je navedeno u Sažetku opisa svojstva lijeka, 1 mL suspenzije sadrži 80 mg fosfolipidne frakcije iz svinjskih pluća (poraktant alfa), što odgovara približno 76 mg/mL ukupnih fosfolipida od čega je dipalmitoilfosfatidilkolina 30 mg/mL i 0,9 mg/mL hidrofobnih bjelančevina male molekulske mase. Preparat sadrži gotovo isključivo samo polarne lipide, osobito fosfatidilkolin (oko 70 % ukupnog fosfolipidnog sadržaja) i oko 1 % specifičnih hidrofobnih bjelančevina male molekulske mase SP-B i SP-C. Ne sadrži aditive. Pomoćne tvari koje se nalaze u preparatu su natrij klorid i voda za uštrcavanje. Kao pomoćna tvar naveden je i natrij hidrogenkarbonat no on nije u sastavu lijeka već se koristi u postupku proizvodnje za korekciju pH vrijednosti. Neutralni lipidi poput triacilglicerola i kolesterola su filtrirani metodom kromatografije te ih Curosurf ne sadrži. Curosurf je liposomalni lijek. Terapijska indikacija Curosurfa je liječenje IRDS-a, a primjenjuje se i kao profilaksa u nedonošćadi kod koje postoji rizik od IRDS-a. U ovom istraživanju Curosurf je korišten u svom komercijalnom obliku. Detaljan sastav Curosurfa je naveden u Tablici 3.1 (Zhang i sur., 2011.).

Tablica 3.1 Detaljan sastav Curosurfa (Zhang i sur., 2011.). Podaci prikazani u tablici predstavljaju maseni postotak svakog sastojka u odnosu na ukupnu masu Curosurfa.

Fosfolipidi	99
fosfatidilkolin/DPPC	69/47
PG	1,2
PE	4,5 - 7,4
PI i PS	4,5 - 8,4
LPC	1,0 - 7,0
SM	1,8 - 7,9
Hidrofobni proteini	1,1
SP-B	0,4
SP-C	0,7

3.2 Priprema uzoraka

Pripremljeno je devet pripravaka za izradu uzoraka. Jedan pripravak je sadržavao čisti, netretirani Curosurf. Četiri pripravka su sadržavala Curosurf s četiri različita volumna udjela izoflurana. Preostala četiri pripravka su sadržavala Curosurf s četiri različita volumna udjela sevoflurana. U Tablici 3.2 je naveden sastav svakog pojedinog pripravka te njihovi nazivi koji će se rabiti u daljnjem tekstu.

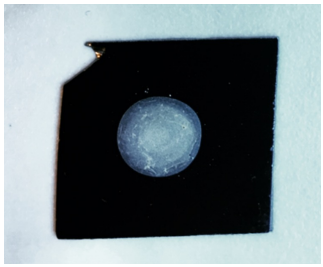
Tablica 3.2 Sastav i nazivi pripravaka

pripravak	volumni udio Curosurfa	volumni udio izoflurana	volumni udio sevoflurana
Curosurf	100 %		
Izo10	90 %	10 %	
Izo20	80 %	20 %	
Izo30	70 %	30 %	
Izo40	60 %	40 %	
Sevo10	90 %		10 %
Sevo20	80 %		20 %
Sevo30	70 %		30 %
Sevo40	60 %		40 %

Valja naglasiti da su volumni postoci anestetika kojima smo izlagali Curosurf znatno viši od onih koji se primjenjuju u kliničkoj praksi s ciljem da se naglasi djelovanje anestetika na surfaktant.

Pripravci su izrađeni u polipropilenskim epruvetama s nepropusnim čepom te stavljeni u hladnjak na 4 °C. Prije izrade uzoraka za spektroskopska mjerenja, pripravci su izvađeni iz hladnjaka te ostavljeni na sobnoj temperaturi 60 minuta.

Za spektroskopska mjerenja je iz svakog pripravka pripremljeno po 30 uzoraka, dakle ukupno 270 uzoraka. 10 μL pripravka je naneseno na silicijevu pločicu koja ujedno služi i kao IR prozor te sušeno pomoću vakuum pumpe u eksikatoru tijekom 60 minuta da se dobiju tanki filmovi (Slika 3.1). Vrijeme sušenja je određeno snimanjem spektara uzoraka sušenih 30, 40, 50, 60, 70 i 80 minuta. Njihova usporedba je pokazala da se vrpce slobodne vode prestaju javljati u spektrima sušenim 60 i više minuta. Eliminacija slobodne vode je nužna budući da se vrpce slobodne vode preklapaju sa spektrom surfaktanta te značajno otežavaju interpretaciju spektra.



Slika 3.1 Tanki film uzorka dobiven nanošenjem pripravka na silicijevu pločicu i sušenjem uzorka u eksikatoru

3.3 Metode i obrada rezultata

Za karakterizaciju uzoraka napravljena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), a rezultati su obrađeni dvijema statističkim metodama: metodom analize glavnih komponenti (engl. *principal component analysis,* PC analiza) i Studentovim *t*-testom.

3.3.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

FTIR spektri su snimani na PerkinElmer uređaju Spectrum GX (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) u Laboratoriju za nanomaterijale Zavoda za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišten je MCT (Mercury Cadmium Telluride) detektor hlađen tekućim dušikom te KBr djelitelj zrake (engl. *beamsplitter*). Prije snimanja uzoraka učinjeno je snimanje pozadine usrednjavajući 200 skenova s rezolucijom 4 cm^{-1}. Spektri uzoraka su snimani u transmisijskom modu usrednjavajući 100 skenova s rezolucijom 4 cm^{-1}. Snimanja su učinjena u području valnih brojeva od 3800 do 700 cm^{-1}. Svi spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi unutar 60 minuta od izrade tankih filmova. Snimljen je set od 30 FTIR mjerenja tankih filmova uzoraka iz istog pripravka zbog relevantnosti statističke metode. Svi uzorci tretirani su na isti način i snimljeni pod jednakim uvijetima.

Prije snimanja setova spektara tretiranih uzoraka (uzorci pripravljeni iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30, Izo40, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40), snimljen je set spektara netretiranog Curosurfa te su na temelju literature (Stuart, 1997.; Arrondo i Goñi, 1998.) asignirane karakteristične vibracijske vrpce.

Da bismo provjerili prikazuju li se vibracijske vrpce anestetika u spektrima tretiranih uzoraka zbog njihovog mogućeg prekrivanja važnih vibracijskih vrpci Curosurfa, snimljeni su i spektri oba anestetika.

3.3.2 Obrada spektara

Obrada spektara je učinjena pomoću programskog paketa Kinetics u sklopu Matlaba. Neobrađeni spektri su prvo korigirani na osnovnu liniju (engl. *baseline correction*), a zatim su normirani na vibracijsku vrpcu 1739 cm^{-1} koja odgovara vibraciji istezanja C=O skupine. Korekcija osnovne linije (engl. *baseline*) se provodi da bi se ispravili nedostaci osnovne linije koji mogu biti posljedica prevelike debljine i nehomogensti uzorka, a mogu biti vezani i uz instrument poput variranja temperature i napona te uzroci vezanih uz detektor, laser ili interferometar. Normiranje na određenu vrpcu podrazumijeva množenje apsorbancije cijelog spektra konstantnim faktorom tako da apsorbancija vrpce nakon normiranja iznosi 1, što olakšava međusobnu usporedbu spektara (Serec, 2016.).

3.3.3 Analiza glavnih komponenti (PC analiza)

Analiza glavnih komponenti (PC analiza) je nenadgledana, kvalitativna statistička metoda koja omogućava svođenje i analizu velikog broja promatranih, međusobno koreliranih varijabli na manji broj novih, međusobno nekoreliranih varijabli linearnim kombiniranjem izvornih varijabli uz minimalan gubitak informacija. Linearne kombinacije izvornih varijabli se nazivaju glavne komponente (engl. *principal components,* PC). Prvom glavnom komponentom (PC1) objašnjen je maksimum varijance iz podataka, drugom glavnom komponentom (PC2) objašnjen je maksimum varijance koja je ostala neobjašnjena prvom glavnom komponentom i tako redom. Ukupna varijanca je zbroj varijanci svih izvornih varijabli. Cilj je u prvih nekoliko glavnih komponenti izdvojiti što veći dio ukupne varijance te tako reducirati broj izvornih varijabli. Tako izdvojene komponente se uobičajeno izražavaju u kumulativnim postocima ukupne varijance.

Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u *n*-dimenzijskom prostoru gdje svaki vektor predstavlja određenu varijablu. Uvođenjem glavnih komponenti smanjuje se dimenzionalnost prostora čime se pojednostavnjuje interpretacija podataka. Glavne komponente su međusobno ortogonalne. Udaljenost projekcije promatrane točke na glavnu komponentu od ishodišta

koordinatnog sustava odgovara vrijednosti tzv. faktorskog boda (engl. *score*) za podatak točke. Korelacija između originalnih varijabli i glavnih komponenti može se opisati tzv. opterećenjem (engl. *loading*) (Jednačak, 2013.).

Statistički podaci dobiveni PC analizom mogu se vizualizirati pomoću faktorskih bodova. Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava i njihovo grupiranje (Jednačak, 2013.).

PC analiza je učinjena pomoću programskog paketa PLS Toolbox u sklopu Matlaba. Spektri su prije provođenja PC analize obrađeni na način opisan u poglavlju 3.3.2. Prije provedbe PC analize na sve je spektre primjenjeno predprocesuiranje srednjeg centra (engl. *mean center preprocessing*).

Rezultati su prikazani na dva načina, kao faktorski bodovi i kao opterećenja. Svaka točka na grafu faktorskih bodova (engl. *scores plot*) predstavlja spektar jednog uzorka, a iz grafova opterećenja (engl. *loadings plot*) mogu se uočiti djelovi spektra koji najviše doprinose vrijednostima pojedinih faktorskih bodova na glavnoj komponenti.

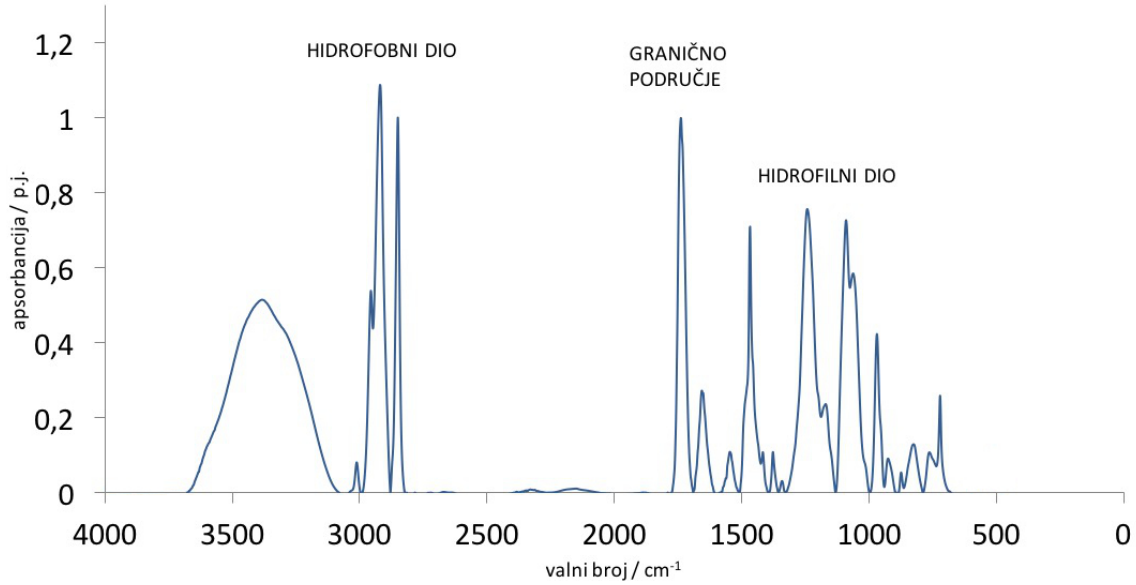
3.3.4 Statistička obrada spektara Studentovim *t*-testom

Studentov t-test je proveden pomoću programskog paketa Kinetics u sklopu Matlaba. Prije provedbe Studentovog *t*-testa, spektri su obrađeni na način opisan u poglavlju 3.3.2. Za svaki set spektara uzoraka iz istog pripravka je zatim izračunata srednja vrijednost spektara koju nazivamo srednjim spektrom. Srednji spektar svakog tretiranog uzorka (spektri uzoraka iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30, Izo40, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40) je zatim oduzet od srednjeg spektra netretiranog uzorka (spektri uzoraka iz pripravka Curosurf) dajući razlikovni spektar dva uspoređivana srednja spektra. Pozitivne i negativne promjene u razlikovnom spektru označavaju područja spektra u kojima se javljaju razlike između dva promatrana srednja spektra. Pozitivna promjena označava porast, a negativna promjena pad intenziteta srednjeg spektra kojeg se uspoređuje s kontrolnim srednjim spektrom. Razlikovni spektri dobiveni ovom metodom su zatim analizirani pomoću Studentovog *t*-testa koji je proveden za svaku točku u spektru, a oni valni brojevi na kojima se javila statistički značajna razlika između dva promatrana srednja spektra su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom. Kriterij statističke značajnosti je bio $p < 0,01$.

4. REZULTATI

4.1 Karakteristične vibracije u FTIR spektru Curosurfa

Srednji spektar tankog filma Curosurfa u području valnih brojeva od 3800 do 700 cm^{-1} prikazan je na Slici 4.1. Spektar je podijeljen u tri područja koja odgovaraju vibracijama tri osnovna dijela molekule fosfolipida: područje vibracija hidrofobnog dijela molekule (3100 - 2800 cm^{-1}), područje vibracija karbonilne skupine (1750 - 1700 cm^{-1}) i područje vibracija polarnog dijela molekule fosfolipida (1300 - 1000 cm^{-1}). Na temelju ranije objavljenih rezultata mjerenja fosfolipida infracrvenom spektroskopijom (Stuart, 1997.; Arrondo i Goñi, 1998.) napravljena je asignacija vibracija vibracijskih vrpci tankih filmova plućnog surfaktanta Curosurfa prikazana u Tablici 4.1 i detaljnije opisana u daljenjem tekstu.



Slika 4.1 Spektar tankog filma Curosurfa

Tablica 4.1 Asignacija karakterističnih vibracijskih vrpci fosfolipida tankog filma Curosurfa. Asignacija je napravljena na temelju literature (Stuart, 1997.; Arrondo i Goñi, 1998.)

valni broj (cm^{-1})	asignacija
3700 - 3100	OH
2957	CH_3 istezanje, asimetrično
2921	CH_2 istezanje, asimetrično
2873	CH_3 istezanje, simetrično
2851	CH_2 istezanje, simetrično
1739, 1733	C=O istezanje
1472	CH_2 sjeckanje
1244	PO_2^- istezanje, asimetrično
1091	PO_2^- istezanje, simetrično
970	$(CH_3)_3N^+$ istezanje, asimetrično

Vibracijske vrpce koje odgovaraju vibracijama hidrofobnog dijela molekule fosfolipida, tzv. repovima, proizlaze iz C-H vibracija. To su vibracijska vrpca asimetričnog istezanja CH_2 skupine na valnom broju 2921 cm^{-1}, vibracijska vrpca simetričnog istezanja CH_2 skupine na valnom broju 2851 cm^{-1}, vibracijska vrpca asimetričnog istezanja CH_3 skupine na valnom broju 2957 cm^{-1} i vibracijska vrpca simetričnog istezanja CH_3 skupine na valnom broju 2873 cm^{-1}. Vibracijske vrpce istezanja CH_2 skupine su ujedno i najintenzivnije vrpce spektra Curosurfa, dok se vibracijske vrpce istezanja CH_3 skupine javljaju u obliku "ramena" vibracijskih vrpci vibracija CH_2 skupine. Vibracijska vrpca sjeckanja CH_2 skupine javila se na valnom broju 1472 cm^{-1}. Navedene vibracijske vrpce su asignirane na temelju literature (Arrondo i Goñi, 1998.).

Vibracijske vrpce koje odgovaraju vibracijama istezanja C=O skupina uključenih u stvaranje esterskih veza s glicerolom se javljaju na valnim brojevima 1739 cm^{-1} i 1733 cm^{-1}. Navedene vibracijske vrpce su asignirane na temelju literature (Stuart, 1997., Wong i Mantsch, 1988.).

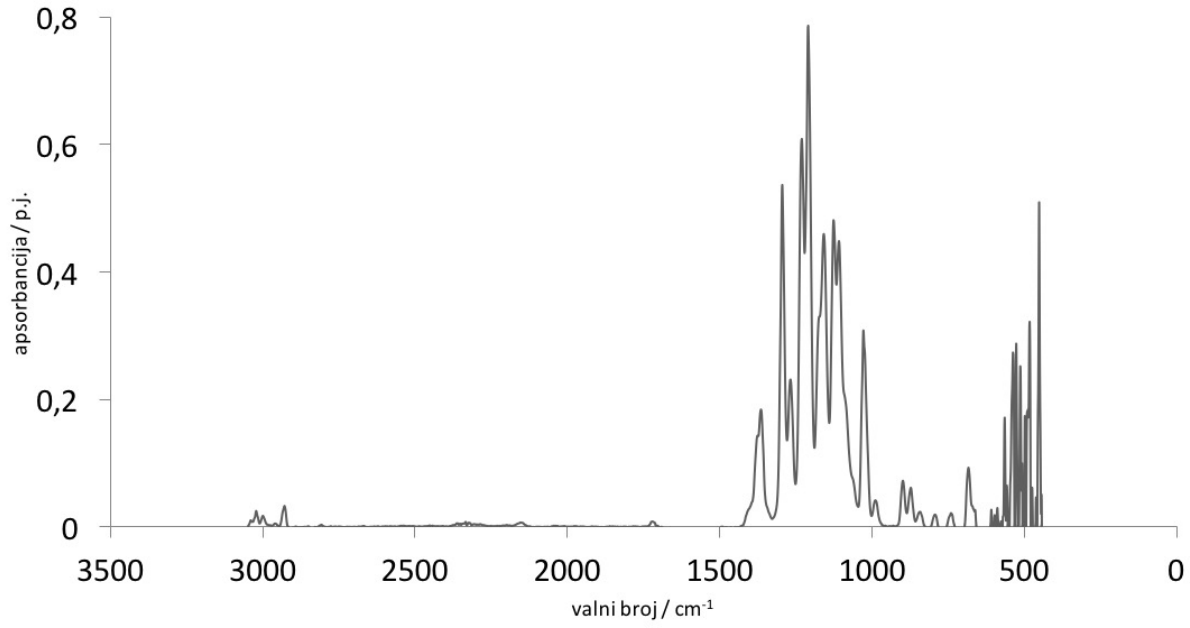
Vibracijske vrpce koje odgovaraju vibracijama polarnog dijela molekule fosfolipida, tzv. glavi, proizlaze iz vibracija istezanja PO_2^- skupine. Nalaze se na valnom broju 1244 cm^{-1} za vibraciju asimetričnog istezanja PO_2^- skupine te na valnom broju 1091 cm^{-1} za vibraciju simetričnog

istezanja PO_2^- skupine. Navedene vibracijske vrpce su asignirane na temelju literature (Arrondo i Goñi, 1998.). Vibracijska vrpca koje proizlazi iz vibracije istezanja $(CH_3)_3N^+$ skupine nalazi se na valnom broju 970 cm^{-1}. Navedena vibracijska vrpca je asignirana na temelju literature (Stuart, 1997.).

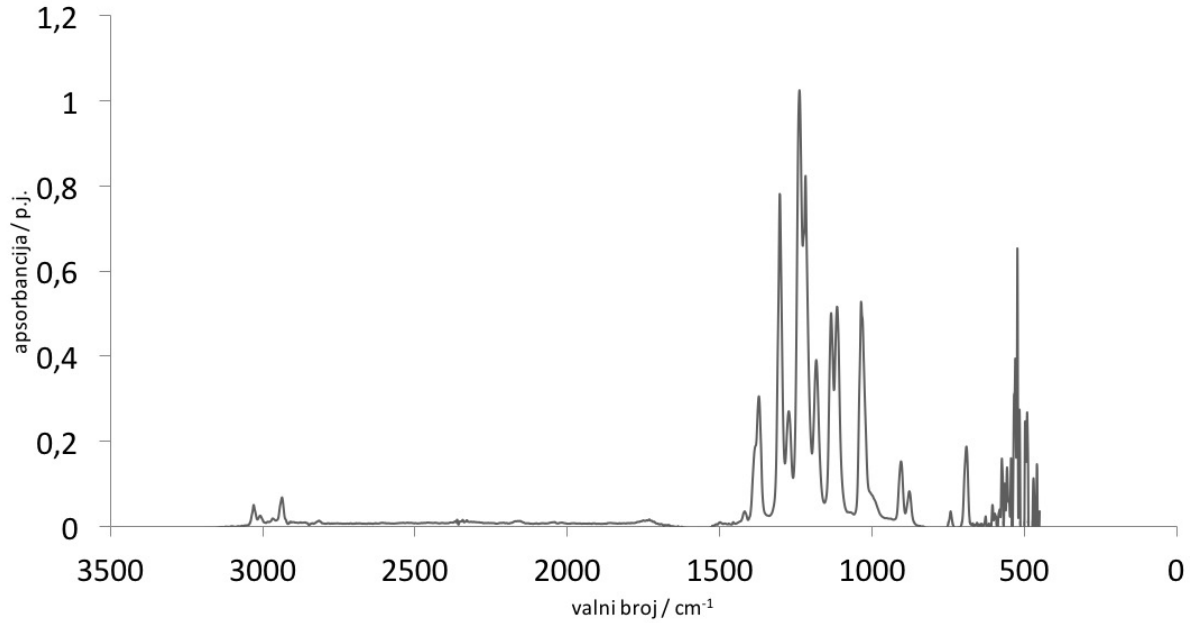
Široka vibracijska vrpca koja se nalazi u području valnih brojeva od 3700 do 3100 cm^{-1} s maksimumom intenziteta na 3384 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja OH skupine.

4.2 Spektri izoflurana i sevoflurana

U spektrima izoflurana i sevoflurana uočava se vibracijska vrpca na valnom broju 1240 cm^{-1} (Slika 4.2 i Slika 4.3). Ova vibracijska vrpca se nalazi u području koje u spektrima uzoraka odgovara vibraciji asimetričnog istezanja fosfatne skupine. U spektrima uzoraka se ne javljaju vibracijske vrpce na položajima preostalih vibracijskih vrpci anestetika te možemo reći da vibracijska vrpca na 1240 cm^{-1} u spektrima tretiranih uzoraka nije vibracijska vrpca anestetika već fosfolipidne fosfatne skupine. Nedostatak vrpci anestetika u spektrima uzoraka posljedica je brzog isparavanja anestetika i sušenja uzoraka.



Slika 4.2 Spektar izoflurana



Slika 4.3 Spektar sevoflurana

4.3 Vibracije tankih filmova tretiranih uzoraka

4.3.1 Vibracije hidrofobnog dijela molekule fosfolipida

Najintenzivnije vibracijske vrpce područja spektra koje odgovara vibracijama hidrofobnog dijela molekule su one koje proizlaze iz vibracija istezanja CH_2 skupina (Slike 4.4 do 4.7). Osnovna promjena koja se uočava u ovom području spektra u spektrima svih tretiranih uzoraka je promjena intenziteta obiju vibracijskih vrpci CH_2 skupine. U spektrima uzoraka tretiranih izofluranom se javlja i promjena vibracijske vrpce sjeckanja CH_2 skupine. U Tablicama 4.2 do 4.5 su za svaki uzorak navedeni položaji i intenziteti vibracijskih vrpci karakterističnih vibracija ovog područja spektra.

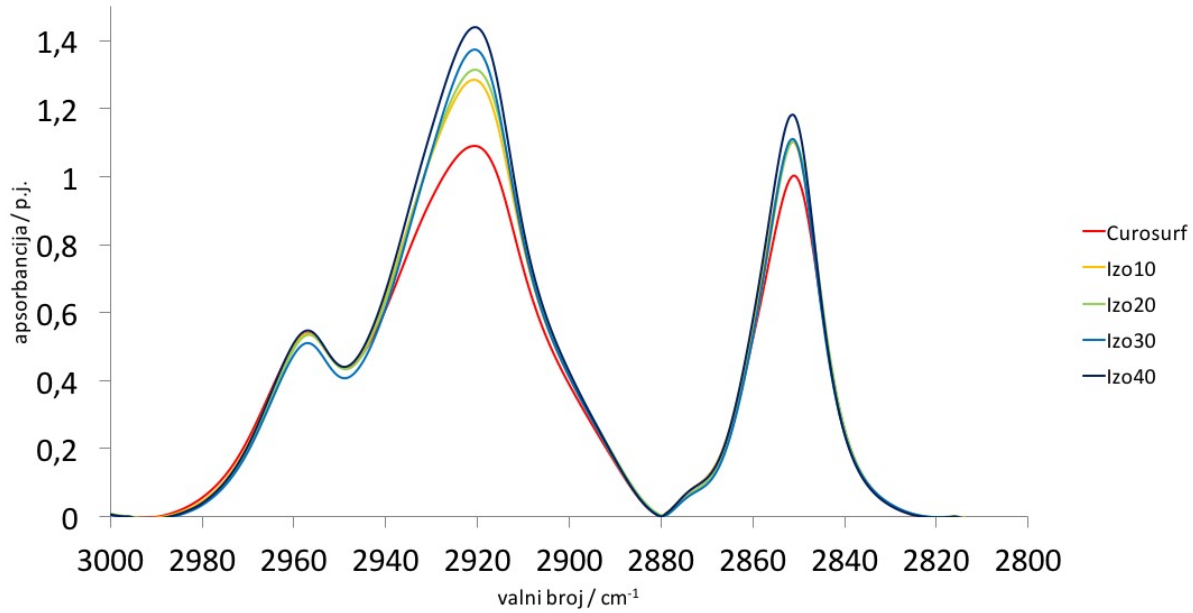
4.3.1.1 Uzorci tretirani izofluranom

U spektrima uzoraka tretiranih izofluranom (uzorci iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40) uočava se porast intenziteta vibracijske vrpce asimetričnog istezanja CH_2 skupine na valnom broju 2921 cm^{-1} s porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku. Istovjetna promjena može

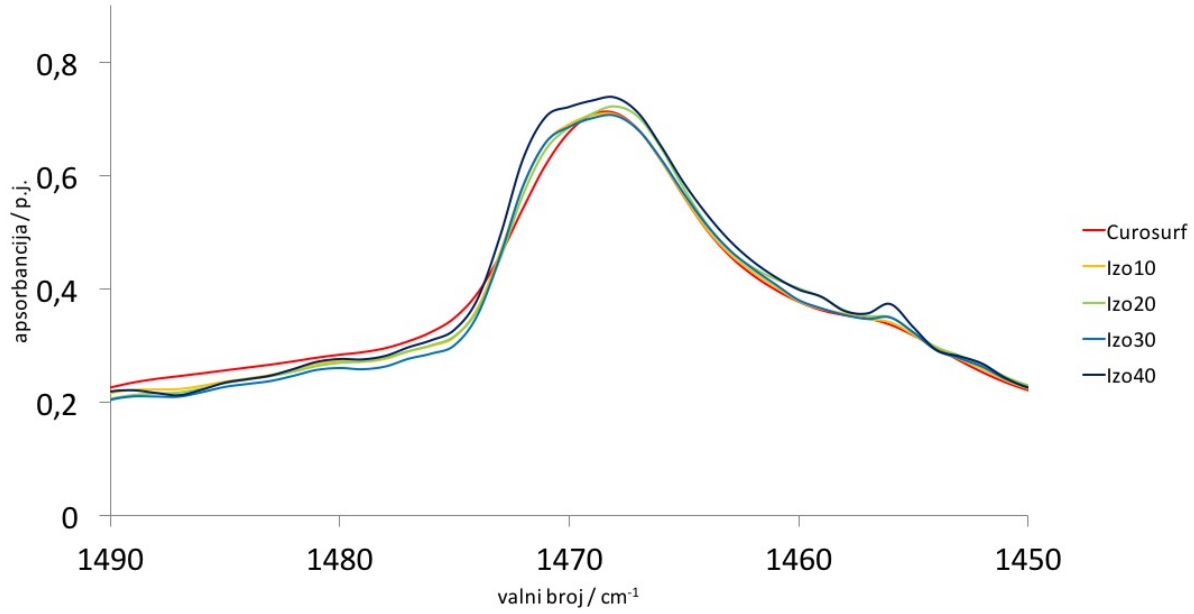
se uočiti i za vibracijsku vrpcu simetričnog istezanja CH_2 skupine na valnom broju 2851 cm^{-1} (Slika 4.4).

Vibracijske vrpce asimetričnog (2957 cm^{-1}) i simetričnog (2873 cm^{-1}) istezanja CH_3 skupine su vrlo malo promjenjene u spektrima svih uzoraka tretiranih izofluranom s izuzetkom vrpce asimetričnog istezanja CH_3 skupine u spektru uzoraka iz pripravka Izo30 koja je nešto slabijeg intenziteta (Slika 4.4).

Na vibracijskoj vrpci sjeckanja CH_2 skupine na valnom broju 1472 cm^{-1} se nakon dodavanja izoflurana javilo slabo izraženo rame na valnom broju 1469 cm^{-1} te blagi porast intenziteta vibracijske vrpce u spektru uzoraka iz pripravka Izo40 (Slika 4.5).



Slika 4.4 Vibracijske vrpce FTIR spektara hidrofobnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom - vibracijske vrpce istezanja CH_2 i CH_3 skupina



Slika 4.5 Vibracijske vrpce FTIR spektara hidrofobnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom - vibracijska vrpca sjeckanja CH_2 skupine

Tablica 4.2 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci hidrofobnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom - vibracijske vrpce istezanja i sjeckanja CH_2 skupine

	CH_2 asimetrično istezanje		CH_2 simetrično istezanje		CH_2 sjeckanje	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	2921	1,09	2851	1,00	1472	0,71
Izo10	2921	1,28	2851	1,10	1472	0,72
Izo20	2921	1,32	2851	1,11	1472	0,71
Izo30	2921	1,38	2851	1,11	1472	0,71
Izo40	2921	1,44	2851	1,18	1472	0,74

Tablica 4.3 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci hidrofobnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom - vibracijske vrpce istezanja CH_3 skupine

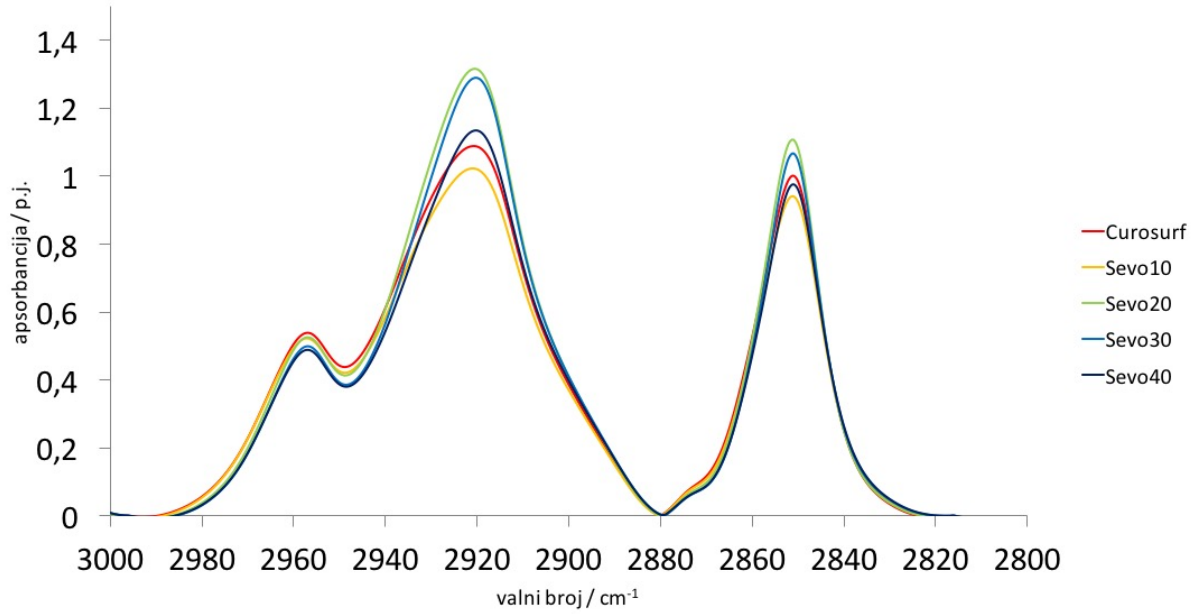
	CH_3 asimetrično istezanje		CH_3 simetrično istezanje	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	2957	0,54	2873	0,08
Izo10	2957	0,54	2873	0,08
Izo20	2957	0,54	2873	0,08
Izo30	2957	0,51	2873	0,07
Izo40	2957	0,55	2873	0,08

4.3.1.2 Uzorci tretirani sevofluranom

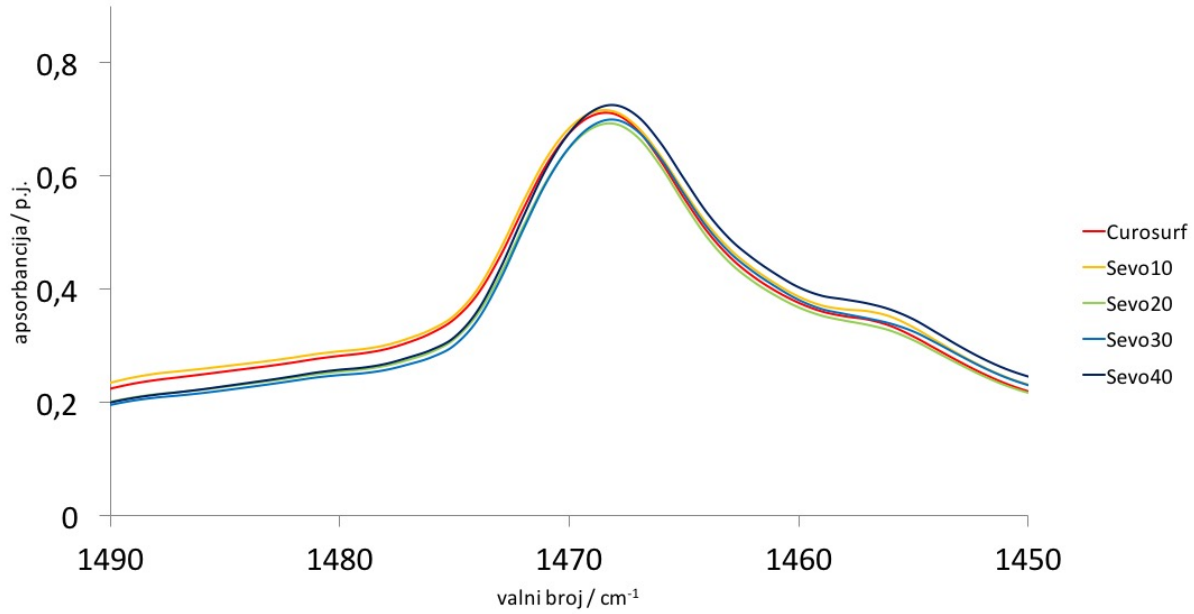
Spektri uzoraka tretiranih sevofluranom (uzorci iz pripravaka Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40) su pokazali nešto drugačije ponašanje u odnosu na one tretirane izofluranom. Vibracijske vrpce koje odgovaraju asimetričnoj i simetričnoj vibraciji istezanja CH_2 skupine imaju različite intenzitete, međutim, porast intenziteta ovih vrpci ne prati porast volumnog udjela anestetika u uzorku već je nekonzistentan. Najslabiji intenzitet javlja se kod vibracijske vrpce spektra uzorka iz pripravka Sevo10, a slijede ga intenziteti vibracijskih vrpci uzoraka iz Curosurfa te pripravaka Sevo40, Sevo30 i Sevo20 (Slika 4.6).

Mali pad intenziteta s porastom volumnog udjela anestetika u pripravku pojavljuje se za vibracijske vrpce asimetričnog (2957 cm^{-1}) i simetričnog (2873 cm^{-1}) istezanja CH_3 skupine (Slika 4.6).

Promjene vibracijske vrpce sjeckanja CH_2 skupine na valnom broju 1472 cm^{-1} su minimalne (Slika 4.7).



Slika 4.6 Vibracijske vrpce FTIR spektara hidrofobnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom - vibracijske vrpce istezanja CH_2 i CH_3 skupina



Slika 4.7 Vibracijske vrpce FTIR spektara hidrofobnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom - vibracijska vrpca sjeckanja CH_2 skupine

Tablica 4.4 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci hidrofobnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom - vibracijske vrpce istezanja i sjeckanja CH_2 skupine

	CH_2 asimetrično istezanje		CH_2 simetrično istezanje		CH_2 sjeckanje	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	2921	1,09	2851	1,00	1472	0,71
Sevo10	2921	1,02	2851	0,94	1472	0,72
Sevo20	2921	1,32	2851	1,11	1472	0,70
Sevo30	2921	1,29	2851	1,07	1472	0,70
Sevo40	2921	1,13	2851	0,97	1472	0,72

Tablica 4.5 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci hidrofobnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom - vibracijske vrpce istezanja CH_3 skupine

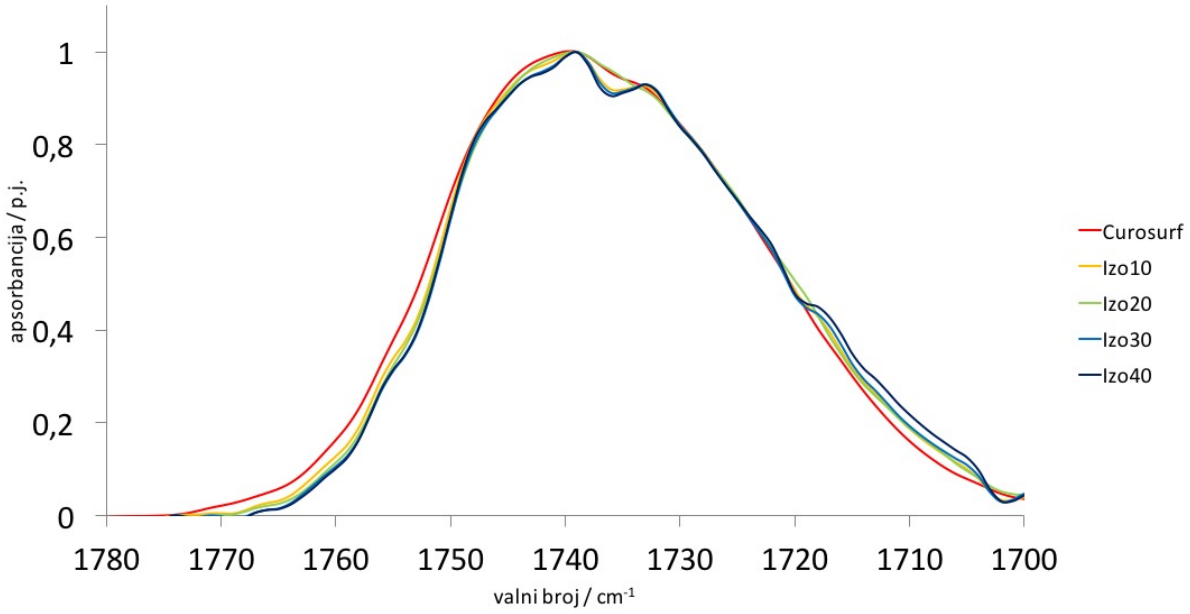
	CH_3 asimetrično istezanje		CH_3 simetrično istezanje	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	2957	0,54	2873	0,08
Sevo10	2957	0,53	2873	0,08
Sevo20	2957	0,53	2873	0,07
Sevo30	2957	0,50	2873	0,06
Sevo40	2957	0,49	2873	0,06

4.3.2 Vibracije karbonilne skupine

Najintenzivnija vibracijska vrpca područja spektra koje odgovara vibracijama istezanja C=O skupina uključenih u stvaranje esterskih veza s glicerolom se nalazi na valnom broju 1739 cm^{-1} u spektrima svih uzoraka (Slika 4.8 i Slika 4.9). Na valnim brojevima 1743 cm^{-1} i 1733 cm^{-1} se uočavaju dvije vibracijske vrpce u obliku ramena vodeće vrpce. U Tablicama 4.6 i 4.7 su za svaki uzorak navedeni položaji i intenzitet vibracijskih vrpci karakterističnih vibracija ovog područja spektra.

4.3.2.1 Uzorci tretirani izofluranom

Vibracijska vrpca koja se nalazi na valnom broju 1739 cm^{-1}, a odgovara vibraciji istezanja C=O skupine, nepromjenjena je u spektrima svih uzoraka tretiranih izofluranom (uzorci iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40) (Slika 4.8). S porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku, uočava se formiranje ramena na valnom broju 1743 cm^{-1} te vrlo mali pad intenziteta novonastale vrpce s porastom volumnog udjela anestetika u pripravku. Vibracijska vrpca na valnom broju 1733 cm^{-1} je s dodatkom anestetika postala izraženija. Valja napomenuti da se u spektru uzorka iz pripravka Izo20 ne mogu razlučiti navedene promjene već taj spektar prati liniju spektra Curosurfa.



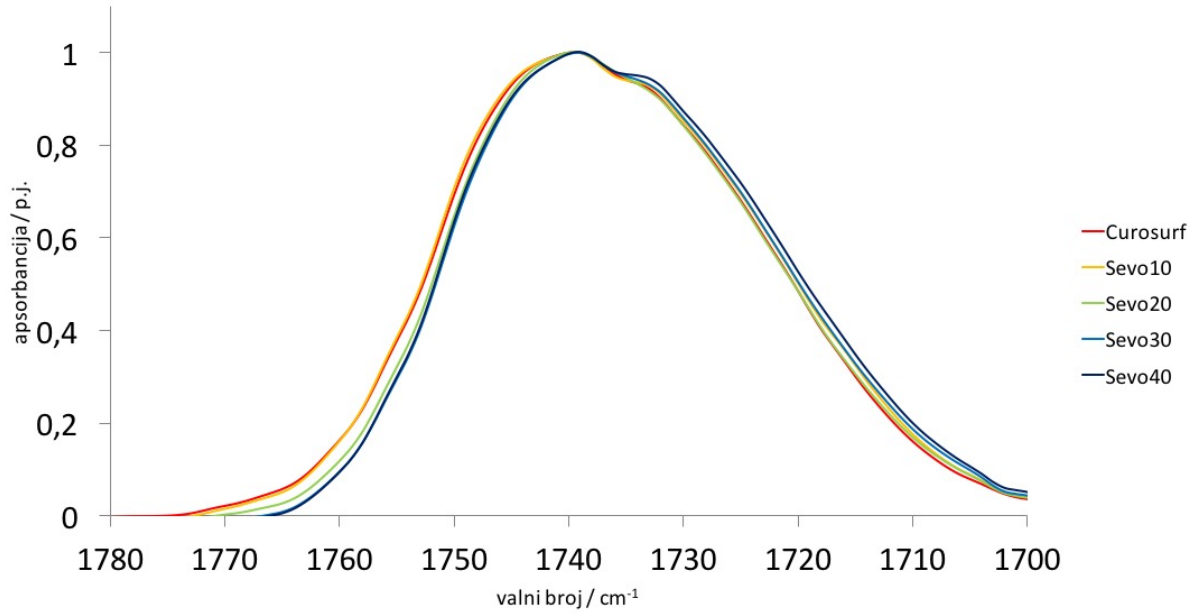
Slika 4.8 Vibracijske vrpce FTIR spektara karbonilne skupine molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom

Tablica 4.6 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci karbonilne skupine molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom

	C=O		C=O		C=O	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	-	-	1739	1,00	1733	0,92
Izo10	1743	0,96	1739	1,00	1733	0,93
Izo20	1743	0,96	1739	1,00	1733	0,92
Izo30	1743	0,95	1739	1,00	1733	0,93
Izo40	1743	0,95	1739	1,00	1733	0,93

4.3.2.2 Uzorci tretirani sevofluranom

U spektrima uzoraka tretiranih sevofluranom (uzorci iz pripravaka Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40) javile su se vrlo male promjene (Slika 4.9). Vibracijska vrpca na valnom broju 1743 cm^{-1} u spektrima ovih uzoraka nije razlučiva te ju stoga nismo uvrstili u Tablicu 4.7. Promjene vrpce na valnom broju 1733 cm^{-1} su neznatne.



Slika 4.9 Vibracijske vrpce FTIR spektara karbonilne skupine molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom

Tablica 4.7 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci karbonilne skupine molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom

	C=O		C=O		C=O	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	-	-	1739	1,00	1733	0,92
Sevo10	-	-	1739	1,00	1733	0,93
Sevo20	-	-	1739	1,00	1733	0,92
Sevo30	-	-	1739	1,00	1733	0,93
Sevo40	-	-	1739	1,00	1733	0,94

4.3.3 Vibracije polarnog dijela molekule fosfolipida

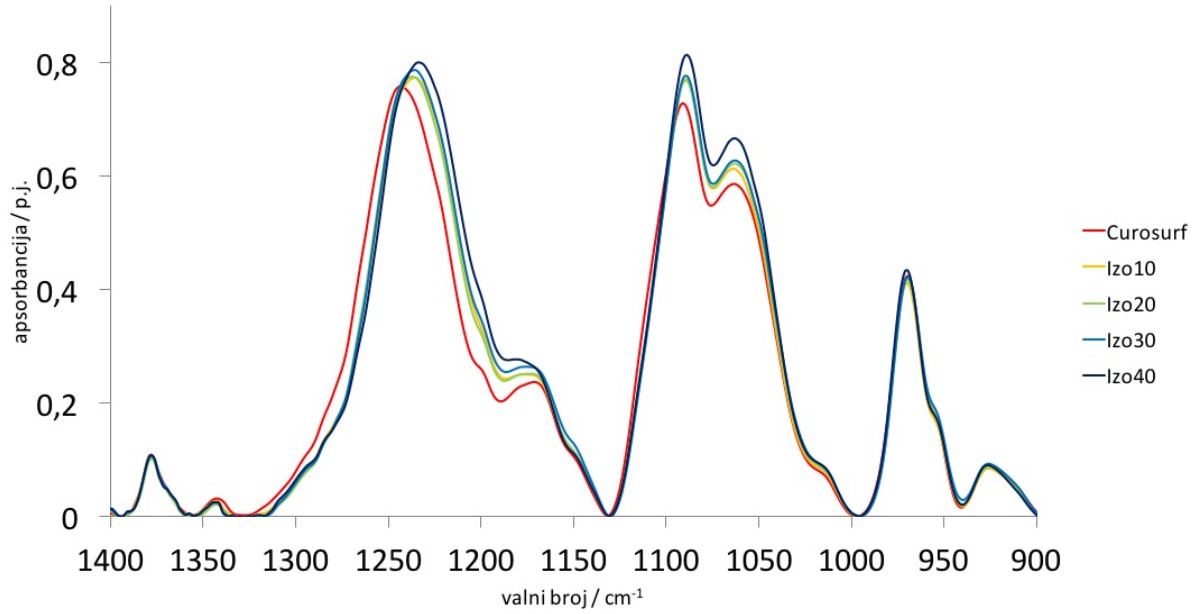
Najintenzivnije vibracijske vrpce polarnog dijela molekule fosfolipida su one koje proizlaze iz vibracija istezanja PO_2^- skupine i javljaju se na valnim brojevima 1244 cm^{-1} za vibraciju asimetričnog istezanje i 1091 cm^{-1} za vibraciju simetričnog istezanje (Slika 4.10 i Slika 4.11). Promjene koje se uočavaju u ovom području spektra vezane su upravo za vibracijske vrpce PO_2^- skupine i javljaju se u spektrima svih uzoraka. U Tablicama 4.8 i 4.9 su za svaki uzorak navedeni položaji i intenziteti vibracijskih vrpci karakterističnih vibracija ovog područja spektra.

4.3.3.1 Uzorci tretirani izofluranom

Najznačajnija promjena u spektrima uzoraka tretiranih izofluranom (uzorci iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40) javlja se na vibracijskoj vrpci asimetričnog istezanja PO_2^- skupine (Slika 4.10). Položaj vrpce se pomiče prema nižim valnim brojevima: s 1244 cm^{-1} na 1236 cm^{-1} u spektrima uzoraka iz pripravka Izo10 i Izo30, na 1237 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Izo20 i na 1234 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Izo40. Uočava se i proširenje vrpce s porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku. Intenzitet ove vrpce je također blago porastao s porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku.

Uočava se i promjena položaja vibracijske vrpce simetričnog istezanja PO_2^- skupine na valnom broju 1091 cm^{-1} prema nižim valnim brojevima. Intenzitet ove vibracijske vrpce je porastao s porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku (Slika 4.10).

Vibracijska vrpca istezanja kolina na valnom broju 970 cm^{-1} je vrlo blago promjenjenih intenziteta (Slika 4.10).



Slika 4.10 Vibracijske vrpce FTIR spektara polarnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom

Tablica 4.8 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci polarnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom

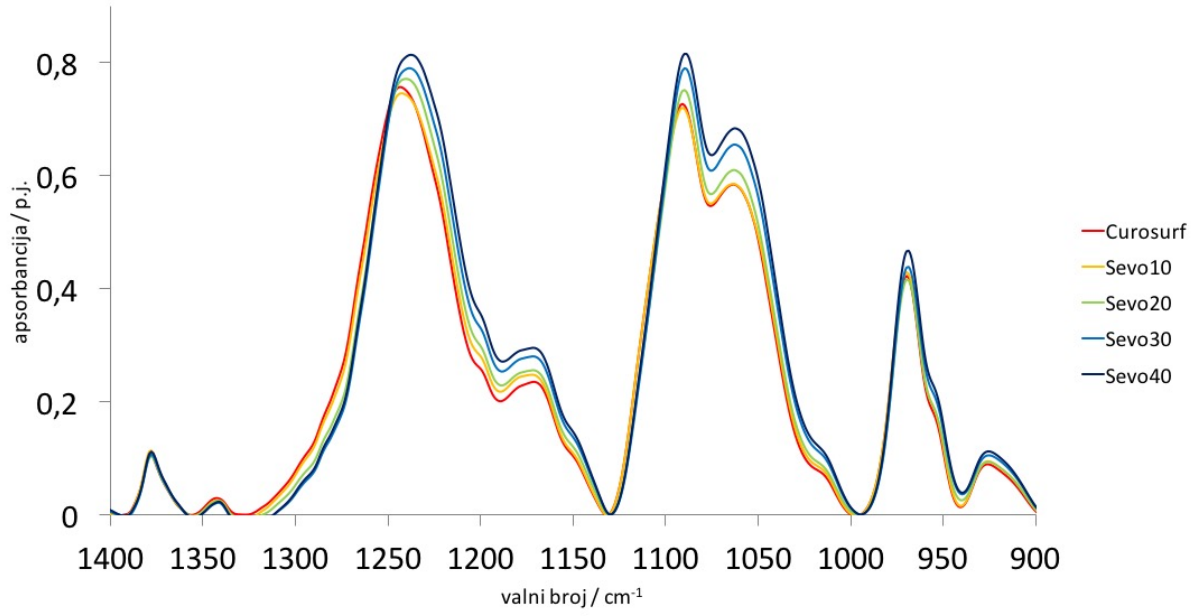
	PO_2^- asimetrično istezanje		PO_2^- simetrično istezanje		$(CH_3)_3N^+$	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	1244	0,76	1091	0,73	970	0,42
Izo10	1236	0,77	1090	0,77	970	0,41
Izo20	1237	0,77	1090	0,77	970	0,42
Izo30	1236	0,79	1090	0,78	970	0,42
Izo40	1234	0,80	1089	0,81	970	0,43

4.3.3.2 Uzorci tretirani sevofluranom

Najznačajnija promjena javlja na vibracijskoj vrpci asimetričnog istezanja PO_2^- skupine u spektrima svih uzoraka tretiranih sevofluranom (uzorci iz pripravaka Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40) (Slika 4.11). Položaj vrpce se pomiče prema nižim valnim brojevima: s 1244 cm^{-1} na 1242 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Sevo10, na 1240 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Sevo20, na 1239 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Sevo30 i na 1238 cm^{-1} u spektru uzoraka iz pripravka Sevo40. Uočava se i proširenje vrpce s porastom volumnog udjela sevoflurana u pripravku. Intenzitet ove vrpce je vrlo blago porastao s porastom volumnog udjela izoflurana u pripravku uz iznimku spektra uzoraka iz pripravka Sevo10.

Intenzitet vibracijske vrpce simetričnog istezanja PO_2^- skupine na valnom broju 1091 cm^{-1} je, uz iznimku spektra uzoraka iz pripravka Sevo10, porastao s porastom volumnog udjela sevoflurana u pripravku, a može se uočiti i promjena položaja ove vrpce prema nižim valnim brojevima (Slika 4.11).

Promjene intenziteta vibracijske vrpce istezanja kolina na valnom broju 970 cm^{-1} su vrlo blage. Nešto veći porast intenziteta ove vrpce javlja se tek u spektru uzoraka iz pripravka Sevo40 (Slika 4.11).



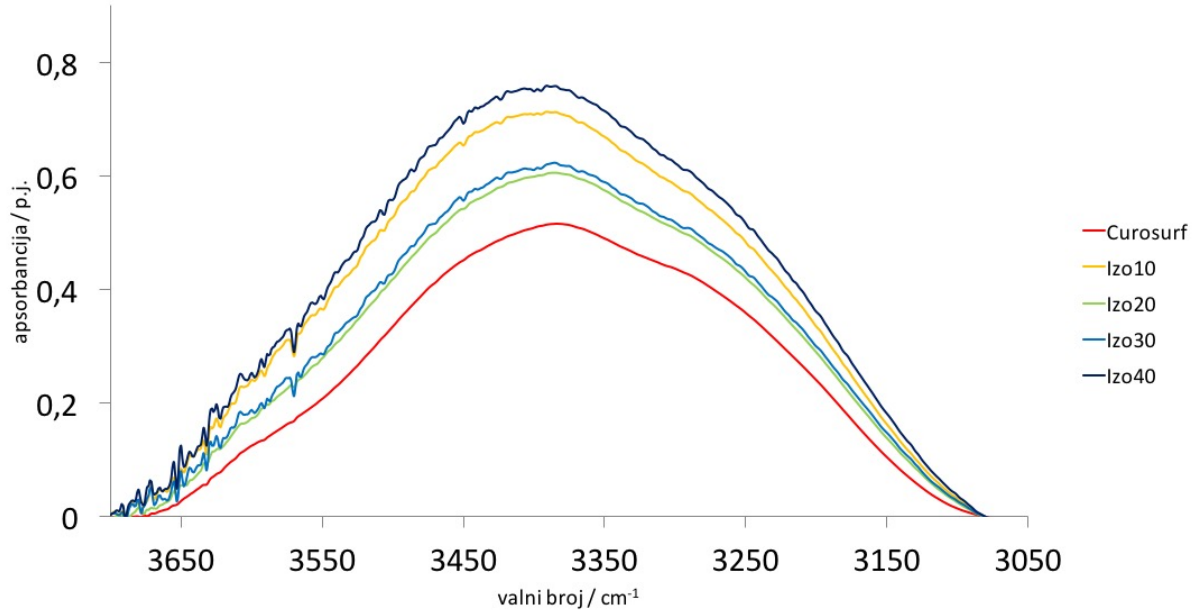
Slika 4.11 Vibracijske vrpce FTIR spektara polarnog dijela molekule fosfolipida uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom

Tablica 4.9 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta karakterističnih vibracijskih vrpci polarnog dijela molekule fosfolipida u FTIR spektrima uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom

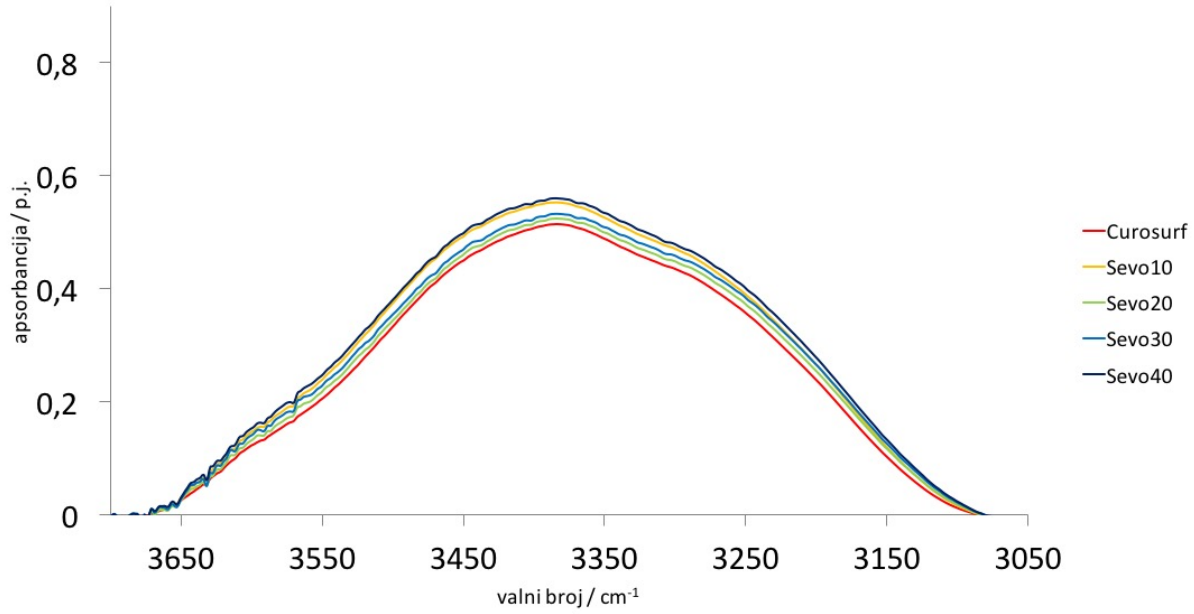
	PO_2^- asimetrično istezanje		PO_2^- simetrično istezanje		$(CH_3)_3N^+$	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	1244	0,76	1091	0,73	970	0,42
Sevo10	1242	0,75	1091	0,72	970	0,43
Sevo20	1240	0,77	1090	0,75	970	0,42
Sevo30	1239	0,79	1090	0,79	970	0,44
Sevo40	1238	0,81	1089	0,82	970	0,47

4.3.4 Vibracije OH skupine

Vibracije istezanja OH skupine se javljaju kao široka vibracijska vrpca s maksimumom intenziteta na valnom broju 3384 cm^{-1} (Slika 4.12 i Slika 4.13). Porast intenziteta ove vrpce javlja se u spektrima svih tretiranih uzoraka, (uzorci iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30, Izo40, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40). Porast intenziteta ove vrpce u spektrima uzoraka iz pripravaka Izo10 i Sevo10 je nesrazmjerno viši u odnosu na porast intenziteta ove vrpce u spektrima ostalih uzoraka. Promjene intenziteta u skupini uzoraka tretiranih sevofluranom su slabije izražene od promjena intenziteta u skupini uzoraka tretiranih izofluranom. U Tablici 4.10 su za svaki uzorak navedeni položaji i intenziteti vibracijske vrpce OH skupine.



Slika 4.12 Vibracijske vrpce FTIR spektara OH skupine uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih izofluranom



Slika 4.13 Vibracijske vrpce FTIR spektara OH skupine uzoraka Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom

Tablica 4.10 Vrijednosti valnih brojeva i intenziteta vibracijskih vrpci OH skupine u FTIR spektarima svih uzoraka

	OH	
uzorak iz pripravka	valni broj (cm^{-1})	apsorbancija (p.j.)
Curosurf	3384	0,51
Izo10	3384	0,71
Izo20	3384	0,60
Izo30	3384	0,62
Izo40	3384	0,76
Sevo10	3384	0,55
Sevo20	3384	0,52
Sevo30	3384	0,53
Sevo40	3384	0,56

4.4 PC analiza FTIR spektara tankih filmova uzoraka

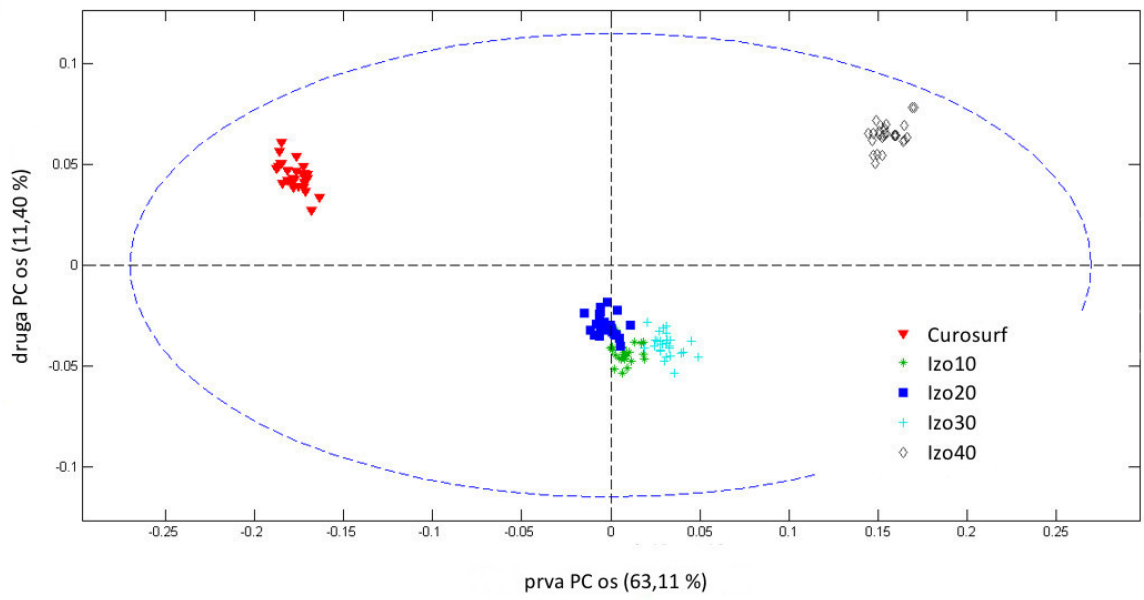
Vrijednosti dobivene analizom glavnih komponenti (PC) FTIR spektara tankih filmova uzoraka pokazuju da je većina varijacije podataka predstavljena s prvom glavnom komponentom, PC1 (Tablica 4.11).

Tablica 4.11 Varijance opisane s prve dvije glavne komponente za FTIR spektre tankih filmova uzoraka

	Udio varijance, %	
	spektri uzoraka iz pripravaka Curosurf, Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40	spektri uzoraka iz pripravaka Curosurf, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40
PC1	63,11	60,93
PC2	11,40	10,60

4.4.1 Uzorci tretirani izofluranom

Na grafičkom prikazu faktorskih bodova u prostoru glavnih komponenti PC1 i PC2 prikazano je jasno grupiranje spektara uzoraka iz pripravaka Curosurf, Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40 (Slika 4.14). Vidi se i značajna razdvojenost spektara uzoraka Curosurfa i spektara uzoraka pripravljenih iz pripravka Izo40 međusobno te u odnosu na spektre ostalih uzoraka.



Slika 4.14 Grafički prikaz faktorskih bodova u prostoru prve dvije glavne komponente za spektre uzoraka iz pripravka Curosurf i pripravaka tretiranih izofluranom

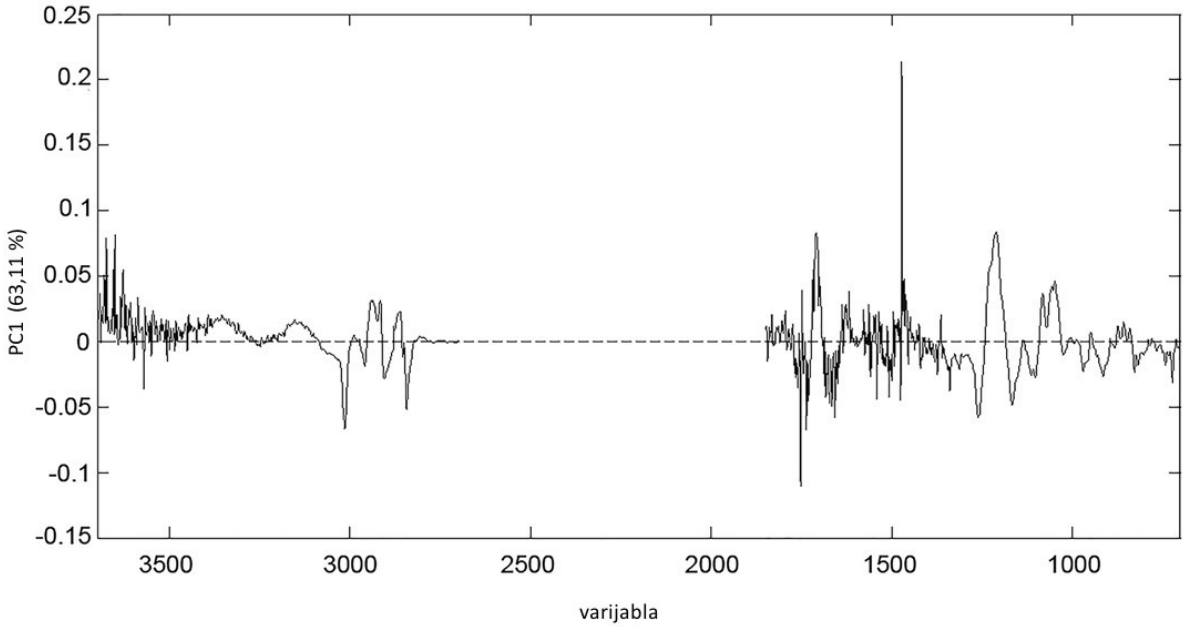
Opterećenja prve glavne komponente, PC1, koja odgovaraju faktorskim bodovima za spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30 i Izo40 su grafički prikazana na Slici 4.15.

Na grafu opterećenja se u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama hidrofobnog dijela uočava nekoliko manje izraženih opterećenja koje uključuju opterećenje negativne vrijednosti pri 2960 cm^{-1}, opterećenje pozitivne vrijednosti pri 2920 cm^{-1}, opterećenje pozitivne vrijednosti pri 2862 cm^{-1} i opterećenje negativne vrijednosti pri 2842 cm^{-1} (Slika 4.15).

Na grafu opterećenja, u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama karbonilne skupine, izdvajaju se slijedeća opterećenja: opterećenje pozitivne vrijednosti pri 1746 cm^{-1} i opterećenje negativne vrijednosti pri 1735 cm^{-1} (Slika 4.15).

Na grafu opterećenja se u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama polarnog dijela molekule fosfolipida izdvaja opterećenje negativne vrijednosti s minimumom intenziteta pri 1258 cm^{-1} koje se nastavlja u opterećenje pozitivne vrijednosti s maksimumom intenziteta pri 1212 cm^{-1} (Slika 4.15) .

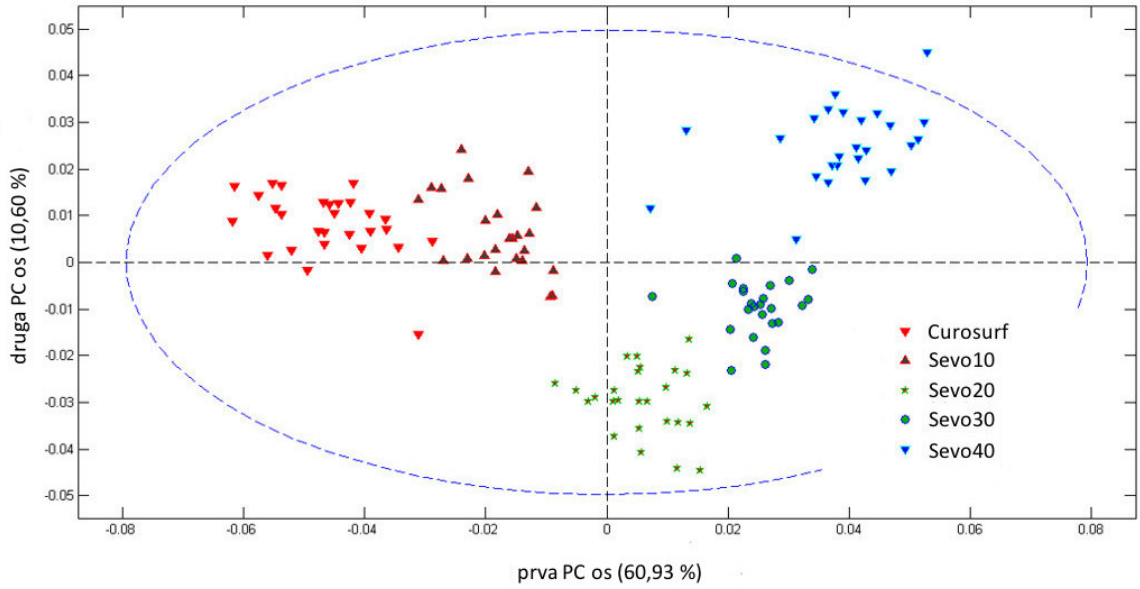
Najintenzivnije opterećenje na grafu opterećenja je pozitivne vrijednosti i javlja se pri 1472 cm^{-1}. Na ovom valnom broju nalazi se vibracijska vrpca koja odgovara vibraciji sjeckanja CH_2 skupine (Slika 4.15).



Slika 4.15 Grafički prikaz opterećenja prve glavne komponente koja odgovaraju faktorskim bodovima za spektre uzoraka iz pripravaka tretiranih izofluranom

4.4.2 Uzorci tretirani sevofluranom

Na grafičkom prikazu faktorskih bodova u prostoru glavnih komponenti PC1 i PC2 prikazano je jasno grupiranje spektara uzoraka iz pripravaka Curosurf, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40 (Slika 4.14).



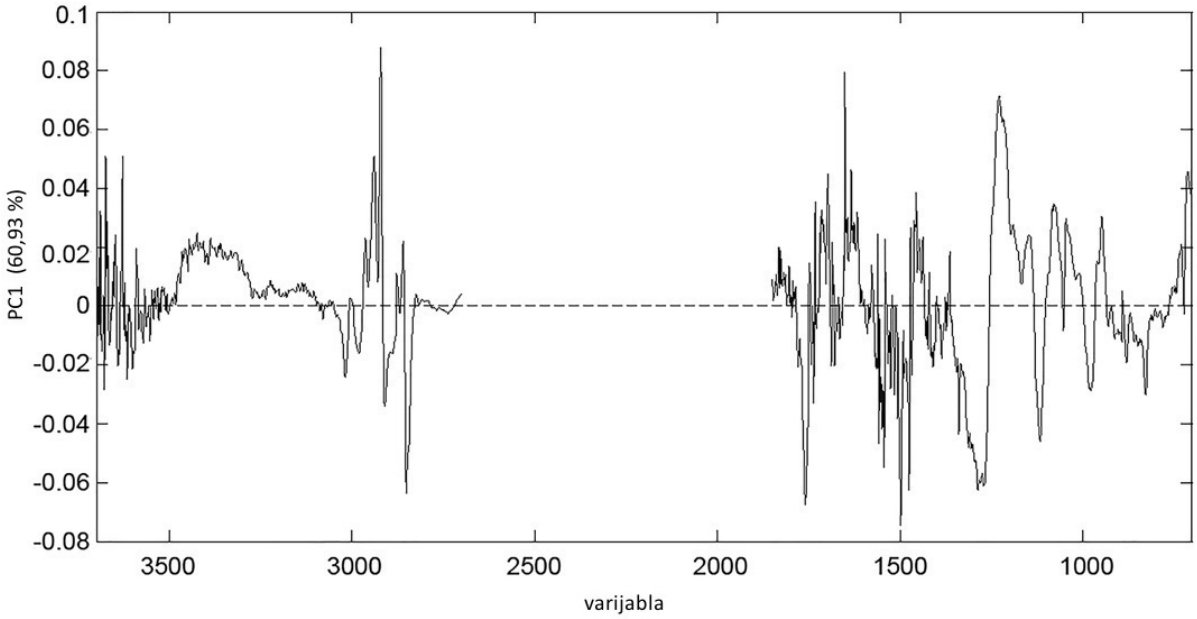
Slika 4.16 Grafički prikaz faktorskih bodova u prostoru prve dvije glavne komponente za spektre uzoraka iz pripravka Curosurf i pripravaka tretiranih sevofluranom

Opterećenja prve glavne komponente koja odgovaraju faktorskim bodovima za FTIR spektre uzoraka Curosurfa te uzorke iz pripravaka Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40 grafički su prikazana na Slici 4.17.

Na grafu opterećenja se u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama hidrofobnog dijela molekule fosfolipida uočava opterećenje izrazito pozitivne vrijednosti pri 2921 cm^{-1} te opterećenje izrazito negativne vrijednosti pri 2851 cm^{-1}. Ova opterećenja odgovaraju asimetričnoj odnosno simetričnoj vibraciji istezanja CH_2 skupine. Manje izražena opterećenja se uočavaju pri 3018 cm^{-1} (negativna vrijednost), 2964 cm^{-1} i 2939 cm^{-1} (pozitivna vrijednosti), 2910 cm^{-1} (negativna vrijednosti) i 2859 cm^{-1} (pozitivna vrijednosti) (Slika 4.17).

Na grafu opterećenja, u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama karbonilne skupine, uočavaju se slijedeća opterećenja: opterećenje negativne vrijednosti pri 1737 cm^{-1} i opterećenje pozitivne vrijednosti pri 1732 cm^{-1} (Slika 4.17).

Na grafu opterećenja, u području valnih brojeva koje odgovara vibracijama polarnog dijela molekule fosfolipida, izdvaja se opterećenje izrazito negativne vrijednosti s minimumom intenziteta pri 1289 cm^{-1} koje se nastavlja u opterećenje pozitivne vrijednosti s maksimumom intenziteta pri 1227 cm^{-1} (Slika 4.17).



Slika 4.17 Grafički prikaz opterećenja prve glavne komponente koja odgovaraju faktorskim bodovima za spektre uzoraka iz pripravaka tretiranih izofluranom

4.5 Studentov *t*-test

Zbog izrazito velikog broja uspoređivanih mjerenja klasični tablični prikaz rezultata Studentovog *t*-testa nije izvediv te su rezultati prikazani grafički (Slike 4.18 do 4.25). Razlikovni spektar dobiven je oduzimanjem srednjeg spektra svakog seta tretiranih uzoraka (uzorci iz pripravaka Izo10, Izo20, Izo30, Izo40, Sevo10, Sevo20, Sevo30 i Sevo40) od srednjeg spektra seta uzoraka Curosurfa. Pozitivne i negativne promjene u razlikovnom spektru označavaju područja spektra u kojima se javljaju razlike između dva uspoređivana srednja spektra. Pozitivna promjena označava porast, a negativna promjena pad intenziteta srednjeg spektra tretiranih uzoraka u odnosu na srednji spektar Curosurfa. Studentov *t*-test je proveden za svaki valni broj razlikovnog spektra. Valni brojevi na kojima se javila statistički značajna razlika između dva promatrana srednja spektra su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom (Slike 4.18 do 4.25). Kriterij statističke značajnosti je bio $p < 0,01$. Pomoću Kolmogorov - Smirnov testa uz $p < 0,05$ je pokazano da točke u promatranim spektrima uz vrlo rijetke iznimke zadovoljavaju uvjet normalne raspodjele koja je uvjet za primjenu Studentovog *t*-testa. Standardna devijacija srednjih spektara je prikazana tankom linijom (Slike 4.18 do 4.25).

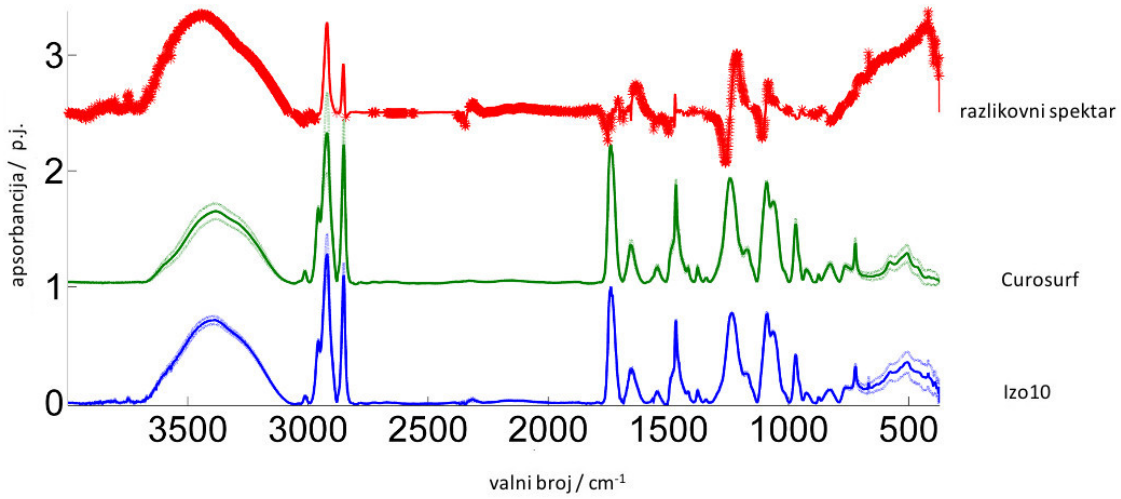
4.5.1 Uzorci tretirani izofluranom

U području spektra koje odgovara vibracijama hidrofobnog dijela molekule fosfolipida, na razlikovnom spektru se za uspoređivane srednje spektre svih uzoraka javljaju dvije jasno naznačene vrpce pozitivnog intenziteta s maksimumima intenziteta pri 2921 cm^{-1} odnosno 2851 cm^{-1}, a odgovaraju vibracijama asimetričnog odnosno simetričnog istezanja CH_2 skupine (Slike 4.18 do 4.21). Statistički značajna razlika vibracijske vrpce asimetričnog istezanja CH_2 skupine javlja se između srednjih spektara uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo30 (Slika 4.20). Statistički značajna razlika obje vibracijske vrpce CH_2 skupine javlja se između srednjih spektara uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo40 (Slika 4.21). Na valnim brojevima 1472 cm^{-1} i 1469 cm^{-1} koji odgovaraju položaju vibracijske vrpce sjeckanja CH_2 skupine se na razlikovnom spektru za uspoređivane srednje spektre svih uzoraka javljaju vrpce pozitivnog intenziteta. Statistički značajna razlika javlja se na valnom broju 1469 cm^{-1} između srednjih spektara Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo40.

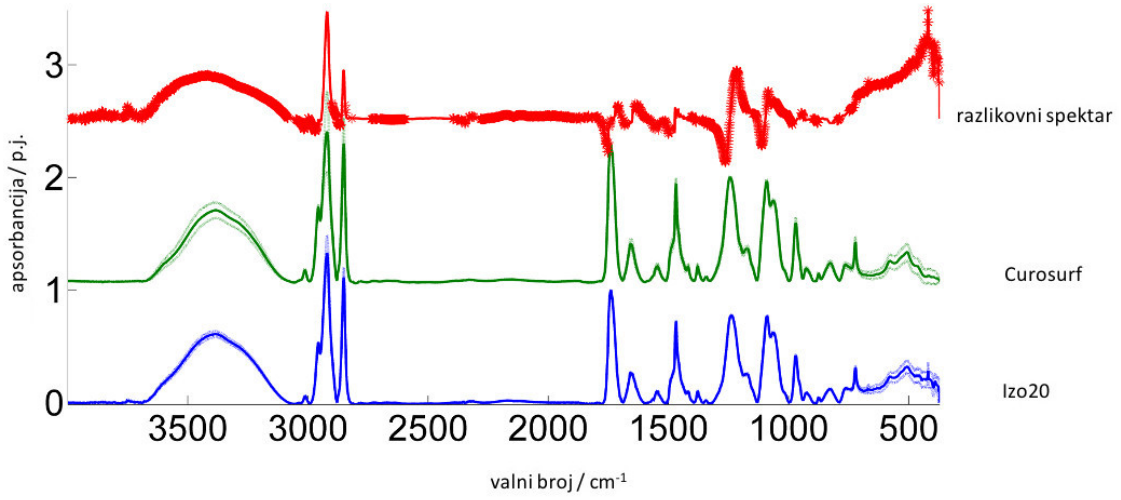
U području spektra koje odgovara vibracijama karbonilne skupine se na razlikovnom spektru za uspoređivane srednje spektre svih uzoraka javljaju dvije vrpce negativnog intenziteta s minimumima intenziteta pri 1748 cm^{-1} i 1733 cm^{-1} (Slike 4.18 do 4.21). Statistički značajna razlika ovih vrpci se javlja između srednjih spektara svih uspoređivanih uzoraka.

U području spektra koje odgovara vibracijama polarnog dijela molekule fosfolipida se na razlikovnom spektru se uspoređivane srednje spektre svih uzoraka javljaju četiri vrpce: vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1260 cm^{-1} koja se nastavlja u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1216 cm^{-1} te vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1111 cm^{-1} koja se nastavlja u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1087 cm^{-1} (Slike 4.18 do 4.21). Statistički značajna razlika ovih vrpci se javlja između srednjih spektara svih uspoređivanih uzoraka.

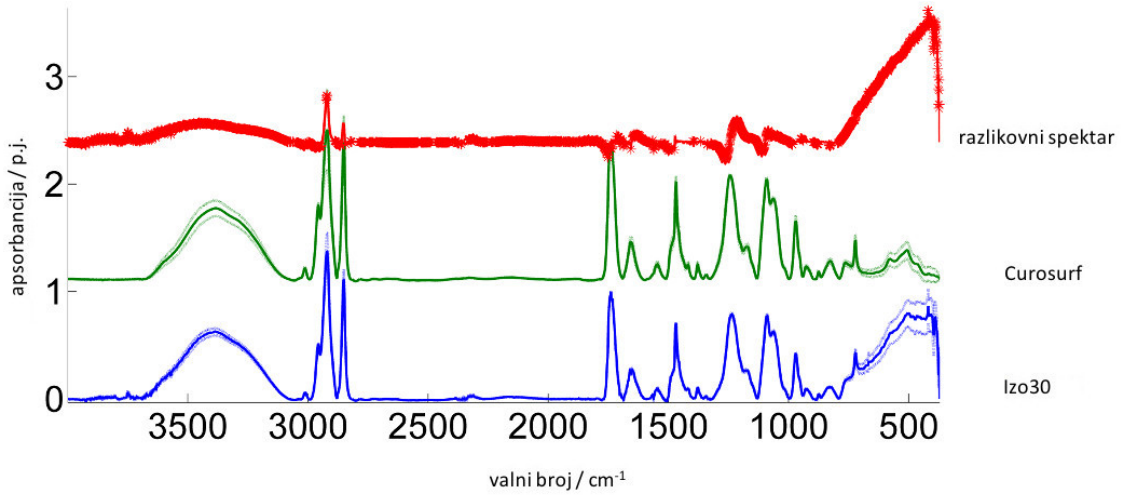
U području spektra koje odgovara vibraciji istezanja OH skupine, na razlikovnog spektru se za uspoređivane srednje spektre svih uzoraka uočava široka vrpca pozitivnog intenziteta (Slike 4.18 do 4.21). Statistički značajna razlika ove vrpce se javlja između srednjih spektara svih uspoređivanih uzoraka.



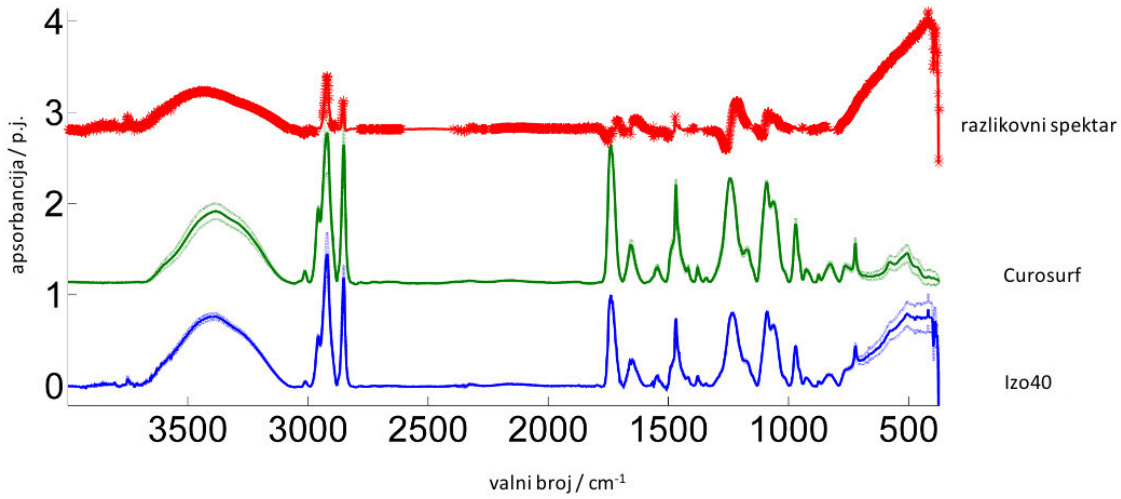
Slika 4.18 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo10 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.19 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo20 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.20 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo30 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.21 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Izo40 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.

4.5.2 Uzorci tretirani sevofluranom

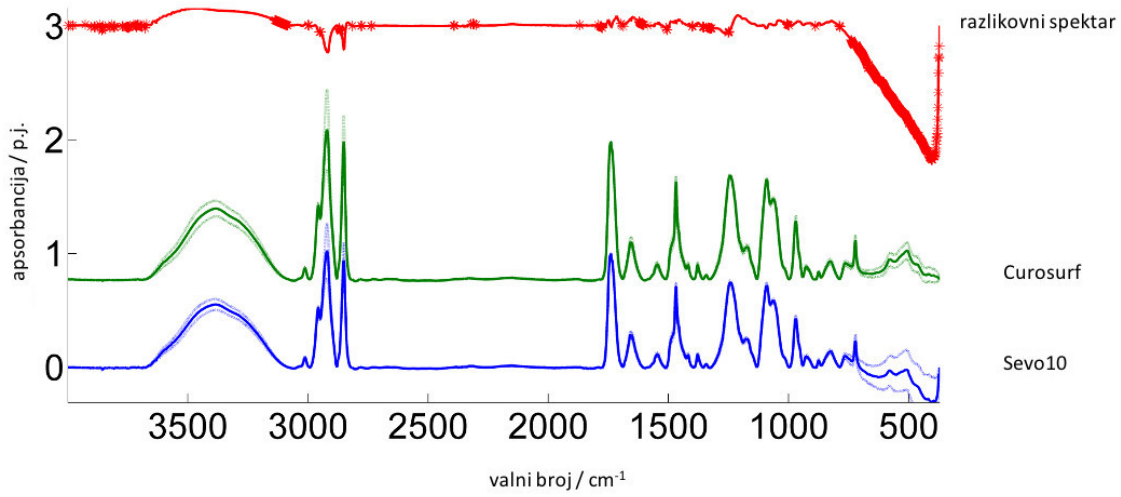
U području spektra koje odgovara vibracijama hidrofobnog dijela molekule fosfolipida, na razlikovnom spektru se za uspoređivane srednje spektre svih uzoraka javljaju dvije vrpce pri 2921 cm^{-1} odnosno 2851 cm^{-1}, a odgovaraju vibracijama asimetričnog odnosno simetričnog istezanja CH_2 skupine (Slike 4.22 do 4.25). Na razlikovnom spektru srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo10, obje vrpce su negativnog intenziteta i nisu obilježene kao statistički značajne (Slike 4.22). Na razlikovnom spektru srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo20, obje vrpce su pozitivnog intenziteta te također nisu obilježene kao statistički značajne (Slike 4.23). Na razlikovnom spektru srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo30, vrpca koja odgovara vibracijama asimetričnog istezanja CH_2 skupine pri 2921 cm^{-1} je pozitivnog intenziteta i nije obilježena kao statistički značajna, dok je vrpca simetričnog istezanja negativnog intenziteta i obilježena je kao statistički značajna (Slike 4.24). Na razlikovnom spektru srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo40 obje su vrpce negativnog intenziteta i obilježene kao statistički značajne (Slike 4.25). Izostalo je javljanje vrpci na položajima koji odgovaraju vibracijskim vrpcama sjeckanja CH_2 skupine.

U području spektra koje odgovara vibracijama karbonilne skupine, na razlikovnim spektrima srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo20, Curosurfa i Sevo30 te Curosurfa i Sevo40, javlja se vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1750 cm^{-1} (Slike 4.23 do 4.25). Statistički značajna razlika ovih vrpci javlja se između srednjih spektara navedenih uzoraka.

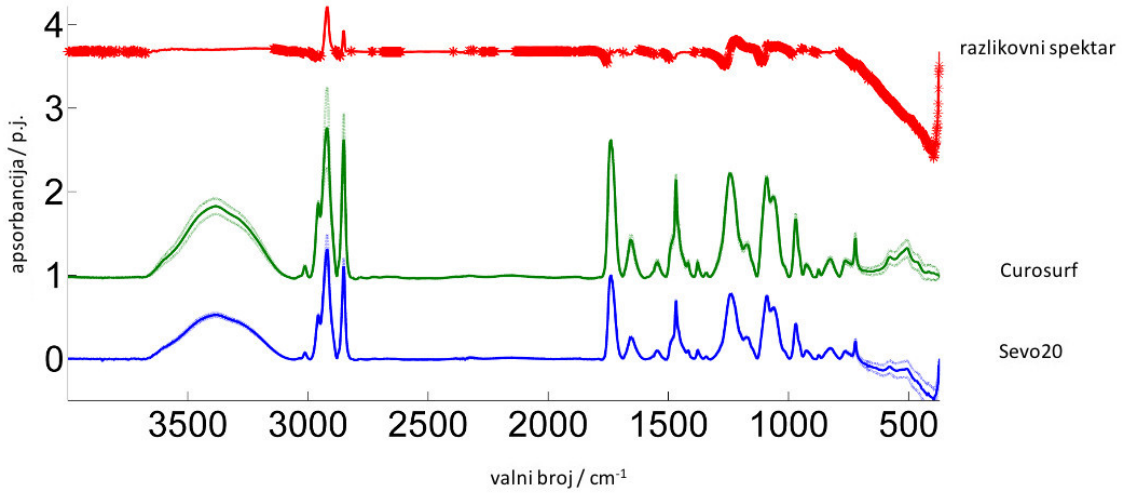
U području spektra koje odgovara vibracijama polarnog dijela molekule fosfolipida, na razlikovnom spektru srednjeg spektra Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo10, javlja se vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1256 cm^{-1} i prelazi u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1214 cm^{-1} (Slika 4.22). Statistički značajnom je obilježena točka pri 1244 cm^{-1}. Na razlikovnom spektru srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo20 javlja se vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1265 cm^{-1} koja prelazi u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1217 cm^{-1} te vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1112 cm^{-1} koja prelazi u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1088 cm^{-1} (Slika 4.23). Navedene vrpce su obilježene kao statistički značajne. Na razlikovnom spektru uzoraka srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo30, javlja se vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1261

cm^{-1} i prelazi u vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1216 cm^{-1} te vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1112 cm^{-1} koja prelazi u vrpcu pozitivnog intenziteta s dva maksimuma intenziteta pri 1084 cm^{-1} i 1047 cm^{-1} (Slika 4.24). Navedene vrpce su obilježene kao statistički značajne. Na razlikovnom spektru uzoraka srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo40, javlja se vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1269 cm^{-1} i nastavlja se na vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumom intenziteta pri 1217 cm^{-1} te vrpca negativnog intenziteta s minimumom intenziteta pri 1116 cm^{-1} koja se nastavlja na vrpcu pozitivnog intenziteta s maksimumima intenziteta pri 1084 cm^{-1} i 1047 cm^{-1} (Slika 4.25). Navedene vrpce su obilježene kao statistički značajne.

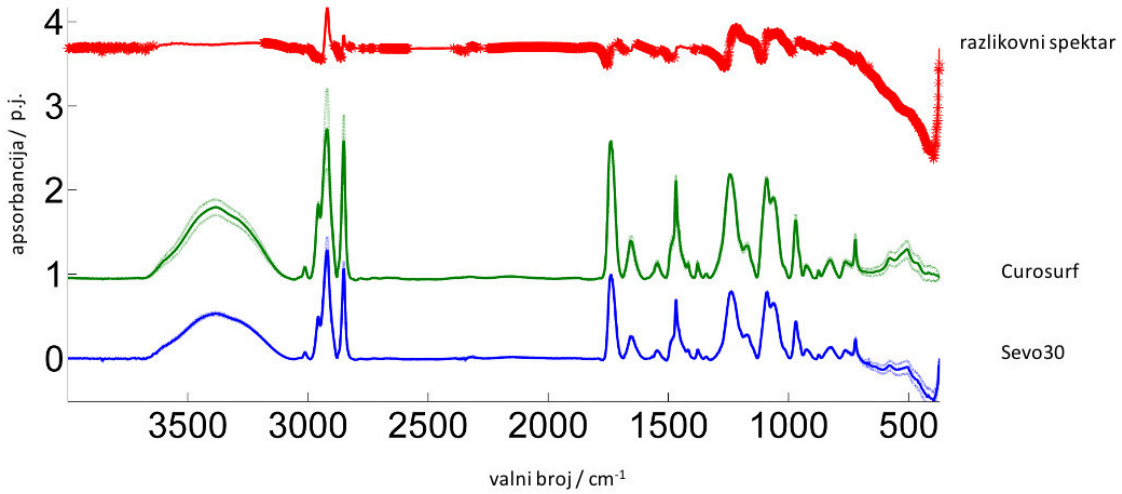
U području spektra koje odgovara vibraciji istezanja OH skupine, na razlikovnim spektrima uzoraka srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo10 te Curosurfa i Sevo40, uočava se široka vrpca pozitivnog intenziteta obilježena kao statistički značajna tek na manjem dijelu razlikovnog spektra srednjeg spektra uzoraka Curosurfa i srednjeg spektra uzoraka iz pripravka Sevo40 (Slika 4.22 i Slika 4.25).



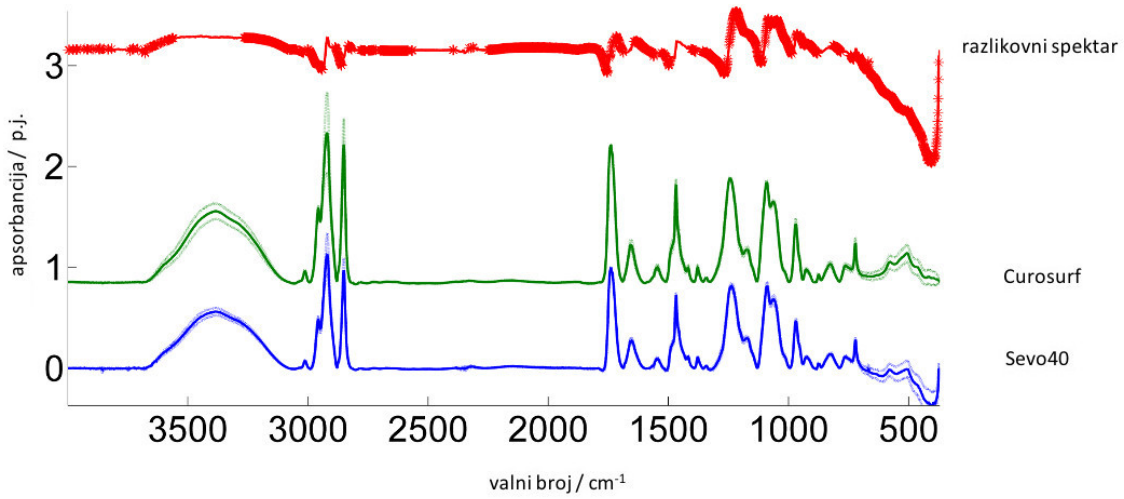
Slika 4.22 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Sevo10 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.23 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Sevo20 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.24 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Sevo30 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.



Slika 4.25 Rezultat Studentovog *t*-testa provedenog za srednje spektre uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravka Sevo40 ($p < 0,01$, standardna devijacija je označena tankom linijom). Valni brojevi na kojima je razlika između uspoređivanih spektara statistički značajna su na razlikovnom spektru označeni zvjezdicom.

5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je uporabom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom istražiti utjecaj inhalacijskih anestetika izoflurana i sevoflurana na fosfolipidnu komponentu plućnog surfaktanta te provjeriti mogu li se multivarijantna analiza podataka i statistička analiza Studentovim *t*-testom uspješno primjeniti kao nadopuna obradi spektara i razumjevanju opažanih promjena. Infracrvena spektroskopija je odavno prepoznata kao vrijedna analitička metoda, dijelom zbog svoje niske cijene, visoke osjetljivosti i nedestruktivnosti u određivanju molekulskih svojstava bioloških molekula i utjecaja vanjskih čimbenika na biološke molekule, a dijelom jer pruža mogućnost rada s raznolikim uzorcima vrlo malih količina.

Infracrvena spektroskpija je u ovom istraživanju upotpunjena multivarijantnom analizom podataka – PC analizom i statističkom analizom Studentovim *t*-testom. PC analiza je iznimno korisna metoda kada se barata s velikim brojem varijabli. U ovom istraživanju varijable su valni brojevi. Da bi se potvrdilo da postoji razlika između setova spektara uzoraka iz svakog pripravka u odnosu na cijelo transmisijsko područje, određeni su faktorski bodovi na čijem se grafu vidi jasno grupiranje setova spektara iz svakog pripravka, čime je potvrđeno postojanje razlike. Opterećenja su određena da bi se odredilo koji valni brojevi doprinose razdvajanju setova spektara te potvrdilo da razdvajanju, tj. razlici među spektrima, doprinose glavne funkcionalne skupine molekule fosfolipida.

Nezavisno od PC analize napravljeni su izračuni razlikovnih spektara između srednjeg spektra uzoraka Curosurfa te srednjeg spektra uzoraka iz svakog pripravka te je učinjena njihova analiza Studentovim *t*-testom kojim se, za svaki valni broj u spektru, odredilo postojanje statistički značajne razlike. Studentovim *t*-testom je potvrđena razlika među spektrima na onim valnim brojevima na kojima se nalaze glavne funkcionalne skupine fosfolipida.

Dosadašnja istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant su iznimno rijetka i većinom starijeg datuma (Woo i sur., 1969., Enhorning i sur., 1986., Lalchev i sur. 1992., Tobin i sur., 2000.), a niti jedno do sada objavljeno istraživanje se ne temelji na uporabi infracrvene spektroskopije što je donekle predstavljalo otežavajući čimbenik u interpretaciji rezultata ovog istraživanja. Nasuprot tome, istraživan je utjecaj inhalacijskih anestetika na fosfolipide membrane, strukture kojoj je plućni surfaktant vrlo sličan, međutim i ova su istraživanja većinom starijeg datuma. Prema podacima iz dostupne literature, istraživani su najčešće stariji anestetici kloroform, halotan i enfluran koji su danas zamijenjeni izofluranom, sevofluranom i desfluranom, učinkovitijim anesteticima novije generacije s mnogo manje neželjenih svojstava. Spoznaje proizašle iz tih istraživanja, kao i literatura vezana uz vibracijsku spektroskopiju fosfolipida, doprinijele su razvoju metodologije i razumijevanju rezultata ovog istraživanja. Fosfolipidi su odličan kandidat za infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom budući da sadrže infracrveno aktivne veze u sva tri dijela od kojih je molekula građena: u hidrofobnim repovima, u području esterskih veza s glicerolom i u hidrofilnoj glavi (Lewis i McElhaney, 1998.).

Biološke membrane nisu idealan model za istraživanje plućnog surfaktanta budući da su građene od lipidnog dvosloja, dok se plućni surfaktant *in vivo* nalazi u obliku jednosloja. Curosurf je, međutim, liposomalni lijek što ga zbog postojanja lipidnog dvosloja čini znatno pogodnijim za usporedbu s biološkim membranama. Membrane karakterizira temperatura faznog prijelaza pri kojoj lipidi iz gel faze u kojoj su lanci masnih kiselina ispruženi i gusto naslagani prelaze u fazu tekućih kristala koju karakterizira porast neuređenosti i fluidnosti membrane. Na temperaturu faznog prijelaza utječe nekoliko čimbenika poput duljine lanca masne kiseline, stupnja nezasićenosti masne kiseline te naboja lipida. Iako se nigdje u dostupnoj literaturi ne navodi temperatura faznog prijelaza Curosurfa, zbog visokog udjela DPPC-a čija je temperatura faznog prijelaza 41 °C (http://www.avantilipids.com), smatramo da je Curosurf na sobnoj temperaturi pri kojoj su se vršila mjerenja u gel fazi. Treba naglasiti i da Curosurf, za razliku od plućnog surfaktanta *in vivo,* ne sadrži kolesterol čija prisutnost također može utjecati na uređenost strukture dvosloja odnosno jednosloja.

Infracrveni spektar plućnog surfaktanta Curosurfa je snimljen i analiziran prije snimanja spektara tretiranih uzoraka, a asignacija vibracijskih vrpci, učinjena na temelju podataka o položaju vibracijskih vrpci fosfolipida ranije objavljenih u literaturi je pokazala da spektar Curosurfa sadržava elemente tipičnog spektra fosfolipida.

Hidrofobni dio

U području valnih brojeva od 3100 do 2800 cm^{-1} koje odgovara vibracijama hidrofobnih repova javljaju se vibracijske vrpce istezanja CH_2 i CH_3 skupina. Vibracijske vrpce koje odgovaraju asimetričnom i simetričnom istezanju CH_2 skupina su ujedno i najintenzivnije vibracijske vrpce cijelog područja spektra Curosurfa.

Položaji vibracijskih vrpci istezanja CH_2 i CH_3 skupina su osjetljivi na konformaciju te odražavaju promjene *trans*/*gauche* omjera lanaca masnih kiselina (Stuart, 1997.). Smanjenje uređenosti lanaca s *trans* konformacijom karakterizirano je promjenom položaja vibracijskih vrpci simetričnog i asimetričnog istezanja CH_2 skupine prema valnim brojevima viših vrijednosti te proširenjem ovih vrpci (Snyder, 1967.), što je karakteristika faznog prijelaza iz gel faze u fazu tekućih kristala (Lewis i McElhaney, 2013.).

Otprije je poznato da neki inhalacijski anestetici povećavaju neuređenost membranskih modela te da snižavaju temperaturu faznog prijelaza, a budući da je neuređenost membrane posljedica promjene konformacije lanaca masnih kiselina, općenito se smatra da je snižavanje temperature faznog prijelaza posljedica neposrednog učinka inhalacijskih anestetika na hidrofobni dio molekule lipida (Tsai i sur., 1990.). Neki su autori mišljenja da polarni inhalacijski anestetici zbog prisutnosti pozitivnog naboja međudjeluju isključivo s hidrofilnim dijelom molekule lipida (Yoshida i sur., 1989.), pa je predloženo da učinak polarnih, za razliku od nepolarnih anestetika, na porast neuređenosti membrane može biti posljedica oslobađanja potpore vodenog matriksa te da mehanizam kojim polarni inhalacijski anestetici snižavaju temperaturu faznog prijelaza ne uključuje učinak na hidrofobni dio molekule (Tsai i sur., 1990.). Tsai i suradnici su, uporabom FTIR spektroskopije, uspoređujući učinak polarnih anestetika halotana i enflurana s učinkom nepolarnog ugljikovog tetraklorida na membranu sačinjenu od DPPC-a u rasponu temperatura od 25 do 50 °C (ovaj raspon uključuje temperaturu faznog prijelaza) zaključili da je učinak polarnih anestetika na porast neuređenosti membrane i temperaturu faznog prijelaza različit od učinka nepolarnog ugljikovog tetraklorida te da je općenito učinak anestetika na membrane kompleksan (Tsai i sur. 1990).

Budući da smo istraživanje proveli na temperaturi od 25 °C koja je bitno ispod temperature faznog prijelaza, ne opažamo učinak anestetika na temperaturu faznog prijelaza. Ovaj bi se učinak mogao detaljnije proučiti u temperaturno ovisnom mjerenju. U spektrima tretiranih uzoraka nije se javila promjena položaja niti proširenje vibracijskih vrpci CH_2 i CH_3 skupina što navodi na zaključak da anestetici nisu potakli stvaranje *gauche* rotamera što bi smanjilo broj

trans rotamera te povećalo konformacijsku neuređenost te utjecalo na porast mobilnosti dvosloja. U spektrima skupine uzoraka tretiranih izofluranom javio se, međutim, porast intenziteta obiju vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupine koji je proporcionalan porastu volumnog udjela izoflurana u pripravku. Bunow i Levin navode da bi porast intenziteta ovih vrpci mogao reflektirati porast intermolekulskog nereda (Bunow i Levin, 1977.) što je u suglasju s istraživanjima utjecaja anestetika provedenim uporabom simulacija molekulske dinamike (Tu i sur., 1998., Koubi i sur., 2000.).

PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima svih uzoraka tretiranih izofluranom prikazala je opterećenja u području valnih brojeva koji odgovaraju vibracijama asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine što je u skladu s opažanim promjenama u spektrima i čime se potvrdio njihov doprinos razdvajanju spektara na grafu faktorskih bodova. U razlikovnom spektru se za uspoređivani srednji spektar Curosurfa i srednje spektre svih uzoraka tretiranih izofluranom na valnim brojevima vibracijskih vrpci asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine javljaju dvije vrpce pozitivnog intenziteta koje potvrđuju porast intenziteta ovih vrpci nakon dodavanja izoflurana. Statistički značajna razlika javlja se tek za srednje spektre uzoraka s volumnim udjelom anestetika 30 % i više međutim u ovom području srednjih spektara svih uzoraka je velika standardna devijacija što utječe na preciznost Studentovog *t*-testa.

Porasti intenziteta vibracijskih vrpci asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine u spektrima uzoraka tretiranih sevofluranom nisu proporcionalni porastu volumnog udjela sevoflurana u pripravku te se javlja naizgled nasumičan porast odnosno pad intenziteta koji za sada ne možemo objasniti. PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima svih uzoraka tretiranih sevofluranom prikazala je opterećenja u području valnih brojeva koji odgovaraju vibracijama asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine što je i za očekivati budući da, iako je nekonzistentna, razlika intenziteta ovih vibracijskih vrpci postoji te doprinosi razdvajanju spektara na grafu faktorskih bodova. U razlikovnom spektru se za uspoređivani srednji spektar Curosurfa i srednje spektre svih uzoraka tretiranih sevofluranom na valnim brojevima vibracijskih vrpci asimetričnog i simetričnog istezanja CH_2 skupine javljaju dvije vrpce čiji su intenziteti pozitivni odnosno negativni u skladu s porastom odnosno padom intenziteta opažanim u spektrima.

Vrpca koja se javlja na 1472 cm^{-1} odgovara vibraciji sjeckanja CH_2 skupine. Broj i položaj vibracijskih vrpci u ovom području također ovise o konformaciji te o slaganju (engl. *packing*) lanaca masnih kiselina (Stuart, 1997.). U spektrima uzoraka tretiranih izofluranom javilo se

razdvajanje ove vibracijske vrpce s pojavom novonastale vrpce na valnom broju 1469 cm^{-1} što također može reflektirati promjene u intermolekularnom redu.

PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima svih uzoraka tretiranih izofluranom je na položaju 1472 cm^{-1} prikazala najintenzivnije opterećenje čime je potvrđena razlika koja se opaža u spektrima. U razlikovnom spektru se na položajima 1469 cm^{-1} i 1472 cm^{-1} javljaju vrpce za uspoređivani srednji spektar Curosurfa i srednje spektre svih uzoraka tretiranih izofluranom što također potvrđuje postojanje razlike koja se opaža u spektrima.

U spektrima uzoraka tretiranih sevofluranom nema značajnih razlika ove vibracijske vrpce, s čime je u skladu i nedostatak opterećenja nakon provedbe PC analize kao i izostanak vrpce u razlikovnim spektrima Curosurfa i uzoraka tretiranih sevofluranom.

Karbonilna skupina

U području valnih brojeva od 1750 do 1700 cm^{-1} koje odgovara vibracijama karbonilnih skupina uključenih u stvaranje esterskih veza s glicerolom, javljaju se vibracijske vrpce istezanja karbonilnih skupina uključenih u stvaranje esterskih veza s glicerolom. Ovo područje može sadržavati jednu ili više infracrveno aktivnih skupina koje mogu pružiti vijedne informacije o strukturi lipida. Od značaja je i što se javljaju se u području spektra u kojem nema vibracijskih vrpci drugih važnih infracrveno aktivnih skupina (Arrondo I Goñi, 1998.). Usprkos tome, vrlo je malo istraživanja posvećeno detaljnoj interpretaciji strukture vibracijskih vrpci istezanja C=O skupine diacilglicerolipida. U svom udžbeniku o infracrvenoj spektroskopiji, Stuart navodi da će se u ovom području kod fosfolipida koji sadrže dva lanca masnih kiselina poput dipalmitoilfosfatidilglicerola, javljati barem dvije vibracijske vrpce koje odgovaraju C=O skupinama uključenim u stvaranje esterske veze svakog od dva lanca. Navodi da razlika u valnom broju nastaje zbog nejednakosti u strukturi lanaca što je posljedica toga da jedan lanac zauzima *trans* konformaciju, a drugi *gauche* konformaciju ne bi li se održao njihov paralelan položaj (Stuart, 1997.). Karbonilna skupina čija je vibracija istezanja na višem valnom broju je vezana za lanac s *trans* konformacijom, a ona na nižem valnom broju na lanac s *gauche* konformacijom (Stuart, 1997.). Asignacija ovih vibracijskih vrpci ipak nije tako jednostavna budući da na ove vibracijske vrpce utječe mnogo više čimbenika od konformacije lanca. Položaji ovih vibracijskih vrpci su izrazito osjetljivi na vezanje vodika pa se promjene ovih vrpci događaju i kada nastaju promjene u hidrataciji ali i kod prijelaza iz gel faze u fazu tekućih

kristala (Lewis i McElhaney, 2013.). Iz objavljenih istraživanja faznog prijelaza lipida može se zaključiti da su vibracijske vrpce istezanja C=O skupine složene i ovise o duljini i strukturi lanca masne kiseline (Abrahamsson i sur., 1978., Mantsch i sur., 1985., Lewis i McElhaney, 1990.), ali i o kemijskoj strukturi polarnog dijela molekule (Mantsch i sur., 1982., Sarris i sur., 1998., Zhang i sur., 1997.) te se može reći da pružaju uvid u način na koji su fizikalna svojstva lipidnog dvosloja pod utjecajem promjena u kemijskoj strukturi sva tri dijela molekule fosfolipida (Lewis i McElhaney, 2013.).

Lewis i McElhaney zastupaju stajalište da su ove vibracijske vrpce zbroj doprinosa dviju esterskih C=O skupina te kao razlog oskudnosti istraživanja ovog područja navode poteškoće s tradicionalnim metodama asignacije koje su posljedica visoke osjetljivosti ovog područja na promjene u strukturi lipidne molekule (Lewis i McElhaney, 2013.). Levin i suradnici su vibracijsku vrpcu na 1743 cm^{-1} asignirali kao vibraciju istezanja C=O skupine na položaju *sn*-1, a vrpcu na 1728 cm^{-1} kao vibraciju istezanja C=O skupine na položaju *sn*-2 (Levin i sur., 1982.). Ove su asignacije temeljene na istraživanjima 'suhih' ili vrlo slabo hidratiranih DPPC-a i ne mogu se jednostavno primijeniti na u cijelosti hidratirane fosfolipide. U prilog ovom stajalištu govori istraživanji provedeno na u cijelosti hidratiranim diacilglicerolipidima kod kojih je C=O skupina obilježenom izotopom ^{13}C, a čiji je zaključak da kod dvosloja diacilglicerolipida u gel fazi i fazi tekućih kristala, esterske C=O skupine na položajima *sn*-1 i *sn*-2 daju slične obrasce apsorpcije infracrvenog zračenja te da su podkomponente vibracijskih vrpci istezanja C=O skupine zbroj usporedivih doprinosa obje skupine, a ne posljedica konformacijskih različitosti. Predlažu da bi ove podkomponente mogle biti pripisane subpopulacijama slobodne C=O skupine i C=O skupine s vezanim vodikom (Blume i sur., 1988.). Slično su istraživanje nekoliko godina kasnije proveli i Lewis i suradnici istražujući vibracije C=O skupine u cijelosti hidratiranih fosfolipidnih dvosloja gdje je samo jedna C=O skupina označena izotopom ^{13}C te objavljuju da dolazi do javljanja dvije vibracijske vrpce na oko 1743 i 1728 cm^{-1} te su zaključili da ove vrpce proizlaze iz hidratiranih subpopulacija obje karbonilne skupine (Lewis i sur., 1994.).

U spektru Curosurfa, ove se vibracijske vrpce javljaju na valnim brojevima 1739 cm^{-1} i 1733 cm^{-1}. Prema Stuart (Stuart, 1997.), vibraciji istezanja C=O skupine na položaju *sn*-1 odgovara vibracijska vrpca na 1739 cm^{-1}, a vibracijska vrpca na 1733 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja C=O skupine na položaju *sn*-2. C=O skupina čija je vibracija istezanja na višem valnom broju (1739 cm^{-1}) je vezana za lanac s *trans* konformacijom, a ona na nižem valnom broju (1733 cm^{-1}) na lanac s *gauche* konformacijom. Intenzivnija vrpca je ona na 1739 cm^{-1} te se može

zaključiti da je *trans* konformacija favorizirana konformacija lanaca masnih kiselina fosfolipida Curosurfa.

Učinak inhalacijskih anestetika na ove vibracijske vrpce istraživali su Tsai i suradnici uporabom FTIR ATR (engl. *atenuated total reflectance*) spektroskopije, a istraživanje je provedeno s halotanom i enfluranom (Tsai i sur., 1990.). Objavljuju da se nakon dodavanja anestetika u ovom području javljaju tri vibracijske vrpce čiji su položaji na 1744 cm^{-1}, 1735 cm^{-1} i 1728 cm^{-1} za uzorke tretirane halotanom te na 1740 cm^{-1}, 1734 cm^{-1} i 1729 cm^{-1} za uzorke tretirane enfluranom. Wong i Mantsch su predložili da vrpca na 1744,3 cm^{-1} odgovara vibraciji istezanja slobodne C=O skupine na položaju *sn*-1, a vibracijske vrpce na 1737,5 cm^{-1} i 1728,2 cm^{-1} vibracijama istezanja slobodne C=O skupine i C=O skupine s vezanim vodikom na položaju *sn*-2 (Wong i Mantsch, 1988.). Tsai i suradnici su, temeljeno na ovim spoznajama, zaključili da anestetici prekidaju vodikove veze na skeletu glicerola zbog čega je došlo do javljanja vibracijske vrpce slobodne C=O skupine na položaju *sn*-2 te predlažu da je ova pojava uzrok perturbacijama membrane nakon tretiranja anestetikom (Tsai i sur., 1990.).

Rezultati našeg istraživanja su u suglasju s rezultatima koje su objavili Tsai i suradnici. U spektrima svih uzoraka javlja se vibracijska vrpca na valnom broju 1739 cm^{-1} koju smo asignirali kao vibracijsku vrpcu istezanja C=O skupine na položaju *sn*-1. Položaj i intenzitet ove vibracijske vrpce je nepromjenjen u spektrima svih uzoraka. Vibracijsku vrpcu koja se u spektrima uzoraka tretiranih izofluranom javila na valnom broju 1733 cm^{-1} asignirali smo kao vibracijsku vrpcu istezanja slobodne C=O skupine na položaju *sn*-2. Ova vrpca se najvjerovatnije počela javljati kao posljedica dehidratacije uzrokovane anestetikom. Vibracijska vrpca koja bi odgovarala vibraciji istezanja C=O skupine s vezanim vodikom se nije javila, što je najvjerovatnije posljedica sušenja uzoraka prije snimanja spektara. U spektru uzoraka iz pripravka Izo20 nije se javila vibracijska vrpca na valnom broju 1733 cm^{-1}, što bi mogao biti rezultat usrednjavanja spektara s većim odstupanjem. Blagi pad intenziteta koji se javlja na valnom broju 1743 cm^{-1}, ocrtavajući konture moguće novonastale vibracijske vrpce, mogao bi biti posljedica šuma, međutim, zbog dosljednog eksperimentalnog ponašanja rezultata ne možemo isključiti da je njen nastanak posljedica utjecaja anestetika.

PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima svih uzoraka tretiranih izofluranom prikazala je opterećenja u području valnih brojeva koji odgovaraju položajima novonastalih vibracijskih vrpci čime je potvrđen njihov doprinos razdvajanju spektara na grafu faktorskih bodova. Studentovim t-testom je potvrđena statistički značajna razlika između srednjeg spektra

Curosurfa i srednjih spektara uzoraka tretiranih izofluranom koja je u skladu s promjenama opažanim u spektrima.

U spektrima uzoraka tretiranih sevofluranom, vibracijske vrpce istezanja C=O skupine ostale su gotovo nepromjenjene, a opaža se tek vrlo blagi porast intenziteta vrpce na 1733 cm^{-1} kada je udio anestetika u pripravku bio 40 % (pripravak Sevo40) što navodi na zaključak da sevofluran ima značajno slabiji učinak na dehidrataciju od izoflurana te je moguće da se ona događa tek pri vrlo visokim udjelima anestetika koji su nekoliko desetaka puta viši od volumnih udjela koji se primjenjuju u kliničkoj praksi. Opterećenja koja su prikazana nakon provedbe PC analize na valnim brojevima blizu položaja vrhova vrpce istezanja C=O najvjerovatnije odražavaju vrlo male promjene u širini kontura ove vibracijske vrpce te porast intenziteta vibracijske vrpce istezanja slobodne C=O skupine na položaju *sn*-2 u spektrima uzoraka iz pripravka s najvećim volumnim udjelom sevoflurana. Studentovim *t*-testom je potvrđena statistički značajna razlika između srednjeg spektra Curosurfa i srednjih spektara uzoraka tretiranih sevofluranom na valnim brojevima na kojima se javlja gore navedeno proširenje ove vibracijske vrpce.

Hidrofilni dio

U području valnih brojeva od 1300 do 1000 cm^{-1} koje odgovara vibracijama hidrofilnog dijela, tj. polarne glave molekule fosfolipida javljaju se vibracijske vrpce istezanja fosfatne skupine. Ove su vibracijske vrpce izrazito osjetljive na prisutnost različitih kationa i hidratacijske uvjete, s time da je asimetrična vibracija ona osjetljivija te promjene njenog intenziteta i valnog broja sugeriraju strukturne promjene molekule (Serec, 2016.).

Fosfatni dio molekule fosfolipida, odavno prepoznat kao glavno mjesto vezanja vode (Ueda i Yoshida, 1999.), predložen je i kao glavno mjesto djelovanja i vezanja polarnih inhalacijskih anestetika na fosfolipide membrana (Shieh i sur., 1976., Lieb i sur., 1982., Yoshida i sur., 1984. i 1989., Craig i sur., 1987., Tsai i sur., 1987. i 1990., Ueda i Yoshida, 1999.).

Najznačajnija promjena u spektrima svih tretiranih uzoraka javila se upravo na vibracijskim vrpcama istezanja fosfatne skupine koje su nakon dodavanja anestetika promijenile i položaj i intenzitet. Vibracijska vrpca kolina koja se javlja na valnom broju 970 cm^{-1} ukazuje na prisutnost fosfatidilkolina u sastavu Curosurfa.

Naši rezultati su u suglasju s rezultatima studija koje su pokazale dehidratirajući učinak anestetika na fosfolipide plućnog surfaktanta (Di Paulo i Sandorfy, 1974., Tsai i sur., 1990.). Arrondo i suradnici navode da se vibracijska vrpca asimetričnog istezanja 'suhe' fosfatne skupine DPPC-a nalazi oko valnog broja 1240 cm^{-1} te se pomiče na oko 1220 cm^{-1} za potpuno hidratirani DPPC (Arrondo i sur., 1984). Vibracijska vrpca asimetričnog istezanja fosfatne skupine Curosurfa se nalazi na 1244 cm^{-1} što je u skladu s položajem vibracije asimetričnog istezanja dehidratirane fosfatne skupine. Curosurf u svom sastavu sadrži vodu te možemo pretpostaviti da je fosfatna skupina fosfolipida sadržanih u Curosurfu prije sušenja uzoraka stvorila veze s vodom sadržanom u preparatu. Nakon dodavanja anestetika, opaža se pomak ove vibracijske vrpce prema nižim valnim brojevima. Budući da se hidratacijski uvjeti uzorka nisu mijenjali, ovaj pomak je najvjerovatnije posljedica prekidanja vodikove veze te vezanja anestetika na to mjesto zbog čega se vibracija molekule fosfolipida pomiče prema nižim valnim brojevima. Ovaj je učinak anestetika ostao i nakon sušenja te je moguće da anestetici stvaraju jače veze s fosfatnom skupinom nego voda. Vibracijska vrpca istezanja fosfatne skupine u spektrima uzoraka iz pripravka Izo10 se u odnosu na ovu vibracijsku vrpcu u spektru Curosurfa pomakla za 8 cm^{-1}, dok su promjene ove vrpce u spektrima preostalih uzoraka mnogo manje što navodi na zaključak da sam porast volumnog udjela izoflurana ne utječe značajno na stupanj dehidratacije. Ovaj rezultat pruža perspektivu za daljnje istraživanje utjecaja izoflurana na fosfolipide plućnog surfaktanta u volumnim udjelima koji se primjenjuju u kliničkoj praksi, a kojim bi se mogao istražiti najmanji volumni udio anestetika pri kojem se opaža promjena položaja ove vibracijske vrpce. Promjene položaja vibracijske vrpce simetričnog istezaja fosfatne skupine također govore u prilog dehidratacijskom učinku izoflurana, no kako je ova vrpca znatno manje osjetljiva na hidratacijske uvjete, i promjene koje se na njoj javljaju su znato manje.

U spektrima uzoraka tretiranih sevofluranom se također javlja promjena položaja vibracijskih vrpci asimetričnog i simetričnog istezanja fosfatne skupine prema nižim valnim brojevima proporcionalno porastu volumnog udjela anestetika u pripravku, ali je pomak slabije izražen što navodi na zaključak da sevofluran ima slabiji utjecaj na fosfatnu skupinu.

PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima uzoraka tretiranih izofluranom te uzoraka tretiranih sevofluranom prikazala je opterećenja u području valnih brojeva koji odgovaraju vibracijama asimetričnog i simetričnog istezanja fosfatne skupine čime je potvrđen njihov doprinos razdvajanju spektara na grafu faktorskih bodova. Studentovim *t*-testom je potvrđena statistički značajna razlika ovih vibracijskih vrpci između srednjeg spektra Curosurfa

i srednjih spektara uzoraka tretiranih izofluranom te srednjih spektara uzoraka tretiranih sevofluranom. Prijelazi iz negativnih u pozitivne intenzitete koji se vide u ovom području razlikovnih spektara javljaju se kada postoji promjena valnog broja promatrane funkcionalne skupine.

Vibracijska vrpca istezanja kolina ($(CH_3)3N^+$) koji je u molekuli fosfatidilkolina vezan na polarnu glavu gotovo je nepromjenjena u spektrima svih uzoraka. Vrlo blagi porast intenziteta ove vrpce u spektru uzorka iz pripravka Sevo40 u odnosu na spektar Curosurfa kao i vrlo blage varijacije u intenzitetu ove vrpce u spektrima uzoraka iz ostalih tretiranih pripravka su zanemarivi. Može se zaključiti da, usprkos prisutnosti pozitivnog elektrostatskog naboja ove skupine, izofluran i sevofluran nemaju učinak na ovaj dio molekule. Tsai i suradnici su u svom istraživanju hidratacije fosfolipida slabu ulogu ove skupine u hidrataciji doveli u vezu s terminalnim CH_3 skupinama lanaca masnih kiselina, predlažući da ova skupina uzrokuje 'zaštitu' (engl. *shielding*) naboja (Tsai i sur., 1987.) te se može pretpostaviti da je zbog toga izostalo i međudjelovanje s anesteticima. PC analizom provedenom na Curosurfu i uzorcima iz pripravaka tretiranih izofluranom nije se pronašla razlika između spektara na ovom valnom broju kao niti statistički značajna razlika na razlikovnom spektru nakon provođenja Studentovog *t*-testa čime smo potvrdili promjenu opažanu u spektrima. PC analiza provedena na spektrima Curosurfa i spektrima uzoraka iz pripravaka tretiranih sevofluranom prikazala je opterećenje na ovom valnom broju, a Studentovim *t*-testom je potvrđeno postojanje statistički značajne razlike na razlikovnom spektru srednjih spektara uzoraka Curosurfa i uzoraka iz pripravaka Sevo40 što je u skladu s porastom intenziteta koji se javlja u spektru uzoraka iz ovog pripravka.

Primjetili smo porast vibracijske vrpce OH skupine u spektrima svih tretiranih uzoraka. Ovaj porast bi mogao biti povezan sa sušenjem uzoraka, međutim, nalaz se sistematski ponavlja u spektrima svih tretiranih uzoraka (uz iznimku spektara uzoraka iz pripravaka Izo10 i Sevo10 u kojima je ova vrpca nesrazmjerno porasla u odnosu na volumni udio anestetika u pripravku) te je moguće da je porast intenziteta ove vrpce posljedica neke od promjena koje nastaju u molekuli fosfolipida nakon izlaganja anesteticima. Potrebna su daljnja istraživanja ne bi li se objasnilo podrijetlo ovog procesa.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju međudjelovanje fosfatnog dijela molekule fosfolipida sadržanih u plućnom surfaktantu s inhalacijskim anesteticima izofluranom i sevofluranom te govore u prilog njihovom dehidratacijskom učinku na hidrofilni dio i na područje molekule u

kojem karbonilne skupine čine esterske veze s glicerolom. Također govore u prilog postojanju učinka na porast intermolekularnog nereda u koji je uključen hidrofobni dio molekule fosfolipida. Budući da se plućni surfaktant nalazi u plućnoj alveoli na granici zraka i vode, dehidratacija polarnih glava jednosloja plućnog surfaktanta bi mogla utjecati na oslabljenje sile koja održava film surfaktanta što bi za posljedicu moglo imati oslabljenje njegove funkcije snižavanja površinske napetosti.

Učinak sevoflurana na Curosurf je slabiji i manje dosljedan od učinka izoflurana. Budući da je sevofluran anestetik novije generacije, s manje neželjenih učinaka od izoflurana, njegov slabiji učinak na plućni surfaktant je tome dosljedan. Trebalo bi, međutim, provesti detaljnije istraživanje primjenjujući volumne udjele anestetika koje se primjenjuju u kliničkoj praksi te primjeniti kliničke uvijete. Valja također naglasiti da se u ljudi plućni surfaktant u alveolama nalazi u obliku lipidnog jednosloja dok se u Curosurfu on nalazi u obliku liposoma. Bilo bi zanimljivo, ali i veliki izazov, provesti FTIR spektroskopsko istraživanje plućnog surfaktanta sakupljenog u različita vremena za vrijeme opće anestezije iz pacijenata izlaganih različitim volumnim udjelima ova dva anestetika te u istraživanje uključiti i promjene proteinske komponente plućnog surfaktanta. Ovo bi mogao biti slijedeći korak u razumijevanju razmjera i reverzibilnosti promjena plućnog surfaktanta za vrijeme i nakon velikih anesteziooloških procedura.

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj inhalacijskih anestetika izoflurana i sevoflurana na fosfolipide plućnog surfaktanta Curosurfa. Vibracijska dinamika tankih filmova Curosurfa tretiranog različitim volumnim udjelima anestetika praćena je infracrvenom spektroskopijom, a dobiveni spektri su analizirani metodom glavnih komponenti i Studentovim *t*-testom. Temeljem rezultata istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Vibracijski spektri tankih filmova tretiranih uzoraka pokazali su da pri volumnim udjelima izoflurana odnosno sevoflurana od 10 %, 20 %, 30% i 40 % postoji učinak anestetika na plućni surfaktant Curosurf, a promjene u spektrima su dosljedne porastu volumnog udjela anestetika kojim je Curosurf tretiran.
2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom upotpunjena PC analizom spektara, može se uspješno primijeniti za istraživanje strukturnih promjena fosfolipidne komponente plućnog surfaktanta izloženog inhalacijskim anesteticima izofluranu i sevofluranu.
3. Najizraženiji učinak oba anestetika je na hidrofilni dio molekule fosfolipida i u skladu je s dehidratacijskim učinkom anestetika na fosfolipidne dvosloje. Promjena položaja vibracijskih vrpci istezanja fosfatne skupine prema nižim valnim brojevima upućuje prvenstveno na prekidanje vodikovih veza i vezanje anestetika na to mjesto.
4. Učinak izoflurana na karbonilne skupine uključene u stvaranje esterskih veza koji se očituje javljanjem novonastale vibracijske vrpce istezanja slobodne karbonilne skupine na položaju *sn*-2, također upućuje na dehidratacijski učinak anestetika. Učinak izoflurana na hidrofobni dio molekule koji se očituje kao porast intenziteta vibracijskih vrpci istezanja CH_2 skupina upućuje na promjene u uređenosti fosfolipidnog dvosloja.
5. Učinak sevoflurana na karbonilne skupine se ne opaža, a njegov učinak na CH_2 skupine je nekonzistentan porastu volumnog udjela anestetika u pripravku što upućuje na zaključak da je učinak izoflurana na fosfolipidni dio molekule plućnog surfaktanta izraženiji od učinka sevoflurana.

6. Ovo istraživanje pruža perspektivu za daljnja spektroskopska istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika na plućni surfaktant koja bi se mogla provesti na surfaktantu sakupljenom iz pluća ljudi izlaganih inhalacijskim anesteticima u kliničkim uvjetima.

Popis literature

Abrahamsson S, Dahlen B, Lofgren H, Pascher I (1978) Lateral packing of hydrocarbon chains. Prog Chem Fats other Lipids 16: 125-143.

Abraini JH, Marassio G, David HN, Vallone B, Prangé T, Colloc'h N (2014) Crystallographic studies with xenon and nitrous oxide provide evidence for protein-dependent processes in the mechanisms of general anesthesia. Anesthesiology 121(5): 1018-1027.

Adachi H, Hayashi H, Sato H, Dempo K, Akino T (1989) Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. Biochem J 262: 781–786.

Agassandian M, Mallampalli RK (2013) Surfactant phospholipid metabolism. Biochim Biophys Acta 1831(3): 612-625.

Alcorn JF, Wright JR (2004) Degradation of pulmonary surfactant protein D by Pseudomonas aeruginosa elastase abrogates innate immune function. J Biol Chem 279(29): 30871-30879.

Arcario MJ, Mayne CG, Tajkhorshid E (2014) Atomistic models of general anesthetics for use in silico biological studies. J Phys Chem B 118(42): 12075-12086.

Arrondo JL, Goñi FM, Macarulla JM (1984) Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension. A study of the phosphate group vibration. Biochim Biophys Acta 794(1): 165-168.

Arrondo JL, Goñi FM (1998) Infrared studies of protein-induced perturbations of lipids in lipoproteins and membranes. Chem Phys Lipids 96(1-2): 53-68.

Avery ME, Mead J (1959) Surface properties in relations to atelectasis and hyaline membrane disease. Am J Dis Child 97: 517-523.

Baber J, JF Ellena, DS Cafiso (1995) Distribution of general anesthetics in phospholipid bilayers determined using ^{2}H-NMR and ^{1}H-^{1}H NOE spectroscopy. Biochemistry 34: 6533-6539.

Ballard PL (1986) Hormones and lung maturation. Monogr Endocrinol 28: 1-354.

Batenburg JJ (1992) Surfactant phospholipids: synthesis and storage. Am J Physiol 262(4 Pt 1): 367-385.

Baumgart JP, Zhou ZY, Hara M, Cook DC, Hoppa MB, Ryan TA, Hemmings HC Jr (2015) Isoflurane inhibits synaptic vesicle exocytosis through reduced Ca^{2+} influx, not Ca^{2+}-exocytosis coupling. Proc Natl Acad Sci USA 112(38): 11959-11964.

Bhutani VK, Abbasi S (1992) Relative likelihood of bronchopulmonary dysplasia based on pulmonary mechanics measured in preterm neonates during the first week of life. J Pediatr 120: 605-613.

Blume A, Hübner W, Messner G (1988) Fourier transform infrared spectroscopy of ^{13}C=O-labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. Biochemistry 27(21): 8239-8249.

Bourbon JR (1991) Pulmonary surfactant: Biochemical, functional, regulatory and clinical concepts. CRC Press, Boca Raton, FL

Brnjas-Kraljević J (2001) Fizika za studente medicine 1. dio: Struktura materije i dijagnostičke metode. Medicinska naklada, Zagreb

Buchet R, Sandorfy C, Trapane TL, Urry DW (1985) Infrared spectroscopic studies on gramicidin ion-channels: relation to the mechanisms of anesthesia. Biochim Biophys Acta 821: 8-16.

Bunow MR, Levin IW (1977) Comment on the carbon-hydrogen stretching region of vibrational Raman spectra of phospholipids. Biochim Biophys Acta 487(2): 388-394.

Butterworth JF, Mackey DC, Wasnick JD (2013) Inhalation anesthetics. U: Butterworth JF, Mackey DC, Wasnick JD (ed.) Morgan and Mikhail's clinical anesthesiology. McGraw-Hill Education, 159-161.

Casal HL, Mantsch HH (1984) Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. Biochim Biophys Acta 779(4): 381-401.

Chabot S, Koumanov K, Lambeau G, Gelb MH, Balloy V, Chignard M, Whitsett JA, Touqui L (2003) Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2. J Immunol 171(2): 995-1000.

Cheong N, Madesh M, Gonzales LW, Zhao M, Yu K, Ballard PL, Shuman H (2006) Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. J Biol Chem 281(14): 9791-9800.

Clements JA, Brown ES, Johnson RP (1958) Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: some theoretical considerations. J Appl Physiol 12:262-268.

Cockshutt AM, Possmayer F (1992) Metabolism of surfactant lipids and proteins in the developing lung. U: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ (ed.) Pulmonary surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 339-378.

Cogo PE, Toffolo GM, Ori C, Vianello A, Chierici M, Gucciardi A, Cobelli C, Baritussio A, Carnielli VP (2007) Surfactant disaturated-phosphatidylcholine kinetics in acute respiratory distress syndrome by stable isotopes and a two compartment model. Respir Res 8: 13.

Corrales A, Xu F, Garavito-Aguilar ZV, Blanck TJ, Recio-Pinto E (2004) Isoflurane reduces the carbachol-evoked Ca^{2+} influx in neuronal cells. Anesthesiology 101(4): 895-901.

Craig NC, Bryant GJ, Levin IW (1987) Effect of halothane on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a Raman spectroscopic study. Biochemistry 26: 2449-2458.

Creuwels LAJM, van Golde LMG, Haagsman HP (1997) The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. Lung 175: 1-39.

Cutz E, Wert SE, Nogee LM, Moore AM (2000) Deficiency of lamellar bodies in alveolar type II cells associated with fatal respiratory disease in a full-term infant. Am J Respir Crit Care Med 161(2): 608-614.

Das RM, Ahmed MK, Mantsch HH, Scott JE (1995) FT-IR spectroscopy of methylmercury-exposed mouse lung. Mol Cell Biochem 145(1): 75-79.

Das RM, Ahmed MK, Oulton MR, Mantsch HH, Tsubai T, Scott JE (1997) Methylmercury-induced alterations in lung and pulmonary surfactant properties of adult mice. Chem Phys Lipids 89(2): 107-117.

DeMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvac A, Nogee L, Cole S, Colten HR (1994) Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. Am J Respir Cell Mol Biol 11(2): 230-239.

Di Paulo T, Sandorfy C (1974) Hydrogen bond breaking potency of fluorocarbon anesthetics. J Med Chem 17: 809-814.

Dluhy RA, Reilly KE, Hunt RD, Mitchell ML, Mautone AJ, Mendelsohn R (1989) Infrared spectroscopic investigations of pulmonary surfactant. Surface film transitions at the air-water interface and bulk phase thermotropism. Biophys J 56(6): 1173-1181.

Enhorning G, Possmayer F (1980) Pulmonary surfactant-associated proteins: their role in the expression of surface activity. J Appl Physiol 49(1): 34-41.

Enhorning G, Pototschnik R, Possmayer F, Burgoyne R (1986) Pulmonary surfactant films affected by solvent vapors. Anesth Analg 65: 1275-1280.

Eyring H, Jhon MS (1969) Significant liquid structures. Jhon Wiley and Sons, New York

Fitzgerald ML, Xavier R, Haley KJ, Welti R, Goss JL, Brown CE, Zhuang DZ, Bell SA, Lu N, McKee M, Seed B, Freeman MW (2007) ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. J Lipid Res 4 (3): 621-632.

Franks NP, Lieb WR (1979) The structure of lipid bilayers and the effects of general anaesthetics. An x-ray and neutron diffraction study. J Mol Biol 133(4): 469-500.

Fringeli UP, Günthard HH (1981) Infrared membrane spectroscopy. Mol Biol Biochem Biophys 31: 270-332.

Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Wataba Y, Abe T (1980) Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. Lancet 1: 55-59.

Funkhouser JD, Batenburg JJ, Van Golde LM (1981) Acylation of 1-palmitoyllysophosphatidylglycerol in a alveolar type II cells from rat lung. Biochim Biophys Acta 666(1): 1-6.

Glasser JR, Mallampalli RK (2012) Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. Microbes Infect 14(1): 17-25.

Gluck L, Kulovich MV, Borer Jr. RC, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN (1971) Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. Am J Obstet Gynecol 109: 440-445.

Gluck L, Motoyama EK, Smits HL, Kulovich MV (1967) The biochemical developement of surface activity in mammalian lung. I. The surface-active phospholipids; the separation and

distribution of surface-active lecithin in the lung of the developing rabbit fetus. Pediatr Res 1: 237-246.

Goerke J (1974) Lung surfactant. Biochim Biophys Acta 344: 241-261.

Goodman LS, Gilman A. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2006) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York

Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM (1991) Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest 88(6): 1976-1981.

Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ (1997) Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Resp Crit Care Med 155: 1309-1315.

Gulfo N, Bartucci R, Sportelli L (1988) Effect of inhalation anesthetics on spin-labeled cholesterol containing DPPC vesicles. Z Naturforsch C 43(3-4): 264-8.

Günzler H, Gremlich H-U (2006) Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Školska knjiga, Zagreb

Halliday HL (1997) Synthetic or natural surfactants. Acta Paediatr 86: 233-237.

Hallman M, Feldman B, Gluck L (1975) The absence of phosphatidylglycerol in surfactant. Pediatr Res 9: 396.

Hartog A, Vasquez de Anda GF, Gommers D, Kaisers U, Verbrugge SJ, Schnabel R, Lachmann B (1999) Comparison of exogenous surfactant therapy, mechanical ventilation with high end-expiratory pressure and partial liquid ventilation. Br J Anaesth 82: 81-86.

Hawgood S, Shiffer K (1991) Structures and properties of the surfactant-associated proteins. Annu Rev Physiol 53: 375-394.

Henderson FC, Miakotina OL, Mallampalli RK (2006) Proapoptotic effects of P. aeruginosa involve inhibition of surfactant phosphatidylcholine synthesis. J Lipid Res 47(10): 2314-2324.

Hobza P, Sandorfy C (1984) Quantum chemical and statistical thermodynamic investigations of anesthetic activity. 3. The interaction between CH_4, CH_3Cl, CH_2Cl_2, $CHCl_4$ and an O-H… O hydrogen bond. Can J Chem 62: 606-609.

Hogenkamp A, Herías MV, Tooten PC, Veldhuizen EJ, Haagsman HP (2007) Effects of surfactant protein D on growth, adhesion and epithelial invasion of intestinal Gram-negative bacteria. Mol Immunol 44(14): 3517-3527.

Holm BA, Wang Z, Egan EA, Notter RH (1996) Content of dipalmitoyl phosphatidylcholine in lung surfactant: ramifications for surface activity. Pediatr Res 39(5): 805-811.

Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K (1997) Surfactant composition in infants and young childrenwith cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 156(1): 161-165.

Jacobsen NE (2007) NMR Spectroscopy Explained : Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey

Jednačak T (2013) Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Doktorski rad

Jobe AH, Ikegami M, Sarton-Miller I, Barajas L (1980) Surfactant metabolism of newborn lamb lungs studied in vivo. J Appl Physiol 49: 1091-1098.

Johansson J, Curstedt T, Robertson B (1994) The proteins of the surfactant system. Eur Respir J 7: 372-391.

Kaltenborn E, Kern S, Frixel S, Fragnet L, Conzelmann KK, Zarbock R, Griese M (2012) Respiratory syncytial virus potentiates ABCA3 mutationinduced loss of lung epithelial cell differentiation. Hum Mol Genet 21(12): 2793-2806.

Kandasamy P, Zarini S, Chan ED, Leslie CC, Murphy RC, Voelker DR (2011) Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits Mycoplasma pneumoniae-stimulated eicosanoid production from human and mouse macrophages. J Biol Chem 286(10): 7841-7853.

King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA (1973) Isolation of apoprotein from canine surface-active material. Am J Physiol 224: 788-795.

Klaus MH, Clements JA, Havel RJ (1961) Composition of surface active material isolated from beef lung. Proc Natl Acad Sci USA 47: 1858-1859.

Knells G, Ahmed MK, Das RM, Oulton MR, Mantsch HH, Scott JE (1995) Fourier-transform infrared spectroscopic analysis of rabbit lung surfactant: subfraction-associated phospholipid and protein profiles. Chem Phys Lipids 77(2): 193-201.

Koehler LS, Cruley W, Koehler K (1977) Solvent effects on halothane: ^{19}F nuclear magnetic resonance in solvents and artificial membranes. Mol Pharmacol 13(1): 113-121.

Koubi L, Tarek M, Klein ML, Scharf D (2000) Distribution of halothane in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations. Biophysical Journal 78: 800-811.

Koubi L, Tarek M, Bandyopadhyay S, Klein ML, Scharf D (2001) Membrane structural perturbations caused by anesthetics and nonimmobilizers: a molecular dynamics investigation. Biophys J 81(6): 3339-3345.

Kurashima K, Ogawa H, Ohka T, Fujimura M, Matsuda T, Kobayashi T (1991) A pilot study of surfactant inhalation in the treatment of asthmatic attack. Arerugi 40(2): 160-163.

Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR (1988) Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. Proc Natl Acad Sci USA 85(15): 5566-5570.

Kuronuma K, Mitsuzawa H, Takeda K, Nishitani C, Chan ED, Kuroki Y, Nakamura M, Voelker DR (2009) Anionic pulmonary surfactant phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide-interacting proteins CD14 and MD-2. J Biol Chem 284(38): 25488-25500.

Lachmann B, Verbrugge SJC (1998) Physiological Rationale to Prevent Ventilation-Induced Lung Injury. U: Gullo A (ed.) Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine. A.P.I.C.E.. Springer, Milano

Lajoie P, Guay G, Dennis JW, Nabi IR (2005) The lipid composition of autophagic vacuoles regulates expression of multilamellar bodies. J Cell Sci 118(Pt 9): 1991-2003.

Lalchev Z, Christova Y, Todorov R Alexandrov V, Stoichev P, Petkov R (1992) Alterations of Biochemical and Physicochemical Quantities of Pulmonary Lavages Attending Halothane and Penthrane Treatment in Rats. App Cardiopulm Pathophys 4: 315-322.

Lankenau, HM (1976) A genetic and statistical study of the respiratory distress syndrome. Eur J Pediatr 123: 167-177.

Lee DC, Chapman D (1986) Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. Biochim Biophys Acta 859(2): 266-270.

Lemoine S, Tritapepe L, Hanouz JL, Puddu PE (2016) The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans? Br J Anaesth 116(4): 456-475.

Levin IW, Mushayakarara E, Bittman R (1982) Vibrational assignment of the *sn*1 and *sn*2 carbonyl stretching modes of membrane phospholipids. J Raman Spectroscop 13: 231-234.

Lewis RNAH, McElhaney RN (1990) The subgel phases of *n*-saturated diacyl phosphatidylcholines. A Fourier transform infrared spectroscopy study. Biochemistry 29: 7946-7953.

Lewis RNAH, McElhaney RN, Pohle W, Mantsch HH (1994) Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. Biophys J 67(6): 2367-2375.

Lewis RNAH, McElhaney RN (1998) The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. Chem Phys Lipids 96: 9-21.

Lewis RNAH, McElhaney RN (2013) Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1828: 2347-2358.

Li J, Marsh JJ, Spragg RG (2002) Effect of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase overexpression on the mouse lung surfactant system. Am J Respir Cell Mol Biol 26: 709-715.

Lieb, WR, Kovalycsik M, Mendelsohn R (1982) Do clinical levels of general anesthetics affect lipid bilayers? Evidence from Raman scattering. Biochim Biophys Acta 688: 388-398.

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer 17(1): 62-70.

Malacrida L, Germán R, Piriz H, Rocchiccioli F, Botti H, Denicola A, Briva A (2014) Sevoflurane anesthesia deteriorates pulmonary surfactant promoting alveolar collapse in male Sprague-Dawley rats. Pulm Pharmacol Ther 28: 122-129.

Mantsch HH, Cameron DG, Tremblay PP, Kates M (1982) Phosphatidylcholine bilayers: an infrared spectroscopic characterization of the polymorphic phase behaviour. Biochim Biophys Acta 689: 63-72.

Mantsch HH, Madec C, Lewis RNAH, McElhaney RN (1985) The thermotropic phase behavious of model membranes composed of phosphatidylcholines containing isobranched fatty acids. II. Infrared and ^{31}P-NMR spectroscopic studies. Biochemistry 24: 2440-2446.

Mantsch HH, McElhaney RN (1991) Phospholipid phase transition in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. Chem Phys Lipids 57(2-3): 213-216.

Mautone AJ, Reilly KE, Mendelsohn R (1987) Fourier transform infrared and differential scanning calorimetric studies of a surface-active material from rabbit lung. Biochim Biophys Acta 896(1): 1-10.

McCormack FX, Pattanajitvilai S, Stewart J, Possmayer F, Inchley K, Voelker DR (1997) The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. J Biol Chem 272(44): 27971-27979.

McCrae KC, Rand T, Shaw RA, Mason C, Oulton MR, Hastings C, Cherlet T, Thliveris JA, Mantsch HH, MacDonald J, Scott JE (2001) Analysis of pulmonary surfactant by Fourier-transform infrared spectroscopy following exposure to Stachybotrys chartarum (atra) spores. Chem Phys Lipids 110(1): 1-10.

Merritt TA, Soll RF, Hallman M, (1993) Overview of exogenous surfactant replacement therapy. J Intensive Care Med 8: 205-228.

Metcalfe IL, Enhorning G, Possmayer F (1980) Pulmonary surfactant-associated proteins: their role in the expression of surface activity. J Appl Physiol 49(1): 34–41.

Miakotina OL, McCoy DM, Shi L, Look DC, Mallampalli RK (2007) Human adenovirus modulates surfactant phospholipid trafficking. Traffic 8(12): 1765-1777.

Molliex S, Crestani B, Dureuil B, Bastin J, Rolland C, Aubier M, Desmonts JM (1994) Effects of Halothane on Surfactant Biosynthesis by Rat Alveolar Type II Cells in Primary Culture. Anesthesiology 81: 668-676.

Morton WTG (1850) Remarks on the comparative value of ether and chloroform, with hints upon natural and artificial teeth. Printed by William A. Hall, Boston

von Neergard K (1929) Neue Auffassungen uber einen Grund-begriff der Atemmechanik. Z Gesamte Exp Med 66: 373-394.

Nerelius C, Martin E, Peng S, Gustafsson M, Nordling K, Weaver T, Johansson J (2008) Mutations linked to interstitial lung disease can abrogate anti-amyloid function of prosurfactant protein C. Biochem J 416(2): 201-209.

Nogee LM (2004) Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. Annu Rev Physiol 66: 601-623.

Nogee LM, Dunbar AE , Wert S, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA (2002) Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. Chest 121(3 Suppl): 20S-21S.

North C, Cafiso DS (1997) Contrasting membrane localization and behavior of halogenated cyclobutanes that follow or violate the MeyerOverton hypothesis of general anesthetic potency. Biophys J 72: 1754-1761.

Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR (2010) Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. Proc Natl Acad Sci USA 107(1): 320-325.

Numata M, Kandasamy P, Nagashima Y, Posey J, Hartshorn K, Woodland D, Voelker DR (2012) Phosphatidylglycerol suppresses influenza A virus infection. Am J Respir Cell Mol Biol 46(4): 479-487.

Oulton M, Fraser M, Dolphin M, Yoon R, Faulkner G (1986) Quantification of surfactant pool sizes in rabbit lung during perinatal development. J Lipid Res 27: 602-661.

Pattle RE (1955) Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Nature 175: 1125-1126.

Paugam-Burtz C, Molliex S, Lardeux B, Rolland C, Aubie M, Desmonts JM, Crestani B (2000) Differential Effects of Halothane and Thiopental on Surfactant Protein C Messenger RNA in Vivo and in Vitro in Rats. Anesthesiology 93(3): 805-810.

Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E (1989) Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. Biochemistry 28(15): 6361-6367.

Pickholz M, Saiz L, Klein ML (2005) Concentration effects of volatile anesthetics on the properties of model membranes: a coarse-grain approach. Biophys J 88: 1524-1534.

Pinheiro ACN, Gomez RS, Guatimosimc C, Silva JH, Prado MAM, Gomez MV (2006) The effect of sevoflurane on intracellular calcium concentration from cholinergic cells. Brain Res Bull 69: 147-152.

Possmayer F (2004) Phospholipid metabolism in lung surfactant. Subcell Biochem 37: 359-388.

Possmayer F, Yu S-H, Weber JM, Harding PGR (1984) Pulmonary surfactant. Can J Biochem Cell Biol 62: 1121-1133.

Possmayer F (1988) A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. Am Rev Respir Dis 138(4): 990-998.

Post M, van Golde LM (1988) Metabolic and developmental aspects of the pulmonary surfactant system. Biochim Biophys Acta 947(2): 249-286.

Rooney SA, Young SL, Mendelson CR (1994) Molecular and cellular processing of lung surfactant, FASEB J 8(12): 957-967.

Sarris HE, Loffredo W, Dluhy RA, Hernuist L, Wisner DA, Tsai M-D (1998) Phospholipids chilar at phosphorus. Characterization of the subgel phase of thiophosphatidylcholines by use of X-ray diffraction, phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, and Fourier transform infrared spectroscopy. Biochemistry 27: 4625-4631.

Schwartz RM, Luby AM, Scanlon JW, Kellogg RJ (1994) Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g. N Engl J Med 330(21): 1476-1480.

Scott JE (2004) The pulmonary surfactant: impact of tobacco smoke and related compounds on surfactant and lung development. Tob Induc Dis 2(1): 3-25.

Serec K (2016) Vibracijska dinamika tankih filmova soli deoksiribonukleinske kiseline. Doktorski rad

Shieh DD, Ueda I, Lin HC, Eyring H (1976) Nuclear magnetic resonance studies of the interaction of general anesthetics with 1,2-dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine bilayer. Proc Natl Acad Sci USA 73: 3999-4002.

Silver RK, MacGregor SN, Farrell EE, Ragin A, Davis C, Socol ML (1993) Perinatal factors influencing survival at twenty-four weeks' gestation. Am J Obstet Gynecol 168: 1724-1731.

Simon SA, McIntosh TJ, Bennett PB, Shrivastav BB (1979) Interaction of halothane with lipid bilayers. Mol Pharmacol 16: 163-170.

Snyder RG (1967) Vibrational study of the chain conformations of the liquid n-paraffins and molten polyethylene. J Chem Phys 47: 1316-1360.

Stephanova E, Valtcheva-Sarker R, Topouzova-Hristova T, Lalchev Z (2007) Influence of volatile anaesthetics on lung cells and lung surfactant. Biotechnol Biotechnol Equip 21: 393-398.

Stuart B (1997) Biological applications of infrared spectroscopy. John Wiley and Sons, England

Suezaki Y, Kamaya H, Ueda I (1985) Molecular origin of biphasic response of main phase-transition temperature of phospholipid membrane to long-chain alcohols. Biochim Biophys Acta 818: 31-37.

Tang PB, Yan B, Xu Y (1997) Different distribution of fluorinated anesthetics and nonanesthetics in model membrane: a ^{19}F NMR study. Biophys J 72(4): 1676-1682.

Thannhauser SJ, Benotti J, Boncoddo NF (1946) Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityl lecithin) from lung: its occurrence in the sphingomyelin fraction of animals tissues. J Biol Chem 166: 669-675.

Tobin WR, Kaiser HE, Groeger, AM, Lema MJ (2000) The effects of volatile anesthetic agents on pulmonary surfactant function. In vivo 14: 157-164.

Trudell JR, Hubbell WL (1976) Localization of molecular halothane in phospholipid bilayer model nerve membranes. Anesthesiology 44(3): 202-205.

Tsai YS, Ma SM, Kamaya H, Ueda I (1987) Fourier transform infrared studies on the phospholipid hydration: phosphate-oriented hydrogen bonding and its attenuation by volatile anesthetics. Mol Pharmacol 26: 623-630.

Tsai YS, Ma SM, Nishimura S, Ueda I (1990) Infrared spectra of phospholipid membranes: interfacial dehydration by volatile anesthetics and phase transition. Biochim Biophys Acta 1022: 245-250.

Tu K, Tarek M, Klein M, Scharf D (1998) Effects of anesthetics on the structure of a phospholipid bilayer: molecular dynamics investigation of halothane in the hydrated liquid crystal phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. Biophys J 75: 2123-2134.

Ueda I, Yoshida T (1999) Hydration of lipid membranes and the action mechanisms of anesthetics and alcohols. Chem Phys Lipids 101(1): 65-79.

Veldhuizen R, Possmayer F (2004) Phospholipid metabolism in lung surfactant. Subcell Biochem 37: 359-388.

Weibel ER (1963) Morphometry of the human lung. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

Wilcox DT, Irish MS, Holm BA, Glick PL (1996) Pulmonary parenchymal abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. Clin Perinatol 23: 771-779.

Williams MC (1982) Ultrastructure of tubular myelin and lamellar bodies in fastfrozen adult rat lung. Exp Lung Res 4(1): 37-46.

Wong PT, Mantsch HH (1988) High pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1,2-diacyl phospholipids. Chem Phys Lipids 46(3): 213-224.

Woo SW, Berlin D, Hedley-Whyte J (1969) Surfactant function and anesthetic agents. J Appl Physiol 26(5): 571-577.

Wright JR (2004) Host defense functions of pulmonary surfactant. Biol Neonate 85(4): 326-332.

Wright JR, Dobbs LG (1991) Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. Annu Rev Physiol 53: 395-414.

Wu Y, Xu Z, Henderson FC, Ryan AJ, Yahr TL, Mallampalli RK (2007) Chronic Pseudomonas aeruginosa infection reduces surfactant levels by inhibiting its biosynthesis. Cell Microbiol 9(4): 1062-1072.

Xu Y, Tang P (1997) Amphiphilic sites for general anesthetic action? Evidence from ^{129}Xe–{^{1}H} intermolecular nuclear Overhauser effects. Biochim Biophys Acta 1323(1): 154-162.

Yamakura T, Harris RA (2000) Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. Anesthesiology 93(4): 1095-1101.

Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N (2001) ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. FEBS Lett 508(2): 221-225.

Yoshida T, Okabayashi H, Takahashi K, Ueda I (1984) A proton nuclear magnetic resonance study on the release of bound water by inhalation anesthetic study in water-in-oil emulsion. Biochim Biophys Acta 772: 102-107.

Yoshida T, Takahashi K, Ueda I (1989) Molecular orientation of volatile anesthetics at the binding surface: ^{1}H– and ^{19}F–NMR studies of submolecular affinity. Biochim Biophys Acta 985: 331-333.

Yoshino A, Murate K, Yoshida T, Okabayashi H, Krishna PR, Kamaya H, Ueda I (1994) Surface-oriented saturable binding of halothane with micelles: paramagnetic relaxation of 19F-NMR spin-lattice relaxation rate and gas chromatography studies. J Colloid Interface Sci 166: 375-382.

Yoshino A, Yoshida T, Okabayashi H, Kamaya H, Ueda I (1998) ^{19}F and ^{1}H NMR and NOE study on halothane–micelle interaction: residence location of anesthetic molecules. J Colloid Interface Sci 198: 319-322.

Zarbock R, Woischnik M, Sparr C, Thurm T, Kern S, Kaltenborn E, Hector A, Hartl D, Liebisch G, Schmitz G, Griese M (2012) The surfactant protein C mutation A116D alters cellular processing, stress tolerance, surfactant lipid composition, and immune cell activation. BMC Pulm Med 12: 15.

Zhang Y-P, Lewis RNAH, McElhaney RN (1997) Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behaviour of the *n*-saturated 1,2-diacyl-phosphatidylglicerols. Biophys J 72: 779-793.

Zhang H, Qihui F, Wang YE, Neal CR, Zuo YY (2011) Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy. Biochim Biophys Acta 1808(7): 1832-1842.

Zheng B, Zhan Q, Chen J, Xu H, He Z. (2015) Sevoflurane pretreatment enhance HIF-2α expression in mice after renal ischemia/reperfusion injury. Int J Clin Exp Pathol 8(10): 13114-13119.

Zimmermann LJ, Janssen DJ, Tibboel D, Hamvas A, Carnielli VP (2005) Surfactant metabolism in the neonate. Biol Neonate 87(4): 296-307.

Životopis

Vilena Vrbanović Mijatović rođena je 17. listopada 1977. godine u Splitu. Završila je prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Lucijan Vranjanin“ u Zagrebu, nakon koje upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu na kojem je diplomirala 2003. godine. Specijalistički ispit iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja je položila 2010. godine te je trenutno zaposlena kao liječnik specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u KBC-u Zagreb. Osim rada na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje sudjelovala je i u radu sa studentima na kolegiju Anesteziologija i reanimatologija za studente pete godine studija na hrvatskom i engleskom jeziku. Sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih konferencija. Doktorski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu upisuje 2011. godine.