

Agnieszka Stasińska

WPLÝW LIPIDOWYCH POCHODNYCH DOPAMINY
NA CHEMICZNĄ REGULACJĘ ODDYCHANIA U
CZUWAJĄCYCH SZCZURÓW

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Mieczysław Pokorski

Zakład Neurobiologii Oddychania

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej *im.* M. Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Warszawa 2014

SPIS TREŚCI

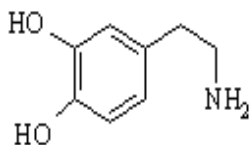
1. Wstęp.....	1-15
1.1 Dopamina-właściwości chemiczne i biologiczne	
1.2 Receptory dopaminergiczne	
1.3 Chemiczna regulacja oddychania	
1.4 Dopamina, a kłębki szyjne	
1.5 N-acylo-dopaminy-lipidowe pochodne dopaminy	
1.5.1 N-oleinoilo-dopamina (OLDA)- jako związek najbardziej aktywny ze wszystkich N-acylo-amin	
1.5.2 N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina - zmetylowana pochodna OLDA (Me-OLDA)	
2. Hipoteza badawcza i cele pracy	16-17
3. Materiał i Metody	18-23
3.1 Zwierzęta doświadczalne	
3.2 Badanie odpowiedzi oddechowych na hipoksję i hiperkapnię u szczurów czuwających	
3.3 Badanie metabolizmu oddechowego u szczurów czuwających	
3.4 Badanie gazometryczne u szczurów uśpionych	
3.5 Zastosowane w doświadczeniach związki chemiczne	
3.6 Analiza danych	
4. Wyniki	24-43
4.1 OLDA	
4.1.1 OLDA, a odpowiedzi oddechowe na hipoksję	
4.1.2 OLDA, a odpowiedzi oddechowe na hiperkapnię	
4.1.3 Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów dopaminowych	
4.1.3.1 Wpływ OLDA na regulację oddychania po uprzednim zablokowaniu receptorów dopaminowych D2 obwodowych	
4.1.3.2 Wpływ OLDA na regulację oddychania po uprzednim zablokowaniu receptorów dopaminowych D2 obwodowych i ośrodkowych	
4.1.4 Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1	
4.1.5 Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 i dopaminowych D2 obwodowych	
4.1.6 OLDA a czułość hipoksyjna	
4.2 Me-OLDA	

4.2.1	Me-OLDA a odpowiedzi oddechowe na hipoksję	
4.2.2	Me-OLDA a odpowiedzi oddechowe na hiperkapnię	
4.2.3	Wpływ Me-OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych	
4.2.4	Wpływ Me-OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1	
4.2.5	Me-OLDA, a czułość hipoksyjna	
4.3	Metabolizm tlenowy	
4.4	Antagoniści i ich wpływ na regulację oddychania	
4.5	Podsumowanie wyników	
5.	Dyskusja	44-51
5.1	Wpływ lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania	
5.2	Lipidowe pochodne dopaminy, a choroba Parkinsona	
5.3	Udział receptorów wanilloidowych w oddziaływaniu lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania	
5.4	Udział receptorów dopaminowych w oddziaływaniu lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania	
5.5	Wpływ lipidowych pochodnych dopaminy na odpowiedź oddechową na hiperkapnię	
5.6	OLDA i Me-OLDA a czułość hipoksyjna	
5.7	OLDA a metabolizm	
6.	Wnioski	52
7.	Streszczenie	53-55
8.	Abstract	56-58
9.	Spis piśmiennictwa	59-63

1. Wstęp

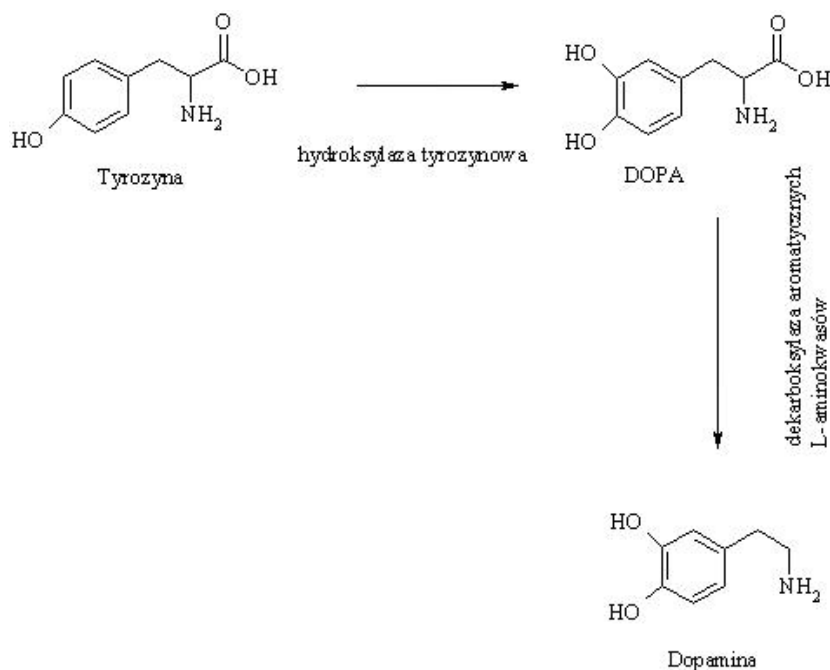
1.1. Dopamina-właściwości chemiczne i biologiczne

Dopamina, będąca aminą katecholową jest jednym z głównych neuroprzekazników występujących w organizmie. Pełna nazwa chemiczna dopaminy brzmi 3,4-dihydroksyfenyletyloamina (1).



Rys. 1. Struktura dopaminy

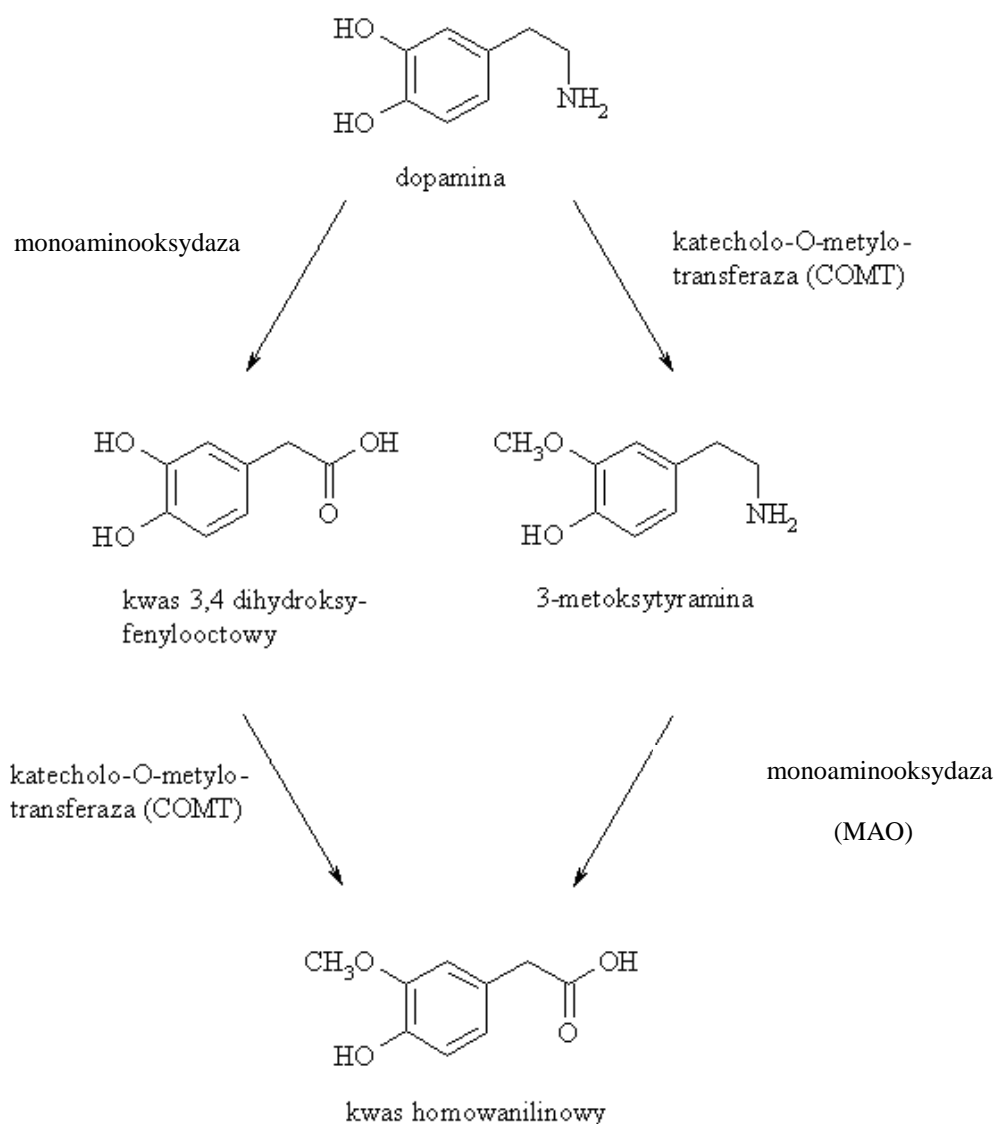
Dopamina jest syntetyzowana na drodze przekształcenia L-tyrozyny za pomocą hydroksylazy tyrozyny w L-dihydroksyfenyloalaninę (L-DOPA). L-DOPA jest następnie dekarboksylowana za pośrednictwem dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów do dopaminy (2). Szlak syntezy dopaminy został przedstawiony na Rys.2.



Rys. 2. Synteza dopaminy

Rysunek pobrany z internetu (<http://en.wikipedia.org/wiki/Dopamine>-domena publiczna)

Metabolizm dopaminy w organizmie zachodzi dwiema ścieżkami, prowadzącymi do tego samego produktu końcowego. Enzymami biorącymi udział w szlaku metabolicznym dopaminy są monoaminooksydaza (MAO) oraz katecholo-O-metylotransferaza (COMT). Pierwszymi produktami reakcji w metabolizmie dopaminy są kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy – DOPAC, bądź 3-metoksytyramina (3-O-metyldopamina) w zależności od enzymu działającego jako pierwszy. Produktem końcowym w każdym przypadku (bez względu na kolejność działania enzymów) będzie kwas homowanilinowy (HVA) (2).



Rys. 3. Metabolizm dopaminy *in vivo*

Rysunek pobrany z internetu (<http://en.wikipedia.org/wiki/Dopamine>-domena publiczna)

Dopamina jako związek hydrofilowy nie przechodzi przez barierę krew-mózg. Jako neuroprzebieżnik ma ograniczony czas działania i co za tym idzie, również ograniczony czas półtrwania, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. W warunkach *in vitro* trzygodzinna inkubacja roztworu dopaminy w Medium 199 (roztworze stosowanym w hodowlach komórkowych) w obecności tkanki przysadki powodowała spadek stężenia dopaminy o ¼, przy czym obecność przeciwutleniacza- kwasu askorbinowego hamowała ten proces. W buforze Krebsa-Henseleita (o składzie zbliżonym do płynu wewnątrzkomórkowego) trzygodzinna inkubacja powodowała rozkład 98% dopaminy obecnej w układzie (3).

Te dwie cechy dopaminy tj. niemożność przechodzenia przez barierę krew-mózg oraz ograniczony czas działania niewątpliwie stwarzają duży problem w prowadzeniu badań naukowych dotyczących dopaminy jak również ograniczają możliwości terapeutycznego zastosowania tego związku chemicznego w chorobach neurodegeneracyjnych.

1.2. Receptory dopaminergiczne

Dopamina podobnie jak inne przebieżniki realizuje swoje liczne funkcje poprzez aktywację specyficznych receptorów umiejscowionych na komórkach docelowych. Wszystkie receptory dopaminowe aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału wchodząc w interakcję z odpowiednimi białkami G. Podstawę klasyfikacji receptorów dopaminowych stanowi związek funkcjonalny tych receptorów z cyklazą adenylnową.

Wyróżniamy dwie podrodziny receptorów dopaminowych:

- podrodzina D1 (D1-like), do której zaliczane są receptory typu D1 i D5 (pobudzenie receptorów podrodziny D1 zwiększa aktywność cyklazy adenylnowej)
- podrodzina D2 (D2-like), do której zaliczane są receptory typu D2, D3, D4 (pobudzenie receptorów podrodziny D2 zmniejsza aktywność cyklazy adenylnowej albo nie ma na nią wpływu) (1).

Receptory dopaminowe występują głównie w mózgu, w szczególności istocie czarnej, prążkowiu i polu brzusznej nakrywki. Neurony dopaminergiczne tworzą cztery

główne szlaki: nigro-striatalny (ruch i koordynacja), mezolimbiczny (układ nagrody, regulacja zachowań emocjonalnych i poznawczych), mezokortykalny (regulacja zachowań emocjonalnych i poznawczych) i guzkowo-lejkowy (regulacja hormonalna) (4).

Wykazano, że receptory dopaminowe typu D1 i D2 są najbardziej „wszędobylskimi” receptorami i w znacznych ilościach występują w większości obszarów mózgu, do których docierają włókna dopaminergiczne. Z kolei rozmieszczenie receptorów D3, D4, D5 jest ograniczone do określonych struktur mózgowych tj. hipokampu oraz mózdzku (1).

Receptor typu D1 jest najbardziej rozpowszechnionym receptorem spośród wszystkich receptorów dopaminowych, D1 mRNA zostało odkryte w prążkowie, jądrze półleżącym przegrody (n. accumbens), opuszce węchowej oraz obszarach limbicznych kory mózgowej, podwzgórzu i wzgórzu (5). Przez wiele lat uważano, że receptory dopaminowe typu D1 umiejscowione są wyłącznie presynaptycznie. Jednakże wykazanie immunoreaktywności receptorów D1 na zakończeniach nerwowych w kompleksie prążkowiec oraz części siateczkowatej istoty czarnej dowiodło obecności w mózgu postsynaptycznych receptorów dopaminowych D1. Uważa się, że receptory te mogą być zaangażowane w złożony proces kontroli syntezy i uwalniania nie tylko dopaminy lecz również innych neuroprzekazników: GABA, kwasu glutaminowego oraz acetylocholino (1).

Receptor typu D2 jest dominującym receptorem w podrodzynie D2 i w zależności od analizowanej struktury mózgowej może stanowić nawet ok. 90% całej populacji receptorów dopaminowych tej podrodziny. Największe zagęszczenie receptorów dopaminowych typu D2 stwierdzono w prążkowie, gałce bladej, jądrze półleżącym przegrody (n. accumbens), opuszce węchowej i istocie czarnej (6). Receptory D2 są umiejscowione post i presynaptycznie (7). Dopaminowe receptory presynaptyczne charakteryzują się 5-100 krotnie większą wrażliwością na dopaminę niż receptory postsynaptyczne (7). Wykazano, że w różnych liniach komórkowych pobudzenie receptorów D2 hamuje aktywność cykazy adenylanowej i w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy cAMP. Pobudzenie receptorów dopaminowych D2 może wpływać w dwojaki sposób na poziom wewnątrzkomórkowego wapnia. Przykładowo w komórkach linii CHO i Lkt⁻ zaobserwowano dwuetapowy wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie (8) natomiast w komórkach linii GH₄C₁ pobudzenie receptora D2 wpływało na szybki spadek stężenia jonów wapniowych (9). Przypuszczalnie, w tym ostatnim

modelu doświadczalnym receptor D2 jest sprzężony poprzez białko G z kanałem K^+ . W wyniku aktywacji kanałów K^+ dochodzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej, zamknięcia zależnych od napięcia kanałów wapniowych, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia napływu jonów wapnia do komórki(10).

Dopamina jako neuroprzebieźnik spełnia wiele różnorodnych funkcji. Jedną z ważniejszych funkcji dopaminy jest regulacja motoryki. Brak stymulacji dopaminowej w przypadku ssaków oznacza akinezę, czyli unieruchomienie. Drastyczne, bo o ponad 80 % obniżenie poziomu dopaminy w jądrach podstawy mózgu, na skutek postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznych szlaku nigrostriatalnego występuje w chorobie Parkinsona (11). Uważa się, że za pewne objawy schizofrenii odpowiada nasiloną transmisją dopaminergiczną w układzie mezolimbicznym, leki stosowane w terapii tego schorzenia działają antagonistycznie w stosunku do receptorów dopaminowych, szczególnie tych z rodziny D2 (7). Za niezwykle ważne uważa się także badanie roli receptorów dopaminowych w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych, szczególnie jeśli uwzględnia się to, że jednym z dwóch osiowych objawów depresji jest anhedonia (utrata zdolności do odczuwania przyjemności), wynikająca z zaburzeń w funkcjonowaniu mózgowego układu nagrody, w którym dopamina odgrywa główną rolę. Zagadnieniem bardzo intensywnie badanym w ostatnich latach jest udział dopaminy i receptorów dopaminowych w powstawaniu uzależnień lekowych. Dopaminowe przekazywanie synaptyczne w powłoce jądra półleżącego przegrody wzrasta po podaniu substancji uzależniających (11). Dopamina odgrywa także istotną rolę w fizjologii szeregu układów obwodowych, modulując pracę nerek i układu krążenia, sekrecję amin katecholowych z rdzenia, a aldosteronu z kory nadnerczy (1).

Ponadto, dopamina jest jednym z ważniejszych neuroprzebieźników zaangażowanych w chemiczną regulację oddychania, działającym w dwojaki sposób – ośrodkowo pobudzając, a obwodowo hamując odpowiedź oddechową. W ośrodkowym układzie nerwowym dopamina występuje w strukturach zlokalizowanych w pniu mózgu wrażliwych na zmianę ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla oraz na pH (12). Ponadto stwierdzono jej obecność w neuronach nerwu zatokowego (odgałęzieniu nerwu językowo-gardłowego) - w zwoju skalistym (13), przekazującego informacje z obwodowych chemoreceptorów, a prowadzącego do jądra pasma samotnego, miejsca integracji sygnału z tych receptorów (14). Na poziomie kłębków szyjnych dopamina występuje w komórkach I typu (15).

1.3. Chemiczna regulacja oddychania

Chemiczna regulacja oddychania polega na dostosowywaniu wentylacji płucnej do zmian ciśnienia parcjalnego tlenu (PaO_2), dwutlenku węgla (PaCO_2) oraz stężenia jonów wodorowych w krwi tętniczej. Proces ten odbywa się na drodze odruchowej, kształtowanej przez sprzężenie zwrotne. Elementem wyjściowym tych sprzężeń jest chemoreceptor obwodowy. Wyróżniamy dwie odrębne pod względem morfologicznym i czynnościowym grupy chemoreceptorów: ośrodkowe i obwodowe (16).

Chemoreceptory ośrodkowe pobudzają oddychanie w reakcji na kwasinę oddechową (zwiększone stężenie CO_2) i kwasinę metaboliczną (zwiększone stężenie jonów H^+). Chemoreceptory te zlokalizowane są obustronnie na brzuszo-bocznej powierzchni opuszki pnia mózgu. Chemoreceptory ośrodkowe odpowiadają za 80% odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię, ponadto reagują na pH płynu zewnątrzkomórkowego w ich otoczeniu (16). Skład płynu zewnątrzkomórkowego w mózgu w warunkach stabilnych pozostaje w równowadze z płynem mózgowo-rdzeniowym. Na zmiany płynu mózgowo-rdzeniowego reaguje chemoreceptor ośrodkowy. Wg Loeschcke (1982) zmniejszenie pH płynu mózgowo-rdzeniowego o jednostkę prowadzi u ludzi do podwojenia wentylacji (15).

Chemoreceptory obwodowe zlokalizowane są w kłębkach szyjnych i aortalnych. Kłębki aortalne, których jest zwykle 7-9 rozrzucone są w okolicy łuku aorty i pnia tętnicy płucnej. Ich reakcja na bodźce chemiczne jest jakościowo podobna do generowanej przez kłębki szyjne, jednak wielokrotnie słabsza. U wielu gatunków, w tym u człowieka znaczenie czynnościowe kłębków aortalnych jest znikome. Honda (1999) ocenił udział kłębków aortalnych w odpowiedzi wentylacyjnej u ludzi na hipoksję na około 5-10% (15).

Z kolei kłębki szyjne uważa się za organ odpowiadający za około 95% stymulacji oddychania pod wpływem hipoksji, jak również za około 20% odpowiedzi oddechowej na CO_2 i H^+ . Ich rola w normalnym oddychaniu pozostaje wciąż niewyjaśniona, prawdopodobnie udział kłębków w normalnym oddychaniu wynosi 10-20%. Kłębki szyjne są organem położonym obustronnie na rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej na zewnętrzną i wewnętrzną. Unerwione są przez nerw zatokowy, zwany nerwem Heringa, który jest odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego, IX nerwu czaszkowego. Kłębek szyjny zbudowany jest z dwóch typów komórek: typ I to komórki chemoreceptorowe mające połączenia synaptyczne z zakończeniami nerwu zatokowego, typ II to komórki podporowe,

które wciskają się wypustkami pomiędzy komórki chemoreceptorowe, porównywane są z komórkami glijowymi w mózgu, ale ich rola wciąż pozostaje nieokreślona (15).

Naturalnym i najsilniejszym bodźcem dla kłębków szyjnych jest hipoksja. Odpowiedź oddechowa na hipoksję ma charakter dwufazowy: stymulująco-hamujący. Za główny mechanizm fazy stymulującej uznaje się wydzielanie w pniu mózgu pod wpływem pobudzenia kłębków szyjnych przez hipoksję stymulującego neuroprzekaźnika – kwasu glutaminowego. Mechanizm fazy drugiej określanej często jako ośrodkowa hipoksyjna depresja oddychania nie jest do końca wyjaśniony. Mają w niej swój udział neuroprzekaźniki hamujące, takie jak kwas γ -aminomasłowy (GABA) (16). Większość badaczy przychyliła się do koncepcji, że faza pobudzeniowa zachodzi za pośrednictwem kłębków szyjnych zaś źródło hamowania oddychania położone jest w mózgu. Jednak o tym, że kłębki szyjne mają swój udział w kształtowaniu fazy hamującej odpowiedzi oddechowej na hipoksję świadczy fakt, że u ludzi z wyciętymi kłębkami szyjnymi odnotowano nie tylko brak odpowiedzi pobudzającej na hipoksję, ale także fazy depresyjnej oddychania (17).

Odpowiedź oddechowa na hipoksję jest źródłem istotnej informacji dotyczącej fizjologicznej kontroli oddychania. Odpowiedź ta wykazuje znaczne różnice w zależności od siły bodźca, czasu jego działania oraz metody badawczej. Jedną z metod badawczych jest test progresywnej hipoksji, polegający na oddychaniu zwrotnym. Badany wdycha ten sam gaz, który wydycha, zatem z każdym wdechem otrzymuje mieszaninę powietrza ze zmniejszoną zawartością tlenu. Inną metodą jest tzw. technika „steady-state”. W teście tym dokonuje się skokowego zadania bodźca, czyli obniżenia PaO_2 , którego natężenie utrzymuje się na stałym poziomie (15).

1.4. Dopamina, a kłębki szyjne

Dopamina jest głównym neuroprzekaźnikiem kłębków szyjnych, jednakże jej rola w mechanizmie chemorecepcji wciąż wzbudza wiele kontrowersji. Wydawałoby się, że dopamina spełnia rolę idealnego neuroprzekaźnika. Zarówno dopamina jak i hydroksylaza tyrozynowa, enzym limitujący jej syntezę, są obecne w komórkach chemoreceptorowych (15). W 1996 roku Donnelly i Iturriaga potwierdzili, że hipoksja uwalnia dopaminę z kocich i szczurzych kłębków szyjnych (18). Wzrost ekspresji genu hydroksylazy tyrozynowej rozpoczyna się w przeciągu godziny od podania hipoksji, co prowadzi do

zwiększenia nerwowej aktywności kłębków szyjnych i wzrostu wentylacji płucnej (19). Chemoreceptyjna aktywność wzrasta w hipoksji, kiedy tętnicze PO_2 spada ze 100 do około 30 mmHg, ale obniża się znów wraz z podaniem ostrzejszej hipoksji (20). W 1996 roku Donnelly i Iturriaga stwierdzili, że powtarzająca się stymulacja hipoksyjna w kłębkach szyjnych kotów i szczurów wywołuje wzrost aktywności chemosensorycznej, przy jednoczesnej progresywnej redukcji uwalniania dopaminy z kłębków szyjnych (18). Ta obserwacja uwydatniła rozbieżność pomiędzy pobudzeniem chemosensorycznym, a uwalnianiem dopaminy. Jednakże, osłabienie uwalniania katecholamin w odpowiedzi na powtarzającą się stymulację było obserwowane w innych systemach katecholaminowych (21). Dopamina jako pobudzający neuroprzekaźnik powinna zwiększać oddychanie i aktywność chemoreceptora, jednak efekt egzogennej dopaminy jest różny i zależy od wielu czynników tj. dawki, warunków doświadczalnych oraz gatunku zwierzęcia (15). U królików podanie dopaminy do kłębków szyjnych wywołuje chemosensoryczne pobudzenie, ale u większości innych gatunków dopamina wywołuje chemosensoryczne hamowanie. U kotów jednorazowe podanie dopaminy dożylnie lub bezpośrednio do kłębków wywołuje chwilowe hamowanie chemosensorycznej aktywności, podczas gdy ciągłe dożylnie podawanie dopaminy *in situ* obniża odpowiedź kłębków szyjnych na hipoksję i hiperkapnię (22, 23). Hamujący wpływ dopaminy na chemosensoryczną aktywność jest blokowany lub odwracany w pobudzenie po blokadzie receptorów dopaminowych typu D2. Dodatkowo, obwodowy antagonist receptorów D2-domperidon wywołuje wzrost podstawowej chemosensorycznej aktywności i zwiększa odpowiedź na hipoksję (22).

Różnice w efekcie działania egzogennej dopaminy i jej możliwego udziału w generacji dośrodkowej chemosensorycznej aktywności odzwierciedlają różnice gatunkowe. U kotów i szczurów pobudzająca odpowiedź po podaniu dopaminy wydaje się być zależna od kilku innych neuroprzekaźników, z kolei u królików aktywność chemosensoryczna jest generowana głównie przez synapsy dopaminergiczne (24). Dopamina podana do wyizolowanego zwoju skalistego dolnego nerwu językowo-gardłowego królika wywołała zależny od dawki wzrost aktywności nerwu zatokowego. Co więcej, stwierdzono że ten efekt jest blokowany przez antagonistę receptorów D2-spiperon (25). Z kolei podanie dopaminy do wyizolowanych zwojów dolnych nerwu językowo-gardłowego kotów nie wpłynęło na aktywność nerwu zatokowego (24). Okazało się, że dopamina podawana przed acetylocholiną wywoływała zależną od dawki modyfikację

nerwowych odpowiedzi wywołanych wcześniej przez podanie acetylocholin i ATP. Niskie dawki dopaminy potęgowały odpowiedzi indukowane przez acetylocholinę, podczas gdy duże dawki hamowały te odpowiedzi (26, 27).

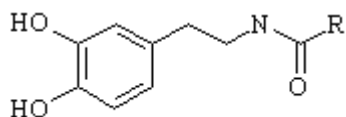
Najczęściej odnotowywanym działaniem dopaminy podawanej kotom było zahamowanie aktywności nerwu zatokowego. Podobny efekt został odnotowany również u ludzi. Jednak działanie dopaminy może być również stymulujące, np. w przypadku podawania jej w wysokich dawkach po podaniu antagonistów receptorów dopaminowych, albo po zastosowaniu rezerpiny (28,15). Pragnąc wyjaśnić dwoisty wpływ dopaminy niektórzy badacze wysunęli koncepcję o istnieniu w kłębkach szyjnych receptorów dopaminowych D2 o różnym powinowactwie do dopaminy. Receptory dopaminergiczne D2 w kłębkach szyjnych zlokalizowano presynaptycznie i postsynaptycznie (1). Ponieważ presynaptyczne receptory są fizjologicznie bardziej wystawione na niższą koncentrację transmiterów niż postsynaptyczne receptory (28), dlatego niska dawka dopaminy mogłaby preferencyjnie działać z presynaptycznymi receptorami, obniżać uwalnianie dopaminy i zredukować jej koncentrację w szczeliny synaptycznej. Propozycja, że hamujące działanie dopaminy może być rezultatem jej działania na presynaptyczne receptory jest poparta dodatkową obserwacją, z której wynika że małe dawki dopaminy, które miały działanie hamujące w kłębkach szyjnych kontrolnych u kotów, w przypadku kłębków szyjnych opróżnionych z dopaminy wykazywały działanie pobudzające (29). Efekty presynaptyczne były bowiem minimalizowane lub znoszone całkowicie w przypadku podawania dopaminy po uprzednim opróżnieniu kłębków szyjnych.

Z kolei dopamina w wysokiej dawce mogłaby wywierać działanie pobudzające na postsynaptyczny receptor D2 o niższym powinowactwie do neurotransmiterów w porównaniu do receptora presynaptycznego (28). Pobudzające działanie dopaminy, po uprzednim podaniu blokerów receptorów dopaminowych D2, może być także spowodowane preferencyjnym działaniem tych blokerów w stosunku do presynaptycznych receptorów, bądź wynikać z wysokiego powinowactwa albo większej dostępności do tych receptorów (30). Dodatkowo, w 1993 roku Gauda i wsp. opisali w swojej pracy występowanie receptorów D2 u kotów w zwoju skalistym dolnym nerwu językowo-gardłowego (31). Występowanie postsynaptycznych receptorów D2 w kłębkach szyjnych kotów nasunęło przypuszczenie o pobudzającym działaniu dopaminy poprzez właśnie te receptory, gdzie naturalnie uwalniana dopamina indukuje wzrost aktywności nerwu zatokowego. Ta końcowa propozycja została później poparta obserwacją, z której

wynikało, że *in vivo* pewne blokery receptorów D2 w zwiększonych dawkach progresywnie redukują, a w końcu znoszą wentylację spoczynkową i stymulowaną bodźcem aktywność nerwu zatokowego (28). Podsumowując, dopamina jest głównym neurotransmiterem kłębków szyjnych. Postsynaptyczne receptory D2 w kłębkach szyjnych określane są jako pobudzające i stymulowane hipoksją uwolnienie dopaminy generuje wzrost aktywności nerwu zatokowego. Odwrotnie, redukcja poziomu dopaminy w kłębkach szyjnych jak i w mózgu pacjentów chorujących na chorobę Parkinsona redukuje nerwową aktywność nerwu zatokowego w odpowiedzi na hipoksję (32).

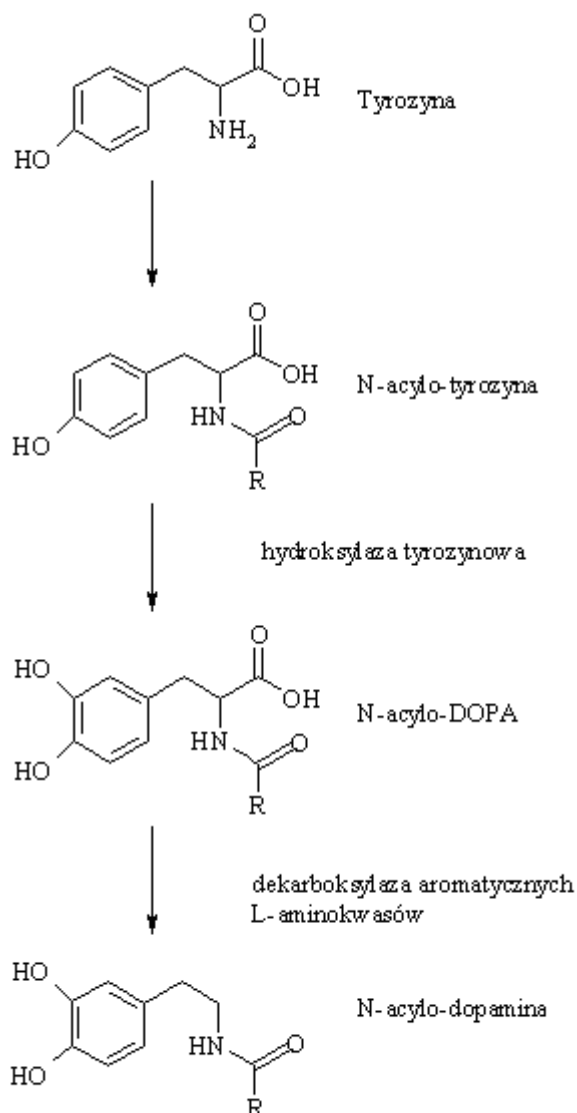
1.5 N-acylo-dopaminy - lipidowe pochodne dopaminy

N-acylo-dopaminy to związki chemiczne zbudowane z dopaminy oraz kwasów tłuszczowych. Istnienie takich związków zostało zaproponowane w oparciu o teoretyczne przesłanki przez dwóch badaczy: Pokorskiego i Matysiaka w 1998 roku. W tym samym roku po raz pierwszy przeprowadzono syntezę N-acylo-dopamin (33,34).



Rys. 4. Struktura N-acylo-dopamin

Zsyntetyzowanie tych związków umożliwiło poznanie ich podstawowych właściwości *in vitro*. Dodatkowo pojawiło się pytanie o możliwość występowania tych związków w organizmie. W 2003 roku dokonano przełomowego odkrycia, z którego wynikało, że N-acylo-dopaminy są produkowane w tkankach ssaków (4). Co więcej, zidentyfikowano czterech przedstawicieli tej klasy związków tj. N-arachidonylo-dopamina (NADA), N-oleinoilo-dopamina (OLDA), N-stearylo-dopamina (STERDA) i N-palmitynylo-dopamina (PALDA) (4). Wykazano, że N-acylo-dopaminy występują przede wszystkim w prążkowie oraz w istocie czarnej mózgu, zatem w regionach o wysokiej aktywności dopaminergicznej (4), co zasugerowało możliwość zbliżonego do amin katecholowych szlaku syntezy. Proponowany szlak syntezy został przedstawiony na Rys. 5.



Rys. 5. Schemat biosyntezy N-acylo-dopamin ('R' - reszta kwasu tłuszczowego np.: oleinowego) (37)

Prawdopodobnie tyrozyna jest N-acylowana przez dany kwas tłuszczowy, potem ulega hydroksylacji w pozycji 3 za pośrednictwem hydroksylazy tyrozynowej. Następnie, w efekcie działania dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów ulega dekarboksylacji do odpowiednich N-acylo-dopamin (5).

Szlak związany z metabolizmem tej klasy związków nie jest do tej pory poznany, jednak przypuszcza się, że może być związany ze szlakiem metabolicznym dopaminy. Prawdopodobnie jedyny możliwy szlak metabolizmu N-acylo-dopamin związany jest z katecholo-O-metylo-transferazą (COMT) i metylowaniem związków do pochodnych 3-O-metylo (4). W przypadku N-acylo-dopamin, szlak wymagający utlenienia grupy aminowej

przez monoaminooksydazę (MAO) nie jest możliwy, gdyż etap ten wiązałby się z uprzednią hydrolizą wiązania amidowego (4).

Lipofilna budowa N-acylo-amin umożliwia przechodzenie im przez barierę krew-mózg. Ta właściwość jest niezwykle istotna, szczególnie w kwestii rozważania tych związków chemicznych jako nośników dopaminy do mózgu. Dopamina jest neurotransmiterem obecnym po obydwu stronach bariery krew-mózg, ale ze względu na hydrofilową budowę nie jest w stanie przejść przez barierę krew-mózg. Z kolei w chorobach neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem neuronów dopaminergicznych w mózgu takich jak np. choroba Parkinsona, uzupełnienie poziomu dopaminy staje się wielkim wyzwaniem. Sama dopamina jako związek hydrofilowy i w dodatku ulegający natychmiastowej degradacji obwodowej nie znajduje zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (35). Z kolei L-DOPA, prekursor dopaminy stosowany w leczeniu choroby Parkinsona w celu uzupełnienia poziomu dopaminy w mózgu nie jest idealnym rozwiązaniem. Podanie L-DOPA pacjentowi powinno być skojarzone z podaniem innego związku, a mianowicie inhibitora dekarboksylazy dopaminy, który co prawda zapobiega rozpadowi L-DOPA na obwodzie, ale jednocześnie wywołuje szereg efektów ubocznych. Ponadto L-DOPA może być stosowana w określonym wymiarze czasu, potem jej efektywność spada (36). A zatem lipidowe pochodne dopaminy niewątpliwie są alternatywą w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem dopaminy.

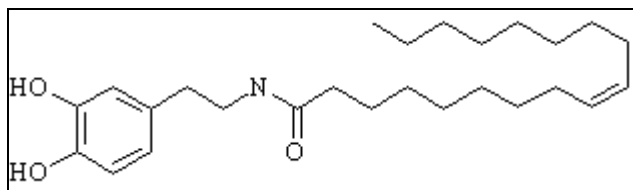
1.5.1. N-oleinoilo-dopamina (OLDA)-jako związek najbardziej aktywny ze wszystkich N-acylo-amin

Wybór OLDA na przedmiot moich badań spośród innych znanych N-acylo-dopamin wynika z następujących pobudek:

- Dopamina i kwas oleinowy są wszechobecne w komórkach ssaków, a ich kondensacja do OLDA ma miejsce w mózgu *in vivo*
- OLDA reguluje napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza neuronów i tym samym jest istotnym elementem w generowaniu odpowiedzi chemoreceptorów kłębków szyjnych na bodźce chemiczne.

Pełna chemiczna nazwa OLDA brzmi: N-[2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylo]-9Z-oktadecenamid, potocznie nazywana jest „dopamidem oleinowym”. Jej struktura została

przedstawiona na Rys 6.



Rys. 6. Struktura OLDA.

OLDA została zsyntetyzowana chemicznie, jej sumaryczny wzór to $C_{26}H_{43}NO_3$, a masa molowa 417,62 g/mol. N-oleinoilo-dopamina jest rozpuszczalna w chloroformie, DMSO, etanolu i metanolu, przy czym jej roztwory w dwóch ostatnich rozpuszczalnikach są nietrwałe.

Z dotychczasowych prac wynika, że OLDA dobrze przenika przez barierę krew-mózg (35). Ponadto OLDA wykazuje znaczną stabilność, wielokrotnie przekraczającą stabilność dopaminy. Znaczna (24-godz.) stabilność OLDA *in vivo* może być związana z faktem, że, w przeciwieństwie do lipidowych pochodnych innych amin biogennych, nie jest ona rozkładana za pośrednictwem hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) (4). W błonowych i cytozolowych modelach, stabilność OLDA jest bliska stabilności *in vivo*. W zawieszynie błon homogenatu mózgu szczura wzbogaconej jonami wapnia w stężeniach fizjologicznych OLDA wykazuje stabilność na poziomie 17 godzin. W pozostałych badanych układach, tj. zawieszynie błon pozbawionych jonów wapnia oraz frakcji cytozolowej homogenatu mózgu szczura pozbawionej lub wzbogaconej o jony wapnia w stężeniu fizjologicznym stabilność wzrasta do 24 godzin, tj. do wartości obserwowanej dla układu *in vivo* (37).

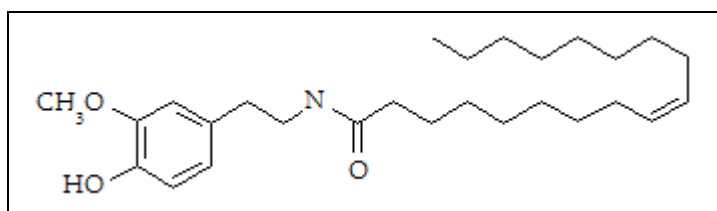
Ponadto OLDA jest preferencyjnie wychwytywana przez kłębki szyjne, a mianowicie absorpcja OLDA przez kłębki szyjne jest kilkakrotnie wyższa niż samej dopaminy (38).

N-oleinoilo-dopamina spełnia rozliczne funkcje w organizmie, a wśród nich najlepiej do tej pory poznana to: pobudzenie aktywności lokomotorycznej u szczurów w mechanizmie dopaminergicznym (39). W 2009 roku Konieczny i wsp. udokumentowali właściwości mięśniowo-relaksacyjne OLDA głównie na podstawie doświadczeń z zastosowaniem rezerpiny, wywołującej sztywność mięśniową u szczurów (40). Z kolei kilka lat wcześniej Chu i wsp. dokonali odkrycia z którego wynikało, że OLDA jest

agonistą receptorów wanilloidowych TRPV1 (41). W związku z tym odkryciem wysunięto wnioski, że OLDA może działać na neurony dopaminergiczne w sposób bezpośredni, ale także w sposób pośredni. Zasugerowano możliwość pobudzenia układu dopaminergicznego w efekcie interakcji OLDA z receptorem wanilloidowym, znajdującym się na neuronach dopaminergicznych istoty czarnej i prążkowie (42). Receptory wanilloidowe są nieselektywnymi kanałami dla kationów. W wyniku ich aktywacji jony, głównie Ca^{2+} , które odgrywają wiodącą rolę w wielu kaskadach sygnałowych napływają do wnętrza komórek. Receptory te są aktywowane przez specyficzne ligandy, mediatory stanu zapalnego, a także przez protony (niskie pH) i temperaturę (43).

Innym znanym oddziaływaniem OLDA jest modyfikacja wzorca oddechowego u szczurów. Przeprowadzone kilka lat wcześniej badania dotyczyły wpływu OLDA na regulację oddychania u szczurów w stanie uśpienia ogólnego, co pozbawiło je korowej kontroli oddychania i zdolności kompensacyjnych odnośnie zmian oddychania pod wpływem bodźców chemicznych. Oddychanie jest bowiem regulowane przez dwa niezależne mechanizmy, jeden odpowiedzialny jest za kontrolę automatyczną, a drugi za dowolną. Podstawowe, metaboliczne oddychanie, zachodzące niezależnie od naszej woli kontrolowane jest przez układ komórek rozrusznikowych znajdujących się w rdzeniu przedłużonym. Obok utrzymania homeostazy oddechowej, nerwowe mechanizmy regulujące oddychanie mają także inne ważne nie homeostatyczne funkcje, tak jak ma to miejsce w przypadku aktów oddechowych związanych ze świadomością i zachowaniem. Niezbędne funkcje organizmu, takie jak poruszanie się czy utrzymanie postawy, czy też czynności wynikające z wolnej woli, powodują, że wzorzec oddychania u świadomego osobnika jest wypadkową potrzeb metabolicznych oraz woli i zachowania. Układ związany z kontrolą dowolną oddychania znajduje się w korze mózgu. Uśpienie ogólne może zniekształcać odpowiedzi oddechowe na OLDA w stanie czuwania. Dlatego uważa się, że badanie układu oddechowego w stanie czuwania ma większą wagę fizjologiczną (15).

1.5.2. N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina-zmetylowana pochodna OLDA (Me-OLDA)



Rys. 7. Struktura Me-OLDA.

Wiedza dotycząca zmetylowanej pochodnej OLDA jest ograniczona. Me-OLDA przechodzi przez barierę krew-mózg, podobnie jak OLDA (37). Wiadomo, że metylacja OLDA do Me-OLDA zachodzi w warunkach *in vitro*, za pośrednictwem enzymu biorącego udział w szlaku metabolicznym dopaminy-COMT (37). Dalszym wzmocnieniem biologicznej aktywności Me-OLDA są wyniki wskazujące na jej mięśniowo-relaksacyjne działanie *in vivo*, w rezerpinowym modelu zwiększonego napięcia mięśniowego u szczura. Co więcej, Me-OLDA wykazuje silniejsze działanie i w mniejszej dawce niż OLDA (dane niepublikowane). Dodatkowo, obecność zmetylowanej grupy w przypadku Me-OLDA może zwiększać powinowactwo do receptorów wanilloidowych TRPV1, bowiem agonistów tych receptorów także charakteryzuje obecność pierścienia katecholowego, zmetylowanego w pozycji 3 (45). Pierścień katecholowy obecny w przypadku OLDA umożliwia co prawda wejście w interakcję z receptorem wanilloidowym TRPV1, ale O-metylacja OLDA mogłaby zwiększać powinowactwo do receptorów wanilloidowych (46).

2. Hipoteza badawcza i Cele pracy

Hipoteza badawcza

Dopamina jest jednym z najważniejszych neuroprzekaźników zaangażowanych w chemiczną regulację oddychania, działającym w dwojaki sposób – ośrodkowo pobudzając, a obwodowo hamując odpowiedź oddechową. Założenie pracy jest następujące: wpływ badanych lipidowych pochodnych dopaminy, tj. OLDA (N-oleinoilo-dopamina) oraz Me-OLDA (N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina) na regulację oddychania może przypominać działanie samej dopaminy. Ponadto badany przeze mnie wpływ lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania zachodzi najprawdopodobniej za pośrednictwem dopaminergicznego układu receptorowego.

Dopamina jako związek hydrofilowy i w dodatku ulegający natychmiastowej degradacji obwodowej nie znajduje zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Lipidowe pochodne dopaminy, jako związki chemiczne zdolne do przechodzenia przez barierę krew-mózg oraz wykazujące wysoką stabilność, miałyby przewagę nad samą dopaminą, szczególnie w zastosowaniu do leczenia chorób neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem dopaminy w mózgu. Przydatność tej klasy związków w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych powinna w oczywisty sposób uwzględniać ich wpływ na regulację oddychania.

Cele pracy

Celem pracy było zbadanie i porównanie wpływu OLDA i Me-OLDA na regulację oddychania i na odpowiedzi oddechowe na bodźce chemiczne u nieuśpionych zwierząt oraz określenie poprzez jakie układy neuroprzekaźnikowe związki te oddziałują na regulację oddychania.

Cele szczegółowe

- Określenie wpływu OLDA i Me-OLDA na odpowiedzi oddechowe na dwa poziomy bodźca hipoksyjnego i na dwa poziomy bodźca hiperkapnicznego.

- Określenie wpływu OLDA i Me-OLDA na czułość hipoksyjną, która stanowi o zdolności układu oddechowego do zwiększania wentylacji minutowej w odpowiedzi na zwiększoną siłę bodźca
- Określenie czy OLDA i Me-OLDA działają na regulację oddychania poprzez układ dopaminergiczny. Zróżnicowanie między dopaminergiczną komponentą ośrodkową i obwodową, na poziomie kłębków szyjnych, poprzez użycie przechodzących i nieprzechodzących przez barierę krew-mózg antagonistów receptorów dopaminowych.
- Określenie czy OLDA i Me-OLDA działają na regulację oddychania bezpośrednio poprzez neurony dopaminergiczne, czy też pośrednio poprzez interakcję z receptorem wanilloidowym TRPV1
- Określenie czy OLDA i Me-OLDA mogą wpływać na metabolizm ustroju (konsumpcja tlenu, produkcja CO₂), co mogłoby warunkować zmiany oddychania.

3. Materiał i Metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadziłam na 89 szczurach szczepu Wistar-Cmd: (WI)WU, samcach, w wieku 12- 16 tygodni, o wadze 270-350 g (szczegółowa waga zwierząt podana jest w rozdziale Wyniki). Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, PAN gdzie były hodowane przy zachowaniu 12-godzinnego systemu dnia i nocy przy temperaturze powietrza 21⁰C i wilgotności 51%. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i karmione były standardową paszą bytową. Badania przeprowadziłam zgodnie z zezwoleniem IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr: 03/2009).

3.2. Badanie odpowiedzi oddechowych u szczurów czuwających

Badania przeprowadziłam przy użyciu zestawu pletyzmograficznego dla zwierząt nieuśpionych (Buxco Electronics; Wilmington NC). Zestaw zbudowany jest z komory pletyzmograficznej wyposażonej w dwa pneumatografy połączone z przetwornikiem analogowo-cyfrowym. Komora pletyzmograficzna o pojemności 3,7 litra podzielona jest na część doświadczalną i referencyjną. Różnica ciśnienia między częścią doświadczalną a referencyjną mierzona jest przez przetwornik, sygnał następnie jest wzmacniany i integrowany przez oprogramowanie do analizy danych (Biosystem XA, Buxco Electronics). Za wymianę powietrza oraz utrzymanie odpowiedniej wilgotności w komorze odpowiada pompa, która jest połączona z częścią doświadczalną komory. Przepływ przez pompę wynosi 4 L/min. Gazy tj. 12 i 8% O₂ w N₂ oraz 5 i 10% CO₂ w O₂ podawałam losowo przy pomocy worka o pojemności 5 L, który podłączałam do komory. Czas wymiany gazu w komorze wynosił 30 sek.

W pracy poniżej przez ‘podanie hipoksji’ lub hiperkapnii rozumiem podanie w powietrzu wdechowym mieszanki gazowej 12 lub 8% O₂ w N₂ oraz 5 i 10% CO₂ w O₂.

Protokół badawczy dotyczący odpowiedzi oddechowych na ostrą dwustopniową hipoksję oraz ostrą dwustopniową hiperkapnię.

Zwierzęta umieszczałam pojedynczo w komorze pletyzmograficznej. Po okresie

adaptacji i stabilizacji oddychania (ok. 20-30 min) badałam parametry oddechowe w warunkach normoksyjnych (oddychanie powietrzem atmosferycznym dostarczonym poprzez pompę), następnie podawałam wybrany bodziec hipoksyjny lub hiperkapniczny. Trwające 3 minuty testy przedzielone były 10 min oddychaniem powietrzem atmosferycznym. Testy, przeprowadziłam metodą „*steady-state*”, bez regulacji w trakcie testu poziomu wydychanego CO₂.

Zbadałam odpowiedzi oddechowe w warunkach normoksji oraz po podaniu bodźców chemicznych w następujących warunkach eksperymentalnych:

- po 1 godzinie od podania OLDA
- po 1 godzinie od podania Me-OLDA
- po 1 godzinie od podania OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych
- po 1 godzinie od podania OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych i ośrodkowych
- po 1 godzinie od podania OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów wanilloidowych TRPV1
- po 1 godzinie od podania OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów wanilloidowych i dopaminowych
- po 1 godzinie od podania Me-OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych
- po 1 godzinie od podania Me-OLDA na tle wcześniej wykonanej blokady receptorów wanilloidowych
- po 1 godzinie od podania antagonisty receptorów dopaminowych D2- domperidonu, działającego tylko obwodowo
- po 1 godzinie od podania samego antagonisty receptorów dopaminowych D2- haloperidolu, działającego ośrodkowo i obwodowo
- po 1 godzinie od podania samego antagonisty receptorów wanilloidowych- TRPV1, działającego ośrodkowo i obwodowo

W każdej grupie eksperymentalnej, badanie odpowiedzi oddechowej w warunkach normoksji oraz ostrej dwustopniowej hipoksji i hiperkapnii przeprowadzane było najpierw w warunkach kontrolnych, tj. bez jakiegokolwiek wcześniejszej ingerencji farmakologicznej.

Blokady receptorowe wykonywane były zawsze 40 min przed podaniem badanego związku, OLDA bądź Me-OLDA. W przypadku podwójnej blokady

receptorowej, jaką była blokada receptorów dopaminowych D2 obwodowych i wanilloidowych TRPV1, antagonistą receptorów dopaminowych D2 obwodowych domperidon został podany 20 min przed antagonistą receptorów wanilloidowych TRPV1-5'-jodoresinoferotoksyną.

Do analizy odpowiedzi oddechowej uwzględniłam następujące parametry mierzone oddech po oddechu:

- wentylacja minutowa V_E jako produkt częstości i objętości oddechowej ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- częstość oddechowa f (oddechy $\cdot \text{min}^{-1}$)
- objętość oddechowa V_T ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)

3.3. Badanie metabolizmu oddechowego u szczurów czuwających

Badania przeprowadziłam przy użyciu zestawu pletyzmograficznego dla zwierząt nieuśpionych (Buxco Electronics; Wilmington NC). Celem badań było określenie wpływu OLDA na metabolizm tlenowy, w hipoksji w porównaniu do normoksji w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA.

Protokół badawczy dotyczący metabolizmu tlenowego

Zwierzęta umieszczałam pojedynczo w komorze pletyzmograficznej. Po okresie adaptacji i stabilizacji oddychania (ok. 20-30 min) rejestrowałam przez około 15 min parametry oddechowe i metaboliczne w warunkach normoksji. W tym czasie szczury oddychały powietrzem atmosferycznym dostarczonym przez pompę. Następnie przez 10 min podawałam ostrą hipoksję - 8% O_2 w N_2 . Mieszanka podawana była bezpośrednio z butli gazowej przez pompę do komory pletyzmograficznej. Następnie wyjmowałam szczura z komory i podawałam mu OLDA, po czym po upływie godziny przeprowadzałam testy oddechowe i rejestrację parametrów metabolicznych i oddechowych, w takim samym schemacie jak w warunkach kontrolnych. Parametry oddechowe i metaboliczne uwzględniane w analizie metabolizmu tlenowego to:

- Wentylacja minutowa V_E ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- Konsumpcja tlenu VO_2 ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- Produkcja dwutlenku węgla VCO_2 ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)

3.4. Badanie gazometryczne u szczurów uśpionych

Badania wykonałam przy użyciu zestawu pletyzmograficznego dla zwierząt uśpionych (Buxco Electronics; Wilmington NC), zasada działania komory była taka sama jak w podrozdziale 3.2. Objętość powietrza w komorze była mniejsza od tej dla szczurów nieuśpionych i wynosiła 3,1 L. Badania przeprowadziłam na dwóch grupach szczurów. Pierwsza grupa eksperymentalna to 3 szczury kontrolne, którym nie podawałam żadnych środków farmakologicznych, druga grupa to 3 szczury, którym dootrzewnowo podałam OLDA (40 mg/kg m.c.).

Szczury zostały uśpione poprzez dootrzewnowe podanie narkozy w składzie: 600 mg uretanu (Sigma-Aldrich) i 12 mg α -chloralozy (Fluka) rozpuszczone w 2,4 ml wody do iniekcji w dawce 0,3 ml/100 g m.c. Po podaniu narkozy zwierzę ułożyłam na plecach w komorze pletyzmograficznej, a następnie zakaniulowałam tętnicę udową do pobierania krwi na badania gazometryczne. Po 20-min okresie stabilizacji oddychania przeprowadziłam kontrolne 3-min testy hipoksyjne: 12 lub 8% O₂ w N₂ przedzielone 10-min oddychaniem normoksyjnym. Krew do badań gazometrycznych pobierana była na samym początku doświadczenia tj. w warunkach normoksji, ostatnich 30 sek każdej hipoksji oraz po 30 min od podania OLDA.

Parametry gazometryczne krwi tętniczej takie jak ciśnienie parcjalne tlenu (PaO₂) i dwutlenku węgla (PaCO₂) oraz pH mierzyłam za pomocą analizatora gazometrycznego VetStat Electrolyte and Blood Gas Analyzer (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME).

3.5. Zastosowane w doświadczeniach związki chemiczne

- OLDA (N-oleinoilo-dopamina) (zsyntetyzowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, otrzymana w darze od Prof. Zbigiewa Czarnockiego) podawana w dawce 40 mg/kg m.c., rozpuszczana w 0.3 ml DMSO (dimetylosulfotlenku) (Sigma)
- Me-OLDA (N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina) (zsyntetyzowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, otrzymana w darze od Prof. Zbigiewa Czarnockiego) podawana w dawce 40 mg/kg m.c., rozpuszczana w 0.3 ml DMSO (dimetylosulfotlenku)
- Domperidon –antagonista receptorów dopaminowych obwodowych D₂, nie przechodzący bariery krew-mózg. Domperidon podawałam szczurom w dawce 6 mg/kg m.c., rozpuszczałam w kropli 10%-owego kwasu solnego, 100 μ l metanolu oraz 200 μ l

soli fizjologicznej (Sigma).

- Haloperidol-antagonista receptorów dopaminowych D2, działający zarówno obwodowo jak i ośrodkowo. Haloperidol podawałam w dawce 0.9 mg/kg m.c (Polfa).
- 5'-IRTX (5'-jodoresiniferotoksyna) – antagonist receptorów wanilloidowych TRPV1, podawałam w dawce 1 μ mol/kg m.c. tj. 0.7546 mg/kg m.c. 1 mg 5'-IRTX rozpuszczałam w 1.6 ml 100% DMSO (Tocris).

Zastosowane związki chemiczne podawałam szczurom dootrzewnowo.

3.6. Analiza danych

Wszystkie dane uzyskane w pracy przedstawiłam jako wartości średnie \pm SE. Różnicę w przebiegu odpowiedzi oddechowej na hipoksję/hiperkapnię po podaniu badanych związków tj. OLDA bądź Me-OLDA testowałam za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji z powtarzaniem pomiarem, gdzie zmienną zależną była wielkość wentylacji płucnej V_E , objętości płucnej V_T , lub częstości oddechowej f . Pierwszy czynnik - międzyobiektywny (podawany związek) działał na dwóch poziomach: kontrola i związek po podaniu; drugi czynnik – wewnątrzobiektywny (czas) obejmował siedem kolejnych punktów pomiarowych: 0; 30; 60; 90; 120; 150; 180 sek od początku testu. Porównywałam efekt związku, efekt czasu, a także interakcję pomiędzy efektem związku i czasu. Taką samą analizę statystyczną zastosowałam w przypadku porównania różnic w przebiegach odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu OLDA bądź Me-OLDA na tle uprzednio wykonanych blokad receptorowych: dopaminowych bądź wanilloidowych. Zastosowałam dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzaniem pomiarem również do porównania różnic pomiędzy przebiegami odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu antagonistów receptorów dopaminowych i wanilloidowych.

Czułość reakcji układu oddechowego na bodźce chemiczne oceniana jest z wielkości przyrostu szczytowej wentylacji płucnej pod wpływem silniejszego bodźca przed i po podaniu danego związku. Czułość hipoksyjną wyliczyłam w sposób następujący: obliczałam różnicę pomiędzy wartością szczytową wentylacji minutowej w 30 sek od podania bodźca hipoksyjnego, a spoczynkową wentylacją przed i po podaniu badanego związku: OLDA bądź Me-OLDA. Porównywałam te różnice między dwoma poziomami bodźców hipoksyjnych.

W przypadku metabolizmu tlenowego różnicę pomiędzy wartościami kontrolnymi uzyskanymi w warunkach normoksji i hipoksji, a tymi po podaniu OLDA porównywałam za pomocą testu t-Studenta dla grup zależnych. Różnicę pomiędzy wartościami kontrolnymi, a tymi po podaniu OLDA w przypadku pomiarów gazometrycznych, porównywałam za pomocą testu t-Studenta dla grup niezależnych.

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadziłam przy użyciu programu statystycznego SPSS wer. 18. Różnice dla $p < 0,05$ były uznawane za istotne statystycznie.

4. Wyniki

Doświadczenia wykonałam na 89 szczurach. Zwierzęta zostały podzielone na 13 grup doświadczalnych, różniących się między sobą zestawem podanych środków farmakologicznych jak również sposobem przeprowadzenia eksperymentu.

Tabela 1. Podział i liczebność grup doświadczalnych

Grupa	Związek I	Związek II	n	Masa szczura
1	OLDA (odpowiedź oddechowa)	----	7	310-350g
2	HAL	OLDA	8	270-310g
3	DOM	OLDA	8	295-310g
4	5'-IRTX	OLDA	8	290-314g
5	5'-IRTX+DOM	OLDA	8	293-310g
6	OLDA (metabolizm)	----	5	322-348g
7	Me-OLDA	----	7	278-330g
8	DOM	Me-OLDA	7	287-310g
9	5'-IRTX	Me-OLDA	7	282-312g
10	HAL	----	6	300-350g
11	DOM	----	6	300-340g
12	5'-IRTX	----	6	292-308g
13	OLDA (gazometria)	----	6	282-350g

OLDA – N-oleinoilo-dopamina, Me-OLDA – N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina, HAL-Haloperidol, DOM-Domperidon, 5'-IRTX-5'-jodoresinoferotoksyna

Uzyskane w moich doświadczeniach odpowiedzi oddechowe na hipoksję miały klasyczny dwufazowy, stymulująco-hamujący przebieg. Szczytowa stymulacja oddychania następowała w 30 sekundzie od zadziałania bodźca, po czym wentylacja stopniowo obniżała się w trakcie 150 sekundy testu, co odpowiada fazie depresyjnej.

4.1 OLDA

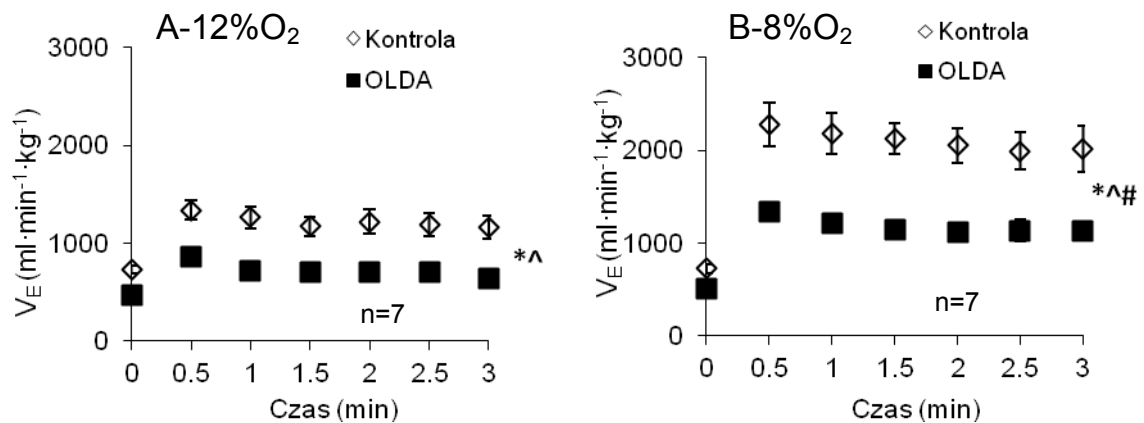
4.1.1 OLDA a odpowiedzi oddechowe na hipoksję

Podanie OLDA wpłynęło na zmniejszenie wentylacji spoczynkowej z $731,1 \pm 39,2$ do $472,9 \pm 38,5$ ml/min/kg ($p < 0,001$), czyli o $34,9 \pm 5,9\%$, jak również szczytowej z $1335,8 \pm 99,2$ do $856,6 \pm 73,7$ ml/min/kg ($p < 0,001$), czyli o $34,2 \pm 6,9\%$ w odpowiedzi na 12% bodziec hipoksyjny. Znamienne obniżeniu uległa również wentylacja w końcowym punkcie testu, odpowiadającemu obserwowanemu maksimum fazy depresyjnej, ze średniej wartości $1165,2 \pm 121,3$ w warunkach kontrolnych do $644,5 \pm 35,5$ ml/min/kg

po podaniu OLDA. Zmiany wentylacji płucnej w odpowiedzi na silniejszą 8% hipoksję przedstawiały się następująco: wentylacja spoczynkowa zmniejszyła się z $723,9 \pm 52,9$ do $502,5 \pm 22,0$ ml/min/kg ($p < 0,02$), czyli o $28,6 \pm 6,3\%$, natomiast szczytowa spadła z $2279,0 \pm 237,8$ do $1338,3 \pm 49,5$ ml/min/kg ($p < 0,002$) czyli o $38,3 \pm 6,2\%$, porównaniu do kontroli.

Zmiany w przebiegu odpowiedzi oddechowej na hipoksję zachodziły za pośrednictwem zarówno objętości oddechowej jak i częstości ($p < 0,004$ efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA), które malały po podaniu OLDA. W warunkach szczytowej 12% hipoksji częstość oddechowa spadła o $21,7 \pm 4,9\%$ ($p < 0,002$) zaś objętość oddechowa o $17,2 \pm 6,9\%$ ($p < 0,02$).

Zmiany dotyczące częstości i objętości oddechowej po podaniu OLDA, w odpowiedzi na dwa poziomy bodźca hipoksyjnego (12 i 8%) przedstawione zostały w tabeli 2.



Rys. 8. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12% hipoksję (Panel A) i 8% hipoksję (Panel B) u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1 godzinę po podaniu OLDA. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt OLDA (^ $P < 0.001$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA (# $P < 0.001$) dla Panelu B. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt OLDA (^ $P < 0.002$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA (# $P < 0.018$) dla Panelu A (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

Tabela 2. Częstość oddechowa (f) i objętość oddechowa (V_T) w trzech punktach czasowych w przebiegu odpowiedzi oddechowej: punkt spoczynkowy- 0 s, punkt szczytowy -30 s, punkt depresyjny-180s, w czasie 12 i 8% hipoksji, w dwóch różnych warunkach eksperymentalnych: kontrolnych i po podaniu OLDA.

Warunki	Kontrola			OLDA		
	12% Hipoksja					
Test hipoksyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny
Czas testu (sek)	0	30	180	0	30	180
f (min^{-1})	85.5 ± 4.8	110.2 ± 9.8	118.7 ± 10.0	63.8 ± 2.4*	85.7 ± 9.0^	76.5 ± 4.7●
V_T (ml kg^{-1})	8.7 ± 0.6	12.8 ± 1.3	9.9 ± 0.8	7.7 ± 0.7#	10.3 ± 0.6°	8.8 ± 0.4∞
8% Hipoksja						
Test hipoksyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny
Czas testu (sek)	0	30	180	0	30	180
f (min^{-1})	83.0 ± 4.9	145.1 ± 11.6	149.6 ± 15.7	65.7 ± 4.7*	106.7 ± 5.6 ^	112.5 ± 5.5●
V_T (ml kg^{-1})	8.8 ± 0.5	16.1 ± 1.3	13.5 ± 0.6	8.0 ± 0.4#	13.0 ± 0.6 °	10.4 ± 0.5∞

Średnie wartości z 7 szczurów ± SE; OLDA –podawana w pojedynczej dawce, 40 mg/kg dootrzewnowo.

*P<0.003 dla różnic pomiędzy normoksyjnym f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

^P<0.004 dla różnic pomiędzy szczytowym punktem hipoksji f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

●P<0.03 dla różnic różnic pomiędzy depresyjnym punktem hipoksji f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

#P<0.056 dla różnic pomiędzy normoksyjnym V_T u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

°P<0.03 dla różnic pomiędzy punktem szczytowym hipoksji V_T u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

∞P<0.03 dla różnic pomiędzy punktem depresyjnym hipoksji V_T u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, dla dwóch poziomów hipoksji

Zastosowane bodźce hipoksyjne przed i po podaniu OLDA spowodowały porównywalne spadki poziomu tlenu we krwi tętniczej (tabela 3). Przed podaniem OLDA, odpowiedzi hipoksyjne były badane przy poziomie dwutlenku węgla wynoszącym $\text{PaCO}_2 = 38,7 \pm 5,7$ mmHg dla 8% hipoksji oraz $43,7 \pm 3,5$ mmHg dla 12% hipoksji. Po podaniu OLDA wartości PaCO_2 wynosiły odpowiednio $56,0 \pm 2,5$ mmHg i $48,7 \pm 6,5$ mmHg dla 12% i 8% hipoksji. Poziom pH utrzymywał się przed podaniem OLDA na poziomie $7,4 \pm 0,02$ (12% hipoksja) i $7,4 \pm 0,02$ (8% hipoksja), zaś po podaniu OLDA jego wartość wynosiła odpowiednio $7,3 \pm 0,02$ oraz $7,3 \pm 0,05$ dla 12% i 8% hipoksji.

Tabela 3. Poziom tlenu, dwutlenku węgla i pH krwi tętniczej, oceniane gazometrycznie, w poszczególnych etapach doświadczalnych przed i po podaniu OLDA

	Kontrola	12% hipoksja	8% hipoksja
PaO_2 (mmHg)	91,0 ± 0,7	56,7 ± 3,2	49,3 ± 2,9
PaCO_2 (mmHg)	52,3 ± 3,6	43,7 ± 3,5	38,7 ± 5,7
pH	7,3 ± 0,04	7,4 ± 0,02	7,4 ± 0,02
Po podaniu OLDA			
PaO_2 (mmHg)	96,3 ± 3,6	62,3 ± 3,6	50,0 ± 1,9
PaCO_2 (mmHg)	66,7 ± 4,1*	56,0 ± 2,5^	48,7 ± 6,5
pH	7,3 ± 0,04	7,3 ± 0,02	7,3 ± 0,05

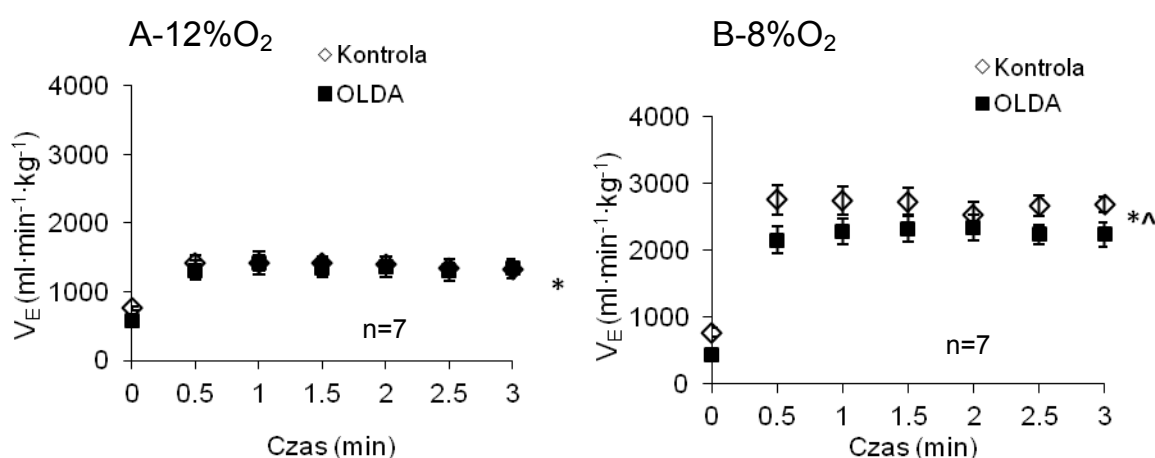
Średnie wartości z 6 szczurów ± SE, OLDA podawana w dawce 40 mg/kg masy ciała

*P<0,03 dla różnic pomiędzy PaCO_2 warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, w normoksji

^P<0,02 dla różnic pomiędzy PaCO_2 w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA, po podaniu 12% hipoksji (Test Studenta dla grup niezależnych)

4.1.2. OLDA a odpowiedzi oddechowe na hiperkapnię

W odpowiedzi na 10% hiperkapnię wentylacja minutowa uległa zmniejszeniu po podaniu OLDA wzdłuż przebiegu testu ($p < 0,0001$, efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA), przy czym szczytowa wentylacja w 30 sek po podaniu bodźca spadła o $21,0 \pm 6,2\%$ ($p < 0,006$) w porównaniu do warunków kontrolnych. W efekcie zastosowania słabszego 5% bodźca hiperkapnicznego nie odnotowałam zmian wentylacji minutowej po podaniu OLDA.



Rys. 9. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 5%-ową hiperkapnię (Panel A) i 10%-ową hiperkapnię (Panel B) u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.001$) dla Panelu A Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt OLDA (^ $P < 0.0001$) dla Panelu B (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

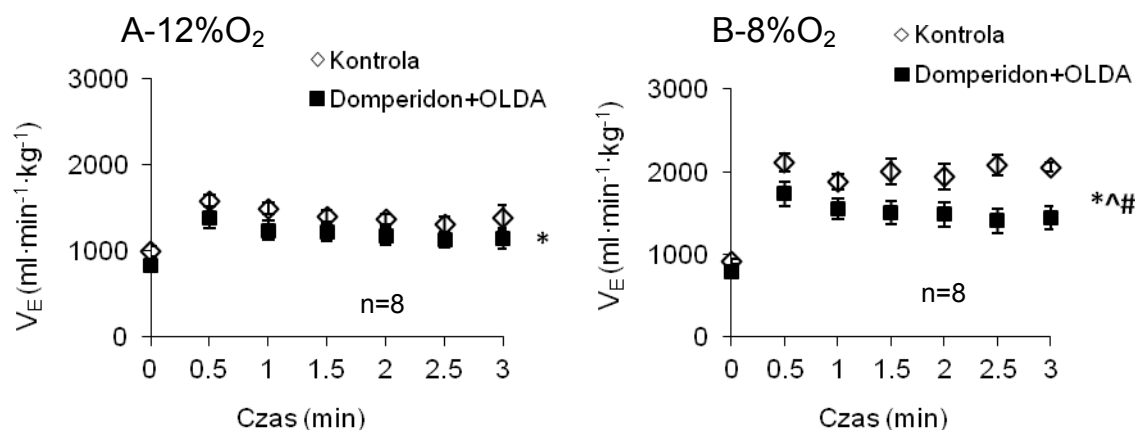
Podanie OLDA wpłynęło na obniżenie odpowiedzi oddechowej na silny bodziec hiperkapniczny, co może sugerować udział chemoreceptorów obecnych mózgu w oddziaływaniu OLDA na regulację oddychania. Oddechowe efekty hiperkapnii zachodzą głównie za pośrednictwem chemoreceptorów pnia mózgu, odrębnych od tych obecnych w kłębkach szyjnych, choć kłębki odpowiadają za ok. 15-20% odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię, zwłaszcza w pierwszej fazie (15).

4.1.3 Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów dopaminowych

4.1.3.1. Wpływ OLDA na regulację oddychania po uprzednim zablokowaniu receptorów dopaminowych D2 obwodowych

W celu uzyskania blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych zastosowałam domperidon- antagonistę receptorów dopaminowych D2, który nie przechodzi przez barierę krew-mózg.

OLDA podawana na tle blokady receptorów obwodowych D2 spowodowała obniżenie wentylacji minutowej ($p < 0,007$ -efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA w przypadku 8% hipoksji) (Rys. 10 Panel B). Obniżenie wentylacji nie było istotne statystycznie w przypadku 12% hipoksji (Rys. 10 Panel A). Różnice w wentylacji minutowej w spoczynku i szczycie 12% hipoksji oscylowały na poziomie 15 i 11% w porównaniu do warunków kontrolnych, zaś w przypadku silniejszej hipoksji na poziomie 13 i 18%.



Rys. 10. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję (Panel A) i 8% hipoksję (Panel B) u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1 godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych D2. Znaczący efekt czasu ($*P < 0.0001$), efekt OLDA ($^{\wedge}P < 0.0001$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA ($\# P < 0.003$) dla Panelu B. Znaczący efekt czasu ($*P < 0.0001$), dla Panelu A (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Zmiany w przebiegu odpowiedzi oddechowej zachodziły głównie za pośrednictwem częstości ($p < 0,005$ efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA).

Odnotowałam spadek częstości spoczynkowej ze średniej wartości $109,3 \pm 4,5$ do $93,9 \pm 4,9$

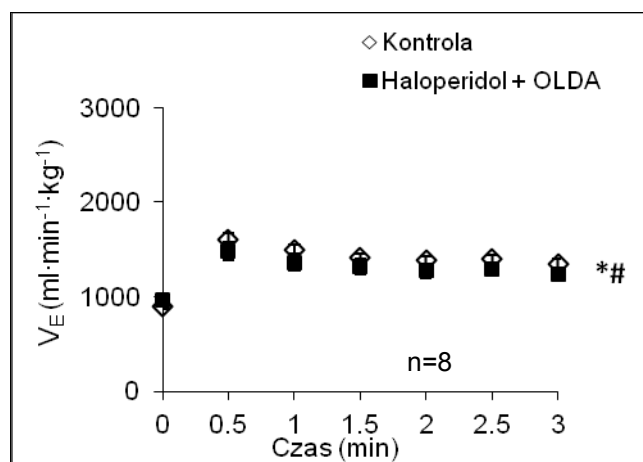
liczba oddechów/min ($p < 0,01$), a częstości szczytowej z $131 \pm 7,98$ do $114 \pm 4,9$ liczba oddechów /min ($p < 0,03$) w odpowiedzi na podanie 12 % hipoksji.

Zastosowanie silniejszego 8% bodźca hipoksyjnego spowodowało zmniejszenie szczytowej wartości objętości minutowej o $10,8 \pm 1,9\%$ ($p < 0,0002$) w porównaniu do wartości kontrolnych.

4.1.3.2. Wpływ OLDA na regulację oddychania po uprzednim zablokowaniu receptorów dopaminowych D2 obwodowych i ośrodkowych

Blokada receptorów dopaminowych D2 obwodowych i ośrodkowych była możliwa po podaniu haloperidolu-antagonisty receptorów dopaminowych D2, działającego zarówno obwodowo jak i ośrodkowo.

Podanie OLDA po uprzednim podaniu haloperidolu spowodowało zaledwie kilkuprocentowe zmiany zarówno w przypadku wentylacji spoczynkowej jak i szczytowej w odpowiedzi na podanie 12% hipoksji, w porównaniu do warunków kontrolnych (Rys. 11).

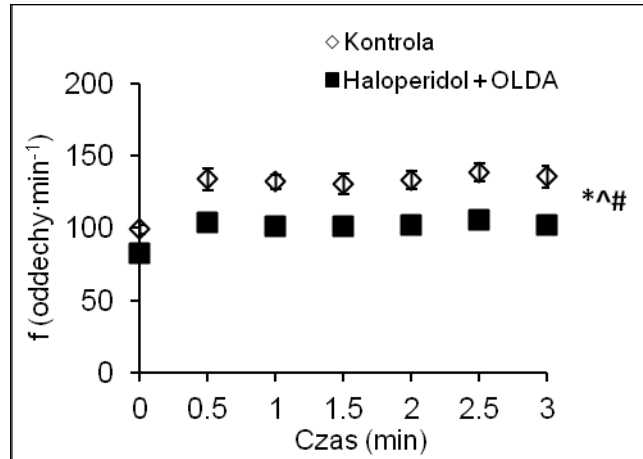


Rys. 11. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych i ośrodkowych D2.

Zmiany w przebiegu odpowiedzi oddechowej na hipoksję zachodziły za pośrednictwem zarówno objętości oddechowej jak i częstości ($p < 0,0001$ i $p < 0,001$, efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA), jednakże były to całkiem przeciwstawne efekty, co spowodowało brak istotnej zmiany w wentylacji minutowej.

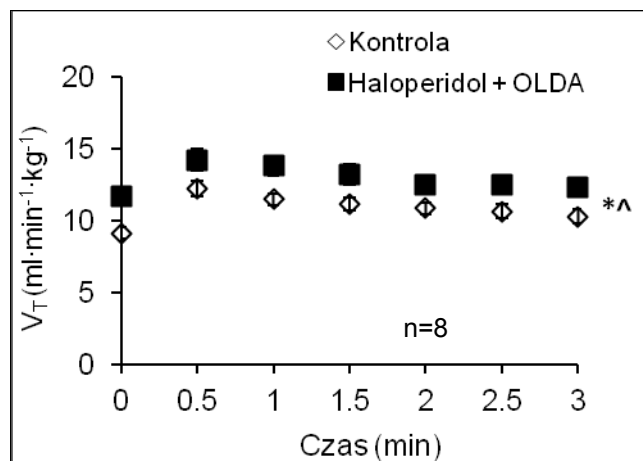
OLDA podawana na tle działania haloperidolu spowodowała znaczne obniżenie częstości oddechowej w porównaniu do warunków kontrolnych. Odnotowałam spadek

częstości spoczynkowej ze średniej wartości $99,1 \pm 3,35$ do $82,4 \pm 4,2$ liczba oddechów/min ($p < 0,009$), a częstości szczytowej z $133,8 \pm 7,76$ do $104,3 \pm 3,68$ liczba oddechów /min ($p < 0,002$) w odpowiedzi na 12% bodziec hipoksyjny (Rys. 12).



Rys. 12. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych i ośrodkowych D2. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt OLDA ($\wedge P < 0.001$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA (# $P < 0.009$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Jednocześnie zaobserwowałam zwiększenie objętości oddechowej o $28,5 \pm 5,8$ % ($p < 0,0005$) w warunkach spoczynku i o $16,1 \pm 1,8$ % w warunkach szczytowych, w porównaniu do wartości kontrolnych (Rys. 13).



Rys. 13. Zmiany objętości minutowej (V_T) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych i ośrodkowych D2. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt OLDA ($\wedge P < 0.0001$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

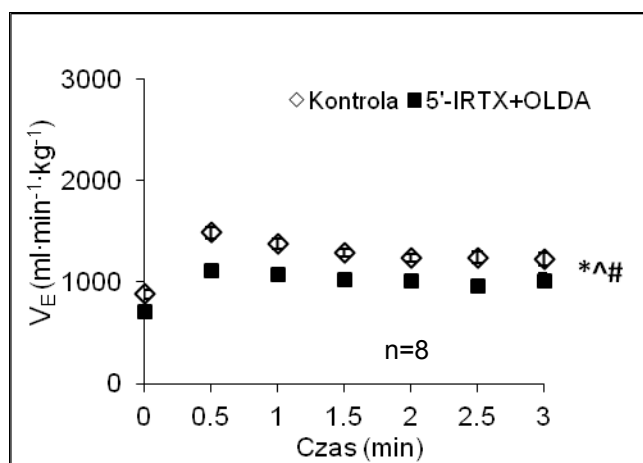
Wynik ten stanowi o złożoności działania OLDA. Działanie OLDA na tle blokady

receptorów dopaminowych D2 zarówno obwodowych jak i ośrodkowych przypomina działanie samej dopaminy, która pobudza ośrodki oddechowe w mózgu i hamuje odpowiedź oddechową regulowaną na poziomie kłębków szyjnych. Efektem pobudzenia ośrodków oddechowych w mózgu jest zwiększenie objętości oddechowej natomiast zmniejszenie częstości oddechowej jest przejawem zahamowania odpowiedzi oddechowej na poziomie kłębków szyjnych.

4.1.4. Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1

Blokada receptorów wanilloidowych TRPV1 nastąpiła po podaniu 5'-jodoresinotoksyny. Działanie OLDA na tle blokady receptorów wanilloidowych przypominało to uzyskane na tle blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych.

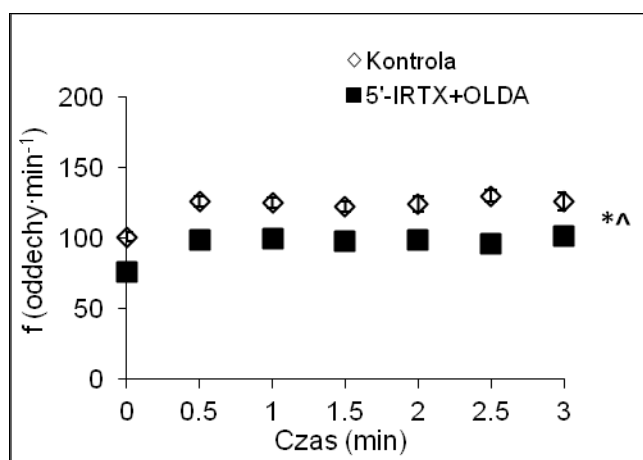
OLDA podawana po uprzednim zablokowaniu receptorów TRPV1 spowodowała zmniejszenie spoczynkowej wentylacji minutowej o $18,9 \pm 3,5\%$ ($p < 0,0007$), a szczytowej o $25 \pm 3,5\%$ ($p < 0,0002$) w odpowiedzi na 12% bodziec hipoksyjny w porównaniu do warunków kontrolnych (Rys. 14).



Rys. 14. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12% hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1 godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1. Znaczący efekt czasu ($*P < 0,0001$), efekt OLDA ($^{\wedge}P < 0,001$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA ($\#P < 0,006$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Zmiany w przebiegu odpowiedzi oddechowej zachodziły wyłącznie za pośrednictwem częstości oddechowej ($p < 0,0001$, efekt związku dwuczynnikowa ANOVA).

Częstość oddechów w spoczynku spadała z $100,6 \pm 3,2$ do $76,3 \pm 1,4$ /min, a szczytowa częstość z $126,4 \pm 3,6$ do $98,9 \pm 2,84$ /min (Rys. 15).



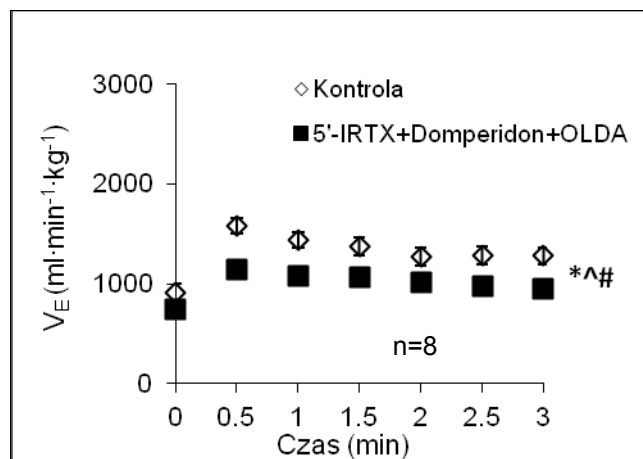
Rys. 15. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1 godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1. Znaczący efekt czasu (* $P < 0,0001$), efekt OLDA (^ $P < 0,0001$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Podanie OLDA na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 nie wpłynęło na objętość oddechową zarówno w fazie stymulującej jak i depresyjnej oddychania.

4.1.5. Wpływ OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV 1 i dopaminowych D2 obwodowych

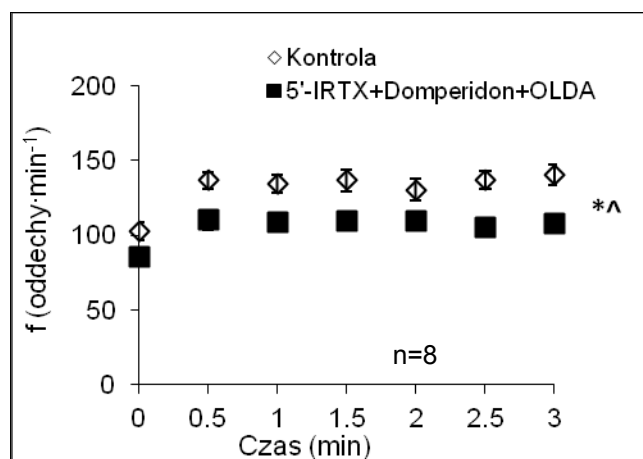
Badania obejmowały również określenie wpływu OLDA na regulację oddychania na tle blokady dwóch różnych rodzajów receptorów, a mianowicie receptorów dopaminowych obwodowych D2 i receptorów wanilloidowych TRPV1.

Działanie OLDA na tle tej podwójnej blokady receptorowej skutkowało zmniejszeniem wentylacji spoczynkowej o $14,8 \pm 9,8\%$ ($p < 0,03$), a szczytowej o $27,5 \pm 4,4\%$ ($p < 0,0001$) w porównaniu do warunków kontrolnych, otrzymanych w efekcie podania 12 % hipoksji (Rys. 16).



Rys. 16. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV 1i dopaminowych obwodowych D2. Znaczący efekt czasu (* $P<0.0001$), efekt OLDA (^ $P<0.001$) oraz jednoczesny efekt czasu i OLDA (# $P<0.002$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

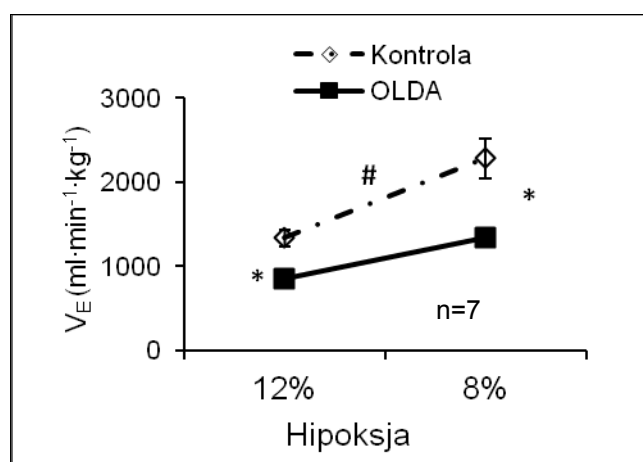
Zmiany w przebiegu odpowiedzi oddechowej na hipoksję zachodziły głównie za pośrednictwem częstości oddechowej, która malała w efekcie podania OLDA na tle jednoczesnej blokady receptorowej dopaminowej obwodowej i wanilloidowej ($p<0,018$ efekt związku x czas oraz $p<0,0001$ efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA) . W warunkach szczytowej 12% hipoksji częstość oddechowa spadła o $19\pm 4,5\%$ ($p<0,002$) zaś objętość oddechowa o $13,2\pm 3\%$ ($p<0,002$) w porównaniu do wartości kontrolnych (Rys. 17).



Rys. 17. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem OLDA i 1godzinę po podaniu OLDA. OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 i dopaminowych obwodowych D2 . Znaczący efekt czasu (* $P<0.0001$), efekt OLDA (^ $P<0.0001$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

4.1.6. OLDA a czułość hipoksyjna

Zaobserwowałam zmiany czułości hipoksyjnej po podaniu OLDA. Czułość hipoksyjna jest definiowana jako nasilenie szczytowej wentylacji płucnej wraz ze wzrostem poziomu siły bodźca. W moim układzie doświadczalnym czułość hipoksyjna została oszacowana ze wzrostu od punktu spoczynkowego wentylacji minutowej (0)' do punktu szczytowego (30'), dla dwóch poziomów bodźca hipoksyjnego, w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA. Zaobserwowałam, że na obu poziomach hipoksji, szczytowa wentylacja była niższa po podaniu OLDA ($p < 0,008$ dla różnic pomiędzy V_E szczytową w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA w przypadku 12% hipoksji i $p < 0,004$ dla różnic pomiędzy V_E szczytową w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA w przypadku 8% hipoksji; sparowany test Studenta). Obniżenie to wyrażone linią regresji liniowej, znamienne nasilało się przy silniejszej 8% hipoksji po podaniu OLDA ($p < 0,02$; sparowany *test t*). Stąd wniosek, że OLDA zmniejsza czułość hipoksyjną, a zatem upośledza zdolności kłębków szyjnych do normalnie mającego miejsce zwiększania oddychania wraz ze wzrostem siły bodźca hipoksyjnego (Rys. 18).

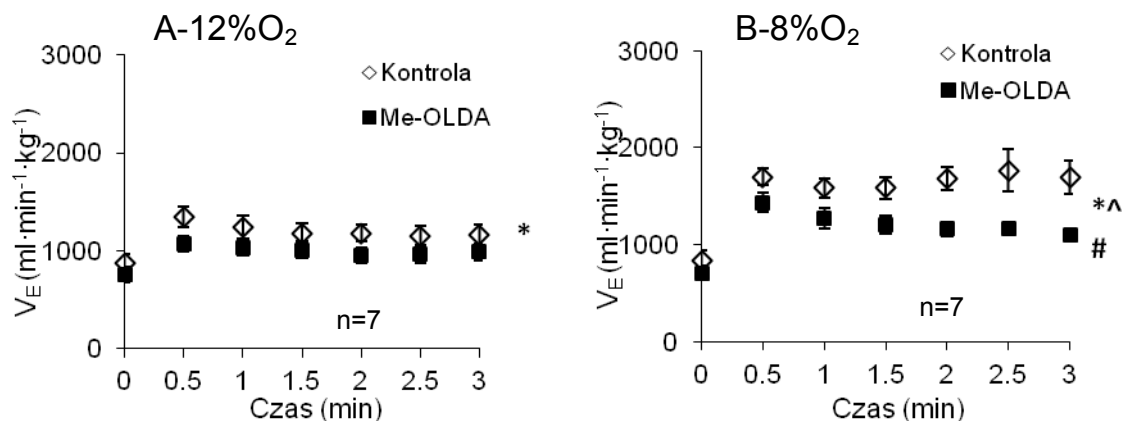


Rys. 18. Czułość hipoksyjna - oszacowana ze wzrostu od punktu spoczynkowego wentylacji minutowej (0)' do punktu szczytowego (30'), dla dwóch poziomów bodźca hipoksyjnego 12 i 8 %, w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA. * $P < 0,008$ dla różnic pomiędzy szczytowym V_E u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA dla 12% hipoksji. * $P < 0,004$ dla różnic pomiędzy szczytowym V_E u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu OLDA dla 8% hipoksji (sparowany test Studenta). OLDA spowodowała znacząco większe obniżenie w przypadku silniejszego bodźca hipoksyjnego, 8% hipoksji (sparowany test Studenta, # $P < 0,02$). A zatem OLDA obniżyła nie tylko szczytowe wartości wentylacji minutowej lecz również czułość hipoksyjną.

4.2 Me-OLDA

4.2.1 Me-OLDA a odpowiedzi oddechowe na hipoksję

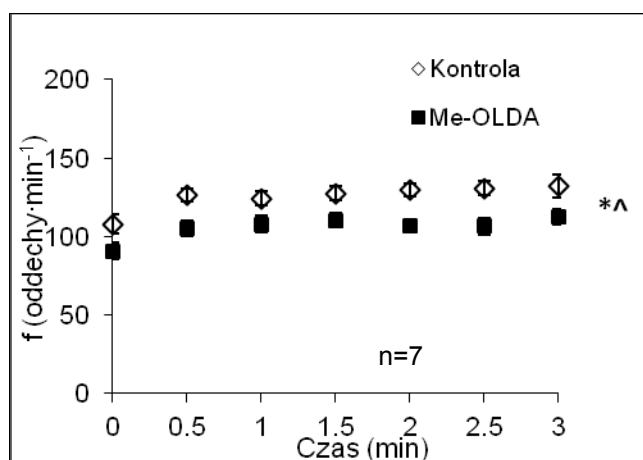
Działanie Me-OLDA skutkowało zmniejszeniem wentylacji minutowej (w przypadku 12% hipoksji $p < 0,01$, efekt związku dwuczynnikowa ANOVA). Zaobserwowałam jednak zdecydowanie słabszą reakcję w porównaniu do tej, którą uzyskałam po podaniu OLDA. Wentylacja spoczynkowa spadła z $875,5 \pm 88,3$ do $754,6 \pm 82,2$ ml/min/kg ($p < 0,04$), o $13,1 \pm 5,8\%$ zaś szczytowa zmniejszyła się ze średniej wartości $1347,9 \pm 108,9$ do $1072,1 \pm 76,8$ ml/min/kg ($p < 0,002$) tj. spadła o $9,7 \pm 4,2\%$ w odpowiedzi na 12% bodziec hipoksyjny, w porównaniu do wartości kontrolnych. W odpowiedzi na 8% hipoksję zmiana w wentylacji spoczynkowej była podobna do tej przy 12% hipoksji, zaś wentylacja szczytowa zmniejszyła się ze średniej wartości $1698,3 \pm 88,2$ do $1433,8 \pm 97,4$ ml/min/1000g ($p < 0,001$), spadła o $15,7 \pm 6,4\%$ w porównaniu do kontroli.



Rys. 19. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12% hipoksję (Panel A) i 8% hipoksję (Panel B) u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Znaczący efekt czasu ($*P < 0,003$), efekt Me-OLDA ($^{\wedge}P < 0,03$) oraz jednoczesny efekt czasu i Me-OLDA ($\# P < 0,002$) dla Panelu B. Znaczący efekt czasu ($*P < 0,001$), efekt Me-OLDA ($^{\wedge}P < 0,01$) dla Panelu A (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

Zmiany w przebiegu wentylacji minutowej po podaniu Me-OLDA zachodziły wyłącznie za pośrednictwem częstości oddechowej ($p < 0,001$ efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA) (Rys. 20), co dodatkowo pogłębia różnicę pomiędzy OLDA i jej zmetylowaną pochodną, OLDA bowiem działała na regulację oddychania zarówno poprzez częstość jak i objętość oddechową. Częstość oddechowa spoczynkowa spadła ze średniej wartości $107,9 \pm 5,9$ do $90,9 \pm 5,6$ liczba oddechów/min ($p < 0,0001$), a szczytowa z

126,8±4,1 do 104,9±4,9 liczba oddechów /min w następstwie podania 12% bodźca hipoksyjnego. Podanie Me-OLDA zносиło odpowiedź ze strony objętości oddechowej.



Rys. 20. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Znaczący efekt czasu (*P<0.0001), efekt Me-OLDA (^P<0.0001) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Zmiany dotyczące częstości i objętości oddechowej po podaniu Me-OLDA, w odpowiedzi na dwa poziomy bodźca hipoksyjnego (12 i 8%) przedstawione zostały w tabeli numer 5.

Tabela 5. Częstość oddechowa (f) i objętość oddechowa (V_T) w trzech punktach czasowych w przebiegu odpowiedzi oddechowej: punkt spoczynkowy- 0 s, punkt szczytowy -30 s, punkt depresyjny-180s, w czasie 12 i 8% hipoksji, w dwóch różnych warunkach eksperymentalnych: kontrolnych i po podaniu OLDA.

Warunki	Kontrola			ME-OLDA		
	12% Hipoksja					
Test hipoksyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny	Punkt spoczynkowy	Punkt szczytowy	Punkt depresyjny
Czas testu (sek)	0	30	180	0	30	180
f (min ⁻¹)	108.0±5.9	126.8±4.1	132.1 ±7.4	90.9±5.6*	105.0±5.0	112.6±5.2●
V _T (ml kg ⁻¹)	8.2±0.4	10.6±0.6	9.2±0.6	8.2±0.4	10.3±0.4	8.8±0.5
8% Hipoksja						
Test hipoksyjny	Punkt	Punkt	Punkt	Punkt	Punkt	Punkt
Czas testu (sek)	0	30	180	0	30	180
f (min ⁻¹)	98.0±7.1	145.7 ±4.8	163.9±12.5	81.5±5.9*	119.9±6.4 ^	121.8±6.2●
V _T (ml kg ⁻¹)	8.4±0.5	12.1±0.7	11.0±1.0	8.8±0.3	12.0 ±0.3	9.3 ±0.3#

Średnie wartości z 7 szczurów ± SE; ME-OLDA podawana była w pojedynczej dawce, 40 mg/kg masy ciała
*P<0.001 dla różnic pomiędzy normoksyjnym f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu ME-OLDA dla dwóch poziomów hipoksji

^P<0.003 dla różnic pomiędzy punktem szczytowym hipoksji f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu ME-OLDA dla jednego poziomu hipoksji

●P<0.003 dla różnic pomiędzy punktem depresyjnym hipoksji f u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu ME-OLDA dla dwóch poziomów hipoksji

#P<0.008 dla różnic pomiędzy punktem depresyjnym hipoksji V_T u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu ME-OLDA dla jednego poziomu hipoksji

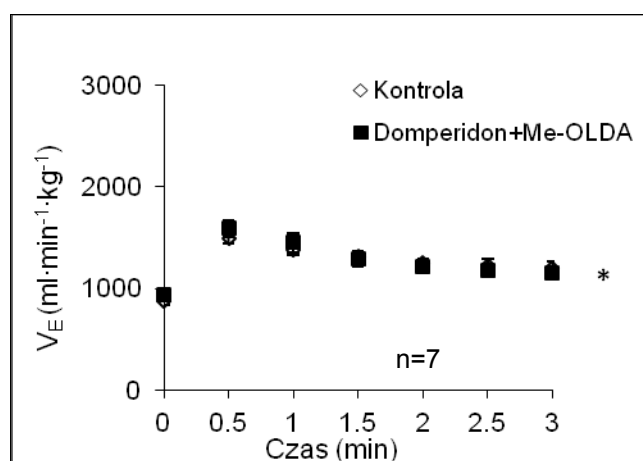
(Sparowany test Studenta t)

4.2.2 Me-OLDA a odpowiedzi oddechowe na hiperkapnię

Me-OLDA nie wpłynęła na odpowiedź oddechową na hiperkapnię, co może stanowić o głównie obwodowym działaniu Me-OLDA na regulację oddychania.

4.2.3 Wpływ Me-OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów dopaminowych

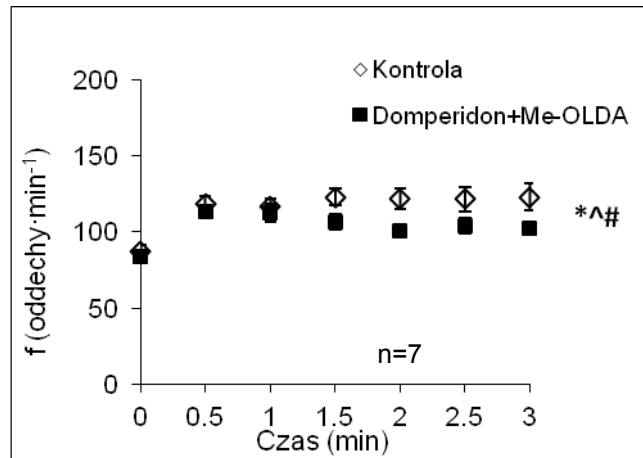
Me-OLDA podawana na tle blokady receptorów dopaminowych D2 obwodowych, doprowadziła do zniesienia odpowiedzi oddechowej, do stanu uzyskanego w warunkach kontrolnych (Rys. 21). Wynik ten może świadczyć o wyłącznym oddziaływaniu Me-OLDA na regulację oddychania poprzez receptory dopaminergiczne D2 obwodowe.



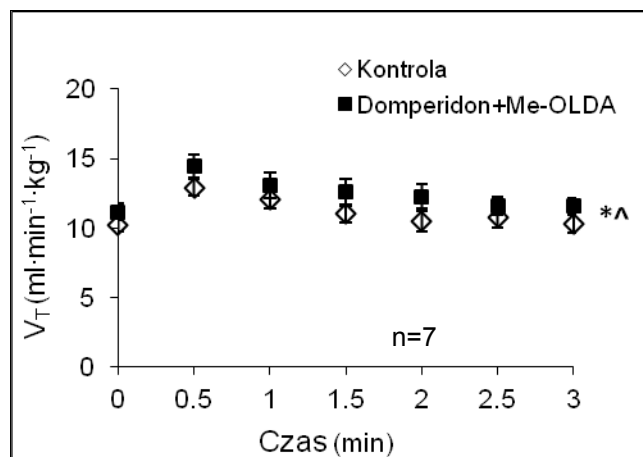
Rys. 21. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych D2. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

Przebieg wentylacji minutowej po podaniu Me-OLDA, jest wypadkową zmian zarówno objętości oddechowej ($p < 0,003$ efekt związku dwuczynnikowa ANOVA) jak i częstości oddechowej ($p < 0,03$ efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA). Spoczynkowa objętość oddechowa wzrosła o $10 \pm 3,5\%$ ($p < 0,01$), zaś w 30 sek od podania 12% bodźca hipoksyjnego zwiększyła się o $11,9 \pm 4,3\%$ ($p < 0,01$), w porównaniu do warunków kontrolnych. Z kolei częstość oddechowa w warunkach spoczynku spadła ze średniej wartości $86,99 \pm 4,4$ w kontroli do $83,6 \pm 1,8$ liczba oddechów/min po podaniu Me-OLDA, zaś w 30 sek od podania 12% hipoksji zmniejszyła się z $118,4 \pm 5,5$ do $113,4 \pm 3,9$ liczba

oddechów /min w porównaniu do warunków kontrolnych.



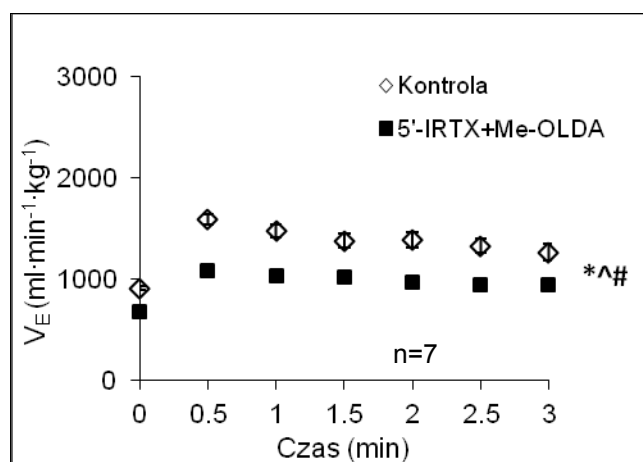
Rys. 22. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych D2. Znaczący efekt czasu (*P<0.0001) efekt Me-OLDA (^P<0.035) oraz jednoczesny efekt czasu i Me-OLDA (# P<0.0001) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)



Rys. 23. Zmiany objętości minutowej (V_T) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych D2. Znaczący efekt czasu (*P<0.0001), efekt Me-OLDA (^P<0.003) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami)

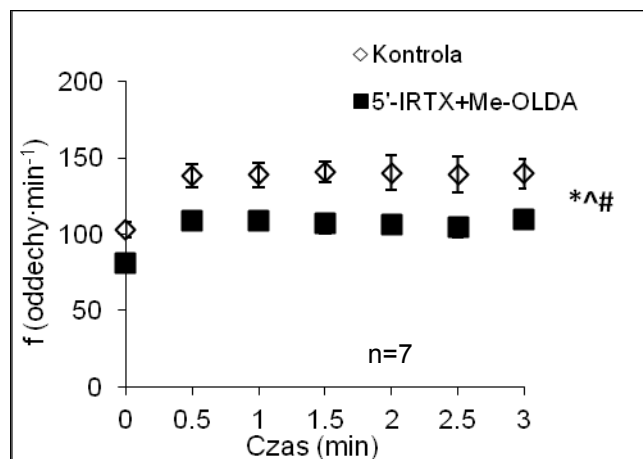
4.2.4 Wpływ Me-OLDA na regulację oddychania na tle blokady receptorów wanilloidowych

Efektem działania Me-OLDA na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 było obniżenie wentylacji minutowej ($p < 0,0001$, efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA). Odnotowałam spadek wentylacji minutowej spoczynkowej o $24,79 \pm 3,3\%$ ($p < 0,0001$), zaś wentylacji szczytowej o $31,6 \pm 2,9\%$ w odpowiedzi na 12% bodziec hipoksyjny w porównaniu do warunków kontrolnych.

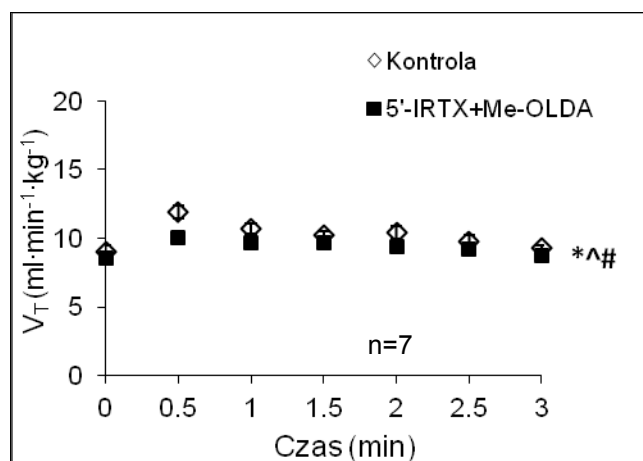


Rys. 23. Zmiany wentylacji minutowej (V_E) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1. Znaczący efekt czasu (* $P < 0.0001$), efekt Me-OLDA (^ $P < 0.0001$) oraz jednoczesny efekt czasu i Me-OLDA (# $P < 0.0001$) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

Zmiany w przebiegu wentylacji minutowej nastąpiły głównie w wyniku zmniejszenia częstości oddechowej ($p < 0,001$, efekt związku, dwuczynnikowa ANOVA), która zarówno w warunkach spoczynku jak i szczytu spadła o 21% po podaniu Me-OLDA.



Rys. 24. Zmiany częstości oddechowej (f) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1. Znaczący efekt czasu (*P<0.0001) efekt Me-OLDA (^P<0.001) oraz jednoczesny efekt czasu i Me-OLDA (# P<0.05) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

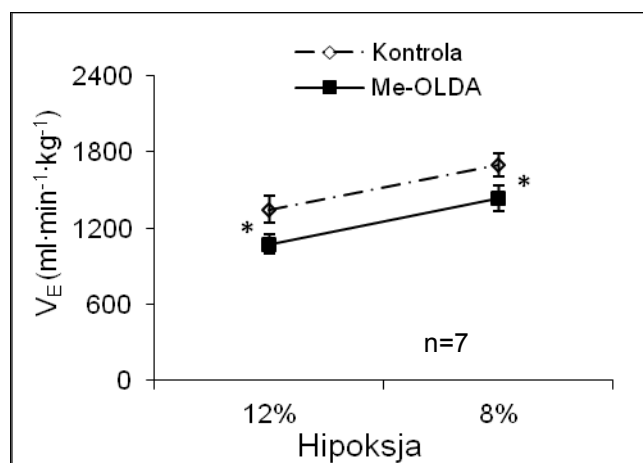


Rys. 25. Zmiany objętości minutowej (V_T) w czasie ekspozycji na 12 % hipoksję u szczurów w warunkach kontrolnych tj. przed podaniem Me-OLDA i 1 godzinę po podaniu Me-OLDA. Me-OLDA podawana była na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV 1. Znaczący efekt czasu (*P<0.0001), efekt Me-OLDA (^P<0.01) oraz jednoczesny efekt czasu i Me-OLDA (# P<0.03) (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzalnymi pomiarami).

4.2.5. Me-OLDA a czułość hipoksyjna

Nie zaobserwowałam zmian czułości hipoksyjnej po podaniu Me-OLDA. Odnotowałam, że na obu poziomach hipoksji, szczytowa wentylacja była niższa po podaniu Me-OLDA (p<0,04 dla różnic pomiędzy V_E szczytową w warunkach kontrolnych i po podaniu Me-OLDA w przypadku 12% hipoksji i p<0,02 dla różnic pomiędzy V_E szczytową w warunkach kontrolnych i po podaniu Me-OLDA w przypadku 8% hipoksji; sparowany test Studenta). Obniżenie to wyrażone linią regresji liniowej, łączącej

szczytowe wentylacje nie nasilało się przy silniejszej 8% hipoksji po Me-OLDA (Rys.26). Stąd wniosek, że Me-OLDA nie wpływa na czułość hipoksyjną, a zatem nie upośledza zdolności kłębków szyjnych do normalnie mającego miejsce zwiększania oddychania wraz ze wzrostem siły bodźca hipoksyjnego.



Rys. 26. Czułość hipoksyjna. Czułość hipoksyjna została oszacowana ze wzrostu od punktu spoczynkowego wentylacji minutowej (0') do punktu szczytowego (30'), dla dwóch poziomów bodźca hipoksyjnego 12 i 8 %-owego, w warunkach kontrolnych i po podaniu Me-OLDA. * $P < 0.04$ dla różnic pomiędzy szczytowym V_E u szczurów w warunkach kontrolnych i po podaniu Me-OLDA dla 12% hipoksji. * $P < 0.02$ dla różnic pomiędzy szczytowym V_E , w warunkach kontrolnych i po podaniu Me-OLDA dla 8% hipoksji (sparowany test Studenta).

4.3 Metabolizm tlenowy

Pomiary metabolizmu tlenowego zostały przeprowadzone celem określenia charakterystyki działania badanego związku. Głównym zamierzeniem tej części eksperymentalnej było ustalenie, czy OLDA działa na regulację oddychania w sposób bezpośredni, czy też zmniejszenie odpowiedzi oddechowej pod wpływem działania tego związku wynika ze zmniejszenia metabolizmu tlenowego.

W normoksji OLDA zmniejsza wentylację minutową o $43,4 \pm 7,7\%$ ($p < 0,002$), a w 8% hipoksji o $26,4 \pm 3,8\%$ ($p < 0,001$), w porównaniu do wartości kontrolnych. Z kolei konsumpcja tlenu VO_2 po podaniu OLDA zmniejszała się o $32 \pm 8,7\%$ ($p < 0,02$) w normoksji i o $20 \pm 8,6\%$ ($p < 0,03$) w 8% hipoksji. Zmiany te były istotne statystycznie. Nie odnotowałam jednak zmian istotnych statystycznie zarówno w normoksji jak i hipoksji w przypadku wpływu OLDA na parametr metaboliczny jakim jest VE/VO_2 w porównaniu do wartości kontrolnych, co świadczy o braku wpływu OLDA na metabolizm tlenowy. Zmiany dotyczące metabolizmu tlenowego przedstawiłam w Tabeli 4.

Tabela 4. Minutowa wentylacja (V_E), konsumpcja tlenu (V_{O_2}) oraz metaboliczne i oddechowe wskaźniki: (V_E/V_{O_2}), ($V_{O_2\text{ OLDA}}/V_{O_2\text{ CON}}$) i ($V_{E\text{ OLDA}}/V_{E\text{ CON}}$) w czasie normoksji i 8% hipoksji, w trakcie dwóch różnych warunków eksperymentalnych, tj. kontrolnych (bez farmakologicznej ingerencji) i po podaniu OLDA.

Warunki	Kontrola	OLDA
Normoksja		
V_E (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	1142,3±41,3	643,4±89,0*
$V_{E\text{ OLDA}}/V_{E\text{ CON}}$	0,56±0,08	
V_{O_2} (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	55,6±6,2	35,7±1,9°
V_E/V_{O_2}	21,4±2,5	17,9±2,1
$V_{O_2\text{ OLDA}}/V_{O_2\text{ CON}}$	0,67±0,09	
Hipoksja		
V_E (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	1648,7±77,5	1204,7±33,9#
$V_{E\text{ OLDA}}/V_{E\text{ CON}}$	0,73±0,04∞	
V_{O_2} (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	33,2±2,9	25,9±2,1●
V_E/V_{O_2}	50,8±4,7	47,4±4,0
$V_{O_2\text{ OLDA}}/V_{O_2\text{ CON}}$	0,795±0,09£	

Srednie wartości ± SE z pięciu szczurów; OLDA podawana była w pojedynczej dawce, 40 mg/kg dootrzewnowo.

* P< 0.002 dla różnic pomiędzy V_E normoksyjnym u szczurów kontrolnych i szczurów którym podano OLDA (sparowany test t Studenta).

P< 0.001 dla różnic pomiędzy V_E hipoksyjnym u szczurów kontrolnych i szczurów którym podano OLDA (sparowany test t Studenta).

° P< 0.02 V_{O_2} 002 dla różnic pomiędzy V_{O_2} normoksyjnym u szczurów kontrolnych i szczurów którym podano OLDA (sparowany test t Studenta).

● P<0.03 dla różnic pomiędzy V_{O_2} hipoksyjnym u szczurów kontrolnych i szczurów którym podano OLDA (sparowany test t Studenta).

∞ P<0.04 dla różnic pomiędzy $V_{E\text{ OLDA}}/V_{E\text{ CON}}$ w warunkach normoksji i hipoksji.

£ P<0.048 dla różnic pomiędzy $V_{O_2\text{ OLDA}}/V_{O_2\text{ CON}}$ w warunkach normoksji i hipoksji.

4.4. Antagoniści i ich wpływ na regulację oddychania

Wszystkie wykorzystane przeze mnie w doświadczeniach blokery układów receptorowych tj. domperidon, haloperidol oraz 5⁷-jodoresinoferotoksyna zostały przebadane pod kątem wpływu na regulację oddychania. Żaden z wymienionych antagonistów nie wpływa istotnie statystycznie na odpowiedź oddechową na hipoksję. Zatem wszystkie odpowiedzi na hipoksję uzyskane w efekcie podawania OLDA bądź Me-OLDA na tle działania wyżej wymienionych antagonistów nie były obciążone działaniem samych antagonistów.

4.5. Podsumowanie Wyników

1. Zarówno OLDA jak i jej zmetylowana pochodna Me-OLDA wpływają na regulację oddychania, obniżając odpowiedź oddechową w warunkach normoksji oraz hipoksji. Jednak hamujący wpływ OLDA na regulację oddychania jest około dwukrotnie silniejszy niż Me-OLDA.

2. Zarówno OLDA jak i Me-OLDA oddziałują na regulację oddychania poprzez dopaminergiczny układ receptorowy D2. Wpływ Me-OLDA na regulację oddychania zachodzi głównie przez układ dopaminergiczny obwodowy D2, zaś w przypadku OLDA istotny jest również udział dopaminergicznej komponenty ośrodkowej.
3. Brak wpływu Me-OLDA na odpowiedź oddechową na hiperkapnię potwierdza swoistość działania tego związku i sugeruje, że ścieżka działania tego związku na regulację oddychania prowadzi przez kłębki szyjne. Z kolei uzyskany efekt obniżenia odpowiedzi oddechowej na 10% bodziec hiperkapniczny po podaniu OLDA pozwala przypuszczać, że charakter działania tego związku na regulację oddychania jest zarówno obwodowy jak i ośrodkowy.
4. W przeciwieństwie do samej OLDA, Me-OLDA może działać na regulację oddychania jako agonista receptorów wanilloidowych TRPV1 umiejscowionych na neuronach dopaminergicznych, które pobudzają układ glutaminergiczny, co mogłoby zmniejszać hamujące skutki oddziaływania OLDA na regulację oddychania zachodzące poprzez receptory dopaminergiczne D2.
5. W przeciwieństwie do OLDA, Me-OLDA nie zaburza czułości hipoksyjnej, co potwierdza słabsze oddziaływanie Me-OLDA na regulację oddychania.
6. Brak wpływu OLDA na metabolizm tlenowy świadczy o bezpośrednim wpływie badanego związku chemicznego na regulację oddychania, zaobserwowane zmniejszenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu OLDA nie jest efektem obniżenia metabolizmu tlenowego.

5. Dyskusja

Celem mojej pracy było określenie wpływu lipidowych pochodnych dopaminy tj. OLDA (N-oleinoilo-dopaminy) oraz Me-OLDA (N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopaminy) na odpowiedzi oddechowe na bodźce chemiczne oraz określenie poprzez jakie układy neuroprzekaźnikowe związki te oddziałują na regulację oddychania u nieuśpionych zwierząt. Lipofilna budowa OLDA i Me-OLDA umożliwia im penetrację bariery krew-mózg, co dodatkowo w połączeniu z ich stosunkowo wysoką stabilnością (35, 4) stwarza potencjalną możliwość zastosowania tych związków w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem dopaminy w mózgu. Sama dopamina jako związek hydrofilowy i w dodatku ulegający natychmiastowej degradacji obwodowej nie znajduje zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

5.1. Wpływ lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania

W pierwszej kolejności określiłam wpływ badanych przeze mnie lipidowych pochodnych dopaminy na odpowiedź oddechową na hipoksję. Pierwsza i najważniejsza obserwacja uzyskana na podstawie wyników moich badań jest następująca: zarówno OLDA jak i jej zmetylowana pochodna wpływają hamująco na regulację oddychania i zmniejszają odpowiedź na hipoksję. Jednakże w przypadku OLDA zmniejszenie to w porównaniu do tego uzyskanego po Me-OLDA jest o 100% wyższe w warunkach normoksji i o 75% w warunkach szczytowej hipoksji. Co więcej, zmniejszenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję w przypadku OLDA zachodzi za pośrednictwem zarówno częstości oddechowej jak i objętości oddechowej, które maleją po podaniu OLDA. W przypadku Me-OLDA obniżenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję zachodzi wyłącznie za pośrednictwem częstości oddechowej. Obserwacja ta przemawia za określeniem OLDA jako związku działającego na regulację oddychania na poziomie zarówno ośrodkowym jak i obwodowym, w odróżnieniu od zmetylowanej pochodnej OLDA, której działanie jest głównie obwodowe. Istnieją bowiem przesłanki, zgodnie z którymi zmiany w odpowiedzi oddechowej na hipoksję na poziomie kłębków szyjnych zachodzą za pośrednictwem częstości zaś zmiany w odpowiedzi oddechowej na poziomie mózgu zachodzą głównie za pośrednictwem objętości oddechowej (15).

5.2 Lipidowe pochodne dopaminy a choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona charakteryzuje się drastycznym obniżeniem poziomu dopaminy (o ponad 80%) w jądrach podstawy mózgu, na skutek postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznego szlaku nigrostriatalnego (1). Obecnie najczęściej stosowanym środkiem w leczeniu tej choroby jest prekursor dopaminy: 3,4-dihydroksyfenylo-L-alanina (L-DOPA), który uzupełnia braki naturalnego neuroprzekaźnika. By zahamować rozkład L-DOPA i umożliwić jej przejście do mózgu podaje się jednocześnie benserazyd lub inny inhibitor dekarboksylazy dopaminy. Jednak ze względu na liczne efekty uboczne występujące podczas terapii L-DOPA+benserazyd, np: zaburzenia myślenia czy nadmierną aktywność ruchową oraz opóźniony efekt terapeutyczny tego związku trwają poszukiwania alternatywnych metod leczenia (1,40). Ponadto niedogodnością terapeutycznego zastosowania L-DOPA w leczeniu chorych na Parkinsona jest opóźnione działanie tego związku chemicznego wynikające z konieczności enzymatycznej transformacji L-DOPA w dopaminę. Nadzieje obecnie pokładane są więc w lipidowych pochodnych dopaminy. W 2009 roku Konieczny i wsp (40) zbadali wpływ OLDA na napięcie mięśniowe oraz akinezę w rezerpinowym szczurzym modelu wywołującym sztywność mięśniową. Okazało się, że OLDA (20 mg/kg) znacząco obniżyła indukowane przez rezerpinę (2.5 mg/kg) napięcie mięśniowe w odpowiedzi na pasywne rozciąganie i zginanie stawu kolanowego kończyny tylnej szczura, co zostało zmierzone w badaniu MMG (określającym czynności mechaniczne mięśni). Co więcej, OLDA obniżyła wywołaną podaniem rezerpiny zwiększoną aktywność elektromiograficzną, mierzoną przed i w trakcie ruchu szczura przy pomocy badania EEG (metoda rejestracji i analizy bioelektrycznej czynności mięśniowej i nerwowej). Podanie L-DOPA (25 mg/kg) także osłabiało wywołane rezerpiną zwiększenie aktywności EEG i MMG, jednakże efekt działania tego związku był zdecydowanie słabszy i opóźniony w czasie w porównaniu do tego uzyskanego po podaniu OLDA.

A zatem OLDA jest związkiem chemicznym o właściwościach mięśniowo-relaksacyjnych, podobnie jak Me-OLDA, przy której właściwości te są jeszcze silniejsze niż w przypadku OLDA. Podanie Me-OLDA w dawce 10 mg/kg wywołuje efekt mięśniowo-relaksacyjny taki sam jak podanie OLDA w dawce 20 mg/k (dane niepublikowane).

Ważnym aspektem w kontekście opisywanych przeze mnie zagadnień badawczych jest

występujące w chorobie Parkinsona zaburzenie oddychania. Uważa się, że obniżona odpowiedź oddechowa na hipoksję towarzysząca tej chorobie może wynikać nie tylko z centralnych, ale także obwodowych deficytów neurotransmisyjnych. Pacjenci z chorobą Parkinsona mają obniżoną czułość hipoksyjną będącą prawdopodobnie efektem dysfunkcji chemoreceptorów oddechowych, w których dopamina jest głównym neuroprzekaźnikiem (32).

Na podstawie powyżej przedstawionych informacji można wnioskować o potencjalnych możliwościach OLDA i Me-OLDA jako nośników dopaminy do mózgu w leczeniu choroby Parkinsona. Działanie zmetylowanej pochodnej OLDA wydaje się tu być korzystniejsze. Podanie Me-OLDA mogłoby bowiem nie tylko zwiększyć dowóz dopaminy do mózgu, ale również nie pogłębiałoby dodatkowo depresji oddechowej, będącej częstym zaburzeniem w chorobie Parkinsona. Zmetylowana OLDA, tak jak opisałam to w rozdziale 5.1 wpływa co prawda na obniżenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję, jednak zmniejszenie odpowiedzi oddechowej po podaniu samej OLDA jest dwukrotnie silniejsze.

5.3. Udział receptorów wanilloidowych w oddziaływaniu lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania

Kolejna obserwacja wynikająca z moich doświadczeń dotyczy możliwości działania obydwu badanych przeze mnie związków chemicznych na regulację oddychania poprzez interakcję z receptorem wanilloidowym TRPV1. Wpływ OLDA na odpowiedź oddechową na hipoksję na tle blokady receptorów wanilloidowych przypomina działanie samej OLDA, co wskazuje na brak udziału receptora TRPV1 w tej odpowiedzi. W przypadku Me-OLDA uzyskałam odmienny wynik, a mianowicie zmniejszenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 pogłębiło się o około 85% w przypadku zarówno wentylacji minutowej spoczynkowej jak i szczytowej w porównaniu do odpowiedzi oddechowej uzyskanej po zastosowaniu samej Me-OLDA. Wynik ten może stanowić rozwiązanie zagadnienia badawczego dotyczącego określenia czy OLDA lub Me-OLDA mogłyby oddziaływać na regulację oddychania bezpośrednio poprzez interakcję z neuronami dopaminergicznymi, czy też pośrednio poprzez interakcję z receptorem wanilloidowym TRPV1 zlokalizowanym na neuronach dopaminergicznych, prowadzącą do torowania glutaminergicznych wejść pobudzających

do tych neuronów w analogii do wpływu opisanego w komórkach dopaminergicznych w części zbitnej substancji czarnej w mózgu (42). Zmetylowana OLDA co prawda działa na regulację oddychania, zmniejszając odpowiedź oddechową na hipoksję, ale jest to działanie dwukrotnie słabsze niż to obserwowane w przypadku OLDA. Co więcej, działanie zmetylowanej OLDA na regulację oddychania nasiliło się po zablokowaniu receptorów wanilloidowych TRPV1. Wyciągam więc wniosek, że obydwie obserwacje mogą świadczyć o działaniu Me-OLDA, w przeciwieństwie do OLDA, na regulację oddychania poprzez interakcję z receptorem wanilloidowym TRPV1 na neuronach dopaminergicznych, prowadzącą do pobudzenia układu glutaminergicznego i receptora NMDA. Wiadomo bowiem, że pobudzenie układu glutaminergicznego prowadzi do podwyższenia odpowiedzi oddechowej na hipoksję o około 171% (w przypadku podania 8% hipoksji), gdzie o 25% podwyższa się objętość oddechowa, a o 125% częstość oddechowa (47). Blokada układu glutaminergicznego w efekcie podania antagonisty receptora NMDA, MK-801, prowadzi do mniejszej stymulacji oddychania przez hipoksję - zwiększenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję wynosi tylko około 84% (w przypadku podania 8% hipoksji), gdzie o 83% podwyższa się częstość oddechowa, a podwyższenie objętości oddechowej zostaje zniesione. Z kolei w warunkach 15-min normoksji, blokada receptora NMDA wpływa na obniżenie wentylacji minutowej o około 27%, w porównaniu do warunków kontrolnych (47). Tak więc Me-OLDA może działać na regulację oddychania jako agonista receptorów wanilloidowych TRPV1 umiejscowionych na neuronach dopaminergicznych. Jest to działanie pobudzające oddychanie, które przeciwdziała, hamującemu oddziaływaniu poprzez receptor dopaminowy D2 (ten wątek został dokładnie omówiony w podrozdziale 5.4). Reasumując, Me-OLDA jako agonista receptorów zarówno wanilloidowych TRPV1 jak i receptorów D2, prowadzących odpowiednio do pobudzenia i hamowania oddychania, prowadzi do mniejszego hamowania oddychania niż sama OLDA. Ponadto podanie zmetylowanej OLDA na tle blokady receptorów wanilloidowych TRPV1 uwidacznia nasilenie obniżenia odpowiedzi oddechowej, co wskazuje na wyłączne wówczas działanie Me-OLDA przez receptory dopaminergiczne D2, prowadzące do obniżenia oddychania.

5.4 Udział receptorów dopaminowych w oddziaływaniu lipidowych pochodnych dopaminy na regulację oddychania

Obydwa badane przeze mnie związki chemiczne działają na regulację oddychania głównie poprzez dopaminowy układ receptorowy.

Podanie Me-OLDA na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych doprowadziło do całkowitego zniesienia odpowiedzi oddechowej do warunków uzyskanych w kontroli, co świadczy o działaniu Me-OLDA na regulację oddychania głównie przez receptory dopaminowe D2 obwodowe.

W efekcie podania OLDA na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych i ośrodkowych doszło do zniesienia odpowiedzi oddechowej do warunków zbliżonych do tych uzyskanych w kontroli, różnice pomiędzy wartościami wentylacji minutowej w stosunku do kontroli oscylowały na poziomie kilku procent. Również w tym przypadku przebieg wentylacji minutowej był wynikiem zmian zarówno częstości jak i objętości oddechowej, co potwierdza działanie OLDA na regulację oddychania zarówno na poziomie mózgu jak i obwodowym. Działanie OLDA podawanej na tle blokady receptorów dopaminowych obwodowych przypominało to uzyskane na tle blokady receptorów dopaminowych ośrodkowych i obwodowych, z tą różnicą, że zmiany pomiędzy wartościami wentylacji minutowej w stosunku do kontroli oscylowały na poziomie nie kilku lecz kilkunastu procent.

5.5 Wpływ lipidowych pochodnych dopaminy na odpowiedź oddechową na hiperkapnię

Relatywny udział obwodowych i centralnych mechanizmów chemosensorycznych na regulację oddychania u uśpionych kotów został oszacowany w 1983 roku przez Pokorskiego i Lahiri. Stwierdzili oni, że udział komponenty obwodowej w kształtowaniu odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię jest niewielki. Jednakże, efekt komponenty obwodowej zwiększa się liniowo wraz ze wzrostem stężenia jonów wodorowych we krwi tętniczej $[H^+]$, procentowy udział obwodowej komponenty wzrasta z 9 do 17%, w następstwie zwiększenia stężenia jonów wodorowych we krwi tętniczej $[H^+]$ z 48.0 do 72.8 $nmol\ l^{-1}$ (48).

Badane przeze mnie związki chemiczne nie wpływały lub tylko nieznacznie

oddziaływały na odpowiedź oddechową na hiperkapnię. Podanie OLDA powodowało obniżenie odpowiedzi oddechowej na 10% bodziec hiperkapniczny, nie zarejestrowałam jednak zmian w przypadku słabszego 5% bodźca hiperkapnicznego. Z kolei zmetylowana OLDA w ogóle nie wpłynęła na odpowiedź oddechową na hiperkapnię. Reakcja na silną hiperkapnię mogła zależeć od czynności ośrodkowych chemoreceptorów zlokalizowanych na brzusznej powierzchni opuszki mózgu, reagujących na CO₂, które mają wyższy próg i inną dynamikę pobudzeniowych reakcji oddechowych niż chemoreceptory kłębków szyjnych. Reakcja ta mogła też zależeć od zwiększenia stężenia jonów H⁺ związanego z kwasimą oddechową. Uważa się, że ponad 80% odpowiedzi oddechowej na CO₂ i H⁺ zachodzi za pośrednictwem chemoreceptorów ośrodkowych, a tylko pozostałe kilkanaście procent za pośrednictwem chemoreceptorów kłębków szyjnych (16). Brak zdeklarowanych odpowiedzi oddechowych na hiperkapnię w przypadku Me-OLDA podkreśla swoistość działania tego związku na generację odpowiedzi na hipoksję na poziomie kłębków szyjnych. Wyniki te mogą sugerować głównie obwodowy wpływ Me-OLDA na regulację oddychania. W przypadku OLDA byłoby to również działanie ośrodkowe co wynika z obserwowanego przeze mnie obniżenia odpowiedzi oddechowej na 10% hiperkapnię po podaniu OLDA.

Określenie centralnej hamującej dopaminergicznej neuromodulacji oddychania jest wielkim wyzwaniem w związku z tym, że agoniści i antagoniści receptorów dopaminergicznych wywołują rozbieżne efekty oddechowe wskazując na złożoność dopaminergicznych mechanizmów(49, 50).

5.6 OLDA i Me-OLDA a czułość hipoksyjna

Czułość hipoksyjna jest wskaźnikiem opisującym wrażliwość kłębków szyjnych na bodziec hipoksyjny, określa zdolność układu oddechowego do zwiększania szczytowej wentylacji minutowej wraz ze wzrostem siły bodźca. Zaobserwowałam, że OLDA zmniejsza czułość hipoksyjną, a zatem upośledza zdolność kłębków szyjnych do normalnie mającego miejsce zwiększania oddychania wraz ze wzrostem siły bodźca hipoksyjnego. W przypadku zmetylowanej OLDA nie odnotowałam wpływu na czułość hipoksyjną. Prawdopodobnie, odmienny wpływ dwóch badanych przeze mnie lipidowych pochodnych dopaminy na czułość hipoksyjną jest rezultatem nieco odmiennej "ścieżki receptorowej" poprzez, którą obydwa związki oddziałują na regulację oddychania. Tak jak opisałam w

podrozdziałach 5.3 i 5.4 z moich obserwacji wynika, że OLDA i Me-OLDA działają na regulację oddychania głównie poprzez receptory dopaminowe D2, co prowadzi do obniżenia odpowiedzi na hipoksję, natomiast zmetylowana OLDA wpływa na regulację oddychania także poprzez receptory wanilloidowe TRPV1, co przeciwdziała zmniejszeniu oddychania. A zatem efekt Me-OLDA na regulację oddychania zachodzący poprzez receptory dopaminowe D2 być może jest równoważony efektem działania tego związku na regulację oddychania przez receptory wanilloidowe TRPV1, stąd brak wpływu Me-OLDA na czułość hipoksyjną.

5.7 OLDA a metabolizm

Wielu badaczy uważa podwyższony metabolizm za czynnik stymulujący odpowiedź oddechową na hipoksję, co np. jest typowe dla profesjonalnych sportowców. Z badań przeprowadzonych na japońskich dzudokach wagi ciężkiej wynika, że wysoki poziom konsumpcji tlenu był znacząco skorelowany z wysoką czułością hipoksyjną. Co więcej zauważono pewną prawidłowość, a mianowicie im wyższa masa ciała u zawodników tym wyższa konsumpcja tlenu (VO_2). Stwierdzono, że może to być wynikiem lepszego nerwowo-mięśniowego mechanizmu sprzężenia lub lepszych mięśniowo-oddechowych funkcji transferowych u wytrenowanych atletów (51).

Stwierdzenie wpływu OLDA na metabolizm tlenowy sugerowałoby możliwość modulacji aktywności enzymów oksydacyjnych w mitochondriach bądź też udział badanego związku w procesach energetycznych zachodzących w komórkach mięśniowych (52, 53, 54).

Z przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczących kontrolnego efektu hipoksji na metabolizm wynika, że konsumpcja tlenu w hipoksji obniża się (Tabela 3).

Ponadto OLDA wpłynęła na obniżenie konsumpcji tlenu (VO_2) zarówno w normoksji jak i hipoksji w porównaniu do warunków kontrolnych. Jednak obniżenie konsumpcji tlenu zachodziło przy jednoczesnym obniżeniu wentylacji minutowej. W celu określenia zmian metabolizmu po podaniu OLDA niezbędne jest wyliczenie zmiany wentylacji minutowej na zmianę zużycia tlenu. Parametrem opisującym zmiany zachodzące w obrębie metabolizmu tlenowego jest ekwiwalent oddechowy, tj. stosunek wentylacji minutowej do konsumpcji tlenu w określonym przedziale czasowym – VE/VO_2 (55).

Brak istotnych zmian zarówno w normoksji jak i hipoksji w przypadku wpływu OLDA na ekwiwalent oddechowy w porównaniu do warunków kontrolnych świadczy o braku wpływu OLDA na metabolizm tlenowy. Można na tej podstawie przypuszczać, że badany związek wpływa na regulację oddychania w sposób bezpośredni, a nie poprzez metabolizm tlenowy. Zaobserwowane w przeprowadzonych eksperymentach zmniejszenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu OLDA (opisane wyżej) nie jest więc wtórnym efektem obniżenia metabolizmu tlenowego.

6. Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań można wnioskować o potencjalnej możliwości oddziaływania OLDA i Me-OLDA w stanach neurodegeneracyjnych, jako nośników dopaminy do mózgu. Me-OLDA mogłaby wpływać nie tylko na objawy chorób neurodegeneracyjnych z niedoborem dopaminy, obniżając sztywność mięśniową (bardziej niż sama OLDA), ale również nie pogłębiałaby dodatkowo depresji oddechowej, będącej częstym zaburzeniem dodatkowym, występującym np. w chorobie Parkinsona. Zmniejszenie odpowiedzi oddechowej po podaniu samej OLDA jest dwukrotnie silniejsze niż w przypadku Me-OLDA. Stąd wniosek, że zmetylowana pochodna OLDA mogłaby okazać się alternatywą terapeutyczną L-DOPA, z podawaniem której wiążą się efekty uboczne.
2. Biorąc pod uwagę, że lipidowe pochodne dopaminy przechodzą do mózgu i zakładając, że są one przekaźnikami dopaminy, której działanie ośrodkowe jest pobudzające dla oddychania, to związki te mogłyby mieć także znaczenie w patologiach hipoksyjnych, czy w chronicznej hipoksji towarzyszącej procesowi starzenia.

7. Streszczenie

Przedmiotem moich badań są związki chemiczne należące do niedawno odkrytej klasy lipidowych, zacylowanych pochodnych dopaminy, tj. N-oleinoilo-dopamina (OLDA) i N-oleinoilo-3'-O-metylo-dopamina (Me-OLDA). N-acylo-dopaminy są amidami dopaminy oraz wyższych kwasów tłuszczowych, endogennie syntetyzowanymi w mózgu ssaków. N-acylo-dopaminy występują przede wszystkim w prądkowiu oraz w istocie czarnej mózgu, zatem w regionach o wysokiej aktywności dopaminergicznej. Szlak związany z metabolizmem dopamidów nie jest do tej pory poznany, jednak przypuszcza się, że może być związany ze szlakiem metabolicznym dopaminy, tj. z ich metylacją przy pomocy enzymu katechoło-O-metylo-transferazy (COMT).

Lipofilna budowa OLDA i Me-OLDA umożliwia im penetrację bariery krew-mózg, co dodatkowo w połączeniu z ich stosunkowo wysoką stabilnością stwarza możliwość zastosowania tych związków w stanach neurodegeneracyjnych związanych z niedoborem dopaminy w mózgu, takich jak np. choroba Parkinsona, gdzie uzupełnienie poziomu dopaminy staje się wielkim wyzwaniem. Dopamina jest neuroprzekaźnikiem spełniającym wiele różnorodnych funkcji. Jedną z ważniejszych funkcji dopaminy jest regulacja motoryki. Brak stymulacji dopaminowej w przypadku ssaków oznacza akinezję, czyli unieruchomienie. Drastyczne, bo o ponad 80%, obniżenie poziomu dopaminy w jądrach podstawy mózgu, na skutek postępującej degeneracji neuronów dopaminergicznego szlaku nigrostriatalnego występuje w chorobie Parkinsona. Sama dopamina jako związek hydrofilowy i w dodatku ulegający natychmiastowej degradacji obwodowej (w buforze Krebsa-Henseleita, o składzie zbliżonym do płynu wewnątrzkomórkowego trzygodzinna inkubacja powodowała rozkład 98% dopaminy) nie znajduje zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Ponadto dopamina jest głównym neurotransmiterem kłębków szyjnych, jednakże jej rola w mechanizmie chemorecepcji wciąż wzbudza wiele kontrowersji. Kłębki szyjne są organem znajdującym się na rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej na zewnętrzną i wewnętrzną, odpowiadającym za około 95% stymulacji oddychania pod wpływem hipoksji, jak również za około 20% odpowiedzi oddechowej na CO₂ i H⁺. Rola kłębków w normalnym oddychaniu pozostaje wciąż niewyjaśniona, prawdopodobnie ich udział w normalnym oddychaniu wynosi 10-20%. Wiadomo jednak, że rola dopaminy w chemicznej regulacji oddychania jest dwójaka: działając ośrodkowo pobudza, a

obwodowo, tj. przez kłębki szyjne, hamuje odpowiedź oddechową.

Celem mojej pracy było określenie wpływu OLDA i Me-OLDA na regulację oddychania i odpowiedzi oddechowe na bodźce chemiczne u nieuśpionych zwierząt oraz określenie poprzez jakie układy receptorowe związki te oddziałują na regulację oddychania. Rozróżnienie pomiędzy działaniem obwodowym i ośrodkowym oraz udziałem komponenty dopaminergicznej i wanilloidowej w kształtowaniu odpowiedzi oddechowej wywołanej podaniem badanych związków stanowiło podstawowy element mojej pracy.

Badania przeprowadziłam przy użyciu zestawu pletyzmograficznego dla zwierząt nieuśpionych (Buxco Electronics Wilmington NC). Pomiary wentylacji płucnej i jej składowych: częstości i objętości oddechowej przeprowadziłam w warunkach normoksji (szczury oddychały powietrzem atmosferycznym), w warunkach ostrej dwustopniowej hipoksji (12% O₂ i 8% O₂ w N₂) oraz hiperkapnii (5% CO₂ i 10% CO₂ w O₂).

Obydwa badane związki chemiczne tj. OLDA oraz Me-OLDA wpływają na regulację oddychania obniżając odpowiedź oddechową, zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji, jednak wpływ samej OLDA na regulację oddychania jest dwukrotnie silniejszy. Na przykład, szczytowa hiperwentylacja hipoksyjna rejestrowana w 30 sek po podaniu 12% bodźca hipoksyjnego zmniejszyła się z 1335,8 ±99,2 w kontroli do 856,6 ±73,7 ml/min/kg (p<0.001) w hipoksji po OLDA i z 1347,9 ±108,9 w kontroli do 1072,1 ±76,8 ml/min/kg (p<0.002) w hipoksji po Me-OLDA. Działanie zarówno OLDA jak i Me-OLDA na regulację oddychania zachodzi głównie przez dopaminergiczny układ receptorowy D2. Jednak w przypadku Me-OLDA działanie to odbywa się przede wszystkim przez układ dopaminergiczny obwodowy D2, zaś w przypadku OLDA istnieje również udział komponenty ośrodkowej. Za potwierdzeniem tego wniosku przemawiają wykonane przeze mnie doświadczenia z użyciem antagonistów receptorów dopamniowych D2, tj.: domperidonu (działającego tylko obwodowo) i haloperidolu (działającego ośrodkowo i obwodowo). Co więcej, przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły możliwe działanie Me-OLDA na regulację oddychania przez receptory wanilloidowe TRPV1, a jednocześnie wykluczyły taką możliwość w przypadku samej OLDA. Postawienie niniejszej tezy badawczej umożliwiły badania z zastosowaniem antagonisty receptorów wanilloidowych TRPV1 - 5'-jodoresiniferotoksyny. Ponadto brak wpływu Me-OLDA na odpowiedź oddechową na hiperkapnię potwierdza swoistość działania tego związku i sugeruje, że ścieżka działania tego związku na regulację

oddychania prowadzi głównie przez kłębki szyjne. Z kolei uzyskany efekt obniżenia odpowiedzi oddechowej na silny bodziec hiperkapniczny po podaniu OLDA pozwala przypuszczać, że charakter działania tego związku na regulację oddychania jest zarówno obwodowy jak i ośrodkowy.

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań można wnioskować, że zarówno OLDA jak i Me-OLDA są nowymi, lipidowymi pochodnymi dopaminy, które mają potencjalne możliwości zwiększania dostępności dopaminy w układzie nerwowym, a więc mogą odgrywać korygującą rolę w neurodegeneracyjnych stanach jej niedoboru. Oddziaływanie Me-OLDA wydawałoby się korzystniejsze, gdyż nie pogłębiałaby ona depresji oddechowej, będącej częstym zaburzeniem towarzyszącym tym stanom, np. chorobie Parkinsona.

8. Abstract

The subject of my research are compounds which belong to recently discovered lipid acyl derivatives of dopamine: N-oleoyl-dopamine (OLDA) and N-oleoyl-3'-O-methyl-dopamine (Me-OLDA). These compounds belong to a novel class of bioactive amides of fatty acids, which are endogenously synthesized in mammalian brain. N-acyl-dopamines are present mainly in the substantia nigra and striatum, the brain regions characterized by high dopaminergic activity. The metabolic pathway of N-acyl-dopamines is still unknown, but it is supposed that it can be similar to that of dopamine proper, i.e., involving methylation by catechol-O-methyltransferase (COMT).

The lipophilic structure of OLDA and Me-OLDA enables penetration of the compounds into the brain, which, in connection with a high stability of these compounds, makes them good candidates for a potential use in neurodegenerative states, especially in those underlain by dopamine insufficiency, for instance, Parkinson's disease, where the supplementation of dopamine still constitutes a great challenge. Dopamine is a neurotransmitter which controls variety of functions. One of the most important function of dopamine is the regulation of locomotor activity. Lack of dopamine stimulation, in case of mammals, leads to akinesia – immobilization. A drastic, about 80%, decrease of dopamine in the brain nuclei, as a result of progressive degeneration of dopamine neurons the nigrostriatal pathway, is observed in Parkinson's disease. Dopamine itself as a hydrophilic compound, undergoing immediate peripheral degradation (in Krebs-Hanseleit buffer, with composition similar to that of intracellular fluid, 3-hour incubation results in degradation of 98% of dopamine), is not applicable in the treatment of neurodegenerative diseases.

Dopamine also is the main neurotransmitter in the carotid bodies. The carotid bodies are sensory organs placed at the bifurcation of the common carotid artery in the neck region, which are responsible for about 95% of the hypoxic hyperventilation and about 20% of the hypercapnic hyperventilation. The organs also respond to increased concentration of H⁺ ions. The role of carotid bodies in normoxic ventilation remains still unexplained, probably their contribution of to normoxic ventilation amounts to 10-20%. The role of dopamine in the regulation of ventilatory chemoreception is still subject of much controversy. It is known, however, that this role is double: acting centrally,

dopamine stimulates ventilation and peripherally, i.e., via the carotid bodies, dopamine inhibits ventilation and its responses to hypoxia.

The main aim of my research was to determine the influence of OLDA and Me-OLDA on respiration and on the ventilatory responses to the chemical stimuli hypoxia and hypercapnia in conscious rats and to investigate through which receptor systems these compounds might regulate ventilation. The essential element of the research was to differentiate between the peripheral and central mechanisms of action and between the contribution of dopaminergic and vanilloid components in shaping the ventilatory responses after administration of both compounds. The differentiation between the peripheral and central components of action of both compounds was achieved by using dopaminergic antagonists: domperidone, a specifically peripheral antagonist, and haloperidol, acting both peripherally and centrally. The effects mediated through the vanilloid TRPV1 receptors were assessed by using the specific antagonist of this receptor system - 5'-iodoresiniferotoxine.

The study was conducted with the use of a plethysmographic rodent chamber (Buxco Electronics Wilmington NC). The measurements of minute ventilation and its components: tidal volume and breathing frequency were carried out in normoxic conditions (rats breathed atmospheric air), and two sequential hypoxic (12% O₂ and 8% O₂ in N₂) and hypercapnic (5% CO₂ and 10% CO₂ in O₂) conditions.

The investigated chemical compounds OLDA and Me-OLDA decreased resting ventilation and its responses to hypoxia; the influence of OLDA was about doubly stronger than that of Me-OLDA. For instance, peak hypoxic hyperventilation recorded 30 s after the onset of the 12% hypoxic stimulus decreased from 1335,8 ±99,2 (control) to 856,6 ±73,7 ml/min/kg (hypoxia; p<0.001) after OLDA and from 1347,9 ±108,9 (control) to 1072,1 ±76,8 ml/min/kg (hypoxia; p<0.002) after Me-OLDA. The ventilatory effects of both OLDA and Me-OLDA were exerted through the dopaminergic D2 receptor pathway. However, in case of Me-OLDA this action ran mainly through the peripheral D2 receptor pathway, whereas in case of OLDA the participation of the central dopaminergic component also was evident. Furthermore, the experiments confirmed the possible action of Me-OLDA on ventilation through vanilloid TRPV1 receptors and eliminated this possibility for OLDA. Also, lack of the influence of Me-OLDA on the hypercapnic ventilatory responses points to the specificity of the action of this compound regarding the generation of hypoxic ventilation taking place in the carotid body. On the other hand, some

inhibitory effect of OLDA on the ventilatory response to 10% hypercapnia suggests that this compound has both peripheral and central influence on ventilation.

On the basis of the research conducted, it can be concluded that OLDA and Me-OLDA are novel compounds with the potential to increase the availability of dopamine molecule in the neural system and therefore may have a role in correcting neurodegenerative states. Of the two, Me-OLDA seems more advantageous since it would have a smaller inhibitory effect on lung ventilation, which is usually dampened in such states to start with, for instance in Parkinson's disease.

9. Spis piśmiennictwa

Piśmiennictwo jest ponumerowane w kolejności pojawiania się w tekście

1. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału pod redakcją Nowaka J. i Zawilskiej J. 2004 rok strony: 274.
2. Goldstein D, Eisenhofer G, Kopin I. Clinical catecholamine neurochemistry: a legacy of Julius Axelrod. *Cell Mol Neurobiol* 2006: 695-702.
3. Marien M, Shin S, Cooper G, Jhamandas K. Stability of dopamine in an in vitro system using medium 199. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62: 600-603.
4. Narkiewicz O, Moryś J. Neuroanatomia czynnościowa i kliniczna. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
5. Weiner D. M, Levey A. I, Sunahara R. K., Niznik H. H, O'Dowd B. F and Brann M. R. Dopamine D1 and D2 receptor mRNA expression in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 1859-1863.
6. Bouthenet M. L, E. Souil M. P., Martres P, Sokoloff B, Giros and Schwartz J. C. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 1991; 564: 203-219.
7. Jaber M, Robinson S. W, Missale C, Caron M. G. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 1996; 35: 1504-1519.
8. Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Buznow J, Meldolesi J and Civelli O. Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk fibroblasts, hyperpolarization and cytosolic-free Ca^{2+} concentration decrease in GH₄C₁ cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10320-10326.
9. Seabrook G. R, Knowles M, Brown N, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman B and McAllister G. Pharmacology of high-threshold calcium currents in GH₄C₁ pituitary cells and their regulation by activation of human D2 and D4 dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 728-734.
10. Kitai S. T, and Surmeier D. J. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv Neurol* 1993

11. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 125-132.
12. Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rat modulate Steep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* 2006; 570: 385-396.
13. Alheid G, McCrimmon D. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 164: 3-11.
14. Smatresk N, Pokorski M, Lahiri S. Opposing effects of dopamine receptor blockade on ventilation and chemoreceptor activity. *J Appl Physiol Respirat Environ Exerc Physiol* 1983; 54: 1567-1573.
15. Pokorski M. Chemiczna regulacja oddychania. W: Kliniczne aspekty regulacji oddychania. Alfa-medica Press 2001, Bielsko Biała, pp. 31-46.
16. Tafil-Klawe M, Klawe J. Wykłady z fizjologii człowieka. W: Fizjologia układu oddechowego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2009, Warszawa, pp. 554-559.
17. Honda Y. Chemical control of breathing. W: Control of Breathing in Health and Disease. Inc. New York, 1999, pp. 41-87.
18. Iturriaga R, Alcayaga J, Gonzalez C. Neurotransmitters in carotid body function: the case of dopamine-invited article. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2009; vol 648: 137-143.
19. Acker H. Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Resp Physiol* 1994; 95: 1-10.
20. Lahiri S. Chromophores in O₂ chemoreception; the carotid body model. *News Physiol Sci* 1994; 9: 161-165.
21. Garcia A. G, Kirpekar S. M and Sanchez Garcia P. Release of noradrenaline from the cat sleepen by nerve stimulation and potassium. *J Physiol* 1976; 261: 301-317.
22. Iturriaga R, Larrain C and Zapata P. Effects of dopamine blockade upon carotid chemosensory activity and its hypoxia-induced excitation. *Brain Res* 1994; 663: 145-164.
23. Liados F and Zapata P. Effects of dopamine analogues and antagonists on carotid body chemosensory *in situ*. *J Physiol* 1978; 274: 487-499.
24. Iturriaga R, Varas R and Alcayaga J. Electrical and pharmacological properties of petrosal ganglion neurons that innervate the carotid body. *Resp Physiol and Neurobiol* 2007; 157: 130-139.

25. Alcayaga J, Soto R, Vargas R, Oritz F, Arroyo J and Iturriaga R. Carotid body transmitters actions on rabbit petrosal ganglion in vitro. *Adv Exp Med* 2006; 580: 331-337.
26. Alcayaga J, Varas R, Arroyo J, Iturriaga R and Zapata P. Dopamine modulates carotid nerve responses induced by acetylcholine on cat petrosal ganglion in vitro. *Brain Res* 1999; 831: 97-103.
27. Alcayaga J, Retamal M, Cerpa V, Arroyo J and Zapata P. Dopamine inhibits ATP-induced responses in the cat petrosal ganglion in vitro. *Brain Res* 2003; 966: 283-287.
28. Gonzalez C, Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Pharmacol Rev* 1994; 74: 874-876.
29. Okajima Y, Nishi K. Analysis of inhibitory and excitatory actions of dopamine on chemoreceptor discharges of carotid body of cat in vivo. *Jpn J Physiol* 1981; 31: 695-704.
30. Siggins G. R. Monoamines and message transduction in central neurons. *Transduction of neuronal signals* 1986; p. 61-68.
31. Gauda E. B, Shirahata M, Fitzgerald R. S. Expression of D2-dopamine receptors in cat carotid body and petrosal ganglia. *FASEB J* 1993; 7: 457.
32. Serebrovskaya T, Karaban I, Mankovskaya I, Bernardi L, Passino C, Appenzeller O. Hypoxic ventilatory responses and gas exchange in patients with Parkinson's disease. *Respiration* 1998; 65: 28-33.
33. Bezuglov V, Bobrov M, Gretskaya N, et al. Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 447-449.
34. Czarnocki Z, Matuszewska I, Matuszewska M. Highly efficient synthesis of fatty acids dopamides. *Org Prep Proced Int* 1998; 30: 699-702.
35. Pokorski M, Matysiak Z, Marczak M, Ostrowski R, Kapuściński A, Matuszewska I, Kańska M and Czarnocki Z. Brain uptake of radiolabeled N-oleoyl-dopamine in the rat. *Drug Development Research* 2003; 60: 217-224.
36. Okereke CS. Role of integrative pharmacokinetic and pharmacodynamic optimization strategy in the management of Parkinson's disease patients

- experiencing motor fluctuations with levodopa. *J Pharm Pharmaceut* 2002; 5: 146-161.
37. Zajac D. Właściwości biologiczne N-oleinoilo-dopaminy, nowej lipidowej pochodnej dopaminy, z uwzględnieniem jej wpływu na regulację oddychania u szczurów. Rozprawa doktorska 2009.
38. Pokorski M, Zajac D, Kapuściński A, Matysiak Z and Czarnocki Z. Accumulation of radiolabeled N-oleoyl-dopamine in the rat carotid body. W: *The Arterial Chemoreceptors* 2006; 173-178.
39. Przegaliński E, Filip D, Zajac D, Pokorski M. N-oleoyl-dopamine increases locomotor activity in the rat. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2006;19:897-904.
40. Konieczny J, Przegaliński E and Pokorski M. N-oleoyl-dopamine decreases muscle rigidity induced by reserpine in rats. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2009; 22: 21-28.
41. Chu C, Huang S, De Petrocellis L, et al. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 2003; 278: 13633-13639.
42. Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 2003; 23: 3136-44.
43. Cortright DN and Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1814.
44. dane niepublikowane
45. Szallasi A, Blumberg P. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 159-211.
46. Gavva N, Klionsky L, Qu Y, et al. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 20283-20295.
47. Ang RC, Hoop B, Kazemi H. Role of glutamate as the central neurotransmitter in the hypoxic ventilatory response. *J Appl Physiol* 1992; 72 (4): 1480-7.
48. Pokorski M and Lahiri S. Relative peripheral and central chemosensory responses to metabolic alkalosis. *Am J Physiol* 1983; 245 (6): 873-80
49. Nielsen AM, Bisgard GE. Dopaminergic modulation of respiratory timing mechanisms in carotid body-denervated dogs. *Respir Physiol* 1983; 53(1): 71-86.

50. Lalley PM. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2008; 164(1-2): 160-167.
51. Yoshio O, Akio Y, Fumiaki H, Yoshitake N, et al. Ventilatory and heart rate responses to hypoxia in well-trained judo athletes. *Eur J Appl Physiol* 1984; 52: 541-5.
52. Boushel R., Gnaiger E., Calbet J.A., Gonzalez-Alonso J., Wright-Paradis C., Sondergaard H., Ara I., Helge J.W., Saltin B.: Muscle mitochondrial capacity exceeds maximal oxygen delivery in humans. *Mitochondrion*, 2011, 11 (2), 303-307.
53. McGuire B.J., Secomb T.W.: A theoretical model for oxygen transport in skeletal muscle under conditions of high oxygen demand. *J. Appl. Physiol.*, 2001, 91 (5), 2255-2265.
54. Grassi B.: Oxygen uptake kinetics: Why are they so slow? And what do they tell us? *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006, 57 (suppl. 10), 53-65.
55. Wenninger J.M, Olson E. B, Cotter C. J, Thomas C. F and Behan M. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol* 2008; 106: 1522-1528.