



UDK 57.086:616.8-085:615.211-099:636.3(043.3)

Jurij Žel, dr. vet. med.

**NEVROLOŠKA OCENA IN NEVROTOKSIČNOST  
LIPOSOMALNEGA BUPIVAKAINA PO  
INTRATEKALNI APLIKACIJI PRI PRAŠIČU**

Doktorska disertacija

**NEUROLOGICAL EVALUATION AND  
NEUROTOXICITY OF LIPOSOME BUPIVACAINE  
AFTER INTRATHECAL INJECTION IN PIG**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2020

Jurij Žel

## **Nevrološka ocena in nevrotoksičnost liposomalnega bupivakaina po intratekalni aplikaciji pri prašiču**

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Inštitutu za anatomijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, na Kliniki za prežvekovalce in prašiče Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen: \_\_\_\_\_

**Mentorica:** izr. prof. dr. Tatjana Stopar Pintarič

**Somentorica:** izr. prof. dr. Alenka Seliškar

Izjava o delu:

»Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni ter da nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.«

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

**Predsednik:** doc. dr. Mitja Gombač

**Član:** izr. prof. dr. Tomaž Snoj

**Član:** prof. dr. Mirt Kamenik

## **NEVROLOŠKA OCENA IN NEVROTOKSIČNOST LIPOSOMALNEGA BUPIVAKAINA PO INTRATEKALNI APLIKACIJI PRI PRAŠIČU**

### **IZVLEČEK**

Ključne besede: analgezija; živalski modeli; bupivakain – toksičnost; zdravila s podaljšanim sproščanjem – farmakologija; liposomi; spinalna injekcija – škodljivi učinki; hrbtenjača – anatomija in histologija; spinalni živci – anatomija in histologija; prašiči

Suspenzija liposomalnega bupivakaina (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) je formulacija s podaljšanim sproščanjem bupivakaina, ki je odobrena za infiltracijo v mehka tkiva in interskaleni blok brahialnega pleksusa pri ljudeh, ne pa za nevraksialno uporabo. Namen te raziskave je ugotoviti nevrološke posledice in histopatološke spremembe pri naraščajočih odmerkih liposomalnega bupivakaina, apliciranega intratekalno.

Petindvajsetim prašičem, težkim  $36,2 \pm 4,4$  kg, naključno razdeljenim v pet skupin, smo intratekalno aplicirali naslednje testne učinkovine: 3 ml 0,9% raztopine natrijevega klorida (negativna kontrola), 3 ml 0,5% bupivakain HCl (pozitivna kontrola) ali enega od treh odmerkov 1,33%-suspenzije liposomalnega bupivakaina (1,5, 3 ali 5 ml oziroma 20, 39 ali 66 mg). Po okrevanju iz anestezije smo ocenjevali nevrološki status živali in tri tedne po aplikaciji testnih učinkovin prašiče žrtvovali. Možno nevrotoksičnost testnih učinkovin smo ocenjevali s histopatološko preiskavo hrbtenjače in hrbtenjačnih živcev ter z analizo cerebrospinalne tekočine, ki smo jo odvzeli pred aplikacijo testnih učinkovin in pred žrtvovanjem.

Prašiči, ki so prejeli 0,9% natrijev klorid, 3 ml 0,5% bupivakain HCl ali 1,5 ml 1,33% (20 mg) liposomalnega bupivakaina, so okrevali v 2, 5 ali 4 urah po aplikaciji. Prašiči, ki so prejeli 3 ali 5 ml 1,33% (39 ali 66 mg) liposomalnega bupivakaina, so kazali znake nevraksialnega bloka do 32 ur po aplikaciji. Histopatološke analize niso potrdile sprememb, ki bi kazale na nevrotoksičnost, rezultati analize cerebrospinalne tekočine pa so bili nejasni.

Nevraksialni blok po intratekalni aplikaciji liposomalnega bupivakaina pri prašiču je odvisen od odmerka in traja dlje kot po aplikaciji bupivakain HCl. S histopatološko preiskavo hrbtenjače in hrbtenjačnih živcev nismo opazili sprememb, ki bi kazale na nevrotoksičnost liposomalnega bupivakaina.

## **NEUROLOGICAL EVALUATION AND NEUROTOXICITY OF LIPOSOME BUPIVACAINE AFTER INTRATHECAL INJECTION IN PIG**

### **ABSTRACT**

Key words: Analgesia; models, animal; bupivacain – toxicity; delayed-action preparation – pharmacology; liposomes; injections, spinal – adverse effects; spinal cord – anatomy and histology; spinal nerve – anatomy and histology; swine

Bupivacaine liposome injectable suspension (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA) is an extended-release formulation of bupivacaine. It is approved for analgesia via tissue infiltration and interscalene brachial plexus in man, but not for use in neuraxial space. The aim of this study is to establish neurologic and histopathologic outcomes of escalating dosages of liposome bupivacaine suspension administered intrathecally.

Twenty-five pigs, weighing  $36.2 \pm 4.4$  kg, were randomly assigned to one of five groups to receive intrathecal injections of 3 ml 0.9% sodium chloride (negative control), 3 ml 0.5% bupivacaine hydrochloride (positive control), or one of three doses of 1.33% liposome injectable suspension: 1.5, 3 or 5 ml (20, 39 or 66 mg). After recovering from general anaesthesia, the pigs were assessed for neurological outcome study by blinded observers. Three weeks later, the animals were sacrificed for histopathologic evaluations of neurotoxicity. The samples of cerebrospinal fluid were analysed before the application of tested substances and three weeks later.

Pigs that received 0.9% sodium chloride, bupivacaine hydrochloride 3 ml or 1.5 ml of 1.33% (20 mg) liposome bupivacaine recovered within 2, 5 and 4 hours, respectively. Pigs that received 3 and 5 ml of 1.33% (39 and 66 mg) liposome bupivacaine, respectively, exhibited signs of neuraxial block up to 32 hours after injection. No histopathologic evidence of neurotoxicity was found in any of the groups, results of the cerebrospinal fluid analysis were inconclusive.

Intrathecal administration of liposome bupivacaine injectable suspension in pigs resulted in a dose-response pattern of longer duration of neuraxial block than bupivacaine hydrochloride without histopathologic evidence of neurotoxicity.

## KAZALO

KAZALO SLIK.....	8
KAZALO TABEL.....	10
SEZNAM OKRAJŠAV.....	11
1 UVOD.....	12
1.1 NAMEN RAZISKAVE .....	13
1.2 RAZISKOVALNI HIPOTEZI.....	13
2 PREGLED LITERATURE .....	14
2.1 NOCICEPCIJA.....	14
2.2 ŽIVCI IN HRBTENJAČA.....	15
2.3 HRBTENICA ČLOVEKA IN PRAŠIČA .....	17
2.4 CEREBROSPINALNA TEKOČINA.....	18
2.5 POOPERACIJSKA BOLEČINA .....	18
2.6 LOKALNI ANESTETIKI .....	19
2.6.1 Vrste lokalnih anestetikov in zgradba .....	19
2.6.2 Vpliv disociacijske konstante na delovanje lokalnih anestetikov .....	20
2.6.3 Selektivnost lokalnih anestetikov .....	21
2.6.4 Mehanizem delovanja.....	21
2.6.5 Neželeni učinki .....	24
2.6.6 Načini aplikacije .....	24
2.7 NEVRAKSIALNA ANESTEZIJA PRI PRAŠIČU .....	25
2.8 BUPIVAKAIN IN LIPOSOMALNI BUPIVAKAIN .....	26
3 MATERIALI IN METODE .....	30
3.1 POSKUSNE ŽIVALI .....	30
3.2 IZVEDBA POSKUSA.....	31
3.3 NEVROLOŠKA OCENA.....	34
3.4 PATOHISTOLOŠKE PREISKAVE .....	36
3.5 KRVNE ANALIZE IN ANALIZA CEREBROSPINALNE TEKOČINE.....	38
3.5.1 Krvne analize .....	38
3.5.2 Analiza cerebrospinalne tekočine .....	38
3.5.3 Biokemijske preiskave.....	41
3.6 STATISTIČNA OBDELAVA.....	41
4 REZULTATI .....	43

4.1	HEMATOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE PREISKAVE KRVI .....	43
4.2	KOŽNA TEMPERATURA.....	45
4.3	NEVROLOŠKI PREGLED .....	45
4.4	NOCICEPCIJA.....	46
4.5	PROPRIOCEPCIJA.....	46
4.6	ATAKSIJA .....	48
4.7	ODTEGNITVENI REFLEKS .....	48
4.8	PATOHOSTOLOŠKE PREISKAVE .....	49
4.9	CEREBROSPINALNA TEKOČINA .....	53
5	RAZPRAVA.....	57
6	ZAKLJUČKI .....	65
7	POVZETEK .....	66
8	SUMMARY .....	69
9	ZAHVALE .....	72
10	LITERATURA .....	74
11	PRILOGE .....	91
11.1	PRILOGA 1.....	91
11.2	PRILOGA 2.....	92
11.3	PRILOGA 3.....	93
11.4	PRILOGA 4.....	94
11.5	ČLANEK.....	95

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1: Shematski prikaz zgradbe živca (Campoy in Schroeder, 2013)</b>	
Figure 1: Schematic presentation of the nerve structure (Campoy and Schroeder, 2013) .....	15
<b>Slika 2: Shematski prikaz zgradbe hrbtenjače (Fletcher, 2013)</b>	
Figure 2: Schematic presentation of spinal cord structure (Fletcher, 2013).....	17
<b>Slika 3: Shematski prikaz strukture natrijevega kanalčka (Catterall in Swanson, 2014)</b>	
Figure 3: Schematic presentation of sodium channel structure (Catterall and Swanson, 2014) .....	22
<b>Slika 4: Zgradba liposomalnega bupivakaina</b>	
Figure 4: Liposome bupivacaine structure .....	28
<b>Slika 5: Orientacijske točke za intratekalno aplikacijo testnih učinkovin</b>	
Figure 5: Orientation points for the intrathecal administration of tested substances. ....	32
<b>Slika 6: Prikaz odvzema cerebrospinalne tekočine</b>	
Figure 6: Presentation of cerebrospinal fluid sampling.....	33
<b>Slika 7: Organigram poskusa</b>	
Figure 7: Organigram of the experiment .....	34
<b>Slika 8: Hrbtenjača na prehodu v kavdo ekvino</b>	
Figure 8: Spinal cord on the transition to the cauda equina .....	36
<b>Slika 9: Odstotek prašičev s oslabljeno nocicepcijo, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin</b>	
Figure 9: Percent of pigs with altered nociception, regardless of grade, in hours after application of tested substances.....	46
<b>Slika 10: Odstotek prašičev s oslabljeno propriocepcijo, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin</b>	
Figure 10: Percent of pigs with altered proprioception, regardless of grade, in hours after application of tested substances.....	47
<b>Slika 11: Odstotek prašičev z znaki ataksije, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin</b>	
Figure 11: Percent of pigs with signs of ataxia, regardless of grade, in hours after application of tested substances .....	48
<b>Slika 12: Odstotek prašičev z oslabljenim odtegnitvenim refleksom, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin</b>	
Figure 12: Percent of pigs with altered withdrawal reflex, regardless of grade, in hours after application of tested substances.....	49
<b>Slika 13: Prečni prerez hrbtenjačnih živcev, obarvanih s toluidinskim modrilom, za morfometrično analizo</b>	
Figure 13: Toluidin blue stained spinal nerves for morphometrical analysis. ....	50
<b>Slika 14: Prečni prerezi hrbtenjače</b>	
Figure 14: Cross sections of the spinal cord.....	52

Slika 15: CD3 imunoreaktivnost	
Figure 15: CD3 immunoreactivity.....	53
Slika 16: Enojedrne celice v vzorcu cerebrospinalne tekočine	
Figure 16: Mononuclear cells in a sample of cerebrospinal fluid .....	56
Slika 17: Krvno kontaminiran vzorec cerebrospinalne tekočine kot posledica travmatske punkcije	
Figure 17: Blood contaminated sample of cerebrospinal fluid as a result of traumatic puncture .....	56

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Ocena motnosti cerebrospinalne tekočine	
Table 1: Estimation of cerebrospinal fluid turbidity .....	39
Tabela 2: Ocena obarvanosti cerebrospinalne tekočine	
Table 2: Estimation of cerebrospinal fluid colour .....	39
Tabela 3: Vrednosti izbranih hematoloških parametrov pri prvem odvzemu	
Table 3: Values of selected hematological parameters at the first sampling.....	44
Tabela 4: Vrednosti izbranih hematoloških parametrov pri drugem odvzemu	
Table 4: Values of selected hematological parameters at the second sampling.....	44
Tabela 5: Vrednosti izbranih biokemijskih parametrov v serumu	
Table 5: Values of selected biochemical parameters in serum.....	45
Tabela 6: Rezultati morfometrične analize	
Table 6: Results of morphometrical analysis .....	51
Tabela 7: Izbrani parametri cerebrospinalne tekočine pred aplikacijo testnih učinkovin	
Table 7: Selected paremeters of cerebrospinal fluid before the application of tested substances .....	54
Tabela 8: Izbrani parametri cerebrospinalne tekočine pri drugem odvzemu	
Table 8: Selected paremeters of cerebrospinal fluid at the second sampling .....	55
Tabela 9: Ocena nocicepcije v urah po aplikaciji testne učinkovine	
Table 9: Evaluation of nociception in hours after intrathecal application of tested substances.	91
Tabela 10: Ocena propriocepceije v urah po aplikaciji testne učinkovine	
Table 10: Evaluation of proprioception in hours after intrathecal application of tested substances .....	92
Tabela 11: Ocena ataksije v urah po aplikaciji testne učinkovine	
Table 11: Evaluation of ataxia in hours after intrathecal application of tested substances .....	93
Tabela 12: Ocena odtegnitvenega refleksa v urah po aplikaciji testne učinkovine	
Table 12: Evaluation of withdrawal reflex in hours after intrathecal application of tested substances .....	94

## SEZNAM OKRAJŠAV

bupivakain HCl	Bupivakain hidroklorid
C 1–7	Vratna vretenca in številka vretenca
DI–DIV	Štiri homologne domene, ki sestavljajo podenoto $\alpha$ natrijevega kanalčka
EDTA	Etilendiaminotetraocetna kislina
EKG	Elektrokardiogram
EQ	Kavda ekvina (angl. <i>cauda equina</i> )
EtCO <sub>2</sub>	Delni tlak ogljikovega dioksida na koncu izdiha
G	Merska enota, ki se uporablja pri izražanju premera injekcijskih igel in venskih katetrov (angl. <i>gauge</i> )
GM	Sivina hrbtenjače (angl. <i>grey matter</i> )
L 1–7	Ledvena vretenca in številka vretenca
LB	Liposomalni bupivakain; bupivakain inkapsuliran v liposomih
ME	Ovojnice osrednjega živčevja (angl. <i>meninges</i> )
Nav 1.1–Nav1.9	Tipi natrijevih kanalčkov glede na razliko v podenoti $\alpha$
PBS	Fiziološka raztopina, puferirana s fosfatom (angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
pKa	Disociacijska konstanta predstavlja vrednost pH, pri kateri je 50 % molekul učinkovine ioniziranih
S	Križnična vretenca
S1–S6	Šest transmembranskih segmentov, ki sestavljajo domene DI–DIV in tvorijo pore za prehod natrijevih ionov v natrijevem kanalčku
SD	Standardni odklon (angl. <i>standard deviation</i> )
SpO <sub>2</sub>	Zasičenost hemoglobina s kisikom, izmerjena s pulznim oksimetrom
T 1–5	Prsna vretenca in številka vretenca
TAP	Blok prečne trebušne mišice (angl. <i>transversus abdominis plane block</i> )
WM	Belina hrbtenjače (angl. <i>white matter</i> )

## 1 UVOD

Bolečina je neprijetna senzorna ali čustvena zaznava, povezana z dejansko ali potencialno poškodbo tkiva (Muir, 2007). Je subjektivna izkušnja z dvema komplementarnima vidikoma: prvi je občutenje bolečine v določenem delu telesa, drugi je povezan z neprijetnim počutjem in s tem povzročenimi vedenjskimi spremembami (Lorenz in sod., 2011a).

Pooperacijska bolečina pri človeku pogosto še vedno ni ustrezno nadzorovana (Gan, 2017), neustrezno nadzorovana akutna pooperacijska bolečina pa lahko vodi v kronično bolečino (Johansen in sod., 2012). Za učinkovit nadzor bolečine sta potrebna multimodalni analgetični pristop in preventivna aplikacija analgetikov pred kirurško travmo (Hellyer in sod., 2007).

Večina učinkovin, ki jih uporabljam za analgezijo, bolečino le zmanjša ali spremeni njeno občutenje. Lokalni anestetiki edini preprečijo depolarizacijo membrane nevronov in tako nastanek ali prenos bolečinskega impulza (Martin-Flores, 2013).

Čas delovanja lokalnih anestetikov je za učinkovit nadzor pooperacijske bolečine ob enkratni aplikaciji velikokrat prekratek, zato jih ponovno apliciramo ali uporabimo epiduralne katetre za kontinuirano aplikacijo lokalnega anestetika (Radlinsky in sod., 2005), kar je privelo do razvoja lokalnih anestetikov s podaljšanim sproščanjem (Epstein-Barash in sod., 2009).

Eden od pomembnejših lokalnih anestetikov je bupivakain, ki je aminoamidni lokalni anestetik z relativno dolgim učinkom (Ramsey, 2012). Ena od oblik, ki dodatno podaljša učinek bupivakaina, je liposomalni bupivakain (LB) (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA). Ta oblika bupivakaina je inkapsulirana v multivezikularnih liposomih, ki izboljšajo stabilnost pripravka, podaljšajo delovanje ter zmanjšajo sistemsko nevro- in kardiotoksičnost (Kohane in Langer, 2010; Chahar in Cummings, 2012).

Liposomalni bupivakain je odobren za infiltracijo v mehka tkiva in interskaleni blok pri ljudeh (Balocco in sod., 2018; Pacira Pharmaceuticals, 2018). Kljub uporabi za tkivno in perinevrinalno infiltracijo (Hamilton in sod., 2016; Hamilton in sod., 2017), je informacij o nevraksialni uporabi liposomalnega bupivakaina malo. Učinkovitost in varnost po terapevtskem ali nenamernem vbrizganju liposomalnega bupivakaina v intratekalni prostor sta slabo raziskani (Joshi in sod., 2015; Malinovsky in sod., 1997).

## 1.1 NAMEN RAZISKAVE

Namen naše raziskave je ugotoviti nevrološke in nevrotoksične posledice vbrizganja treh različnih odmerkov liposomalnega bupivakaina (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) v intratekalni prostor pri prašiču ter jih primerjati s standardno formulacijo bupivakaina (bupivakain HCl, pozitivna kontrola) in fiziološko raztopino (negativna kontrola).

## 1.2 RAZISKOVALNI HIPOTEZI

Hipoteza 1: V primerjavi z bupivakain hidrokloridom povzroči liposomalni bupivakain po intratekalni aplikaciji daljši senzorični in krajši motorični blok, ki pa je odvisen od odmerka.

Hipoteza 2: Uporaba liposomalnega bupivakaina v klinično pomembnih odmerkih pri intratekalni aplikaciji ne povzroča degenerativnih sprememb na hrbtenjačnih živcih.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 NOCICEPCIJA

Nocicepcija oziroma zaznavanje bolečine je kaskada prevajanja in modulacije živčnih impulzov, ki poteka v treh korakih:

1. pri transdukciiji nociceptorji pretvorijo bolečinski dražljaj v električni impulz,
2. s transmisijo se posredujejo živčni impulzi v osrednje živčevje,
3. z modulacijo nevroni signal ojačajo ali oslabijo.

Končna percepcija bolečine je integracija projekcijskih poti v talamus in korteks. Tako dobimo končno, zavedno, subjektivno in čustveno doživetje bolečine (Lorenz in sod., 2011b).

Bolečinski impulz generirajo nociceptorji v različnih organih. Nociceptorje delimo na dva tipa. Tip 1 reagira na mehanične in kemične bolečinske dražljaje, vendar ima relativno visok prag za temperaturo. Tip 2 ima nižjo temperaturno mejo in višjo mejo vzdražnosti za mehanične dražljaje (Lascelles, 2012).

Živčne impulze, ki jih generirajo različni receptorji, prevajajo senzorična živčna vlakna A- $\alpha$ , A- $\beta$ , A- $\delta$  in C. Za prenos bolečinskih dražljajev sta pri tem odgovorna zadnja navedena tipa vlaken. Občasno je lahko impulz, ki ga prevajajo vlakna A- $\beta$ , interpretiran kot bolečina (Lascelles, 2012). Vlakna A- $\delta$  so tanka, mielinizirana, hitro prevodna vlakna (od 5 do 30 m/s). Povezana so z zaznavo ostre, lokalizirane in prehodne bolečine. Drugi tip vlaken, ki prevajajo bolečinske impulze, so vlakna C. To so vlakna z nižjo hitrostjo prevajanja impulzov (od 0,5 do 2 m/s) in so nemielinizirana. Pretežno prevajajo temperaturne impulze in impulze, ki so povezani s slabo lokaliziranim pekočim in dolgotrajnejšim občutkom bolečine, ki ostaja po prekinitvi bolečinskega dražljaja.

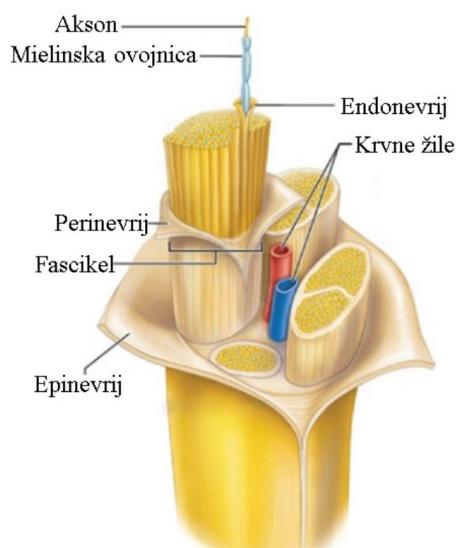
Glede na vlakna, ki prevajajo bolečino, lahko bolečino opredelimo kot hitro in počasno. Hitra, ostra in dobro omejena bolečina je povezana z vlakni A- $\delta$ . Počasna bolečina je topa, difuzna in intenzivna ter je povezana z vlakni C. Ta vlakna so polimodalna z visokim pragom vzdražljivosti (Lorenz in sod., 2011b; Lascelles, 2012).

Pot prenosa bolečinskega impulza se prek perifernih živcev nadaljuje do hrbtenjače, kjer organizirani v lamine pretežno vstopajo v dorzalni rog sivine in tam z nevroni tvorijo sinapse. Nekatera aferentna vlakna se cepijo in prečkajo več segmentov hrbtenjače, preden tvorijo sinapse. Bolečinska informacija se nato prenaša v kavdalni nukleus, ki je del trigeminalnega

senzoričnega kompleksa, dalje v thalamus, retikularno formacijo in do korteksa (Lascelles, 2012).

## 2.2 ŽIVCI IN HRBTENJAČA

Živčna vlakna se povezujejo v živec, in čeprav je makroskopsko videti kot kompaktna struktura, je sestavljen iz več fasciklov, ki jih povezuje epinevrij. To je plast vezivnega tkiva, ki obdaja periferni živec in vsebuje tudi žile, ki živec oskrbujejo. Posamezne fascikle živca obdaja perinevrij, ki je večslojna epitelna ovojnica iz perinevrálnih celic. Fascikli, ki vsebujejo posamezne aksone in kapilare, niso kontinuirane strukture, saj se delijo in anastomozirajo. V notranjosti jih povezuje vezivni endonevrij (Slika 1) (Campoy in Schroeder, 2013).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe živca (Campoy in Schroeder, 2013)

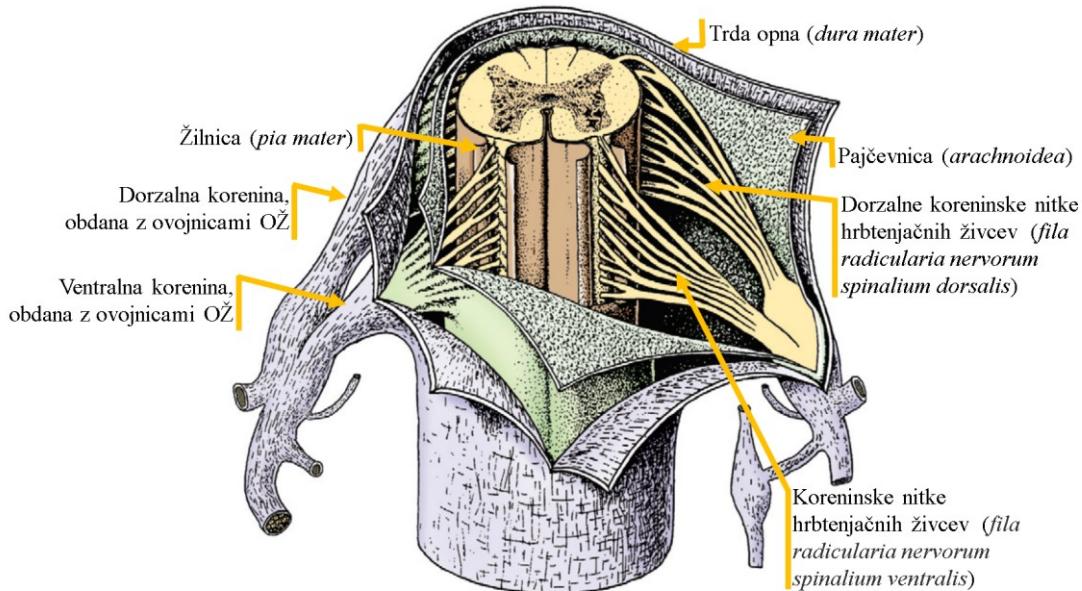
Figure 1: Schematic presentation of the nerve structure (Campoy and Schroeder, 2013)

Živci vstopajo v hrbtenjačo kot hrbtenjačni živci. Glede na mesto vstopa živcev lahko hrbtenjačo razdelimo na funkcionalne segmente, ki imajo dorzalne in ventralne korenine (*radices dorsales et radices ventrales*). Živci, ki vstopajo v hrbtenjačne segmente, so sestavljeni iz aksonov z različno količino mielina, obdajajo pa jih ovojnice osrednjega živčevja. Ob vstopu v hrbtenjačo se aksoni hrbtenjačnih živcev reorganizirajo v koreninske nitke hrbtenjačnih

živcev (*fila radicularia nervorum spinalium*). Število teh se razlikuje med hrbtenjačnimi segmenti (Fletcher, 2013; Dyce in sod., 2010).

Hrbtenjača in korenine aferentnih in eferentnih hrbtenjačnih živcev so obdane s tremi zaščitnimi plastmi. Najbolj površinska, trda opna (*dura mater*), je fibrozna ovojnica in ustvarja cilinder, ki obdaja hrbtenjačo. Na področju hrbtenjačnih živcev ustvarja lateralne podaljške, ki le-te obdajajo. Notranjo površino trde opne obdaja tanka pajčevnica (*arachnoidea*), ki zaobjema subarahnoidalni ali intratekalni prostor, napoljen s cerebrospinalno tekočino. Iz nje izhajajo trabekulacije, s katerimi se pritrja na žilnico (*pia mater*), najgloblje ležečo ovojnico, ki je dobro prekravljena. Žilnica se pritrja na glialne celice, ki so na površini hrbtenjače. Bilateralno ob lateralnem robu hrbtenjače je žilnica zadebeljena in ustvarja dendikulatne ligamente, s katerimi se pritrjuje na trdo opno in tako stabilizira hrbtenjačo v prostoru, napoljenem s cerebrospinalno tekočino (Fletcher, 2013; Dyce in sod., 2010).

V sredini hrbtenjače je centralni kanal (*canalis centralis*), ki se kavdalno razširi v terminalni ventrikel (*ventriculus terminalis*). Kanal obdaja sivina, ki je sestavljena iz teles in podaljškov nevronov ter glia celic. V preseku je oblike metulja z značilnima ventralnim in dorzalnim rogom, iz katerih izstopajo hrbtenjačni živci. Sivino obdaja belina (*substancia alba*), ki je sestavljena pretežno iz mieliniziranih aksonov. Razdelimo jih v lateralni, dorzalni in ventralni funikulus s prečno povezavo (*comissura alba*) (Slika 2) (Fletcher, 2013; Dyce in sod., 2010).



Slika 2: Shematski prikaz zgradbe hrbtenjače (Fletcher, 2013)

Figure 2: Schematic presentation of spinal cord structure (Fletcher, 2013)

Legenda: OŽ – osrednje živčevje

Legend: CNS – Central nervous system

### 2.3 HRBTENICA ČLOVEKA IN PRAŠIČA

V nasprotju z zgradbo hrbtenjače so lahko medvrstne razlike pri zgradbi hrbtenice precejšnje. Človek ima 7 vratnih, 12 prsnih in 5 ledvenih vretenc (Busscher in sod., 2010). Prašiči, ki so pogost model v translacijskih raziskavah, imajo 7 vratnih, 14–15 prsnih in 6–7 ledvenih vretenc. Število vretenc v torakolumbalnem delu pri prašiču je pogosto različno (Koenig in Lieblich, 2004). Kljub temu da se človeška in prašičja hrbtenica razlikujeta po številu in zgradbi vretenc, je dolžina hrbtenice med tretjim vratnim in zadnjim ledvenim vretencem pri prašičih, težkih okrog 40 kg, primerljiva z dolžino hrbtenice odraslega človeka, ki je visok 183 cm (Busscher in sod., 2010).

## 2.4 CEREBROSPINALNA TEKOČINA

Pretežni del zunajcelične tekočine v osrednjem živčevju zavzema cerebrospinalna tekočina. Polni ventrikle, spinalni kanal in subarahnoidalni prostor med žilnico in pajčevnico. Ima več funkcij: mehanična zaščita hrbtenjače, s prenosom hormonov in prenašalcev opravlja komunikacijsko vlogo v osrednjem živčnem sistemu, vanjo se izločajo metabolni produkti sinaptične aktivnosti (Brown in sod., 2004). Nastaja pretežno z ultrafiltracijo in sekrecijo horoidnega pleteža v lateralnem, tretjem in četrtem možganskem ventriklu ter je od krvnega obtoka ločena s krvno-možgansko bariero (De Lorenzi in Mandara, 2010).

Analiza cerebrospinalne tekočine je pomembna pri diagnostiki vnetnih, neoplastičnih in degenerativnih obolenj (Cook in Levine, 2014). Pri vzorčenju cerebrospinalne tekočine moramo odvzeti primerno količino, ki je pri človeku 12 ml (Teunissen in sod., 2009). Najpogostejši zapleti po odvzemu so glavobol, lokalna bolečina, krvavitev in nastanek hematoma. Vnos infekta ob punkciji lahko povzroči tudi meningitis (Doherty in Forbes, 2014). Pri živalih pri odvzemu ni priporočljivo preseči 1 ml cerebrospinalne tekočine na 5 kg telesne mase. Ob punkciji lahko poškodujemo manjše žile in povzročimo kontaminacijo cerebrospinalne tekočine s krvjo, kar brez poškodbe hrbtenjače ni škodljivo za pacienta, otežuje pa laboratorijsko analizo (De Lorenzi in Mandara, 2010). Vzorec je lahko nediagnostičen, če je cerebrospinalna tekočina močno kontaminirana s krvjo (Cook in Levine, 2014). Cerebrospinalno tekočino je priporočljivo analizirati v eni uri po odvzemu, saj zaradi nizkih vsebnosti beljakovin, koncentracije lipidov in hipotoničnosti pride do celične lize z dezintegracijo citoplazemskih in jedrnih membran (Di Terlizzi in Platt, 2009).

## 2.5 POOPERACIJSKA BOLEČINA

Nadzor pooperacijske bolečine je pri ljudeh velik problem, saj nekateri avtorji poročajo o neustrezni oskrbi pooperacijske bolečine pri do 80 % bolnikov. Odstotek se razlikuje glede na kirurški poseg, metode analgezije in čas po posegu (Gan, 2017). Neustrezno nadzorovana akutna bolečina lahko vodi v kronično bolečino, kar so ugotovili pri 40,4 % bolnikov po kirurških posegih (Johansen in sod., 2012). Povezava med motnjami občutenja na področju brazgotine po kirurškem posegu in pojavom bolečine kaže v veliki večini primerov na nevropsatske mehanizme (Johansen in sod., 2012). Osnovni pristop pri nadzoru pooperacijske

bolečine je uporaba opioidnih analgetikov. Sočasna uporaba drugih učinkovin, kot so nesteroidni analgetiki, antagonisti receptorjev NMDA (N-metil-D-aspartat), antiepileptiki, antidepresivi in lokalni anestetiki, omogoča boljšo protibolečinsko oskrbo. Uporaba teh učinkovin lahko tudi zmanjša odmerke opioidnih analgetikov in s tem njihove neželene učinke (Gan, 2017).

Večina učinkovin, ki jih uporabljamo za preprečevanje bolečine, modificira bolečino ali pa jo zgolj zmanjša. Samo lokalni anestetiki preprečijo prenos bolečinskega dražljaja (Martin-Flores, 2013), zato je njihova uporaba v skladu z multimodalnim pristopom in preventivno analgezijo pred kirurško travmo, dvema glavnima načeloma protibolečinske oskrbe (Hellyer in sod., 2007).

## 2.6 LOKALNI ANESTETIKI

Zapisi o uporabi različnih snovi in načinov za lokalno lajšanje bolečine segajo v obdobje starega Egipta, vendar uporabo lokalne anestezije v medicinske namene povezujemo z izolacijo kokaina in njegovo uporabo v drugi polovici 19. stoletja (Schroeder, 2013). Regionalna anestezija za nadzor peri- in pooperacijske bolečine je tudi v medicini malih živali v zadnjih desetletjih vse bolj priljubljena, saj so tehnike ob upoštevanju anatomskega značilnosti živali in farmakoloških lastnosti lokalnih anestetikov enostavne, varne in učinkovite (Lerche, 2013). Z regionalno anestezijo zmanjšamo medoperacijsko porabo splošnih anestetikov in pooperacijsko uporabo analgetikov (Cohen, 2012); na ta način zmanjšamo neželene učinke splošnih anestetikov in analgetikov ter dosežemo boljše počutje bolnika (Lerche, 2013).

Lokalni anestetiki so učinkovine, ki preprečujejo depolarizacijo membrane nevronov in s tem preprečujejo nastanek ali prenos bolečinskega impulza (Lerche, 2013). Nekatere lokalne anestetike, kot je lidokain, uporabljamo tudi sistemsko, s čimer zmanjšamo bolečino in pooperacijsko porabo analgetikov ter medoperacijsko porabo splošnih anestetikov (McCarthy in sod., 2010).

### 2.6.1 Vrste lokalnih anestetikov in zgradba

Večina lokalnih anestetikov ima enako osnovno strukturo. Sestavljeni so iz lipofilnega aromatskega obroča in stranske aminske verige. Povezuje ju ogljikovodikova veriga, ki vsebuje

estersko ali amidno vez. Amfifilna zgradba molekule lokalnega anestetika je pomembna za sam učinek lokalnega anestetika (Pawson in Forsyth, 2008). Glede na strukturo delimo lokalne anestetike na estre in amide. Med estre uvrščamo prokain, klorprokain in tetrakain, med amide pa uvrščamo lidokain, mepivakain, bupivakain, ropivakain in druge (Martin-Flores, 2013). Estri in amidi se razlikujejo tudi glede na način presnove in dolžino učinkovanja (Pawson in Forsyth, 2008). Z izjemo kokaina, ki se pretežno presnavlja v jetrih, etrske lokalne anestetike hidrolizirajo serumske holinesteraze (Martin-Flores, 2013). Amidni lokalni anestetiki se presnavljajo v jetrih z mikrosomalnimi encimi, kjer dealkilacijo najpogosteje nasledi hidroliza (Pawson in Forsyth, 2008). Ta pot ima več korakov kot presnova etrskeh lokalnih anestetikov in traja dlje (Martin-Flores, 2013).

Amfifilna struktura z aromatskim obročem na eni strani in aminom na drugi strani je pomembna za delovanje lokalnega anestetika. Lipofilna komponenta molekule omogoča prehod skozi celično membrano. Učinkovitost in lipofilnost lokalnih anestetikov sta v pozitivni korelaciji. Slednja se povečuje s številom ogljikovih atomov v povezovalni verigi. Lipofilnost ne povečuje samo prehoda molekule skozi celično membrano, ampak tudi sekvestracijo v mielinu; tako podaljša učinkovanje. Na drugi strani amino skupina v strukturi lokalnega anestetika določa topnost v vodi, kar omogoča disociacijo molekule in vezavo na natrijeve kanalčke (Martin-Flores, 2013).

Vezava lokalnih anestetikov na serumske beljakovine je variabilna. Lokalni anestetiki, na primer bupivakain, ki se izraziteje vežejo na plazemske beljakovine, imajo daljše delovanje in večjo afiniteto do receptorskega proteina v natrijevem kanalčku (Martin-Flores, 2013).

### 2.6.2 Vpliv disociacijske konstante na delovanje lokalnih anestetikov

Disociacijska konstanta ( $pK_a$ ) je vrednost pH, pri kateri je 50 % molekul učinkovine ioniziranih (Martin-Flores, 2013). Glede na to, da so lokalni anestetiki večinoma šibke baze, je razmerje med ionizirano in neionizirano obliko molekule izjemno pomembno. Neionizirana oblika molekule je bolj lipofilna in prehaja skozi celično membrano. Po drugi strani je ionizirana oblika tista, ki se znotrajcelično veže na natrijeve kanalčke in prekine prehod natrijevih ionov skoznje (Pawson in Forsyth, 2008). Disociacijska konstanta tako določa hitrost prehoda molekule v celico in s tem hitrost učinkovanja lokalnega anestetika. Patofiziološki procesi, kot

je lokalno vnetje, spremenijo pH okolja, v katerega apliciramo lokalni anestetik. To posledično vpliva na učinkovitost in morebitne toksične učinke (Martin-Flores, 2013).

### 2.6.3 Selektivnost lokalnih anestetikov

Pojav, da v določenih koncentracijah lokalni anestetiki preprečijo prevajanje impulzov nekaterim živčnim vlaknom, medtem ko druga ostanejo intaktna, je bil opisan že zelo zgodaj (Erlanger in Gasser, 1929).

Diferencialni blok je pogosto odvisen od debeline živčnih vlaken, saj so majhna mielinizirana vlakna A- $\delta$  občutljivejša na delovanje lokalnih anestetikov kot debela mielinizirana vlakna A- $\alpha$  in A- $\beta$ . Vlakna C, ki so tanjsa in nemielinizirana, so podobno občutljiva na lokalne anestetike kot večja vlakna A (Campoy in Schroeder, 2013).

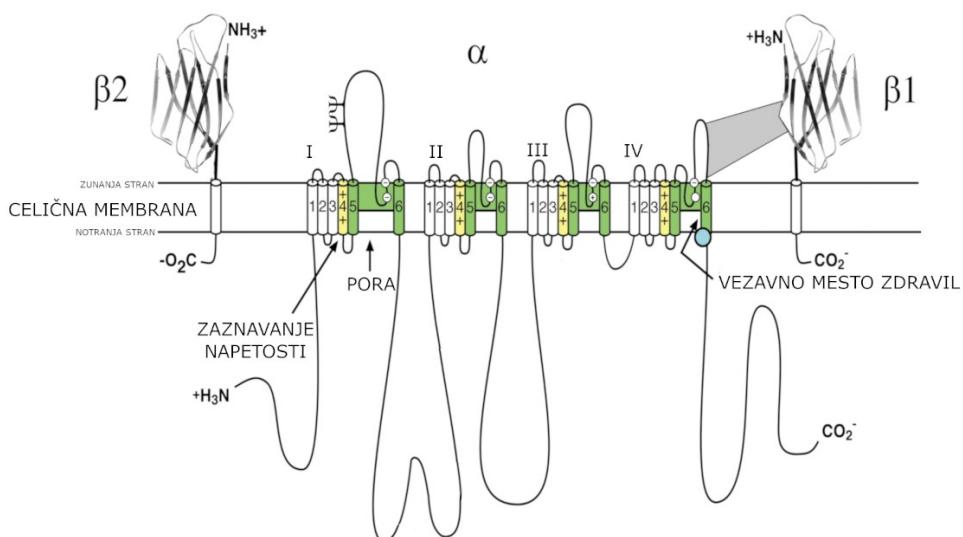
Z različnim učinkom lokalnih anestetikov glede na tip živčnih vlaken lahko tako dosežemo senzorični blok, medtem ko motorična aktivnost ostane ohranjena (Martin-Flores, 2013).

### 2.6.4 Mehanizem delovanja

Čeprav lokalne anestetike uporabljamo že več kot stoletje, je bil mehanizem delovanja dolgo neznan. Raziskave v zadnjih desetletjih so v ospredje delovanja lokalnih anestetikov postavile natrijeve kanalčke oziroma njihovo blokado, čeprav v klinično pomembnih koncentracijah lokalni anestetiki vplivajo tudi na kalijeve in kalcijeve kanalčke (Scholz, 2002).

Natrijevi kanalčki so transmembranski proteini, ki so pomembni pri depolarizaciji celične membrane (Slika 3). Sestavljeni so iz podenote  $\alpha$  in podenote  $\beta$ . Prva s svojimi podenotami ustvarja poro, skozi katero prehajajo natrijevi ioni, ter določa elektrofiziološke in farmakološke značilnosti natrijevega kanalčka (Zimmer in sod., 2014). Podenote  $\beta$  imajo funkcijo modulacije podenot  $\alpha$  (Eijkelkamp in sod., 2012). Natančneje je podenota  $\alpha$  zgrajena iz štirih homolognih domen (DI–DIV), ki so znotrajcelično povezane. Vsaka od njih je sestavljena iz šestih transmembranskih segmentov S1–S6. Funkcijsko sestavljata segmenta S5–S6 poro za prehod natrijevih ionov in sta zunajcelično povezana z zanko P. Te zanke so mesta vezave nekaterih toksinov, kot je tetrodotoksin. Transmembranski segmenti S1–S4 so pomembni za zaznavanje električnega potenciala. Pri tem je najpomembnejši pozitivno nabiti segment S4 (Scholz, 2002; Eijkelkamp in sod., 2012).

Pri mirujočem membranskem potencialu so natrijevi kanalčki zaprti. Ob ekscitaciji oziroma depolarizaciji se kanalčki odprejo, kar omogoči hiter prehod natrijevih ionov v celico (Zimmer in sod., 2014). Odpiranje in zapiranje natrijevih kanalčkov je pogojeno s konformacijskimi spremembami podenote  $\alpha$  zaradi premika napetostno občutljivih segmentov S4 v domenah DI–DIII. Odprtju in vdoru natrijevih ionov v celico sledi inaktivacija natrijevega kanalčka. Ta je posledica premika segmenta S4 v domeni DIV. Posledično se premakne znotrajcelična zanka med segmentoma DIII in DIV. Ta vsebuje skupino treh aminokislin, ki delujejo kot vrata in zaprejo natrijev kanalček na znotrajcelični strani. Po fazi inaktivacije ostanejo kanalčki refraktarni do repolarizacije membrane (Zimmer in sod., 2014).



Slika 3: Struktura natrijevega kanalčka, shematski prikaz (Catterall in Swanson, 2014)

Figure 3: Sodium channel structure, schematic presentation (Catterall and Swanson, 2014)

Na podlagi podenote  $\alpha$  ločimo devet tipov natrijevih kanalčkov (Nav1.1-Nav1.9), ki imajo različne elektrofiziološke značilnosti in so specifično zastopani v različnih tkivih. Nav1.1–Nav1.3 se nahajajo v osrednjem živčevju. Nav1.7–Nav1.9 so značilni za periferno živčevje, medtem ko so Nav1.6 v osrednjem in perifernem živčevju ter gladkih mišicah. V prečno progastih mišicah so prisotni Nav1.5, medtem ko so v srcu prisotni Nav1.6 (Zimmer in sod., 2014). Čeprav imajo posamezni tipi natrijevih kanalčkov različne elektrofiziološke značilnosti, sta vezava in učinkovanje klinično najpogosteje uporabljenih zdravil, med njimi lokalnih anestetikov, na različne tipe neselektivna (Eijkelkamp in sod., 2012). Vezalna mesta

blokatorjev natrijevih kanalčkov so medvrstno dobro ohranjena v bakterijskih in sesalskih kanalčkih, kar je bilo dokazano z interakcijami bakterijskih natrijevih kanalčkov s pogostimi blokatorji (Boiteux in sod., 2014).

Način delovanja lokalnih anestetikov je pogojen z njihovo vezavo na natrijeve kanalčke (Scholz, 2002). Ko se lokalni anestetik veže na vezalno mesto na znotrajcelični strani celične membrane, reverzibilno prepreči prehod natrijevih ionov in depolarizacijo membrane ter tako nastanek bolečinskega impulza. To dejstvo je izjemno pomembno pri protbolečinski oskrbi bolnikov, saj so lokalni anestetiki edina učinkovina, ki lahko prepreči prenos ali nastanek bolečinskega impulza, medtem ko druge učinkovine bolečino zgolj modulirajo ali vplivajo na nastanek vnetnih mediatorjev (Lerche, 2013).

Popolna blokada natrijevih kanalčkov bi imela hude neželene učinke, kot so popolna izguba občutanja, koma in zastoj srca. Blokatorji natrijevih kanalčkov bi glede na neselektivnost povzročili neželene učinke v več tkivih, če ne bi delovali na inhibicijo akcijskega potenciala depolariziranih in hitro depolarizirajočih celic, ki so odgovorne za prenos ali nastanek bolečine. Pri celicah, ki imajo zaprte natrijeve kanalčke, ne povzročijo popolnega bloka (Catterall in Swanson, 2015).

Mesta vezave lokalnih anestetikov se nahajajo na znotrajcelični strani podenote  $\alpha$ , in sicer na segmentih S6 (Zimmer in sod., 2014) v domenah DI, DIII in DIV (Catterall in Swanson, 2015). Aminokisline, ki pokrivajo notranjo stran teh segmentov, ustvarjajo tridimenzionalna receptorska mesta. Velike hidrofilne molekule se lahko vežejo, če je kanalček odprt. V mirujoči fazi, ko so kanalčki zaprti, vodijo od lipidnega dela membrane do receptorskega mesta v segmentih S6 fenestracije, ki omogočajo vezavo hidrofobnih molekul (Eijkelkamp in sod., 2012).

Konformacijske spremembe ob odpiranju in zapiranju natrijevih kanalčkov omogočajo lokalnim anestetikom dostopnost do vezalnih mest in s tem njihovo učinkovanje (Eijkelkamp in sod., 2012; Boiteux in sod., 2014).

Lokalni anestetiki ne vplivajo le na natrijeve kanalčke, temveč tudi na kalijeve, kjer v perifernem živčevju prispevajo k spremembji akcijskega in potenciala v mirovanju (Scholz, 2002).

Lokalni anestetiki vplivajo tudi na kalcijeve kanalčke, ki so sorodni natrijevim kanalčkom in so pomembni predvsem pri sinaptičnem prenosu in mišičnih kontrakcijah. Do zavrtja kanalčkov pride le pri višjih koncentracijah lokalnih anestetikov, saj je njihova afiniteta do kalcijevih

kanalčkov manjša. Iz tega razloga bi lahko pričakovali učinke na kalcijeve kanalčke pri spinalni anesteziji (Scholz, 2002).

#### 2.6.5 Neželeni učinki

Neželeni učinki lokalnih anestetikov so pretežno vezani na osrednje živčevje in srčno-žilni sistem (Hellyer in sod., 2007), saj so podobni natrijevi kanalčki prisotni tudi v možganih, srcu in mišicah (Balser, 2001). Neželeni učinki na osrednje živčevje se kažejo kot epileptoidni napadi, saj so inhibitorni nevroni doveznejši za učinke lokalnih anestetikov (Lerche, 2013). Možen je tudi pojav alergijskih reakcij, ki so pogostejše pri lokalnih anestetikih z estrsko zgradbo (Dullenkopf in Borgeat, 2003). Sistemske neželene učinke lahko povzroči tudi lokalna aplikacija v terapevtskih odmerkih. Do tega pride, če se lokalni anestetik na mestu aplikacije prehitro absorbira v krvni obtok in veže na plazemske beljakovine (Dullenkopf in Borgeat, 2003).

Pri aplikaciji lokalnega anestetika lahko poškodujemo živčna vlakna. Poškodba je najpogostejša pri nemerni intranevrálni aplikaciji, ki je pri blokih med 16 in 17 % (Liu in sod., 2011; Hara in sod., 2012). Kljub visoki stopnji nemernih intranevrálnih aplikacij pri perifernih blokih je stopnja zapletov okrog 3 % pri blokih perifernega živčevja in 0,04 % pri nevraksialnih blokih. Večina zapletov je začasnih, trajne posledice so redke (Brull in sod., 2007).

#### 2.6.6 Načini aplikacije

Pri topikalni ali površinski anesteziji lokalni anestetik nanesemo na sluznico ali kožo pred posegom. Medtem ko je na sluznicah uporaba lokalnih anestetikov učinkovita, nas kljub različnim oblikam krem in obližev omejuje prehodnost lokalnega anestetika skozi intaktno kožo (Lerche, 2013; Campoy in Schroeder, 2013). Lokalni anestetik je treba nanesti na kožo od 15 minut do 3 ure pred posegom, na učinek pa vpliva globina penetracije, ki je omejena (Kumar in sod., 2015).

Lokalna infiltracijska anestezija temelji na principu infiltracije lokalnega anestetika v področje kirurškega posega ali njegovo okolico. Lokalni anestetik lahko apliciramo enkratno ali pa

namestimo kateter, ki omogoča infiltracijo tkiv v daljšem časovnem obdobju (Campoy in Schroeder, 2013). Mogoča je tudi intraartikularna uporaba, ki pa je lahko hondrotoksična (Lerche, 2013).

Intravenska regionalna anestezija, ki je bila opisana že leta 1908, je uporabna zgolj za anestezijo distalnih delov okončin. Temelji na intravenski aplikaciji lokalnega anestetika po namestitvi hemookluzivne obveze, s čimer dosežemo zastoj lokalnega anestetika v distalnem delu okončine (Campoy in Schroeder, 2013).

Pri regionalni anesteziji vnesemo lokalni anestetik v bližino živca in tako začasno blokiramo senzorično, lahko tudi motorično aktivnost živca v med- in pooperacijskem obdobju. Glede na operacijske potrebe je mogoče anestezirati več perifernih živcev in s tem posledično več regij (Campoy in Schroeder, 2013).

Kadar želimo anestezirati večje področje, lahko uporabimo nevraksialno anestezijo, pri kateri lokalni anestetik večinoma apliciramo epiduralno. Če vstopimo v subarahnoidalni prostor, govorimo o intratekalni anesteziji (Lerche, 2013). S pomočjo nevraksialne anestezije lahko pri ljudeh izvedemo nekatere kirurške posege brez splošne anestezije (Sivevski in sod., 2018). Določene kirurške posege je mogoče izvesti zgolj z uporabo perifernih blokov (Jiménez-Almonte in sod., 2015) ali infiltracijo lokalnega anestetika (Li in sod., 2018) in tako doseči primerno analgezijo ter se izogniti neželenim učinkom nevraksialne anestezije.

V veterinarski medicini je uporaba nevraksialne anestezije brez splošne anestezije omejena pretežno na rejne živali, pri katerih se uporablja rutinsko (Skarda in Tranquilli, 2007a). Pri hišnih živalih je nevraksialna anestezija največkrat le del anestehijskega protokola. Izjemoma jo lahko uporabimo pri sediranih živalih (Otero in Campoy, 2013). Najpogostejši neželeni učinki so respiratorni in kardiovaskularni kolaps, tremorji, konvulzije in bruhanje, kar je posledica absorpcije velikih odmerkov lokalnih anestetikov ali nehotene intravaskularne aplikacije lokalnega anestetika. Možen je pojav meningitisa pri vnosu infekta ob punkciji (Skarda in Tranquilli, 2007b).

## 2.7 NEVRAKSIALNA ANESTEZIJA PRI PRAŠIČU

Uporaba nevraksialne anestezije pri sediranih prašičih je dokaj enostavna in jo lahko uporabljamo za kirurške posege v ingvinalnem, umbilikalnem in rektalnem področju (Skarda in Tranquilli, 2007a). Najpogostejše mesto za aplikacijo nevraksialne anestezije leži med 6.

ledvenim in 1. križničnim vretencem. To mesto se uporablja za epiduralno anestezijo (Skarda in Tranquilli, 2007a). Pri prašičih v obdobju rasti sega hrbtenjača bolj kavdalno v križnico (Koenig in sod., 2004) in tako omogoča tudi odvzem cerebrospinalne tekočine in intratekalno aplikacijo (Swindle, 2009). Anatomski orientacijski točki, ki ju uporabljamo za punkcijo v tem predelu, sta črevnična grebena, ki sta najizrazitejši točki v lumbalnem področju in ju uporabimo za identifikacijo prostora med ledvenimi in križnimi vretenci. Mesto punkcije leži kavdalno za linijo, ki povezuje črevnična grebena (Swindle, 2009). Ob medialni punkciji na tem področju prebodemo interarkuatno vez, kar zaznamo kot povečan upor ob prehodu igle. Nato vstopimo v hrbtenični kanal, ki pri 40 kg težkih prašičih leži približno v globini štirih centimetrov (Skarda in Tranquilli, 2007a).

## 2.8 BUPIVAKAIN IN LIPOSOMALNI BUPIVAKAIN

Bupivakain je lokalni anestetik z aminoamidno strukturo in disociacijsko konstanto 8.1. Stopnja vezave na serumske beljakovine je visoka (od 88 do 96 %). V jetrih se presnavlja z glukoronidacijo (Dullenkopf in Borgeat, 2003). Pri živalih ga uporabljamo za perinevrально, infiltrativno in epiduralno aplikacijo. Pri epiduralni aplikaciji je čas do anestetičnega učinka daljši kot pri lidokainu, in sicer 20–30 minut. Bupivakain učinkuje 6–8 ur (Ramsey, 2012), zato je za daljšo pooperacijsko analgezijo potrebna ponovna aplikacija ali uporaba epiduralnih katetrov (Radlinsky in sod., 2005), zaradi česar so začeli razvijati oblike lokalnih anestetikov s podaljšanim delovanjem (Epstein-Barash in sod., 2009).

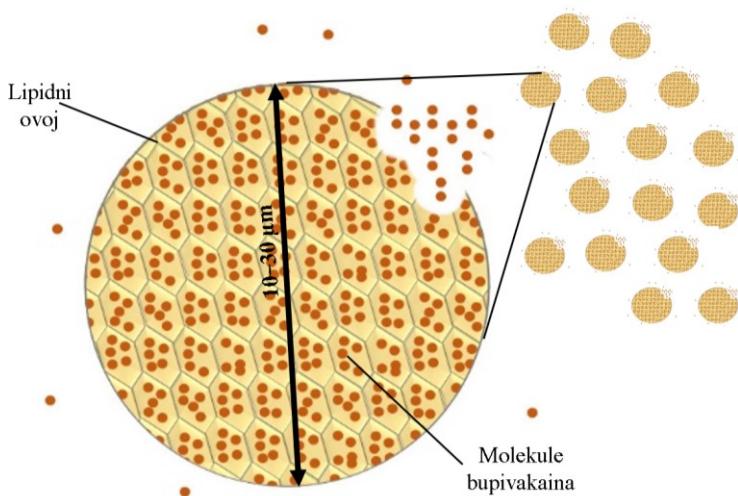
Z namenom podaljšanja učinka bupivakaina so začeli razvijati različne nosilce, na katere je vezan bupivakain. Ti so lahko v obliki polimernih mikrodelcev (Curley in sod., 1996; Padera in sod., 2008; Mcalvin in sod., 2013) ali kirurško implantiranih peletov s postopnim sproščanjem lokalnega anestetika (Masters in sod., 1993; Wang in sod., 2009). Raziskali so tudi lipidno proteinske sladkorne delce (Kohane in sod., 2002; Colombo in sod., 2004), navzkrižno vezano obliko hialuronske kisline (Jia in sod., 2004) in mikrosfere (Kohane in sod., 2003; Patenaude in Hoare, 2012). Neželeni učinki teh oblik nosilcev so tkivne reakcije in sistemska toksičnost ob sproščanju lokalnega anestetika (Kohane in Langer, 2010). Novejše raziskave preučujejo micelarne oblike (Weldon in sod., 2018). Bupivakainu ob aplikaciji dodajajo tudi zdravila, na primer deksametazon ali deksmedetomidin, ki lahko podaljšata učinek (Dräger in sod., 1998; Kopacz in sod., 2003; Rwei in sod., 2018).

V nasprotju s standardno obliko bupivakaina oblike s podaljšanim sproščanjem podaljšajo senzorični blok in zaradi postopnega sproščanja aktivne učinkovine zmanjšajo nevarnost akutnih sistemskih neželenih učinkov. Na drugi strani se lahko zaradi podaljšane izpostavljenosti tkiv pokažejo lokalni nevro- in miotoksični učinki (Epstein-Barash in sod., 2009).

Liposomalni bupivakain (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) je bupivakain, ki je inkapsuliran v multivezikularnih liposomih, ki izboljšajo stabilnost pripravka, podaljšajo delovanje in zmanjšajo sistemsko nevro- in kardiotoksičnost (Kohane in Langer, 2010; Chahar in Cummings, 2012).

Liposomalni bupivakain je s strani Zvezne agencije za prehrano in zdravila Združenih držav Amerike odobren za infiltracijo v mehka tkiva in interskaleni blok pri ljudeh (Balocco in sod., 2018; Pacira Pharmaceuticals, 2018).

Za inkapsulacijo bupivakaina uporablja tehnologijo DepoFoam (Depofoam, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA), ki je patentirana oblika nosilca zdravilnih učinkovin (Mantripragada, 2008) in je sestavljena kot vodna suspenzija multivezikularnih liposomov velikosti 10–30 µm, organiziranih v nekoncentrični obliki kot satje (Chahar in Cummings, 2012). Vsak vezikel je obdan z lipidnim dvoslojem, ki zagotavlja mehansko stabilnost in postopno sproščanje aktivne učinkovine. Ko zunanji liposomi počijo, se inkapsulirana vsebina sprosti in lipidne membrane preostalih liposomov se reorganizirajo. Liposomi se tako zaporedoma povečajo in pokajo, dokler se vsa inkapsulirana učinkovina postopoma ne sprosti (Slika 4) (Richard in sod., 2011; Bramlet in sod., 2012).



Slika 4: Shematska zgradba liposomalnega bupivakaina

Figure 4: Schematic liposome bupivacaine structure

Tehnologija inkapsulacije aktivne učinkovine se ne uporablja le pri lokalnih anestetikih, temveč tudi pri učinkovinah, kot sta morfin in citarabin, ter drugih protibakterijskih, protivirusnih, protineoplastičnih in peptidnih učinkovinah (Angst in Drover, 2006). Inkapsulacija aktivne učinkovine v liposome omogoča nižjo plazemsko koncentracijo aktivne učinkovine v daljem časovnem obdobju (Chahar in Cummings, 2012).

Del bupivakaina v liposomalnem pripravku je v prosti, neinkapsulirani obliki, ki omogoča hiter učinek. Inkapsulirani bupivakain, ki se sprošča do 96 ur po aplikaciji, pa omogoča podaljšanje učinka (Ilfeld, 2013; Hu in sod., 2013; Viscusi in sod., 2012).

Čeprav nekateri avtorji ugotavljajo, da uporaba liposomalnega bupivakaina pri artroplastikah kolena v primerjavi s konvencionalnimi protibolečinskimi protokoli ne izboljša analgezije (Schwarzkopf in sod., 2016; Kuang in sod., 2017), drugi potrjujejo boljšo analgetično oskrbo pri uporabi liposomalnega bupivakaina pri kirurških posegih, kot je odstranitev hemoroidov, in pri korekcijah deformacij palca (Beiranvand in Moradkhani, 2017). V primerjavi z neinkapsuliranim bupivakainom liposomalni bupivakain dalj časa zagotavlja analgezijo, obenem pa zmanjša slabost po uporabi opioidov za 18,3 % (Yu in sod., 2018). Drugače trdi raziskava, pri kateri funkcionalno okrevanje in protibolečinska oskrba po uporabi liposomalnega bupivakaina pri artroplastikah kolena v primerjavi s periatrikularno infiltracijo bupivakaina ob souporabi multimodalne analgezije nista izboljšana (Kuang in sod., 2017).

Trenutno je uporaba liposomalnega bupivakaina omejena pretežno na infiltracijo kirurške rane (Hamilton in sod., 2017; Wang in sod., 2017), ki omogoča učinkovito analgezijo in manjšo porabo opioidnih analgetikov do 72 ur po aplikaciji (Golf in sod., 2011; Richard in sod., 2011; Bramlet in sod., 2012; Hamilton in sod., 2016). Liposomalni bupivakain je že bil učinkovit pri interskalenskih (Vandepitte in sod., 2017) in medrebrnih blokadah (Kopacz in sod., 2003; Rice in sod., 2015), blokadah stelatnega ganglija (Ferrillo, 2016), blokih prečne trebušne mišice (TAP, angl. *transversus abdominis plane block*) (Stokes in sod., 2017), drugih blokadah perifernih živcev (Mcalvin in sod., 2014; Damjanovska in sod., 2015; Hamilton in sod., 2016), epiduralni aplikaciji (Boogaerts in sod., 1994; Viscusi in sod., 2012; Malik in sod., 2017) in intraartikularni aplikaciji (Shaw in sod., 2017; Knych in sod., 2018).

Liposomalni bupivakain kaže po aplikaciji bimodalno farmakokinetiko s hitro absorpcijo in podaljšanim sproščanjem. Pri tem je hitrost sistemske absorpcije odvisna od celokupnega odmerka, mesta aplikacije in prekrvljenosti področja. Sistemski neželeni učinki so slabost, povisana telesna temperatura, edem na mestu aplikacije, hipotenzija in bruhanje (Hu in sod., 2013). Po topikalni aplikaciji 532 mg liposomalnega bupivakaina pri artroplastikah kolena pri človeku je maksimalna plazemska koncentracija 935 ng/ml (Bramlet in sod., 2012), kar je pod mejno vrednostjo 2000–4000 ng/ml, pri kateri pričakujemo nevro- ali kardiotoksičnost (Jorfeld in sod., 1968; Bardsley in sod., 1998; Hu in sod., 2013). Maksimalni dovoljeni odmerek pri odraslem človeku je 266 mg ali 20 ml 1,33%- liposomalnega bupivakaina (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., CA, ZDA).

Postopno sproščanje in s tem nižja raven aktivne učinkovine pripomoreta k zmanjšanju neželenih učinkov po aplikaciji v primerjavi z uporabo neinkapsulirane oblike bupivakaina (Hu in sod., 2013). Možno nevrotoksičnost liposomalnega bupivakaina so ugotavljali na podlagi tkivne infiltracije (Golf in sod., 2011; Bramlett in sod., 2012) in perinevralne aplikacije (Richard in sod., 2012; Mcalvin in sod., 2014; Damjanovska in sod., 2015; Damjanovska in sod., 2018); v nobeni raziskavi ni bilo ugotovljenih znakov toksičnosti. Podatkov o nevrotoksičnosti pri nevraksialni aplikaciji je malo (Joshi in sod., 2015; Zel in sod., 2018).

Glede na trajanje senzoričnega bloka (Golf in sod., 2011; Bramlet in sod., 2012; Hamilton in sod., 2016) je liposomalna formulacija bupivakaina privlačna alternativa pooperacijske analgetične oskrbe pacienta v primerjavi s sistemskimi analgetiki in uporabo katetrov za dovajanje lokalnih anestetikov.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Raziskavo je odobrila Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (odločbe U34401-20/2016/4, U34401-20/2016/9 in U34401-20/2016/13). V raziskavo smo vključili 25 prašičev (*Sus scrofa domesticus*) ženskega spola, križancev med pasmama landras in veliki beli, s ciljno telesno maso okrog 40 kilogramov. Telesno maso smo ocenili na podlagi meritve obsega prsnega koša. Dolžino hrbtenice smo ocenili z merjenjem od nuhalnega grebena do baze repa v bočni nevtralni legi. Vse živali so izvirale iz iste komercialne reje s certificiranim zdravstvenim statusom. Prašiči so bili vzrejeni v skladu z direktivo Sveta 2008/120/ES, ki določa minimalne pogoje za zaščito prašičev. Oskrba živali in postopki v raziskavi, so bili v skladu z nacionalno in evropsko zakonodajo.

Prašiče smo vhlevili v bokse s slamnatim nastiljem. V posamezni boks smo zaradi boljšega kliničnega nadzora in preprečevanja poškodb namestili od 2 do 3 prašiče, ki so že predhodno bivali v istem boksu. Temperaturo in vlažnost hleva smo merili najmanj enkrat dnevno ob podobnem času. Temperatura je bila med 20 °C in 28 °C (povprečna temperatura  $24,6 \pm 2,0$  °C), relativna vlaga pa med 57 % in 82 % (povprečna relativna vlaga  $68,7 \pm 5,6$  %).

Prašiči so dvakrat dnevno dobili briketirano krmno mešanico BEK – 1 (Jata Emona, Ljubljana) in nekaj žlic marmelade, ki smo jo uporabljali kot priboljšek za lažje izvajanje kliničnih pregledov. Vodo so imeli na razpolago neomejeno. Med poskusom so bili prašiči izpostavljeni naravnemu dnevno-nočnemu ciklu osvetlitve z izjemo prvih 48 ur, ko smo v enournih intervalih ocenjevali njihov nevrološki status. Vse prašiče smo vhlevili najmanj 48 ur pred začetkom poskusa in 12 ur pred prvo anestezijo opravili osnovni klinični ter nevrološki pregled. Telesno temperaturo smo spremljali na podlagi kožne temperature, merjene z infrardečim termometrom (Beurer medical FT 90, Ulm, Germany). Uporabili smo nastavitev merjenja temperature površine. Meritve smo izvajali na pobritem področju, na katerem smo opravili punkcijo cerebrospinalne tekočine. Temperaturo smo merili trikrat v času 30 sekund in aritmetično sredino izmerjenih vrednosti izrazili kot kožno temperaturo. Temperaturo smo beležili pri vseh skupinah enkrat dnevno ob pregledih od drugega dneva po intratekalni aplikaciji testne učinkovine do konca poskusa.

Klinično smo prašiče ocenjevali enkrat dnevno oziroma so klinični pregledi sovpadali z nevrološkimi pregledi.

### 3.2 IZVEDBA POSKUSA

Prašiče smo premedicirali z midazolatom 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma GmbH, Avstrija), butorfanolom 0,5 mg/kg (Butomidor, Richter Pharma AG, Avstrija) in ketaminom 10 mg/kg (Narketan, Vetoquinol UK Ltd, VB). Vse učinkovine smo odmerili v isto brizgo in zdravila aplicirali intramuskularno v vratne mišice. Sedirane prašiče smo namestili v nevralno levostransko bočno lego z iztegnjenim vratom. Za uvod in vzdrževanje anestezije smo uporabili izofluran (Forane, Abbott Laboratories, ZDA) v kisiku, ki smo ga dovajali preko modificirane anesteziskske maske za pse. Modifikacija je zajemala odstranitev tesnilne gume in menjavo z manšeto iz lateks kirurške rokavice, s čimer smo zmanjšali uhajanje anesteziskskih plinov ob maski. Med anestezijo smo spremljali frekvenco dihanja, delni tlak CO<sub>2</sub> na koncu izdiha (EtCO<sub>2</sub>), frekvenco pulza in nasičenost hemoglobina s kisikom (SpO<sub>2</sub>) (LifeVet CP, Eickemeyer, Nemčija), elektrokardiogram (M7000, Guangdong Biolight Meditech, Zhuhai, Kitajska) ter s pomočjo Dopplerjevega meritca (Model 811, Parks Medical Electronics, Beaverton, Oregon, ZDA) neinvazivno merili krvni tlak. V marginalno ušesno veno smo vstavili venski kateter 20 G (BD Venflon; Becton Dickinson Infusion Therapy AB, ZDA), preko katerega smo odvzeli vzorec krvi in med anestezijo dovajali Hartmanovo raztopino (B. Braun, Meslungen, Nemčija) v odmerku 10 ml/kg/h.

Za potrebe odvzema cerebrospinalne tekočine smo kožo obrili in očistili s tekočim milom (Aniosafe Manuclear NPC HF, Laboratorie Anios, Francija), jo sprali z vodo, osušili in razkužili (Cutasept F, Bode, Nemčija).

Za odvzem cerebrospinalne tekočine in aplikacijo testnih učinkovin smo kot punkcijsko mesto določili križišče longitudinalne osi hrbtenice in osi, ki namišljeno povezuje črevnična grebena (Slika 5).



Slika 5: Orientacijske točke za intratekalno aplikacijo testnih učinkovin

Figure 5: Orientation points for the intrathecal administration of tested substances

Spinalno iglo debeline 22 G in dolžine 7,5 cm (Becton-Dickinson, ZDA) smo zabodli na stičišču linij in nadaljevali z uvajanjem igle v kranialni smeri. Pri tem nam je pomagal asistent, ki je usločil hrbtenico s pomočjo vleka zadnjih nog v kranialno smer. Z vbodom smo nadaljevali do pojava cerebrospinalne tekočine v konusu igle in pustili, da prosto kaplja v sterilno polipropilensko konično epruveto. Prve kapljice cerebrospinalne tekočine smo zavrgli z namenom zmanjšanja krvne kontaminacije vzorca. Prašičem smo odvzeli do 3 ml cerebrospinalne tekočine (Slika 6).



Slika 6: Prikaz odvzema cerebrospinalne tekočine

Figure 6: Presentation of cerebrospinal fluid puncture

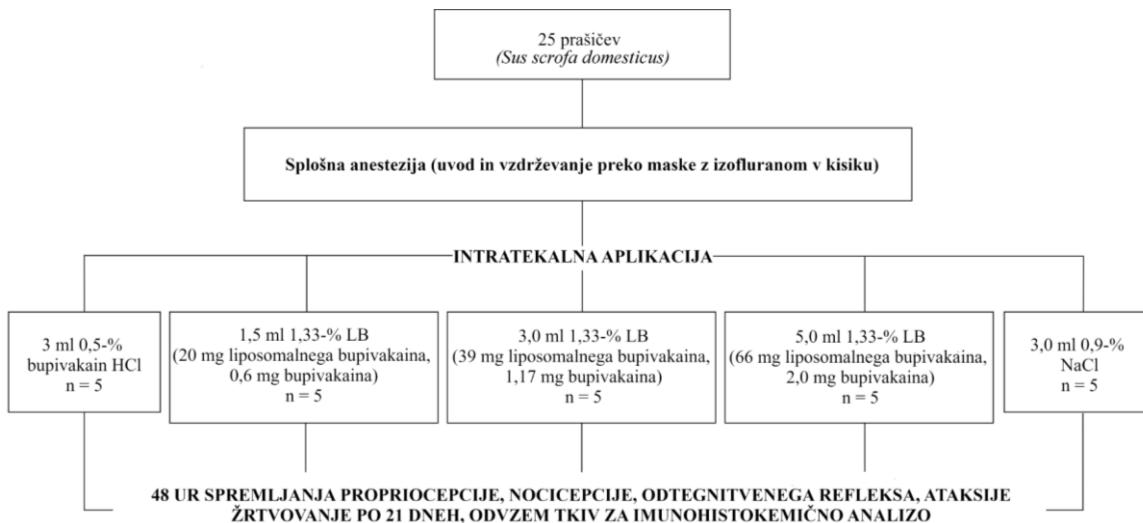
Po odvzemu cerebrospinalne tekočine smo prašičem intratekalno aplicirali eno od naslednjih učinkovin:

1. negativna kontrola, 3 ml 0,9-% NaCl (B. Braun, Meslungen, Nemčija),
2. pozitivna kontrola, 3 ml 0,5%-bupivakain HCl (Marcain Spinal, AstraZeneca UK Limited, VB),
3. 1,5 ml 1,33%-liposomalni bupivakain (Depo Foam Bupivacaine; Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) (vsebuje 20 mg LB in 0,6 mg bupivakaina),
4. 3 ml 1,33%-liposomalni bupivakain (vsebuje 39 mg LB in 1,17 mg bupivakaina),
5. 5 ml 1,33%-liposomalni bupivakain (vsebuje 66 mg LB in 2 mg bupivakaina).

Izbira učinkovine je bila naključna, določili smo jo z žrebom zaprtih kuvert. Tako smo v poskusu dobili pet skupin s petimi osebki.

Po intratekalni aplikaciji testne učinkovine smo prašiče prebudili iz anestezije. Nevrološki status je ocenjeval opazovalec, ki ni vedel, katero učinkovino so prašiči prejeli. Prvih dvanajst ur smo prašiče nevrološko ocenjevali v enournih intervalih, naslednjih 36 ur pa vsake 4 ure. Po 48 urah smo jih nevrološko ocenili enkrat dnevno do 21. dneva po aplikaciji testne učinkovine.

Zadnji dan poskusa smo prašiče anestezirali na enak način kot prvič in jim odvzeli vzorce cerebrospinalne tekočine in venske krvi. Po odvzemu smo prašiče evtanazirali s pripravkom T-61 (Hoechst Rousset Vet, Francija) v odmerku 0,3 ml/kg intravensko (Slika 7).



Slika 7: Organigram poskusa

Figure 7: Organigram of the experiment

Legenda: LB – liposomalni bupivakain  
Legend: LB – liposome bupivacain

Pri intratekalni aplikaciji lokalnega anestetika lahko pride do zastoja dihanja ali paralize. V tem primeru je bila v skladu z dovoljenjem za izvajanje poskusov predvidena predčasna evtanazija, ki bi jo izvedli takoj ob zaznavi zastoja dihanja. Vzrok za evtanazijo bi bila tudi nezmožnost hoje, ki bi trajala več kot 12 ur, ali pojav hujših poškodb, ki bi bile posledice ataksije po aplikaciji testnih učinkovin. Ob pojavu motenj v mikturiciji je bila predvidena kateterizacija s Foleyevim katetrom.

### 3.3 NEVROLOŠKA OCENA

Pred poskusom in po aplikaciji testne učinkovine smo vse prašiče nevrološko pregledali. Nevrološki pregled je vključeval oceno zavora dihanja, nadzor akta uriniranja in pregled propriocepcije, odtegnitvenega refleksa, nocicepcije in ataksije na vseh štirih nogah. V prvih dvanajstih urah po aplikaciji testne učinkovine smo prašiče nevrološko pregledali vsako uro,

od 12 do 48 ur po aplikaciji testne učinkovine pa smo preglede združili v štiriurne intervale, kar pomeni, da je bil prašič pregledan v štiriurnem intervalu. Nevrološko stanje sta ocenjevala dva ocenjevalca, ki sta ocene uskladila s skupnim opazovanjem.

Propriocepциjo (percepcija oziroma zavedanje gibanja telesa) smo ocenjevali s postavitveno reakcijo. Pri tej smo spodbili nogo in postavili dorzalni del prstov na tla. Ocenjevali smo odmak noge in postavitev noge v fiziološko lego. Živali pri tem nismo fizično fiksirali, ob spodbijanju noge smo poskusili nuditi le oporo telesu. Postavitveno reakcijo smo ocenili z 0, kar je primerna reakcija, pri kateri žival ob upogibu in postavitvi dorzalnega distalnega dela noge na tla položaj nemudoma popravi. Pri oceni –1 je reakcija upočasnjena oziroma žival potrebuje dalj časa, da nogo vrne v fiziološki položaj. Pri oceni –2 je postavitvena reakcija odsotna, žival ne vrne noge v fiziološki položaj (Jaggy in Spiess, 2010).

Odtegnitveni refleks je segmentalni hrbtenjačni refleks, pri katerem žival ob nežnem pritisku odmakne nogo. Z nežnim pritiskom s prsti smo stisnili dorzalno površino četrtega prsta prašiča in ocenjevali odziv. Z 0 smo ocenili primerno reakcijo, pri kateri žival hitro in s primerno močjo odmakne nogo. Z –1 smo ocenili upočasnjeno reakcijo, pri kateri žival odmakne nogo počasneje in z manjšo silo. Pri oceni –2 je reakcija odsotna, ob dražljaju žival ne odmakne noge (Jaggy in Spiess, 2010).

Nocicepcija oziroma zaznava globinske bolečine je preizkus, pri katerem smo s prijemalko po Peantu močno stisnili dorzalno površino četrtega prsta. Pri tem nismo ocenjevali odmika okončine, temveč znake izražanja bolečine, kot sta vokalizacija in spremembra obrazne mimike. Z oceno 0 smo ocenili primerno reakcijo oziroma zaznavanje bolečine. Pri stisku s prijemalko je prašič vokaliziral in se burno odzval. Pri oceni –1 je bila reakcija slabše izražena, vokalizacija ni bila intenzivna in odziv ni bil izrazit. Pri oceni –2 reakcije ni bilo, prašič se, ne glede na moč pritiska, ni odzval (Jaggy in Spiess, 2010).

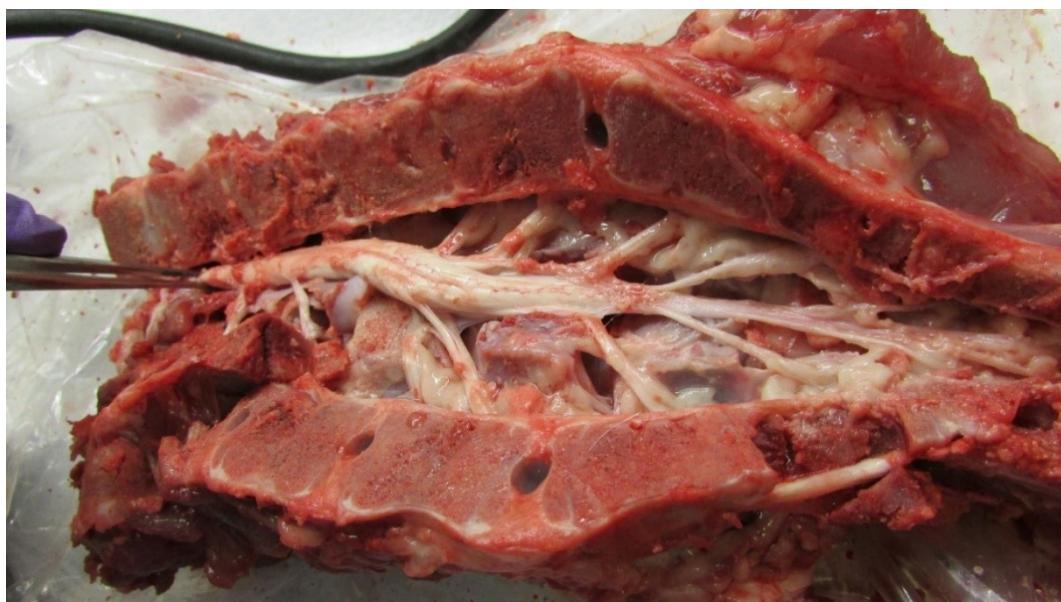
Ataksijo smo ocenjevali kot zmožnost in koordinacijo hoje. Pri tej oceni smo prašiča zgolj opazovali in ocenjevali njegovo gibanje. Pri blagih spremembah smo prašiče izpustili iz boksov; tako so se lahko prosto gibali, zato je bilo lažje opaziti subtilne spremembe. Ataksijo smo ocenjevali z 1, kar je pomenilo neambulatorno stanje, pri katerem žival ni bila sposobna samostojno stati ali hoditi. Ocena 2 je pomenila izrazite motnje v koordinaciji in zanašanje

zadnjega dela telesa. Z oceno 3 smo ocenili blage motnje v koordinaciji in hoji. Pri oceni 4 ni bilo odstopanj od normalnega vzorca gibanja (Damjanovska in sod., 2015).

V končni obdelavi in predstavitevi podatkov smo ocene nevroloških parametrov, pri katerih nismo opazili odstopanj, kljub podrobnejšemu gradiranju predstavili le kot spremenjene in normalne.

### 3.4 HISTOPATOLOŠKE PREISKAVE

Histopatološko preiskavo smo opravili na vzorcih, ki smo jih odvzeli 21. dan po aplikaciji testnih učinkovin. Po žrtvovanju prašičev smo odvzeli hrbtenjačo z ovojnicami osrednjega živčevja z lumbalnega in torakalnega področja ter vzorce kavde ekvine v prečnem prerezu (Slika 8). Vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku ali jih pripravili za vlaganje v Epon (Stopar-Pintaric in sod., 2013; Damjanovska in sod., 2015).



Slika 8: Hrbtenjača na prehodu v kavdo ekvino

Figure 8: Spinal cord on the transition to the cauda equina

Zamrznjene vzorce hrbtenjače z ovojnicami osrednjega živčevja in kavdo ekvino smo narezali na 7-10 mikronske rezine. Obarvali smo jih s hematoksilinom in eozinom.

Rezine zamrznjenih vzorcev smo uporabili tudi za imunohistokemično barvanje limfocitov T. Vse postopke, razen inkubacije s primarnimi protitelesi, smo opravili pri sobni temperaturi. Preparate smo eno uro sušili na zraku in jih po desetih minutah v 100%- ledenem acetonu

evaporirali 5 minut. Nato smo jih spirali tri krat po pet minut s fiziološko raztopino, puferirano s fosfatom (PBS). Vsa nadaljnja spiranja so potekala enako. Po nanosu proteinskega blokatorja sistema Novolink (Protein Block, RE7150-K, Leica Biosystems, Buffalo Grove, ZDA) smo preparate ponovno sprali. Sledilo je inkubiranje z anti-CD3 epsilon protitelesi (MCA5951GA, Bio-Rad Laboratories Inc, Kalifornija, ZDA) v razredčitvi 1:200 pri 4 °C čez noč. Po inkubaciji smo preparate sprali in za 30 minut nanesli peroksidazni blok (Peroxidase Suppressor, 35000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA), ponovno sprali in nanesli pripravek Post Primary Block sistema Novolink (RE7150-K, Leica Biosystems, Buffalo Grove, ZDA). Po ponovnem spiranju je sledil nanos pripravka DAB Chromogen sistema Novolink (RE7150-K, Leica Biosystems, Buffalo Grove, ZDA). Tako pripravljeni preparate smo sprali, dehidrirali in pokrili.

Imunohistokemično reakcijo smo preverjali s pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo prisotnosti limfocitov T smo uporabili priželjc prašiča. Pri negativni kontroli smo primarna protitelesa nadomestili s PBS ali tris-EDTA. Število imunopozitivnih celic smo izrazili s povprečnim številom na kvadratni milimeter. Pri vsakem prašiču je bil pri štirikratni povečavi na treh rezinah izmerjen celoten areal živca tako, da smo obkrožili zunanji epinevrij v programu Ellipse (ViDiTo, version 2.0.7.1, 2004, Košice, Slovaška), ki je izračunal površino. V vsakem obkroženem živcu smo prešteli imunopozitivne celice.

Vzorce kavde ekvine, vložene v Epon, smo fiksirali z raztopino Karnovsky II (2,5-% glutaraldehid, 4,0-% paraformaldehid in 0,1 M natrijev kakodilat, pH 7,4). V naslednjem koraku smo vzorce fiksirali z 1 : 1 raztopino iz 2-% osmijevega tetroksida in 3-% kalijevega ferocianida. Sledila je dehidracija v raztopinah z etanolom in propilen oksidom ter infiltracija z zmesjo Epon. Tako fiksirane preparate smoobarvali s toluidinskim modrilom in jih pregledali pod mikroskopom (Eclipse E800; Nikon, Tokio, Japonska). Sliko smo zajeli z digitalno kamero (DXM1200F; Nikon, Tokio, Japonska).

S histomorfometrično analizo smo v živcih kavde ekvine ocenjevali delež živčnega in neživčnega tkiva. Analizo smo opravili s pomočjo programa Ellipse. Pri tem smo na nizki povečavi obrobili zunanjo mejo živčnih fasciklov. Naključno smo v preparatu izbrali tri fascikle, ki smo jih ocenili pod veliko povečavo. Pri tem smo obrobili zunanjo mejo živčnega vlakna in notranjo mejo mielina. S pomočjo programa za morfometrično analizo smo določili:

1. delež živčnega tkiva,

2. numerično gostoto živčnih vlaken,
3. numerični delež velikih mieliniziranih živčnih vlaken,
4. arealni delež velikih mieliniziranih vlaken,
5. premer velikih mieliniziranih vlaken,
6. premer aksonov,
7. debelino mielina,
8. G-razmerje, ki je razmerje med premerom aksona in debelino debelih vlaken in je indikator mielinizacije.

Število vnetnih celic smo prešteli v vidnem polju na tkivnih rezinah, ki smo jih imunohistokemično barvali.

Morfometrično analizo je opravila oseba (prof. dr. Erika Cvetko), ki ni bila seznanjena s podatkom, katero učinkovino smo aplicirali prašiču.

### 3.5 KRVNE ANALIZE IN ANALIZA CEREBROSPINALNE TEKOČINE

#### 3.5.1 Krvne analize

Prašičem smo ob prvi in drugi anesteziji odvzeli do 10 ml venske krvi za hematološke in osnovne biokemijske preiskave.

Vzorce krvi v epruvetah EDTA smo analizirali s hematološkim analizatorjem ADVIA 120 (Siemens Healthcare, Nemčija) ter določili število eritrocitov, trombocitov in levkocitov z diferencialno belo krvno sliko. Vzorce krvi v serumskih epruvetah smo centrifugirali 10 minut na 1300 g. Serum smo nato analizirali z biokemičnim analizatorjem (RX-Daytona, Randox, VB). Pri prvem odvzemu smo določili naslednje parametre: sečnina, kreatinin, celokupne beljakovine in albumini. Pri drugem odvzemu smo določili le celokupne beljakovine in albumine.

#### 3.5.2 Analiza cerebrospinalne tekočine

Cerebrospinalno tekočino smo vzorčili v sterilne konične polipropilenske epruvete brez dodatkov z navojnim zapiranjem, pri čemer smo pri odvzemu zavrgli nekaj začetnih kapljic likvorja. Odvzeli smo do 3 ml likvorja na žival in ga začeli analizirati v času od 30 do 60 minut

po odvzemu. Vse vzorce smo organoleptično pregledali, določili število nukleiranih celic in celokupno število celic. Opravili smo tudi citološko diferenciacijo v citocentrifugi pripravljenih preparatov (Kobe in Flisar, 2004).

### *3.5.2.1 Organoleptični pregled*

Pri organoleptičnem pregledu smo ocenili motnost cerebrospinalne tekočine. Motnost smo ocenili na lestvici od 0 do 4 (Tabela 1) (Kobe in Flisar, 2004).

Tabela 1: Ocena motnosti cerebrospinalne tekočine

Table 1: Turbidity estimation of cerebrospinal fluid

Ocena	Opis
<b>0</b>	Bistra cerebrospinalna tekočina
<b>1</b>	Opazna motnost v primerjavi z vodo
<b>2</b>	Motnost dopušča branje besedila skozi epruveto
<b>3</b>	Motnost otežuje branje skozi epruveto
<b>4</b>	Motnost onemogoča branje skozi epruveto

Obarvanja cerebrospinalne tekočine nismo ocenjevali z barvo, temveč smo samo označili prisotnost obarvanja, kot je navedeno v Tabeli 2.

Tabela 2: Ocena obarvanosti cerebrospinalne tekočine

Table 2: Estimation of cerebrospinal fluid colour

Ocena	Opis
<b>0</b>	Brez obarvanja
<b>1</b>	Prisotno obarvanje

### 3.5.2.2 Število nukleiranih celic

Za določitev števila nukleiranih celic v cerebrospinalni tekočini smo le-te obarvali s kislo raztopino fenolnega fuksina po Deemeju. Uporabili smo 100 µl cerebrospinalne tekočine in 10 µl barvila. Za štetje smo uporabili komoro po Fuchs-Rosenthalu, na katero smo namestili krovno steklo, pod njega s pipeto nanesli suspenzijo cerebrospinalne tekočine in barvila ter počakali nekaj minut, da so celice v komori sedimentirale na steklo. Pri štetju celic smo upoštevali osnovna načela izločevanja in vključevanja celic, ki se dotikajo stranic kvadratkov, in pod 200 ali 400-kratno povečavo prešteli celice v vseh velikih kvadratih Fuchs-Rosenthalove komore. Ta je sestavljena iz 16 velikih kvadratov po 1 mm<sup>2</sup>, od teh je vsak razdeljen na 16 manjših s stranico 0,25 mm in ploščino 0,0625 mm<sup>2</sup>. Globina komore je 0,2 mm. Število nukleiranih celic na µl smo tako izračunali po formuli:

$$\text{število delcev v } \mu\text{l} = \frac{\text{število preštetih delcev}}{\text{prešteta površina v } \text{mm}^2 \times \text{globina komore v mm} \times \text{razredčitev}} \quad [1]$$

Če formulo poenostavimo, lahko število preštetih nukleiranih celic delimo s 3 in število izrazimo v 10<sup>6</sup>/l (Kobe in Flisar, 2004).

### 3.5.2.3 Celokupno število celic

Celokupno število celic smo določali v komori po Bürker-Türku. Pri štetju celic smo upoštevali osnovna načela izločevanja in vključevanja celic, ki se dotikajo stranic kvadratkov. Pod 200 ali 400-kratno povečavo smo prešteli celice na določeni površini in z enako formulo, kot smo jo uporabili za izračun števila nukleiranih celic, izračunali celokupno število celic v µl (Kobe in Flisar, 2004).

### 3.5.2.4 Citološko diferenciranje

V nastavek za citocentrifugo (Centric 250, Domel, Slovenija) smo odmerili 300 µl cerebrospinalne tekočine. Centrifugirali smo 10 minut pri hitrosti 60 x g (Kobe in Flisar, 2004). Po centrifugiranju smo preparat posušili na zraku in ga fiksirali pet minut v metanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA). Po fiksaciji smo pripravili raztopino may gruenwald giemse (Merck,

Kenilworth, ZDA), in sicer 20 kapljic raztopine v 10 ml destilirane vode. Barvilo smo nanesli na preparat in inkubirali 30 minut. Vse preparate smo po barvanju in sušenju v digestoriju namočili za eno minuto v ksitol, na preparat nanesli smolo (Thermo Scientific, Shandon, Xylene Substitute, Waltham, ZDA) in prekrili s krovnimi stekelci. Preparate smo pregledali pod mikroskopom (Nikon eclipse Ni, Tokio, Japonska) in jih fotografirali (Nis elements, Nikon, Tokio, Japonska). Pri diferenciaciji smo določali odstotek nevtrofilcev in limfocitov (te smo šteli v lastno kategorijo) ter enojedrnih celic (makrofagi, celice horoidnega pleteža, ependimske celice in celice ovojnega osrednjega živčnega sistema).

### 3.5.3 Biokemijske preiskave

Po pripravi vzorca za štetje celic in diferenciacijo smo preostanek cerebrospinalne tekočine centrifugirali 10 minut na 700 x g. Supernatant smo analizirali z biokemijskim analizatorjem (RX-Daytona, Randox, VB) ter določili vsebnost glukoze in celokupnih proteinov, za katere smo uporabili pirogalol test kit (kataloška številka 1570). Test ima minimalno detekcijsko mejo 0,022 g/l in linearno distribucijo do 2,14 g/l. Preostanek vzorca cerebrospinalne tekočine smo skladiščili na -80 °C.

## 3.6 STATISTIČNA OBDELAVA

Histopatolološke parametre smo statistično obdelali s programom Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS, ver. 22, Chicago, IL, 2013). Moč studije pri oceni histopatololoških parametrov je bila večja od 0,8 (Stopar-Pintarič in sod., 2013). Histopatološke parametre smo analizirali z analizo variance in naknadno naredili Bonferonijev preizkus.

Nevrološke parametre smo podali deskriptivno, odstopanja smo povzeli s prisotnostjo ali odsotnostjo nevroloških znakov. Telesno maso prašičev in izmerjeno dolžino hrbtnice prašičev smo izrazili kot povprečno vrednost s standardnim odklonom.

Odstopanje preiskovanih hematoloških parametrov in parametrov cerebrospinalne tekočine od referenčnega območja smo izrazili v odstotkih. Skupine smo med seboj primerjali z analizo variance, v primeru nepravilne razporeditve podatkov, ki smo jo potrdili s testom normalne porazdelitve Shapiro Wilk, smo uporabili Kruskal-Wallisov test. Primerjavo vrednosti

parametrov pred poskusom in po njem smo ob pravilni razporeditvi podatkov opravili s parnim t-testom. Ob nepravilni razporeditvi podatkov smo uporabili Wilcoxonov test predznačenih rangov. Primerjavo količine limfocitov in nevrofilcev med krvno kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci cerebrospinalne tekočine smo opravili z Mann-Whitneyevim testom. Pri vseh statističnih izračunih smo kot značilno upoštevali vrednost  $p < 0,05$ .

Rezultate smo prikazali s srednjo vrednostjo in standardnim odklonom ali mediano in kvartilnim razmikom pri velikih nihanjih preiskovanih parametrov.

Statistično analizo v zgornjem odstavku naštetih parametrov smo izvedli s programom SigmaPlot for Windows version 11.0 (Systat software GMBH, Erkrath, Nemčija).

## 4 REZULTATI

Vseh 25 prašičev je zaključilo poskus. Na začetku poskusa so tehtali povprečno  $36,2 \pm 4,4$  kg, dolžina hrbtenice od nuhalnega grebena do baze repa v bočni nevtralni legi je bila  $77,9 \pm 5,6$  cm. Telesna masa in izmerjena dolžina hrbtenice sta se do konca poskusa povečali na  $46,9 \pm 4,1$  kg oziroma  $85,9 \pm 3,2$  cm.

Noben prašič na začetku poskusa ni ob pregledu šepal ali kazal nevroloških odstopanj. Pri posameznih prašičih smo opazili posamezne majhne kožne odrgnine in blag serozni izcedek iz nosa ali oči. Vsi prašiči so bili odzivni, apetit je bil primeren.

### 4.1 HEMATOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE PREISKAVE KRVI

Na začetku poskusa smo pri 40 % prašičev diagnosticirali levkocitozo (referenčna vrednost  $11,3\text{--}22,8 \times 10^9/l$ ), znižan hematokrit jih je imelo 60 % (referenčna vrednost 0,311–0,459), trombocitozo smo diagnosticirali pri 56 % prašičev (referenčna vrednost  $138,2\text{--}467,8 \times 10^9/l$ ) (Tabela 3). Na koncu raziskave je imelo levkocitozo 12 %, znižan hematokrit 52 %, trombocitozo pa 36 % prašičev. Število levkocitov je bilo na koncu poskusa, ne glede na prejeto testno učinkovino, značilno nižje ( $p < 0,001$ ). Značilno znižanje na koncu poskusa smo, ne glede na prejeto testno učinkovino, opazili tudi pri številu limfocitov ( $p < 0,001$ ), eozinofilcev ( $p = 0,015$ ) in trombocitov ( $p = 0,002$ ) (Tabela 4).

Koncentracija celokupnih beljakovin na začetku in koncu poskusa se ni značilno razlikovala. Na koncu poskusa smo, ne glede na prejeto testno učinkovino, ugotovili značilno povečanje ( $p < 0,001$ ) koncentracije albuminov in zmanjšanje koncentracije globulinov ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

Tabela 3: Vrednosti izbranih hematoloških parametrov pri prvem odvzemu (povprečje ± SD)

Table 3: Values of selected hematological parameters at the first sampling (average ± SD)

Skupina	Št. levkocitov	Št.	Hematokrit	Št. trombocitov	Št.	Št. limfocitov
	(x 10 <sup>9</sup> /l)	eritrocitov (x 10 <sup>12</sup> /l)	(l/l)	(x 10 <sup>9</sup> /l)	nevtrofilcev (x 10 <sup>9</sup> /l)	(x 10 <sup>9</sup> /l)
<b>NaCl 0,9-%</b>	23,18 ± 4,43	5,73 ± 0,65	0,30 ± 0,03	520,60 ± 127,94	7,72 ± 3,81	13,52 ± 1,87
<b>Bupi 3 ml</b>	20,66 ± 5,25	5,82 ± 0,71	0,30 ± 0,04	551,40 ± 180,32	5,71 ± 2,74	12,94 ± 3,30
<b>LB 1,5 ml</b>	18,67 ± 4,77	5,56 ± 0,60	0,29 ± 0,03	586,40 ± 177,28	6,91 ± 4,47	10,41 ± 2,04
<b>LB 3,0 ml</b>	26,29 ± 6,67	6,08 ± 0,77	0,31 ± 0,05	541,80 ± 126,69	11,81 ± 3,67	12,05 ± 2,83
<b>LB 5,0 ml</b>	21,24 ± 7,05	6,18 ± 0,67	0,31 ± 0,05	519,40 ± 165,24	8,68 ± 3,53	10,42 ± 2,56

Legenda: SD – standardni odklon; Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5 ml; LB 3 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 3 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml

Legend: SD – standard deviation; Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33% 3 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL

Tabela 4: Vrednosti izbranih hematoloških parametrov pri drugem odvzemu (povprečje ± SD)

Table 4: Values of selected hematological parameters after the second sampling (average ± SD)

Skupina	Št. levkocitov	Št.	Hematokrit	Št. trombocitov	Št.	Št. limfocitov
	(x 10 <sup>9</sup> /l)	eritrocitov (x 10 <sup>12</sup> /l)	(l/l)	(x 10 <sup>9</sup> /l)	nevtrofilcev (x 10 <sup>9</sup> /l)	(x 10 <sup>9</sup> /l)
<b>NaCl 0,9-%</b>	18,51 ± 3,14	5,77 ± 0,39	0,30 ± 0,02	454,80 ± 73,22	6,44 ± 2,05	10,75 ± 1,43
<b>Bupi 3 ml</b>	19,86 ± 4,37	6,22 ± 0,50	0,32 ± 0,03	505,80 ± 77,83	7,48 ± 2,72	10,92 ± 1,53
<b>LB 1,5 ml</b>	15,30 ± 3,90	5,41 ± 0,33	0,29 ± 0,03	434,20 ± 16,95	5,85 ± 2,61	8,19 ± 1,83
<b>LB 3,0 ml</b>	20,52 ± 2,54	6,17 ± 0,33	0,32 ± 0,03	502,40 ± 63,73	7,97 ± 1,04	10,79 ± 1,83
<b>LB 5,0 ml</b>	19,21 ± 2,83	6,25 ± 0,56	0,32 ± 0,04	432,40 ± 94,57	7,79 ± 1,71	9,93 ± 2,31

Legenda: SD – standardni odklon; Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5 ml; LB 3 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 3 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml

Legend: SD – standard deviation; Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33% 3 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL

Tabela 5: Vrednosti izbranih biokemijskih parametrov v serumu (povprečje ± SD)

Table 5: Values of selected biochemical parameters in serum (average ± SD)

Skupina	Sečnina (mmo/l)	Kreatinin (µmol/l)	Beljakovine, 1. odvzem (g/l)	Albumini, 1. odvzem (g/l)	Globulini, 1. odvzem (g/l)	Beljakovine, 2. odvzem (g/l)	Albumini, 2. odvzem (g/l)	Globulini, 2. odvzem (g/l)
<b>NaCl 0,9-%</b>	3,15 ± 1,06	102,19 ± 15,13	54,63 ± 4,76	24,22 ± 3,82	30,41 ± 2,47	55,14 ± 5,24	27,55 ± 1,98	27,60 ± 3,97
<b>Bupi 3 ml</b>	3,34 ± 0,68	106,28 ± 12,80	54,40 ± 5,70	24,67 ± 5,53	29,73 ± 3,32	58,03 ± 5,77	30,24 ± 4,18	27,80 ± 1,97
<b>LB 1,5 ml</b>	3,28 ± 1,33	95,17 ± 17,80	58,12 ± 3,79	25,43 ± 1,91	32,69 ± 2,59	54,08 ± 2,70	28,46 ± 1,07	25,62 ± 2,33
<b>LB 3,0 ml</b>	2,95 ± 1,41	98,98 ± 20,17	61,59 ± 5,59	29,05 ± 2,72	32,54 ± 5,90	60,10 ± 5,07	31,06 ± 2,92	29,05 ± 4,35
<b>LB 5,0 ml</b>	2,75 ± 0,58	91,41 ± 6,89	62,44 ± 3,04	25,60 ± 3,76	36,84 ± 4,79	57,61 ± 3,29	28,96 ± 3,57	28,65 ± 3,80

Legenda: SD – standardni odklon; Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5 ml; LB 3 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 3 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml; 1. odvzem - odvzem vzorcev za analizo med prvo anestezijo, 2. odvzem - odvzem vzorcev med drugo anestezijo

Legend: SD – standard deviation; Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33% 3 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL; 1. odvzem – sampling during the first anesthesia, 2. odvzem – sampling during the second anesthesia

## 4.2 KOŽNA TEMPERATURA

Kožna temperatura je bila med 31,6 °C in 38,3 °C z mediano 35,5 °C. Temperaturo, večjo od 38,0 °C ali enako tej vrednosti, smo opazili pri dveh meritvah. Ob obeh meritvah kožne temperature nad 38,0 °C je bila izmerjena temperatura okolja 27 °C.

## 4.3 NEVROLOŠKI PREGLED

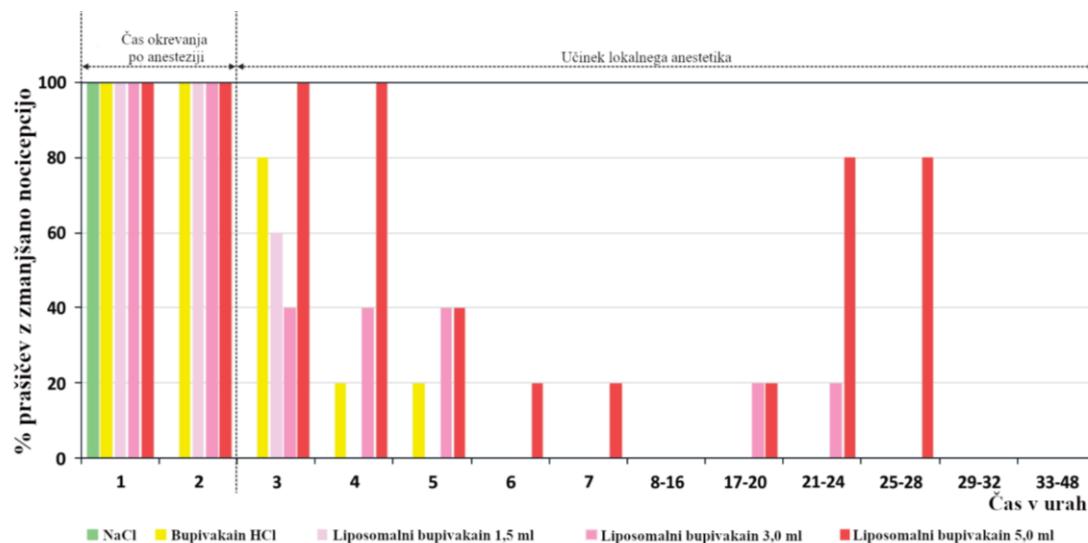
Noben prašič ni imel nevroloških znakov na sprednjih nogah, ki bi trajali dlje kot dve uri po anesteziji.

Pri nobeni skupini nismo opazili razlik v nevroloških parametrih med levo in desno nogo. Ne glede na količino in koncentracijo testnih učinkovin pri nobenem prašiču nismo opazili znakov zastoja dihanja ali težav z mikturicijo.

#### 4.4 NOCICEPCIJA

Bupivakain HCl in 0,9%-NaCl: pri vseh prašičih, ki smo jim intratekalno aplicirali fiziološko raztopino, je bila nocicepcija normalna dve uri po aplikaciji. Nocicepcija je bila normalna štiri ure po aplikaciji 3 ml bupivakain HCl pri štirih prašičih, en prašič pa je imel normalno nocicepcijo po petih urah.

Liposomalni bupivakain: prašiči, ki so prejeli 1,5 ml (20 mg), so imeli normalno nocicepcijo najkasneje v štirih urah po intratekalni aplikaciji. Prašiči, ki so prejeli 3 ml (39 mg) ali 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina, so imeli normalno nocicepcijo v 6 oziroma 8 urah. Oslabljeno nocicepcijo smo opazili v obdobju 17–28 ur pri eni živali, ki je prejela 3 ml (39 mg) liposomalnega bupivakaina. Oslabljeno nocicepcijo so v tem časovnem intervalu imeli tudi vsi prašiči v skupini, ki je prejela 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina (Slika 9, Priloga 1).



Slika 9: Odstotek prašičev z oslabljeno nocicepcijo, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin

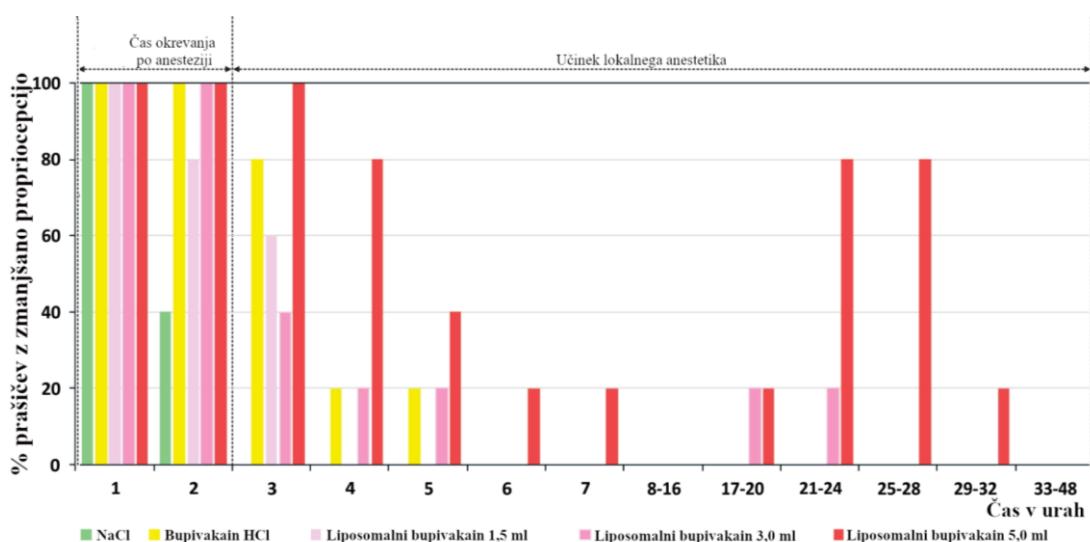
Figure 9: Percent of pigs with altered nociception, regardless of grade, in hours after application of tested substances

#### 4.5 PROPRIOCEPCIJA

Bupivakain HCl in 0,9%-NaCl: pri prašičih, ki so intratekalno prejeli fiziološko raztopino, je bila propriocepca normalna do tretje ure po aplikaciji. Prašiči, ki so prejeli 15 mg bupivakain

HCl, so imeli normalno propriocepcijo do četrte ure, en prašič pa je imel normalno po petih urah.

Liposomalni bupivakain: prašiči so imeli normalno propriocepcijo do četrte oziroma šeste ure po intratekalni aplikaciji 1,5 ml (20 mg) in 3 ml (39 mg) liposomalnega bupivakaina. Pri aplikaciji 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina je učinek na propriocepcijo trajal do 8 ur. Oslabljeno propriocepcijo smo v obdobju 17–32 ur ponovno opazili pri enem prašiču, ki je prejel 3 ml (39 mg) liposomalnega bupivakaina, in pri vseh prašičih, ki so prejeli 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina. Po 32 urah nismo opazili nobenih odstopanj pri nobeni živali (Slika 10, Priloga 2).



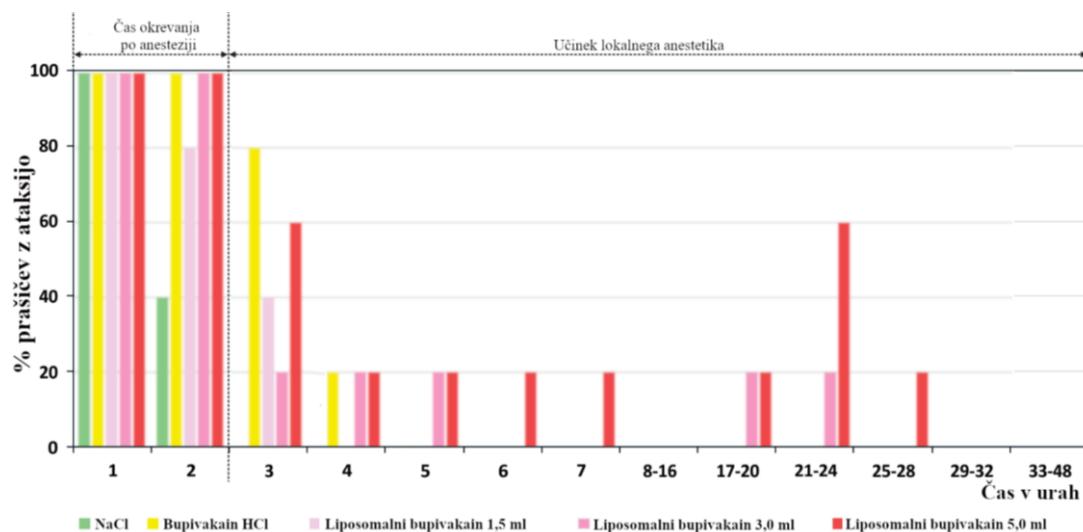
Slika 10: Odstotek prašičev z oslabljeno propriocepcijo, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin

Figure 10: Percent of pigs with altered proprioception, regardless of grade, in hours after application of tested substances

#### 4.6 ATAKSIJA

Bupivakain HCl in 0,9-% NaCl: prašiči, ki so intratekalno prejeli 0,9-% NaCl, do tretje ure po aplikaciji niso bili več ataktični. Prašiči, ki so intratekalno prejeli bupivakain HCl, so imeli znake ataksije 4 ure po aplikaciji.

Liposomalni bupivakain: prašiči, ki so intratekalno prejeli 1,5 ml (20 mg) liposomalnega bupivakaina, so tri ure po aplikaciji imeli znake ataksije. Pri prašičih, ki so prejeli 3 ml (39 mg) liposomalnega bupivakaina, smo opazili znake ataksije do pet ur po aplikaciji, pri čemer smo v obdobju 17–28 ur po aplikaciji ponovno opazili znake ataksije pri enem prašiču. Pri prašičih, ki so intratekalno prejeli 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina, smo opazili znake ataksije sedem ur po aplikaciji. Ponovne znake ataksije smo v intervalu 17–28 ur po aplikaciji opazili pri treh živalih (Slika 11, Priloga 3).



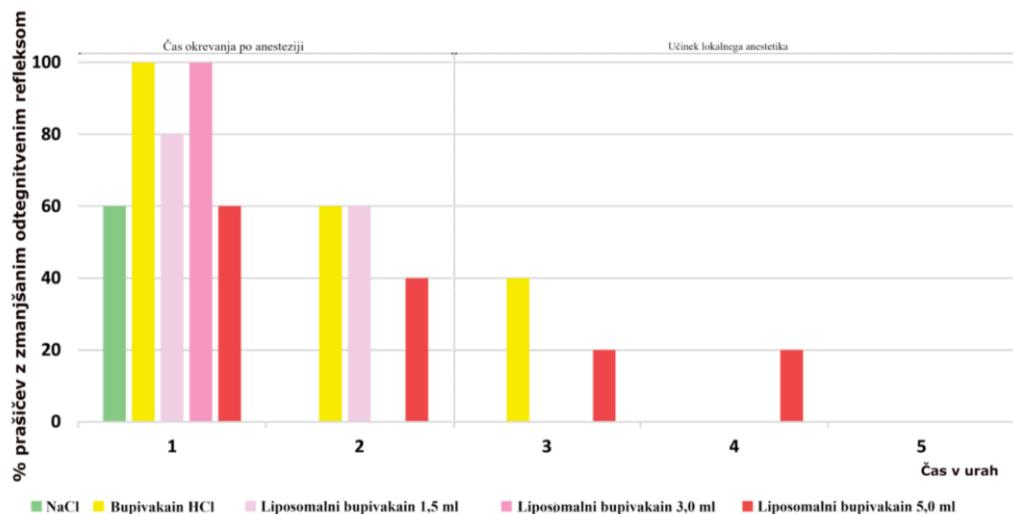
Slika 11: Odstotek prašičev, ki so imeli znake ataksije, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin

Figure 11: Percent of pigs with signs of ataxia, regardless of grade, in hours after application of tested substances

#### 4.7 ODTEGNITVENI REFLEKS

Bupivakain HCl in 0,9-% NaCl: pri prašičih, ki so intratekalno prejeli 0,9-% NaCl, 2 uri po aplikaciji nismo več opazili odstopanj. Pri prašičih, ki so prejeli bupivakain HCl, smo opazili normalen odtegnitveni refleks po treh urah po aplikaciji.

Liposomalni bupivakain: ne glede na količino liposomalnega bupivakaina, ki so ga prašiči prejeli intratekalno, smo ugotovili normalen odtegnitveni refleks do četrte ure po aplikaciji pri vseh prašičih razen pri enemu, ki je prejel 5 ml (66 mg) liposomalnega bupivakaina in je imel znake oslabljenega odtegnitvenega refleksa do pete ure po aplikaciji (Slika 12, Priloga 4).

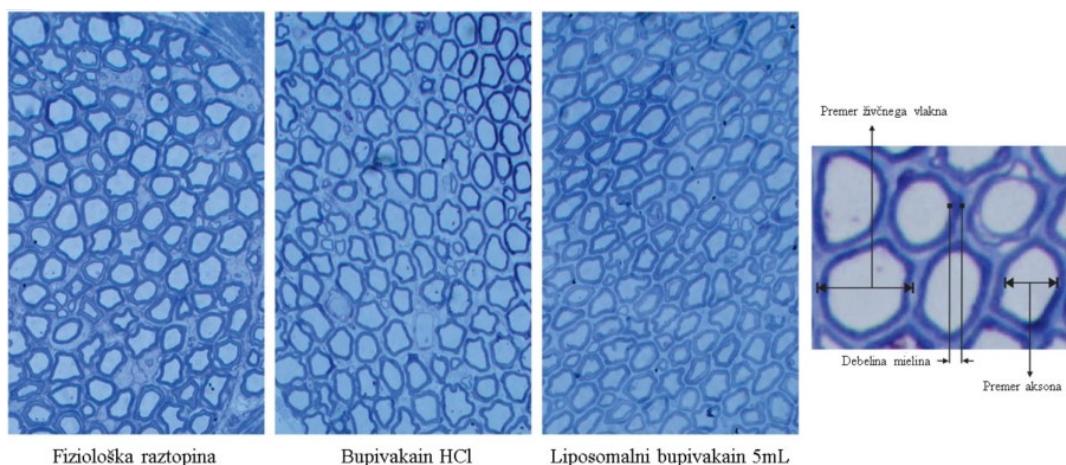


Slika 12: Odstotek prašičev z oslabljenim odtegnitvenim refleksom, ne glede na stopnjo, v urah po aplikaciji testnih učinkovin

Figure 12: Percent of pigs with altered withdrawal reflex, regardless of grade, in hours after application of tested substances

#### 4.8 HISTOPATOLOŠKE PREISKAVE

V kavdi ekvini (0,5 mikronske rezine) nismo opazili poškodb fasciklov v nobeni skupini, ne glede na vrsto in količino aplicirane testne učinkovine. Pri parametrih morfometrične analize nismo ugotovili značilnih razlik med skupinami (Slika 13 in Tabela 6). Limfociti T so bili redki in difuzno razporejeni samo v ovojnicih osrednjega živčevja, ki so obdajale kavdo ekvino. V hrbtenjačnih živcih nismo našli limfocitov T.



Slika 13: Prečni prerez hrbtničnih živcev, obarvanih s toluidinskim modrilom, za morfometrično analizo

Figure 13: Toluidin blue stained spinal nerves for morphometrical analysis

Tabela 6: Rezultati morfometrične analize (povprečje ± SD)

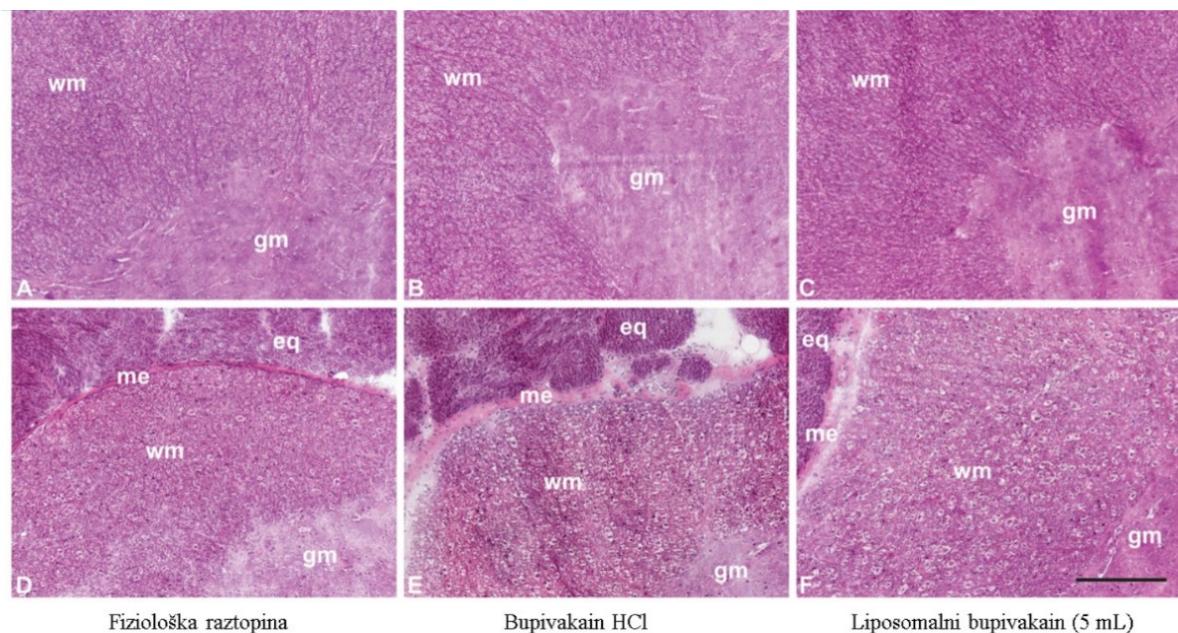
Table 6: Results of morphometrical analysis (average ± SD)

	<b>NaCl 3 ml</b>	<b>Bupi HCl 3 ml</b>	<b>LB 1,5 ml</b>	<b>LB 3,0 ml</b>	<b>LB 5,0 ml</b>
<b>Delež živčnega tkiva (%)</b>	66,00 ± 8,45	63,59 ± 4,68	67,20 ± 14,58	68,56 ± 7,94	66,42 ± 5,03
<b>Numerična gostota živčnih vlaken (N/mm<sup>2</sup>)</b>	8537 ± 1115	9372 ± 2031	11856 ± 1358	8757 ± 2664	9620 ± 1492
<b>Numerični delež velikih mieliniziranih živčnih vlaken (%)</b>	68,76 ± 10,90	73,37 ± 13,74	57,35 ± 7,24	72,56 ± 15,01	63,78 ± 5,75
<b>Arealni delež velikih mieliniziranih vlaken (%)</b>	65,77 ± 5,04	66,01 ± 4,73	61,25 ± 3,63	65,38 ± 6,31	61,86 ± 2,05
<b>Premer velikih mieliniziranih vlaken (µm)</b>	11,45 ± 0,26	10,53 ± 1,21	10,11 ± 0,38	11,14 ± 1,43	10,85 ± 1,39
<b>Premer aksonov (µm)</b>	7,57 ± 0,76	6,96 ± 1,02	6,46 ± 0,56	7,23 ± 1,00	6,99 ± 1,16
<b>Debelina mielina (µm)</b>	1,94 ± 0,29	1,78 ± 0,15	1,83 ± 0,12	1,96 ± 0,23	1,93 ± 0,21
<b>G-razmerje</b>	0,66 ± 0,06	0,66 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,65 ± 0,02	0,64 ± 0,03
<b>Vnetne celice (N/mm<sup>2</sup>)</b>	3,88 ± 1,37	7,98 ± 4,18	7,14 ± 5,19	4,57 ± 3,05	5,15 ± 3,14

Legenda: SD – standardni odklon; G-razmerje je definirano s premerom aksona : premerom velikih živčnih vlaken; Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5 ml; LB 3 ml – liposomalni bupivakain 1,33-% 3 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml

Legend: SD – standard deviation; G-ratio – diameter of axon: large fibre diameter; Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 3 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL

Na prečnih prerezih hrbtenjače nismo našli histopatoloških sprememb pri nobeni skupini prašičev, in sicer ne glede na testno učinkovino ali količino te (Slika 14).



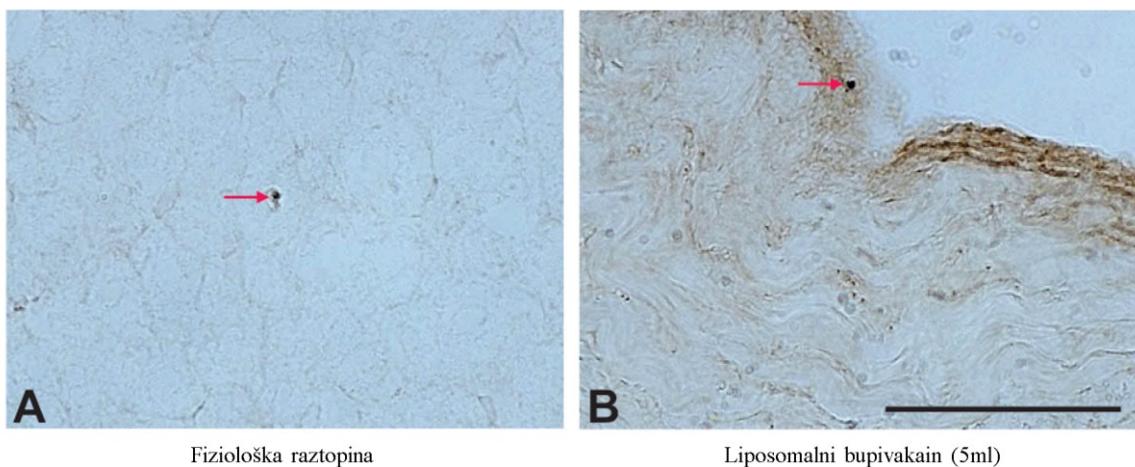
Slika 14: Prečni prerez hrbtenjače

Figure 14: Cross sections of the spinal cord

Legenda: Vzorci hrbtenjače prsnega dela hrbtenice (A–C) in ledvenega dela hrbtenice (D–E) ne kažejo patoloških sprememb v sivini (gm), belini (wm), ovojnicih osrednjega živčevja (me) ali kavdi ekvini (eq). Barvanje s hematoksilinom in eozinom. Velikost označevalca v spodnjem desnem kotu je 100 µm

Legend: Thoracic (A–C) and lumbar spinal cord samples (D–E) do not show pathological changes in the grey matter (gm), white matter (wm), meninges (me) or cauda equina (eq). Haematoxylin eosin staining. Bar 100 µm

Z imunoreaktivnostjo-CD3 smo na prečnih prerezih torakalnega in lumbalnega dela hrbtenjače opazili posamezne limfocite T v belini hrbtenjače ali ovojnicih osrednjega živčevja pri vseh skupinah prašičev (Slika 15).



Slika 15: CD3 imunoreaktivnost

Figure 15: CD3 immunoreactivity

Legenda: Puščica – limfocit T, A – belina hrbtnjače, B – ovojnica osrednjega živčevja, velikost označevalca 100 µm

Legend: Arrow – lymphocyte T, A – white matter, B – meninges, bar 100 µm

#### 4.9 CEREBROSPINALNA TEKOČINA

Na začetku poskusa smo pri 33 % vzorcev cerebrospinalne tekočine opazili obarvanost, na koncu poskusa pa pri 24 %. Motnost smo, ne glede na stopnjo, opazili pri 50 % vzorcev na začetku poskusa in pri 32 % na koncu poskusa.

Na začetku poskusa je vrednost 0,4 g/l celokupnih beljakovin (D'Angelo in sod., 2009; Kulkarni in sod., 2009) presegalo 58 % vzorcev, število nukleiranih celic je bilo večje od  $15 \times 10^6/l$  (Kulkarni in sod., 2009) v 29 % vzorcev. V 70 % vzorcev smo opazili znake krvne kontaminacije z več kot 500 eritrociti/ $\mu l$  (Cook in Levine, 2014) (Tabela 7).

Tabela 7: Izbrani parametri cerebrospinalne tekočine pred aplikacijo testnih učinkovin (mediana – kvartilni razmik)

Table 7: Selected parameters of cerebrospinal fluid before the application of tested substances (median–interquartile range)

Skupina	Št. nukleiranih celic ( $\times 10^6/l$ )	Št. celic ( $\times 10^6/l$ )	Mono-nuklearne celice (%)	Limfociti (%)	Nevtrofilci (%)	Beljakovine (g/l)
<b>NaCl 0,9-%</b>	5,0 (4,0–7,0)	865,0 (598,8–1296,3)	70,5 (50,5–87,5)	18,5 (7,0–30,0)	6,0 (2,0–20,0)	0,311 (0,272–0,390)
<b>Bupi 3 ml</b>	13,0 (9,0–16,5)	3446,0 (867,5–5999,8)	32,0 (22,8–57,0)	26,0 (23,5–31,0)	10,0 (6,5–31,0)	0,440 (0,417–0,546)
<b>LB 1,5 ml</b>	7,0 (4,3–20,8)	719,0 (179,3–5108,8)	75,0 (50,8–93,5)	6,0 (5,8–41,8)	2,0 (0,8–18,3)	0,378 (0,333–0,687)
<b>LB 3,0 ml</b>	17,0 (7,5–26,5)	1950,0 (275,8–12372,8)	69,0 (61,5–79,0)	12,0 (7,5–15,0)	17,0 (10,5–26,0)	0,431 (0,320–0,948)
<b>LB 5,0 ml</b>	7,0 (2,0–16,8)	712,0 (137,0–4162,5)	88,0 (74,0–95,8)	6,0 (2,3–15,5)	3,0 (1,8–8,8)	0,400 (0,282–0,556)

Legenda: Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5,0 ml; LB 3,0 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 3,0 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml

Legend: Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5.0 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 3.0 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL

Na koncu poskusa je bilo v 46 % vzorcev več kot 0,4 g/l celokupnih beljakovin. Število nukleiranih celic je bilo večje od  $15 \times 10^6/l$  v 21 % vzorcev, znake krvne kontaminacije z več kot 500 eritrociti/ $\mu l$  pa smo opazili pri 54 % vzorcev.

Na začetku in na koncu poskusa se posamezne skupine prašičev niso razlikovale glede na število nukleiranih celic, celokupnih beljakovin in stopnjo krvne kontaminacije cerebrospinalne tekočine (Tabela 8).

Tabela 8: Izbrani parametri cerebrospinalne tekočine pri drugem odvzemu po 21 dneh (mediana – kvartilni razmik)

Table 8: Selected parameters of cerebrospinal fluid at the second sampling after 21 days (median – interquartile range)

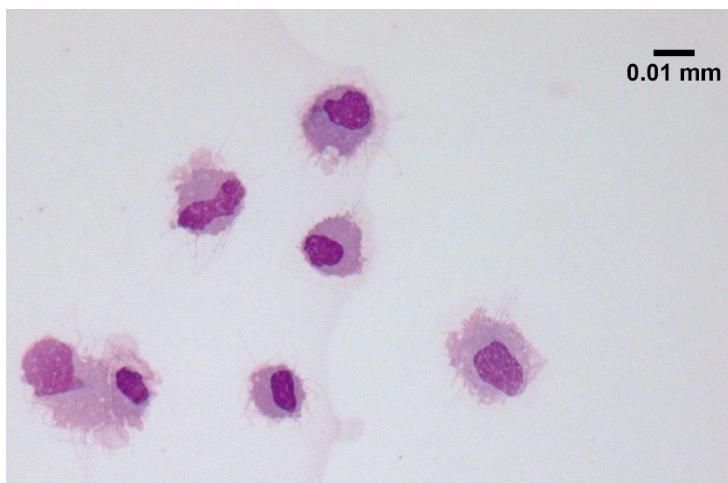
Skupina	Št. nukleiranih celic ( $\times 10^6/l$ )	Št. celic ( $\times 10^6/l$ )	Mono-nuklearne celice (%)	Limfociti (%)	Nevtrofilci (%)	Beljakovine (g/l)
<b>NaCl 0,9-%</b>	8,0 (5,3-33,3)	802,0 (106,1-21316,8)	73,5 (43,5-89,5)	22,5 (9,5-36,0)	4,5 (1,0-20,0)	0,431 (0,347-0,504)
<b>Bupi 3 ml</b>	9,0 (6,0-28,5)	102,0 (75,5-15172,7)	81,0 (56,0-95,0)	11,5 (3,5-28,5)	7,5 (0,5-14,5)	0,653 (0,459-0,923)
<b>LB 1,5 ml</b>	9,0 (7,3-10,3)	556,0 (513,3-1793,7)	89,0 (57,0-92,0)	6,0 (3,5-10,8)	2,0 (0,8-7,8)	0,400 (0,368-0,478)
<b>LB 3,0 ml</b>	8,0 (6,0-11,5)	210,0 (111,8-1204,6)	86,0 (79,5-94,5)	7,0 (4,5-10,5)	2,0 (0,750-11,3)	0,386 (0,366-0,411)
<b>LB 5,0 ml</b>	6,0 (4,0-21,0)	60,0 (28,4-17301,5)	96,0 (80,8-99,0)	4,0 (1,0-10,3)	0,0 (0,0-8,8)	0,393 (0,381-0,765)

Legenda:Bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5-%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9-%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 5,0 ml; LB 3,0 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 3,0 ml; LB 1,5 ml – liposomalni bupivakain 1,33-%, 1,5 ml

Legend:: Bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 5.0 mL; LB 3 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 3.0 mL; LB 1.5 mL – liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 mL

S citološko diferenciacijo smo pri s krvjo kontaminiranih vzorcih ugotovili značilno večji odstotek nevtrofilcev ( $p < 0,001$ ) in limfocitov ( $p < 0,001$ ) kot pri nekontaminiranih vzorcih. Odstotek enojedrnih celic je bil ne glede na skupino pri kontaminiranih vzorcih manjši ( $p < 0,001$ ).

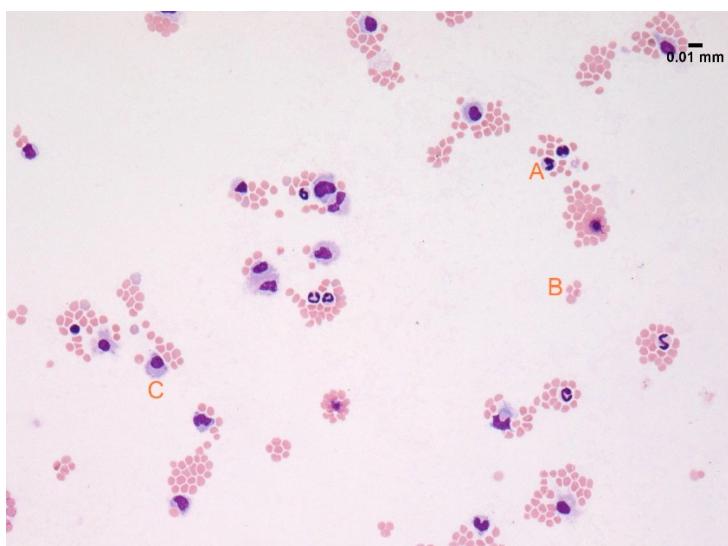
Odstotek limfocitov v cerebrospinalni tekočini je bil na koncu poskusa ne glede na aplicirano učinkovino značilno manjši ( $p = 0,018$ ) v primerjavi z začetno vrednostjo, medtem ko se odstotek nevtrofilcev in enojedrnih celic ni razlikoval (Sliki 16 in 17).



Slika 16: Enojedrne celice v vzorcu cerebrospinalne tekočine

Figure 16: Mononuclear cells in a sample of cerebrospinal fluid

Legenda: 400-kratna povečava, barvanje po Giemsi, velikost označevalca v zgornjem desnem kotu je 0,01 mm  
Legend: 400x magnification, Giemsa stained, bar 0,01 mm



Slika 17: Krvno kontaminiran vzorec cerebrospinalne tekočine kot posledica travmatske puncije

Figure 17: Blood contaminated sample of cerebrospinal fluid as a result of traumatic puncture

Legenda: V preparatu citocentrifuge je prisotnih več eritrocitov (B), nevtrofilcev (A) in enojedrnih celic (C),  
200-kratna povečava, barvanje po Giemsi, velikost označevalca v zgornjem desnem kotu je 0,01 mm

Legend: Several erythrocytes (B), neutrophils (A) and mononuclear cells (C) in a cyt centrifuge sample,  
Magnification 200x, Giemsa stained, bar 0,01 mm

## 5 RAZPRAVA

Liposomalni bupivakain (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) je odobren za infiltracijo v mehka tkiva in interskaleni blok pri ljudeh (Exparel, 2018). Podatki o epiduralni (Boogaerts in sod., 1994; Viscusi in sod., 2012; Malik in sod., 2017) in intratekalni aplikaciji so pomanjkljivi (Joshi in sod., 2015; Malinovsky in sod., 1997). Intratekalno uporabo običajnih formulacij lokalnih anestetikov omejuje kratkotrajen analgetični učinek (Boogaerts in sod., 1994; Lafont in sod., 1994; Boogaerts in sod., 1995; Viscusi in sod., 2012; Joshi in sod., 2015), zato je aplikacija preko intratekalnih katetrov trenutno edina možnost za podaljšanje ugodnih lastnosti spinalne anestezije (Listing in Pöpping, 2018).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti nevrološke in lokalno toksične posledice vbrizganja različnih odmerkov liposomalnega bupivakaina v intratekalni prostor pri prašiču in jih primerjati s standardno formulacijo bupivakaina (bupivakain HCl). Zaradi anatomskeih podobnosti med hrbtenico 40 kg težkega prašiča in odraslega človeka (Busscher, 2010) lahko sklepamo, kakšen bi bil nevrološki odziv odraslega človeka na odmerke liposomalnega bupivakaina, ki smo jih uporabili v raziskavi.

V raziskavo smo vključili 25 prašičev, ki smo jih razdelili v pet skupin. Velikost skupine smo določili na podlagi izračunov podobne raziskave, ki je ocenjevala vnetni odziv po aplikaciji vodnega gela za ultrazvočne preiskave v intratekalni prostor pri prašiču (Stopar Pintarič in sod., 2013). Ob morebitnih težavah pri odvajanju urina po aplikaciji testne učinkovine bi bilo treba prašiče kateterizirati, zato smo v raziskavo vključili le samice (Musk in sod., 2015). Če bi prišlo do zastoja dihanja ali dalj časa trajajoče paralize po aplikaciji testne učinkovine, je bila po protokolu predvidena evtanazija živali, vendar to ni bilo potrebno, saj saj pri nobeni živali ni prišlo do prej opisanih zapletov po aplikaciji testnih učinkovin.

Obdobje prilagajanja na novo okolje pred poskusom smo omejili na 48 ur, kar je bilo sorazmerno kratko obdobje, saj je bila opazna razlika pri sodelovanju prašičev pri nevrološkem pregledu glede na to, koliko časa so bili vhlevljeni. To sicer ni vplivalo na kakovost izvedbe kliničnih testov, bi pa daljše obdobje privajanja in ločena nastanitev prašičev, kot smo opazili pri kasnejšem delu, povečala navezanost prašiča na opazovalca in s tem olajšala klinično ter nevrološko oceno. Klinični pregledi prašičev so se, v nasprotju z nevrološkimi, osredotočili

predvsem na opazovanje obnašanja, apetita in kliničnih znakov, ki jih lahko vrednotimo z adspekcijo.

Zdravstveno stanje prašičev smo spremljali tudi z merjenjem telesne temperature z infrardečim termometrom, ki je namenjen merjenju kožne temperature pri ljudeh. Kožno temperaturo smo merili na standardiziranem mestu (med posegom obrito mesto punkcije). Temperatura in vlažnost okolja vplivata na kožno temperaturo (Soerensen in Pedersen, 2015). Rezultate meritev kožne temperature smo zato uporabili le za primerjavo med posameznimi živalmi in prašiče ob odstopanjih intenzivnejše nadzirali. Nekaj prašičev iz različnih skupin je imelo pri več meritvah blago povišano kožno temperaturo v primerjavi z drugimi prašiči. Pri nobenem prašiču to ni bilo povezano s poslabšanjem kliničnega stanja, so pa bile okoljske temperature v času izmerjenih najvišjih vrednosti temperature kože sorazmerno visoke, saj so dosegale 28 °C, tudi relativna vlažnost je dosegala 80 % .

Na začetku in koncu poskusa smo vsem prašičem odvzeli vzorce venske krvi ter na koncu poskusa ugotovili značilno manjše število levkocitov. Razlik med skupinami pri tem nismo ugotovili, je pa moč statistične analize v tem primeru premajhna za potrditev značilnosti. Če bi intratekalna aplikacija liposomalnega bupivakaina v naši raziskavi povzročila dalj časa trajajoč sistemski vnetni odziv, bi pričakovali povečanje števila levkocitov, ne zmanjšanja. Sprememba števila levkocitov je lahko pogojena s stresom ob menjavi okolja (Martínez-Miró in sod., 2016), število limfocitov se ob tem zmanjša (McGlone in sod., 1993). Zgolj stres tako ne pojasni zmanjšanja števila prašičev z levkocitozo in zmanjšanje števila limfocitov ob koncu raziskave. Verjetneje je, da so bile visoke vrednosti levkocitov na začetku poskusa posledica akutnega stresa kot tudi možne subklinične infekcije.

Izboljšani pogoji reje (obogatitev okolja s slamnatim nastiljem, večja kvadratura na žival v primerjavi s farmskimi pogoji reje) med poskusom in stres ob menjavi okolja bi lahko bili vzrok za zmanjšanje števila levkocitov in še posebej limfocitov na koncu poskusa.

Koncentracija albuminov se spremeni pri kroničnih infekcijah (Gough, 2007; Allison, 2012), zato bi lahko bilo zvečanje koncentracije albuminov na koncu poskusa pokazatelj zmanjšanja kronične infekcije. Na drugi strani je bila koncentracija globulinov ob koncu poskusa nižja. Skupaj z značilno razliko v zmanjšanju števila trombocitov ta podatek ponovno kaže na zmanjšanje kronične infekcije oziroma njeno subklinično prisotnost na začetku poskusa. Trombociti niso samo pomembni pri strjevanju krvi, ampak so pomembni regulatorji vnetnih bolezni (Matowicka-Karna, 2016).

Vnetje bi lahko bilo možen dejavnik, ki zmanjša učinkovitost lokalnih anestetikov zaradi vpliva disociacijske konstante v kislem okolju. Ne glede na prisotnost kronične sistemske infekcije je pričakovani vpliv vnetja na učinkovanje lokalnih anestetikov majhen (Ueno in sod., 2008), predvsem ob upoštevanju dejstva, da vnetje ni bilo lokalizirano na preiskovanem področju. Pri vseh prašičih smo opravili punkcijo cerebrospinalne tekočine v ledvenem področju. Pri tem je bila primarna orientacijska točka presek prečne linije kril črevnic z mediano linijo. S punkcijo smo pridobili do 3 ml cerebrospinalne tekočine. Pri več odvzemih smo opazili počasno iztekanje cerebrospinalne tekočine. Vzrok za to je lahko mesto punkcije, saj na tem mestu običajno dobimo manjšo količino cerebrospinalne tekočine kot pri odvzemu iz cerebelomedularne cisterne (Swindle, 2009). V številnih vzorcih cerebrospinalne tekočine smo opazili kontaminacijo z epitelnimi celicami. Možno je, da je bil počasen tok cerebrospinalne tekočine povezan z majhnim premerom spinalne igle in ostanki površinsko ležečih tkiv v lumnu igle, ki upočasnjujejo pretok. Kljub temu je uporaba namenske spinalne igle zaradi oblike konice indicirana, saj zmanjšuje možnost poškodbe tkiv (Campoy in Schroeder, 2013; Read, 2013).

V naši raziskavi smo ugotovili kontaminacijo cerebrospinalne tekočine s krvjo, ki je bila 70-% na ob prvem odvzemu in 56-% po 21 dneh, in sicer pri meji kontaminacije 500 eritrocitov/ $\mu\text{l}$  (Cook in Levine, 2014). Čeprav se to zdi veliko, je stopnja kontaminacije pri ljudeh pri travmatski punkciji do 20 % oziroma vsaj 72 %, če je meja kontaminacije postavljena na 100 eritrocitov/ $\mu\text{l}$  (Petzold in sod., 2006). Če mejo 100 eritrocitov/ $\mu\text{l}$  apliciramo na rezultate naše raziskave, bi to pomenilo 83%- krvno kontaminacijo vzorcev cerebrospinalne tekočine na začetku poskusa oziroma 68-% na koncu poskusa. Čeprav je bila punkcija travmatska, so odstotki, predvsem kontaminacije cerebrospinalne tekočine pri odvzemu na koncu poskusa, primerljivi s statistiko punkcije cerebrospinalne tekočine pri ljudeh (Petzold in sod., 2006). Vsi prašiči so po punkciji primerno okrevali, podaljšano okrevanje pa smo ugotovili zgolj pri intratekalni aplikaciji 3 ml (39 mg) in 5 ml (66 mg) 1,33%- liposomalnega bupivakaina. Povezave med travmatičnostjo punkcije in nevrološkim okrevanjem tako nismo mogli potrditi. Čeprav je poškodba hrbitenjače mogoča, kot se je verjetno zgodilo pri psih (Joshi in sod., 2015), v naši raziskavi znakov podaljšanega okrevanja ali dolgotrajnih parez oziroma paraliz nismo opazili.

Cilj analize cerebrospinalne tekočine je bil diagnosticirati vnetni proces, ki bi ga lahko povzročila aplikacija testnih učinkovin. Če pri tem upoštevamo stopnjo kontaminacije pri istih

osebkih pred aplikacijo testnih učinkovin in po njej, tega statistično nismo dokazali, saj je bila stopnja kontaminacije visoka in se je razlikovala med odvzemi. Treba je upoštevati tudi, da se število vnetnih celic v krvi med poskusom spreminja, kar dodatno vpliva na distribucijo in količino vnetnih celic v kontaminirani cerebrospinalni tekočini na začetku in koncu poskusa. Vpliv kontaminacije cerebrospinalne tekočine s krvjo je bil tako velik, da je onemogočil jasne zaključke o vnetnem dogajanju samo na podlagi analize cerebrospinalne tekočine. Značilne razlike, ki smo jih opazili pred poskusom in po njem, so verjetno zgolj posledica krvne kontaminacije in onemogočajo primerjavo med skupinami. Kljub kontaminaciji cerebrospinalne tekočine s krvjo pa s histopatološko analizo nismo opazili znakov vnetja ali degeneracije po aplikaciji testne učinkovone.

Z organoleptično oceno smo opazili obarvanje ali motnost cerebrospinalne tekočine v odstotkih, ki so nižji od odstotkov kontaminacije na podlagi štetja celic. Vsekakor je določitev števila eritrocitov za mejo kontaminacije pri štetju ključna, dokazuje pa nižja senzitivnost organoleptičnega pregleda v primerjavi z drugimi metodami (Petzold in sod., 2006).

Pri citološki diferenciaciji smo v določenih vzorcih opazili precejšnjo prizadetost enojedrnih celic, kar je bilo vidno predvsem v preparatih z nizko stopnjo kontaminacije s krvjo. Vzrok poškodb celic bi lahko bil postopek citocentrifugiranja, čeprav smo uporabili sorazmerno nizke sile 60 x g (Kobe in Flisar, 2004) v primerjavi z opisanimi 150 x g (D'Angelo in sod., 2009).

Vzrok je lahko tudi predhodna obdelava vzorca, saj je glede na štetje celic in določanje števila nukleiranih celic lahko prišlo do prekoračenja časa 30 minut do citocentrifugiranja. Ne glede na pripravo vzorca je višja vsebnost krvnega seruma v kontaminiranih vzorcih verjetno pripomogla k ohranitvi celic za citološko diferenciacijo (Cook in Levine, 2014). Koncentracija celokupnih beljakovin v cerebrospinalni tekočini na začetku in koncu poskusa se ni razlikovala, vendar je razporeditev rezultatov nenormalna in vezana na krvno kontaminacijo (Aasebø in sod., 2014).

Histopatološka analiza vzorcev hrbtenjače in kavde ekvine, ki smo jih odvzeli po evtanaziji živali, ni kazala znakov infiltracije z vnetnimi celicami. Prav tako nismo ugotovili patoloških sprememb. To tudi potrjuje, da kontaminacija s krvjo ob punkciji ni povzročila patoloških sprememb v hrbtenjači ozziroma kavdi ekvini.

Nevrološki pregled pri prašičih smo zasnovali na osnovi nevrološkega pregleda, ki ga uporabljam pri klinični diagnostiki nevroloških obolenj psov (Jaggy in Spiess, 2010). Čeprav se hrbtenici psa in prašiča razlikujeta, sta razporeditev hrbtenjačnih segmentov in osnovni

princip refleksov med vrstami podobna; tako lahko s podobno izvedenimi testi dobimo relevantne podatke (Lorenz in sod., 2011c). Nevrološki pregled je vključeval oceno zavora dihanja, odvajanja urina in oceno propriocepције, odtegnitvenega refleksa, nocicepcije ter ataksije na vseh štirih nogah.

Opravljanje preizkusov na vseh nogah je pomembno s stališča določanja kranialnega širjenja lokalnega anestetika. S preizkušanjem odzivov na zadnjih in sprednjih nogah lahko določimo prizadetost segmentov C1–C5, C6–T2, T3–L3, L4–S (Lorenz in sod., 2011c). Kljub temu da je z natančnejšimi testi mogoče bolje določiti, do katerega segmenta na hrbtenjači sega blok ob aplikaciji lokalnega anestetika, je tovrstna ocena pri prašičih težavna. Da ne bi prihajalo do odstopanj, smo za oceno nocicepcije stalno uporabljali četrti prst, na katerem smo z bolečim pritiskom na dorzalno stran izzvali bolečino. S preizkušanjem drugih prstov bi potencialno testirali drug dermatom in s tem spremenili rezultate kliničnega pregleda. Kljub temu je možno, da so obstajali nevrološki deficiti na drugih torakalnih in abdominalnih segmentih, saj nocicepcijo in propriocepциjo pri prašičih lahko zgolj subjektivno interpretiramo, ocena pa je odvisna tudi od obnašanja posamezne živali. Zato dopuščamo možnost blagih nevroloških deficitov, ki v naši raziskavi niso bili klinično ugotovljeni.

Pri ocenjevanju nocicepcije, propriocepцијe in spinalnih refleksov smo ocenjevali odzive prašičev z 0, -1, -2. Pri tem 0 pomeni normalen in pričakovani odziv, -1, zmanjšan odziv in -2 odsotnost odziva. Pri ocenjevanju nevroloških motenj, pri čemer diagnosticiramo klinične znake zgornjih motornih nevronov, lahko reflekse ocenimo tudi kot močnejše. Zaradi učinka lokalnih anestetikov pri širjenju bolečinskega impulza (Martin-Flores, 2013), tega nismo pričakovali, niti opazili. Čeprav smo ocenjevali s širšim spektrom, smo v končni nevrološki oceni upoštevali zgolj dva parametra, in sicer normalno stanje in prizadeto stanje. Poenostavitev ocenjevalnih parametrov v tem primeru izboljša deskriptivno predstavitev podatkov. Poleg enostavnejše in nazornejše predstavitev podatkov nam poenostavitev nevrološke ocene omogoča tudi izločitev subjektivnih kliničnih interpretacij v primeru mejnih nevroloških ocen. To je bilo najizrazitejše pri ocenjevanju ataksije, kjer smo ocenjevali stopnje s štiritočkovno lestvico od normalnega stanja, blage in izrazite ataksije do neambulatornega stanja. S poenostavitvijo smo oceno omejili zgolj na prisotnost oziroma odsotnost anomalije.

Da bi se ocenjevalca izognila različnim subjektivnim interpretacijam nevrološkega stanja, sta vse prve preglede opravila skupaj, prav tako veliko večino pregledov v prvih dvanajstih urah po intratekalni aplikaciji testne učinkovine. Pri nevroloških preizkusih je dodaten izziv

interpretacija nevroloških parametrov, saj lahko po kliničnih opažanjih temperament in strah živali otežujeta nevrološko oceno.

Pri aplikaciji lokalnih anestetikov v stranskem položaju bi lahko pričakovali lateralizirano prizadetost (Gorgi in sod., 2006), vendar tega nismo opazili.

Pri nobenem prašiču med poskusom ni prišlo do zavora dihanja ali pareze oziroma paralize prednjih nog. Prizadetost prednjih okončin se je v prvih dveh urah po anesteziji pojavljala v vseh skupinah, in sicer ne glede na aplicirano učinkovino. Upoštevati moramo, da na nevrološko oceno v zgodnjem poanesteziskem obdobju lahko vplivajo anestetiki, predvsem ketamin, ki smo ga aplicirali v mišico kot sestavni del premedikacije v sorazmerno velikem odmerku (10 mg/kg). Kot poročajo Löscher in sod. (1990), lahko ketamin vpliva na nevrološko oceno, zato smo ocene v prvih dveh urah po koncu anestezije izločili iz ocenjevanja nevroloških parametrov. Glede na pričakovane učinke testnih učinkovin zamik v ocenjevanju ne bi smel vplivati na nevrološko oceno (Richard in sod., 2011; Golf in sod., 2011; Bramlet in sod., 2012; Hamilton in sod., 2016).

Noben prašič ni kazal nevroloških znakov na prednjih okončinah, kar kaže na to, da je verjetnost visokega spinalnega bloka pri prašičih z odmerki, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, majhna. Glede na podobnosti določenih parametrov s človeško hrbtnico (Busscher in sod., 2010) v izbranem živalskem modelu sklepamo na majhno verjetnost pojava neželenih učinkov pri odraslem človeku. Na podlagi tega bi lahko odmerki, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, koristili kot vodilo pri klinični študiji intratekalne aplikacije liposomalnega bupivakaina pri človeku.

Rezultati naše raziskave kažejo, da aplikacija liposomalnega bupivakaina v intratekalni prostor povzroči nevronalno blokado v odvisnosti od odmerka. Začetni blokadi po intratekalni aplikaciji sta sledila okrevanje in ponovni blok. Ta učinek smo opazili pri živalih, ki so prejele 5 ml 1,33-% (66 mg) liposomalnega bupivakaina. Pri teh je zmanjšanje nocicepcije in propriocepcije trajalo dlje kot po aplikaciji 3 ml 1,33-% (39 mg) bupivakaina. Dodatno je nevralni blok ponovno nastopil po 17–20 urah in trajal do 32 ur.

Pri tem je treba poudariti, da je ocena blagih nevroloških sprememb, kot je ocena občutka za toplo/hladno, pri prašičih z uporabljeno metodologijo nemogoča. Hitro okrevanje polisinaptičnih refleksov prav tako kaže na osrednji vpliv pri nevrološki oceni (Behr, 2018). Zaradi teh razlogov je mogoče, da so blage nevrološke spremembe trajale dlje, kot smo jih klinično ugotavljali.

Podobno kot pri intratekalni aplikaciji majhnih odmerkov bupivakaina HCl v obstetrični analgeziji nastopi nevronalna blokada po aplikaciji liposomalnega bupivakaina hitro (Ngan Kee, 2016), kar lahko najverjetneje povežemo s količino prostega bupivakaina v pripravku Exparel (Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA). Liposomalna bupivakain vsebije 1,17 mg prostega bupivakaina v 3 ml in 2 mg prostega bupivakaina 5 ml suspenzije. Kot navajajo Hu in sodelavci (2013) poveča sproščanje bupivakaina iz liposomov koncentracijo prostega bupivakaina 12 ur po aplikaciji in se nadaljuje preko 72 ur z maksimalno koncentracijo med 24 in 48 urami. Navedeni časovni intervali sovpadajo s farmakodinamskimi ugotovitvami naše raziskave.

Čeprav bi bilo mogoče na podlagi drugih modelov (Joshi in sod., 2015) in tudi farmakokinetičnih podatkov (Hu in sod., 2013; Hadzic in sod., 2016) pričakovati daljši učinek, ni noben prašič kazal nevroloških znakov v daljšem časovnem obdobju kot 32 ur po aplikaciji. Kljub temu ne moremo izključiti daljšega učinka liposomalnega bupivakaina, saj ga z uporabljenimi nevrološkimi testi nismo opazili. Za natančnejši nevrološki pregled bi bilo po naših opazovanjih potrebno daljše privajanje na opazovalca in trening prašičev.

Hitrejša normalizacija odtegnitvenega refleksa v primerjavi s propriocepциjo in nocicepcijo ter zmožnost hoje kažeta, da ima intratekalna aplikacija močnejši učinek na senzorično kot na motorično funkcijo, kot je opisano pri epiduralni aplikaciji liposomalnega bupivakaina (Boogaerts in sod., 1994). To je najverjetneje posledica manjših količin bupivakaina, ki se postopno sproščajo iz liposomov. Majhna količina bupivakaina ima večji vpliv na avtonomno in senzorično blokado kot na motorično blokado (Viscusi in sod., 2012). Neobičajna časovna razlika med odtegnitvenim refleksom in nocicepcijo, ataksijo in propriocepциjo potruje diferencialno senzorično-motorično blokado. Po drugi strani smo z odtegnitvenim refleksom ocenjevali polisinaptični refleks, katerega refleksni lok ne sega samo v hrbtenjačo, temveč vključuje tudi cerebralno komponento, ki lahko pri stresu vpliva na izid preizkusa (Behr, 2018). V naši raziskavi nismo ugotovili histopatoloških sprememb, ki bi kazale na nevrotoksičnost. Degeneracije v sivini in belini hrbtenjače, ki so jih opisali Joshi in sodelavci (2015), bi lahko bile posledica sorazmerno visokih odmerkov liposomalnega bupivakaina glede na velikost živali ozziroma dolžino cerebrospinalnega kanala.

Neobičajno dolga prizadetost nog po intratekalni aplikaciji bupivakain HCl in fiziološke raztopine pri psih pasme beagle (Joshi in sod., 2015), kaže na druge dejavnike, kot so veliki odmerki lokalnih anestetikov ali iatrogena poškodba, kar bi lahko povzročilo histopatološke

spremembe; to je treba upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Prav tako je metodološka razlika med našo in omenjeno raziskavo (Joshi in sod., 2015) precejšnja in ju je je zato težko primerjati. Dober varnostni profil tehnologije DepoFoam je dobro dokumentiran v liposomalnih formulacijah citarabina (DepoCyt®, Pacira Pharmaceuticals, Inc.) in morfina (DepoDur®, Pacira Pharmaceuticals, Inc.) (Howel, 2001; Angst in Drover, 2006; Lambert in Los, 2008). Formulacije citarabina, morfina in bupivakaina, osnovane na tehnologiji DepoFoam, so tudi podobno varne kot formulacije zgolj z aktivno učinkovino (Glantz in sod., 1999; Gambling in sod., 2005; Carvalho in sod., 2007; Viscusi in sod., 2014).

Zaključimo lahko, da je liposomalni bupivakain, apliciran intratekalno, v odvisnosti od odmerka povzročil daljšo nevronalno blokado kot bupivakain HCl. Nismo ugotovili histopatoloških sprememb, ki bi kazale na toksične učinke intratekalno apliciranih odmerkov liposomalnega bupivakaina.

Eisenach in Yaksh (2018) menita, da so ne glede na rezultate naše raziskave, pred uvedbo liposomalnega bupivakaina za intratekalno aplikacijo pri ljudeh potrebne dodatne raziskave, katerih ugotovitve bi dale podatke o farmakodinamičnih lastnostih in varnosti intratekalne uporabe liposomalnega bupivakaina pri človeku.

## 6 ZAKLJUČKI

Liposomalni bupivakain v odvisnosti od intratekalno apliciranega odmerka povzroči daljšo nevronalno senzorično blokado kot bupivakain HCl.

Liposomalni bupivakain, apliciran intratekalno, v klinično pomembnih odmerkih ne povzroča degenerativnih ali kroničnih vnetnih sprememb na hrbtenjačnih živcih in hrbtenjači.

Intratekalno aplicirani liposomalni bupivakain v odmerkih 3 ml (39 mg) ali 5 ml (66 mg) povzroči po prvotnem okrevanju ponoven pojav nevronalne blokade od 17 do 32 ur po aplikaciji.

## 7 POVZETEK

Suspenzija liposomalnega bupivakaina (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA) je formulacija zdravila s podaljšanim sproščanjem bupivakaina, ki je inkapsuliran s pomočjo tehnologije DepoFoam (Depofoam, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, ZDA). To je patentirana oblika nosilca zdravilnih učinkovin, sestavljena kot vodna suspenzija multivezikularnih liposomov. Ti so, podobno kot satje, organizirani v nekoncentrični oblici. Ko zunanji liposomi počijo, se inkapsulirana vsebina sprosti in lipidne membrane preostalih liposomov se reorganizirajo. Liposomi se tako zaporedoma povečajo in pokajo, dokler se vsa inkapsulirana učinkovina postopoma ne sprosti. Inkapsulacija aktivne učinkovine v liposome omogoča nižjo plazemsko koncentracijo aktivne učinkovine in sproščanje v daljšem časovnem obdobju do 96 ur po aplikaciji. Del bupivakaina v liposomalnem pripravku se nahaja v prosti, neinkapsulirani oblici, kar omogoča hitrejši učinek lokalnega anestetika po aplikaciji.

Liposomalni bupivakain je odobren za infiltracijo v mehka tkiva in interskaleni blok pri ljudeh. Poleg teh področij uporabe so ga preučevali tudi pri medrebrnih blokadah, blokadah stelatnega ganglija, TAP blokih in drugih blokadah perifernih živcev. Kljub temu je podatkov o nevraksialni uporabi liposomalnega bupivakaina, posebej o intratekalni aplikaciji, malo. Namen raziskave je bil ugotoviti nevrološke in histopatološke posledice naraščajočih odmerkov liposomalnega bupivakaina, apliciranega intratekalno. Zaradi podobnosti hrbtenice 40 kg težkega prašiča in odraslega človeka lahko nudi v raziskavi uporabljen živalski model informacije o učinku intratekalno apliciranega liposomalnega bupivakaina pri človeku.

Petindvajset prašičev, težkih  $36,2 \pm 4,4$  kg, naključno razdeljenih v pet skupin, smo premedicirali z midazolatom, butorfanolom in ketaminom. Sedirane prašiče smo namestili v nevralno levostransko bočno lego in jih anestezirali z izofluranom v kisiku, ki smo ga dovajali preko obrazne maske. Lumbalno smo pripravili sterilno kirurško polje in na križišču longitudinalne osi hrbtenice in osi, ki namišljeno povezuje črevnična grebena s spinalno iglo odvzeli cerebrospinalno tekočino ter intratekalno aplicirali naslednje testne učinkovine: 3 ml 0,9%-raztopine natrijevega klorida (negativna kontrola), 3 ml 0,5%-bupivakain HCl (pozitivna kontrola), ali enega od treh odmerkov 1,33%-suspenzije liposomalnega bupivakaina (1,5, 3 ali 5 ml oziroma 20, 39 in 66 mg).

Cerebrospinalno tekočino smo pregledali organoleptično, določili število nukleiranih celic in celokupno število celic. Pri vseh vzorcih smo opravili tudi citološko diferenciacijo v citocentrifugi pripravljenih preparatov in določili koncentracijo celokupnih proteinov.

Po okrevanju prašičev iz anestezije smo ocenjevali nevrološki status živali. Ta je vključeval oceno zavora dihanja, nadzor akta uriniranja in klinično oceno propriocepcije, odtegnitvenega refleksa, nocicepcije in ataksije na vseh štirih nogah. V prvih 12 urah po aplikaciji testne učinkovine smo nevrološki pregled opravili vsako uro, 12 do 48 ur po aplikaciji testne učinkovine pa smo preglede združili v štiriurne intervale, kar pomeni, da je bil vsak prašič pregledan v štiriurnem intervalu. Po 48 urah smo prašiče ocenjevali enkrat dnevno.

Enaindvajseti dan po aplikaciji testnih učinkovin smo prašiče ponovno anestezirali, odvzeli cerebrospinalno tekočino in jih žrtvovali. Možno nevrotoksičnost testnih učinkovin smo ocenjevali s histopatološko preiskavo hrbtenjače, ovojnici osrednjega živčnega sistema, hrbtenjačnih živcev in kavde ekvine ter s primerjavo odvzetih vzorcev cerebrospinalne tekočine pred aplikacijo testnih učinkovin in pred žrtvovanjem.

Žrtvovanim prašičem smo odvzeli prečne prereze hrbtenjače z ovojnicami osrednjega živčevja z lumbalnega in torakalnega področja ter vzorce kavde ekvine. Del vzorcev živčnega tkiva smo obarvali s hematoksilinom in eozinom ter jih pripravili za imunohistokemično dokazovanje limfocitov T s protitelesi anti-CD3. Histopatološko smo ocenili infiltracijo vnetnih celic v sivini in belini hrbtenjače ter v ovojnicah osrednjega živčevja. Fiksirane vzorce kavde ekvine smo obarvali s toluidinskim modriliom in na njih opravili histomorfometrično analizo, pri čemer smo ocenjevali delež živčnega in neživčnega tkiva.

Vseh 25 prašičev je zaključilo poskus. Na začetku poskusa so tehtali povprečno  $36,2 \pm 4,4$  kg, dolžina hrbtenice od nuhalnega grebena do baze repa v bočni nevtralni legi je bila  $77,9 \pm 5,6$  cm. Telesna masa in izmerjena dolžina hrbtenice sta se do konca poskusa povečali na  $46,9 \pm 4,1$  kg oziroma  $85,9 \pm 3,2$  cm.

Živali, ki so prejele 0,9%-natrijev klorid, 3 ml bupivakain HCl ali 1,5 ml (20 mg) 1,33%-liposomalnega bupivakaina, so okrevale v 2, 5 ali 4 urah po aplikaciji. Živali, ki so prejele 3 ml (39 mg) ali 5 ml (66 mg) 1,33%-liposomalnega bupivakaina, so kazale znake nevraksialnega bloka do 32 ur po aplikaciji z vmesnim okrevanjem.

Na prečnih prerezih kavde ekvine nismo opazili poškodb fasciklov v nobeni skupini, in sicer ne glede testno učinkovino in količino. Parametri morfometrične analize niso kazali značilnih razlik med skupinami. Limfociti T so bili redki in difuzno razporejeni samo v ovojnicah

osrednjega živčevja, v živcih jih nismo našli. Histopatološke analize po aplikaciji vseh testnih učinkovin niso potrdile znakov nevrotoksičnosti, rezultati analize cerebrospinalne tekočine pa so bili nejasni.

Na osnovi nevroloških pregledov zaključujemo, da je nevraksialni blok po intratekalni aplikaciji liposomalnega bupivakaina pri prašiču odvisen od odmerka in traja dlje kot po aplikaciji bupivakain HCl.

## 8 SUMMARY

Bupivacaine liposome injectable suspension (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA) is an extended release formulation of bupivacaine, which is encapsulated with the DepoFoam (Exparel, Pacira Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA) technology. This patented drug releasing technology is an aqueous solution of multivesicular liposomes, organized in a honeycomb like structure. When the outer liposomes burst, they release the encapsulated content and the remaining liposomes reorganise. In this way liposomes gradually burst until all encapsulated content is slowly released. Encapsulation in liposomes enables lower plasma concentration of an active ingredient and gradual release for up to 96 hours after application. A fraction of the bupivacaine in the liposome formulation is in free, non-encapsulated form, which provides faster onset of local anaesthesia after application.

Bupivacaine liposome injectable suspension is approved for analgesia via tissue infiltration and interscalene brachial plexus in men, but not for use in neuraxial space. It has been investigated also for use in intercostal blocs, transversus abdominis plane (TAP) blocks, blocks of the stellate ganglion and other perineural applications. In spite of that, information on the effects after neuraxial liposome bupivacaine application, especially after intrathecal use, is scarce. The aim of this study is to establish neurologic and histopathologic outcomes of escalating dosages of liposome bupivacaine suspension administered intrathecally. Because of the similarities of an adult human spine and that of a 40 kg pig, the animal model used in this study could provide valuable information for intrathecal liposome bupivacaine use in humans.

Twenty-five pigs, weighing  $36.2 \pm 4.4$  kg, were randomly assigned to one of five groups and premedicated with midazolam, butorphanol and ketamine. Afterwards the pigs were anaesthetised in left lateral recumbency with isoflurane using face mask. A surgical field was prepared on the lumbar region and cerebrospinal fluid was collected at the junction of the long axis of the spine and the perpendicular line that was directed between the iliac crests. After cerebrospinal fluid sampling, the pigs were intrathecally injected with 3 ml 0.9% sodium chloride (negative control), 3 ml 0.5% bupivacaine hydrochloride (positive control), or one of three doses of 1.33% liposome injectable suspension: 1.5, 3 or 5 ml.

The cerebrospinal fluid was organoleptically evaluated, a nucleated cell count and a total cell count were performed. Cell differentiation in cytocentrifuge samples and total protein concentration were performed.

After recovering from general anaesthesia, the pigs were assessed for neurological study outcomes by blinded observers. The animals were observed for signs of respiratory depression and disturbances in urine voiding. Proprioception, nociception, ataxia and the withdrawal reflex were evaluated in all four legs. Evaluations were performed hourly during the first 12 hours after application of the tested substances. Between 12 and 48 hours, evaluations were performed in a four hour interval. For the remaining time, once daily checkups were conducted.

Three weeks after intrathecal administration of tested substances, the animals were anesthetised again, cerebrospinal fluid samples were obtained, and the pigs were sacrificed. Neurotoxicity was evaluated with histopathological examination of the spinal cord, meninges, spinal nerves, and cauda equina samples and with the comparison of the cerebrospinal fluid samples before the application of tested substances and before euthanasia.

Cross sections of the cauda equina and spinal cord from the thoracic and lumbar region including meninges were extracted. Neural tissue samples were haematoxylin and eosin stained and prepared for immunohistochemical detection of T - lymphocytes with anti - CD3 antibodies. The infiltration of inflammatory cells in grey matter, white matter and meninges was assessed. Samples of the cauda equina were stained with toluidine blue and the proportion of the neural and nonneural tissue was analysed histomorphometrically.

All pigs completed the study. Their body mass increased to  $46,9 \pm 4,1$  kg at the end of the study. The estimated spine length from the nuchal crest to the tail base increased from  $77,9 \pm 5,6$  cm to  $85,9 \pm 3,2$  cm at the end of the study.

Animals that received 0.9% sodium chloride, 3 ml bupivacaine hydrochloride or 1,5 ml 1,33% liposome bupivacaine recovered within 2 hours, 5 hours and 4 hours, respectively. Animals that received the liposome bupivacaine 3 ali 5 ml 1,33% liposome bupivacaine exhibited signs of neuraxial block up to 32 hours after injection with temporary normalisation.

Cross sections of cauda equina showed no fascicle damage in any of the groups. Morphometrical analysis did not show significant differences between the five groups. T-lymphocytes were scarce and scattered in the meninges and no lymphocytes were found intraneurally. Summarized, no histopathological signs of neurotoxicity were found in any of the groups, results of the cerebrospinal fluid analysis were inconclusive.

In conclusion, intrathecal administration of liposome bupivacaine injectable suspension in pigs resulted in a dose-response pattern of longer duration of neuraxial block than bupivacaine hydrochloride without histopathologic evidence of neurotoxicity.

## 9 ZAHVALE

**Izr. prof. dr. Tatjani Stopar Pintarič** za vodenje, pomoč in spodbudo. Hvala za priložnost biti član ekipe, za ves čas, proste ure in dneve dopusta. Vaša podpora, zagon in energija so bila vodila te poti.

**Izr. prof. dr. Alenki Seliškar** Hvala, ker ste verjeli, ko sam nisem. Da ste potisnili, ko sem obstal, in podprli, ko bi padel.

**Prof. dr. Eriki Cvetko** z Inštituta za anatomijo Medicinske Fakultete Univerze v Ljubljani za sodelovanje v raziskavi, izdelavo in interpretacijo histopatoloških preparatov ter strokovno pomoč.

Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije s programskima skupinama P3-0043 in P4-0053 za financiranje raziskave.

Kliničnemu oddelku za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana za finančno in materialno podporo pri izvedbi raziskave.

Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani za finančno in materialno podporo pri izvedbi raziskave in doktoratu.

**Ivanu Blažinoviču, Majdi Črnak Maasarani, Marku Slaku, Nataši Pollak Kristl, Frideriku Štendlerju, Milanu Števancu, Andreji Vidmar iz Inštituta za anatomijo Medicinske Fakultete Univerze v Ljubljani** za sodelovanje v raziskavi, histopatološke preiskave, strokovno pomoč in pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

**Prof. dr. Admirju Hadžiću** in **dr. Max Kurodi** za vodenje, projektiranje, nadziranje in vso strokovno pomoč pri opravljeni raziskavi. Hvala za vso spodbudo, nasvete in izkušnjo dela z vama.

**Asist. dr. Mariji Damjanovski** in **izr. prof. Saši Šega Jazbec** pri izvedbi raziskave in za strokovno podporo.

**Izr. prof. dr. Alenki Nemeč Svete** in **Aleksandru Jenku** za pomoč pri laboratorijskih analizah in interpretaciji rezultatov.

**Roku Klančniku** za tehnično pomoč pri raziskavi.

**Prof. dr. Mihi Pintariču** za lektoriranje angleškega besedila.

**Martinu Vrtačniku** za lektoriranje slovenskega besedila.

**Mag. Giti Greč Smole** za pomoč pri literaturi in tehnični obliku doktorske naloge.

**Mag. Mateji Stvarnik** in **Biljani Grubišič** za tehnično podporo in spodbudne besede. Eki

Klinike za prežvekovalce in prašiče za podporo in pomoč pri organizaciji in oskrbi živali.

Eki patologije IPDRČ za podporo in pomoč pri izdelavi in oceni preparatov.

Sodelavcem KMŽ, ki ste spodbujali, pomagali in prisluhnili.

Vsem prijateljem, ki ste verjeli in dajali vzor. Prislonili ste uho, pomagali, razumeli in olajšali težke trenutke.

**Vesni, Gregorju** in **Martini**, staršem in drugim članom družine. Dali ste spodbudo in perspektivo nadaljevati. Verjeli ste vame in mi stali ob strani. Hvala za vso podporo, neomajno zaupanje in vzor.

## 10 LITERATURA

Aasebø E, Opsahl JA, Bjørlykke Y, et al. Effects of blood contamination and the rostral-caudal gradient on the human cerebrospinal fluid proteome.

PLoS One 2014; 9(3): e90429 (13 str.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943968/> (4. 12. 2018).

Allison RW. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, eds. Veterinary hematology and clinical chemistry. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012: 460–76.

Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam<sup>TM</sup>: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. Clin Pharmacokinet 2006; 45(12): 1153–76.

Balocco AL, Van Zundert PGE, Gan SS, Gan TJ, Hadzic A. Extended release bupivacaine formulations for postoperative analgesia: an update.  
Curr Opin Anaesthesiol 2018; 31(5): 636–42.

Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology.  
J Mol Cell Cardiol 2001; 33(4): 599–613.

Bardsley H, Gristwood R, Baker H, Watson N, Nimmo W. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol 1998; 46(3): 245–9.

Behr S. Neurology. In: Eastern European regional veterinary conference: scientific proceedings. Zagreb, 2018: 249–66.

Beiranvand S, Moradkhani MR. Bupivacaine versus liposomal bupivacaine for pain control.  
Drug Res (Stuttg) 2018; 68(7): 365–9.

Boiteux C, Vorobyov I, French RJ, et al. Local anesthetic and antiepileptic drug access and binding to a bacterial voltage-gated sodium channel.

Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(36): 13057–62.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246943/> (28. 10. 2019).

Boogaerts JG, Lafont ND, Carlino S, et al. Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits. Br J Anaesth 1995; 75(3): 319–25.

Boogaerts JG, Lafont ND, Declercq AG, et al. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study.

J Clin Anesth 1994; 6(4): 315–20.

Bramlett K, Onel E, Viscusi ER, Jones K. A randomized, double blind, dose ranging study comparing wound infiltration of DepoFoam bupivacaine, an extended-release liposome bupivacaine, to bupivacaine HCl for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty. Knee 2012; 19(5): 530–6.

[http://www.thekneejournal.com/article/S0968-0160\(11\)00226-2/fulltext](http://www.thekneejournal.com/article/S0968-0160(11)00226-2/fulltext) (28. 10. 2019).

Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. Neuroscience 2004; 129(4): 957–70.

Brull R, McCartney CJ, Chan VW, El-Beheiry H. Neurological complications after regional anesthesia: contemporary estimates of risk. Anesth Analg 2007; 104(4): 965–74.

Busscher I, Ploegmakers JJ, Verkerke GJ, Veldhuizen AG. Comparative anatomical dimensions of the complete human and porcine spine. Eur Spine J 2010; 19: 1104–14.

Campoy L, Schroeder K. General considerations. In: Campoy L, Read MR, eds. Small animal regional anesthesia and analgesia. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 11–8.

Carvalho B, Roland LM, Chu LF, Campitelli VA 3rd, Riley ET. Single dose, extended-release epidural morphine (DepoDur) compared to conventional epidural morphine for post-cesarean pain. *Anesth Analg* 2007; 105(1): 176–83.

Catterall WA, Swanson TM. Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Mol Pharmacol* 2015; 88: 141–50.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468632/> (28. 10. 2019).

Chahar P, Cummings KC 3rd. Liposome bupivacaine: a review of a new bupivacaine formulation. *J Pain Res* 2012; 5: 257–64.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442744/pdf/jpr-5-257.pdf> (28. 10. 2019).

Cohen SM. Extended pain relief trial utilizing infiltration of Exparel®, a long-acting multivesicular liposome formulation of bupivacaine: a phase IV health economic trial in adult patients undergoing open colectomy. *J Pain Res* 2012; 5: 567–72.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3508659/> (28. 10. 2019).

Colombo G, Langer R, Kohane DS. Effect of excipient composition on the biocompatibility of bupivacaine-containing microparticles at the sciatic nerve.

*J Biomed Mater Res A* 2004; 68(4): 651–9.

Cook JR, Levine GJ. Cerebrospinal fluid and central nervous system cytology. In: Valenciano AC, Cowell RL, eds. Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2014: 222–43.

Curley J, Castillo J, Hotz J, et al. Prolonged regional nerve blockade. Injectable biodegradable bupivacaine/polyester microspheres. *Anesthesiology* 1996; 84(6): 1401–10.

D'Angelo A, Bellino C, Miniscalco B, et al. Spinal fluid collection technique from the atlanto-occipital space in pigs. *Acta Vet Brno* 2009; 78: 303–5.

Damjanovska M, Cvetko E, Hadzic A, et al. Neurotoxicity of perineural vs. intraneuronal extrafascicular injection of liposome bupivacaine in the porcine model of sciatic nerve block. *Anaesthesia* 2015; 70: 1418–26.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5049634/pdf/ANAE-70-1418.pdf> (27. 11. 2017).

Damjanovska M, Cvetko E, Kuroda MM, et al. Neurotoxicity of intraneuronal injection of bupivacaine liposome injectable suspension versus bupivacaine hydrochloride in a porcine model. *Vet Anaesth Analg* 2019; 46(2): 236–45. [https://www.vaajournal.org/article/S1467-2987\(18\)30264-2/fulltext](https://www.vaajournal.org/article/S1467-2987(18)30264-2/fulltext) (5. 2. 2019).

De Lorenzi D, Mandara MT. The central nervous system. In: Raskin RE, Meyer DJ, eds. *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2010: 325–65.

Di Terlizzi R, Platt SR. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals. Part II. analysis. *Vet J* 2009; 180(1): 15–32.

Doherty CM, Forbes RB. Diagnostic lumbar puncture. *Ulster Med J* 2014; 83(2): 93–102.

Dräger C, Benziger D, Gao F, Berde CB. Prolonged intercostal nerve blockade in sheep using controlled-release of bupivacaine and dexamethasone from polymer microspheres. *Anesthesiology* 1998; 89(4): 969–79.

Dullenkopf A, Borgeat A. Lokalanästhetika. *Anaesthesist* 2003; 52(4): 329–40.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Textbook of veterinary anatomy*. 4th ed. St. Louis: Saunders, 2010: 268–331.

Eijkelkamp N, Linley JE, Baker MD, et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain* 2012; 135: 2585–612.

Eisenach JC, Yaksh TL. Spinal Exparel® - an extended duration of preclinical study needed.  
Br J Anaesth 2019;122(3): 298–300.

Epstein-Barash H, Shichor I, Kwon AH, et al. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(17): 7125–30.

Erlanger J, Gasser HS. The Action potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves. Am J Physiol 1929; 92(1): 43–82.

Ferrillo MG. Treatment of complex regional pain syndrome with stellate ganglion local anesthetic blockade: a case report of one patient's experiences with traditional bupivacaine HCl and liposome bupivacaine. Clin Case Rep 2016; 4(9): 861–5.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5018589/> (28. 10. 2019).

Fletcher TF. Spinal cord and meninges. In: Evans H, de Lahunta A, eds. Miller's anatomy of the dog. 4th ed. St. Louis: Saunders, 2013: 589–610.

Gambling D, Hughes T, Martin G, Horton W, Manvelian G. A comparison of Depodur™, a novel, single-dose extended-release epidural morphine, with standard epidural morphine for pain relief after lower abdominal surgery. Anesth Analg 2005; 100(4): 1065–74.

Gan TJ. Poorly controlled postoperative pain: prevalence, consequences, and prevention. J Pain Res 2017; 10: 2287–98.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5626380/pdf/jpr-10-2287.pdf> (28.10.2019).

Glantz MJ, LaFollette S, Jaeckle KA, et al. Randomized trial of a slow-release versus a standard formulation of cytarabine for the intrathecal treatment of lymphomatous meningitis. J Clin Oncol 1999; 17(10): 3110–6.

Golf M, Daniels SE, Onel E. A phase 3, randomized, placebo-controlled trial of DepoFoam® bupivacaine (extended-release bupivacaine local analgesic) in bunionectomy. Adv Ther 2011; 28(9): 776–88.

Gorfine SR, Onel E, Patou G, Krivokapic ZV. Bupivacaine extended-release liposome injection for prolonged postsurgical analgesia in patients undergoing hemorrhoidectomy: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.  
*Dis Colon Rectum* 2011; 54(12): 1552–9.

Gorgi AA, Hofmeister EH, Higginbotham MJ, Kent M. Effect of body position on cranial migration of epidurally injected methylene blue in recumbent dogs.  
*Am J Vet Res* 2006; 67(2): 219–21.

Gough A. Laboratory findings. In: Gough A, eds. Differential diagnosis in small animal medicine. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007: 292–382.

Hadzic A, Minkowitz HS, Melson TI, et al. Liposome bupivacaine femoral nerve block for postsurgical analgesia after total knee arthroplasty. *Anesthesiology* 2016; 124(6): 1372–83.

Hamilton TW, Athanassoglou V, Mellon S, et al. Liposomal bupivacaine infiltration at the surgical site for the management of postoperative pain.

Cochrane Database Syst Rev 2017; 2: CD011419. (71 str.)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD011419.pub2/abstract> (28. 10. 2019).

Hamilton TW, Athanassoglou V, Trivella M, et al. Liposomal bupivacaine peripheral nerve block for the management of postoperative pain.

Cochrane Database Syst Rev 2016; 8: CD011476. (47 str.)

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD011476.pub2/epdf/standard> (28.10.2019).

Hara K, Sakura S, Yokokawa N, Tadenuma S. Incidence and effects of unintentional intraneuronal injection during ultrasound-guided subgluteal sciatic nerve block.

*Reg Anesth Pain Med* 2012; 37(3): 289–93.

Hellyer PW, Robertson SA, Fails AD. Pain and its management. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, eds. Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007: 31–57.

Howell SB. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system: DepoFoam technology. *Cancer J* 2001; 7(3): 219–27.

Hu D, Onel E, Singla N, Kramer WG, Hadzic A. Pharmacokinetic profile of liposome bupivacaine injection following a single administration at the surgical site. *Clin Drug Investig* 2013; 33(2): 109–15.

Ilfeld BM. Liposome bupivacaine in peripheral nerve blocks and epidural injections to manage postoperative pain. *Expert Opin Pharmacother* 2013; 14(17): 2421–31.

Jaggy A, Spiess B. Neurological examination of small animals. In: Jaggy A, eds. Small animal neurology: an illustrated text. Hannover: Schlütersche, 2010: 1–38.

Jia X, Colombo G, Padera R, Langer R, Kohane DS. Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid. *Biomaterials* 2004; 25(19): 4797–804.

Jiménez-Almonte JH, Wyles CC, Wyles SP, et al. Is Local infiltration analgesia superior to peripheral nerve blockade for pain management after THA: a network meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2016; 474(2): 495–516.

Johansen A, Romundstad L, Nielsen CS, Schirmer H, Stubhaug A. Persistent postsurgical pain in a general population: prevalence and predictors in the Tromsø study. *Pain* 2012; 153(7): 1390–6.

<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=22445291> (19. 11. 2018).

Jorfeldt L, Löfström B, Pernow B, et al. The effect of local anaesthetics on the central circulation and respiration in man and dog. *Acta Anaesthesiol Scand* 1968; 12(4): 153–69.

Joshi GP, Patou G, Kharitonov V. The safety of liposome bupivacaine following various routes of administration in animals. *J Pain Res* 2015; 8: 781–9.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634838/> (28. 10. 2019).

Knych HK, Mama KR, Moore CE, Hill AE, Mckemie DS. Plasma and synovial fluid concentrations and cartilage toxicity of bupivacaine following intra-articular administration of a liposomal formulation to horses. *Equine Vet J* 2019; 51(3): 408-14.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/evj.13015> (21. 11. 2018).

Kobe JM, Flisar Ž. Priporočeni postopki za osnovne laboratorijske preiskave likvorja.  
Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo, 2004.

Koenig HE, Lieblich HG, Červeny C. Nervous system (systema nervosum). In: Koenig HE, Lieblich HG, eds. Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas. Stuttgart: Schattauer, 2004: 465–536.

Koenig HE, Lieblich HG. Axial skeleton (skeleton axiale). In: Koenig HE, Lieblich HG, eds. Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas. Stuttgart: Schattauer, 2004: 27–96.

Kohane DS, Langer R. Biocompatibility and drug delivery systems.  
*Chem Sci* 2010; 1: 441–6.  
<http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2010/sc/c0sc00203h> (28. 10. 2019).

Kohane DS, Lipp M, Kinney RC, et al. Biocompatibility of lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine in the epineurium. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(3): 450–9.

Kohane DS, Smith SE, Louis DN, et al. Prolonged duration local anesthesia from tetrodotoxin-enhanced local anesthetic microspheres. *Pain* 2003; 104(12): 415–21.

Kopacz DJ, Lacouture PG, Wu D, et al. The dose response and effects of dexamethasone on bupivacaine microcapsules for intercostal blockade (T9 to T11) in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2003; 96(2): 576–82.

Kuang MJ, Du Y, Ma JX, et al. The efficacy of liposomal bupivacaine using periarticular injection in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *J Arthroplasty* 2017; 32(4): 1395–402.

Kulkarni MD, Samant SR, Yadav GB, Khanvilkar AV, Khasnis MW. Diagnostic importance of cerebrospinal fluid in pathognomonic condition. *Vet World* 2009; 2(11): 441–3.

Kumar M, Chawla R, Goyal M. Topical anesthesia. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2015; 31(4): 450–6.

Lafont ND, Boogaerts JG, Legros FJ. Use of liposome-associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. *Anesth Analg* 1994; 79(4): 818.

Lambert WJ, Los K. DepoFoam multivesicular liposomes for the sustained release of macromolecules. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, eds. Modified-release drug delivery technology. 2nd ed. Vol. 1. New York: Informa Healthcare, 2008: 207–14.

Lascelles BDX. Surgical pain: pathophysiology, assessment, and treatment strategies. In: Tobias KM, Johnston SA, eds. Veterinary surgery: small animal. Vol. 1. St. Louis: Saunders, 2012: 237–47.

Lerche P. Introduction. In: Lerche P, Aarnes TK, Covey-Crump G, Taboada FM, eds. Handbook of small animal regional anesthesia and analgesia techniques. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 1–13.

Li C, Qu J, Pan S, Qu Y. Local infiltration anesthesia versus epidural analgesia for postoperative pain control in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2018; 13(1): e112. (11 str.)  
<https://josr-online.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13018-018-0770-9> (27. 11. 2018).

Listing H, Pöpping D. Pro: epidural analgesia remains the gold standard for abdominal and thoracic surgery.

*Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2018; 53(4): 237–44.

Liu SS, YaDeau JT, Shaw PM, et al. Incidence of unintentional intraneurial injection and postoperative neurological complications with ultrasound-guided interscalene and supraclavicular nerve blocks. *Anaesthesia* 2011; 66(3): 168–74.

Lorenz MD, Coates JR, Kent M. Pain. In: *Handbook of veterinary neurology*. 5th ed. St. Louis: Saunders, 2011a: 413–31.

Lorenz MD, Coates JR, Kent M. *Handbook of veterinary neurology*. 5th ed. St. Louis: Saunders, 2011b: 2–36.

Lorenz MD, Coates JR, Kent M. *Handbook of veterinary neurology*. 5th ed. St. Louis: Saunders, 2011c: 37–57.

Löscher W, Ganter M, Fassbender CP. Correlation between drug and metabolite concentrations in plasma and anesthetic action of ketamine in swine. *Am J Vet Res* 1990; 51(3): 391–8.

Malik O, Kaye AD, Kaye A, Belani K, Urman RD. Emerging roles of liposomal bupivacaine in anesthesia practice. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2017; 33(2): 151–6.

Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, et al. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits.  
*Anesth Analg* 1997; 85(6): 1331–6.

Mantripragada S. DepoFoam technology. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, eds. Modified-release drug delivery technology. 2nd ed. Vol. 2. New York: Informa Healthcare, 2008: 705–12.

Martínez-Miró S, Tecles F, Ramón M, et al. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res* 2016; 12: e171. (9 str.)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992232/> (1. 12. 2018).

Martin-Flores M. Clinical pharmacology and toxicology of local anesthetics and adjuncts. In: Campoy L, Read MR, eds. Small animal regional anesthesia and analgesia. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 25–40.

Masters DB, Berde CB, Dutta SK, et al. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix.  
*Anesthesiology* 1993; 79(2): 340–6.

Matowicka-Karna J. Markers of inflammation, activation of blood platelets and coagulation disorders in inflammatory bowel diseases.  
*Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2016; 70: e305–12.  
<http://www.phmd.pl/api/files/view/116871.pdf> (1. 12. 2018).

McAlvin JB, Padera RF, Shankarappa SA, et al. Multivesicular liposome bupivacaine at the sciatic nerve. *Biomaterials* 2014; 35(15): 4557–64.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999413/pdf/nihms573712.pdf> (28. 10. 2019).

McAlvin JB, Reznor G, Shankarappa SA, Stefanescu CF, Kohane DS. Local toxicity from local anesthetic polymeric microparticles.

Anesth Analg 2013; 116(4): 794–803.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3606664/> (21. 11. 2018).

McCarthy GC, Megalla SA, Habib AS. Impact of intravenous lidocaine infusion on postoperative analgesia and recovery from surgery a systematic review of randomized controlled trials. Drugs 2010; 70(9): 1149–63.

McGlone JJ, Salak JL, Lumpkin EA, et al. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers.

J Anim Sci 1993; 71(4): 888–96.

Muir WW. Considerations for general anesthesia. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, eds. Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007: 7–31.

Musk GC, Zwierzchoniewska M, He B. Catheterization of the urethra in female pigs. Lab Anim 2015; 49(4): 345–8.

Ngan Kee WD, Ng FF, Khaw KS, Tang SPY, Koo AGP. Dose-Response curves for intrathecal bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine given for labor analgesia in nulliparous women. Reg Anesth Pain Med 2017; 42(6): 788–92.

Otero PE, Campoy L. Epidural and spinal anesthesia. In: Campoy L, Read MR, eds. Small animal regional anesthesia and analgesia. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 227–60.

Pacira Pharmaceuticals. Exparel (bupivacaine liposome injectable suspension): product monograph. Parsippany, NJ: Pacira Pharmaceuticals, 2018.

[https://www.exparel.com/sites/default/files/EXPAREL\\_Prescribing\\_Information.pdf](https://www.exparel.com/sites/default/files/EXPAREL_Prescribing_Information.pdf) (7. 2. 2018).

Padera R, Bellas E, Tse JY, Hao D, Kohane DS. Local myotoxicity from sustained release of bupivacaine from microparticles. *Anesthesiology* 2008; 108(5): 921–8.

Patenaude M, Hoare T. Injectable, mixed natural-synthetic polymer hydrogels with modular properties. *Biomacromolecules* 2012; 13(2): 369–78.

Pawson P, Forsyth S. Anesthesia agents. In: Maddison J, Page S, Church D, eds. Small animal clinical pharmacology. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2008: 83–112.

Petzold A, Sharpe LT, Keir G. Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. *Neurocrit Care* 2006; 4(2): 153–62.

Radlinsky MG, Mason DE, Roush JK, Pineda R. Use of a continuous, local infusion of bupivacaine for postoperative analgesia in dogs undergoing total ear canal ablation. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227(3): 414–9.

Ramsey I. BSAVA small animal formulary. 7th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Society, 2011: 43–4.

Read MR. Equipment for loco-regional anesthesia and analgesia. In: Campoy L, Read MR, eds. Small animal regional anesthesia and analgesia. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 43–64.

Rice DC, Cata JP, Mena GE, et al. Posterior intercostal nerve block with liposomal bupivacaine: an alternative to thoracic epidural analgesia. *Ann Thorac Surg* 2015; 99(6): 1953–60.

[http://www.annalsthoracsurgery.org/article/S0003-4975\(15\)00289-1/fulltext](http://www.annalsthoracsurgery.org/article/S0003-4975(15)00289-1/fulltext) (28. 10. 2019).

Richard BM, Newton P, Ott LR, et al. The safety of EXPAREL® (bupivacaine liposome injectable suspension) administered by peripheral nerve block in rabbits and dogs. *J Drug Deliv* 2012; 2012: e962101 (10 str.)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270427/pdf/JDD2012-962101.pdf> (18. 3. 2017).

Richard BM, Rickert DE, Newton PE, et al. Safety evaluation of EXPAREL (DepoFoam bupivacaine) administered by repeated subcutaneous injection in rabbits and dogs: species comparison. *J Drug Deliv* 2011; 2011: e467429 (14 str.)  
<https://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/467429/> (28. 10. 2019).

Rwei AY, Sherburne RT, Zurakowski D, Wang B, Kohane DS. Prolonged duration local anesthesia using liposomal bupivacaine combined with liposomal dexamethasone and dexmedetomidine. *Anesth Analg* 2018; 126(4): 1170–5.

Scholz A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth* 2002; 89(1): 51–62.

Schroeder K. History of regional anesthesia. In: Campoy L, Read MR, eds. *Small animal regional anesthesia and analgesia*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013: 3–9.

Schwarzkopf R, Drexler M, Ma MW, et al. Is there a benefit for liposomal bupivacaine compared to a traditional periarticular injection in total knee arthroplasty patients with a history of chronic opioid use? *J Arthroplasty* 2016; 31(8): 1702–5.

Shaw KA, Moreland C, Jacobs J, et al. Improved chondrotoxic profile of liposomal bupivacaine compared with standard bupivacaine after intra-articular infiltration in a porcine model. *Am J Sports Med* 2018; 46(1): 66–71.

Sivevski AG, Karadjova D, Ivanov E, Kartalov A. Neuraxial anesthesia in the geriatric patient. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: e254 (4 str.)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165911/> (27. 11. 2018).

Skarda RT, Tranquilli WJ. Local and regional anesthetic and analgesic techniques: dogs. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, eds. *Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia*. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007a: 561–697.

Skarda RT, Tranquilli WJ. Local anesthetics. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, eds. *Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia*. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007b: 395–418.

Soerensen DD, Pedersen LJ. Infrared skin temperature measurements for monitoring health in pigs: a review. *Acta Vet Scand* 2015; 57(1): e5 (11 str.)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337315/> (30. 11. 2018).

Stokes AL, Adhikary SD, Quintili A, et al. Liposomal bupivacaine use in transversus abdominis plane blocks reduces pain and postoperative intravenous opioid requirement after colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2017; 60(2): 170–7.

Stopar-Pintaric T, Hadzic A, Strbenc M, et al. Inflammatory response after injection of aqueous gel into subarachnoid space in piglets. *Reg Anesth Pain Med* 2013; 38(2): 100–5.

Swindle MM. Sample collection series: cerebrospinal fluid collection in swine. Sinclair BioResources, LLC 2009. (1 str.)  
<https://www.sinclairresearch.com/assets/sites/2/Cerebrospinal-Fluid-Collection.pdf> (28. 10. 2019).

Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009; 73(22): 1914–22.

Ueno T, Tsuchiya H, Mizogami M, Takakura K. Local anesthetic failure associated with inflammation: verification of the acidosis mechanism and the hypothetic participation of inflammatory peroxynitrite. *J Inflamm Res* 2008; 1: 41–8.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218719/> (4. 12. 2018).

Vandepitte C, Kuroda M, Witvrouw R, et al. Addition of liposome bupivacaine to bupivacaine HCl versus bupivacaine HCl alone for interscalene brachial plexus block in patients having major shoulder surgery. *Reg Anesth Pain Med* 2017; 42(3): 334–41.

Verlinde M, Hollmann MW, Stevens MF, et al. Local anesthetic-induced neurotoxicity.

Int J Mol Sci 2016; 17(3): e339 (17 str.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813201/pdf/ijms-17-00339.pdf> (28. 10. 2019).

Viscusi ER, Candiotti KA, Onel E, Morren M, Ludbrook GL. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposome bupivacaine administered via a single epidural injection to healthy volunteers. Reg Anesth Pain Med 2012; 37(6): 616–22.

Viscusi ER, Sinatra R, Onel E, Ramamoorthy SL. The safety of liposome bupivacaine, a novel local analgesic formulation. Clin J Pain 2014; 30(2): 102–10.

Wang CF, Djalali AG, Gandhi A, et al. An absorbable local anesthetic matrix provides several days of functional sciatic nerve blockade. Anesth Analg 2009; 108(3): 1027–33.

Wang X, Xiao L, Wang Z, Zhao G, Ma J. Comparison of peri-articular liposomal bupivacaine and standard bupivacaine for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. Int J Surg 2017; 39: 238–48.

[http://www.journal-surgery.net/article/S1743-9191\(17\)30134-6/fulltext](http://www.journal-surgery.net/article/S1743-9191(17)30134-6/fulltext) (28. 10. 2019).

Weldon C, Ji T, Nguyen MT, et al. Nanoscale bupivacaine formulations to enhance the duration and safety of intravenous regional anesthesia.

ACS Nano 2019; 13(1): 18-25. (26 str.)

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b05408/> (21. 11. 2018).

Yu ZX, Yang ZZ, Yao LL. Effectiveness of liposome bupivacaine for postoperative pain control in total knee arthroplasty: a PRISMA-compliant meta-analysis of randomized controlled trials. Medicine (Baltimore) 2018; 97(13): e0171 (6 str.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5895431/> (21. 11. 2018).

Zel J, Hadzic A, Cvetko E, et al. Neurological and histological outcomes after subarachnoid injection of a liposomal bupivacaine suspension in pigs: a pilot study.  
Br J Anaesth 2019; 122(3): 379–87.

Zimmer T, Haufe V, Blechschmidt S. Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. Glob Cardiol Sci Pract 2014; 2014(4): 449–63.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355518/> (28. 10. 2019).

## 11 PRILOGE

### 11.1 PRILOGA 1

Tabela 9: Ocena nocicepcije v urah po aplikaciji testne učinkovine

Table 9: Evaluation of nociception in hours after intrathecal application of tested substances

Ure po aplikaciji		1	2	3	4	5	6	7	17–20	21–24	25–28
Prašič / testna učinkovina											
2 / bupi 3 ml		-2	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
19 / bupi 3 ml		-2	-2	-2	-1	-1	0	0	0	0	0
23 / bupi 3 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
24 / bupi 3 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
25 / bupi 3 ml		-2	-2	-1	0	0	0	0	0	0	0
3 / LB 1,5 ml		-2	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
9 / LB 1,5 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
10 / LB 1,5 ml		-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
20 / LB 1,5 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
21 / LB 1,5 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
4 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	0
8 / LB 3 ml		-2	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0
15 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
17 / LB 3 ml		-2	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0
18 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
5 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	0	0	0	-1	-1	-1
6 / LB 5 ml		-2	-1	-1	-1	0	0	0	0	-1	-1
7 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	-1	0	0	0	-1	0
13 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	-1
14 / LB 5 ml		-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	-1	-1
1 / NaCl 3 ml		-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 / NaCl 3 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 / NaCl 3 ml		-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 / NaCl 3 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 / NaCl 3 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Nevrološke ocene se nanašajo na najnižjo oceno zadnjih okončin v določeni uri oziroma intervalu ocenjevanja. 1–25: oznake prašičev od 1–25; bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 3 mL; LB 1,5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 1,5 mL. Prikazani so časovni intervali, v katerih smo opazili nevrološke spremembe. 0: primerna reakcija; -1: oslabljena reakcija; -2: odsotna reakcija

Legend: Neurological evaluations refer to the lowest observed grade on the hind limbs in an evaluated interval. 1–25: number of pigs 1–25; bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 3 mL; LB 1.5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 1.5 mL. Intervals with observed neurological changes are shown. 0: adequate reaction; -1: altered reaction; -2: absent reaction

## 11.2 PRILOGA 2

Tabela 10: Ocena propriocepceje v urah po aplikaciji testne učinkovine

Table 10: Evaluation of proprioception in hours after intrathecal application of tested substances

Ure po aplikaciji		1	2	3	4	5	6	7	17–20	21–24	25–28	29–32
Prašič / testna učinkovina												
2 / bupi 3 ml		-2	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 / bupi 3 ml		-2	-2	-2	-2	-1	0	0	0	0	0	0
23 / bupi 3 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
24 / bupi 3 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
25 / bupi 3 ml		-2	-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
3 / LB 1,5 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
9 / LB 1,5 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
10 / LB 1,5 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 / LB 1,5 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
21 / LB 1,5 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0
8 / LB 3 ml		-2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
15 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17 / LB 3 ml		-2	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
18 / LB 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	0	0	0	-1	-1	-1	-1
6 / LB 5 ml		-2	-2	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	0
7 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	-1	0	0	0	-1	0	0
13 / LB 5 ml		-2	-2	-1	-1	-1	-1	0	0	0	-1	0
14 / LB 5 ml		-2	-1	-1	-1	0	0	0	0	-1	-1	0
1 / NaCl 3 ml		-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 / NaCl 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 / NaCl 3 ml		-2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 / NaCl 3 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 / NaCl 3 ml		-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Nevrološke ocene se nanašajo na najnižjo oceno zadnjih okončin v določeni uri oziroma intervalu ocenjevanja. 1–25: oznake prašičev od 1–25; bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 3 mL; LB 1,5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 1,5 mL. Prikazani so časovni intervali, v katerih smo opazili nevrološke spremembe. 0: primerna reakcija; -1: oslabljena reakcija; -2: odsotna reakcija

Legend: Neurological evaluations refer to the lowest observed grade on the hind limbs in an evaluated interval. 1–25: number of pigs 1–25; bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL –liposome bupivacaine 1.33%, 3 mL; LB 1.5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 1.5 mL. Intervals with observed neurological changes are shown. 0: adequate reaction; -1: altered reaction; -2: absent reaction

### 11.3 PRILOGA 3

Tabela 11: Ocena ataksije v urah po aplikaciji testne učinkovine

Table 11: Evaluation ataxia in hours after intrathecal application of tested substances

Ure po aplikaciji		1	2	3	4	5	6	7	17–20	21–24	25–28
Prašič / testna učinkovina											
2 / bupi 3 ml		1	1	4	4	4	4	4	4	4	4
19 / bupi 3 ml		1	1	1	2	4	4	4	4	4	4
23 / bupi 3 ml		1	2	3	4	4	4	4	4	4	4
24 / bupi 3 ml		1	3	3	4	4	4	4	4	4	4
25 / bupi 3 ml		1	1	2	4	4	4	4	4	4	4
3 / LB 1,5 ml		1	1	3	4	4	4	4	4	4	4
9 / LB 1,5 ml		1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
10 / LB 1,5 ml		3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
20 / LB 1,5 ml		1	3	3	4	4	4	4	4	4	4
21 / LB 1,5 ml		1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
4 / LB 3 ml		1	2	4	4	4	4	4	3	3	4
8 / LB 3 ml		1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
15 / LB 3 ml		1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
17 / LB 3 ml		1	3	3	3	3	4	4	4	4	4
18 / LB 3 ml		1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
5 / LB 5 ml		1	1	3	4	4	4	4	2	1	1
6 / LB 5 ml		1	1	2	4	4	4	4	4	3	4
7 / LB 5 ml		1	1	2	4	4	4	4	4	4	4
13 / LB 5 ml		1	1	4	4	3	3	3	4	4	4
14 / LB 5 ml		2	3	4	3	4	4	4	4	3	4
1 / NaCl 3 ml		1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
11 / NaCl 3 ml		1	2	4	4	4	4	4	4	4	4
12 / NaCl 3 ml		1	2	4	4	4	4	4	4	4	4
16 / NaCl 3 ml		3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
22 / NaCl 3 ml		3	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Legenda: Nevrološke ocene ataksije se nanašajo oceno v določeni uri oziroma intervalu ocenjevanja. 1 – 25: oznake prašičev od 1 – 25; bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9%, 3 mL (negativna kontrola); LB 5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 3 mL; LB 1,5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 1,5 mL. Prikazani so časovni intervali, v katerih smo opazili nevrološke spremembe. 1: neambulatorno stanje; 2: izrazite motnje v koordinaciji; 3: blage motnje v koordinaciji in hoji; 4: ni odstopanj.

Legend: Neurological evaluations refer to the observed grade in an evaluated interval. 1 – 25: number of pigs 1 – 25; bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 mL (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL –liposome bupivacaine 1.33%, 3 mL; LB 1.5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 1.5 mL. Intervals with observed neurological changes are shown. 1: nonambulatory state; 2: evident impairment of coordination; 3: slight impairment of coordination; 4: no changes

## 11.4 PRILOGA 4

Tabela 12: Ocena odtegnitvenega refleksa v urah po aplikaciji testne učinkovine

Table 12: Evaluation of withdrawal reflex in hours after intrathecal application of tested substances

<b>Prašič / testna učinkovina</b>	<b>Ure po aplikaciji</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
2 / bupi 3 ml	-2	0	0	0
19 / bupi 3 ml	-2	0	0	0
23 / bupi 3 ml	-2	-1	0	0
24 / bupi 3 ml	-2	-1	-1	0
25 / bupi 3 ml	-2	-2	-1	0
3 / LB 1,5 ml	-1	-1	0	0
9 / LB 1,5 ml	-1	0	0	0
10 / LB 1,5 ml	0	0	0	0
20 / LB 1,5 ml	-1	-1	0	0
21 / LB 1,5 ml	-2	-1	0	0
4 / LB 3 ml	-1	0	0	0
8 / LB 3 ml	-2	0	0	0
15 / LB 3 ml	-1	0	0	0
17 / LB 3 ml	-2	0	0	0
18 / LB 3 ml	-2	0	0	0
5 / LB 5 ml	0	0	0	0
6 / LB 5 ml	-1	-1	-1	-1
7 / LB 5 ml	-2	-1	0	0
13 / LB 5 ml	-2	0	0	0
14 / LB 5 ml	0	0	0	0
1 / NaCl 3 ml	-2	0	0	0
11 / NaCl 3 ml	-1	0	0	0
12 / NaCl 3 ml	-1	0	0	0
16 / NaCl 3 ml	0	0	0	0
22 / NaCl 3 ml	0	0	0	0

Legenda: Nevrološke ocene se nanašajo na najnižjo oceno zadnjih okončin v določeni uri oziroma intervalu ocenjevanja. 1–25: oznake prašičev od 1 – 25; bupi 3 ml – bupivakain hidroklorid 0,5%, 3 ml (pozitivna kontrola); NaCl 0,9%, 3 ml (negativna kontrola); LB 5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 5 mL; LB 3 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 3 mL; LB 1,5 mL – liposomalni bupivakain 1,33%, 1,5 mL. Prikazani so časovni intervali, v katerih smo opazili nevrološke spremembe. 0: primerna reakcija; -1: oslabljena reakcija; -2: odsotna reakcija

Legend: Neurological evaluations refer to the lowest observed grade on the hind limbs in an evaluated interval. 1 –25: number of pigs 1 – 25; bupi 3 mL – bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 ml (positive control); NaCl 0.9%, 3 mL (negative control); LB 5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 5 mL; LB 3 mL –liposome bupivacaine 1.33%, 3 mL; LB 1.5 mL – liposome bupivacaine 1.33%, 1.5 mL. Intervals with observed neurological changes are shown. 0: adequate reaction; -1: altered reaction; -2: absent reaction

## 11.5 ČLANEK

**BJA**

*British Journal of Anaesthesia*, 122 (3): 379–387 (2019)

doi: 10.1016/j.bja.2018.10.025

Advance Access Publication Date: 23 November 2018

Regional Anaesthesia

---

REGIONAL ANAESTHESIA

### Neurological and histological outcomes after subarachnoid injection of a liposomal bupivacaine suspension in pigs: a pilot study

J. Zel<sup>1,\*</sup>, A. Hadzic<sup>2,3</sup>, E. Cvetko<sup>4</sup>, A. Seliskar<sup>1</sup>, M. Damjanovska<sup>5</sup>,  
M. M. Kuroda<sup>2,6</sup>, S. Sega Jazbec<sup>7</sup> and T. Stopar Pintaric<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, Slovenia, <sup>2</sup>NYSORA (The New York School of Regional Anaesthesia), New York, NY, USA, <sup>3</sup>Department of Anaesthesiology, Ziekenhuis Oost-Limburg, Genk, Belgium, <sup>4</sup>Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, <sup>5</sup>Clinical Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, Slovenia, <sup>6</sup>SciMedBE, Leuven, Belgium and <sup>7</sup>Department of Neurology, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

\*Corresponding author. E-mail: jurij.zel@vf.uni-lj.si

 This article is accompanied by an editorial: Spinal Exparel® - an extended duration of preclinical study needed by Eisenach & Yaksh., *Br J Anaesth* 2019;122:298–300, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.11.021>.

---

**Background:** An injectable liposomal bupivacaine suspension (EXPAREL™) is approved by the US Food and Drug Administration for analgesia by tissue infiltration and interscalene brachial plexus, but not for use in the neuraxial space. This pilot study describes neurological and histological outcomes of escalating doses of this extended-release formulation of bupivacaine after subarachnoid administration.

**Methods:** Twenty-five pigs (*Sus scrofa domesticus*) weighing 36.2 (4.4) kg were randomly assigned to one of five groups to receive a subarachnoid injection of sodium chloride 0.9%, 3 ml (negative control), preservative-free bupivacaine hydrochloride 0.5%, 3 ml (positive control), or one of three doses of liposomal bupivacaine suspension 1.33%: 1.5, 3, or 5 ml. After recovering from general anaesthesia, neurological outcomes were assessed by blinded observers. Three weeks later, the animals were sacrificed for histological evaluations of neurotoxicity.

**Results:** Animals that received sodium chloride 0.9%, bupivacaine hydrochloride, or liposomal bupivacaine 1.5 ml recovered within 2, 5, or 4 h, respectively. Animals that received liposomal bupivacaine 3 or 5 ml exhibited signs of neuraxial block (decreased nociception and proprioception) up to 32 h after injection. No histological evidence of neurotoxicity was found in any of the groups.

**Conclusions:** Subarachnoid administration of liposomal bupivacaine in pigs exhibited a dose-response effect, and resulted in longer duration of neuraxial block than bupivacaine hydrochloride without histological evidence of neurotoxicity. Our study contributes preliminary data to inform further toxicological assessments and regulatory approval before subarachnoid administration in humans.

**Keywords:** spinal anaesthesia; local anaesthetics; bupivacaine; extended-release preparations; liposomes

---

**Editorial decision:** 19 October 2018; **Accepted:** 19 October 2018

© 2018 British Journal of Anaesthesia. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
For Permissions, please email: [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)

#### Editor's key points

- Liposomal formulation is an effective method to extend the duration of various drugs, including of the local anaesthetic bupivacaine.
- The safety and efficacy of intrathecal injection of a formulation of liposomal bupivacaine were tested in a pig model.
- Liposomal bupivacaine showed dose-dependent reductions in nociception and proprioception of up to 32 h after injection with no evidence of neurotoxicity.
- Further studies are required to confirm the safety and efficacy of neuraxial injections of liposomal bupivacaine.

Extended-release local anaesthetic formulations of bupivacaine have been developed to prolong the duration of analgesia in neural blockade.<sup>1</sup> Liposomal bupivacaine suspension (DepoFoam bupivacaine; EXPAREL, Pacira Pharmaceuticals, Inc., Parsippany, NY, USA) consists of bupivacaine encapsulated in multivesicular liposomes.<sup>2–6</sup> Liposomal bupivacaine has been approved for analgesia by soft tissue infiltration and for interscalene brachial plexus block, but not for neuraxial application (epidural or subarachnoid injection). In several clinical studies, albeit not consistently, injection of liposomal bupivacaine for nerve blocks and infiltration into the surgical site provided effective extended analgesia and reduced opioid consumption.<sup>3,4,7</sup> Liposomal bupivacaine use in peripheral nerve and epidural blocks resulted in extended sensory block without apparent evidence of neurotoxicity.<sup>8–16</sup> In contrast, data on its pharmacodynamics and any toxicity of subarachnoid liposomal bupivacaine are limited.<sup>17,18</sup> However, such studies in animal models are necessary before human studies because the paucity of protective connective tissue in the subarachnoid space renders delicate neural structures vulnerable to toxicity from prolonged direct exposure to anaesthetics.<sup>19</sup> This pilot study describes the characteristics of neuraxial blockade with escalating subarachnoid doses of liposomal bupivacaine in pigs.

#### Methods

Because of the potential for increased risk of toxicity from prolonged exposure to extended-release formulations, a pilot study using the porcine model was conducted using dosages and volumes studied in humans.

#### Ethics approval

This study was approved by the National Ethics Committee and National Veterinary Administration, licenses U34401-20/2016/4, U34401-20/2016/9, and U34401-20/2016/13.

#### Experimental animals

Twenty-five female pigs (*Sus scrofa domesticus*), hybrids from Landrace and Large White, weighing 36.2 (4.4) kg were included. The animals were obtained from a commercial farm that certified their good general health status 3 days before they were anaesthetised. Pigs were reared according to the Council directive for minimum standards for the protection of pigs (2008/120/EC). Animal care and research procedures complied with relevant national and European legislation. Pigs were

housed in straw-bedded pens in groups of two or three animals at 20–29°C and relative humidity 58–80%, and were fed twice daily with a commercial diet and supplied with water from nipple waterers. Animals were exposed to the natural light/dark cycle with the exception of the first 48 h after general anaesthesia. Animals were clinically and neurologically examined 12 h before anaesthesia to ensure good health status.

#### Study design

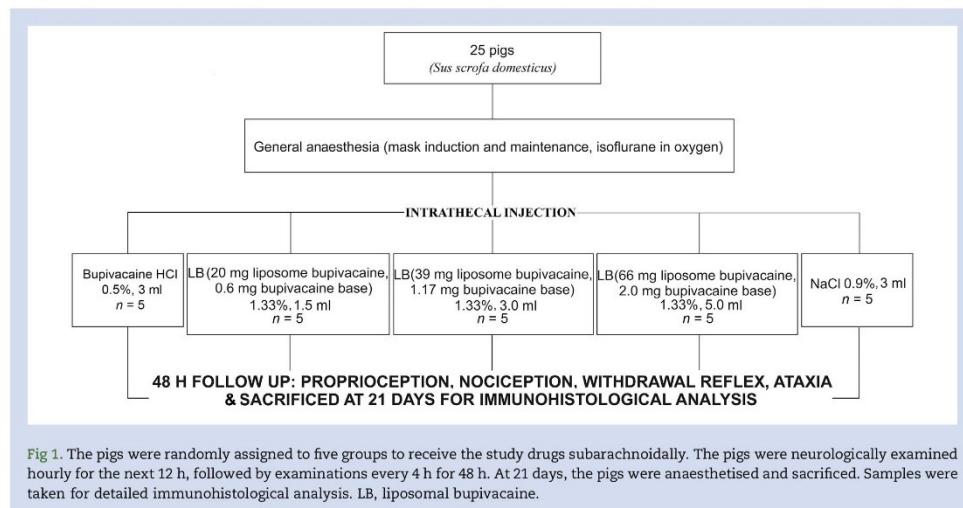
Animals were premedicated with midazolam 0.5 mg kg<sup>-1</sup> (Midazolam Torrex; Torrex Chiesi Pharma GmbH, Vienna, Austria), butorphanol 0.5 mg kg<sup>-1</sup> (Butomidor; Richter Pharma AG, Wels, Austria), and ketamine 10 mg kg<sup>-1</sup> (Narketan; Vetoquinol UK Ltd, Northamptonshire, UK) mixed together and given i.m. Anaesthesia was maintained with isoflurane (Forane; Abbott Laboratories, Lake Forest, IL, USA) in oxygen using a facemask. BP was measured by a Doppler flow monitor (model 811, Parks Medical Electronics, Beaverton, OR, USA). ECG, end-tidal carbon dioxide tension, and pulse oxygen saturation were monitored with a multiparametric monitor (BLT M9000 VET; Guangdong Biolight Meditech, Zhuhai, China). A 22-G catheter (BD Venflon; Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Sweden) was placed in an auricular vein, and lactated Ringer's solution (B. Braun, Melsungen, Germany) was infused at 10 ml kg h<sup>-1</sup>.

The length of the spine was estimated by measuring the distance between the nuchal crest and the base of the tail with the animal in a neutral left lateral recumbent position. A line was drawn between the iliac crests perpendicular to the long axis of the spine to determine the needle insertion site, corresponding to L5–L6 or L6–S1. The hair was clipped and the skin aseptically prepared. An assistant pulled the hind limbs cranially to facilitate insertion of a 22-G Quincke spinal needle (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in a slightly cranial direction until the appearance of CSF was noted.

The pigs were randomly assigned to treatment groups using an online-generated sequence (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Group allocation (concealed in sealed envelopes) indicated which drug was to be administered (five animals per group) (Fig 1). As guidance for selecting the dose for liposomal bupivacaine was not available, study doses were based on published data.<sup>9,20</sup>

- NaCl 0.9%, 3 ml (B. Braun) (negative control)
- preservative-free bupivacaine HCl 0.5%, 3 ml (positive control) (Marcaine spinal 0.5%, Hospira, Lake Forest, IL, USA)
- liposomal bupivacaine mixture 1.33%, 1.5 ml (bupivacaine liposomal injectable suspension 20 mg + bupivacaine base 0.6 mg)
- liposomal bupivacaine mixture 1.33%, 3 ml (39 mg suspension + bupivacaine base 1.17 mg)
- liposomal bupivacaine mixture 1.33%, 5 ml (66 mg suspension + bupivacaine base 2 mg)

As the research assistant who opened the sealed envelopes could not be blinded to the injection solution because of the different volumes being injected, the assistant had no further role in the study. The researchers who assessed the animals were blinded to the injection solution and did not participate in the injection preparation or administration. After discontinuation of general anaesthesia, animals were allowed to recover in pens and were neurologically assessed by two trained members of the research team blinded to drug treatment. After 21 days, animals were re-



**Fig 1.** The pigs were randomly assigned to five groups to receive the study drugs subarachnoidally. The pigs were neurologically examined hourly for the next 12 h, followed by examinations every 4 h for 48 h. At 21 days, the pigs were anaesthetised and sacrificed. Samples were taken for detailed immunohistological analysis. LB, liposomal bupivacaine.

anaesthetised using the same anaesthesia protocol described above, sacrificed using i.v. T-61 0.3 ml kg<sup>-1</sup> euthanasia solution (1 ml containing embutramide 200 mg, mebezonium iodide 50 mg, and tetracaine hydrochloride 5 mg; Intervet International BV, Boxmeer, Netherlands, France), and samples were collected for histological analysis.

#### Neurological evaluations

Two trained research staff members blinded to injection solution evaluated the animals hourly for the first 12 h, and then every 4 h until 48 h after the subarachnoid injections. For the remaining 19 days of the study, animals were observed daily.

Neurological evaluations of all four limbs comprised the following parameters. Nociception (vocal response to painful stimuli) was tested by pinching the dorsal aspect of the fourth digit with forceps to induce pain. The reaction was rated as 0 (loud vocalisation), which was interpreted as normal and compared with altered nociception, which was evaluated as -1 (mild vocalisation) or -2 (no vocalisation). Proprioception (perception or awareness of position and movement of the body) was tested by rating the knuckling reflex. The dorsal aspect of the foot was placed on the ground and the animal's returning of the foot to its physiologic position was evaluated as 0 (quick repositioning), which was interpreted as normal and compared with an altered reflex, graded as -1 (delayed repositioning) or -2 (absent repositioning). In non-ambulatory animals, the knuckling reflex was evaluated as -2. Ataxia was graded as 4 (ambulatory—no neurological impairment in moving pattern) and compared with a state of ataxia which was graded as 1 (non-ambulatory—not able to rise or walk at all), 2 (heavy ataxia—able to stand alone, walking with significant impairment of moving pattern), or 3 (slight ataxia—subtle changes in moving pattern only).

#### Histology

The transverse segments of thoracic and lower lumbar spinal cord with meninges, and nerve specimens of cauda equina were excised. Specimens were frozen in liquid nitrogen (-80°C) or processed for Epon-embedding.<sup>12,21</sup> Frozen specimens of the spinal cord with meninges and the cauda equina were sliced into 7–10 µm transverse sections, stained with haematoxylin/eosin, and processed for immunohistochemistry for T-lymphocyte anti-CD3 antibody labelling (Bio-Rad Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). Positive and negative tissue controls were included with each batch of slides as a check on correct tissue preparation and staining techniques. Sections of porcine thymus served as positive control for the presence of T-lymphocytes. The sections in which the primary antibody was replaced with phosphate-buffered saline or tris-buffered saline remained unstained to serve as negative controls. Infiltration with inflammatory cells in grey, white matter and meninges were histologically assessed.

Epon-embedded cauda equina specimens were fixed in Karnovsky II solution (glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 4.0% in sodium cacodylate 0.1 M buffer, pH 7.4), postfixed in 1:1 solution of aqueous osmium tetroxide 2% and potassium ferrocyanide 3%, dehydrated in graded ethanol solutions and propylene oxide, and infiltrated epon mixtures. Cross-sections of 0.5 µm were cut and stained with toluidine blue and captured by a digital camera (DXM1200F; Nikon, Tokyo, Japan) connected to a microscope (Eclipse E800; Nikon).

Morphometric analysis was performed using the Ellipse program (ViDiTo, version 2.0.7.1, 2004, Kosice, Slovakia). The nerve images with the outer border of the fascicles were delineated at low magnification. The inner areas of three

randomly selected fascicles within the nerves were analysed at high magnification. The outer border of the nerve fibre and the inner border of myelin were circumscribed. Morphometric software assessed (1) the surface percentage of neural tissue, (2) fibre density in the fascicle, (3) the proportion of large fibres, (4) large fibre diameter, (5) axon diameter, (6) myelin width, and (7) G-ratio (axon diameter: large fibre diameter as another indicator of myelinisation). These images were analysed by a trained evaluator blinded to group assignment.

#### Statistical analysis

Results are presented descriptively for this pilot study. Continuous variables are presented as mean (standard deviation); discrete (nominal, ordinal) variables as  $n$  (%). The Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for descriptive summaries.

### Results

All 25 animals successfully completed the protocol (Fig 1). Mean body mass and mean estimated spine length were similar among the five groups: 36.2 (4.4) kg and 77.9 (5.6) cm, respectively.

The neurological data presented in this report pertain to changes observed in the hind legs, consistent with subarachnoid administration. No neurological impairment of the front limbs was observed beyond emergence of anaesthesia. No animal exhibited abnormal breathing patterns, dysfunction of urination, or both during any of the daily observations.

#### Nociception

##### Saline and bupivacaine

Nociception returned to normal within 2 h after injection of saline 0.9% and within 4 h after injection of bupivacaine HCl 15 mg; a single animal in the bupivacaine group recovered nociception after 5 h.

##### Liposomal bupivacaine mixtures

All doses of liposomal bupivacaine impaired nociception. In animals that received liposomal bupivacaine 1.5 ml (20 mg), nociception returned to normal within 4 h; however, in animals that received 3 ml (39 mg) or 5 ml (66 mg), nociception returned to normal within 6 and 8 h, respectively. Decreased nociception reappeared between 17 and 28 h in one animal that received liposomal bupivacaine 3 ml (39 mg) and in five out of five animals that received 5 ml (66 mg). No alteration in nociception was detected in any of the groups after 28 h (Fig 2).

#### Proprioception

##### Saline and bupivacaine

Animals that received saline recovered proprioception within 3 h after injection. Animals that received bupivacaine 15 mg showed normal proprioception within 4 h after injection; a single animal recovered normal proprioception after 5 h.

##### Liposomal bupivacaine mixtures

All doses of liposomal bupivacaine affected proprioception. While proprioception returned to normal with liposomal

bupivacaine 1.5 ml (20 mg) and 3 ml (39 mg) within 4–6 h, respectively, the effect of liposomal bupivacaine 5 ml (66 mg) appeared to last up to 8 h. Moreover, decreased proprioception reappeared between 17 and 32 h in one animal that received liposomal bupivacaine 3 ml (39 mg) and in five out of five animals that received 5 ml (66 mg). No alteration in proprioception was detected in any of the groups after 32 h (Fig 2).

#### Ataxia

##### Saline and bupivacaine

No animal showed signs of ataxia 2 h after injection of saline; animals given bupivacaine showed signs of ataxia through 4 h.

##### Liposomal bupivacaine mixtures

Animals that received liposomal bupivacaine 1.5 ml (20 mg) showed signs of ataxia up to 3 h. Ataxia in animals that received 3 ml (39 mg) liposomal bupivacaine resolved within 5 h but returned in one animal between 17 and 24 h. Ataxia in animals that received liposomal bupivacaine 5 ml (66 mg) lasted up to 7 h, returned at 17–20 h in three out of five animals, and lasted through 28 h in one animal (Fig 3).

#### Histology

Cauda equina nerve cross-sections of 0.5  $\mu$ m thickness demonstrated no fascicle damage in any of the groups. Morphometric parameters were similar among the groups (Table 1, Fig 4). T-lymphocytes were scarce and scattered only in meninges, encircling the cauda equina. No T-lymphocytes were found in any of the nerve specimens. Transverse sections of the spinal cord samples demonstrated no pathologic changes in any of the groups. Immunoreactivity for CD3 exhibited solitary T-lymphocytes in the white matter or meninges in all groups (Fig 5).

### Discussion

Our data suggest that application of liposomal bupivacaine in the subarachnoid space results in early and prolonged duration of neural blockade in a dose-dependent manner. This effect was most pronounced in animals that received liposomal bupivacaine 5 ml. The decrease in nociception and proprioception lasted longer than in animals that received bupivacaine 0.5%, 3 ml. Moreover, neural block returned after 17–20 h and lasted up to 32 h. The steep dose-response observed is likely related to the larger doses of free bupivacaine released from the higher doses of liposomal bupivacaine suspension.

Of note, all animals, including those that received saline (placebo), exhibited some impairment of neurological function during the first 2 h after emergence from general anaesthesia, suggesting that early neurological impairment is at least partially related to administration of anaesthesia.<sup>22</sup> In contrast, animals that received bupivacaine showed signs of neurological impairment commensurate with spinal anaesthesia with all animals recovering within 5 h.

The observed neuraxial blockade is consistent with published pharmacokinetic data<sup>7</sup> that suggest that release of bupivacaine base increases at 12 h and continues throughout 72+ h with maximum concentration occurring between 24 and 48 h.<sup>6</sup> This dynamic in the release of bupivacaine base from liposomes<sup>7</sup> appears to correlate well with the

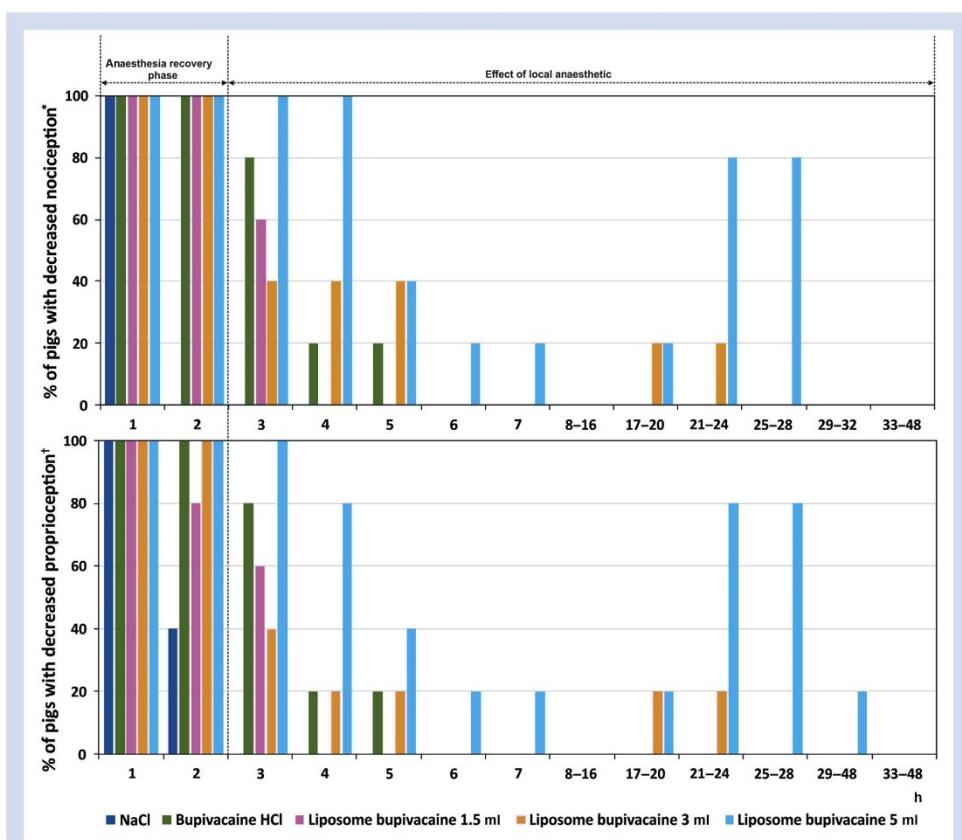


Fig 2. Percentage of pigs with decreased nociception and proprioception by h after subarachnoidal application. \*Decreased nociception defined as no or mild vocalisation when pinching the finger with forceps. †Decreased proprioception defined as a delayed or absent knuckling reflex.

pharmacodynamic data in the current study. Moreover, our data suggest that injection of liposomal bupivacaine in the subarachnoid space could result in longer duration of neural blockade than bupivacaine in a dose-dependent manner. The DepoFoam-based formulations of cytarabine (DepoCyt; Pacira Pharmaceuticals, Inc., Parsippany, New Jersey, USA), morphine (DepoDur; Pacira Pharmaceuticals, Inc., Parsippany, New Jersey, USA), and bupivacaine have safety profiles that are similar to standard formulations of the active drug.<sup>23-29</sup>

None of the pigs exhibited abnormal breathing or impairment of the front legs. Given the anatomical similarities of pig and human spines,<sup>30</sup> this suggests that the dosages and volumes selected for this study are not likely to cause high subarachnoid block in humans. No animals in our study demonstrated neurological deficits beyond 32 h of injection. Nonetheless, this pilot study suggests that a sensory focused sophisticated neurological assessment should be extended

beyond 48 h in order to detect neurological effects of subarachnoid liposomal bupivacaine, particularly with higher doses.<sup>17</sup> None of the animals in our study exhibited cardiovascular instability or urinary voiding disturbance; however, future research should examine the degree of autonomic nervous system blockade and its effects on cardiovascular parameters and urinary retention.

Subarachnoid administration of liposomal bupivacaine exhibited preferential sensory blockade in the doses used in our study. This observation is similar to that reported with epidural administration of liposomal bupivacaine.<sup>8</sup> This is most likely because only small amounts of bupivacaine are released from liposomes over time. As with bupivacaine, small concentrations and doses of local anaesthetics more readily result in autonomic and sensory blockade than in motor block.<sup>9</sup>

Histologically, there was no evidence of neurotoxicity, which is consistent with a previously published report on

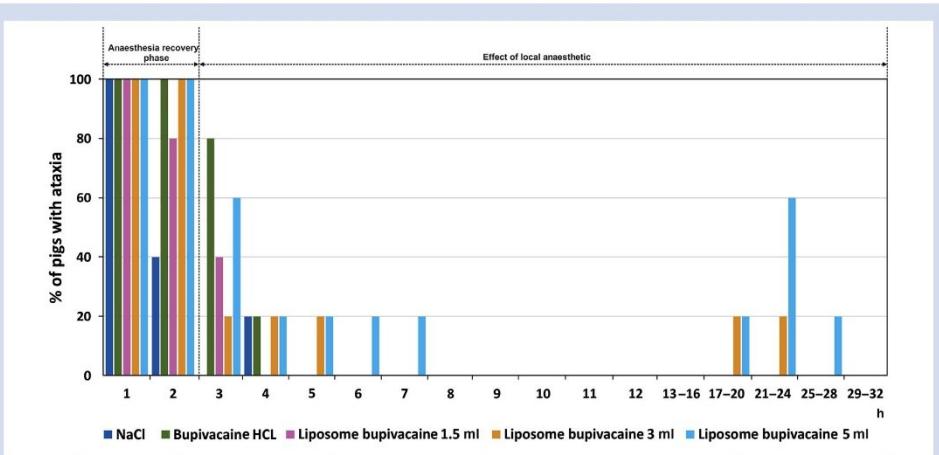


Fig 3. Percentage of pigs showing signs of ataxia by h after subarachnoidal application.

Table 1 Neural tissue morphometric analysis data. Values are mean (standard deviation). \*G ratio defined as axon diameter: large fibre diameter

	NaCl 0.9%, 3 ml	Bupivacaine 0.5%, 3 ml	Liposomal bupivacaine 1.33%, 1.5 ml	Liposomal bupivacaine 1.33%, 3 ml	Liposomal bupivacaine 1.33%, 5 ml
Surface % of neural tissue	66.0 (8.4)	63.6 (4.68)	67.2 (14.6)	68.6 (7.9)	66.4 (5.0)
Fibre density in fascicle ( $N \text{ mm}^{-2}$ )	8500 (1100)	9400 (2000)	11800 (1400)	8800 (2700)	9600 (1500)
Portion of large fibres (%)	68.8 (10.9)	73.4 (13.7)	57.4 (7.24)	72.6 (15.0)	63.8 (5.8)
Large fibre area per total fascicle area (%)	65.8 (5.0)	66.0 (4.7)	61.2 (3.6)	65.4 (6.3)	61.9 (2.0)
Large fibre diameter ( $\mu\text{m}$ )	11.4 (0.3)	10.5 (1.2)	10.1 (0.4)	11.1 (1.4)	10.8 (1.4)
Axon diameter ( $\mu\text{m}$ )	7.6 (0.8)	7.0 (1.0)	6.5 (0.6)	7.2 (1.0)	7.0 (1.2)
Myelin width ( $\mu\text{m}$ )	1.9 (0.3)	1.8 (0.2)	1.8 (0.1)	2.0 (0.2)	1.9 (0.2)
G ratio*	0.7 (0.1)	0.7 (0.03)	0.6 (0.03)	0.6 (0.02)	0.6 (0.03)
Inflammatory cells ( $N \text{ mm}^{-2}$ )	3.9 (1.4)	8.0 (4.2)	7.1 (5.2)	4.6 (3.0)	5.2 (3.1)

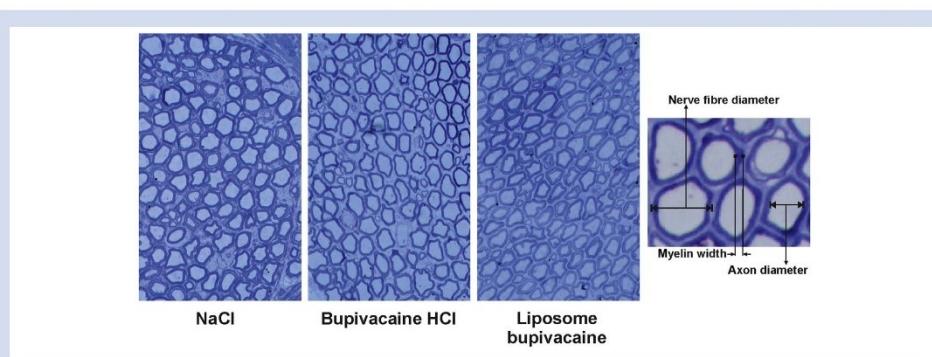
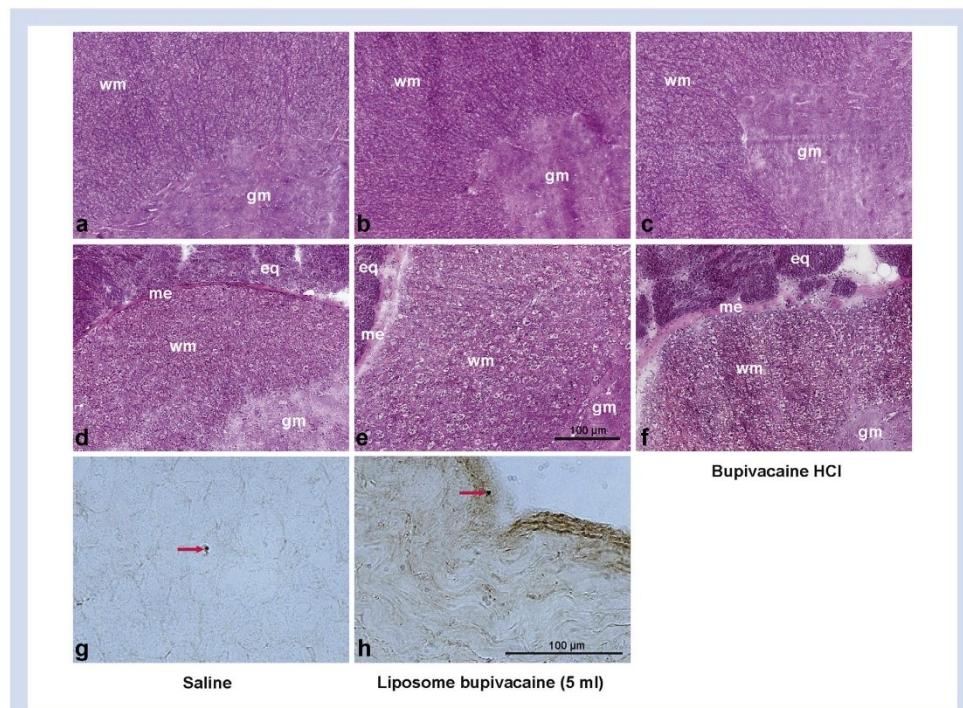


Fig 4. Examples of morphometric analysis cross sections stained with toluidine blue. Detailed morphometric analysis data is listed in Table 1.



**Fig 5.** Transverse sections of thoracic (a–c) and lower lumbar (d–h) spinal cord show no pathologic changes in grey matter (gm), white matter (wm) or meninges (me) or cauda equina (eq) after injection of saline, bupivacaine HCl or liposome bupivacaine. Haematoxylin eosin staining bar 100 µm. Only particular sites of white matter of the spinal cord (g) or meninges (h) exhibited solitary T-lymphocytes after injection of saline, bupivacaine HCl or liposomal bupivacaine. Immunoreactivity for CD3, bar 100 µm.

perineural application in pigs.<sup>12</sup> The histological alterations after subarachnoid injections of liposomal bupivacaine in dogs observed by Joshi and colleagues<sup>17</sup> could have resulted from the relatively high doses used in this smaller animal model. The methodologic differences with our study make direct comparison difficult. Assessment of subtle neurological changes, such as discerning warm-cold, is difficult in experimental animals; therefore, longer-lasting, subclinical neuraxial blockade could not be reliably assessed and may have lasted longer than measured in our study. Nociception was studied by pinching the dorsal aspect of the fourth digit, a standard protocol in canine neurological examination. However, different degrees of impairment in nociception could exist in other dermatomal segments (e.g. thoracic or abdominal), and slight changes in nociception, that may have clinical relevance, might have been missed. Although we did not detect neurological injury, it is possible that additional methods to assess mitochondrial dysfunction, neuronal apoptosis, neuronal membrane disruption, and cell necrosis could be more sensitive and are suggested for future studies.<sup>30</sup> In addition, the disposition of residual drug, if any, should be examined in spinal cord and nerve root tissue in future

studies. It is presumed that local anaesthetics produce neurotoxicity by entering nerve tissue, and that the lipid-rich liposomal bupivacaine suspension rapidly leaves aqueous CSF and lodges in the lipid-rich environment of the spinal cord, where high local concentrations could cause toxicity over prolonged time periods. Currently available local anaesthetics have a narrow therapeutic/toxicity ratio, which is concentration-dependent. As the liposomal bupivacaine suspension is a fixed concentration formulation, we could not vary this ratio, which should be done in future studies. The degree of cephalad spread after subarachnoid injection of liposomal bupivacaine suspension could only be measured grossly by observation of ambulation and daily respiratory assessments. No information is available about cephalad spread of free bupivacaine after injection of liposomal bupivacaine suspension and should be examined in more detail before subarachnoid injection in humans, either in research or clinical practice.

In conclusion, subarachnoid administration of liposomal bupivacaine resulted in longer duration of neural blockade than simple bupivacaine in a dose-dependent pattern without histological evidence of neurotoxicity or inflammatory

response. Our study contributes important data to inform further toxicological assessments in humans. However, it is necessary to evaluate the pharmacodynamic properties of liposomal bupivacaine and dose-response before regulatory approval for subarachnoid administration in humans, either in clinical research or practice.

### Authors' contributions

Study design: AH, EC, MD, TSP. Study conduct: JZ, EC, AS, MD, TSP. Data analysis and interpretation: JZ, EC, MMK, SSJ, TSP. Writing paper, revising paper, and approving the final version: all authors.

### Acknowledgements

We thank I. Blazinovic, M.C. Maasarani, M. Slak, N. Pollak, F. Stendler, M. Stevanec, and A. Vidmar from the Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia; R. Klančnik, student; and A. Nemec Svetec and A. Jenko, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, for technical support.

### Declarations of interest

AH has received research funding and honoraria as a consultant to PACIRA Pharmaceuticals. The other authors declare no competing interests.

### Funding

PACIRA Pharmaceuticals (Parsippany, NJ, USA), grant number 2017-065; Slovenian Research Agency (Ljubljana, Slovenia), group P3-0043, P4-0053 and Tertiary funding from the Clinical Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, University Medical Centre Ljubljana (Ljubljana Slovenia).

### References

- Epstein-Barash H, Shichor I, Kwon AH, et al. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7125–30
- Richard BM, Rickert DE, Newton PE, et al. Safety evaluation of EXPAREL (DepoFoam bupivacaine) administered by repeated subcutaneous injection in rabbits and dogs: species comparison. *J Drug Deliv* 2011; **2011**: 467429
- Golf M, Daniels SE, Onel E. A phase 3, randomized, placebo controlled trial of DepoFoam bupivacaine (extended release bupivacaine local analgesic) in bunionectomy. *Adv Ther* 2011; **28**: 776–88
- Bramlett K, Onel E, Viscusi ER, Jones K. A randomized, double blind, dose ranging study comparing wound infiltration of DepoFoam bupivacaine, an extended-release liposome bupivacaine, to bupivacaine HCl for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty. *Knee* 2012; **19**: 530–6
- Chahar P, Cummings 3rd KC. Liposome bupivacaine: a review of a new bupivacaine formulation. *J Pain Res* 2012; **5**: 257–64
- Hu D, Onel E, Singla N, Kramer WG, Hadzic A. Pharmacokinetic profile of liposome bupivacaine injection following a single administration at the surgical site. *Clin Drug Invest* 2013; **33**: 109–15
- Hadzic A, Minkowitz HS, Melson TI, et al. Liposome bupivacaine femoral nerve block for postsurgical analgesia after total knee arthroplasty. *Anesthesiology* 2016; **124**: 1372–83
- Boogaerts JG, Lafont ND, Declercq AG, et al. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth* 1994; **6**: 315–20
- Viscusi ER, Candiotti KA, Onel E, Morren M, Ludbrook GL. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposome bupivacaine administered via a single epidural injection to healthy volunteers. *Reg Anesth Pain Med* 2012; **37**: 616–22
- Lafont ND, Legros FJ, Boogaerts JG. Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. *Anesthesia* 1996; **51**: 578–9
- Richard BM, Newton P, Ott LR, et al. The safety of EXPAREL (bupivacaine liposome injectable suspension) administered by peripheral nerve block in rabbits and dogs. *J Drug Deliv* 2012; **2012**: 962101
- Damjanovska M, Cvetko E, Hadzic A, et al. Neurotoxicity of perineural vs. intraneuronal extrafascicular injection of liposome bupivacaine in the porcine model of sciatic nerve block. *Anesthesia* 2015; **70**: 1418–26
- McAlvin JB, Padera RF, Shankarappa SA, et al. Multivesicular liposome bupivacaine at the sciatic nerve. *Biomaterials* 2014; **35**: 4557–64
- Lafont ND, Boogaerts JG, Legros FJ. Use of liposome-associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. *Anesth Analg* 1994; **79**: 818
- Kopacz DJ, Lacouture PG, Wu D, Nandy P, Swanton R, Landau G. The dose response and effects of dexamethasone on bupivacaine microcapsules for intercostal blockade (T9 to T11) in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2003; **96**: 576–82
- Vandepitte C, Kuroda M, Witvrouw R, et al. Addition of liposome bupivacaine to bupivacaine HCl versus bupivacaine HCl alone for interscalene brachial plexus block in patients having major shoulder surgery. *Reg Anesth Pain Med* 2017; **42**: 334–41
- Joshi GP, Patou G, Kharitonov V. The safety of liposome bupivacaine following various routes of administration in animals. *J Pain Res* 2015; **8**: 781–9
- Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, et al. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg* 1997; **85**: 1331–6
- Lambert DH, Hurley RJ. Cauda equina syndrome and continuous spinal anesthesia. *Anesth Analg* 1991; **72**: 817–9
- Busscher I, Ploegmakers JJ, Verkerke GJ, Veldhuizen AG. Comparative anatomical dimensions of the complete human and porcine spine. *Eur Spine J* 2010; **19**: 1104–14
- Pintaric TS, Hadzic A, Strbenc M, Podpecan O, Podbegar M, Cvetko E. Inflammatory response after injection of aqueous gel into subarachnoid space in piglets. *Reg Anesth Pain Med* 2013; **38**: 100–5
- Löscher W, Ganter M, Fassbender CP. Correlation between drug and metabolite concentrations in plasma and anesthetic action of ketamine in swine. *Am J Vet Res* 1990; **51**: 391–8
- Lambert WJ, Los K. DepoFoam multivesicular liposomes for the sustained release of macromolecules. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, editors.

- Modified-release drug delivery technology. New York: Informa Healthcare; 2008. p. 207–14
- 24. Howell SB. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system: DepoFoam technology. *Cancer J* 2001; **7**: 219–27
  - 25. Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam<sup>TM</sup>: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multi-vesicular liposome technology. *Clin Pharmacokinet* 2006; **45**: 1153–76
  - 26. Viscusi ER, Sinatra R, Onel E, Ramamoorthy SL. The safety of liposome bupivacaine, a novel local analgesic formulation. *Clin J Pain* 2014; **30**: 102–10
  - 27. Carvalho B, Roland LM, Chu LF, Campitelli 3rd VA, Riley ET. Single dose, extended-release epidural morphine (DepoDur) compared to conventional epidural morphine for post Cesarean pain. *Anesth Analg* 2007; **105**: 176–83
  - 28. Gambling D, Hughes T, Martin G, Horton W, Manvelian G. A comparison of Depodur<sup>TM</sup>, a novel, single-dose extended-release epidural morphine, with standard epidural morphine for pain relief after lower abdominal surgery. *Anesth Analg* 2005; **100**: 1065–74
  - 29. Glantz MJ, LaFollette S, Jaeckle KA, et al. Randomized trial of a slow-release versus a standard formulation of cytarabine for the intrathecal treatment of lymphomatous meningitis. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3110–6
  - 30. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* 2017; **22**: 306–23

Handling editor: H.C. Hemmings Jr