INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ i KLINICZNEJ
IM. MIROSŁAWA MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Katarzyna Kaczyńska

ROLA OBWODOWYCH RECEPTORÓW GABAERGICZNYCH I GLUTAMINIANERGICZNYCH TYPU NMDA W REGULACJI ODDYCHANIA U SZCZURA

ZS 249
H3637

Praca doktorska

Promotor: doc. dr hab. n. med. Małgorzata Szereda-Przestaszewska

Pracownia Odruchów Oddechowych

Warszawa 2004

http://rcin.org.pl

Składam serdeczne podziękowania

Pani doc. dr hab. n. med. Małgorzacie Szereda - Przestaszewskiej za życzliwość i wszechstronną merytoryczną pomoc towarzyszącą na każdym etapie przygotowania niniejszej pracy

Pani Teresie Warnawin za pomoc techniczną w przeprowadzaniu doświadczeń

http://rcin.org.pl

SPIS TREŚCI

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY 4

WSTĘP 5

CEL PRACY 18

MATERIAŁY I METODY 19

1. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY, ZNIECZULENIE, PREPARATYKA WSTĘPNA 19

2. PREPARATYKA NERWÓW 20

2.1. Preparowanie nerwów błędnych w odcinku śródszyjnym oraz ponad zwojami guzkowymi 20
2.2. Preparatyka nerwów krtaniowych górnych 21
2.3. Preparatyka nerwów zatokowych 21

3. PREPARATYKA I POMIAR AKTYWNOŚCI MIĘŚNIA PRZEPONY 22

4. SUBSTANCJE FARMAKOLOGICZNE STOSOWANE W DOŚWIADCZENIACH 22

5. UKŁADY DOŚWIADCZALNE ZASTOSOWANE W PRACY 23

5.1. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM KAPSAICYNY 23

5.1.1. Zbadanie wpływu pętli wagalnej oraz nerwów krtaniowych górnych na kształt i zachowanie się wzorca oddechowego oraz ciśnienia krwi po dożylnej iniekcji kapsaicyny 23
5.1.2. Wpływ blokady receptorów waniloidowych na odpowiedź pokapsaicynową 24

5.2. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM GABA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ 25

5.2.1. Zbadanie wpływu pętli wagalnej na kształt i zachowanie się wzorca oddechowego oraz ciśnienie tętnicze krwi, wywołanych dotętniczą iniekcją GABA 25
5.2.2. Skutki blokady receptorów $GABA_A$ przy użyciu bikukuliny i pikrotoksyny 26
5.2.3. Skutki blokady receptorów $GABA_B$ przy użyciu CGP 35348 26
5.2.4. Zbadanie roli informacji dośrodkowej z chemoreceptorów ciałek szyjnych w powstawaniu wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dotętniczym podaniem GABA 26

5.3. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM NMDA DO ŻYŁY UDOWEJ 27

5.3.1. Wpływ obustronnej wagotomii śródszyjnej na zachowanie się i kształt wzorca oddechowego oraz ciśnienie krwi po dożylnej iniekcji NMDA 27
5.3.2. Wpływ blokady receptorów NMDA przy użyciu AP-7 27
5.3.3. Zbadanie udziału zwojów guzkowych nerwów błędnych w powstawaniu odpowiedzi oddechowo-krążeniowej wywołanej dożylnym podaniem NMDA 28
5.3.4. Skutki odnerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych na pojawienie się wzorca oddechowego i zmian ciśnienia tętniczego krwi, charakterystycznych dla dożylnego podania NMDA 28

http://rcin.org.pl

5.4. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ 28

5.4.1. Wpływ obustronnej wagotomii śródszyjnej na zachowanie się i kształt wzorca oddechowego oraz ciśnienie krwi po dotętniczej iniekcji NMDA 28
5.4.2. Skuteczność AP-7 w blokowaniu odpowiedzi oddechowo-krążeniowych wywołanych dotętniczą iniekcją NMDA 29
5.4.3. Znaczenie obecności zwojów guzkowych nerwów błędnych w generacji wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dotętniczym podaniem NMDA 29
5.4.4. Skutki odnerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych na pojawienie się wzorca oddechowego i zmian ciśnienia tętniczego krwi, charakterystycznych dla dotętniczego podania NMDA 30

5. 5. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM KLONIDYNY 30

5.5.1. Wpływ przecięcia pętli wagalnej na kształt wzorca oddechowego i ciśnienie krwi wywołanych dożylnym podaniem klonidyny 30
5.5.2. Wpływ blokady receptorów α_2–adrenergicznych przy użyciu SKF 86466 na odpowiedź wywołaną podaniem klonidyny 31
5.5.3. Zbadanie roli informacji dośrodkowej z chemoreceptorów ciałek szyjnych w powstawaniu wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dożylnym podaniem klonidyny 31

6. OBLICZENIA STOSOWANE W PRACY 31

6. 1. Obliczanie głównych parametrów oddechowych 31
6. 2. Obliczanie współczynnika zahamowania oddychania 32
6. 3. Obliczanie średniego ciśnienia tętniczego 33
6. 4. Obliczenia statystyczne 33

WYNIKI 34

1. KAPSAICYNA 34

1. 1. ODPOWIEDŹ ODDECHOWA ORAZ WPŁYW WAGOTOMII ŚRÓDSZYJNEJ NA KSZTAŁT I ZACHOWANIE SIĘ WZORCA ODDECHOWEGO WYWOŁANEGO DOŻYLNYM PODANIEM KAPSAICYNY 34
1.2. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW WANILOIDOWYCH NA ODPOWIEDŹ POKAPSAICYNOWĄ 39
1.3. UDZIAŁ NERWÓW KRTANIOWYCH GÓRNYCH W ODPOWIEDZI ODDECHOWO-KRĄŻENIOWEJ NA DOŻYLNĄ INIEKCJĘ KAPSAICYNY 41

2. KWAS γ-AMINOMASŁOWY (GABA) 44

2.1. ZMIANY WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA KRWI PO DOTĘTNICZYM PODANIU GABA. ROLA NERWÓW BŁĘDNYCH 44
2.2. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW $GABA_A$ NA PRZEBIEG ODDYCHANIA PO DOTĘTNICZEJ INIEKCJI KWASU γ-AMINOMASŁOWEGO 49
BIKUKULINA 49
PIKROTOKSYNA 51
2.3. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW $GABA_B$ PRZY UŻYCIU CGP 35348 NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWO-KRĄŻENIOWĄ WYWOŁANĄ PRZEZ GABA 53

http://rcin.org.pl

2.4. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH (CSNs) NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ ORAZ ZMIANY CIŚNIENIA KRWI WYWOŁANE DOTĘTNICZYM PODANIEM GABA 54

3. KWAS N-METYLO-D-ASPARAGINOWY (NMDA)

3.1.A. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM NMDA. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII ŚRÓDSZYJNEJ NA WZORZEC ODDECHOWY ORAZ ZMIANY CIŚNIENIA 57
3.2.A. PRZEBIEG ODDYCHANIA PO DOŻYLNYM PODANIU NMDA NA TLE BLOKADY RECEPTORÓW NMDA Z UŻYCIEM AP-7 60
3.3.A. WPŁYW WAGOTOMII NADGUZKOWEJ NA ZMIANY W ODDYCHANIU I CIŚNIENIU KRWI WYWOŁANE DOŻYLNĄ INIEKCJĄ NMDA 62
3.4.A. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ I CIŚNIENIE KRWI PO PODANIU NMDA DO ŻYŁY UDOWEJ 64
3.1.B. ODPOWIEDŹ ODDECHOWO-KRĄŻENIOWĄ WYWOŁANA PODANIEM NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII SRÓDSZYJNEJ NA ZACHOWANIE SIĘ I KSZTAŁT WZORCA ODDECHOWEGO ORAZ CIŚNIENIE KRWI PO INIEKCJI NMDA 67
3.2.B. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW NMDA PRZY UŻYCIU AP 7 NA PRZEBIEG ODPOWIEDZI ODDECHOWO-KRĄŻENIOWEJ WYWOŁANEJ DOTĘTNICZĄ INIEKCJĄ N-METYLO-D-ASPARAGINIANU 70
3.3.B. WPŁYW WAGOTOMII NADGUZKOWEJ NA ZMIANY W ODDYCHANIU I CIŚNIENIU KRWI WYWOŁANE DOTĘTNICZĄ INIEKCJĄ NMDA 72
3.4.B. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH NA PRZEBIEG ODDYCHANIA I ZMIANY CIŚNIENIA KRWI PO INIEKCJI NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ 74

4. KLONIDYNA

4.1. ZMIANY ODDYCHANIA ORAZ CIŚNIENIA KRWI WYWOŁANE DOŻYLNA INIEKCJĄ KLONIDYNY. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII SZYJNEJ NA OBSERWOWANE EFEKTY 77
4.2. SKUTKI BLOKADY RECEPTORÓW α_2–ADRENERGICZNYCH PRZY UŻYCIU SKF 86466 NA ODPOWIEDŹ WYWOŁANĄ PODANIEM KLONIDYNY 81
4.3. WPŁYW ODNERWIENIA CHEMORECEPTORÓW CIAŁEK SZYJNYCH NA OBECNOŚĆ EFEKTÓW ODDECHOWO-KRĄŻENIOWYCH WYWOŁANYCH DOŻYLNĄ INIEKCJĄ KLONIDYNY 84

DYSKUSJA 89

PODSUMOWANIE I WNIOSKI 112

PIŚMIENNICTWO 113

STRESZCZENIE 128

http://rcin.org.pl

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

AP-7	kwas DL-2-amino-7-fosfonoheptanowy
CGP 35348	kwas 3-aminopropyl-dietoksymetyio-fosfinowy
CSN	nerw zatokowy
∫Dia	zintegrowany eiektromiogram przepony
emg	elektromiogram
f	częstość oddychania
GABA	kwas γ-aminomasłowy
KCN	cyjanek potasu
MAP	średnie ciśnienie krwi
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy
NTS	jądro pasma samotnego
RR	czerwień rutenu
SKF 86466	6-chloro-3-metyl-2,3,4,5-tetrahydro-3-benzazepina
SLN	nerw krtaniowy górny
T_I	czas wdechu
T_E	czas wydechu
T_{TOT}	czas pojedynczego cyklu oddechowego
VR_1	receptory waniloidowe
V_T	objętość oddechowa
V_E	wentylacja minutowa
5 HT	serotonina, 5-hydroksytryptamina

http://rcin.org.pl

WSTĘP

Rytm oddechowy kręgowców generowany jest przez grupy neuronów wdechowych i wydechowych znajdujących się w rdzeniu przedłużonym w ośrodkowym układzie nerwowym. Dośrodkowe sygnały z obwodowych receptorów umiejscowionych w drzewie tchawiczo-oskrzelowym układu oddechowego oraz chemoreceptorów obwodowych modyfikują podstawowy wzorzec oddechowy adekwatnie do warunków, w jakich znajduje się organizm, umożliwiając mu optymalną wymianę gazową. Drogi oddechowe zaopatrzone są przez nerw błędny i wyróżnia się w nich trzy główne typy receptorów, odgrywające istotną rolę regulacyjną w kształtowaniu wzorca oddechowego:

1. Receptory wolno adaptujące się na bodziec (SARs). Są anatomicznie zlokalizowane w mięśniówce gładkiej tchawicy i oskrzeli i przewodzą z nich dośrodkowe włókna mielinowe. Bodźcem pobudzającym jest zwiększenie napięcia powierzchniowego ścian dróg oddechowych, do którego się adaptują. Aktywność tych receptorów sumowana jest przez ośrodki oddechowe pnia mózgu, stanowiąc podstawę odruchu Heringa & Breuera, który hamuje wdech inicjując fazę wydechu (Widdicombe i Andrews, 1983; Takano i Kato, 1999; Schelegle i Green, 2001).

2. Receptory szybko adaptujące się (RARs) występują w nabłonku dróg oddechowych od nosa po oskrzela. Wrażliwe są na bodźce mechaniczne i chemiczne. Do tych ostatnich zaliczyć należy drażniące gazy, pyły, mediatory procesów zapalnych i immunologicznych. Przewodzą z nich małe mielinowe włókna. Są mało aktywne w spokojnym oddychaniu. Pobudzenie ich wywołuje kaszel, zwężenie oskrzeli, skurcz krtani i hiperwentylację. pojedyncze wdechy o charakterze westchnięć. Rolą fizjologiczną receptorów RARs jest przeciwdziałanie zmniejszaniu podatności płuc i gorszemu upowietrznieniu pęcherzyków płucnych (Tsubone, 1986; Coleridge i Coleridge, 1994; Otake i wsp., 2001; Sant'Ambrogio i Widdicombe, 2001).

http://rcin.org.pl

3. Trzecia grupa to zakończenia niemielinowych włókien nerwu błędnego typu C, unerwiających drogi oddechowe od miąższu płuc do dużych przewodzących oskrzeli. Dzieli się je na receptory płucne, zwane także receptorami typu J, znajdujące się między ścianą pęcherzyków a kapilarami płucnymi, zaopatrywanymi przez krążenie płucne. Oskrzelowe receptory, z których przewodzą włókna C, unerwiające drzewo oskrzelowe i tchawicę, perfundowane są głównie przez krążenie oskrzelowe. Zlokalizowane są powierzchniowo w śluzówce tchawicy i oskrzeli. Są stosunkowo niewrażliwe na bodźce mechaniczne, reagują zdecydowanie na bodźce chemiczne w drogach oddechowych i tkance płucnej, takie jak autakoidy płucne i kapsaicyna (autakoid zewnętrzny). Odpowiedzią na pobudzenie jest bezdech, spadek objętości oddechowej, przyspieszenie oddychania, skurcz mięśni gładkich dróg oddechowych. Współuczestniczą także w mechanizmie powstawania odruchu kaszlu (Widdicombe i Andrews, 1983; Coleridge i Coleridge, 1994; Lee i Pisarri, 2001). Odpowiedzi wywołane pobudzeniem włókien płucno-oskrzelowych typu C przewodzone są zarówno do ośrodkowego układu nerwowego jak i stanowią miejscowe lub aksonalne odruchy związane z wyzwalaniem tachykinin z zakończeń nerwowych (Otsuka i Yoshioka, 1993).

Chemiczna regulacja oddychania sterowana jest przez obwodowe struktury chemowrażliwe w kłębkach szyjnych i aortalnych, reagujące na zmiany tętniczego ciśnienia parcjalnego tlenu, dwutlenku węgla i zmiany pH. Ciałka szyjne unerwione są przez nerw zatokowy (nerw Heringa), składający się w 86 % z zakończeń niemielinowych u szczura i będący odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego (IX), (McDonald, 1983). Położone są obustronnie w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej na zewnętrzną i wewnętrzną (Gonzalez i wsp., 1994). Zbudowane są z dwóch typów komórek, z których typ I ma znaczenie chemoreceptorowe i jest połączony synaptycznie z zakończeniami nerwu zatokowego (Wang i wsp., 2000). W komórkach tych stwierdza się dużą zawartość katecholamin, a w szczególności dopaminy, noradrenaliny i

http://rcin.org.pl

serotonmy (Gonzalez-Guerrero i wsp., 1993; Almaraz i wsp., 1997). Syntetyzują one również acetylocholinę oraz neuropeptydy takie jak substancja P czy kalcytonina (Gonzalez i wsp., 1994). Kłębki aortalne znajdujące się w okolicy pnia tętnicy płucnej i łuku aorty unerwione są przez nerw aortalny, będący odgałęzieniem nerwu błędnego. Ich fizjologiczna rola w hipoksyjnym odruchu oddechowym jest jednak niewielka i wiąże się głównie ze zmianami wielkości przepływu krwi. W przypadku szczura pomimo stymulacji chemoreceptorów ciałek aortalnych nie zarejestrowano żadnych reakcji systemu oddechowego (Sapru i Krieger, 1977; Brophy i wsp., 1999).

Istnieje wiele systemów neuroprzekaźników i neuromodulatorów, odkrytych w mózgu, związanych z kontrolą oddychania. Wiedza na temat roli w ośrodkowej kontroli wentylacji większości neurotransmiterów i ich receptorów znajdujących się w rdzeniu przedłużonym, istotnie wzrosła w ostatnich latach. W niniejszej pracy zajęto się zbadaniem znaczenia receptorów, zlokalizowanych w obwodowym układzie nerwowym i aktywujących je wybranych substancji neuroaktywnych, takich jak: kwas γ-aminomasłowy, kwas glutaminowy, klonidyna i kapsaicyna, w kontroli oddychania oraz ich wpływu na zachowanie się wzorca oddechowego.

Kwas γ-aminomasłowy (GABA) jest głównym hamującym neuroprzekaźnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców, odgrywającym istotną rolę w genezie rytmu i wzorca oddechowego. Jego znaczenie potwierdziły badania na nowo narodzonych modyfikowanych genetycznie myszach, pozbawionych jednej z izoform enzymu syntetyzującego GABA z glutammianu-dekarboksylazy kwasu glutaminowego. Wykazały obniżoną o 30 % koncentrację GABA w rdzeniu przedłużonym oraz bardzo nieregularny wzorzec oddechowy, który charakteryzowały epizody przedłużonych westchnięć, płytkiego oddychania z krótkim oddechem i bezdechy, co w efekcie prowadziło do śmierci zwierząt (Kuwana i wsp., 2003).

http://rcin.org.pl

Zawartość kwasu γ-aminomasłowego została potwierdzona w jądrach mózgowych związanych z kontrolą oddychania takich jak jądro przyśrodkowo-okołoramienne, jądro pasma samotnego, miejsce sinawe (van der Heyden i wsp., 1979; Izzo i wsp., 1992) oraz jądro dwuznaczne i grzbietowe nerwu błędnego (Gale i wsp., 1980). Jego obecność została również udokumentowana w obwodowych tkankach takich jak płuca (Tohda i wsp., 1998), ciałka szyjne (Oomori i wsp., 1994), zwój guzkowy (De Groat, 1972) i zwoje sympatyczne (De Groat, 1972; Bowery i Brown, 1974).

Receptory GABA zostały zakwalifikowane do trzech głównych klas na podstawie ich farmakologii. Wyróżnia się receptory $GABA_A$, $GABA_B$ i $GABA_C$ (McCrimmon i wsp., 1995). Receptory $GABA_A$ są to kanały jonotropowe, których aktywacja prowadzi do napływu jonów chloru do neuronu i hiperpolaryzacji komórki. Są to struktury polimorficzne, zbudowane z kombinacji podjednostek białkowych α, β, γ, δ i ρ, z których każda występuje pod postacią wielu podtypów. Specyficzna kompozycja tychże podjednostek determinuje rozliczne izoformy receptora (Zezula i wsp., 1991). W receptorze $GABA_A$ oprócz miejsca przyłączania agonisty znajduje się kilka miejsc wiązania modulatorów takich jak: benzodiazepiny, barbiturany, steroidy i cynk (Semyanov, 2002). Agonistą receptorów $GABA_A$ jest muscimol a kompetycyjnym antagonistą bikukulina. Pikrotoksyna działa jako inhibitor niekompetycyjny receptora typu A, blokujący kanał chlorkowy.

Dystrybucja receptorów $GABA_A$, oprócz OUN, obejmuje tkanki i komórki obwodowe. Badania farmakologiczne, biochemiczne i autoradiograficzne potwierdzają obecność receptorów typu A w zwojach sympatycznych (Erdö i Wolff, 1990), zwoju guzkowym nerwu błędnego (Ashworth-Preece, 1997), w zwoju półksiężycowatym nerwu trójdzielnego (Konodo i wsp., 1994), płucach i sercu (Shirakawa i wsp., 1987; Watanabe i wsp., 2002).

Receptory $GABA_A$ odgrywają istotną rolę w regulacji oddychania. Badania z użyciem

http://rcin.org.pl

antagonistów receptorów $GABA_A$ sugerują, że hamują one tonicznie napęd oddechowy, co znajduje potwierdzenie w stymulującym wpływie na napęd oddechowy bikukuliny i pikrotoksyny, blokujących aktywność receptorów $GABA_A$ (Hayashi i Lipski, 1992).

Ośrodkowe podanie agomstów receptora typu A wywoływało depresję objętości oddechowej, amplitudy nerwu przeponowego i bezdech (Da Silva i wsp., 1987) oraz spadek objętości oddechowej u kota (Hedner i wsp., 1981). Podobnie obserwowano wydłużenie czasu wdechu, skrócenie czasu wydechu i bezdech u szczura (Wasserman i wsp., 2002). Wstrzyknięcie GABA i muscimolu do brzuszno-bocznej powierzchni rdzenia przedłużonego kota redukowało aktywność mięśni międzyżebrowych wdechowych i wydechowych (Haxhiu i wsp., 1985). Ośrodkowe receptory $GABA_A$ regulują motoryczny napęd oddechowy krtani (Yajima i wsp., 1997) i przepony (Haxhiu i wsp., 1985), co zostało wyrażone hamowaniem amplitudy aktywności oddechowej nerwu krtaniowego zwrotnego oraz nerwu przeponowego (Holtman i King, 1988).

Receptory $GABA_A$ są zaangażowane w mechanizm odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Świadczy o tym wzrost zawartości GABA w rdzeniu przedłużonym podczas hipoksji (Kazemi i Hoop, 1991) oraz antagonistyczny wpływ obwodowej infuzji bikukuliny na depresję oddechową spowodowaną hipoksją (Melton i wsp., 1990).

Metabotropowe receptory $GABA_B$, związane z białkiem regulacyjnym G, są obecne na zakończeniach włókien nerwowych i błonie postsynaptycznej. Są heterodimerami składającymi się z dwóch podjednostek, niewrażliwymi na muscimol i bukukulinę. Ich specyficznym agonistą jest baklofen. Jedną z głównych ról presynaptycznych receptorów $GABA_B$ jest modulowanie uwalniania neuroprzekaźników i neuropeptydów takich jak GABA, glutaminian, noradrenalina, dopamina, 5-hydroksytryptamina i substancja P z zakończeń komórek nerwowych (Bowery i

http://rcin.org.pl

Pratt, 1992; Bianchi i wsp., 1995; Semyanov, 2002).

Receptory $GABA_B$ są obecne w obrębie struktur rdzenia przedłużonego związanych z kontrolą oddychania (Pierrefiche i wsp., 1993; Suzuki i wsp., 1999). Ich pobudzenie przez baklofen powoduje depresję oddychania w różnych modelach zwierzęcych, zależną od drogi podania. Ośrodkowe podanie baklofenu wywołuje wydłużenie fazy wdechu u szczura (Trippenbach i Lake, 1994), bezdech i zwolnienie rytmu oddechowego u kota (Da Silva i wsp., 1987). Iniekcja baklofenu do NTS redukuje bądź eliminuje oddechowo-krążeniowe efekty chemoodruchu płucnego, w którego przekaźnictwie uczestniczą włókna C (Seifert i Trippenbach, 1995). Pobudzenie oddychania, wywołane stymulacją chemoreceptorów ciałek szyjnych znosi aktywacja receptorów $GABA_B$ w obszarze spoidłowym NTS szczura (Suzuki i wsp., 1999)

Receptory $GABA_B$ biorą udział w odruchach płucnych. Ich agoniści hamują kaszel wywołany inhalacją kapsaicyny lub kwasu cytrynowego na poziomie centralnym i obwodowym (Bolser i wsp., 1994). Presynaptyczne receptory $GABA_B$, zlokalizowane na cholinergicznych neuronach dróg oddechowych, hamują uwalnianie acetylocholiny i zmniejszają cholinergiczny skurcz mięśni gładkich tychże dróg. W związku z tym, dysfunkcja tego receptora wiązana jest ze skurczem dróg oddechowych u astmatyków (Tohda i wsp., 1998). Agoniści receptorów $GABA_B$ zmniejszają uwalnianie mediatorów anafilaktycznych w płucach i zapobiegają wstrząsowi anafilaktycznemu.

Zarówno GABA jak i baklofen hamują uwalnianie tachykinin z nerwów dróg oddechowych wrażliwych na kapsaicynę, znosząc jednocześnie tachykinino-zależny skurcz oskrzeli oraz przesięk mikronaczyniowy płuc (Chapman i wsp., 1993).

Receptory $GABA_C$ rozpoznane niedawno i odkryte w siatkówce i hipokampie kręgowców

http://rcin.org.pl

(Semyanov, 2002), nie odgrywają istotnej roli w genezie i regulacji oddychania (McCrimmon i wsp., 1995).

Kwas glutaminowy jest dominującym mediatorem pobudzającego neuroprzekaźnictwa w ośrodkowym układzie nerwowym. Jądro pasma samotnego (NTS) oraz inne regiony pnia mózgu związane z kontrolą wentylacji wykazują wysoką koncentrację glutaminianu (Meeley i wsp., 1989).

Receptory NMDA, nazwane od ich agonisty- kwasu N-metylo-D-asparaginowego, należą do jonotropowej rodziny receptorów kwasu glutaminowego (McCrimmon i wsp., 1995). Istnieją w postaci heteromerycznych kompleksów zbudowanych z obligatoryjnej podjednostki NR1 połączonej z jedną lub wieloma podjednostkami NR2 i/lub NR3. Ich farmakologiczna regulacja zależy od unikalnej kombinacji miejsc wiążących w receptorze (Danysz i Parsons, 1998). Receptor NMDA posiada miejsce wiązania glutaminianu oraz kompetycyjnych antagonistów, oddzielne miejsce glicynowe, modulatorowe miejsca wiązania poliamin, cynku, magnezu oraz miejsce wiązania antagonistów niekompetycyjnych (Meador-Woodruff i Healy, 2000).

Receptory NMDA zostały opisane w rdzeniu przedłużonym świnki morskiej (Machaalani i Waters, 2002), kota (Yamazaki i wsp., 2000) i szczura (Aicher i wsp., 1999). Ich intensywna ekspresja w miejscu skupiającym jądra odpowiedzialne za kontrolę aktywności serca, oddychanie, sen i wybudzanie sugerują, że są one kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania tych fizjologicznych czynności. Syndrom nagłej śmierci łóżeczkowej niemowląt wiązany jest z dysfunkcją receptora NMDA, co znajduje potwierdzenie w zdecydowanie większej ekspresji mRNA podjednostki NR1 u dzieci z tym schorzeniem (Machaalani i Waters, 2003).

Receptory NMDA znajdujące się na neuronach oddechowych uczestniczą w generacji wzorca oddechowego i są odpowiedzialne za wyłączanie fazy wdechu. Ich blokada powoduje apneustyczny wzorzec oddychania (Foutz i wsp., 1989; Monteau i wsp., 1990). Ośrodkowe

http://rcin.org.pl

zastosowanie antagonistów NMDA znosi indukowany kapsaicyną kaszel, co może wskazywać na udział receptora NMDA w regulacji odruchu kaszlu (Kamei i wsp., 1989).

Kwas glutaminowy został uznany za neurotransmiter włókien dośrodkowych z wielu czuciowych systemów zaangażowanych w kontrolę oddychania, takich jak wolno adaptujące się receptory płucne. Odruch Breura-Hermga może być zablokowany antagonistami receptorów NMDA wstrzykniętymi do NTS-u lub wywołany iniekcją glutaminianu w obszar NTS, gdzie znajdują się zakończenia włókien dośrodkowych receptorów wolno adaptujących się (Bonham i wsp., 1993). Przecięcie nerwu błędnego czy usunięcie zwoju guzkowego zmniejsza koncentrację glutaminianu w NTS (Lewis i wsp. 1988), a stymulacja włókien dośrodkowych powoduje zwiększone jego uwalnianie (Granata i Reis, 1983).

Receptory NMDA współuczestniczą w powstawaniu odruchu z płucnych włókien C. Iniekcja kwasu glutaminowego w rejon NTS wywołuje reakcję identyczną z aktywacją tych włókien, a połączona blokada receptorów NMDA i nie-NMDA znosi odpowiedź wywołaną stymulacją włókien C przez fenyl biguanidynę (Vardhan i wsp., 1993).

Przekaźnictwo pobudzenia z szyjnych obwodowych chemoreceptorów również wymaga udziału glutaminianu (Dogaš i wsp., 1995). Odnerwienie obwodowych chemoreceptorów istotnie zmniejsza uwalnianie glutaminianu w NTS i w obszarze brzusznym rdzenia przedłużonego (Hoop i wsp., 1999). Blokada receptorów NMDA redukuje odpowiedź oddechową na hipoksję oraz eliminuje pobudzenie chemoreceptorów szyjnych wywołane iniekcją NaCN (Ohtake i wsp., 1998). Składowa przywspółczulna odruchu z baroreceptorów jest zależna od receptorów NMDA i przekaźnictwa z udziałem kwasu glutaminowego. Selektywny antagonista receptorów NMDA blokuje bradykardię wywołaną mikroiniekcją L- glutaminianu jak i odpowiedz na pobudzenie baroreceptorów (Canesin i wsp., 2000).

Receptory NMDA znajdują się we wszystkich organach wewnętrznych unerwionych

http://rcin.org.pl

parasympatycznie (Erdö, 1991). W obwodowym układzie nerwowym ich obecność została potwierdzona w autonomicznych i czuciowych zwojach: trójdzielnym, guzkowym, górnym szyjnym, klinowo-podniebiennym (Shigemoto i wsp., 1992), w neuronach krtani i tchawicy (Robertson i wsp., 1998), w motoneuronach przepony (McCrimmon i wsp., 1989) na zakończeniach trzewnych włókien dośrodkowych nerwu błędnego (Aicher i wsp., 1999) oraz w płucach i górnych drogach oddechowych szczura (Dickman i wsp., 2004).

Receptory α_2-adrenergiczne są ważnymi regulatorami współczulnego układu nerwowego, uwalniania neuroprzekaźników, ciśnienia krwi i ciśnienia wewnątrz gałki ocznej. Ich aktywacja działa także uspokajająco i przeciwbólowo (Philipp i wsp., 2002). Są one wrażliwe na fizjologiczne katecholaminy takie jak adrenalina i noradrenalina. Receptory α_2 hamują uwalnianie nie tylko własnych neuroprzekaźników, ale także regulują egzocytozę w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym takich transmiterów jak glutaminian, serotonina czy dopamina (Kamisaki i wsp., 1993; Scheibner i wsp., 2001; Bucheler i wsp., 2002). Wyróżnia się trzy podtypy receptora α_2: α_{2A}, α_{2B}, α_{2C} (Ruffolo i wsp., 1993). Nieselektywnym agonistą wszystkich trzech podtypów jest klonidyna, stosowana w medycynie w leczeniu nadciśnienia, jaskry, zawału serca, w terapii przeciwbólowej i jako środek uspokajający (Eisenach 1988).

Receptory α_2-adrenergiczne są licznie reprezentowane w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie w jądrach rdzenia przedłużonego związanych z właściwościami znieczulającymi (Eisenach i wsp., 1996) oraz w tych jego obszarach, które są zaangażowane w kontrolę oddychania i krążenia (Guyenet i wsp., 1994 ; O'Halloran i wsp., 2001).

W obwodowym układzie nerwowym są obecne na zakończeniach podstawowych włókien dośrodkowych, na neuronach rdzenia kręgowego (Eisenach i wsp., 1996), we wszystkich współczulnie unerwionych tkankach (Ruffolo i wsp., 1993) oraz w ciałkach szyjnych odpowiedzialnych za reakcję na hipoksję (Kou i wsp., 1991). Istnieje wiele dowodów

http://rcin.org.pl

wskazujących na rolę receptorów α_2 w regulacji rytmu oddechowego. Dożylnie podana klonidyna- agonista receptora α_2-adrenergicznego wywoływała depresję oddechową poprzez zmniejszenie częstości oddychania, wyrażonej przedłużeniem czasu wdechu u psów (Burton i wsp., 1990), spadek częstości oddechowej u szczurów (Fuxe i wsp., 1982) i kompletne zahamowanie aktywności nerwu przeponowego u kotów (McCrimmon i Lalley, 1982). Pobudzenie receptorów α_2 u nieuśpionych kóz spowodowało nierytmiczny wzorzec odpowiedzi oddechowej, charakteryzowany przez następujące po sobie epizody tachypnea, zwolnionego nieregularnego oddychania, włączając przedłużenie czasu wydechu i bezdech (O'Halloran i wsp., 1999a). Podanie klonidyny ludziom w celach przeciwbólowych wiązało się z depresją wentylacji minutowej (Jarvis i wsp., 1992), chrapaniem, obturacyjnym bezdechem i desaturacją tlenu we krwi tętniczej (Narchi i wsp., 1992). Zarówno u ludzi jak i u zwierząt jednym z istotniejszych efektów wywoływanych przez klonidynę jest obniżenie ciśnienia krwi (Mestivier i wsp., 1998). Działanie hipotensyjne klonidyny wiąże się z pobudzeniem receptorów α_2 w NTS i jądrze sinawym. Dochodzi wówczas do osłabienia aktywności neuronów współczulnych docierających do serca i naczyń krwionośnych oraz do pobudzenia nerwu błędnego, co w efekcie prowadzi do rozszerzenia naczyń tętniczych i zwolnienia czynności serca. Klonidyna działa także jako nieselektywny agonista receptora α_1, aktywuje również receptory imidazolinowe, których pobudzenie może wywoływać hipotensję (Guimaraes i Moura, 2001).

Receptory waniloidowe typu 1 (VR_1) występują na ciałach, aksonach i zakończeniach włókien czuciowych (Wood i Docherty, 1997). Stanowią one otwierane ligandem kanały kationowe, których aktywacja prowadzi do napływu jonów Ca^{2+} i Na^{2+} do komórki i powstania potencjału czynnościowego (Lee i Lundberg, 1994). Rozmieszczenie receptorów waniloidowych w ośrodkowym układzie nerwowym ogranicza się do rogu grzbietowego rdzenia kręgowego oraz nieciągłych obszarów dookoła i w samym jądrze pasma samotnego. Opisane zostały także w

http://rcin.org.pl

rdzeniowych jądrach nerwu trójdzielnego, w zwoju trójdzielnym, w rdzeniu kręgowym (Szallási i wsp., 1995a), w zwoju guzkowym, w neuronach unerwiających drogi oddechowe; (Szallási i wsp., 1995b; Kollarik i wsp., 2001).

Nie zidentyfikowano, jak dotąd, endogennego ligandu dla receptora VR_1, ale może być on aktywowany przez kapsaicynę i anandamid.

Anandamid jest endogennym agonistą receptora kannabinoidowego uwalnianym z makrofagów, granulocytów zasadochłonnych, neuronów i nabłonka (Lin i Lee, 2002).

Kapsaicyna jest pikantnym składnikiem ostrej papryki, posiadającym właściwości specyficznego i skutecznego stymulatora zakończeń, z których przewodzą niemielinowe włókna C oraz mielinowe włókien Aδ, odchodzące od neuronów oddechowych grupy grzbietowej oraz zwojów: guzkowego i trójdzielnego (Wood i Docherty, 1997). Niemielinowe włókna C reprezentują ponad 80 % czuciowych włókien w nerwie błędnym, który unerwia drogi oddechowe i płuca (Lee i Lundberg, 1994). Dłuższa ekspozycja na kapsaicynę może powodować desensytyzację niemielinowych czuciowych włókien dośrodkowych (Nagy, 1982), natomiast w dużych dawkach, szczególnie u nowo narodzonych zwierząt kapsaicyna działa jak selektywna neurotoksyna, powodując ich degenerację (Jancsó i wsp., 1977).

Receptory waniloidowe są zaangażowane w obwodowe funkcje takie jak percepcja zapalnego i termicznego bodźca bólowego (Caterina i Julius, 2001), mechanizmy kontroli termoregulacji, krążenia oraz obronne odruchy oddechowe (Holzer, 1991). Pełnią one także mniej poznane funkcje centralne, których istnienie sugeruje wzmacniająca presynaptyczne uwalnianie glutaminianu stymulacja receptorów VR_1 w mózgu (Marinelli i wsp., 2003).

Aktywacja niemielinowych włókien przez kapsaicynę powoduje nie tylko transmisję pobudzenia nerwowego do OUN, ale także uwalnianie mediatorów z aktywowanych zakończeń.

http://rcin.org.pl

Do uwalnianych przez kapsaicynę neuropeptydów zalicza się: substancję P, neurokininę A, kalcytonino-zależny peptyd (CGRP) i naczynio-aktywny peptyd jelitowy VIP, które lokalnie mogą oddziaływać na przepływ krwi, przepuszczalność naczyń krwionośnych, aktywność mięśni gładkich i mięśnia sercowego, wzrost tkanek i ich naprawę, oraz procesy immunologiczne (Holzer, 1988; Maggi i Meli, 1988).

Pobudzenie włókien C przez kapsaicynę w istotny sposób może wpływać na oddychanie. Mikroiniekcja kapsaicyny do jądra spoidłowego NTS szczura redukowała częstość oddechową, natomiast podwyższone dawki wywoływały bezdech (Mazzone i Geraghty, 1999).

Dożylna iniekcja kapsaicyny u psów i kotów wywoływała chemoodruch płucny, na który składał się bezdech, następujące po nim płytkie, szybkie ruchy oddechowe, bradykardia i spadek ciśnienia krwi (Pórszász i wsp., 1955; Toh i wsp., 1955; Coleridge i wsp., 1964). Odpowiedź ta zależna była od aktywacji zawartych w nerwie błędnym dośrodkowych włókien C znajdujących się w płucnym łożu naczyniowym. Wagotomia czy też oziębienie nerwów błędnych znosiły oddechowo-krążeniowe efekty kapsaicyny (Coleridge i Coleridge, 1984; Kopczyńska i Szereda-Przestaszewska, 1998).

W odpowiedziach wywołanych przez kapsaicynę obserwuje się różnice między gatunkami. Badania na szczurach (Mitchell i wsp., 1984; Hedner i wsp., 1985; Paleček i wsp., 1989) i małpach (Ravis i Singh, 1996) wykazały, że po wagotomii, obwodowo podana kapsaicyna nadal powoduje bezdech. Sugeruje to, oprócz płucnych włókien C dodatkowe miejsca działania kapsaicyny.

Przedstawione powyżej dane literaturowe wskazują na ważną, aczkolwiek niewyjaśnioną rolę receptorów NMDA, GABA-ergicznych, waniloidowych i α_2-adrenergicznych w obwodowej regulacji oddychania. Punktem wyjścia badań tej pracy była hipoteza, że w odruchach oddechowych wywołanych aktywacją opisanych powyżej receptorów przy użyciu ich ligandów,

http://rcin.org.pl

wejścia czuciowe nerwu błędnego nie pełnią zasadniczej roli w kształtowniu wzorca odpowiedzi ośrodkowych neuronów oddechowych.

Wyniki doświadczeń przedstawione w niniejszej rozprawie zostały częściowo opublikowane:

Kaczyńska K., Szereda-Przestaszewska M. Respiratory effects of capsaicin occur beyond the lung vagi in anaesthetizad rats. Acta Neurobiol. Exp. 60: 159-160. 2000.

Kaczyńska K. Szereda-Przestaszewska M. Superior laryngeal nerve section abolishes capsaicin evoked chemoreflex in anaesthetized rats. Acta Neurobiol. Exp. 62: 19-24. 2002.

Kaczyńska K., Szereda-Przestaszewska M. Apnoeic response to stimulation of peripheral GABA receptors in rats. Respir. Physiol. Neurobiol. 131: 189-197. 2002.

Kaczyńska K., Szereda-Przestaszewska M. Cardiorespiratory effects of intravenous N-methyl-D-aspartate challenge in anaesthetized rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31 (1-2): 101-106.2004.

http://rcin.org.pl

CEL PRACY:

Celem pracy jest zbadanie wpływu pobudzenia obwodowych receptorów wybranych substancji endogennych (GABA) i egzogennych substancji neuroaktywnych (NMDA, klonidyna, kapsaicyna) na wzorzec oddechowy i wentylację.

Problem ten wymaga:

1. Określenia zmian wzorca oddechowego wywołanego obwodowym podaniem ligandów badanych receptorów.
2. Wyjaśnienia roli komponenty odruchowej wywodzącej się z płuc, krtani i chemoreceptorów ciałek szyjnych w obserwowanych odpowiedziach oddechowo-krążeniowych.
3. Określenia znaczenia drogi podania substancji w generacji pełnego wzorca odpowiedzi oddechowych.
4. Ustalenia skuteczności antagonistów badanych substancji w blokowaniu obserwowanych efektów oddechowych.

http://rcin.org.pl

MATERIAŁY I METODY

1. MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY, ZNIECZULENIE, PREPARATYKA WSTĘPNA

Doświadczenia zostały przeprowadzone na 159 szczurach szczepu Wistar, samcach o masie ciała od 250 do 350 g. Zwierzęta usypiano wstrzykiwanym dootrzewnowo uretanem (Sigma w dawce 600 mg/kg) z dodatkiem chloralozy (Fluka AG, 120 mg/kg). Poziom znieczulenia był kontrolowany w ciągu całego doświadczenia, poprzez ocenę wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz reakcji na bodźce bólowe. Dodatkowe dawki narkozy podawano dożylnie, jeżeli wymagał tego stan zwierzęcia.

Oddychające spontanicznie szczury ułożone były w pozycji poziomej na grzbiecie, na podgrzewanym stole operacyjnym. Temperaturę ciała zwierząt, mierzoną w odbycie przy użyciu termometru rtęciowego, utrzymywano na średnim poziomie 38 °C, za pomocą poduszki grzejnej.

W stanie uśpienia ogólnego, przecinano skórę, powięź i mięśnie powierzchowne szyi w linii środkowej, rozszerzano mięśnie głębokie za pomocą pincet na tępo, wyosobniano tchawicę wraz z krtanią. Tchawicę przecinano między pierścieniami poniżej chrząstki tarczowatej krtani i w dolnej części zakładano rurkę tracheostomijną. Górny otwór rurki podłączano do głowicy czujnikowej pneumotachografu (Electrospirometr CS6, Mercury) w celu pomiaru objętości oddechowej. Do rurki wkłuwano igłę kapnografu (Engström Eliza plus, Gambro) służącego do kontroli i rejestracji poziomu wydechowego dwutlenku węgla.

Do prawej żyły udowej, prawej tętnicy udowej i prawej tętnicy szyjnej wspólnej wprowadzono kaniule polietylenowe (∅ wew. 0.75 lub 1.02 mm) wypełnione solą fizjologiczną (0.9% roztwór chlorku sodowego), wzbogaconą 0.1% roztworem heparyny (Heparinum, Polfa). Poprzez cewnik umieszczony w żyle udowej wstrzykiwano dodatkowe dawki narkozy i badane

http://rcin.org.pl

substancje. Te ostatnie, w części doświadczeń, podawano poprzez żyłę szyjną zewnętrzną do prawego przedsionka. Kaniula wprowadzona poprzez prawą tętnicę udową do aorty brzusznej, była podłączona do przetwornika ciśnienia (C.K.01 Mera -Tronik) oraz elektromanometru (MCK 4 11S) i służyła do pomiaru ciśnienia tętniczego krwi. Do kaniuli umieszczonej w prawej tętnicy szyjnej wspólnej podawano badane substancje. Próbki krwi do badań gazometrycznych pobierano z cewnika znajdującego się w prawej tętnicy udowej. Pomiarów dokonywano przy użyciu analizatora równowagi kwasowo - zasadowej (Corning 238 i AVL). Odchylenia od norm fizjologicznych mierzonego ciśnienia parcjalnego O_2 i CO_2 oraz poziomu jonów wodorowych pH, korygowano podając do oddychania mieszankę powietrzną wzbogaconą tlenem lub przez dożylne podanie roztworu dwuwęglanu sodowego (Natrium bicarbonicum 8.4 %, Polfa, Starogard).

Część szyjna nerwów błędnych, nerwy krtaniowe górne lub/oraz nerwy zatokowe i zwoje guzkowe (w zależności od przeprowadzanej serii eksperymentów) były wypreparowane i oddzielone od otaczających tkanek w celu późniejszych neurotomii wykonywanych w trakcie doświadczeń.

Badania zostały wykonane na podstawie zgody Pierwszej Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (Zezwolenie 175).

2. PREPARATYKA NERWÓW

2.1. Preparowanie nerwów błędnych w odcinku śródszyjnym oraz ponad zwojami guzkowymi

Nerw błędny odnajdowano preparując na tępo w odcinku szyjnym między tchawicą a mięśniami szyi. Położony wzdłuż tchawicy, obok tętnic szyjnych wspólnych, odsłaniany był w kierunku dogłowowym. Wagotomii śródszyjnej dokonywano przecinając go obustronnie znacznie poniżej krtani.

http://rcin.org.pl

W części doświadczeń izolowano zwój guzkowy zwracając baczną uwagę na zachowanie nietkniętego unaczynienia i krótki odcinek nerwu błędnego ponad nim. Tak przygotowany nerw przecinano obustronnie wykonując w ten sposób wagotomię nadguzkową (Meeley i wsp., 1989)

2.2. Preparatyka nerwów krtaniowych górnych

Po wypreparowaniu nerwów błędnych, izolowano z tkanek otaczających krtań nerw krtaniowy górny, biegnący od zwoju guzkowego nerwu błędnego i poprzez chrząstkę tarczowatą wchodzący do krtani (Sekizawa i Tsubone, 1991). Pod oba nerwy krtaniowe górne podkładano nitki przygotowując je do przecięcia, na wysokości ok. 0.5 cm ponad miejscem podziału na gałązkę wewnętrzną i zewnętrzną.

2.3. Preparatyka nerwów zatokowych

Rozgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej na tętnicę szyjną wewnętrzną i zewnętrzną wyeksponowywano obustronnie, po wyizolowaniu tchawicy i nerwów błędnych. W miejscu rozwidlenia naczyń położona jest owalna struktura o długości 0,6-0,7 mm i szerokości 0,4-0,5 mm zwana kłębkiem szyjnym. Odchodzący od ciałek szyjnych nerw zatokowy wypreparowywano przy użyciu mikroskopu operacyjnego w kierunku jego połączenia z nerwem językowo-gardłowym (IX), który z kolei wchodzi do czaszki poprzez otwór poszarpany. Odnerwienie chemoreceptorów ciałek szyjnych polegało na obustronnym przecięciu nerwów zatokowych w miejscu ich połączenia z nerwem IX, który był dodatkowo przecinany w kierunku dogłowowym (Cardenas i Zapata , 1983).

http://rcin.org.pl

3. PREPARATYKA I POMIAR AKTYWNOŚCI MIĘŚNIA PRZEPONY

Wycinano niewielki fragment skóry poniżej klatki piersiowej w okolicy wyrostka mieczykowatego mostka.

Przez odsłonięte mięśnie brzucha wprowadzano do przepony dwubiegunową elektrodę.

Ostro zakończona, wykonana z izolowanego drutu elektroda wkłuwana była do części mostkowej przepony pod kątem ostrym, tuż pod wyrostkiem mieczykowatym w kierunku dośrodkowym. Sygnał z elektrody wzmacniany był przez wzmacniacz NL 104 (Neurolog, Digitimer Ltd) i mierzony przez integrator AS 101 (Asbit) o stałej czasu 100 ms. Zapis rejestrowany za pomocą aparatu Omnilight Recorder 8M36 Honeywell (Japonia) monitorowany był również akustycznie w sposób ciągły w czasie doświadczenia.

4. SUBSTANCJE FARMAKOLOGICZNE STOSOWANE W DOŚWIADCZENIACH

Kapsaicyna (8 methyl - N - vanillyl - 6 - noneamide, Sigma) w dawce 5 μg / kg (0.16 μmol / kg) w 0.1% roztworze soli fizjologicznej z etanolem i 10% Tween 80

Czerwień rutenu (Ruthenium red, Sigma) w dawce 1 mg / kg (0.44 μmol / kg) w 0.1% roztworze wodnym

GABA (kwas γ-ammomasłowy, Sigma) w dawce 4 mg/kg (39 μmol / kg) w 0.1% roztworze wodnym

Bikukulina (bicucullme methiodide, Sigma) w dawce 1 mg/kg (2 μmol / kg) w 0.1% roztworze wodnym

Pikrotoksyna (picrotoxin, Sigma) w dawce 0,5 mg/kg (0,8 μmol / kg) w 0.9% roztworze soli fizjologicznej

CGP 35348 ((3-aminopropyl)(diethoxymethyl)-phosphmic acid, Sigma) w dawce 30 mg/kg (133

http://rcin.org.pl

μmol / kg) w 0.1% roztworze wodnym

NMDA (N-methyl-D-aspartic acid, Sigma) w dawce 4 mg/kg (27μmol / kg) w 0.9% roztworze soli fizjologicznej

AP-7 ($_{DL}$-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid, Sigma) w dawce 100 μg / kg (0.44 μmol / kg) w 0.9% roztworze soli fizjologicznej

Klonidyna (clonidine hydrochloride, Sigma) w dawce 15 μg / kg (0.056 μmol / kg) w 0.1% roztworze wodnym

SKF 86466 (6-chloro-3-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-3-benzazepine, SmithKline Beecham) w dawce 200 μg / kg (8.6 μmol / kg) w 0.9% roztworze soli fizjologicznej

Dopamina (3-hydroxytyramine hydrochloride, crystalline; Sigma) w dawce 0.01 mg / kg (0.527 μmol / kg) w 0.9% roztworze soli fizjologicznej

Cyjanek potasu (KCN) w dawce 0.5 mg (0.76 μmol) w 0.1% roztworze wodnym

Serotonina (serotonin hydrogen oxalate, Fluka AG, Busch SG) w dawce 0.025 mg/kg (0.094 μmol / kg) w 0.1% roztworze soli fizjologicznej

5. UKŁADY DOŚWIADCZALNE ZASTOSOWANE W PRACY

5. 1. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM KAPSAICYNY

5.1.1. Zbadanie wpływu pętli wagalnej oraz nerwów krtaniowych górnych na kształt i zachowanie się wzorca oddechowego oraz ciśnienia krwi po dożylnej iniekcji kapsaicyny

Przeprowadzano preparatykę wstępną tj. wykonywano tracheostomię w celu rejestracji objętości oddechowej i wydechowego CO_2. Następnie kaniulowano prawą tętnicę udową do monitorowania ciśnienia tętniczego krwi oraz pobierania próbek krwi celem wykonania oznaczeń

http://rcin.org.pl

gazometrycznych oraz prawą żyłę udową do podawania kapsaicyny i innych substancji.

Przygotowywano do rejestracji przeponę. Wypreparowywano odcinek szyjny nerwów błędnych, nerwy krtaniowe górne i przygotowywano je do przecięcia w dalszym toku doświadczenia, podkładając pod nie nitki bawełniane. Przed przystąpieniem do eksperymentu, pobierano próbkę krwi z prawej tętnicy udowej i mierzono stężenie jonów wodorowych pH oraz ciśnienie parcjalne zawartych we krwi gazów: O_2 i CO_2. Do kaniuli znajdującej się w prawej żyle udowej, wstrzykiwano 0.2 ml 0.9% roztworu soli fizjologicznej stanowiącej kontrolę objętości oraz 0.2 ml rozpuszczalnika (sól fizjologiczna, etanol, Tween 80). Po upływie 10 minut podawano kapsaicynę w iniekcji dożylnej w dawce 5 µg / kg, rejestrując jednocześnie zmiany parametrów oddechowych, ciśnienia tętniczego krwi oraz zintegrowanego elektromiogramu przepony. Czas zapisu odpowiedzi wywołanej kapsaicyną wynosił 1 minutę.

Po uzyskaniu wartości wyjściowej oddychania, dokonywano obustronnej wagotomii szyjnej i po 15 minutach przeprowadzano kontrolny pomiar gazometryczny krwi. Po raz drugi wstrzykiwano kapsaicynę do prawej żyły udowej w celu analizy zmian wzorca oddechowego i ciśnienia krwi po wagotomii.

Następnie po ustabilizowaniu się oddychania, przecinano obustronnie nerwy krtaniowe górne i ponownie wykonywano pomiar gazometryczny próbki krwi i rejestrowano parametry oddechowo-krążeniowe po podaniu kapsaicyny.

Zastosowana w pracy dawka kapsaicyny została wybrana, w oparciu o wcześniejsze prace nad chemoodruchem płucnym u szczura (Paleček i wsp.,1989; Naida i wsp., 1996).

5.1.2. Wpływ blokady receptorów waniloidowych na odpowiedź pokapsaicynową

Po wykonaniu preparatyki wstępnej i kontrolnego pomiaru ciśnienia parcjalnego O_2 i CO_2 oraz poziomu jonów wodorowych pH podawano dożylnie kapsaicynę, jednocześnie rejestrując

http://rcin.org.pl

przez 1 minutę parametry oddechowo-krążeniowe. Po upływie 10 minut, wstrzykiwano do kaniuli, znajdującej się w żyle udowej, czerwień rutenu w dawce 1 mg/kg (Naida i wsp., 1996) i dokonywano zapisu. Po upływie 1 minuty powtórnie podawano dożylnie kapsaicynę i rejestrowano parametry wzorca oddechowego i ciśnienie tętnicze krwi przez 1 minutę.

5. 2. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM GABA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ

5.2.1. Zbadanie wpływu pętli wagalnej na kształt i zachowanie się wzorca oddechowego oraz ciśnienie tętnicze krwi, wywołanych dotętniczą iniekcją GABA

Po przeprowadzeniu preparatyki wstępnej, podobnie jak w pierwszym układzie eksperymentalnym, wprowadzano dodatkowo kaniulę do tętnicy szyjnej wspólnej w celu dotętniczej iniekcji GABA.

Po kontrolnym pomiarze parametrów gazometrycznych krwi, wykonywano próbę objętościową i efekt rozpuszczalnika podając 0.2 ml roztworu soli fizjologicznej i 0.2 ml rozpuszczalnika (0.1 % roztwór wody) do tętnicy szyjnej wspólnej.

Następnie podawano GABA w dawce 4 mg/kg do tętnicy szyjnej wspólnej i dokonywano rejestracji przez 1 minutę. Po ustabilizowaniu się parametrów oddechowo-krążeniowych na poziomie wyjściowym, przecinano obustronnie nerwy błędne w odcinku szyjnym i dokonywano pomiaru ciśnienia parcjalnego O_2 i CO_2 oraz pH krwi. Powtórnie wstrzykiwano dotętniczo GABA w czasie nie krótszym niż 30 minut od poprzedniego podania.

Stosowana w pracy dawka GABA- 4 mg/kg, wywołująca optymalną reakcję została określona na podstawie wstępnych doświadczeń.

http://rcin.org.pl

5.2.2. Skutki blokady receptorów $GABA_A$ przy użyciu bikukuliny i pikrotoksyny

Przygotowane chirurgicznie, poddane wagotomii wstępnej szczury otrzymywały kontrolne podanie GABA do tętnicy szyjnej wspólnej. Po upływie 30 minut wstrzykiwano im dożylnie bikukulinę w dawce 1 mg/kg (Vemulapalli i Barletta, 1984). Po upływie 1 minuty powtórnie podawano dotętniczo GABA.

Odczekiwano 1 godzinę, po czym wstrzykiwano dotętniczo kontrolną dawkę GABA. Po 30 minutach podawano dożylnie pikrotoksynę w dawce 0.5 mg/kg (Holzer i Hagmuller, 1979). Po upływie 1 minuty od jej podania dokonywano po raz drugi iniekcji GABA do tętnicy szyjnej wspólnej.

5.2.3. Skutki blokady receptorów $GABA_B$ przy użyciu CGP 35348

Wyjściowo wagotomizowanym szczurom wstrzykiwano GABA do tętnicy szyjnej wspólnej dwukrotnie. 30 minut przed (kontrola) i 1 minutę po iniekcji CGP 35348 do żyły udowej w dawce 30 mg/kg. Rejestrowano zapis każdego podania.

5.2.4. Zbadanie roli informacji dośrodkowej z chemoreceptorów ciałek szyjnych w powstawaniu wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dotętniczym podaniem GABA

Poddanym preparatyce wstępnej, wyjściowo wagotomizowanym szczurom (stanowiącym grupę kontrolną) wyizolowywano nerw zatokowy i językowo-gardłowy. GABA w dawce 4 mg/kg wstrzykiwano do tętnicy szyjnej wspólnej przed i po przecięciu nerwów zatokowych i językowo-gardłowego po obu stronach, dokonując rejestracji parametrów oddechowo-krążeniowych przez 1 minutę. Odstęp między podaniami wynosił nie mniej niż 30 mmut. Po każdym odnerwieniu badano pH i parametry gazometryczne krwi. Skuteczność przecięcia nerwów zatokowych i językowo-gardłowego badano podając dopaminę w dawce 0.01 mg/kg i

http://rcin.org.pl

cyjanek potasu w dawce 0.5 mg/kg do tętnicy szyjnej wspólnej. Brak depresji i stymulacji oddychania po podaniu obu substancji (odpowiednio) świadczył o poprawnym wykonaniu odnerwienia.

5. 3. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM NMDA DO ŻYŁY UDOWEJ

5.3.1. Wpływ obustronnej wagotomii śródszyjnej na zachowanie się i kształt wzorca oddechowego oraz ciśnienie krwi po dożylnej iniekcji NMDA

Po wykonaniu preparatyki wstępnej, mierzono kontrolnie parametry gazometryczne krwi. Następnie po wykonaniu próby rozpuszczalnika, polegającej na wstrzyknięciu 0.2 ml 0.9 % soli fizjologicznej do prawej żyły udowej, podawano dożylnie NMDA w dawce 4mg/kg i rejestrowano reakcję przez 1 minutę. Po upływie około 30 minut, pozwalających na ustabilizowanie się parametrów oddechowo-krążeniowych zwierzęcia, przecinano obustronnie nerwy błędne poniżej krtani. Po pomiarze ciśnienia parcjalnego O_2 i CO_2 oraz pH krwi, po upływie conajmniej 1 godziny od poprzedniego podania, wstrzykiwano NMDA do żyły udowej. Zastosowana w pracy dawka NMDA została wyselekcjonowana na podstawie przeprowadzonych wstępnie badań dawka-odpowiedź.

5.3.2. Wpływ blokady receptorów NMDA przy użyciu AP-7

Wstępnie wagotomizowane, przygotowane chirurgicznie szczury otrzymywały kontrolną, dożylną iniekcję NMDA w dawce 4 mg/kg. Po upływie 1 godziny podawnc do żyły udowej bloker receptorów NMDA, AP-7 w dawce 100 μg/kg (Sitniewska i wsp., 2003). Odczekiwano 2 minuty i powtórnie wstrzykiwano dożylnie NMDA.

http://rcin.org.pl

5.3.3. Zbadanie udziału zwojów guzkowych nerwów błędnych w powstawaniu odpowiedzi oddechowo-krążeniowej wywołanej dożylnym podaniem NMDA

Przygotowane jak w opisie głównym, poddane wstępnej wagotomii śródszyjnej zwierzęta, stanowiące grupę kontrolną, otrzymywały podanie NMDA (4 mg/kg) do żyły udowej. Następnie przeprowadzano obustronną wagotomię nadguzkową, której prawidłowe wykonanie sprawdzano iniekcją serotoniny w dawce 0.025 mg/kg do żyły udowej (brak bezdechu, lub zwolnienia oddychania po przecięciu nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych). Po odczekaniu około 1 godziny wykonywano kolejne podanie NMDA do żyły udowej, dokonując rejestracji danych oddechowo-krążeniowych przez 1 minutę.

5.3.4. Skutki odnerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych na pojawienie się wzorca oddechowego i zmian ciśnienia tętniczego krwi, charakterystycznych dla dożylnego podania NMDA

Przeprowadzono preparatykę wstępną. Wyjściowo wagotomizowanym szczurom, stanowiącym grupę kontrolną, podawano dożylnie NMDA w dawce 4 mg/kg. Po przecięciu nerwów zatokowych i nerwu IX powtarzano wstrzyknięcie NMDA do żyły udowej, zapisując jednocześnie parametry oddechowo-krążeniowe przez jedną minutę. Skuteczność odnerwienia kłębków szyjnych badano tak jak w punkcie 5.2.4.

5. 4. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH PODANIEM NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ

5.4.1. Wpływ obustronnej wagotomii śródszyjnej na zachowanie się i kształt wzorca oddechowego oraz ciśnienie krwi po dotętniczej iniekcji NMDA

Po przeprowadzeniu preparatyki wstępnej, pomiarze parametrów gazometrycznych krwi,

http://rcin.org.pl

wykonano próbę rozpuszczalnika (0.2 ml 0.9 % soli fizjologicznej). Następnie wstrzykiwano szczurom NMDA w dawce 4 mg/kg do tętnicy szyjnej wspólnej. Po stabilizacji parametrów oddechowo-krążeniowych zwierząt przecinano im obustronnie nerwy błędne na szyi. Odczekiwano 10 minut i ponownie pobierano próbkę krwi do pomiaru ciśnienia parcjalnego O_2 i CO_2 oraz pH. Po czasie nie krótszym niż 1 godzina od poprzedniej iniekcji podawano dotętniczo NMDA, rejestrując jednocześnie parametry oddechowe i ciśnienie krwi.

5.4.2. Skuteczność AP-7 w blokowaniu odpowiedzi oddechowo-krążeniowych wywołanych dotętniczą iniekcją NMDA

Przygotowane chirurgicznie, poddane wagotomii wstępnej szczury otrzymywały kontrolne podanie NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej. Po upływie 1 godziny wstrzykiwano im dożylnie AP-7 w dawce 100 μg/kg. Po upływie 2 minut po raz drugi podawano dotętniczo NMDA rejestrując parametry oddechowe i ciśnienie krwi.

5.4.3. Znaczenie obecności zwojów guzkowych nerwów błędnych w generacji wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dotętniczym podaniem NMDA

Poddane preparatyce wstępnej, wagotomizowane w odcinku szyjnym szczury, stanowiące grupę kontrolną otrzymywały podanie NMDA w dawce 4 mg/kg do tętnicy szyjnej wspólnej. Po przecięciu nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych wstrzykiwano po raz wtóry dotętniczo NMDA, dokonując zapisu w czasie 1 minuty.

http://rcin.org.pl

5.4.4. Skutki odnerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych na pojawienie się wzorca oddechowego i zmian ciśnienia tętniczego krwi, charakterystycznych dla dotętniczego podania NMDA

Przeprowadzono preparatykę wstępną oraz obustronną wagotomię śródszyjną. NMDA wstrzykiwano do tętnicy szyjnej wspólnej dwukrotnie: przed i po odnerwieniu chemoreceptorów ciałek szyjnych w odstępie czasu wynoszącym powyżej 1 godziny. Poprawność przecięcia nerwów zatokowych i nerwu IX sprawdzano jak w punkcie 5.2.4.

5. 5. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM KLONIDYNY

5.5.1. Wpływ przecięcia pętli wagalnej na kształt wzorca oddechowego i ciśnienie krwi wywołanych dożylnym podaniem klonidyny

Po przeprowadzeniu preparatyki wstępnej pobierano próbkę krwi z prawej tętnicy udowej i mierzono pH oraz ciśnienie parcjalne zawartych we krwi gazów: O_2 i CO_2. Wykonano próbę rozpuszczalnika wstrzykując dożylnie 0.2 ml 0.1 % roztworu wodnego. Następnie podawano klonidynę w dawce 15 μg/kg (O'Halloran i wsp., 2001) do prawej żyły udowej, rejestrując jednocześnie parametry oddechowe i ciśnienie krwi przez 2 minuty. Po uzyskaniu warunków kontrolnych badanych parametrów krwi, przecinano nerwy błędne w odcinku szyjnym i po 15 minutach dokonywano pomiaru parametrów gazometrycznych krwi. Po czasie nie krótszym niż 1 godzina od poprzedniej iniekcji, powtórnie podawano dożylnie klonidynę dokonując rejestracji danych.

http://rcin.org.pl

5.5.2. Wpływ blokady receptorów α2–adrenergicznych przy użyciu SKF 86466 na odpowiedź wywołaną podaniem klonidyny

Przeprowadzono preparatykę wstępną oraz obustronną wagotomię śródszyjną. Po kontrolnym wstrzyknięciu klonidyny w dawce 15 μg/kg do żyły udowej odczekiwano godzinę. Następnie podawano SKF 86466 dożylnie w dawce 200 μg/kg (O'Halloran i wsp., 2000). Po upływie 1 minuty dokonywano powtórnej iniekcji dożylnej klonidyny przeprowadzając rejestrację danych przez 2 minuty.

5.5.3. Zbadanie roli informacji dośrodkowej z chemoreceptorów cialek szyjnych w powstawaniu wzorca oddechowo-krążeniowego wywołanego dożylnym podaniem klonidyny

Poddane preparatyce wstępnej, wyjściowo wagotomizowane zwierzęta otrzymywały kontrolną iniekcję klonidyny do prawej żyły udowej. Po przecięciu nerwów zatokowych i nerwu IX podawano dożylnie dopaminę i cyjanek potasu jako substancje sprawdzające poprawność wykonania odnerwienia (p.5.2.4.). Po upływie godziny po raz drugi wstrzykiwano dożylnie klonidynę dokonując rejestracji danych przez 2 minuty.

6. OBLICZENIA STOSOWANE W PRACY

6. 1. Obliczanie głównych parametrów oddechowych

Z zapisu rejestracyjnego dokonywano odczytu i pomiaru objętości oddechowej (V_T) mierzonej w ml oraz zintegrowanej aktywności mięśnia przeponowego. Ze zintegrowanej aktywności przepony wyznaczano takie parametry jak: szczytowa wysokość amplitudy wyładowań mięśnia przeponowego, czas wdechu (T_I), czas wydechu (T_E), całkowity czas trwania pojedynczego cyklu oddechowego (T_{TOT}), częstość oddychania ($f = 60 / T_{TOT}$).

http://rcin.org.pl

Jednostką pomiaru czasu trwania wdechu, wydechu i całkowitego cyklu oddechowego były sekundy. Częstość oddychania mierzono w min^{-1}, natomiast wartość maksymalnej amplitudy zintegrowanego elektromiogramu przepony w jednostkach umownych (Haxhiu i wsp. 1984).

Wentylację minutową (V_E), czyli objętość powietrza pobieraną i oddawaną w ciągu minuty, obliczano według wzoru:

$$V_T\ (ml) \times f\ (min^{-1}) = V_E\ (ml / min)$$

Odpowiedź mierzonych parametrów na kapsaicynę, GABA, NMDA i klonidynę szacowano porównując średnią z pięciu oddechów we wznowionym po bezdechu oddychaniu, po 30, 60 sekundach i/lub po 2 minutach po podaniu substancji, ze średnią pięciu kontrolnych oddechów i wyrażano je w wartościach absolutnych.

Bezdech będący zatrzymaniem oddychania w fazie wydechu, wywołany podaniem kapsaicyny, GABA i NMDA określany był jako wydłużona przerwa wydechowa, trwająca do pierwszego oddechu dająca wyraźne wychylenie na zapisie objętości oddechowej.

6. 2. Obliczanie współczynnika zahamowania oddychania

W odpowiednich seriach doświadczeń, w których analizowano właściwości bezdechu wydechowego lub przedłużenie wydechu, wywołanych podaniem substancji, obliczano współczynnik zahamowania oddychania. Jest on wartością stosunku czasu trwania bezdechu, (jeżeli wystąpił) lub czasu trwania pierwszego przedłużonego wydechu pojawiającego się po podaniu substancji ($T_{E\ test}$) do średniego czasu trwania 5-ciu wydechów kontrolnych przed iniekcją ($T_{E\ kontrola}$):

Wsp. zahamowania = $T_{E\ test} / T_{E\ kontrola}$

http://rcin.org.pl

6. 3. Obliczanie średniego ciśnienia tętniczego

Analizowano, monitorowane podczas wszystkich doświadczeń, ciśnienie tętnicze krwi, biorąc pod uwagę średnie ciśnienie tętnicze, którego wartości wyliczano według wzoru:

Śr. ciśn. tętnicze = ciśn. rozkurczowe + 1/3 (ciśn. skurczowe - ciśn. rozkurczowe)

6. 4. Obliczenia statystyczne

Zmiany parametrów oddechowych analizowano przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Różnice między konkretnymi punktami czasowymi i sytuacjami doświadczalnymi szacowano za pomocą analizy kontrastów, testu Duncana. Współczynnik zahamowania wydechu analizowano używając jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), testu t-Studenta dla prób powiązanych lub testu Wilcoxona.

Normalność rozkładów weryfikowano stosując test Kołmogorowa i Smirnowa. Wyniki uznawano za znamienne, gdy poziom istotności p był mniejszy niż 0.05.

Wartości obliczanych parametrów podane są jako średnie ± błąd średniej.

http://rcin.org.pl

WYNIKI

1. KAPSAICYNA

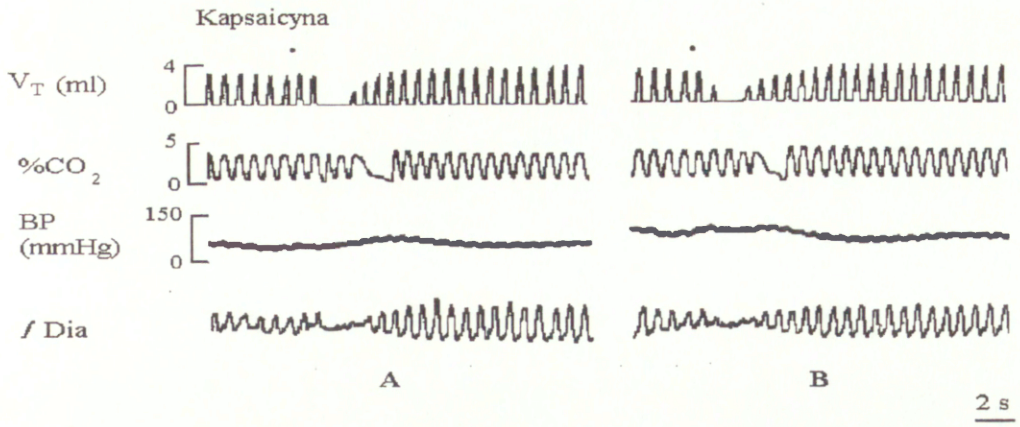
1. 1. ODPOWIEDŹ ODDECHOWA ORAZ WPŁYW WAGOTOMII ŚRÓDSZYJNEJ NA KSZTAŁT I ZACHOWANIE SIĘ WZORCA ODDECHOWEGO WYWOŁANEGO DOŻYLNYM PODANIEM KAPSAICYNY

Bezdech i zmiany głównych parametrów oddechowych

Dawka kapsaicyny zastosowana w pracy: 5 μg/kg została wyselekcjonowana na podstawie danych z piśmiennictwa, gdzie mniejszą (Lee i Lundberg, 1994) lub taką samą dozę stosowano do wywoływania chemoodruchu płucnego u szczura (Paleček i wsp., 1989; Naida i wsp., 1996). Małe dawki kapsaicyny: kilka μg, stymulują wyłącznie najmniejsze chemowrażliwe włókna C u myszy, szczura i świnki morskiej (Holzer i wsp., 1998).

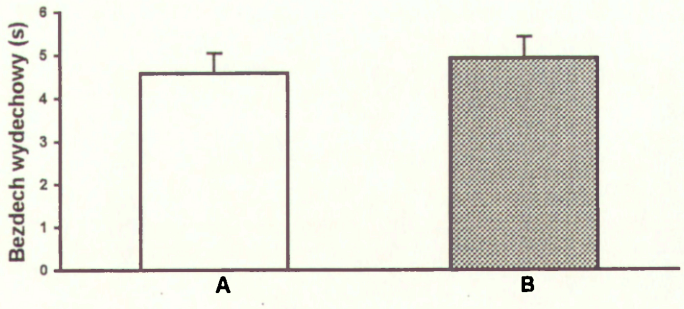
Dożylne podanie kapsaicyny u 15 nieuszkodzonych (zachowane nerwy błędne) szczurów w dawce 5 μg/kg wywołało jednolity wzorzec odpowiedzi oddechowej, charakteryzujący się bezdechem wydechowym, wzrastającą objętością oddechową, krótkotrwałym przyspieszeniem oddychania oraz spadkiem ciśnienia krwi. Po przecięciu nerwów błędnych wzorzec odpowiedzi oddechowej wywołanej kapsaicyną nie zmieniał się w sposób istotny. Rycina 1 obrazuje typową odpowiedź oddechową na kapsaicynę u zwierząt nieuszkodzonych i następnie poddanych obustronnej wagotomii szyjnej.

http://rcin.org.pl



Ryc. 1. Wpływ kapsaicyny na oddychanie i ciśnienie krwi u szczurów przed (A) oraz po obustronnej wagotomii szyjnej (B). V_T- objętość oddechowa, $\%CO_2$- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

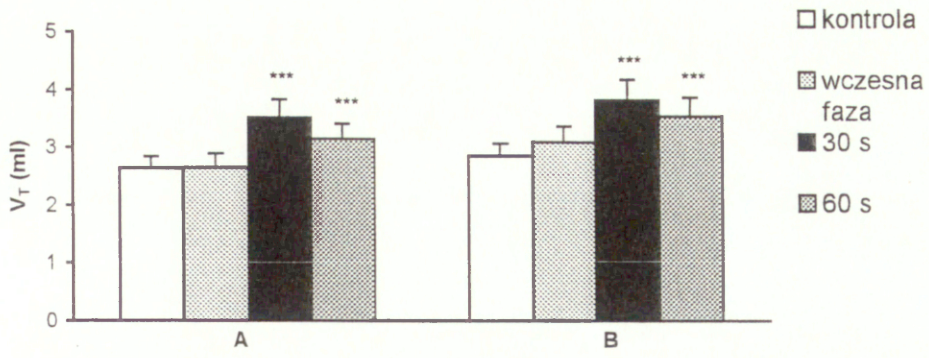
Bezdech wystąpił zarówno u nieuszkodzonych jak i u poddanych wagotomii szczurów. Wyeliminowanie nerwów błędnych nie modyfikowało również średniej długości bezdechu, indukowanego dożylną iniekcją kapsaicyny (Ryc.2)



Ryc. 2. Średnia długość bezdechu wywołanego dożylną iniekcją kapsaicyny u zwierząt nieuszkodzonych (A) oraz po obustronnym przecięciu nerwów błędnych w odcinku szyjnym (B), $p>0.64$ (test t-Studenta); n=15.

We wznowionym po bezdechu oddychaniu nie stwierdzono istotnych różnic w wielkości objętości oddechowej w obu grupach zwierząt ($p=0.08$, dwuczynnikowa ANOVA, n=15). W 30 s po podaniu kapsaicyny zaobserwowano znamienny wzrost objętości oddechowej, utrzymujący się do 60 sekundy, zarówno u zwierząt nieuszkodzonych jak i wagotomizowanych ($p<0.00001$, dwuczynnikowa ANOVA, n=15),(Ryc.3).

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Średnie wartości objętości oddechowej wywołane dożylną iniekcją kapsaicyny u nieuszkodzonych (A) i następnie poddanych przecięciu nerwów błędnych szczurów (B). ***$p<0.001$ (analiza kontrastów); n=15.

Częstość oddychania zwiększała się znamiennie we wczesnej fazie przywróconej po bezdechu wentylacji ($p<0.00002$, dwuczynnikowa ANOVA, n=15). U zwierząt z zachowanymi nerwami błędnymi zaobserwowano nieznaczne jej zmniejszenie w stosunku do kontroli w czasie 60 s po podaniu. Znamienne różnice między wartościami wyjściowymi przed i po przecięciu nerwów błędnych wynikały z niższej częstości oddychania u zwierząt wagotomizowanych ($p<0.05$, analiza kontrastów, n=15). Potwierdza to jedynie powszechnie przyjęty pogląd, że przecięcie nerwów błędnych zwalnia rytm oddechowy (Sant'Ambrogio i Remmers, 1985), (Tabela 1).

Zwiększenie wentylacji minutowej obecne było od momentu przywróconego oddychania do 60 s przed i po wagotomii (Tabela 1).

http://rcin.org.pl

Tabela 1. Zmiany częstości oddychania (f) i wentylacji minutowej (V_E) po dożylnym podaniu kapsaicyny u nieuszkodzonych i wagotomizowanych szczurów.

	f (min^{-1})				V_E ($ml \cdot min.^{-1}$)			
		Kapsaicyna				Kapsaicyna		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	61±2.9	68±4.1*	62 ±3.0	56±2.7*	164±17	182±20	219±25***	180±19*
Zwierzęta wagotomizowane	54±2.9#	60±4.0*#	56±2.7#	53±2.8	146±14	186±24**	217±24***	196±24**

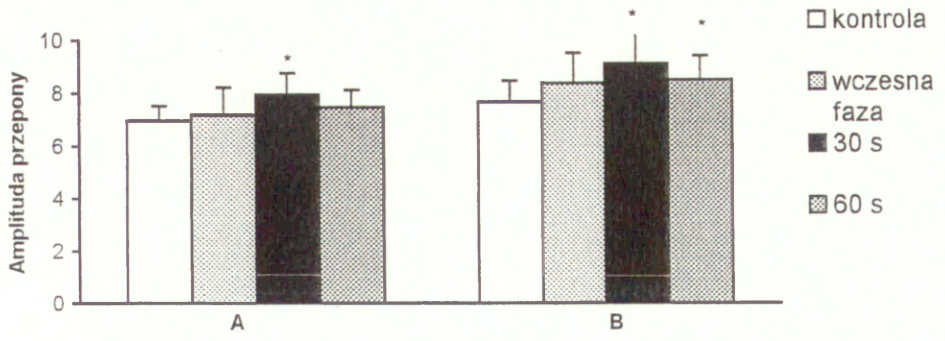
***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną, #p<0.05 w porównaniu z odpowiednią wartością u zwierząt z zachowanymi nerwami błędnymi (analiza kontrastów); n=15.

Wpływ kapsaicyny na aktywność przepony

W 9 doświadczeniach przeprowadzonych zgodnie z opisem znajdującym się w metodyce, dokonano pomiaru i zapisu zintegrowanej aktywności przepony (emg). Wywołanemu podaniem kapsaicyny bezdechowi towarzyszyła cisza elektryczna w zapisie elektromiogramu przepony.

W czasie wznowionego oddychania następował wzrost szczytowej amplitudy emg przepony, osiągający znamienne maksimum w 30 s i utrzymujący się do 60 s od iniekcji kapsaicyny. Efekty te dotyczyły obu stanów unerwienia ($p<0.03$, dwuczynnikowa ANOVA, n=9) (Ryc.4).

http://rcin.org.pl



Ryc. 4. Zmiany amplitudy zintegrowanej aktywności przepony u nieuszkodzonych (A), a następnie wagotomizowanych (B) szczurów po wstrzyknięciu kapsaicyny. *p<0.05 (analiza kontrastów); n=9.

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Spadek średniego ciśnienia tętniczego krwi był statystycznie istotny w czasie trwania bezdechu w obu grupach zwierząt (p<0.001, dwuczynnikowa ANOVA, n=15). Hipotensja utrzymywała się do 30 s u zwierząt nieuszkodzonych, po czym w 60 sekundzie ciśnienie wracało do poziomu kontrolnego. U zwierząt wagotomizowanych nieznamienny statystycznie spadek zachowany był do 60 s (Tabela 2).

Tabela 2. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP) po dożylnej iniekcji kapsaicyny u nieuszkodzonych i wagotomizowanych szczurów.

	MAP (mmHg)			
		Kapsaicyna		
	0	bezdech	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	100±6.9	87±7.1***	90±6.8**	98±7.8
Zwierzęta wagotomizowane	111±6.9	102±6.7**	101±7.2	103±7.4

***p<0.001, **p<0.01, w porównaniu z wartością kontrolną, (analiza kontrastów); n=15.

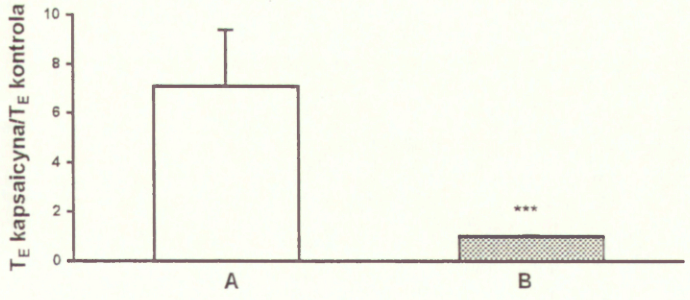
http://rcin.org.pl

1.2. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW WANILOIDOWYCH NA ODPOWIEDŹ POKAPSAICYNOWĄ

Odpowiedź oddechowa

Do blokowania receptorów waniloidowych użyto niekompetycyjnego antagonisty-czerwieni rutenu (ruthenium red, RR). Czerwień rutenu jest nieorganicznym barwnikiem hamującym pobudzenie oraz desensytyzację włókien czuciowych wywoływane kapsaicyną. Mechanizm działania blokera polega na zapobieganiu otwarcia kanałów kationowych receptora waniloidowego (Maggi i wsp., 1993).

Kontrolne wstrzyknięcie kapsaicyny wstępnie poddanym wagotomii szczurom wywołało opisane powyżej: bezdech i następujący we wznowionym oddychaniu znamienny wzrost objętości oddechowej i częstości oddychania. Podanie samej czerwieni rutenu do żyły udowej w dawce 1mg/kg nie wpływało istotnie na przebieg oddychania. Po upływie 1 minuty od iniekcji RR ponownie wstrzykiwano kapsaicynę. Blokada receptorów waniloidowych skutecznie zapobiegała odpowiedzi na kapsaicynę. Nie stwierdzono bezdechu, a współczynnik zahamowania oddychania został siedmiokrotnie zredukowany w porównaniu z wartością przed użyciem antagonisty ($p<0.001$), (Ryc.5).



Ryc.5. Współczynnik zahamowania oddychania po podaniu kapsaicyny przed (A) i po (B) iniekcji czerwieni rutenu. ***$p<0.001$ (test t-Studenta dla zmiennych zależnych), n=9.

http://rcin.org.pl

Blokada receptorów waniloidowych czerwienią rutenu wyeliminowała również pobudzające działanie kapsaicyny na główne parametry oddechowe: objętość i częstość oddychania (Tabela 3).

Tabela 3. Objętość oddechowa (V_T) i częstość oddychania (f) po dożylnym podaniu kapsaicyny przed i bo zablokowaniu receptorów waniloidowych czerwienią rutenu (RR).

	V_T (ml)				f (min^{-1})			
		Kapsaicyna				Kapsaicyna		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Kontrola	2.48±0.4	2.75±0.5	3.1±0.4***	2.95±0.4**	53±5.1	57±5.2**	57±4.5***	54±5.1
RR	2.74±0.6	2.71±0.5	2.77±0.6#	2.72±0.6	54±4.8	56±4.2	55±4.6#	55±4.6

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną, #p<0.05 w porównaniu z odpowiednią wartością w kontroli (test Duncana); n=7.

Odpowiedź krążeniowa

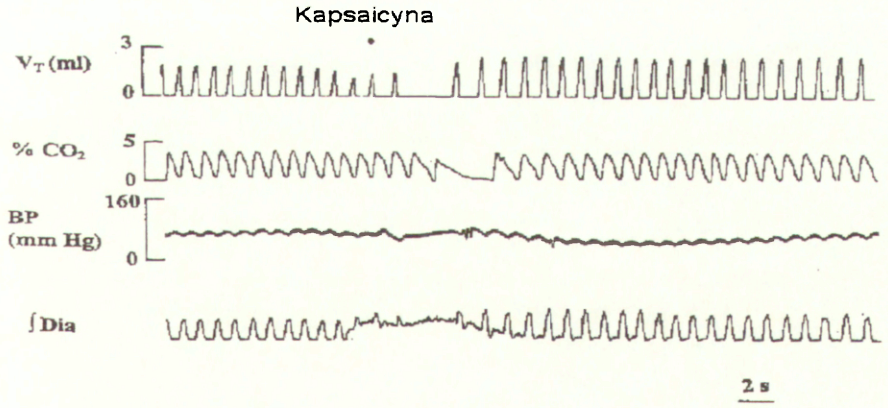
Typowe działanie kapsaicyny na ciśnienie krwi, opisane w podrozdziale 1.1. polegało na obniżeniu średniego ciśnienia tętniczego. Tak było również w tej części eksperymentalnej, kiedy kontrolnie podano kapsaicynę 7 wagotomizowanym zwierzętom. Spadek ciśnienia z wartości wyjściowej 113 ± 12 do 104 ± 9 mmHg zarejestrowano w trakcie trwania bezdechu (p<0.05, test Duncana). Wstrzyknięta powtórnie kapsaicyna po uprzedniej iniekcji czerwieni rutenu nie spowodowała obniżenia ciśnienia, a wręcz znamiennie je podwyższyła z wartości kontrolnej 112 ±12 do 121 ± 15 mm Hg, bezpośrednio po podaniu (p<0.05, test Duncana).

http://rcin.org.pl

1.3. UDZIAŁ NERWÓW KRTANIOWYCH GÓRNYCH W ODPOWIEDZI ODDECHOWO-KRĄŻENIOWEJ NA DOŻYLNĄ INIEKCJĘ KAPSAICYNY

Odpowiedź oddechowa

W związku z brakiem znamiennych różnic w długości czasu bezdechu i w odpowiedziach oddechowych pomiędzy zwierzętami nieuszkodzonymi, a poddanymi obustronnej wagotomii śródszyjnej, w dalszych eksperymentach rejestrowano, analizowano i porównywano wyniki uzyskane u zwierząt wagotomizowanych i poddanych następnie sekcji nerwów krtaniowych górnych. Dożylne podanie kapsaicyny u 9 wagotomizowanych szczurów w dawce 5 μg/kg wywołało opisany w p. 1.1. jednolity wzór odpowiedzi oddechowej, charakteryzujący się bezdechem wydechowym, wzrastającą objętością oddechową oraz spadkiem ciśnienia krwi. Rycina 6 obrazuje typową odpowiedź oddechową na kapsaicynę u wagotomizowanego szczura.

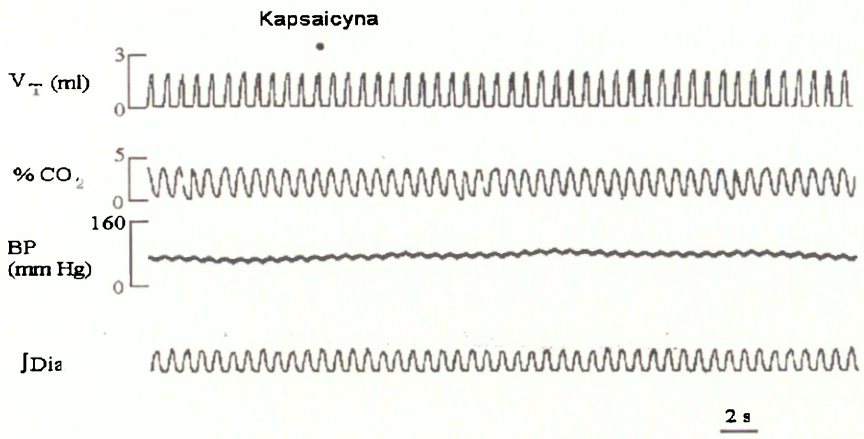


Ryc. 6. Wpływ kapsaicyny na oddychanie i ciśnienie krwi u szczura poddanego obustronnej wagotomii szyjnej. V_T- objętość oddechowa, $\%CO_2$- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Bezdech wydechowy wystąpił u wszystkich wagotomizowanych zwierząt. We wznowionym po bezdechu oddychaniu, w 30 s po podaniu kapsaicyny wzrastała znamiennie objętość oddechowa, a efekt utrzymywał się do 60 sekundy ($p<0.05$). Po przecięciu nerwów

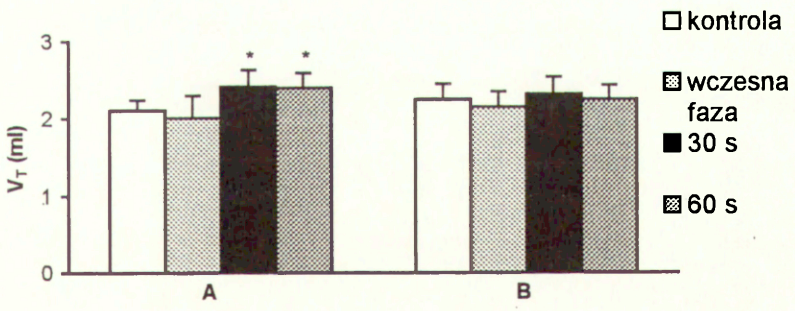
http://rcin.org.pl

krtaniowych górnych kapsaicyna nie wywoływała istotnych zmian w oddychaniu (Ryc.7) po kontynuacji zapisu u powyżej prezentowanego zwierzęcia (Ryc. 6).



Ryc.7. Wpływ kapsaicyny na oddychanie i ciśnienie krwi u szczura poddanego przecięciu nerwów krtaniowych górnych. V_T- objętość oddechowa, $\%CO_2$- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Iniekcja kapsaicyny po wyłączeniu przewodnictwa w SLN nie wpływała znamiennie na objętość oddechową (Ryc. 8).

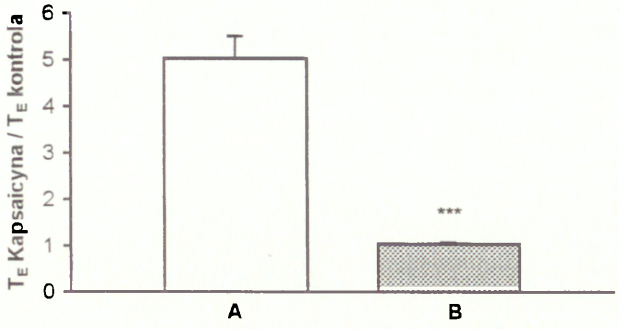


Ryc. 8. Średnie wartości objętości oddechowej wywołane dożylną iniekcją kapsaicyny u wagotomizowanych (A) i następnie poddanych sekcji nerwów krtaniowych górnych, szczurów (B). *p<0.05 (analiza kontrastów); n=9.

U wszystkich szczurów wstępnie wagotomizowanych, a następnie poddanych przecięciu nerwów krtaniowych górnych nie zaobserwowano bezdechu po podaniu kapsaicyny. Średnie wydłużenie wydechu wyrażone współczynnikiem zahamowania oddychania ($T_{E\ Kapsaicyna}$ / $T_{E\ kontrola}$) wynoszące 5.02 ± 0.49 u szczurów poddanych wagotomii

http://rcin.org.pl

zostało zredukowane do 1.05 ± 0.03 po dokonaniu przecięcia nerwów krtaniowych górnych (Ryc. 9).



Ryc.9. Współczynnik zahamowania wydechu ($T_{E\ Kapsaicyna}$ / $T_{E\ kontrola}$) u zwierząt wagotomizowanych (A) i po przecięciu nerwów krtaniowych górnych (B). $p<0.001$ (test t-Studenta); n=9

Odpowiedź krążeniowa

Znamienny spadek średniego ciśnienia tętniczego występował podczas bezdechu u zwierząt wagotomizowanych i utrzymywał się do 30 s po podaniu kapsaicyny. Po przecięciu SLNs, także obserwowano hipotensję pojawiającą się bezpośrednio po iniekcji kapsaicyny, w fazie odpowiadającej bezdechowi przed deaferentacją krtani (Tabela 4).

Tabela 4. Zmiany średniego tętniczego ciśnienia krwi (MAP) wywołane dożylnym podaniem kapsaicyny.

	MAP (mmHg)			
		Kapsaicyna		
	0	bezdech	30 s	60 s
Zwierzęta wagotomizowane	94.1±6.2	80.5±5.0**	76.7±6.2**	88.5±6.8
Zwierzęta po przecięciu SLN	78.9±6.7$^{\#\#}$	68.3±6.05**$^{\#\#\#}$	77.4±6.38	76.9±5.7$^{\#}$

**p<0.01 w stosunku do wartości kontrolnej, $^{\#}$p<0.05, $^{\#\#}$p<0.01, $^{\#\#\#}$p<0.001 w porównaniu z odpowiednią wartością u zwierząt po wagotomii, (analiza kontrastów); n=9
Uwaga: po przecięciu SLNs „bezdech" określa fazę po podaniu kapsaicyny, a nie zjawisko bezdechu

http://rcin.org.pl

2. KWAS γ-AMINOMASŁOWY (GABA)

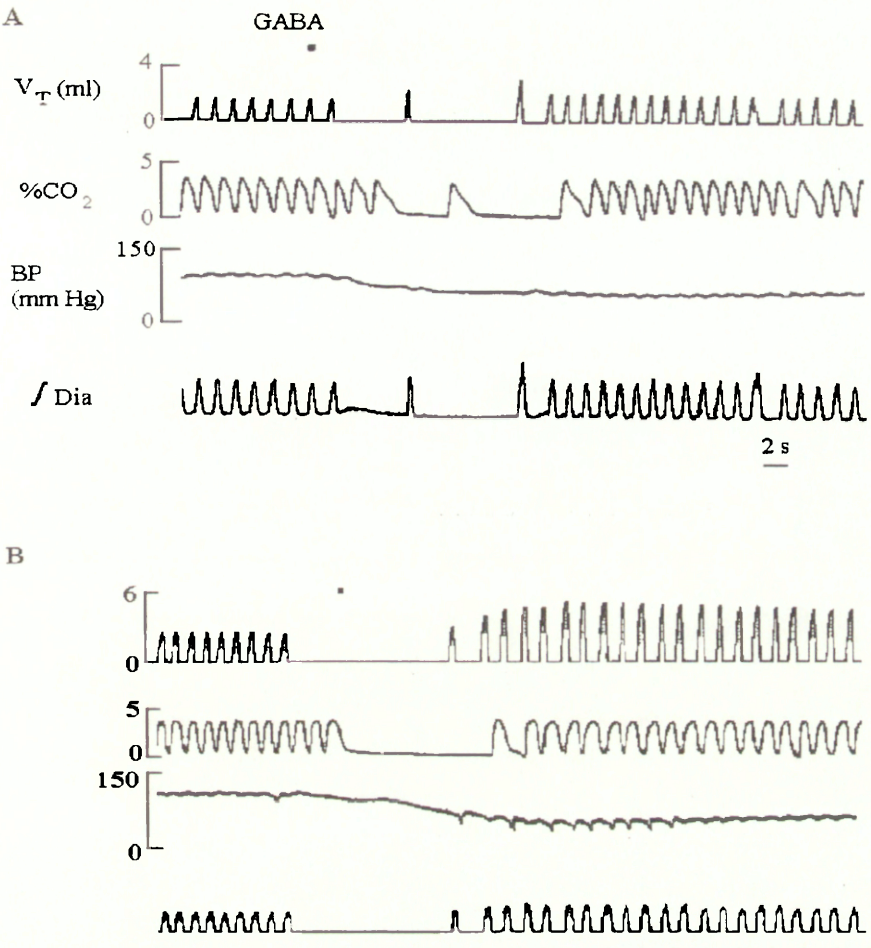
2.1. ZMIANY WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA KRWI PO DOTĘTNICZYM PODANIU GABA. ROLA NERWÓW BŁĘDNYCH

Bezdech i zmiany głównych parametrów oddechowych

Efekty oddechowe dotętniczej iniekcji GABA zbadano w grupie 12 nieuszkodzonych, a następnie poddanych obustronnej obustronnej wagotomii szczurów. Zastosowano dawkę 4 mg/kg, wybraną na podstawie badań wstępnych oraz danych z piśmiennictwa (Holzer i Hagmüller, 1979). Kontrolne podanie rozpuszczalnika w objętości od 0.2-0.3 ml nie powodowało zmian w oddychaniu.

Dotętnicza iniekcja GABA wywołała natychmiastowy efekt, w postaci bezdechu, zwiększonej objętości oddechowej we wznowionym oddychaniu oraz spadek ciśnienia krwi w obu stanach unerwienia (Ryc. 10).

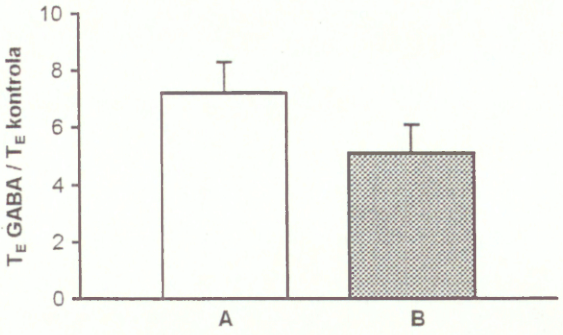
http://rcin.org.pl



Ryc.10. Wpływ dotętniczej iniekcji GABA na oddychanie i ciśnienie krwi u nieuszkodzonego (A) i następnie poddanego wagotomii szczura (B). V_T- objętość oddechowa, $\%CO_2$- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Bezdech po podaniu GABA wystąpił u wszystkich 12 zwierząt. Jego średnia długość wynosiła 5.5 ± 0.8 s u szczurów przed wagotomią oraz 3.9 ± 0.6 s po neurotomii, ($p>0.05$, test t-Studenta). Wydłużenie czasu wydechu, wyrażone współczynnikiem zahamowania oddychania $T_{E\ GABA}/T_{E\ kontrola}$, było statystycznie nierozróżnialne między obu stanami unerwienia (Ryc.11).

http://rcin.org.pl

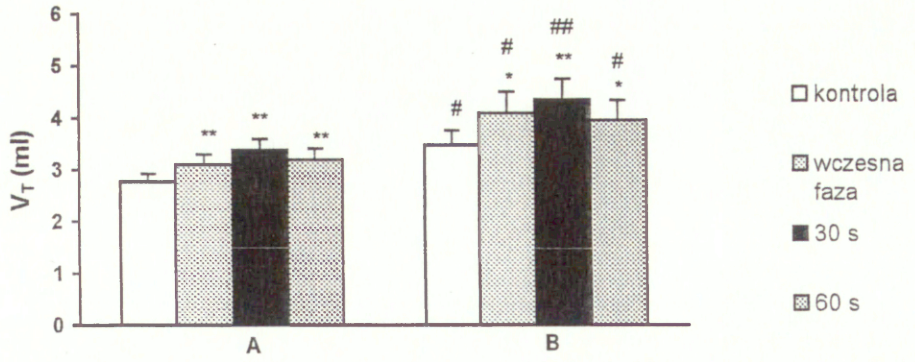


Ryc.11. Współczynnik zahamowania oddychania po podaniu GABA przed (A) i po (B) wagotomii. $p>0.05$ (test t-Studenta dla zmiennych zaleznych), n=12.

We wznowionym po bezdechu oddychaniu zarejestrowano przyrost objętości oddechowej trwający do 60 s od iniekcji GABA, zarówno przed jak i po wagotomii ($p<0.00001$, dwuczynnikowa ANOVA). Jej maksymalne zwiększenie zanotowano w 30 s po podaniu GABA (Ryc.12).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA ujawniła znamienny wpływ odnerwienia na objętość oddechową ($p<0.01$). Stwierdzono znamienne różnice między odpowiednimi wartościami objętości oddechowej w porównaniu do stanu przed odnerwieniem. Wyłączenie sprzężenia wagalnego z płuc powoduje zwiększenie objętości oddechowej (Sant'Ambrogio i Remmers, 1985), stąd wyższe jej wartości już w warunkach kontrolnych i w konsekwencji w czasie 60 s obserwacji u zwierząt wagotomizowanych.

http://rcin.org.pl



Ryc. 12. Średnie wartości objętości oddechowej po dotętniczej iniekcji GABA u nieuszkodzonych (A) i następnie poddanych sekcji nerwów błędnych szczurów (B). *p<0.05, **p<0.01 w stosunku do wartości kontrolnej, #p<0.05, ##p<0.01 w stosunku do odpowiedniej wartości przed wagotomią, (analiza kontrastów); n=12.

Wstrzyknięcie kwasu γ-aminomasłowego do tętnicy szyjnej wspólnej spowodowało spadek częstości oddychania we wczesnej fazie wznowionej wentylacji. Wynik znalazł się na granicy istotności statystycznej i dla zwierząt nieuszkodzonych wynosił: p=0.06 oraz p=0.07 dla zwierząt wagotomizowanych (analiza kontrastów, n=12), (Tabela 5).

Wentylacja minutowa wzrosła maksymalnie w 30 s po podaniu substancji w obu stanach unerwienia (Tabela 5).

Tabela 5. Zmiany w częstości oddychania (f) i wentylacji minutowej (V_E) po dotętniczej iniekcji GABA u nieuszkodzonych i wagotomizowanych szczurów.

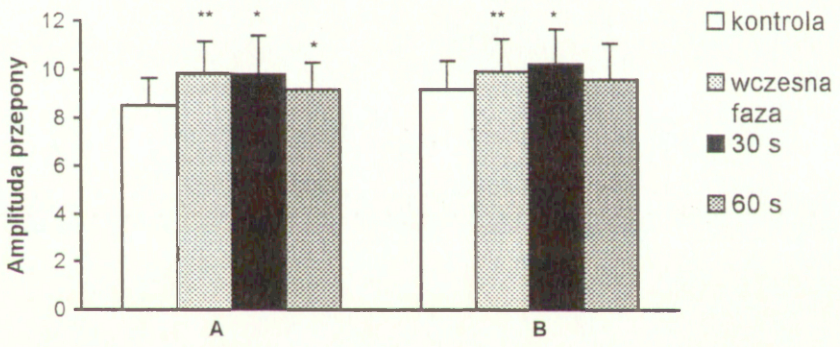
	f (min^{-1})				V_E($ml \cdot min.^{-1}$)			
		GABA				GABA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	58±3.2	53±3.2	62 ±3.9	58±3.6	158±9.7	171±14	197±12**	188±12**
Zwierzęta wagotomizowane	55±2.6	50±3.4	54±3.0	53±3.2	190±18	211±24	234±19*	201±14

**p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną (analiza kontrastów); n=12

http://rcin.org.pl

Wpływ iniekcji GABA na aktywność przepony

Podczas bezdechu wywołanego wstrzyknięciem GABA do tętnicy szyjnej wspólnej w zapisie elektromiogramu przepony pojawiła się cisza elektryczna (Ryc. 10). Od momentu wznowionego oddychania do 30 s po podaniu zanotowano znamienny wzrost szczytowej amplitudy emg zarówno u zwierząt nieuszkodzonych jak i po przecięciu nerwów błędnych. W czasie 60 s wysokość amplitudy ulegała zmniejszeniu, jej wartość była nadal wyższa od kontroli, zaś w przypadku zachowania wejścia wagalnego osiągnęła istotność statystyczną (Ryc.13).



Ryc. 13. Wpływ GABA na amplitudę zintegrowanej aktywności przepony u nieuszkodzonych (A), a następnie wagotomizowanych szczurów (B). **p<0.01, *p<0.05 w porównianiu do wartości kontrolnej (analiza kontrastów); n=8.

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Podany dotętniczo kwas γ-aminomasłowy inicjował spadek ciśnienia krwi w momencie pojawienia się bezdechu. Znamienne obniżenie utrzymywało się do 60 s od momentu iniekcji i obecne było w obu stanach unerwienia (Tabela 6).

http://rcin.org.pl

Tabela 6. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi (MAP) po dotętniczej iniekcji GABA u nieuszkodzonych i wagotomizowanych szczurów.

	MAP (mmHg)			
		GABA		
	0	bezdech	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	121±6.1	100±7.9***	96±7.6***	104±7.8**
Zwierzęta wagotomizowane	127±5.6	102±5.3***	105±6.4***	108±5.6**

***p<0.001, **p<0.01, w porównaniu z wartością kontrolną, (analiza kontrastów); n=12

2.2. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW $GABA_A$ NA PRZEBIEG ODDYCHANIA PO DOTĘTNICZEJ INIEKCJI KWASU γ-AMINOMASŁOWEGO

BIKUKULINA

Odpowiedź oddechowa

Do blokowania odpowiedzi oddechowej wywoływanej przez GABA wybrano bikukulinę, która jest kompetycyjnym agonistą receptora $GABA_A$ (McCrimmon i wsp., 1995). Bikukulinę w dawce 1 mg/kg podawano dożylnie wstępnie wagotomizowanym szczurom. Nie wywoływała ona istotnych zmian w oddychaniu. Odczekiwano jedną minutę i następnie wstrzykiwano GABA. W kontrolnym podaniu GABA u wszystkich badanych zwierząt zanotowano bezdech, a po nim znamienny wzrost objętości oddechowej trwający do 60 s.

Zastosowanie antagonisty zapobiegło pojawieniu się bezdechu oraz zwiększeniu objętości oddechowej (Tabela 7). Zwiększenie współczynnika zahamowania oddychania wywołane przez GABA zostało zredukowane z wartości 5.8 ± 0.8 do 1.06 ± 0.06 po uprzednim użyciu bikukuliny ($p<0.01$, test t-Studenta dla prób zależnych, n=7).

http://rcin.org.pl

Tabela 7. Wpływ blokady bikukuliną na zmiany objętości oddechowej wywołane dotętniczą iniekcją GABA.

	V_T (ml)			
		GABA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Kontrola	3.48 ± 0.5	4.58 ± 0.5**	4.48 ± 0.3**	4.08 ± 0.4**
Bikukulina	3.85 ± 0.1	3.83 ± 0.4	4.01 ± 0.2	3.9 ± 0.2

**p<0.001, w porównaniu z wartością kontrolną, (analiza kontrastów); n=6

Odpowiedź ciśnienia krwi

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła znamienny wpływ zastosowania bikukuliny na zmiany ciśnienia krwi wywołane przez GABA (p<0.05). Przed podaniem antagonisty dotętnicza iniekcja GABA wywoływała istotny statystycznie spadek ciśnienia, pojawiający się w czasie bezdechu i utrzymujący się do 1 minuty. Po uprzednim zastosowaniu blokera obniżenie ciśnienia krwi powodowane działaniem GABA ulegało istotnej redukcji w fazie odpowiadającej bezdechowi w kontrolnym podaniu substancji (Tabela 8).

Tabela 8. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi (MAP) wywołane dotętniczą iniekcją GABA przed i po zastosowaniu bikukuliny.

	MAP (mmHg)			
		GABA		
	0	bezdech	30 s	60 s
Kontrola	107±5.6	80±3.4**	72±3.6***	72±4.3***
Bikukulina	101±6.5	99±6.9##	96±7.9##	97±7.5##

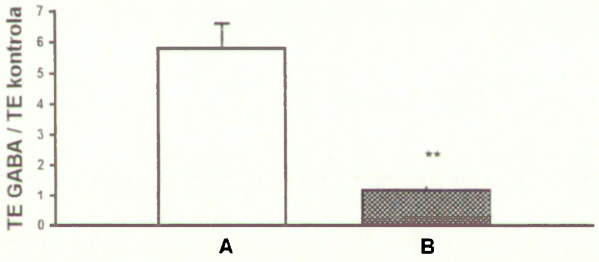
***p<0.001, **p<0.01, w porównaniu z wartością kontrolną, ## p<0.01 w stosunku do odpowiedniej wartości przed zastosowaniem bikukuliny (analiza kontrastów); n=9

http://rcin.org.pl

Odpowiedź oddechowa

Następnym użytym w pracy blokerem była pikrotoksyna, niekompetycyjny antagonista, który wiąże się z chlorkowym kanałem receptora $GABA_A$ i działa jak jego inhibitor (Watanabe i wsp., 2002). Pikrotoksyna podana w dawce stosowanej w tej pracy (0.5 mg/kg) nie wpływała istotnie na oddychanie.

Kontrolne wstrzyknięcie GABA skutkowało zatrzymaniem oddychania u wszystkich szczurów. Blokada wywołana dożylnym podaniem pikrotoksyny znosiła bezdech, co obrazuje istotnie zredukowany współczynnik zahamowania oddychania po zastosowaniu antagonisty (Ryc. 14).



Ryc. 14. Współczynnik zahamowania oddychania przed (A) i po (B) blokadzie pikrotoksyną receptorów $GABA_A$, **$p<0.01$, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=7

Opisany na początku rozdziału znamienny wzrost objętości oddychania wywołany dotętniczym kwasem γ-aminomasłowym pojawił się i tym razem w grupie zwierząt kontrolnych. Zablokowanie receptorów $GABA_A$ pikrotoksyną istotnie zahamowało wzrost zmiennej, a we wczesnej fazie po iniekcji GABA zarejestrowano nawet znamienne statystycznie jej obniżenie (Tabela 9).

http://rcin.org.pl

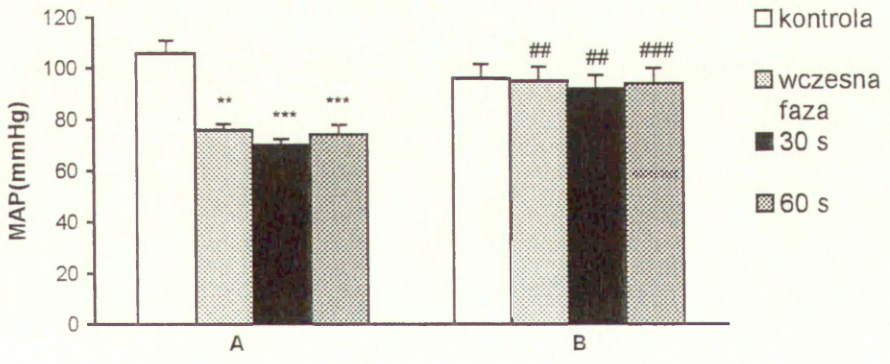
Tabela 9. Wpływ blokady pikrotoksyną na zmiany objętości oddechowej wywołane dotętniczą iniekcją GABA.

	V_T (ml)			
		GABA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Kontrola	3.75 ± 0.3	4.56 ± 0.5**	4.65 ± 0.3***	4.35 ± 0.3*
Pikrotoksyna	3.96 ± 0.2	3.78 ± 0.4*##	4.15 ± 0.3#	4.08 ± 0.3

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną, ## p<0.01, # p<0.05 w stosunku do odpowiedniej wartości przed blokadą, (test Duncana); n=6

Odpowiedź ciśnienia krwi

Podobnie jak w przypadku blokady bikukuliną, pikrotoksyna zahamowała spadek ciśnienia krwi spowodowany przez GABA (efekt podania blokera-$p<0.05$, dwuczynnikowa ANOVA). Wartość wyjściowa zmiennej wynosząca 105 ± 4.8 została obniżona maksymalnie do 70 ± 2.4 mmHg w 30 s po kontrolnym podaniu GABA ($p<0.01$, analiza kontrastów, n=9). Natomiast po zastosowaniu pikrotoksyny nie zanotowano znamiennej różnicy między wartością wyjściową ciśnienia: 96 ± 5.7 a tą osiągniętą w czasie 30 s wynoszącą 92 ± 5.2 mmHg ($p=0.13$, analiza kontrastów, n=9), (Ryc. 15).



Ryc. 15. Zmiany ciśnienia krwi (MAP)wywołane przez GABA przed (A) i po (B) blokadzie pikrotoksyną receptorów $GABA_A$, ***p<0.001,**p<0.01 w stosunku do kontroli, ### p<0.001, ## p<0.01 w stosunku do odpowiedniej wartości przed użyciem blokera, (analiza kontrastów); n=9.

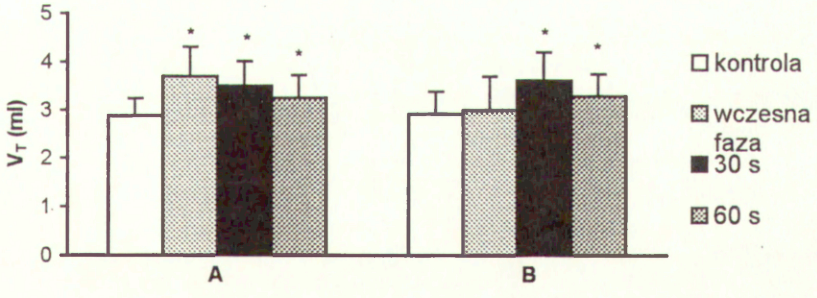
http://rcin.org.pl

2.3. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW $GABA_B$ PRZY UŻYCIU CGP 35348 NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWO-KRĄŻENIOWĄ WYWOŁANĄ PRZEZ GABA

Odpowiedź oddechowa

Receptory $GABA_B$ blokowano stosując CGP 35348 (kwas 3-aminopropylo-dietoksymetylo-fosfinowy). Został on uznany za najbardziej skuteczny bloker receptorów $GABA_B$, który w dawce stosowanej w pracy (30 mg/kg) nie oddziałuje na receptory $GABA_A$ (Olpe i wsp., 1990).

Podanie antagonisty nie zapobiegło bezdechowi po wstrzyknięciu GABA. Średnia długość bezdechu w podaniu kontrolnym GABA wyniosła 6.42 ± 0.7 s natomiast po zastosowaniu CGP 35348 wynosiła 5.48 ± 1.7 ($p=0.6$, test t-Studenta dla prób powiązanych, $n=8$). Antagonista nie wyeliminował również zwiększenia objętości oddechowej zaindukowanego przez podany dotętniczo kwas γ-aminomasłowy ($p<0.01$, dwuczynnikowa ANOVA, $n=8$), (Ryc. 16).



Ryc. 16. Wartości objętości oddechowej po iniekcji GABA przed (A) i po zastosowaniu CGP35348 (B). *$p<0.05$ w stosunku do wartości kontrolnej (analiza kontrastów), $n=8$.

Zmiany ciśnienia krwi

Znamienny spadek ciśnienia krwi wywołany przez GABA utrzymywał się nadal mimo zablokowania receptorów $GABA_B$ przez CGP 35348. W przypadku podania kontrolnego GABA, pojawiające się w czasie bezdechu obniżenie ciśnienia utrzymywało się

http://rcin.org.pl

do 60 s. Natomiast po podaniu antagonisty w 60 s po wstrzyknięciu GABA następował powrót ciśnienia do wartości wyjściowej (Tabela 10).

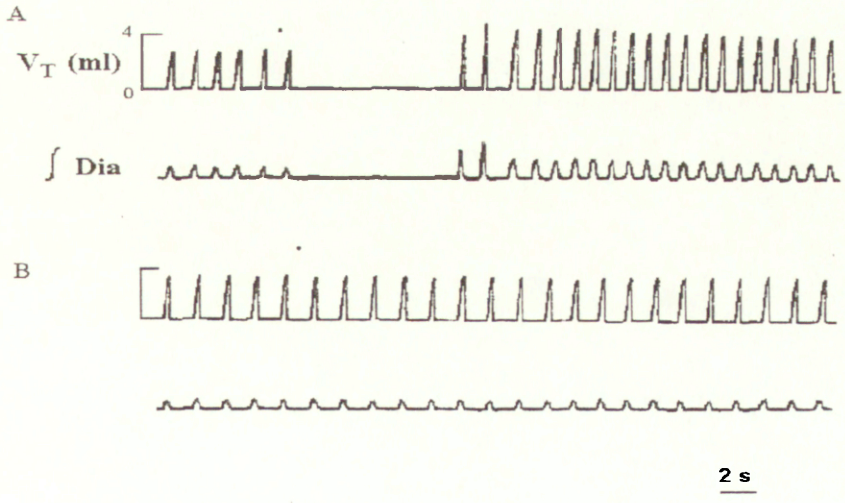
Tabela 10. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi (MAP) po dotętniczej iniekcji GABA przed i po użyciu CGP 35348

	MAP (mmHg)			
		GABA		
	0	bezdech	30 s	60 s
Kontrola	106±8.5	66±4.9**	67±5.8***	70±6.1***
CGP 35348	102±10	69±6.2**	75±4.8*	92±5.9

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną, (analiza kontrastów); n=8

2.4. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH (CSNs) NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ ORAZ ZMIANY CIŚNIENIA KRWI WYWOŁANE DOTĘTNICZYM PODANIEM GABA

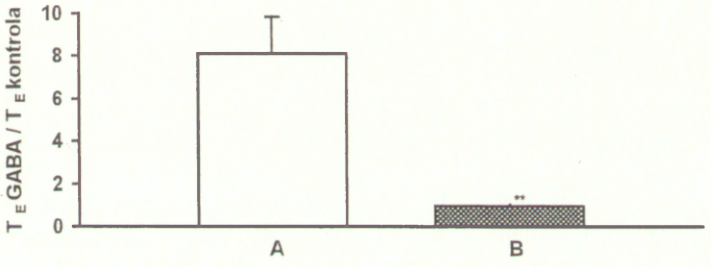
Przebieg ***oddychania: bezdech, główne parametry oddechowe, oraz amplituda*** *zintegrowanego* ***elektromiogramu przepony***



Ryc. 17. Przebieg oddychania w wyniku podania GABA do tętnicy szyjnej wspólnej u szczura po wagotomii (A) i następnie po przecięciu nerwów zatokowych (B). V_T- objętość oddechowa, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

http://rcin.org.pl

Rycina 17 przedstawia typową odpowiedź oddechową na iniekcję GABA do tętnicy szyjnej wspólnej u szczura po wagotomii i następowym przecięciu nerwów zatokowych. Bezdech o średniej długości 7.1 ± 1.3 s wystąpił u wszystkich kontrolnych, wstępnie wagotomizowanych zwierząt. Obustronne przecięcie nerwów zatokowych znosiło zatrzymanie oddychania, co znajduje potwierdzenie w znamiennej różnicy między współczynnikiem zahamowania oddychania u zwierząt przed i po odnerwieniu. Przedłużenie wydechu wyrażone przez $T_{E\ GABA}/ T_{E\ kontrola}$ zostało zredukowane z wartości kontrolnej 8.11 ± 1.7 do 0.97 ± 0.7 w wyniku odnerwienia ($p<0.01$), (Ryc.18).



Ryc. 18. Współczynnik zahamowania oddychania przed (A) i po (B) odnerwieniu ciałek szyjnych. **p<0.01, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=7

Wstrzyknięcie GABA przed wyłączeniem nerwów zatokowych wpłynęło znamiennie na objętość oddechową (ANOVA, p=0.02). Jak ilustruje tabela 10 objętość oddechowa wzrosła w sposób istotny tuż po bezdechu i w 30 s od iniekcji. Zwiększenie objętości obecne było także w czasie 60 s, choć efekt był tylko bliski statystycznej istotności (p=0.058, analiza kontrastów). Odnerwienie ciałek szyjnych znosiło odpowiedź objętości oddechowej na dotętnicze podanie GABA (Tabela 11). Nie zanotowano wpływu iniekcji GABA na zmiany częstości oddychania w obu stanach odnerwienia (ANOVA, p=0.13, n=7).

Zaobserwowano znamienny efekt podania GABA (ANOVA, p=0.034) oraz odnerwienia (ANOVA, p=0.047) na amplitudę zintegrowanego elektromiogramu przepony. Zwiększenie amplitudy pojawiło się we wczesnej fazie wznowionego oddychania i

http://rcin.org.pl

utrzymywało się do 60 s u zwierząt wagotomizowanych. Nie obserwowano tej odpowiedzi u szczurów poddanych przecięciu nerwów zatokowych. Wpływ odnerwienia na efekty GABA ilustrują znamienne różnice między odpowiednimi fazami działania substancji w grupie zwierząt przed i po wyłączeniu nerwów zatokowych (Tabela 11)

Tabela 11. Objętość oddechowa (V_T) i amplituda zintegrowanej aktywności przepony ∫ Dia po podaniu GABA przed i w następstwie odnerwienia ciałek szyjnych.

	V_T (ml)				**∫ Dia**			
		GABA				GABA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta po wagotomii	1.97±0.2	2.50±0.3*	2.55±0.3**	2.30±0.2	7.75±0.9	9.32±0.7**	9.0±1.0*	8.4±0.9
Po przecięciu CSNs	2.25±0.3	2.41±0.3	2.38±0.3	2.28±0.3	6.64±1.0	7.04±0.9$^{\#\#}$	6.95±0.9$^{\#\#}$	6.78±1.0$^{\#}$

**p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną (analiza kontrastów dla zmiennej V_T, test Duncana dla ∫ Dia), $^{\#\#}$p<0.001, $^{\#}$p<0.01 w porównaniu z odpowiednimi wartościami przed chemodenerwacją (test Duncana); n=7.

Wpływ odnerwienia kłębków szyjnych na zmiany ciśnienia krwi indukowane przez GABA

Spowodowany dotętniczą iniekcją GABA spadek ciśnienia, obecny od momentu bezdechu do 60 s pojawił się zarówno u zwierząt wagotomizowanych, jak i po przecięciu nerwów zatokowych. W 30 s po podaniu substancji zanotowano maksymalne jego obniżenie z wartości 92 ± 7.2 do 67 ± 6.6 mmHg (p<0.001, analiza kontrastów, n=7) u zwierząt po wagotomii oraz z 88 ± 10 do 74 ± 8.9 mmHg (p<0.01) po odnerwieniu ciałek szyjnych.

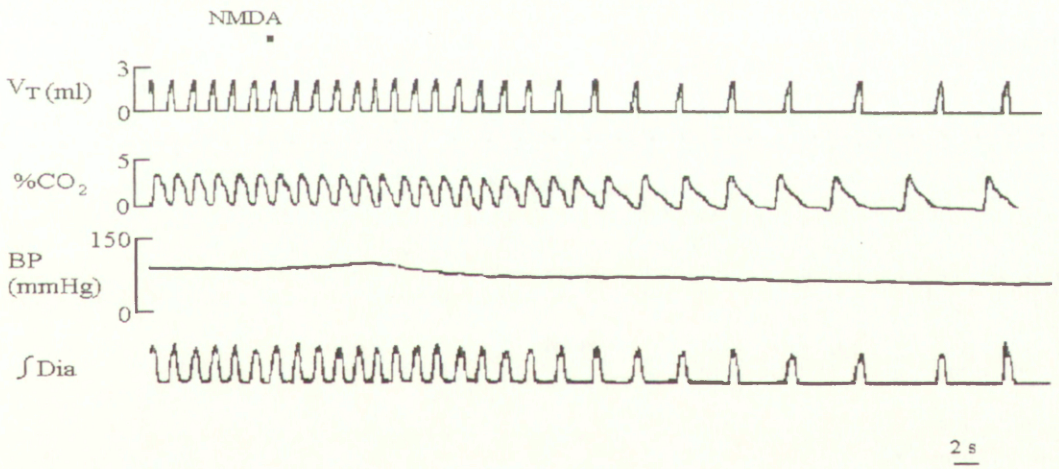
http://rcin.org.pl

3. KWAS N-METYLO-D-ASPARAGINOWY (NMDA)

3.1.A. ANALIZA ZMIAN WZORCA ODDECHOWEGO I CIŚNIENIA TĘTNICZEGO KRWI WYWOŁANYCH DOŻYLNYM PODANIEM NMDA. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII ŚRÓDSZYJNEJ NA WZORZEC ODDECHOWY ORAZ ZMIANY CIŚNIENIA

***Odpowiedź oddechowa** na NMDA. Zmiany głównych parametrów oddechowych*

Podanie NMDA do żyły udowej u 10 nieuszkodzonych i następnie wagotomizowanych zwierząt zainicjowało krótkotrwałą depresję wentylacji, na którą składały się spadek objętości oddechowej oraz zwolnienie rytmu oddechowego (Gong i wsp., 1990). Nie stwierdzono wpływu odcięcia wejścia wagalnego z płuc na zmiany wzorca oddechowego, wywołanego przez NMDA. Rycina 19 prezentuje typową odpowiedź oddechową na dożylną iniekcję NMDA u nieuszkodzonego szczura.



Ryc. 19. Wpływ dożylnej iniekcji GABA na oddychanie i ciśnienie krwi u nieuszkodzonego szczura. V_T- objętość oddechowa, %CO_2- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła znamienny wpływ wstrzyknięcia NMDA na objętość oddechową ($p<0.00001$, $n=10$). Zarówno przed jak i po przecięciu nerwów błędnych, obniżenie objętości oddechowej pojawiło się bezpośrednio po iniekcji NMDA, osiągając najniższą wartość w czasie 30 s. W 60 s od momentu podania nastąpił powrót do kontroli (Tabela 12).

http://rcin.org.pl

Tabela 12. Zmiany w objętości oddechowej (V_T) i częstości oddychania (f) po dożylnej iniekcji NMDA

	V_T(ml)				f (min^{-1})			
		NMDA				NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	1.77±0.2	1.67±0.2*	1.47±0.2***	1.7±0.2	56 ± 2	55 ± 3	35±3***	49±3*
Zwierzęta po wagotomii	2.04±0.2	1.92±0.3***	1.62±0.3**	1.92±0.2	53 ± 2	53 ± 2	37±4**	43±3*

*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001 w stosunku do odpowiedniej wartości kontrolnej, (analiza kontrastów), n=10

Analiza wariancji wykazała istotny wpływ iniekcji NMDA na częstość oddychania (ANOVA, p<0.00001). Zwolnienie oddychania było opóźnione w stosunku do zahamowania objętości oddechowej. Wystąpiło w 30 s po iniekcji, osiągając w tym czasie, podobnie jak objętość, maksymalny spadek i utrzymywało się do 60 s w obu stanach unerwienia (Tabela 12).

Współczynnik zahamowania oddychania: $T_{E\ NMDA}/T_{E\ kontrola}$, którego średnia wartość u zwierząt nieuszkodzonych wynosiła 1.62 ± 0.25, nie różnił się znamiennie od średniej wartości uzyskanej po wagotomii: 1.55 ± 0.24 (p=0.82, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=10), co było uzupełniającym potwierdzeniem obserwowanej odpowiedzi.

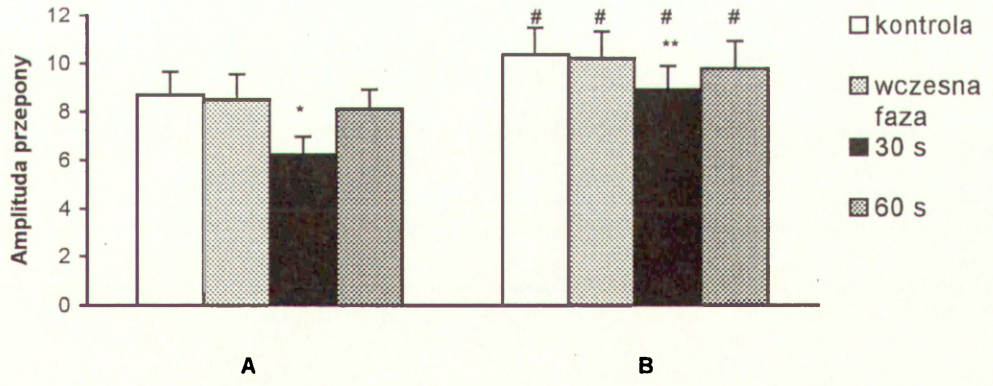
Obniżenie wentylacji minutowej obecne było bezpośrednio po wstrzyknięciu NMDA i utrzymywało się do 60 s zarówno u zwierząt nieuszkodzonych jak i po przeprowadzeniu wagotomii szyjnej (ANOVA, p<0.000001). Maksymalny, prawie dwukrotny znamienny spadek wentylacji minutowej osiągnął wartość 54±10 $ml \cdot min^{-1}$ (p<0.0001) u nieuszkodzonych, i 62 ± 10 $ml \cdot min^{-1}$ (p<0.001) u wagotomizowanych szczurów w porównaniu do wartości kontrolnych: 101 ± 11 oraz 111 ± 15 $ml \cdot min^{-1}$, odpowiednio.

http://rcin.org.pl

***Zmiany** aktywności przepony*

W wyniku dożylnej iniekcji NMDA amplituda zintegrowanej aktywności przepony wykazywała tendencję malejącą, zarówno przed jak i po przecięciu nerwów błędnych. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ odnerwienia na amplitudę zapisu emg ($p<0.05$), (Ryc. 20). Znamienny spadek nastąpił w 30 s w obu stadiach doświadczalnych i wynosił: 6.3 ± 0.74 w porównaniu z kontrolą 8.7 ± 1.0 u szczurów nieuszkodzonych, i 9.0 ± 0.9 w porównaniu do kontroli: 10.4 ± 1.1 u zwierząt poddanych wagotomii.

Szczytowe wartości amplitudy u zwierząt wagotomizowanych były znamiennie wyższe w stosunku do wartości przed otwarciem wejścia wagalnego.



Ryc. 20. Średnie wartości amplitudy emg przepony w wyniku dożylnej iniekcji NMDA przed (A) i po przecięciu nerwów błędnych (B). **$p<0.01$, *$p<0.05$ w stosunku do kontroli, #$p<0.05$ w stosunku do odpowiedniej wartości przed wagotomią, (analiza kontrastów), n=10.

http://rcin.org.pl

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Odpowiedzi oddechowej wywołanej przez NMDA towarzyszyły zmiany w ciśnieniu tętniczym krwi, charakteryzujące się istotnym statystycznie, raptownym i krótkotrwałym wzrostem, bezpośrednio po iniekcji. Efekt ten obserwowano u zwierząt przed i po odnerwieniu (Tabela 13). Po fazie podwyższonego ciśnienia nastąpił jego spadek utrzymujący się do 60 s od iniekcji, znamienny jedynie u szczurów poddanych wagotomii.

Tabela 13. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi po dożylnej iniekcji NMDA u zwierząt nieuszkodzonych i następnie po przecięciu nerwów błędnych

	MAP (mmHg)			
		NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	87± 5.1	112± 6.5***	81 ± 9.4	73 ± 7.5
Zwierzęta wagotomizowane	86 ± 7.7	100 ± 9.2*	67 ± 7.8*	65 ± 7.8*

***p<0.001, *p<0.05 w porównaniu z kontrolą, (analiza kontrastów), n=10.

3.2.A. PRZEBIEG ODDYCHANIA PO DOŻYLNYM PODANIU NMDA NA TLE BLOKADY RECEPTORÓW NMDA Z UŻYCIEM AP-7

Odpowiedź oddechowa

W celu oceny, czy odpowiedź oddechowo-krążeniowa inicjowana przez N-metylo-D-asparaginian zachodzi w wyniku pobudzenia receptorów NMDA, zastosowano ich selektywnego antagonistę: AP-7 (kwas DL-2-amino-7-fosfonoheptanowy).

Dane dotyczące skuteczności blokady zostały przedstawione w Tabeli 14. Jak można zauważyć, zastosowanie antagonisty AP-7 w dawce 200 μg/kg dożylnie zapobiegało zmianom w oddychaniu indukowanym przez NMDA. Nie zanotowano istotnego

http://rcin.org.pl

zmniejszenia częstości oddychania, ani spadku objętości oddechowej w wyniku iniekcji dożylnej NMDA. Ap-7 również znamiennie zredukował przedłużenie wydechu, wyrażone współczynnikiem $T_{E\ NMDA}/T_{E\ kontrola}$ z wartości kontrolnej: 1.81 ± 0.14 do 1.08 ± 0.03 ($p<0.01$, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=5) w wyniku iniekcji NMDA, poprzedzonej wstrzyknięciem antagonisty.

Tabela 14. Zmiany w objętości oddechowej (V_T) i częstości oddychania (f) po dożylnej iniekcji NMDA przed i po zastosowaniu AP-7.

	V_T(ml)			f (min^{-1})		
		NMDA			NMDA	
	0	Wczesna faza	30 s	0	30 s	60 s
Kontrola	2.74± 0.2	2.46± 0.1**	2.40 ± 0.2*	55 ± 1.6	34 ± 2.3**	50 ± 1.0*
AP-7	3.32 ±0.2	3.30 ±0.3$^{\#}$	3.30 ± 0.3$^{\#}$	59 ± 1.0	56 ± 1.0$^{\#\#\#}$	58 ± 1.0$^{\#\#}$

* $p<0.05$, **$p<0.01$, w stosunku do wartości kontrolnej; $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$, w odniesieniu do odpowiedniej wartości przed użyciem blokera (analiza kontrastów), n=5

Zachowanie się ciśnienia krwi

Uprzednie podanie blokera nie wyeliminowało zmian w ciśnieniu tętniczym krwi powodowanych przez dożylny NMDA. Ciśnienie wzrosło bezpośrednio po podaniu, w grupie kontrolnej z wartości wyjściowej 84 ± 4.6 do 124 ± 5.3 mmHg ($p<0.01$, analiza kontrastów, n=5) oraz z wartości 95 ± 15.1 do 117 ± 13.2 mmHg ($p<0.05$) po zastosowaniu AP-7. Po fazie wzrostu ciśnienia obserwowano w obu grupach zwierząt niewielki, nieznamienny jego spadek w porównaniu z wartościami wyjściowymi.

http://rcin.org.pl

3.3.A. WPŁYW WAGOTOMII NADGUZKOWEJ NA ZMIANY W ODDYCHANIU I CIŚNIENIU KRWI WYWOŁANE DOŻYLNĄ INIEKCJĄ NMDA

Odpowiedź oddechowa: główne parametry oddechowe, współczynnik zahamowania oddychania

Aby określić czy zwoje guzkowe pośredniczą w efektach oddechowych NMDA, substancję podano dożylnie 9 wstępnie śródszyjnie wagotomizowanym szczurom (kontrola) i następnie poddanym wagotomii nadguzkowej.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła znamienny wpływ iniekcji NMDA na objętość oddechową ($p=0.001$). Znamienny spadek w V_T obserwowano od zakończenia podania do 30 s po iniekcji w grupie kontrolnej. Po wagotomii nadguzkowej obniżenie objętości ograniczyło się tylko do 30 s po podaniu (Tabela 16).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła znamienny wpływ podania NMDA ($p<0.0001$) oraz interakcję między podaniem i stanem odnerwienia na częstość oddychania ($p<0.05$). Zwolnienie rytmu oddechowego było ograniczone do 30 s po iniekcji u szczurów wagotomizowanych śródszyjnie. Po dodatkowej wagotomii nadguzkowej zwolnienie obecne w czasie 30 s było znacznie zredukowane, i pozostawało na obniżonym poziomie do 60 s po podaniu (Tabela 16).

Objętość minutowa wykazywała znamienne obniżenie w obu stanach odnerwienia ($p<0.000001$, ANOVA). Maksymalny spadek zaobserwowano w 30 s po podaniu NMDA.

U szczurów po wagotomii śródszyjnej V_E obniżyła się z wartości 141 ± 9 do 83 ± 16 $ml \cdot min^{-1}$ ($p<0.001$), a po wagotomii nadguzkowej ze 182 ± 18 to 125 ± 17 $ml \cdot min^{-1}$ ($p<0.01$).

Wagotomia nadguzkowa znamiennie zredukowała współczynnik zahamowania wydechu, który wynosił 2.02 ± 0.23 przed i 1.46 ± 0.16 po odnerwieniu ($p<0.01$, test t-Studenta dla prób powiązanych, $n=9$).

http://rcin.org.pl

Tabela 16. Zmiany w objętości oddechowej (V_T) i częstości oddychania (f) po dożylnej iniekcji NMDA u szczurów po wagotomii śródszyjnej (A) i nadguzkowej (B).

	V_T(ml)			f (min^{-1})		
		NMDA			NMDA	
	0	Wczesna faza	30 s	0	30 s	60 s
A	2.56±0.1	2.41±0.07**	2.26±0.14*	54±2.14	33±3.51***	49 ± 2.0
B	3.14±0.24	3.01±0.27	2.76±0.26*	57±2.2	44±2.6**#	51 ± 1.3**

* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 w stosunku do odpowiedniej wartości kontrolnej, #p<0.05 w stosunku do odpowiedniej wartości przed wagotomią nadguzkową (analiza kontrastów), n=10

Odpowiedź ciśnienia krwi

Podanie NMDA spowodowało dwufazową odpowiedź ciśnienia krwi w obu stanach unerwienia. Natychmiastowy wzrost ciśnienia przeszedł w hipotensję, obecną w czasie 30s po iniekcji, a w 60 s powrócił niemalże do wartości wyjściowych (Tabela 17).

Tabela 17. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi po dożylnej iniekcji NMDA u zwierząt wagotomizowanych śródszyjnie (A) i po wagotomii nadguzkowej (B).

	MAP (mmHg)			
		NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s
A	89 ± 4.5	120 ± 4.4***	72 ± 6.5*	81 ± 6.3
B	84 ± 5.9	113 ± 7.1***	61 ±3.3***	74 ± 3.5

* p<0.05, ***p<0.001 w porównaniu z wartością wyjściową, (analiza kontrastów), n=10

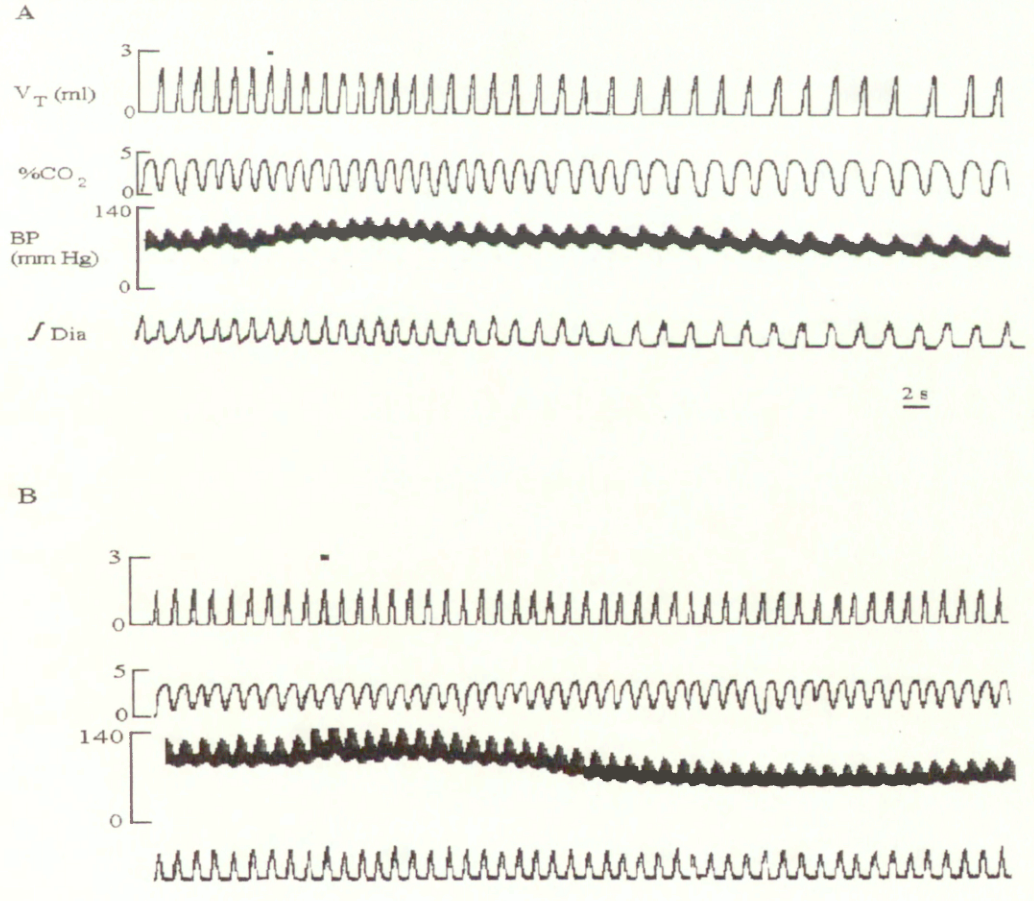
http://rcin.org.pl

3.4.A. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH NA ODPOWIEDŹ ODDECHOWĄ I CIŚNIENIE KRWI PO PODANIU NMDA DO ŻYŁY UDOWEJ

Odpowiedź oddechowa: główne parametry oddechowe, współczynnik zahamowania oddychania

W związku z tym, że wagotomia nie wpłynęła istotnie na wzorzec oddechowy indukowany przez NMDA, w tej części eksperymentalnej użyto szczurów wstępnie poddanych obustronnemu przecięciu nerwów błędnych. Szczury te otrzymywały dwa podania NMDA, po wagotomii i następnie po przecięciu nerwów zatokowych.

Rycina 21 ilustruje typową odpowiedź na dożylne podanie NMDA u wagotomizowanego szczura, następnie poddanego sekcji nerwów zatokowych.



Ryc. 21. Wpływ dożylnej iniekcji NMDA na oddychanie i ciśnienie krwi u wagotomizowanego (A) i następnie poddanego chemodenerwacji szczura (B). V_T- objętość oddechowa, $\%CO_2$- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

http://rcin.org.pl

Zgodnie z wynikami opisanymi w p.3.1.A., poddane wstępnej wagotomii szczury odpowiedziały na wstrzyknięcie NMDA obniżeniem objętości oddechowej (ANOVA, p = 0.0018, n=6) i zwolnieniem rytmu oddechowego (ANOVA, p = 0.000002, n=6). Depresja oddychania wyrażona została również spadkiem wentylacji minutowej w 30 i 60 s od podania (ANOVA, p = 0.000009). Tabela 18 ilustruje zmiany parametrów wentylacyjnych wywołanych przez NMDA u szczurów po przecięciu nerwów błędnych, a następnie po wyłączeniu unerwienia kłębków szyjnych.

Tabela 18. Zmiany w objętości oddechowej (V_T), częstości oddychania (f) i wentylacji minutowej (V_E) po dożylnej iniekcji NMDA u zwierząt po wagotomii (**A**) i po przecięciu CSNs (**B**).

	V_T(ml)			f (min^{-1})			V_E(mlxmin^{-1})		
		NMDA			NMDA			NMDA	
	0	Wczesna faza	30 s	0	30 s	60 s	0	30 s	60 s
A	2.98±0.4	2.63±0.3*	2.65±0.4**	56±2.6	27±2.0***	43±3.6**	173±24	74±10**	128±19
B	3.36±0.4	3.2 ±0.4	3.11±0.3	53±2.4	51±2.8$^{\#}$	52±3.3	177±17	158±16$^{\#}$	172±20

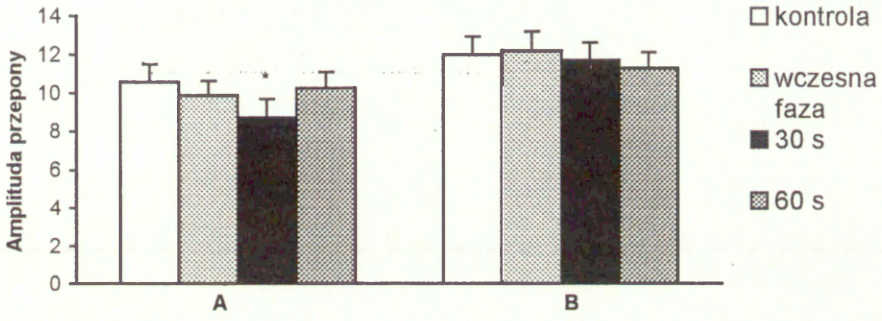
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, w stosunku do kontroli; $^{\#}$p<0.05, w stosunku do odpowiedniej wartości przed przecięciem nerwów zatokowych (analiza kontrastów), n=6

Przecięcie nerwów zatokowych wyeliminowało zahamowanie oddychania obserwowane po podaniu NMDA u szczurów wstępnie wagotomizowanych. W drugim etapie odnerwienia nie zanotowano spadku objętości oddechowej, a także zwolnienia rytmu oddechowego.

Chemodenerwacja znosiła średnie przedłużenie wydechu (T_E) z wartości 5.07 ± 2.6 u zwierząt z przerwaną aferentacją wagalną do 1.04 ± 0.03 po odnerwieniu ciałek szyjnych (p<0.05, test Wilcoxona, n=6).

http://rcin.org.pl

Dożylna iniekcja NMDA spowodowała spadek amplitudy emg przepony u zwierząt po obustronnej wagotomii szyjnej (Ryc. 22). Statystycznie istotne i zarazem maksymalne obniżenie zmiennej pojawiło się w 30 s od podania substancji. W rezultacie odnerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych podanie NMDA nie spowodowało znamiennych efektów w amplitudzie emg.



Ryc. 22. Średnie wartości szczytowej amplitudy przepony w wyniku dożylnej iniekcji NMDA przed (A)i po przecięciu nerwów zatokowych (B). *p<0.05 w stosunku do kontroli, (analiza kontrastów), n=6.

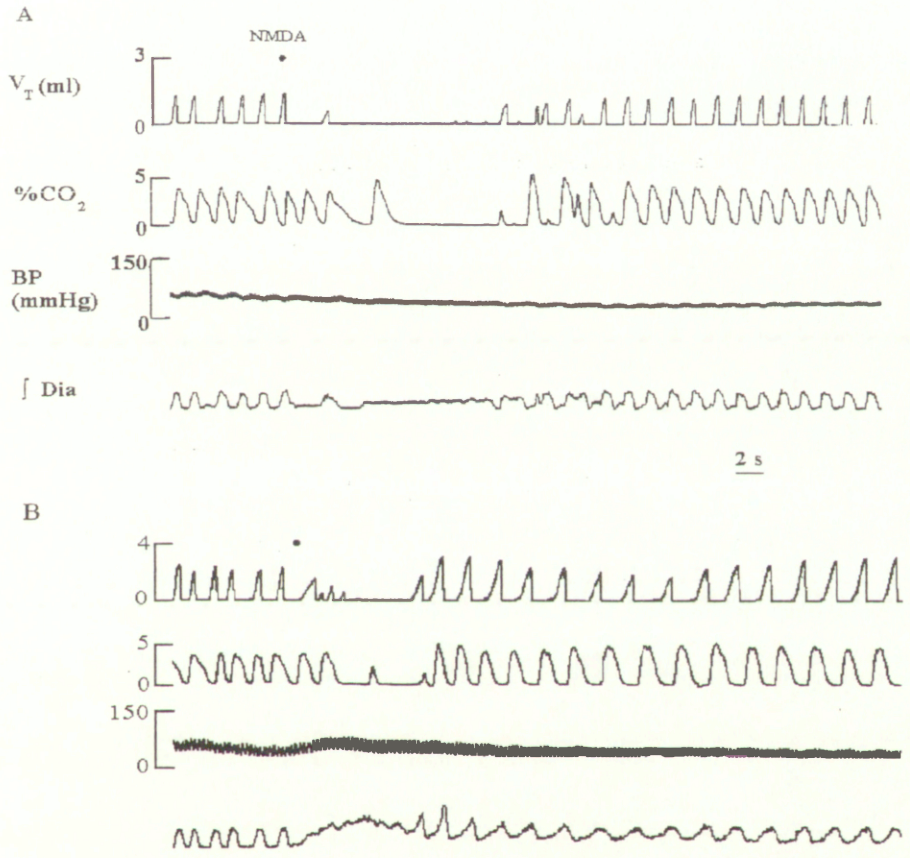
Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Efektom oddechowym NMDA towarzyszyło obecne tuż po podaniu podwyższenie średniego ciśnienia tętniczego krwi w obu stanach unerwienia. U szczurów po wagotomii ciśnienie wzrosło z wyjściowej wartości 78 ± 3.1 do 117 ± 6.7 ($p<0.01$), a po wyłączeniu CSNs z poziomu kontroli 95 ± 8.0 do 121 ± 9.7 mmHg ($p<0.01$). Następnie średnie ciśnienie tętnicze krwi nieznacznie się obniżało w porównaniu ze stanem wyjściowym w 30 i 60 s po iniekcji. Zmiany te nie były istotne statystycznie.

http://rcin.org.pl

3.I.B. ODPOWIEDŹ ODDECHOWO-KRĄŻENIOWA WYWOŁANA PODANIEM NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII SRÓDSZYJNEJ NA ZACHOWANIE SIĘ I KSZTAŁT WZORCA ODDECHOWEGO ORAZ CIŚNIENIE KRWI PO INIEKCJI NMDA

Odpowiedź oddechowa: bezdech i zmiany głównych parametrów oddechowych



Ryc. 23. Wpływ dotętniczej iniekcji NMDA na oddychanie i ciśnienie krwi u nieuszkodzonego (A) i następnie poddanego wagotomii szczura (B). V_T- objętość oddechowa, %CO_2- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

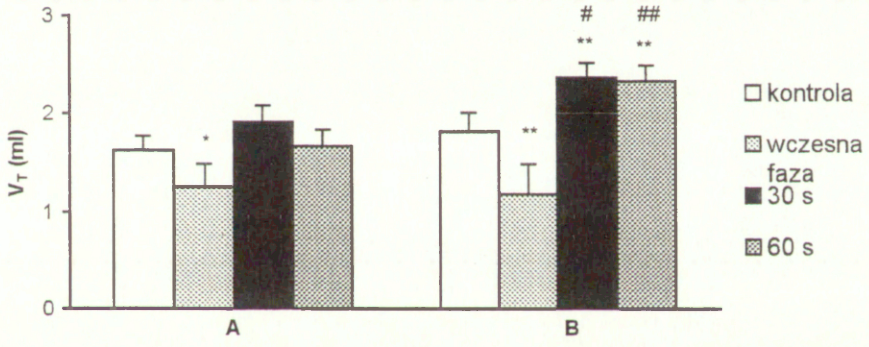
Rycina 23 obrazuje typową odpowiedź oddechową oraz ciśnienia krwi u nieuszkodzonego (A) oraz poddanego sekcji nerwów błędnych zwierzęcia (B) na dotętnicze podanie NMDA.

U 6 z 8 nieuszkodzonych szczurów pojawił się bezdech trwający średnio 3.96 ± 1.6 s, a w następstwie wagotomii u 7 z 8 zwierząt jego wartość była podobna i wynosiła 3.63 ± 0.8 s.

http://rcin.org.pl

Średni czas trwania bezdechu był statystycznie nierozróżnialny pomiędzy dwoma stanami unerwienia (p=0.89, test Wilcoxona).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła znamienny wpływ iniekcji NMDA na objętość oddechową (p=0.00009, ANOVA, n=8) oraz interakcję czynnika odnerwienia z wpływem substancji (p=0.03). Bezpośrednio po bezdechu lub tuż po zakończeniu iniekcji (jeśli bezdech nie wystąpił) zanotowano istotne obniżenie objętości oddechowej zarówno przed jak i po wagotomii (Rycina 24). Po fazie spadku, następowało nieistotne statystycznie zwiększenie zmiennej w czasie 30 s po podaniu u szczurów nieuszkodzonych oraz znamienny wzrost w 30 i 60 s po podaniu u szczurów z wyłączonym sprzężeniem wagalnym.



Ryc. 24. Zmiany objętości oddechowej w wyniku dotętniczej iniekcji NMDA przed (A) i po przecięciu nerwów błędnych (B). *p<0.05, **p<0.01 w stosunku do kontroli, #p<0.05, ##p<0.01 w stosunku do odpowiedniej wartości przed wagotomią (test Duncana), n=8.

ANOVA wykazała istotny wpływ iniekcji NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej na częstość oddychania (p=0.014, n=8). We wznowionym po bezdechu oddychaniu zanotowano krótkotrwałe przyśpieszenie rytmu oddechowego, znamienne jedynie u zwierząt nieuszkodzonych, po czym następowało zwolnienie, istotne statystycznie tylko u zwierząt wagotomizowanych w czasie 60 s po iniekcji NMDA (Tabela 19).

Amplituda zintegrowanego elektromiogramu przepony uległa istotnym zmianom w wyniku dotętniczego podania NMDA (p=0.007, ANOVA, n=8). Charakteryzowały się one stałym zwiększaniem się zmiennej od momentu wznowionej wentylacji do 60 s. Wzrost

http://rcin.org.pl

amplitudy emg osiągnął statystyczną istotność w czasie 30 s po iniekcji u zwierząt nieuszkodzonych oraz w 30 i 60 s u zwierząt po przecięciu nerwów błędnych (Tabela 19).

Tabela 19. Częstość oddychania (f) i amplituda zintegrowanej aktywności przepony ∫ Dia po dotętniczym podaniu NMDA przed i po przecięciu pni nerwów błędnych.

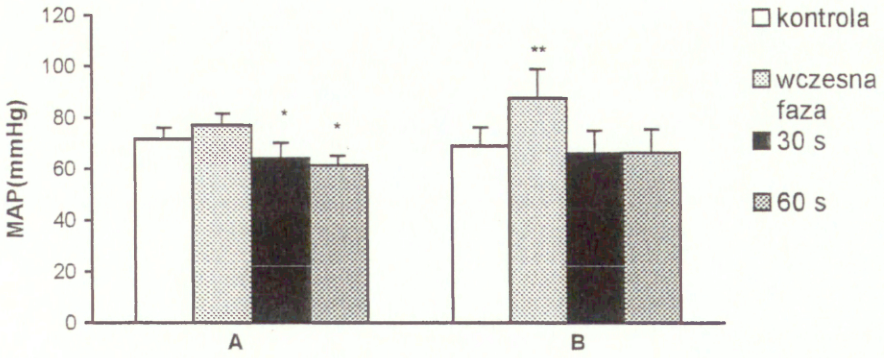
	f (min^{-1})				∫ Dia			
		NMDA				NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta nieuszkodzone	48 ± 2.2	51 ± 3.2*	46 ± 3.4	43 ±3.6	7.4±0.5	8.0±1.0	8.8±1.0*	8.6±0.7
Zwierzęta po wagotomii	47 ± 3.2	51 ± 8.0	39 ± 5.4	40±4.5*	7.0±0.6	7.3±0.5	8.8±1.3**	8.4±1.1*

**p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną (analiza kontrastów dla zmiennej f, test Duncana dla ∫ Dia); n=8.

Odpowiedź ciśnienia krwi

Wstrzyknięcie NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej wpłynęło znamiennie na średnie ciśnienie tętnicze krwi (p=0.00011, ANOVA, n=8). Krótkotrwała odpowiedź presyjna pojawiła się bezpośrednio po zakończeniu podania w obu stanach unerwienia, przy czym znamienna była jedynie u zwierząt wagotomizowanych (p<0.01, test Duncana). W czasie 30 i 60 s ciśnienie krwi uległo obniżeniu w stosunku do kontroli zarówno przed jak i po wagotomii, osiągając istotność statystyczną jedynie u szczurów nieuszkodzonych (Ryc. 25).

http://rcin.org.pl



Rycina 25. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi po dotętniczej iniekcji NMDA u nieuszkodzonych (A) i wagotomizowanych szczurów (B). *p<0.05, **p<0.01 w stosunku do kontroli, test Duncana, n=8.

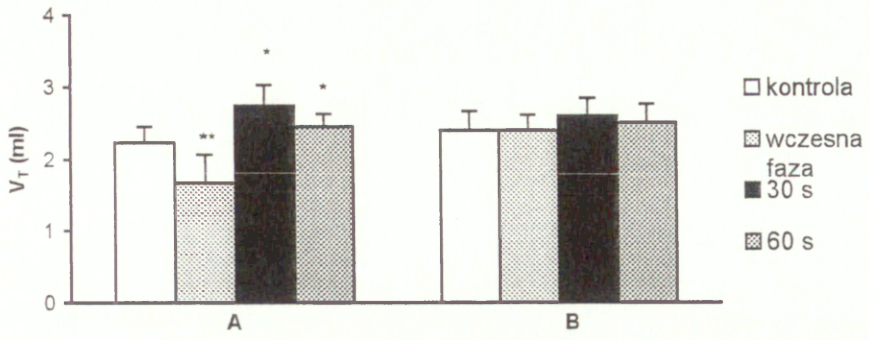
3.2.B. WPŁYW BLOKADY RECEPTORÓW NMDA PRZY UŻYCIU AP 7 NA PRZEBIEG ODPOWIEDZI ODDECHOWO-KRĄŻENIOWEJ WYWOŁANEJ DOTĘTNICZĄ INIEKCJĄ N-METYLO-D-ASPARAGINIANU

Przebieg oddychania

Iniekcja NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej, po uprzednim wstrzyknięciu antagonisty receptorów NMDA do żyły udowej zapobiegła pojawieniu się bezdechu trwającego średnio 2.41 ± 0.4 s w podaniu kontrolnym. Współczynnik zahamowania oddychania, wyrażony stosunkiem $T_{E\ NMDA}/T_{E\ kontrola}$ został skutecznie zredukowany z wartości kontrolnej 3.49 ± 0.5 do 0.89 ± 0.06 po blokadzie z zastosowaniem AP-7 ($p<0.01$, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=6).

Zmiany w objętości oddechowej charakteryzujące się znamiennym spadkiem a następnie jej wzrostem, wywołane iniekcją kontrolną NMDA nie pojawiły się w wyniku wcześniejszego podania antagonisty (Ryc. 26).

http://rcin.org.pl



Rycina 26. Wpływ blokady receptorów NMDA przy zastosowaniu AP-7 na odpowiedź objętości oddechowej wywołaną dotętniczym podaniem NMDA. (A)- kontrolna iniekcja NMDA, (B)- iniekcja NMDA na tle blokady. *p<0.05, **p<0.01 w porównaniu z kontrolą, (test Duncana), n=6.

Odpowiedź ciśnienia krwi

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie ujawniła znamiennego wpływu NMDA na ciśnienie krwi (p=0.154, ANOVA, n=6), mimo iż w podaniu kontrolnym średnie ciśnienie krwi wzrosło z wartości 81 ± 8.4 do 102 ± 5.9 mmHg w trakcie zatrzymania oddychania. Również blokada receptorów NMDA nie miała wpływu na krótkotrwałe podwyższenie ciśnienia indukowane przez NMDA, osiągające wartość 95 ± 8.4 w porównaniu z wartością wyjściową 80 ± 8.3 mmHg.

http://rcin.org.pl

3.3.B. WPŁYW WAGOTOMII NADGUZKOWEJ NA ZMIANY W ODDYCHANIU I CIŚNIENIU KRWI WYWOŁANE DOTĘTNICZĄ INIEKCJĄ NMDA

*Odpowiedź **oddechowa**: główne parametry oddechowe, amplituda emg przepony, współczynnik zahamowania oddychania*

Kontrolne podanie NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej u 10 wstępnie poddanych wagotomii szyjnej zwierząt wpłynęło znamiennie na objętość oddechową (p=0.000007, ANOVA). Bezpośrednio po bezdechu pojawił się statystycznie istotny spadek objętości, a następnie zwiększenie znamienne dla czasu 30 s po podaniu. Po wagotomii nadguzkowej zaobserwowano podobne zmiany w V_T, przy czym znamienny był jedynie wzrost objętości (Tabela 20).

Rytm oddechowy oraz wentylacja minutowa nie zmieniały się w sposób statystycznie istotny w obu stanach odnerwienia. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła, znamienny wpływ dotętniczej iniekcji NMDA na amplitudę zintegrowanego elektromiogramu przepony (p=0.0002). W obu stanach odnerwienia, tuż po iniekcji, zanotowano spadek amplitudy emg, osiągający znamienność tylko przed wagotomią nadguzkową, po którym następował wzrost znamienny wyłącznie po drugim odnerwieniu (Tabela 20).

Bezdech wydechowy obecny bezpośrednio po zakończeniu podania pojawił się zarówno przed jak i po wagotomii nadguzkowej. Współczynnik zahamowania oddychania wynoszący 3.12 ± 0.8 w grupie kontrolnej został zredukowany do wartości 1.85 ± 0.4 po wagotomii nadguzkowej. Różnice te nie były znamienne statystycznie (p=0.21, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=10).

http://rcin.org.pl

Tabela 20. Objętość oddechowa (V_T) oraz amplituda zintegrowanej aktywności przepony $\int$ Dia po dotętniczym podaniu NMDA przed (A) i po wagotomii nadguzkowej (B).

	V_T (ml)				$\int$ Dia			
		NMDA				NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	0	Wczesna faza	30 s	60 s
A	2.18 ± 0.2	1.28 ± 0.2**	2.54±0.2**	2.32 ±0.2	10.7±0.7	8.3±0.9**	11.7±1.2	11.8±01.4
B	2.30 ± 0.2	1.91 ± 0.3	2.93 ± 0.2*	2.66 ±0.2	10.9±0.6	9.9±1.6	13.9±1.0**	13.1±0.8**

**p<0.01, *p<0.05 w porównaniu z wartością kontrolną (analiza kontrastów); n=10.

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Średnie ciśnienie tętnicze krwi podwyższało się w czasie zatrzymania oddychania, po czym wracało do wartości wyjściowych.

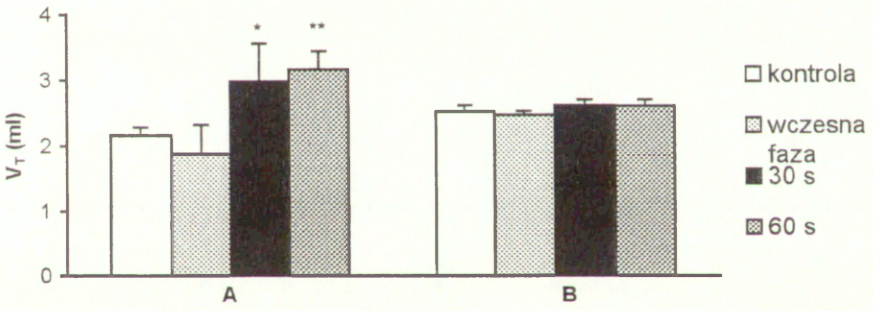
Znamienna odpowiedź presyjna u szczurów przed wagotomią nadguzkową osiągała wartość 100 ± 9.2 w porównaniu do kontroli wynoszącej 75 ± 3.5 mmHg ($p<0.05$, analiza kontrastów), a po wagotomii ciśnienie wzrastało do 103 ± 9.3 z wartości wyjściowej 72 ± 5.0 mmHg ($p<0.01$, analiza kontrastów).

http://rcin.org.pl

3.4.B. WPŁYW PRZECIĘCIA NERWÓW ZATOKOWYCH NA PRZEBIEG ODDYCHANIA I ZMIANY CIŚNIENIA KRWI PO INIEKCJI NMDA DO TĘTNICY SZYJNEJ WSPÓLNEJ

***Przebieg oddychania**: objętość oddechowa i bezdech*

Zgodnie z wynikami opisanymi w punkcie 3.1.B., podanie NMDA u 6 wstępnie wagotomizowanych zwierząt wywołało raptowne pojawienie się bezdechu o średniej długości 3.18 ± 0.3 s. Po bezdechu objętość oddechowa uległa statystycznie istotnym zmianom (p=0.0085, ANOVA). Bezpośrednio po wstrzyknięciu substancji obserwowano nieznamienny spadek objętości oddechowej, po którym następował istotny statystycznie jej wzrost w 30 i 60s rejestracji (Rycina 27).



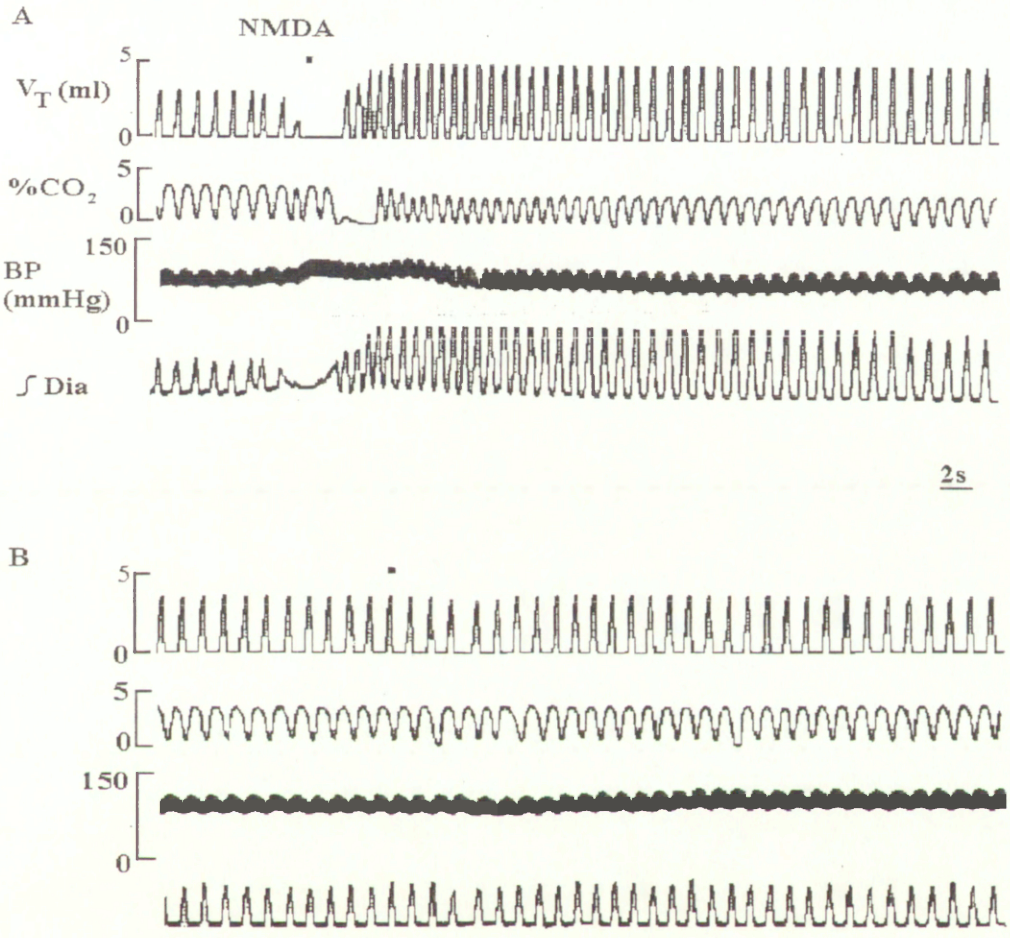
Rycina 27. Średnie wartości objętości oddechowej po podaniu NMDA do tętnicy szyjnej wspólnej u zwierząt po wagotomii (A) i po przecięciu CSNs (B), *p<0.05, **p<0.01 w porównaniu z kontrolą, (test Duncana), n=6.

Jak wynika z powyższej ilustracji wyłączenie unerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych znosiło reakcję objętości oddechowej.

Podobnie skutecznie eliminowało bezdech wydechowy, czego wyrazem jest istotna redukcja współczynnika zahamowania wydechu z wartości kontrolnej 4.7 ± 0.37 do 0.94 ± 0.05 po przecięciu nerwów zatokowych (p<0.001, test t-Studenta dla prób powiązanych, n=6).

http://rcin.org.pl

Typową odpowiedź oddechową i ciśnienia krwi na dotętnicze podanie NMDA u szczura wagotomizowanego i następnie poddanego odnerwieniu kłębków szyjnych obrazuje rycina 28.



Rycina 28. Przebieg oddychania i zmiany ciśnienia krwi w wyniku dotętniczego podania NMDA u szczura po wagotomii (A) i następnie po sekcji CSNs (B).
V_T- objętość oddechowa, %CO_2- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Dwuczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnego wpływu NMDA w iniekcji dotętniczej na częstość oddychania ($p=0.19$), wentylację minutową ($p=0.62$) i amplitudę elektromiogramu przepony ($p=0.7$).

http://rcin.org.pl

Odpowiedź ciśnienia tętniczego krwi

Średnie wartości ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt po wagotomii oraz po następowym przecięciu nerwów zatokowych przedstawia tabela 21.

Tabela 21. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi po dotętniczym podaniu NMDA u zwierząt po wagotomii i następnie po przecięciu nerwów zatokowych.

	MAP (mmHg)			
		NMDA		
	0	Wczesna faza	30 s	60 s
Zwierzęta po wagotomii	86± 7.0	111± 13.4*	80 ± 8.4	90 ± 5.5
Zwierzęta po przecięciu CSNs	93 ± 6.4	108 ± 5.8	107 ± 3.8	108 ± 4.7

*p<0.05 w porównianiu z kontrolą, (test Duncana), n=6.

Po dotętniczej iniekcji NMDA u zwierząt wagotomizowanych ciśnienie krwi wzrosło znamiennie w czasie zatrzymania oddychania, po czym w 30 s nastąpił nieznaczny jego spadek w stosunku do kontroli i po 60 s powrót do poziomu wyjściowego. Wyłączenie unerwienia kłębków szyjnych spowodowało nieistotny wzrost zmiennej utrzymujący się do końca czasu trwania rejestracji.

http://rcin.org.pl

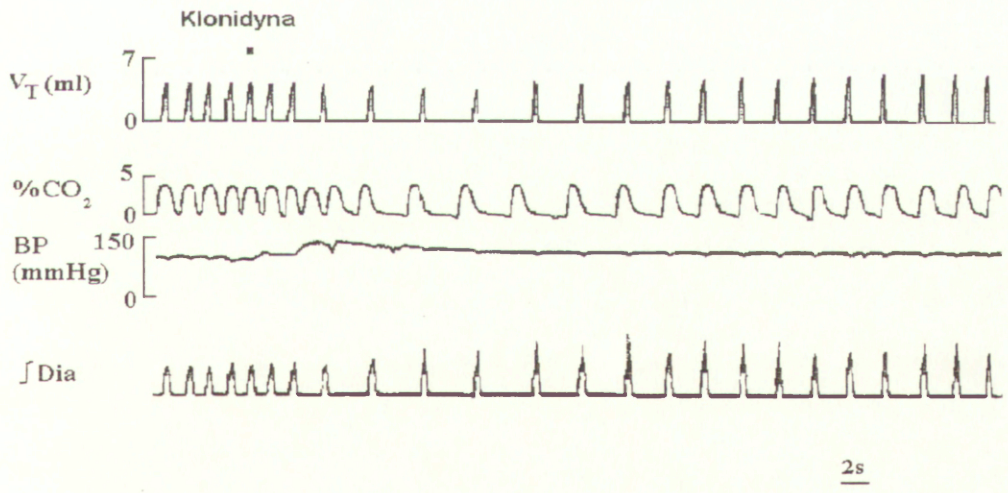
4. KLONIDYNA

4.1. ZMIANY ODDYCHANIA ORAZ CIŚNIENIA KRWI WYWOŁANE DOŻYLNA INIEKCJĄ KLONIDYNY. WPŁYW OBUSTRONNEJ WAGOTOMII SZYJNEJ NA OBSERWOWANE EFEKTY

Przebieg oddychania

W pierwszej fazie eksperymentalnej klonidynę w dawce 15 μg/kg podawano do żyły udowej u 8 nieuszkodzonych, i następnie poddanych obustronnej wagotomii szyjnej szczurów.

Poklonidynowe oddychanie charakteryzowało się wzrostem objętości oddechowej poprzedzonej minimalnym, bezpośrednim spadkiem oraz zwolnieniem rytmu oddechowego w obu stanach unerwienia szczurów. Typowa oddechowo-krążeniowa odpowiedź na dożylną klonidynę została zaprezentowana na rycinie 29.

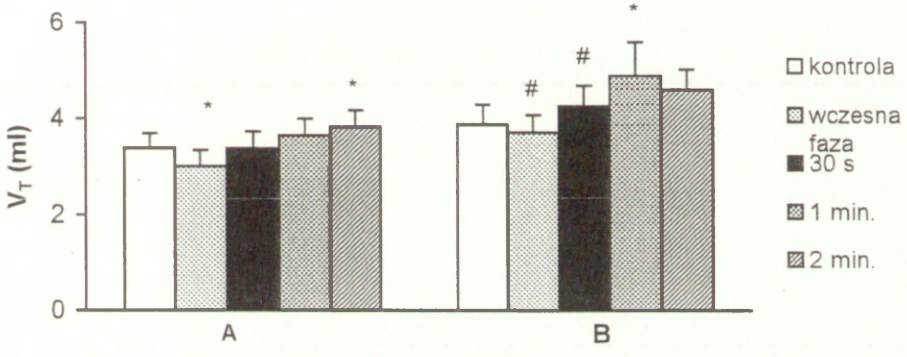


Rycina 29. Przebieg oddychania i zmiany ciśnienia krwi w wyniku dożylnej iniekcji klonidyny u nieuszkodzonego szczura. V_T- objętość oddechowa, %CO_2- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA ujawniła znamienny wpływ podania klonidyny ($p=0.000003$, $n=8$) oraz wpływ neurotomii ($p=0.04$) na objętość oddechową

http://rcin.org.pl

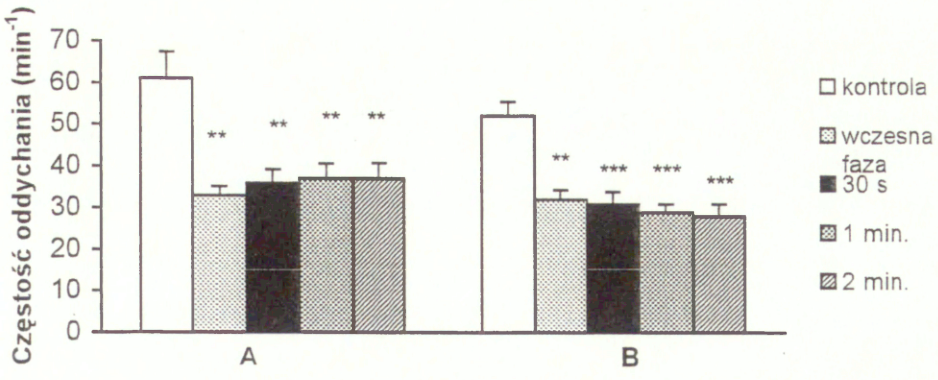
Przy zachowanym sprzężeniu wagalnym tuż po zakończeniu iniekcji, zanotowano znamienne obniżenie objętości oddechowej ($p<0.05$), po czym następował stopniowy jej wzrost osiągający istotność po 2 minutach ($p<0.05$). Po przecięciu nerwów błędnych klonidyna spowodowała nieistotny statystycznie spadek objętości. Wzrost zmiennej pojawił się w 30 sekund po iniekcji i trwał do 2 minut. Znamienność osiągnął w czasie 1 minuty ($p<0.05$), natomiast dla 30 s i 2 minut efekt znalazł się na granicy istotności statystycznej ($p=0.057$ i $p=0.063$, odpowiednio), (Ryc. 30).



Rycina 30. Wpływ dożylnej iniekcji klonidyny na objętość oddechową: (A)-u zwierząt nieuszkodzonych, (B)-po przecięciu nerwów błędnych.
*$p<0.05$ w stosunku do kontroli, #$p<0.05$ w stosunku do odpowiedniej wartości przed odnerwieniem, (analiza kontrastów), n=8.

Dożylne wstrzyknięcie klonidyny miało istotny wpływ na zachowanie się rytmu oddechowego ($p=0.000001$, ANOVA, n=8). Zwolnienie oddychania było znamienne w momencie zakończenia iniekcji i efekt ten utrzymywał się do 2 minut zarówno przed jak i po wykonaniu wagotomii (Ryc. 31).

http://rcin.org.pl



Rycina 31. Zmiany w częstości oddychania spowodowane dożylnym podaniem klonidyny u nieuszkodzonych (A) i wagotomizowanych szczurów (B).**p<0.01, ***p<0.001, w stosunku do wartości kontrolnej (analiza kontrastów), n=8.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła znamienny wpływ klonidyny na wentylację minutową, która została znacznie obniżona w obu stanach unerwienia (p=0.000001, n=8). Depresję oddychania obserwowano od chwili zakończenia iniekcji do 2 minut. We wczesnej fazie poklonidynowego oddychania maksymalne zmniejszenie wentylacji minutowej wynosiło 97 ± 9 ml·min^{-1} w stosunku do wartości wyjściowej 184 ± 20 ml·min^{-1} (p<0.001, n=8) u szczurów nieuszkodzonych oraz 122 ± 16 ml·min^{-1} w porównaniu z kontrolą 198 ± 18 ml·min^{-1} po wagotomii (p<0.0001, n=8).

Dożylne podanie klonidyny miało także wpływ na zmiany amplitudy zintegrowanej aktywności przepony (p=0.00016, ANOVA, n=8). Jej wzrost zanotowano przed i po przecięciu nerwów błędnych. Przy czym w przypadku zwierząt nieuszkodzonych, efekt znalazł się na granicy istotności statystycznej dla 1 i 2 minut zapisu doświadczalnego (p=0.06 i p=0.058, odpowiednio). Po odcięciu wejść wagalnych z płuc, znamienne zwiększenie amplitudy emg nastąpiło w przedziale czasowym od 30 s do 2 minut (Tabela 22).

http://rcin.org.pl

Tabela 22. Zmiany w amplitudzie zintegrowanego elektromiogramu przepony po dożylnej iniekcji klonidyny u zwierząt nieuszkodzonych i następnie po przecięciu nerwów błędnych.

	∫ Dia				
		Klonidyna			
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
Zwierzęta nieuszkodzone	8.6 ± 0.7	8.3 ± 0.8	9.4 ± 1.0	9.9 ± 1.1	9.7 ±1.1
Zwierzęta wagotomizowane	9.5 ± 0.8	11.0 ± 1.4	12.5 ± 1.5*	12.6 ± 1.5*	12.1 ± 1.3*

*p<0.05 w porównianiu z kontrolą, (analiza kontrastów), n=8.

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi

Testowano zmiany średniego ciśnienia tętniczego podczas depresji oddychania wywołane stosowaną dożylnie klonidyną. U nieuszkodzonych szczurów znamienny wzrost średniego ciśnienia tętniczego krwi z 82 ± 9.7 w warunkach kontrolnych do 134 ± 11.9 mmHg wystąpił bezpośrednio po iniekcji (p<0.0001, analiza kontrastów). Ciśnienie pozostawało na podwyższonym poziomie do 30 s po podaniu substancji (p<0.05, analiza kontrastów, n=8), po czym po 1 minucie powracało do wartości kontrolnych i później pojawiała się hipotensja utrzymująca się ponad 2 minuty. Po obustronnej wagotomii szyjnej we wczesnej fazie poklonidynowego oddychania, wartość ciśnienia zwiększyła się ze 117 ± 8.8 do 166 ± 11 mmHg (p<0.0001). W 30 sekundzie po podaniu nastąpił powrót do kontroli, a w 2 minucie znamienne obniżenie ciśnienia (p<0.01).

http://rcin.org.pl

4.2. SKUTKI BLOKADY RECEPTORÓW α_2–ADRENERGICZNYCH PRZY UŻYCIU SKF 86466 NA ODPOWIEDŹ WYWOŁANĄ PODANIEM KLONIDYNY

Przebieg oddychania

W celu weryfikacji hipotezy, że to receptory α_2–adrenergiczne uczestniczą w odpowiedzi oddechowej na podanie klonidyny, 7 wstępnie wagotomizowanych szczurów otrzymało dwie iniekcje dożylne klonidyny w dawce 15 μg/kg. Pierwsza iniekcja stanowiła kontrolę, a druga została wykonana po zastosowaniu selektywnego antagonisty receptora α_2–adrenergicznego: SKF 86466 (200 μg/kg dożylnie).

Zgodnie z wynikami opisanymi na początku rozdziału 4, kontrolne wstrzyknięcie klonidyny spowodowało wzrost objętości oddechowej, obecny od 30 s do 2 minut po iniekcji ($p<0.05$, ANOVA, n=7). Wcześniejsze użycie blokera zapobiegało pojawieniu się istotnych zmian w objętości oddechowej (Tabela 23).

Tabela 23. Zmiany w objętości oddechowej (V_T) w wyniku dożylnej iniekcji klonidyny przed (A) i po zastosowaniu SKF 86466 (B).

	V_T (ml)				
		Klonidyna			
		Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
A	3.8±0.6	3.6±0.5	4.1±0.6	4.8±0.9***	4.5±0.7*
B	4.4±1.0	4.3±1.0	4.4±1.0	4.4±1.0	4.4±1.0

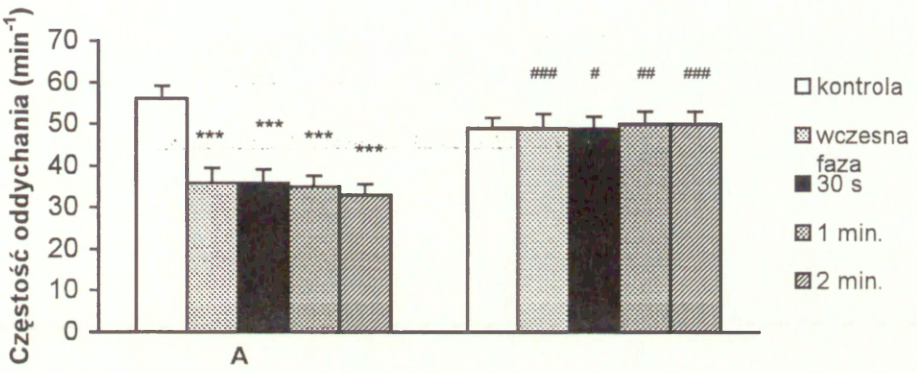
***$p<0.001$, *$p<0.05$ w porównaniu z wartością kontrolną (test Duncana); n=7

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła znamienny wpływ podania klonidyny na częstość oddychania ($p<0.000001$), która istotnie zmalała począwszy od momentu podania substancji do 2 minut w kontrolnej iniekcji. Po wstrzyknięciu SKF 86466 klonidyna nie wywołała istotnych zmian w f. Potwierdza to znamienny wpływ zastosowania blokera na rytm

http://rcin.org.pl

oddechowy ($p<0.01$, ANOVA).

Zanotowano interakcję dwóch czynników: efekt klonidyny x użycie antagonisty na częstość oddychania ($p<0.000001$, ANOVA), co znalazło odzwierciedlenie w istotnych różnicach pomiędzy odpowiednimi fazami działania klonidyny przed i po zastosowaniu SKF 86466 (Rycina 32).



Rycina 32. Wpływ dożylnie podanej klonidyny na zachowanie częstości oddychania przed (A) i po iniekcji antagonisty-SKF 86466 (B). ***$p<0.001$ w stosunku do kontroli, $^{\#\#}p<0.001$, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#}p<0.05$ w stosunku do odpowiedniej wartości przed zastosowaniem blokera (analiza kontrastów), n=7.

Znamienne obniżenie wentylacji minutowej obecne było od momentu zakończenia iniekcji do 2 minut w grupie kontrolnej ($p<0.05$, ANOVA). Nie zaobserwowano znamiennych różnic w objętości minutowej między kontrolą a kolejnymi fazami działania klonidyny po zastosowaniu antagonisty. ANOVA ujawniła interakcję między efektem substancji a użyciem blokera ($p<0.01$), (Tabela 24).

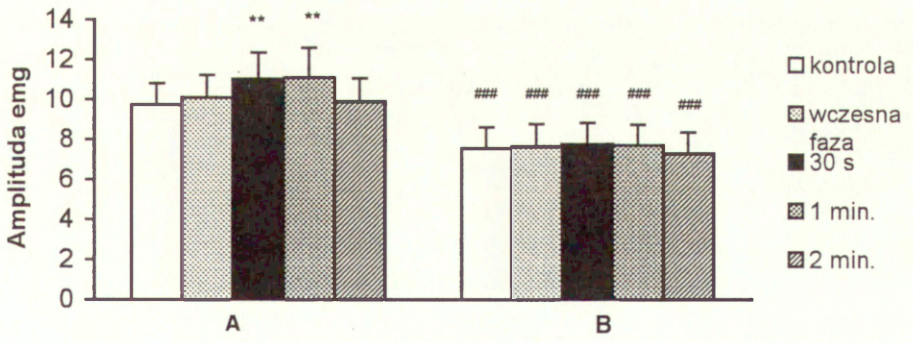
http://rcin.org.pl

Tabela 24. Zmiany w wentylacji minutowej po dożylnym podaniu klonidyny przed (A) i po zastosowaniu SKF 86466 (B).

	V_E(ml x min^{-1})				
		Klonidyna			
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
A	204 ± 23	128 ± 21***	153 ± 27***	166 ± 34**	143 ± 16***
B	210 ± 43	204 ± 49###	214 ± 51###	215 ± 45##	213 ± 45###

***p<0.001, **p<0.01 w porównaniu z wartością kontrolną; ###p<0.001, ##p<0.01 w porównaniu z odpowiednią wartością przed zastosowaniem antagonisty (test Duncana); n=7

Amplituda zintegrowanej aktywności przepony ulegała znamiennemu podwyższeniu w kontrolnej grupie zwierząt w 30 i 60 sekund po podaniu klonidyny. Po uprzednim wstrzyknięciu SKF 86466 nie zanotowano znamiennych różnic w amplitudzie emg między kontrolą a kolejnym fazami działania klonidyny. Analiza wariancji ANOVA wykazała istotny wpływ działania antagonisty na amplitudę emg (p=0.03, n=7). Średnie wartości zmiennej były niższe po zastosowaniu blokera (Ryc. 33).



Rycina 33. Wpływ dożylnie podanej klonidyny na amplitudę emg przepony przed (A) i po iniekcji SKF 86466 (B). **p<0.01 w stosunku do kontroli, ###p<0.001 w stosunku do odpowiedniej wartości przed zastosowaniem blokera (test Duncana), n=7.

http://rcin.org.pl

Wpływ blokady na zachowanie się ciśnienia tętniczego krwi

Średnie ciśnienie tętnicze krwi, zgodnie z wynikami u zwierząt nieuszkodzonych (p.4.1.) ulegało znamiennemu podwyższeniu bezpośrednio po zakończeniu iniekcji klonidyny zarówno w grupie kontrolnej zwierząt jak i po zastosowaniu antagonisty ($p<0.001$ i $p<0.01$, odpowiednio, n=7), (Tabela 25). W grupie kontrolnej wzrost ten pozostawał na poziomie wyższym od wyjściowego do 30 s, po czym nastąpił spadek ciśnienia osiągający znamienność po 2 minutach ($p<0.001$). Użycie antagonisty, zapobiegało późnemu spadkowi zmiennej, która po 2 minutach przekraczała wartość wyjściową. Średnie wartości zmiennej były istotnie niższe w grupie szczurów po zastosowaniu SKF 86466, co znajduje wyraz w interakcji między efektem klonidyny a użyciem antagonisty ($p=0.000002$, ANOVA, n=7).

Tabela 25. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi po dożylnej iniekcji klonidyny przed i po zastosowaniu SKF 86466.

	MAP (mmHg)				
		Klonidyna			
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
Kontrola	101± 14	154± 12***	113 ± 13	89 ± 14	67 ± 10***
SKF 86466	74 ± 7$^{\#\#}$	99 ± 9**$^{\#\#\#}$	86 ± 10$^{\#\#}$	82 ± 9	80 ± 8

***$p<0.001$, **$p<0.01$ w porównaniu z kontrolą, $^{\#\#\#}p<0.001$, $^{\#\#}p<0.01$ w stosunku do odpowiedniej wartości przed użyciem antagonisty (test Duncana), n=10.

4.3. WPŁYW ODNERWIENIA CHEMORECEPTORÓW CIAŁEK SZYJNYCH NA OBECNOŚĆ EFEKTÓW ODDECHOWO-KRĄŻENIOWYCH WYWOŁANYCH DOŻYLNĄ INIEKCJĄ KLONIDYNY

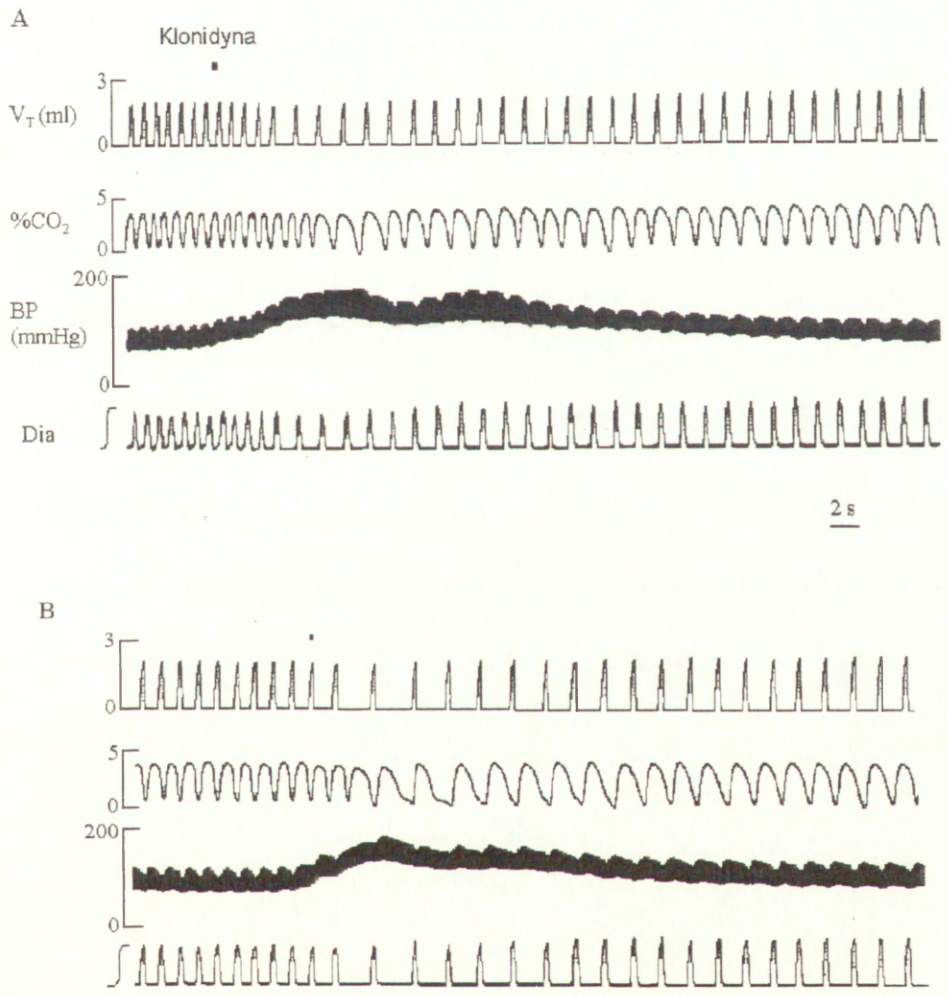
Przebieg oddychania

Kolejną serię doświadczeń przeprowadzono na 10 szczurach celem zbadania udziału nerwów zatokowych w odpowiedziach oddechowo-krążeniowych wywołanych dożylnie

http://rcin.org.pl

wstrzykniętą klonidyną.

Klonidynę podawano kontrolnie zwierzętom wstępnie wagotomizowanym i ponownie dokonywano iniekcji po odnerwieniu chemoreceptorów ciałek szyjnych. Typową odpowiedź u zwierzęcia po wagotomii, a następnie po przecięciu nerwów zatokowych przedstawia Rycina 34.



Rycina 34. Przebieg oddychania i zmiany ciśnienia krwi w wyniku dożylnej iniekcji klonidyny po wagotomii (A) i następnie po przecięciu nerwów zatokowych (B). V_T- objętość oddechowa, %CO_2- wydechowy dwutlenek węgla, BP – ciśnienie tętnicze, ∫ Dia- zintegrowany elektromiogram przepony.

Zgodnie z wynikami przedstawionymi w punkcie 4.1., wstrzyknięcie klonidyny u zwierząt poddanych obustronnej wagotomii szyjnej spowodowało istotne zmiany w objętości oddechowej ($p=0.000001$, ANOVA, $n=10$). Bezpośrednio po podaniu zanotowano jej

http://rcin.org.pl

obniżenie ($p<0.001$), a następnie znamienny wzrost w 1 i 2 minucie od iniekcji ($p<0.05$). Odnerwienie chemoreceptorów ciałek szyjnych zredukowało poklonidynową odpowiedź objętości oddechowej (Tabela 26).

Analiza wariancji wykazała interakcję między skutkiem działania substancji a efektem odnerwienia ($p=0.0002$). Wyrażają to znamienne różnice w oddziaływaniu klonidyny obserwowane we wczesnej fazie i 30 s po iniekcji, zachodzące pomiędzy dwoma stanami unerwienia (Tabela 22).

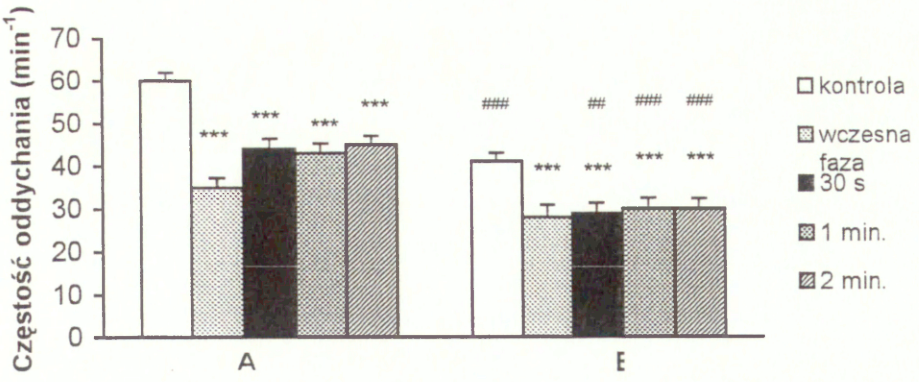
Tabela 26. Zmiany objętości oddechowej (V_T) po dożylnej iniekcji klonidyny przed (A) i po przecięciu nerwów zatokowych (B).

	V_T (ml)				
		Klonidyna			
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
A	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1***	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1*	2.4 ± 0.1*
B	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1$^{\#}$	2.4 ± 0.2$^{\#}$	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1

***$p<0.001$, *$p<0.05$ w porównaniu z wartością kontrolną, $^{\#}p<0.05$ w porównaniu z odpowiednią wartością przed odnerwieniem (analiza kontrastów); n=10

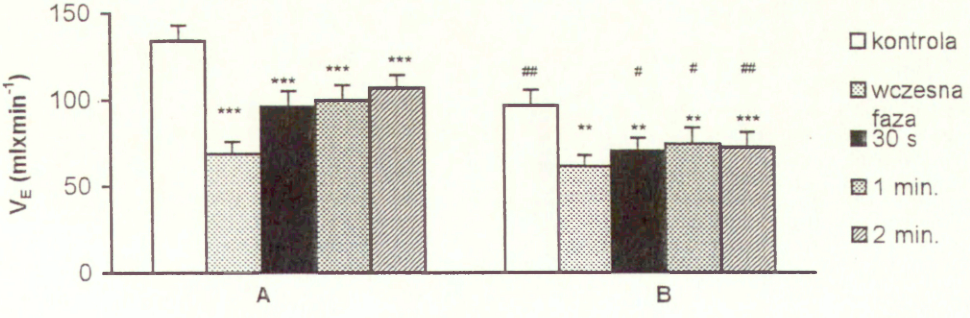
Częstość oddychania zmniejszała się istotnie tuż po iniekcji klonidyny i spadek ten utrzymywał się do 2 minut. Zmiany te charakterystyczne były dla obu stanów unerwienia ($p=0.000001$, ANOVA, n=10). Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła interakcję między działaniem klonidyny a efektem odnerwienia ($p=0.001$) oraz znamienny wpływ samego odnerwienia ($p= 0.0005$) na rytm oddechowy, który manifestował się niższymi wartościami f u zwierząt z wyłączonym wejściami aferentnymi z kłębków. Rycina 35 prezentuje znamienne różnice f pomiędzy odpowiednimi wartościami przed i po przecięciu nerwów zatokowych.

http://rcin.org.pl



Rycina 35. Średnie wartości częstości oddychania przed (A) i po przecięciu nerwów zatokowych (B) po dożylnej iniekcji klonidyny. ***p<0.001 w stosunku do kontroli, ###p<0.001, ##p<0.01, w stosunku do odpowiedniej wartości przed wyłączeniem CSNs (analiza kontrastów), n=10.

Klonidyna spowodowała istotne zmiany w wentylacji minutowej. Analiza statystyczna wykazała istotną interakcję pomiędzy odnerwieniem a skutkami działania klonidyny (p=0.0006). Wentylacja minutowa została istotnie zmniejszona zarówno u zwierząt wagotomizowanych jak i po odnerwieniu chemoreceptorów ciałek szyjnych (p=0.000001, ANOVA). Jej spadek zarejestrowano od momentu zakończenia podania substancji do 2 minut. Statystycznie istotne różnice, zaczynając już od kontroli, pomiędzy stanami przed i po przecięciu nerwów zatokowych potwierdziły wpływ odnerwienia na wentylację minutową (p=0.008), (Rycina 36).



Rycina 36. Średnie wartości wentylacji minutowej (V_E) po dożylnej klonidynie u szczurów po wagotomii (A) i po przecięciu nerwów zatokowych (B).***p<0.001, **p<0.01, w porównaniu do kontroli, ##p<0.01, #p<0.05 w porównaniu do odpowiedniej wartości przed odnerwieniem chemoreceptorów ciałek szyjnych (analiza kontrastów), n=10.

http://rcin.org.pl

Ciśnienie tętnicze krwi

Wyłączenie unerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych pozostało bez wpływu na zmiany ciśnienia tętniczego krwi spowodowane dożylną iniekcją klonidyny.

Ciśnienie osiągnęło maksymalny wzrost bezpośrednio po podaniu, oraz maksymalny spadek w czasie 2 minut przed i po przecięciu nerwów zatokowych.($p=0.00001$, ANOVA).

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ odnerwienia na wartości ciśnienia krwi u zwierząt z wyeliminowanymi wejściami aferentnymi z ciałek szyjnych ($p=0.005$), (Tabela 27).

Tabela 27. Zmiany w średnim ciśnieniu tętniczym krwi po dożylnej iniekcji klonidyny przed i po przecięciu CSNs.

	MAP (mmHg)				
		Klonidyna			
	0	Wczesna faza	30 s	60 s	2 min.
Zwierzęta po wagotomii	87 ± 4	153± 4***	120 ± 8**	97 ± 7	74 ± 4**
Po przecięciu CSNs	79 ± 9	118 ± 14***$^{\#}$	92 ± 10$^{\#}$	67 ± 6$^{\#\#}$	55 ± 6**$^{\#\#}$

***$p<0.001$, **$p<0.01$ w porównaniu z kontrolą, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#}p<0.05$ w stosunku do odpowiedniej wartości przed przecięciem nerwów zatokowych (analiza kontrastów), n=10.

http://rcin.org.pl

DYSKUSJA

Zmiany wzorca oddechowego oraz ciśnienia krwi wywołane dożylnym podaniem kapsaicyny. Wpływ blokady receptorów waniloidowych oraz neurotomii

Odpowiedzi oddechowe wywołane pobudzeniem głównych receptorów dolnych dróg oddechowych (płuc, oskrzeli, tchawicy), oraz chemoreceptorów obwodowych przez podstawowe bodźce i substancje chemiczne zostały dobrze poznane. Jedną z takich wzorcowych substancji, selektywnie pobudzającą niemielinowe włókna C, wywołującą chemoodruch płucny o objawach wagalnie zależnych, jest kapsaicyna. Powodowany przez nią jednolity wzorzec odpowiedzi oddechowej posłużył w obecnej pracy jako punkt odniesienia dla zmian wzorca powodowanych przez pozostałe badane substancje neuroaktywne.

U kotów i psów dożylnie wstrzyknięta kapsaicyna wywołuje chemoodruch płucny charakteryzujący się konstelacją bezdechu, następującego po nim szybkiego i płytkiego oddychania oraz zwolnieniem czynności serca i spadkiem ciśnienia tętniczego (Pórszász i wsp, 1955; Toh i wsp., 1955; Coleridge i wsp., 1964). Odpowiedź ta związana jest z pobudzeniem niemielinowych włókien dośrodkowych nerwu błędnego typu C i jest znoszona przez oziębienie lub przecięcie nerwów błędnych w odcinku szyjnym (Coleridge i wsp., 1964; Kopczyńska i Szereda-Przestaszewska, 1998).

Dane dotyczące chemoodruchu płucnego u szczurów są nieliczne i niejednoznaczne. Niektóre z badań na szczurach opisują bezdech, bradykardię i spadek ciśnienia, eliminowane przez wagotomię (Makara i wsp., 1967; Chachl i Lynch, 1987; Lee i Lundberg, 1994). Odpowiedź oddechowa w fazie wznowionego po bezdechu oddychania została przedstawiona tylko w dwóch publikacjach. Mitchell i wsp. (1984) zanotowali spadek objętości oddechowej i skrócony czas wdechu znoszone przez przecięcie pni nerwów błędnych. W pracy Hednera i wsp.

http://rcin.org.pl

(1985) zaobserwowano fazę szybkiego, płytkiego oddychania w czasie jednej minuty po bezdechu, nie zostało to jednak poparte danymi liczbowymi.

W dostępnej literaturze znalazły się wzmianki informujące, że wagotomia nie zawsze znosi pokapsaicynowy bezdech wydechowy, często jedynie redukuje jego długość (Mitchell i wsp., 1984; Hedner i wsp., 1985; Paleček i wsp., 1989). Rozbieżności pomiędzy wcześniejszymi doniesieniami skłoniły mnie do dalszych badań nad oddechowymi skutkami dożylnej iniekcji kapsaicyny u nieuszkodzonych, wagotomizowanych i poddanych przecięciu nerwów krtaniowych górnych szczurów.

W doświadczeniach tej pracy na efekty oddechowo-krążeniowe powstałe w wyniku dożylnie wstrzykniętej kapsaicyny u nieuszkodzonych szczurów składały się bezdech wydechowy, następujące po nim pobudzenie wentylacji oraz spadek ciśnienia tętniczego krwi. Wzorzec oddechowy występujący po zakończeniu fazy bezdechu różnił się od klasycznej odpowiedzi zaobserwowanej u kotów, psów oraz szczurów opisanych w dwóch poprzednio wymienionych pracach. Prezentowane doświadczenia ujawniły charakterystyczny dla wszystkich zwierząt wzrost objętości oddechowej w 30 i 60 sekundzie po iniekcji kapsaicyny, podczas gdy wcześniejsze badanie na szczurach dokumentowało spadek tej zmiennej (Mitchell i wsp., 1984). Różnica może być związana ze znacznie wyższą dawką stosowaną przez cytowanego autora: 6 a nawet 20-krotnie.

Rytm oddechowy ulegał znamiennemu wzrostowi, ale tylko we wczesnej fazie wznowionego po bezdechu oddychania. Zwiększona wentylacja minutowa odzwierciedlała zdecydowanie przyrost objętości oddechowej, a nie krótkotrwałe przyspieszenie rytmu oddechowego. Zmiany w oddychaniu i ciśnieniu krwi, a także bezdech obecne były również po obustronnym przecięciu nerwów błędnych. Reakcja znikała natomiast po zablokowaniu receptorów waniloidowych czerwienią rutenu, która jest dobrze poznanym antagonistą kanałów wapniowych, hamującym

http://rcin.org.pl

oddechowo-krążeniowe efekty kapsaicyny in vitro (Lou i wsp., 1991) i in vivo (Petho i Szolcsányi, 1990; Naida i wsp., 1996). Odpowiedź oddechowa uzyskana w tej pracy, charakteryzująca się pobudzeniem oddychania odbiega od typowej konstelacji chemoodruchu płucnego. Nie wydaje się, aby było to związane z wielkością stosowanej dawki kapsaicyny. Użyta przez mnie dawka 5 μg / kg została wyselekcjonowana na podstawie dostępnych danych literaturowych. Tę samą dawkę kapsaicyny (Paleček i wsp.,1989; Naida i wsp., 1996) lub nieco mniejszą (Makara i wsp., 1967; Hedner i wsp., 1985) stosowano w celu wywołania chemoodruchu płucnego u szczura. Dowiedziono bowiem, że niskie dawki kapsaicyny (kilka μg / kg) pobudzają wyłącznie najmniejsze chemoczułe włókna C u szczura, myszy i świnki morskiej (Holzer, 1988), inicjując odruchowe przyspieszenie oddychania skojarzone z obniżoną objętością oddechową (Schelegle i wsp., 1995).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że w pojawieniu się bezdechu i w odpowiedzi objętości oddechowej nie współuczestniczą płucne włókna C, bowiem wagotomia szyjna pozostaje bez wpływu na opisane zjawiska. Średnie wartości przyrostu objętości oddechowej oraz średni czas trwania bezdechu nie były znamiennie różne przed i po przecięciu nerwów błędnych.

W poszukiwaniu pozawagalnych pól receptorowych aktywowanych przez kapsaicynę należałoby rozważyć jej działanie na ośrodkowy układ nerwowy, ponieważ ta substancja neuroaktywna z łatwością przechodzi przez barierę krew-mózg (Saria i wsp., 1982; Reid i McCullogh, 1987). Zatem komponenty wzorca oddechowego modyfikowane przez kapsaicynę mogłyby być regulowane aktywnością struktur opuszkowych (Sant'Ambrogio i Sant'Ambrogio, 1997). Potwierdzałby to zarejestrowany przez Hednera i wsp. (1985), opisany w moich badaniach po podaniu dożylnym, wzrost objętości oddechowej po dokomorowym podaniu kapsaicyny. Po iniekcji dokomorowej nie zanotowano jednak zatrzymania oddychania, co wskazuje, że sam

http://rcin.org.pl

mechanizm powstawania bezdechu wywołany działaniem kapsaicyny zlokalizowany jest w obwodowym układzie nerwowym. Wykazano, że włókna unerwiające błonę śluzową nosa, krtani i gardła, wchodzące w skład nerwów trójdzielnego, błędnego i językowo-gardłowego są wrażliwe na kapsaicynę (Jancsó i Király, 1980). Za zjawisko bezdechu mogłoby więc odpowiadać pobudzenie włókien dośrodkowych wyżej wymienionych nerwów docierające do ośrodków w jądrze czuciowym nerwu trójdzielnego oraz w jądrze pasma samotnego. Jak dotąd nie ma danych dotyczących działania kapsaicyny na chemoreceptory obwodowe, a w 1985 roku Hedner wykazał, że przecięcie nerwu językowo-gardłowego pozostaje bez wpływu na zredukowany uprzednio bezdech u wagotomizowanych szczurów.

Hipotetycznym miejscem genezy odruchu mogłyby być zwoje guzkowe, bogato zaopatrzone w receptory waniloidowe (Szallási i wsp., 1995; Wood i Docherty, 1997; Helliwell i wsp., 1998).

Dla potwierdzenia tej hipotezy efekty oddechowe kapsaicyny przetestowano u szczurów wagotomizowanych i następnie poddanych przecięciu nerwów krtaniowych górnych, stanowiących dośrodkową ścieżkę prowadzącą do zwoju guzkowego. Okazało się, że usunięcie SLNs wyeliminowało bezdech oraz zredukowało wzrost objętości oddechowej, występujące u szczurów nieuszkodzonych i wagotomizowanych. Rolę nerwów krtaniowych górnych w obserwowanych efektach potwierdzają badania histologiczne wykazujące, że u szczura zbudowane są one w równych proporcjach z mielinowych Aδ i niemielinowych włókien wrażliwych na kapsaicynę (Domeij i wsp.,1989; Hishida i wsp., 1997).

Górne drogi oddechowe, w tym krtań są niezwykle ważnym obszarem inicjującym ochronne i obronne odruchy oddechowe. Chemowrażliwość krtani jest ugruntowanym faktem, a pobudzenie kapsaicyno-wrażliwych zakończeń w jej obszarze poprzez inhalację kapsaicyny u świnki morskiej i szczura wywołuje zatrzymanie oddychania. Obustronne przecięcie nerwów

http://rcin.org.pl

krtaniowych górnych eliminowało odpowiedź u większości lub wszystkich badanych zwierząt (Paleček i wsp.,1990; Tsubone i wsp.,1991; Lin i wsp., 2000). Efektem tej neurotomii było także opóźnienie wystąpienia bezdechu oraz nieskuteczność w jego eliminacji u połowy badanych zwierząt (Tsubone i wsp.,1991; Hishida i wsp., 1996). Przytoczone dane wskazują, że czuciowe odnerwienie krtani nie zawsze w pełni zapobiega bezdechowi wywołanemu miejscowym podaniem kapsaicyny u szczura. Dowodzą niemniej, że krtań generuje odruchowe zatrzymanie oddychania u tego gatunku.

W prezentowanej pracy przecięcie nerwów krtaniowych górnych każdorazowo likwidowało bezdech pokapsaicynowy. Stąd można wnioskować, że jego obecność wywołana dożylnym podaniem kapsaicyny jest skutkiem aktywacji dróg czuciowych z krtani. Należałoby również przyjąć, że pokapsaicynowy wzrost objętości oddechowej zależy także od zachowania ciągłości nerwów krtaniowych. Świadczy o tym brak istotnych zmian w V_T po podaniu kapsaicyny u zwierząt neurotomizowanych. Zabieg deaferentacji krtani nie zmieniał średnich wartości kontrolnych objętości, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (Kamosińska i Szereda-Przestaszewska, 1988; Mortola i Rezzonico, 1989).

Jest ogólnie przyjęte, że hipotensja, występująca w trakcie pokapsaicynowego zatrzymania oddechu oraz w czasie wznowionego oddychania zależy od zachowanych nerwów błędnych (Makara i wsp., 1967; Hedner i wsp., 1985; Chachl i Lynch, 1987; Lee i Lundberg, 1994). Niektórzy autorzy wskazują jednak, że większe dawki kapsaicyny zastosowane po wagotomii mogą nadal powodować spadek ciśnienia krwi (Makara i wsp., 1967; Hedner i wsp., 1985). W prezentowanych badaniach hipotensję obserwowano pomimo przeprowadzonej wagotomii, a także po deaferentacji krtani. Odpowiedź znoszona była dopiero po zablokowaniu receptorów waniloidowych z zastosowaniem czerwieni rutenu (RR). Biorąc pod uwagę wspomnianą wcześniej łatwość przenikania kapsaicyny przez barierę krew-mózg, najbardziej

http://rcin.org.pl

wiarygodnym wyjaśnieniem tego zjawiska mógłby być bezpośredni wpływ kapsaicyny na ośrodki pnia mózgu, wywołujące odruch hipotensji poprzez uwalnianie substancji P (Donnerer i Lembeck, 1983), lub też jej wpływ na naczynia mózgowe unerwione przez kapsaicyno-wrażliwe włókna (Holzer, 1988). Ośrodkowy wpływ kapsaicyny na ciśnienie krwi pozostaje w pewnej sprzeczności z doniesieniem o słabej penetracji bariery krew-mózg przez RR (Tapia i wsp., 1976), którego użycie w moich doświadczeniach zapobiegło hipotensji. Nie można jednak zupełnie wykluczyć działania kapsaicyny na struktury mózgu, gdyż istnieją inne dane informujące o dużych zdolnościach docierania do mózgu czerwieni rutenu podanej dootrzewnowo, poprzez obszary pozbawione bariery (Feria-Velasco i wsp., 1990). Innym możliwym miejscem działania kapsaicyny, które należy wziąć pod uwagę są baroreceptory zatoki szyjnej (Pórszász i wsp., 1957; Brender i Webb-Peploe, 1969), ponieważ w moim eksperymencie pozostawiono je w stanie pełnego unerwienia. Za tą tezą przemawia redukcja spadku ciśnienia krwi po przecięciu nerwów zatokowych, zarejestrowana w pracy eksperymentalnej dotyczącej efektów kapsaicyny wstrzykiwanej do naczyń kończyny tylnej szczura (Smith i McQueen, 2001).

Zmiany wzorca oddechowego i ciśnienia krwi po dotętniczym podaniu GABA. Rola nerwów błędnych i zatokowych oraz skutki blokady receptorów $GABA_A$ i $GABA_B$

Następną substancją neuroaktywną zastosowaną w celu pobudzenia obwodowych struktur włączonych w regulację oddychania był kwas γ-aminomasłowy. Ponieważ w badaniach wstępnych nie zaobserwowano różnic we wzorcu oddechowym wywołanym podaniami GABA do żyły udowej i do tętnicy szyjnej wspólnej, wyniki niniejszej pracy zostały ograniczone wyłącznie do dotętniczej ścieżki iniekcji.

Wstrzyknięcie GABA do tętnicy szyjnej wspólnej skutkowało bardzo jednolitym i podobnym do

http://rcin.org.pl

pokapsaicynowego wzorcem odpowiedzi oddechowej, na który składały się: bezdech wydechowy i wzrost objętości oddechowej we wznowionym oddychaniu. Zatrzymanie oddychania po GABA polegałc na gwałtownym zahamowaniu wdechu i wydłużeniu fazy wydechowej, co przypomina bezdech występujący w chemoodruchu płucnym ze zniesieniem aktywności motoneuronów mięśni wdechowych i wydechowych (Coleridge i Coleridge, 1994). W przeciwieństwie do przyspieszonego oddychania obecnego po bezdechu w wyniku działania kapsaicyny, po GABA zaobserwowano krótkotrwałe, znajdujące się na granicy istotności statystycznej, zwolnienie rytmu oddechowego. Uzyskane wyniki są zbieżne z publikacją na temat depresyjnego wpływu GABA na oddychanie u szczura, objawiającego się jego zatrzymaniem (Holzer i Hagmüller, 1979). Wspomniana praca nie zawiera danych na temat objętości i częstości oddychania w fazie wznowionej wentylacji, tym niemniej zapis przebiegu oddychania i elektromiogramu przepony jednoznacznie ilustruje wzrost V_T po dożylnej i dotętniczej iniekcji GABA. Inni autorzy: Billingsley i Suria (1982) po bezdechu wywołanym dożylnie podanym kwasem γ-aminomasłowym zarejestrowali fazę przyspieszonego i płytkiego oddychania. Jak wynika ze skąpych danych literaturowych, szczur był jedynym zwierzęciem doświadczalnym regularnie odpowiadającym bezdechem na obwodową iniekcję GABA. Dożylne podanie kwasu spłycało głębokość oddechu u psów oraz stymulowało wentylację u królików i kotów, u tych ostatnich wywołując czasem pojedyncze epizody głębokich wdechów o charakterze westchnięć (Elliott i Hobbiger, 1958). Te rozbieżności w odpowiedziach oddechowych należy przypisać raczej różnicom międzygatunkowym niż stosowanym dawkom. Dawki w zakresie 0.01-10 mg/kg użyte w pracy Elliotta i Hobbigera (1958) były porównywalne do tych, stosowanych u szczura: 0.3-1 mg/kg (Billingsley i Suria, 1982), 1-100 μmol/kg (Holzer i Hagmüller, 1979) i 4 mg/kg (39 μmol/kg) w prezentowanej pracy.

http://rcin.org.pl

Działanie GABA w zastosowanym przeze mnie układzie doświadczalnym miało charakter obwodowy. Wykazano albowiem, że kwas γ-aminomasłowy bardzo słabo, jeśli w ogóle, przenika barierę krew-mózg (Purpura i wsp., 1958; Goa i Sorkin, 1993).

Ośrodkowe efekty oddechowe GABA różnią się od obwodowych odpowiedzi wentylacyjnych opisanych w niniejszej pracy. Podanie kwasu γ-aminomasłowego do komór mózgu lub na brzuszną powierzchnię rdzenia przedłużonego powodowało depresję objętości oddechowej u kota (Yamada i wsp., 1982) i psa (Kneussl i wsp., 1986).

Szczur natomiast reagował na dokomorową iniekcję GABA zahamowaniem oddychania, które dotyczyło zarówno obniżenia V_T jak i f (Hedner i wsp., 1981; Hedner i wsp., 1984), a w nielicznych przypadkach obserwowano krótkotrwałe epizody bezdechu (Sgaragli i Pavan, 1972). Rolę GABA w ośrodkowej regulacji wentylacji potwierdzają anatomiczne dowody wszechobecności systemu gabaergicznego w strukturach odpowiedzialnych za generowanie i kontrolę oddychania. Gabaergiczne unerwienie obejmuje między innymi: grzbietową i brzuszną grupę neuronów oddechowych, jądro zatwarzowe (kompleks Bötzingera), jądro dwuznaczne, jądro okołoramienne, ciała komórek i dendryty nerwu przeponowego (McCrimmon i wsp., 1995).

W obecnej pracy śródszyjna sekcja nerwów błędnych, wyłączająca czuciowe unerwienie z obszaru płuc nie zapobiegła zmianom oddechowym oraz spadkowi ciśnienia krwi, co wskazuje na pozawagalne miejsca działania GABA. Stymulacja oddychania wywołana kwasem γ-aminomasłowym, wyrażającą się zwiększoną objętością oddechową i wentylacją minutową jest charakterystyczna dla pobudzenia chemoreceptorów obwodowych (Cardenas i Zapata, 1983).

Z tego powodu w następnym etapie niniejszej pracy przeprowadzono deaferentację chemoreceptorów ciałek szyjnych. Obustronna sekcja nerwów zatokowych wykluczyła obecność bezdechu i następującego po nim pobudzonego oddychania (ryc. 16). Należy dodać, że nerw aortalny był zachowany w stanie nieuszkodzonym, co implikuje brak jego zaangażowania w

http://rcin.org.pl

oddechowe efekty GABA oraz w inne odpowiedzi oddechowe (Sapru i Krieger, 1977).

Uzyskane wyniki sugerują, że wysoka koncentracja GABA we krwi tętnicy szyjnej, pojawiająca się po podaniu obwodowym, pobudza ciałka szyjne szczura. Jak dotąd rola GABA w funkcjach chemorecepcyjnych pozostaje nie wyjaśniona. Nie ma danych na temat obecności GABA i jego receptorów w kłębkach szyjnych szczura. Potwierdzono natomiast, metodami immunohistochemicznymi, zawartość GABA w ciałkach szyjnych innych zwierząt. U kota była ona niewielka (Pokorski i Ohtani, 1999), w przeciwieństwie do kłębków myszy, w których immunoreaktywność GABA zarejestrowano we wszystkich komórkach chemorecepcyjnych (Oomori i wsp., 1994).

Uzyskaną w obecnej pracy odpowiedzią na egzogenny GABA był bezdech i tendencja do wzrostu objętości oddechowej.

Zatrzymanie oddychania może być zaindukowane poprzez informację czuciową docierającą do ośrodków mózgu generujących bezdech za pośrednictwem kilku nerwów czaszkowych włączając sitową gałązkę nerwu trójdzielnego, unerwiającego śluzówkę nosa, gałązek nerwu językowo-gardłowego i błędnego zaopatrujących czuciowo krtań, płuca i część ustna gardła (Chamberlin i Saper, 1998). O ile wzrost w V_T jest charakterystyczny dla pobudzenia chemoreceptorów ciałek szyjnych, o tyle bezdech wywołany ich aktywacją jest rzadko spotykany. Opisany został jako niestały efekt działania nikotyny przed deaferentacją chemoreceptorów ciałek szyjnych (Jacobs i wsp., 1971). Biorąc pod uwagę, wspomniane we wstępie właściwości systemu gabaergicznego można spekulować, że GABA wpłynęła na zmiany w oddychaniu za pośrednictwem innych neuroprzekaźników.

Niewiele wiadomo na temat, czy GABA moduluje przekaźnictwo w ciałkach szyjnych wpływając na uwalnianie katecholamin i tachykinin (Otsuka i Yoshioka, 1993).

Dowiedziono natomiast, że na obwodzie GABA może działać jako neuromodulator

http://rcin.org.pl

cholinergicznego, parasympatycznego układu nerwowego i przez aktywację receptora A zwiększać uwalnianie acetylocholiny w płucach świnki morskiej (Shirakawa i wsp., 1987). Opisano także hamujący wpływ na wyzwalanie tachykinin z włókien czuciowych nerwów zaopatrujących drogi oddechowe (Chapman i wsp., 1993). Efektem tych dwóch procesów może być skurcz mięśni gładkich dróg oddechowych i w pewnym sensie antagonizowanie go.

W doświadczeniach tej pracy wyłączenie informacji dośrodkowej z dróg oddechowych poprzez wagotomię eliminuje możliwość jej udziału w indukowaniu bezdechu.

W dostępnej literaturze istnieją dane wskazujące, że cienkie włókna czuciowe typu C są łatwo pobudzane przez GABA (Brown i Marsh, 1978; Highashi i wsp., 1982). Ponieważ nerwy zatokowe szczura w przeważającej większości są zbudowane z niemielinowych włókien (McDonald, 1983) może to wyjaśniać obserwowany kształt wzorca oddechowego, na który składa się zarówno pobudzenie chemoreceptorów ciałek szyjnych (zwiększenie objętości oddechowej) jak i aktywacja włókien C nerwu zatokowego (bezdech), powstałe w wyniku dotętniczej iniekcji kwasu.

Aby określić, który typ receptorów GABA jest odpowiedzialny za obserwowaną odpowiedź oddechową zastosowano dwóch antagonistów receptora $GABA_A$ oraz antagonistę receptora $GABA_B$. Zarówno bikukulina (antagonista kompetycyjny receptorów $GABA_A$) jak i pikrotoksyna (inhibitor kanału receptora) podane dożylnie, efektywnie wyeliminowały odpowiedź oddechową kwasu γ-aminomasłowego. Znajduje to potwierdzenie w skuteczności obu substancji użytych w badaniach nad efektami GABA in situ (De Groat, 1970, 1972; Gallagher i wsp., 1978), na poziomie rdzenia przedłużonego (Hedner i wsp., 1984; Da Silva i wsp., 1987) oraz po podaniu dożylnym (Holzer i Hagmüller, 1979). CGP 35348 specyficzny i jeden z najefektywniejszych antagonistów receptorów $GABA_B$ działający obwodowo i ośrodkowo (Olpe i wsp., 1990; Bolser i wsp., 1994) nie zablokował bezdechu i następującego po nim pobudzenia

http://rcin.org.pl

wentylacji. Uzyskane wyniki wskazują więc, że to receptory typu A pośredniczą w powstawaniu obwodowych efektów oddechowych GABA. Niniejsza praca stanowi pierwszą i jedyną próbę porównującą efekty oddechowe dotętniczej GABA u szczurów poddanych wagotomii i następnie sekcji nerwów zatokowych, jednoznacznie wskazującą na udział napędu z chemoreceptorów ciałek szyjnych w powstawaniu, zainicjowanego przez GABA bezdechu i zwiększonej wentylacji.

Nie istnieją właściwie żadne publikacje dotyczące funkcji obwodowych receptorów $GABA_A$ w regulacji oddychania. Wykazano natomiast, że ośrodkowe receptory $GABA_A$ odgrywają znaczącą rolę w generacji i kontroli fazowości wzorca oddechowego (Schmid i wsp., 1991). Według najnowszych badań endogenny GABA oddziałuje na oddychanie głównie poprzez receptory $GABA_A$ Jest to działanie hamujące wykazane zarówno w opuszkowych neuronach oddechowych (Haji i wsp., 1992; Schmid i wsp., 1996) jak i motoneuronach rdzeniowych nerwu przeponowego (Su i Chai, 1998) u kota. Dotyczy ono także ośrodkowych zakończeń chemoreceptorów tętniczych i neuronów mostowego ośrodka pneumotaksycznego. Pobudzenie receptorów typu A w rejonie jądra spoidłowego NTS-u u szczura hamuje odruch z chemoreceptorów obwodowych (Suzuki i wsp., 2003). U tego samego zwierzęcia wykazano, że mostowy ośrodek pneumotaksyczny znajduje się pod silnym gabaergicznym hamowaniem, a blokada receptorów $GABA_A$ prowadzi do długotrwałego zakłócenia aktywności oddechowych (Dutschmann i Herbert, 1998). Także podstawowe w wagalnej regulacji oddychania wyłączenie fazy wdechu jest zależne od aktywacji ośrodkowych receptorów $GABA_A$ (Haji i wsp., 1999).

Tak więc generalnie hamujące ośrodkowe neuroprzekaźnictwo GABA wydaje się być sprzeczne z obwodową stymulacją oddychania obserwowaną w doświadczeniach tej pracy. Można sądzić, że mniejsza zawartość GABA i jego receptorów w obwodowym układzie nerwowym, a także pośrednictwo w uwalnianiu innych neuroprzekaźników, powodują w

http://rcin.org.pl

rezultacie pobudzenie oddychania.

Zaobserwowany w obecnej pracy spadek ciśnienia tętniczego krwi pozostaje w zgodzie z wynikami wcześniejszych badań nad krążeniowymi efektami dożylnej GABA u różnych gatunków zwierząt (Elliott i Hobbiger, 1958; Billingsley i Suria, 1982; Vemulapalli i Barletta, 1984). Żadne z wykonanych przeze mnie odnerwień nie doprowadziło do usunięcia hipotensji spowodowanej dotętniczą iniekcją GABA. Przypuszczalnym miejscem oddziaływania GABA na ciśnienie krwi mogą być zatem zwoje sympatyczne. Założenie to znajduje poparcie w badaniach Velmulapalliego i Barletty (1984), którzy dowiedli, że wywołana przez GABA hipotensja zostaje zniesiona po zablokowaniu zwojów heksametonium i atropiną. Niewykluczone, że GABA działa przez swoje receptory zaopatrujące zwoje sympatyczne (De Groat, 1970; Balcar i wsp., 1986) i hamując w nich przekaźnictwo powoduje spadek ciśnienia. Ewentualny ośrodkowy wpływ na ciśnienie krwi jest bardzo wątpliwy, z uwagi na niską, wspomnianą wcześniej, przenikalność bariery przez GABA. Faktem potwierdzającym udział obwodowych receptorów GABA w powstawaniu hipotensji było jej wyeliminowanie po zastosowaniu bikukuliny - blokera, który nie przekracza bariery krew-mózg (Limmroth i wsp., 1996). Drugim skutecznym antagonistą zapobiegającym spadkowi ciśnienia była pikrotoksyna, co jednoznacznie wskazuje na receptor typu A, odpowiadający za hipotensję wywołaną obwodowym podaniem GABA.

Zmiany wzorca oddechowego i ciśnienia krwi wywołane dożylnym i dotętniczym podaniem NMDA. Wpływ obustronnej wagotomii śródszyjnej, nadguzkowej, sekcji nerwów zatokowych oraz blokady receptorów NMDA

Następną klasą receptorów, licznie reprezentowanych w płucach i drogach oddechowych szczura (Dickman i wsp., 2004), których funkcję w regulacji oddychania badano były receptory NMDA. Ich pobudzenie wywołane dotętniczym lub dożylnym podaniem kwasu N-metylo-D-

http://rcin.org.pl

asparaginowego spowodowało zróżnicowany wzorzec odpowiedzi oddechowych.

Na odpowiedź wentylacyjną uzyskaną w wyniku iniekcji dożylnej składały się: bezpośrednie obniżenie objętości oddechowej oraz zwolnione oddychanie obecne w 30 s od zakończenia iniekcji. Po iniekcji do tętnicy szyjnej wspólnej zarejestrowano natychmiastowe zatrzymanie oddychania z krótkotrwałym obniżeniem objętości we wznowionym oddychaniu, po którym następowało pobudzenie oddychania. Na to ostatnie składały się: zwiększenie objętości i częstości oddychania. Pojawienie się bezdechu nie było stałym zjawiskiem, ale zdecydowanie częściej obserwowano je przy dotętniczej ścieżce podania.

Receptory aminokwasów pobudzających w tkankach obwodowych nie były przedmiotem intensywnych badań. Nie ma w literaturze danych dotyczących obwodowego wpływu NMDA na oddychanie, co utrudnia interpretację i dyskusję uzyskanych wyników. Niemniej są one generalnie zgodne z rezultatami badań zajmującymi się efektami oddechowymi NMDA podanego do NTS-u szczura. Pobudzenie receptorów NMDA w tym obszarze wywoływało bezdech (Bonham i wsp., 1993; Berger i wsp., 1995), z towarzyszącym spadkiem ciśnienia tętniczego krwi i częstości skurczów serca (Vardhan i wsp., 1993 b). Iniekcja NMDA w okolice jądra spoidłowego, będącego miejscem projekcji włókien z chemoreceptorów obwodowych, wyzwoliła wzrost wentylacji minutowej (Vardhan i wsp., 1993 a). U kota z kolei wstrzyknięcie NMDA do neuronów oddechowych w jądrze okołoramiennym zainicjowało gwałtowne i płytkie oddychanie oraz pobudzenie wentylacji zależne od specyficznego miejsca mikroiniekcji (Takayama i Miura, 1993).

W prezentowanych doświadczeniach depresyjny wpływ NMDA na oddychanie, prowadzący do obniżonej objętości oddechowej i przedłużonego czasu wydechu (przy dożylnej ścieżce iniekcji) oraz do bezdechu i początkowego spadku w V_T (przy dotętniczej), mógłby wynikać z aktywacji receptorów NMDA licznie rozmieszczonych w płucach szczura (Dickman i

http://rcin.org.pl

wsp., 2004) znajdujących się w zasięgu krążenia płucnego i układowego.

Typ uzyskanych odpowiedzi oddechowych kwestionuje pobudzenie płucnych włókien C, powodujące bezdech z następowym przyspieszonym rytmem oddechowym (Lee i Pisarri, 2001). Wydawałoby się zatem, że przedłużenie T_E mogłoby zależeć od wzrastającej fazowej aktywności płucnych receptorów typu SARs, która w rezultacie prowadzi do spadku objętości oddechowej (Schelegle i Green, 2001). Nie ma danych eksperymentalnych wyjaśniających czy i jak NMDA działa na receptory wolno adaptujące. Niemniej wykazano, że receptory NMDA obecne na neuronach NTS-u są odpowiedzialne za odruch Heringa-Breuera (Conelly i wsp., 1992) oraz za powstanie bezdechu (Bonham i McCrimmon, 1990).

Koncepcja ta nie znalazła jednak potwierdzenia w dalszym toku doświadczeń, w których odcięcie informacji z receptorów płucnych nie wyeliminowało spadku V_T, zwolnionego rytmu oddychania, ani też bezdechu. Brak pośrednictwa płucnych pni nerwów błędnych w powstawaniu zmian wzorca oddechowego nie wykluczył możliwego hamującego wpływu NMDA poprzez działanie na receptory NMDA znajdujące się w zwojach guzkowych i na drogach wagalnych powyżej tego zwoju. Obecność receptorów NMDA została udokumentowana w zwojach parasympatycznych, nerwach błędnych wstępujących ze zwojów parasympatycznych i w zwojach guzkowych (Erdö, 1991; Shigemoto i wsp., 1992). W celu weryfikacji hipotezy, że obwodowym miejscem działania NMDA są zwoje guzkowe, przeprowadzono następną serię doświadczeń, w której dokonywano ich usunięcia. Wagotomia nadguzkowa nie zapobiegła jednak depresji V_T i f , obecnych po podaniu NMDA do żyły udowej. Niemniej wpływ NMDA na tę ostatnią zmienną był zredukowany, co znalazło wyraz w znamiennie krótszym przedłużeniu T_E po usunięciu zwojów guzkowych. Przy podaniu dotętniczym zaobserwowano zarówno bezdech jak i poprzedzone spadkiem, zwiększenie objętości oddechowej, pojawiające się pomimo neurotomii nadguzkowej. Jakkolwiek średnia długość współczynnika zahamowania wydechu

http://rcin.org.pl

została zredukowana o 40 %, to różnice te nie były znamienne statystycznie. W świetle przedstawionych informacji, wydaje się więc, że aktywacja receptorów NMDA rozmieszczonych w zwojach guzkowych, w niewielkim stopniu, jeśli w ogóle, wpływają hamująco na rytm oddechowy.

Rozpatrując możliwe drogi informacji aferentnej odpowiedzialne za zmiany oddychania wywołane iniekcją kwasu NMDA, należało wziąć pod uwagę chemoreceptory ciałek szyjnych i nerwy zatokowe. Na typową odpowiedź, charakterystyczną dla pobudzenia kłębków szyjnych składają się zwiększona objętość oddechowa i przyspieszony rytm oddychania (Sapru i Krieger, 1977; Cardenas i Zapata, 1983). W 1981 roku Cardenas i Zapata opisali także depresję wentylacji (spadek w V_T i f), zależną od zachowanego unerwienia chemoreceptorów ciałek szyjnych, spowodowaną dożylnym wstrzyknięciem dopaminy. Opisany w niniejszej pracy wzorzec odpowiedzi oddechowej, uzyskany w wyniku dożylnej czy też dotętniczej ścieżki podania, nie wyklucza więc prawdopodobnego udziału chemoreceptorów obwodowych w obserwowanych efektach. Za przyjęciem tej koncepcji przemawiają rezultaty dalszych eksperymentów, w których sekcja nerwów zatokowych zniosła zahamowanie oddychania (iniekcja do żyły) oraz bezdech i wzrost objętości oddechowej poprzedzony krótkotrwałym spadkiem (iniekcja do tętnicy).

Mechanizmy leżące u podstaw działania NMDA na chemoreceptory obwodowe są dalekie od wyjaśnienia. Nie ma również żadnych danych na temat obecności receptorów NMDA w ciałkach szyjnych, co potwierdziłoby uzyskane wyniki. Wiadomo natomiast, że glutaminian występuje w wysokich koncentracjach w komórkach chemorecepcyjnych kota (Torrealba i wsp., 1996), co stanowi przypuszczalny dowód pośredni ekspresji wiążących go receptorów NMDA. Istnieją dane piśmiennictwa dostarczające dowodów na uwalnianie glutaminianu z włókien dośrodkowych chemoreceptorów obwodowych do NTS-u (Lewis i wsp., 1987; Houseley i Sinclair, 1988), które wzrasta po wpływem bodźca hipoksyjnego (Richter i wsp., 1999).

http://rcin.org.pl

Dodatkowo wykazano, że receptory NMDA znajdujące się na wydechowych neuronach opuszkowych psa są odpowiedzialne za przekaźnictwo pobudzenia z chemoreceptorów obwodowych (Dogaš i wsp., 1995). Spadek częstości oddychania następujący po hipoksji zależy od aktywacji tychże receptorów w neuronach mostu i rdzenia przedłużonego (Coles i wsp., 1998). Aktywacja ośrodkowych receptorów NMDA okazała się być krytyczną dla pojawienia się odpowiedzi oddechowej na hipoksję u nieuśpionych szczurów (Ohtake i wsp., 1998) i uśpionych psów (Ang i wsp., 1992). Powyższe dane wyraźnie implikują niezwykle istotną rolę centralnych receptorów NMDA w powstawaniu odpowiedzi wentylacyjnej wywołanej hipoksją.

Niniejsza praca jest pierwszym doniesieniem dokumentującym pośrednictwo chemorecepcyjnych dróg dośrodkowych w inicjowaniu odpowiedzi oddechowej na obwodowo podany NMDA. Przypuszczalnie odbywa się ono poprzez receptory NMDA znajdujące się w ciałkach szyjnych i nerwach zatokowych. Nie ma danych piśmiennictwa na temat wpływu neuromodulacyjnego NMDA na uwalnianie katecholamin z kłębków szyjnych. Potwierdzono natomiast pobudzające właściwości NMDA na uwalnianie dopaminy z neuronów mózgu świnek morskich i szczurów (Kathmann i wsp., 1999; Whitehead i wsp., 2001). Ciałka szyjne szczura są zdecydowanie dopaminergicznym organem (Gonzalez i wsp., 1995). Niewykluczone więc, że w prezentowanych doświadczeniach NMDA działał za pośrednictwem dopaminy, której wspomniane już wcześniej efekty oddechowe (obniżenie V_T i f) przypominają wzorzec oddechowy uzyskany w wyniku iniekcji dożylnej NMDA.

Pomimo, że nie ustalono dotychczas właściwości przenikania przez NMDA bariery krew mózg, z całą pewnością za odpowiedź oddechową odpowiedzialne są obwodowe receptory NMDA. Wskazuje na to dożylnie zastosowana w prezentowanych doświadczeniach blokada z użyciem AP-7, bardzo słabo penetrującym barierę (Lodge i Danysz, 2002), który skutecznie eliminował efekty oddechowe NMDA.

http://rcin.org.pl

Zastanawiające są różnice w odpowiedziach oddechowych spowodowane dwiema różnymi drogami iniekcji. U szczura, ze względu na jego mały rozmiar, substancja podana do tętnicy szyjnej wspólnej bardzo szybko zostaje dostarczona do krążenia żylnego. Dysponując obecnymi wynikami, w których oba wzorce odpowiedzi znoszone są przez przecięcie nerwów zatokowych należy spodziewać się, że chemoreceptory ciałek szyjnych są punktem uchwytu dla NMDA podanego zarówno dożylnie jak i dotętniczo. Prawdopodobnie iniekcja do tętnicy szyjnej wspólnej, bezpośrednio zaopatrującej w krew kłębki szyjne, raptownie dostarcza całą ilość NMDA do komórek chemorecepcyjnych, powodując bardziej zdecydowaną i wyrazistą odpowiedź, w tym bezdech.

Podanie do żyły udowej, dostarczające z pewnym opóźnieniem tylko część wstrzykniętej substancji w obszar rozwidlenia tętnicy szyjnej wspólnej, wywołuje znacznie ograniczony efekt oddechowy.

Odpowiedź ciśnienia tętniczego krwi wywołana przez NMDA: krótkotrwały wzrost z następującym po nim spadkiem była jednakowa niezależnie od ścieżki podania. Pojawiała się bez względu na przeprowadzoną wagotomię śródszyjną, nadguzkową, sekcję nerwów zatokowych i blokadę receptorów NMDA przy pomocy AP-7. Nagła hipertensja mogła być wynikiem wzrostu napędu współczulnego oraz uwalniania katecholamin zaindukowanych przez kwas NMDA (Ramage i wsp., 1998). Dane piśmiennictwa skupiają się głównie na ośrodkowych efektach krążeniowych NMDA, przy czym wyniki są często sprzeczne. Wykazano, że NMDA czy L-glutaminian podane do miejsca sinawego czy jądra spoidłowego mogą powodować znaczny wzrost ciśnienia krwi (Hall i wsp., 1998; Marchenko i Sapru, 2000), a także odpowiedź depresyjną (Merahi i wsp., 1992; Matsuo i wsp., 2001). Typ odpowiedzi krążeniowej wydaje się być związany ze specyficznym miejscem mikroiniekcji substancji.

Według jedynej publikacji zajmującej się wpływem obwodowo podanego NMDA na ciśnienie

http://rcin.org.pl

krwi (Sitniewska, 2003), 4-krotnie niższa dawka NMDA inicjowała podobną do prezentowanej w obecnej pracy odpowiedź ciśnieniową. Różnice polegały na tym, że w cytowanej pracy efekt był znacznie bardziej opóźniony i nieznamienny oraz został zablokowany przy użyciu AP-7. Przypuszczalnie zastosowana przeze mnie dawka AP-7 była niewystarczająca do wyeliminowania zmian ciśnienia wywołanych wyższą dawką NMDA (4 mg/kg), której używałam. Nie można wykluczyć ośrodkowego miejsca genezy odruchu presyjnego i depresyjnego ciśnienia krwi, skoro nie istnieją dane na temat penetracji NMDA przez barierę krew-mózg. Jeśli przyjąć, jednak, że NMDA charakteryzuje się niską przenikalnością, to może ono wpływać na ciśnienie stymulując receptory obecne na neuronach rdzenia kręgowego (Krenz i Weaver, 1998), zwojach współczulnych (Shigemoto i wsp., 1992), czy w samym sercu (Robertson i wsp., 1998).

Sugeruje się, że pobudzenie receptorów NMDA zapoczątkowuje produkcję tlenku azotu (NO), (Robertson i wsp., 1998). NO może pośrednio wpływać na zmiany ciśnienia krwi poprzez działanie na naczynia krwionośne. Wykazano eksperymentalnie, że NO uwalniany z neuronów NTS-u w wyniku aktywacji zaopatrujących je receptorów NMDA, indukuje zależną od dawki hipotensję i bradykardię (Wu i wsp., 2000; Matsuo i wsp., 2001).

Zmiany oddychania oraz ciśnienia krwi wywołane dożylną iniekcją klonidyny. Wpływ obustronnej wagotomii szyjnej, przecięcia nerwów zatokowych oraz blokady receptorów α_2-adrenergicznych

Kolejnym przedmiotem zainteresowania obecnej pracy były receptory α_2-adrenergiczne. Według ostatnich danych receptory te są zaangażowane w regulację rytmu oddechowego (Rives i Bernard, 2001; O'Halloran i wsp., 2001). Nie zbadano jednak, jak dotąd, wyczerpująco efektów

http://rcin.org.pl

oddechowych spowodowanych pobudzeniem receptorów α_2-adrenergicznych ani dróg aferentnych odpowiedzialnych za ich powstanie.

Przedstawione doświadczenia wykazały, że stymulacja receptorów α_2-adrenergicznych wywołana podaniem klonidyny do żyły udowej moduluje rytm oddechowy, powodując natychmiastowe i długotrwałe jego zwolnienie. Istotne zmiany objętości oddechowej charakteryzowały się krótkotrwałym obniżeniem, po którym następował wzrost obecny do 2 minut po iniekcji. Zwiększeniu V_T odpowiadał znamienny wzrost amplitudy elektromiogramu przepony. Obserwowane zmiany wentylacyjne były niezależne od obecności sprzężenia wagalnego z płuc. Jest to zgodne z poprzednimi doniesieniami, w których efekty oddechowe pobudzenia receptorów α_2-adrenergicznych nie były znoszone przez wagotomię (O'Halloran i wsp., 1999b; O'Halloran i wsp., 2001). Zaznaczyć należy, że badania te dotyczyły innych gatunków zwierząt niż szczur oraz, że rejestrowano w nich niejednokrotnie odmienny wzorzec odpowiedzi uzyskany w wyniku aktywacji receptorów α_2-adrenergicznych. W jedynej dostępnej publikacji, w której podawano dożylnie klonidynę uśpionym szczurom również zaobserwowano obniżenie częstości oddychania (Fuxe i wsp., 1982). Niestety nie badano w niej wpływu wagotomii na powstały efekt oddechowy. Uśpione kozy poddane obustronnej wagotomii szyjnej i odnerwieniu chemoreceptorów ciałek szyjnych reagowały na klonidynę podobnie, zmniejszoną częstością oddychania (Hedrick i wsp., 1994). Z kolei u nieuśpionych kóz klonidyna indukowała nieregularny wzorzec oddechowy, na który składały się epizody gwałtownego, płytkiego oddychania, wydłużenia czasu wydechu oraz bezdech (Hedrick i wsp., 1994; O'Halloran i wsp., 1999a; O'Halloran i wsp., 1999b).

Przyczyny rozbieżności w odpowiedzi oddechowej wywołanej klonidyną pomiędzy tymi ostatnimi danymi piśmiennictwa a obecną pracą wydają się wynikać z różnic międzygatunkowych, lub po prostu z faktu zastosowania narkozy. Używana w niniejszej pracy

http://rcin.org.pl

dawka klonidyny była 3-krotnie wyższa niż stosowana przez wymienionych autorów, nie można więc zaistniałych różnic tłumaczyć zbyt małą dawką, nieskuteczną w wywoływaniu bezdechu czy tachypnei.

Obecność receptorów α_2-adrenergicznych w kłębkach szyjnych kota i królika, wykazana przez Kou i wsp.(1991). oraz Ernsberger'a i wsp., (1998), sugeruje możliwy udział chemoreceptorów ciałek szyjnych w obserwowanych efektach wentylacyjnych. Dlatego też kolejnym etapem prezentowanych badań eksperymentalnych było przeprowadzenie deaferentacji wyżej wymienionych struktur chemowrażliwych.

Przecięcie nerwów zatokowych zredukowało zmiany w objętości oddechowej, nie wpłynęło jednak na zwolnienie rytmu oddechowego, co jest zgodne z poprzednio przytoczonymi wynikami (Hedrick i wsp., 1994).

Przypuszczać należy, że uzyskany w obecnej pracy spadek V_T, po którym następuje jej zwiększenie jest spowodowany wyższą dawką klonidyny i zależy od obwodowych receptorów α_2-adrenergicznych, rozmieszczonych w ciałkach szyjnych (Almaraz i wsp., 1997). Wcześniejsze badania wykazały zróżnicowany wpływ dożylnej klonidyny na aktywność chemoreceptorów, hamujący a także stymulujący. Sugerowano, że za efekt pobudzający odpowiedzialne są receptory imidazolinowe I_1, za hamujący natomiast α_2-adrenergiczne (Ernsberger i wsp.,1998). Pozostaje to w sprzeczności z uzyskanymi przeze mnie wynikami, w których zastosowanie specyficznego antagonisty receptorów α_2 –SKF 86466 zapobiegło poklonidynowym zmianom oddechowym, wykazując jednoznacznie pośrednictwo α_2-adrenergicznych dróg nerwowych zarówno w inicjacji zwiększenia V_T jak i zwolnionego oddychania. Należy również wziąć pod uwagę możliwy, pośredni wpływ przejściowego wzrostu ciśnienia krwi, wynikającego z aktywacji naczyniowych receptorów α_2 na zmiany w objętości oddechowej. Następująca po skurczu naczyń krwionośnych hipotensja mogłaby stymulować ciałka szyjne, wywołując w

http://rcin.org.pl

następstwie wzrost V_T, co wyjaśniałoby dlaczego deaferentacja chemoreceptorów ciałek szyjnych jedynie redukuje zmiany w objętości oddechowej na tyle, że stają się one nieistotne statystycznie.

Długotrwałe zwolnienie rytmu oddechowego powstaje najwyraźniej w wyniku aktywacji ośrodkowych receptorów α_2, za czym przemawia fakt, że klonidyna jest substancją przenikającą barierę krew-mózg (Panagiotidis i wsp., 1993). Opublikowano szereg prac mających na celu określenie roli ośrodkowych receptorów α_2 w kontroli oddychania. Ich agoniści zastosowani centralnie zwalniają lub hamują oddychanie u zwierząt (McCrimmon i Lalley, 1982; Burton i wsp., 1990; Errchidi i wsp., 1991) i ludzi (Ooi i wsp., 1991; Narchi i wsp., 1992). Z kolei selektywna blokada receptorów α_2 stymuluje wentylację u psów (Burton i wsp., 1990) oraz zwiększa częstość oddychania u szczurów (Coles i wsp., 1998). Blokada receptorów α_2-adrenergicznych przy użyciu SKF 86466 w niniejszej pracy również stymulowała wentylację, przyczyniając się głównie do wzrostu objętości oddechowej. Przypuszczać zatem należy, że mechanizm pobudzonej wentylacji w wyniku blokady receptorów α_2-adrenergicznych polega na usunięciu powodowanego przez nie tonicznego hamowania generatora rytmu oddechowego w rdzeniu przedłużonym.

Wykazano ponadto, że receptory α_2-adrenergiczne są powszechnie obecne w obszarach rdzenia przedłużonego związanych z kontrolą oddychania i krążenia (Guyenet i wsp., 1994; Schreihofer i Guyenet, 2000). Miejsca te to również jądro pęczka samotnego (Feldman i Moises, 1988), jądro dwuznaczne i brzuszna grupa neuronów oddechowych (Ellenberger i Feldman, 1990) oraz katecholaminergiczne i serotonergiczne neurony rdzenia przedłużonego (Pilowsky i wsp., 1990; Guyenet i wsp., 1994).

Depresyjna odpowiedź oddechowa wywołana klonidyną może być wynikiem nie tylko bezpośredniej aktywacji receptorów α_2, ale także ich hamującego wpływu na uwalnianie innych

http://rcin.org.pl

przekaźników, takich jak acetylocholina (Burton i wsp.,1990) czy kwas glutaminowy (Kamisaki, 1993).

Dożylnie podana klonidyna spowodowała dwufazową odpowiedź ciśnienia krwi: początkowy, krótkotrwały wzrost i następnie długotrwałą hipotensję. Jest to typowa odpowiedź uzyskana w wyniku dożylnej iniekcji agonistów receptorów α_2 u ludzi (Kallio i wsp., 1989; Bloor i wsp., 1992) i różnych gatunków zwierząt (Sannajust i wsp., 1992; Soares de Moura i wsp., 2000).

Jak wynika z piśmiennictwa za presyjny składnik dwufazowej reakcji ciśnienia odpowiadają receptory α_2 znajdujące się na mięśniówce gładkiej naczyń krwionośnych, natomiast hipotensja warunkowana jest aktywacja tychże receptorów rozmieszczonych w rdzeniu przedłużonym (Guimaraes i Moura, 2001; Yamazato i wsp., 2001). Znajduje to potwierdzenie w uzyskanych wynikach, gdyż żadna z przeprowadzonych sekcji: nerwów błędnych czy też zatokowych nie zapobiegła zmianom ciśnienia tętniczego krwi.

Efekt hipotensji został wyeliminowany po zastosowaniu selektywnej blokady receptorów α_2-adrenergicznych przy użyciu SKF 86466, podobnie jak w badaniach Hayar i Guyenet (2000). Trudno wyjaśnić, dlaczego antagonista nie zablokował odpowiedzi presyjnej. Niewykluczone, że mogło to być spowodowane zastosowaniem zbyt małej dawki.

Przedstawiona praca wykazała, że efekty oddechowe badanych substancji były niezależne od dróg czuciowych przewodzonych drogą nerwu błędnego z obszaru dolnych dróg oddechowych. Bezdech wydechowy, będący ekstremalną formą niestabilności wzorca oddechowego, był efektem stałym obwodowego działania kwasu γ-aminomasłowego i kapsaicyny. Pojawiał się także po dotętniczej iniekcji NMDA. Hamujący wpływ dożylnie podanego NMDA na objętość i częstość oddychania w sporadycznych przypadkach prowadził do bezdechu. Niniejsza praca stanowi pierwszą próbę zebrania danych na temat wzorca odpowiedzi

http://rcin.org.pl

oddechowo-krążeniowych wywołanych obwodową iniekcją kwasu NMDA.

Potwierdzono, że poprzedzone krótkotrwałym spadkiem, zwiększenie objętości oddechowej wynikające z pobudzenia chemoreceptorów ciałek szyjnych przez klonidynę skojarzone było ze sterowanym ośrodkowo długotrwałym zwolnieniem rytmu oddechowego.

W poszukiwaniu dróg dośrodkowych dla indukcji odruchów oddechowych wykazano po raz pierwszy udział nerwu krtaniowego górnego w generacji pokapsaicynowgo bezdechu i wzrostu V_T u szczura. Dowiedziono, że zachowanie aferentacji z chemoreceptorów ciałek szyjnych jest warunkiem wystąpienia zmian oddechowych wywołanych przez GABA i NMDA i stanowi to również pierwszą obserwację oddziaływania obu neuroprzekaźników w tym obszarze.

http://rcin.org.pl

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Wzorzec oddechowy wywołany dożylnym podaniem kapsaicyny u szczura charakteryzuje się bezdechem i zwiększoną objętością oddechową we wznowionej wentylacji. Dośrodkową drogę dla tych zmian stanowi nerw krtaniowy górny. Aktywacja receptorów waniloidowych jest odpowiedzialna za zmiany wzorca oddechowego jak i pokapsaicynowy spadek ciśnienia tętniczego.
2. Odruchy oddechowe wywołane obwodowym podaniem kwasu γ-aminomasłowego charakteryzują się bezdechem z następującą po nim hiperwentylacją i przewodzone są przez nerw zatokowy. Zarówno w zmianach oddechowych jak i w odpowiedzi hipotensyjnej pośredniczą receptory $GABA_A$.
3. Dożylne podanie kwasu N-metylo-D-asparaginowego prowadzi do depresji oddechowej z obniżoną objętością oddechową i zwolnionym rytmem oddechowym. Dotętnicze podanie kwasu prowadzi do bezdechu, krótkotrwałego spadku i następnie wzrostu objętości oddechowej. Zarówno przy podaniu dożylnym jak i dotętniczym substancji, efekty oddechowe są zależne od zachowania unerwienia ciałek szyjnych i aktywacji receptorów NMDA. Krótkotrwała odpowiedź presyjna na podanie NMDA zachodzi niezależnie od tych dwóch czynników.
4. Długotrwałe zwolnienie oddychania wywołane dożylnym podaniem klonidyny zachodzi niezależnie od nerwów zatokowych; najprawdopodobniej wywołane jest pobudzeniem ośrodkowych receptorów α_2-adrenergicznych. Przejściowe zmiany objętości oddechowej: spadek a następnie wzrost, uwarunkowane są zachowaną aferentacją z kłębków szyjnych.

Informacja z receptorów obwodowych GABA, NMDA, waniloidowych i α_2-adrenergicznych zmienia ośrodkowy napęd oddechowy prowadząc do krótkotrwałej niestabilności wzorca oddechowego (bezdech), z następową depresją lub pobudzeniem poszczególnych jego składowych. W mechanizmie tego zjawiska nie pośredniczy istotne w obwodowej regulacji oddychania sprzężenie wagalne z płuc. W generacji odpowiedzi oddechowych pośredniczą natomiast wejścia chemorecepcyjne i informacja czuciowa z krtani.

http://rcin.org.pl

PIŚMIENNICTWO

Aicher S.A., Sharma S., Pickel V.M. N-methyl-D-aspartate receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the nucleus tractus solitarius. Neurosci. 91 (1): 119-132. 1999.

Almaraz L., Perez-Garcia M.T., Gomez-Nmo A., Gonzalez C. Mechanisms of alpha2-adrenoceptor-mediated inhibition in rabbit carotid body. Am. J. Physiol. 272: C628-C637. 1997.

Ang R.C., Hoop B., Kazemi H. Role of glutamate as the central neurotransmitter in the hypoxic ventilatory response. J. Appl. Physiol. 72 (4): 1480-1487. 1992.

Ashworth-Preece M., Krstew E., Jarrott B., Lawrence A J. Functional GABAA receptors on rat vagal afferent neurons. Br. J. Pharmacol. 120 (3): 469-475. 1997.

Balcar V.J., Joo F., Kasa P., Dammasch J.E., Wolf J.R. GABA receptor binding in rat cerebral cortex and superior cervical ganglion in the absence of GABA-ergic synapses. Neurosci. Lett. 66: 264-274. 1986.

Berger I., Gillis R.A., Vitagliano S., Panico W.H., Magee S., Kelly M., Norman W.P., McManigle J.E., Taveira DaSilva A.M. NMDA receptors are involved at the ventrolateral nucleus tractus solitarii for termmation of inspiration. Eur. J. Pharmacol. 277: 195-208. 1995.

Bianchi A.L., Denavit-Saubie M., Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. Physiol. Rev. 75 (1): 1-45. 1995.

Billingsley M.L., Suria A. Effects of peripherally admimstered GABA and other amino-acids on cardiopulmonary responses in anaesthetized rats and dogs. Arch. Int. Pharmacodyn. 255: 131-140. 1982.

Bloor B.C., Ward D.C., Belleville J.P., Maze M. Effects of intravenous dexemedetomidine in humans. II. Hemodynamic changes. Anesthesiol.77 (6): 1134-1142. 1992.

Bolser D.C., DeGennaro F.C., O'Reilly S., Chapman R.W., Kreutner W., Egan R.W., Hey J.A. Peripheral and central sites of action of GABA-B agomsts to inhibit the cough reflex in the cat and guinea pig. Br. J. Pharmacol. 113: 1344-1348. 1994.

Bonham A.C., Coles S.K., McCrimmon D.R. Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. J. Physiol. 464: 725-745. 1993.

Bonham A.C., McCrimmon D.R. Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hermg reflex in rat. J. Physiol. 427: 261-280. 1990.

Bowery N.G., Brown D.A. Depolarizing actions of γ-ammobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglia in vitro. Br. J. Pharmacol. 50: 205-218. 1974.

Bowery N.G., Pratt G.D. $GABA_B$ receptors as targets for drug action. Drug Res. 42: 215-223.

http://rcin.org.pl

1992.

Brender D., Webb-Peploe M.M. Vasculary responses to stimulation of pulmonary and carotid baroreceptors by capsaicin. Am. J. Physiol. 217: 1837-1845. 1969.

Brophy S., Ford T.W., Carey M., Jones J.F.X. Activity of aortic chemoreceptors in the anaesthetized rat. J. Physiol. 514.3: 821-828. 1999.

Bucheler M.M., Hadamek K., Hein L. Two alpha (2)-adrenergic receptor subtypes, alpha (2A) and alpha (2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. Neurosci. 109 (4): 819-826. 2002.

Burton M.D., Johnson D.C., Kazemi H. Adrenergic and cholmergic interaction in central ventilatory control. J. Appl. Physiol. 68 (5): 2092-2099. 1990.

Canesin R.O., Bonagamba L.G.H., Machado B.H. Bradycardic and hypotensive responses to microinjection of L –glutamate into the lateral aspect of the commissural NTS are blocked by an NMDA receptor antagonist. Brain Res. 852: 68-75. 2000.

Cardenas H., Zapata P. Dopamine-induced ventilatory depression in the rat, mediated by carotid nerve afferents. Neurosci. Lett. 24(1): 29-33. 1981.

Cardenas H., Zapata P. Ventilatory reflexes originated from carotid and extracarotid chemoreceptors in rats. Am. J. Physiol. 244: R119-R125. 1983.

Caterina M.J., Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. Annu. Rev. Neurosci. 24: 487-517. 2001.

Chamberlin N.L., Saper C.B. A bramstem network mediating apneic reflexes in the rat. J. Neurosci. 18 (15): 6048-6056. 1998.

Chapman R.W., Hey J.A., Rizzo C.A., Bolser D.C GABA$_B$ receptors in the lung. Trends Pharmacol. Sci.14: 26-29. 1993.

Coles S.K., Ernsberger P., Dick T.E. A role for NMDA receptors in posthypoxic frequency decline in the rat. Am. J. Physiol. 274: R1546-R1555. 1998.

Coleridge H.M., Coleridge J.C.G. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 99: 1-110. 1984.

Coleridge H.M., Coleridge J.C.G. Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. Annu. Rev. Physiol. 56: 69-91. 1994.

Coleridge H.M., Coleridge J.C.G., Kidd C. Role of the pulmonary arterial baroreceptors in the effects produced by capsaicin in the dog J. Physiol. (London) 170: 272-285. 1964.

Connelly C.A., Otto-Smith R., Feldman J.L. Blockade of NMDA receptor-channels by MK-801 alters breathing in adult rats. Brain Res. 596: 99-110. 1992.

http://rcin.org.pl

Danysz W., Parsons C.G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. Pharmacol. Rev. 50 (4): 597-664. 1998.

Da Silva A.M.T., Hartley B., Hamosh P., Quest J. A., Gillis R.A. Respiratory depressant effects of GABA α- and β-receptor agonists in the cat. J. Appl. Physiol. 62 (6): 2264-2272. 1987.

De Groat W.C. The actions of γ-aminobutyric acid and related aminoacids on mammalian autonomic ganglia. J. Pharm. Exp. Ther. 172: 348-396. 1970.

De Groat W.C. GABA-depolarization of a sensory ganglion: antagonism by picrotoxin and bicuculline. Brain Res. 38: 429-431. 1972.

Dickman K.G., Youssef J.G., Said S.I. Ionotropic glutamate receptors in lungs and airways molecular basis for glutamate toxicity. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 30 (2): 139-143. 2004.

Dogaš Z., Stuth E.A.E., Hopp F.A., McCrimmon D.R., Zuperku E.J. NMDA receptor-mediated transmission of carotid body chemoreceptor input to expiratory bulbospinal neurons in dogs. J. Physiol. 487 (3): 639-651. 1995.

Domeij S., Carlsoo B., Dahlqvist A., Hellstrom S., Kourtopoulos H. Motor and sensory fibres of the superior laryngeal nerve in the rat. A light and electron microscopic study. Acta Oto-Laryngol. 108: 469-477. 1989.

Donnerer J., Lembeck F. Capsaicin-induced reflex fall in rat blood pressure is mediated by afferent substance P-containing neurons via reflex centre in the brainstem. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 342: 293-295. 1983.

Dutschmann M., Herbert H. NMDA and $GABA_A$ receptors in the rat Kölliker-Fuse area control cardiorespiratory responses evoked by trigeminal ethmoidal nerve stimulation. J. Physiol.510 (3): 793-804. 1998.

Eisenach J.C. Intravenous clonidine produces hypoxemia by a peripheral alpha-2 adrenergic mechamism. J. Pharmacol. Exp. Therap. 244 (1): 247-252. 1988.

Eisenach J.C., De Kock M., Klimscha W. Alpha sub 2-adrenergic agonists for regional anesthesia. Anesthesiol. 85 (3): 655-674. 1996.

Ellenberger H.H., Feldman J.L. Subnuclear organization of the lateral tegmental field of the rat. I: Nucleus ambiguus and ventral respiratory group. J. Comp. Neurol. 292:P 202-211. 1990.

Elliott B.A.C., Hobbiger F. Gamma aminobutyric acid circulatory and respiratory effects in different species; remvestigation of the ant-strychnine action in mice. J. Physiol., London 146: 70-87. 1958.

Erdö S.L. Excitatory amino acid receptors in the mammalian periphery. Trends Pharmacol. Sci. 12: 426-429. 1991.

http://rcin.org.pl

Erdö S.L., Wolf J.R. γ- Aminobutyric acid outside the mammalian brain. J. Neurochem. 54 (2): 363-372. 1990.

Ernsberger P., Kou Y.R., Prabhakar N.R. Carotid body I –imidazoline receptors: binding, visualization and modulatory function. Respir. Physiol. 112: 239-251. 1998.

Errichidi S., Monteau R., Hilaire G. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generation in the newborn rat: an in vitro study. J. Physiol. 443: 477-498. 1991.

Feldman P.D., Moises H.C. Electrophysiological evidence for α_1-and α_2-adrenoceptors in solitary tract nucleus. Am. J. Physiol. 254: H756-H762. 1988.

Feria-Velasco A., Morales-Villagran A., Tapia-Arizmendi G., Arauz-Contreras J. Espinosa de los Monteros A. Effects of ruthenium red intraperitoneally injected to adult rats, on the uptake and release of neurotransmitters from brain synaptosomes. Arch. Investig. Med. 21 (1): 45-50. 1990.

Foutz A.S., Chamagnat J., Denavit-Saubié M. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in respiratory rhythmogenesis. Brain Res. 500: 199-208. 1989.

Fuxe K., Agnati L.F., Harfstrand A., Lundberg J., Hökfelt T., Calza L., Kimmel J., Bernardi P. Intracisternal administration of avian pancreatic polypeptide lowers respiration rate and enhances the clonidine induced reduction of respiration rate in α-chloralose anesthetized rats: possible interactions with an α_2-adrenergic receptor. Acta Physiol. Scand. 15: 381-384. 1982.

Gallagher J.P., Highashi H., Nishi S. Characterization and ionic basis of GABA-induced depolarizations recorded in vitro from cat primary afferents neurons. J. Physiol. London 275: 263-282. 1978.

Gale K., Hamilton B.L., Brown S.C., Norman W.P., Dias Souza J., Gillis R.A. GABA and specific GABA binding sites in brain nuclei associated with vagal outflow. Brain Res. Bull. 5 (2): 325-328. 1980.

Goa K.L., Sorkin E.M. Gabapentin. A review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy. Drugs 46 (3): 409-427. 1993.

Gong Q-L., Hedner T., Hedner J., Björkman R., Nordberg G. Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. Eur. J. Pharmacol. 193: 47-56. 1991.

Gonzalez C., Almaraz L., Obeso A., Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. Physiol. Rev. 74 (4): 829-898. 1994.

Gonzalez C., Dinger B.G., Fidone S.J. Mechanisms of carotid body chemoreception. In: Dempsey J.A., Pack A.I. (Eds.). Regulation of breathing. Marcel Dekker INC, New York, 79: pp. 391-471.1995.

Gonzalez-Guerrero P.R., Rigual R., Gonzalez C. Effects of chronic hypoxia on opioid peptide and catecholamine levels and on the release of dopamine in the rabbit carotid body. J.

http://rcin.org.pl

Neurochem. 60 (5): 1769-1776. 1993.

Granata A.R., Reis D.J. Release of L-^{3}H glutamic acid (L-Glu) and D-^{3}H aspartic acid (D-Asp) in the area of nucleus tractus solitarius in vivo produced by stimulation of vagus nerve. Brain Res. 259: 77-95. 1983.

Guimaraes S., Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. Pharmacol. Rev. 53 (2): 319-356. 2001.

Guyenet P.G., Stornetta R.L., Riley T., Norton F.R., Rosin D.L., Lynch K.R. Alpha α_{2A}-adrenergic receptors are present in lower brainstem catecholaminergic and serotonergic neurons innervating spinal cord. Brain Res. 638: 285-294.1994.

Haji A., Takeda R., Remmers J.E. Evidence that glycine and GABA mediate postsynaptic inhibition of bulbar respiratory neurons in the cat. J. Appl. Physiol. 73: 2333-2342. 1992.

Haji A., Okazaki M., Takeda R. GABA(A) receptor-mediated inspiratory termination evoked by vagal stimulation in decerebrate cats. Neuropharmacol. 38 (9): 1261-1272. 1999.

Hall S., Milne B., Jhamandas K. Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltammetric study. Brain Res. 796 (1-2): 176-186. 1998.

Haxhiu M.A., Lunteren van E., Graaf van de W.B., Strohl K. P., Bruce E., N., Mitra Y., Cherniack N.S. Action of nicotine on the respiratory activity of the diaphragm and genioglossus muscles and nerves that innervate them. Respir. Physiol. 57: 153-169. 1984.

Haxhiu M.A., Mitra J., van Lunteren E., Prabhakar N. R., Cherniack N.S. Influence of central chemoreceptor afferents inputs on respiratory muscle activity. Am. J. Physiol. 249: R266-R273. 1985.

Havar A., Guyenet P.G. Prototypical Imidazoline-1 receptor ligand moxonidine activtes alpha2-adrenoceptors in bulbospinal neurons of the RVL. J. Nurophysiol. 83: 766-776. 2000.

Hayashi F., Lipski J. The role of inhibitory amino acids in control of respiratory motor output in an arterially perfused rat. Respir. Physiol. 89: 47-63.1992.

Hedner J., Hedner T., Jonason J., Lundberg D. GABA-ergic mechanisms in central respiratory control in the anesthetized rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317: 315-320. 1981.

Hedner J., Hedner T., Wesseberg P., Jonason J. An analysis of the mechanism by which γ-aminobutyric acid depresses ventilation in the rat. J. Appl. Physiol. 56 (4): 849-856. 1984.

Hedner J., Hedner T., Jonason J. Capsaicin and regulation of respiration: interaction with central substance P mechanisms. J. Neural. Transm. 61: 239-252.1985.

Hedrick M.S., Ryan M.L., Pizarro J., Bisgard G.E. Modulation of respiratory rhythm by α_2-adrenoceptors in awake and anesthetized goats. J. Appl. Physiol. 77 (2): 742-750. 1994.

http://rcin.org.pl

Helliwell R.J.A., McLatchie L.M., Clarke M., Winter J., Bevan S., McIntyre P. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. Neurosci. Lett. 250: 177-180. 1998.

Highashi H., Ueda N., Nishi S. Chemoreceptors for serotonin (5-HT), acetylocholine (ACh), bradykinin (BK), histamine (H) and γ-ammobutyric acid (GABA) on rabbit visceral afferent neurons. Brain Res. Bull. 8: 23-32. 1982.

Hishida N., Tsubone H., Sekizawa S., Sugano S. Cardiopulmonary responses to capsaicin instillation to the laryngeal lumen and their reflex mechanisms in rats. J. Vet. Med. Sci. 58: 761-767. 1996.

Hishida N., Tsubone H., Sugano S. Fiber composition of the superior laryngeal nerve in rats and guinea pigs. J. Vet. Med. Sci. 59 (6): 499-501. 1997.

Holtman J.R.Jr., King K.A. Regulation of respiratory motor outflow to the larynx and diaphragm by GABA receptors. Eur. J. Pharmacol. 156: 181-187. 1988.

Holzer P., Hagmuller K. Transient apnoea after systemic injection of GABA in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308: 55-60. 1979.

Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neurosci. 24 (3): 739-768. 1988.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurones. Pharmacol. Rev. 43 (2): 143-201. 1991.

Hoop B., Beagle J.L., Maher T.J., Kazemi H. Brainstem amino acid neurotransmitters and hypoxic ventilatory response. Respir. Physiol. 118: 117-129. 1999.

Houseley G.D., Sinclair J.D. Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. J. Physiol. Lond. 406:99-144.1988.

Issa F.G. Effect of clonidine in obstructive sleep apnea. Am. Rev. Respir. Dis. 145: 435-439. 1992.

Izzo P.N., Sykes R.M., Spyer K.M. γ-Aminobutyric acid immunoreactive structures in the nucleus tractus solitarius: a light and electron microscopic study. Brain Res. 691. 69-78. 1992.

Jacobs L., Comroe J.H. Jr. Reflex apnea, bradycardia and hypotension produced by serotonin and phenyldiguanide acting on nodose ganglia of the cat. Circ. Research 29: 145-155. 1971.

Jancsó G., Kiraly E., Jancsó-Gábor. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. Nature 270. 741-743. 1977.

Kallio A., Scheinin M., Koulu M., Ponkilainen R., Ruskoaho H., Vjinamaki O., Scheinin H.

http://rcin.org.pl

Effects of dexemedetomidine, a selective alpha 2-adrenoceptor agomst, on hemodynamic control mechanisms. Clinic. Pharmacol. Therap. 46 (1): 33-42. 1989.

Kamei J., Tanihara H., Igarashi H., Kasuya Y. Effects of N-methyl-D-aspartate antagonists on the cough reflex. Eur. J. Pharmacol. 168 (2): 153-158. 1989.

Kamisaki Y., Hamada T., Maeda K., Ishimura M., Itoh T. Presynaptic α_2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes. J. Neurochem. 60 (2): 522-526. 1993.

Kamosińska B., Szereda-Przestaszewska M. Effect of the larynx on ventilation and respiratory pattern in anaesthetized rabbits. Res. Exp. Med. 188: 49-57. 1988.

Kathmann M., Bauer U., Schlicker E., Göthert M. Cannabinoid CB_1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release m the brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 359: 466-470. 1999.

Kazemi H., Hoop B. Glutamic acid and γ-aminobutyric acid neurotransmitters in central control of breathing. J. Appl. Physiol. 70 (1): 1-7. 1991.

Kneussl M.P., Pappagianopoulos P., Hoop B., Kazemi H. Reversible depression of ventilation and cardiovascular function by ventriculocisternal perfusion with gamma-aminobutyric acid in dogs. Am.Rev.Respir.Disease 133 (6): 1024-1028. 1986.

Kollarik M., Dinh Q.T., Fischer A., Undem B.J. Capsaicin-sensitive and –insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. J. Physiol. 551 (3): 869-879. 2001.

Kondo E., Kiyama H., Araki T., Shida T., Ueda Y., Tohyama M. Coexpression of $GABA_A$ receptor γ1 and γ2 subunits in the rat trigeminal ganglion. Brain Res. Mol. Brain Res. 21: 363-367. 1994.

Kopczyńska B., Szereda-Przestaszewska M. Apnoeic responses to pulmonary and systemic challenge of capsaicin in cats. J. Physiol. Pharmacol. 49. 25-35. 1998.

Kou Y.R., Emsberger P., Cragg P.A., Cherniack N.S., Prabhakar N.R. Role of α_2-adrenergic receptors in the carotid body response to isocapmc hypoxia. Respir. Physiol. 83: 353-364. 1991.

Krenz N.R., Weaver L.C. Effect of spinal cord transection on N-methyl-D-aspartate receptors in the cord. J. Neurotrauma 15:1027-1036. 1998.

Kuwana S., Okada Y., Sugawara Y., Tsunekawa N., Obata K. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. Neurosci. 120: 861-870. 2003.

Latysheva N.V., Raevskii K.S. Behavioral analysis of the consequences of chronic blockade of NMDA-type glutamate receptors in the early postnatal period in rats. Neurosci.Behav. Physiol. 33 (2): 123-131. 2003.

Lee L.Y., Lundberg J.M. Capsazepme abolishes pulmonary chemoreflexes induced by capsaicin

http://rcin.org.pl

in anesthetized rats. J. Appl. Physiol. 76 (5): 1848-1855. 1994.

Lee L.Y., Pisarri T.E. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. Respir. Physiol. 125. 47-65. 2001.

Lewis S.J., Verberne A.J.M., Summers R.J., Beart P.M., Cincotta M. Reduced glutamate binding in rat dorsal vagal complex after nodose ganglionectomy. Brain Res. Bull. 21: 913-91 1988.

Lewis S.J., Cincotta M., Verberne A.J.M., Jarott B., Lodge D., Beart P.M. Receptor autoradiography with L-[^{3}H]-glutamate reveals the presence and axonal transport of glutamate receptors in vagal afferent neurones of the rat. Eur. J. Pharmacol. 144:413-415.1987.

Limmroth V., Lee W.S., Moskowitz M.A. GABAA-receptor-mediated effects of progesterone, its ring-A-reduced metabolites and synthetic neuroactive steroids on neurogemc oedema in the rat meninges. Br. J. Pharmacol. 117 (1): 99-104. 1996.

Lm Y.S., Ho C., Chang S., Kou Y.R. Laryngeal C-fiber afferents are not involved in the apneic response to laryngeal wood smoke in anesthetized rats. Life Sc. 66: 1695-1704. 2000.

Lin Y. S., Lee L.Y. Stimulation of pulmonary vagal C-fibres by anandamide in anaesthetized rats: role of vanilloid type 1 receptors. J. Physiol. 539 (3): 947-955.2002.

Lodge D., Danysz W. Introduction to glutamate receptors, their function and pharmacology. In: Lodge D., Danysz W., Parsons C.G. (Eds.). Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets. FP. Graham Publishing Co, Johnson City, Tennessee, pp. 1-27. 2002.

Lou Y.P., Karlsson J.A., Franco-Cereceda A., Lundberg J.M. Selectivity of ruthenium red in inhibiting bronchoconstriction and CGRP release induced by afferent C-fibre activation in the guinea-pig lung. Acta Physiol. Scand. 142: 191-199. 1991.

Machaalani R., Waters K. A. Distribution and quantification of NMDA R1 mRNA and protein in the piglet brainstem and effects of intermittent hypercapmc hypoxia (IHH). Brain Res. 951: 293-300. 2002.

Machaalani R., Waters K. A. NMDA receptor 1 expression in the brainstem of human infants and its relevance to the sudden infant death syndrome (SIDS). J. Neuropat. Exp. Neurol. 62 (10): 1076-1084. 2003.

Maggi C.A., Bevan S., Walpole C.S.J., Rang H.P., Giuliani S. A comparison of capsazepine and ruthenium red as capsaicin antagonists in the rat isolated urinary bladder and vas deferens. Br J. Pharmacol. 108: 801-805. 1993.

Maggi C.A., Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. Gen. Pharmac. 19 (1): 1-43. 1988.

Makara G.B., György L., Molnár J. Circulatory and respiratory responses to capsaicin, 5-hydroksytryptamine and histamine in rats pretreated with capsaicin. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 170: 39-45. 1967.

http://rcin.org.pl

Marchenko V., Sapru H.N. Different patterns of respiratory and cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of dorsal medulla in the rat. Brain Res. 857: 99-109. 2000.

Marmelli S., Di Marzo V., Berretta N., Matias I., Maccarrone M., Bernardi G., Mercuri N.B. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. J. Neurosci. 23(8): 3136-3144. 2003.

Matsuo I., Hirooka Y., Hironaga K., Eshima K., Shigematsu H., Shihara M., Sakai K., Takeshita A. Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia in vivo. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 280: R1285-R1219. 2001.

Mazzone S.B., Geraghty D.P. Respiratory action of capsaicin microinjected into the nucleus of the solitary tract: involvement of vanilloid and tachykinin receptors. Br. J. Pharmacol. 127: 473-481. 1999.

McCrimmon D.R., Lalley P.M. Inhibition of respiratory neural discharges by clonidine and 5-hydroxytryptophan. J. Pharmacol. Exp. Ther. 222 (3): 771-777. 1981.

McCrimmon D.R., Mitchell G.S., Dekin M.S. Glutamate, GABA, and serotonin in ventilatory control. In: Dempsey, J.A., Pack, A.I. (Eds.), Regulation of breathing. M.Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp.151-218. 1995.

McCrimmon D.R., Smith J.C., Feldman J.L. Involvement of excitatory amino acids in neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. J. Neurosci. 9: 1910-1921. 1989.

McDonald D.M. Morphology of the rat carotid sinus nerve. II. Number and size of axons. J. Neurocytol. 12: 373-392. 1983.

Meador-Woodruff J.H., Healy D.J. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. Brain Res. Rev. 31: 288-294. 2000.

Meeley M.P., Underwood M.D., Talman W.T., Reis D.J. Content and in vitro release of endogenous amino acids in the area of the nucleus of the solitary tract of the rat. J. Neurochem. 53: 1807-1817. 1989.

Melton J.E., Neubauer J.A. Edelman N.H. GABA antagonism reverses hypoxic respiratory depression in the cat. J. Appl. Physiol. 69 (4): 1296-1301. 1990.

Merahi N., Orer H.S., Laguzzi R. 5-HT_2 receptors in the nucleus tractus solitarius: characterisation and role in cardiovascular regulation in the rat. Brain Res. 575: 74-78. 1992.

Mestivier D., Dabire H., Safar M., Chau N.P. Use of nonlinear methods to assess effects of clonidine on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. J. Appl. Physiol. 84 (5): 1795-1800. 1998.

http://rcin.org.pl

Mitchell H. W., Tomlin J., Ward R.J. Reflex changes in respiration and heart rate evoked by intravenous and left ventricular injection of 5-HT and capsaicin in anaesthetized rats: a comparison of mechanisms. Lung 162: 153-163. 1984.

Monteau R., Gauthier P., Rega P., Hilaire G. Effects of Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK-801 on breathing pattern in rats. Neurosci. Lett. 109: 134-139. 1990.

Mortola J.P., Rezzonico R. Ventilation in kittens with chronic section of the superior laryngeal nerves. Respir. Physiol. 76: 369-382. 1989.

Nagy J.I. Capsaicin's action on the nervous system. Trends Neurosci. 362-365. 1982.

Naida A., Ghosh T.K., Mathew O.P. Airway protective reflexes elicited by laryngeal ammonia: role of C-fiber afferents. Respir. Physiol. 103: 11-17. 1996.

Narchi P., Benhamou D., Hamza J., Bouaziz H. Ventilatory effects of epidural clonidine during the first 3 hours after caesarean section. Acta Anaesth. Scand. 36: 791-795. 1992.

O'Halloran K.D., Herman J.K., Bisgard G E. Differential effects of clonidine on upper airway abductor and adductor muscle activity in awake goats. J. Appl. Physiol. 87 (2): 590-597. 1999a.

O'Halloran K.D., Herman J.K., Bisgard G.E. Nonvagal tachypnea following α_2-adrenoceptor stimulation in awake goats. Respir. Physiol. 118: 15-24. 1999b.

O'Halloran K.D., Herman J.K., Bisgard G.E. Clonidine induces upper airway closure in awake goats. Respir. Physiol. 123: 165-176. 2000.

O'Halloran K.D., Herman J.K., Bisgard G.E. Ventilatory effects of α_2-adrenoceptor blockade in awake goats. Respir. Physiol. 126: 29-41.2001.

Ohtake P.J., Torres J.E., Gozal Y.M., Graff G.R., Gozal D. NMDA receptors mediate peripheral chemoreceptor afferent input in the conscious rat. J. Appl. Physiol. 84 (3): 853-861. 1998.

Ohtake P.J., Simakajornboon N., Fehniger M D., Xue Y.D., Gozal D. N-methyl-D-aspartate receptor expression in the nucleus tractus solitarii and maturation of hypoxic ventilatory response in the rat. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162: 1140-1147.2000.

Olpe H.R., Karlsson G., Pozza M. F., Brugger F., Steinmann M., Van Riezen H., Fagg G., Hall R.G., Froestl W., Bittiger H. CGP 35348: a centrally active blocker of $GABA_B$ receptors. Eur. J. Pharmacol. 187: 27-38. 1990.

Ooi R., Pattison J., Feldman S.A. The effects of intravenous clonidme on ventilation. Anesthesia 46: 632-633. 1991.

Oomori Y., Nakaya K., Tanaka H., Iuchi H., Satoh Y., Ono K. Immunohistochemical and histochemical evidence for the presence on noradrenaline, serotonin and gamma-aminobutyric acid in chief cells of the mouse carotid body. Cell Tissue Res. 278: 249-254. 1994.

http://rcin.org.pl

Otake K., Nakamura Y., Tanaka I., Ezure K. Morphology of pulmonary rapidly adaptmg receptor relay neurons in the rat. J. Comp. Neurol. 430: 458-470. 2001.

Otsuka M., Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. Physiol. Rev. 73 (2): 229-308. 1993.

Paleček F., Sant'Ambrogio F.B., Sant'Ambrogio F.B., Mathew O.P. Reflex responses to capsaicin: intravenous, aerosol and intratracheal administration. J. Appl. Physiol. 67: 1428-1437. 1989.

Paleček F., Mathew O.P., Sant'Ambrogio F.B., Sant'Ambrogio F.B. Cardiorespiratory responses to inhaled laryngeal irritants. Inhal. Toxicol. 2: 93-104. 1990.

Panagiotidis G., Stenstrom A., Lundquist I. Effects of adrenergic and cholmergic stimulation on islet monoamine oxidase activity and insulin secretion in the mouse. Eur. J. Pharmacol. 233 (2-3): 285-2980. 1993.

Petho G., Szolcsányi J. Systemically applied ruthenium red inhibits the stimulation of sensory receptors by capsaicin. Acta Physiol. Hung. 75 (Suppl.): 235-236. 1990.

Philipp M., Brede M., Hein L. Physiological significance of α_2-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 283: R287-R295. 2002.

Pierrefiche O., Foutz A.S., Denavit-Saubie M. Effects of $GABA_B$ receptor agonists and antagonists on the bulbar respiratory network in cat. Brain Res. 605: 77-84.1993.

Pilowsky P.M., Jiang C., Lipski J. An intracellular study of respiratory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat and their relationship to catecholamine-containing neurons. J. Comp. Neurol. 301: 604-617. 1990.

Pokorski M., Ohtani S. GABA immunoreactivity in chemoreceptor cells of the cat carotid body. Acta Histochem. Cytochem. 32: 179-182. 1999.

Pórszász J., György L., Pórszász-Gibiszer K. Cardiovascular and respiratory effects of capsaicin. Acta Physiol. Hung. 8: 61-76. 1955.

Pórszász J., Such G., Pórszász-Gibiszer K. Circulatory and respiratory chemoreflex. Acta Physiol. Hung. 12: 189-205. 1957.

Ramage A.G., Daly M.de B. The central action of 5-HT_2 receptor agonist 1-{2,5-dimethoxy-4-iodophenyl}-2-amionopropane (DOI) on cardiac inotropy and vascular resistance in the anaesthetized cat. Br. J. Pharmacol. 125:1172-1179. 1998.

Ravi K., Singh M. Role of vagal lung C-fibres in the cardiorespiratory effects of capsaicin in monkeys. Respir. Physiol. 106: 137-151. 1996.

Reid J., McCullogh J. Capsaicin in blood-brain permeability. Neurosci. Lett. 81: 165-170. 1987.

http://rcin.org.pl

Richter D.W., Schmidt-Garcon P., Pierrefiche O., Bischoff A.M., Lalley P.M. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. J. Physiol. 514 (2): 567-578. 1999.

Rives J.E., Bernard D.G. α_2 Adrenergic receptors and the central control of breathing in the cane toad, Bufo marinus. Respir. Physiol. 125: 213-223. 2001.

Robertson B.S., Satterfield B.E., Said S.I., Dey R.D. N-methyl-D-aspartate receptors are expressed by intrinsinc neurons of rat larynx and esophagus. Neurosci. Lett. 244: 77-80. 1998.

Ruffolo R.R. Jr., Nichols A.J., Stadel J.M., Hieble J.P. Pharmacologic and therapeutic applications of α_2-adrenoceptor subtypes. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 243-279. 1993.

Sannajust F., Cerutti C., Koening-Berard E., Sassard J. Influence of anaesthesia on the cardiovascular effects of rilmenidine and clomdine in spontaneously hypertensive rats. Br. J. Pharmacol. 105 (3): 542-548. 1992.

Sant'Ambrogio G., Remmers J.E. Reflexes influences acting on the respiratory muscles of the chest wall. In The Thorax. Part A. Edited by C. Roussos and P.T. Macklem, New York and Basel, M. Dekker: 531-594. 1985.

Sant'Ambrogio G., Widdicombe J. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. Respir. Physiol. 125: 33-45. 2001.

Sapru H.N., Krieger A.J. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. J. Appl. Physiol. 42: 344-348. 1977.

Saria A., Skofitch G., Lambeck F. Distribution of capsaicin in rat tissues after systemic administration. J. Pharmacol. 34: 273-275. 1982.

Scheibner J., Trendelenburg A.U., Hein L., Starke K. Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice. Br. J. Pharmacol. 132 (4): 925-933. 2001.

Schmid K., Böhmer G., Gebauer K. $GABA_A$ receptor mediated fast synaptic inhibition in the rabbit brain-stem respiratory system. Acta Physiol. Scand. 142: 411-420. 1991.

Schmid K., Foutz A.S., Denavit-Saubie M. Inhibitions mediated by glycine and $GABA_A$ receptors shape the discharge pattern of bulbar respiratory neurons. Brain Res. 710: 150-160. 1996.

Schelegle E.S., Green J.F. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. Respir. Physiol. 125: 17-31. 2001.

Schelegle E.S., Mansoor J.K., Green J.F. Influence of background vagal C-fiber activity on eupneic breathing pattern in anesthetized dogs. J. Appl. Physiol. 79 (2): 600-606. 1995.

http://rcin.org.pl

Schreihofer A.M., Guyenet P.G. Role of presympathetic C1 neurons in the sympatholytic and hypotensive effects of clonidine in rats. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 279: R1753-R1762. 2000.

Seifert E., Trippenbach T. Baclofen attenuates cardiorespiratory effects of vagal C fiber stimulation in rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 73: 1485-1494. 1995.

Sekizawa S., Tsubone H. The respiratory activity of the superior laryngeal nerve in the rat. Respir. Physiol. 86: 355-368. 1991.

Semyanov A.V. GABA-ergic inhibition in the CNS: types of GABA receptors and mechanisms of tonic GABA-mediated inhibitory action. Neurophysiol. 34 (1): 82-92. 2002.

Sgaragli G., Pavan F. Effects of amino acid compounds injected into cerebrospinal fluid spaces, on colonic temperature, arterial blood pressure and behaviour of the rat. Neuropharmacol. 11: 45-56. 1972.

Shigemoto R., Ohishi H., Nakanishi S., Mizuno N. Expression of the mRNA for the rat NMDA receptor (NMDAR1) in the sensory and autonomic ganglion neurons. Neurosci. Lett. 144: 229-232. 1992.

Shirakawa J., Taniyama K., Tanaka C. γ- Aminobutyric acid-induced modulation of acetylocholine release from the guinea pig lung. J. Pharmacol. Exp. Ther. 243, 364-369. 1987.

Sitniewska E.M., Wiśniewska R.J., Wiśniewski K. The role of ionotropic receptors of glutaminic acid in cardiovascular system. Amino Acids. 2003.

Smith P.J., McQueen D.S. Anandamide induces cardiovascular and respiratory reflexes via vasosensory nerves in the anaesthetized rat. Br. J. Pharmacol. 134: 655-663. 2001.

Soares de Moura R.S., Leao M.C., Castro Resende A.C., Moreira C.F., Sena K.M., Silveira S.S., Lima A.F., Nunes F.R., Mesquita Ferreira A.G. Actions of L-NAME and methylene blue on the hypotensive effects of clonidine and rilmenidine in the anesthetized rat. J. Cardiovascular Pharmacol. 35 (5): 791-795. 2000.

Su C-K., Chai C-Y. GABAergic inhibition of neonatal rat phrenic motoneuron. Neurosci. Lett. 248: 191-194. 1998.

Suzuki M., Tetsuka M., Endo M. $GABA_B$ receptors in the nucleus tractus solitarii modulate the carotid chemoreceptor reflex in rats. Neurosci. Lett. 260: 21-24.1999.

Suzuki M., Nishina M., Nakamura S., Maruyama K. Endogenous GABA in the commissural subnucleus of the NTS inhibits the carotid chemoreceptor reflex via $GABA_A$ receptors in rats. J. Neural. Transm. 110: 211-218. 2003.

Szallási A., Nilsson S., Farkas-Szallási T., Blumberg P.M., Hökfelt T., Lundberg J.M. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery and depletion by systemic vanilloid treatment. Brain Res. 703:

http://rcin.org.pl

175-183. 1995 a.

Szallási A., Goso C., Manzini S. Resiniferatoxin binding to vanilloid receptors in guinea pig and human airways. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152 (1): 59-63. 1995 b

Takano K., Kato F. Inspiration-promoting vagal reflex under NMDA receptor blockade in anaesthetized rabbits. J. Physiol. 516 (2): 571-582. 1999.

Takayama K., Miura M. Respiratory responses to microinjection of excitatory amino acid agonists in ventrolateral regions of the lateral parabrachial nucleus in the cat. Brain Res. 604: 217-223. 1993.

Tapia R, Meza-Riuz G., Duran L., Drucker-Colin R.R. Convulsions or flaccid paralysis by ruthenium red depending on route of administration. Brain Res. 116: 101-109. 1976.

Toh C.C., Lee T.S. Kiang A.K. The pharmacological actions of capsaicin and analogues. Br. J. Pharmacol. 10: 175-182. 1955.

Tohda Y., Ohkawa K., Kubo H., Muraki M., Fukuoka M., Nakajima S. Role of GABA receptors in the bronchial response: studies in sensitized guinea-pigs. Clinical & Exp. Allergy 28 (6): 772-777. 1998.

Torrealba F., Bustos G., Montero V.M. Glutamate in the glomus cells of the cat carotid body: immunocytochemistry and in vitro release. Neurochem. Int. 28: 625-631. 1996.

Trippenbach T., Lake N. Excitatory cardiovascular and respiratory effects of baclofen in intact rats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 72: 1200-1207. 1994.

Tsubone H. Characteristics of vagal afferent activity in rats: three types of pulmonary receptors responding to collapse, inflation, and deflation of the lung. Exp. Neurol. 92: 541-552.1986.

Tsubone H., Sant'Ambrogio G., Anderson J.W., Orani G.P. Laryngeal afferent activity and reflexes in the guinea pig. Respir. Physiol. 86: 215-231. 1991.

Van der Heyden J.A.M., Dekloet E.R., Korf J., Versteeg D.H.G. GABA content of discrete brain nuclei and spinal cord of the rat. J. Neurochem. 33: 857-861. 1979.

Vardhan A., Kachroo A., Sapru H.N. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. Am. J. Physiol. 264: R41-R50. 1993 a.

Vardhan A., Kachroo A., Sapru H.N. Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. Brain Res. 618: 23-32. 1993 b.

Vemulapalli S., Barletta M. The role of sympathetic nervous system in the cardiovascular effects of systemically administered γ-aminobutyric acid. Arch. Int. Pharmacodyn. 267, 46-58. 1984.

Wang Z., Keith I.M., Beckman M.J., Brownfield M.S., Vidruk E.H., Bisgard G.E. 5-HT_{5a}

http://rcin.org.pl

receptors in the carotid body chemoreception pathway of rat. Neurosci. Lett. 278: 9-12. 2000.

Wasserman A.M., Ferreira M. JR., Sahibzada N., Hemandez Y.M., Gillis R.A. GABA-mediated neurotransmission in the ventrolateral NTS plays a role in respiratory regulation in the rat. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 283: R1423-R1441. 2002.

Watanabe M., Maemura K., Kanabara K., Tamayama T., Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. Int. Rev. Cytol. 213: 1-47. 2002.

Whitehead K.J., Rose S., Jenner P. Involvement of intrinsic cholinergic and GABAergic innervation in the effect of NMDA on striatal dopamine efflux and metabolism as assessed by microdialysis studies in freely moving rats. Eur. J. Neurosci. 14 (5): 851-850. 2001.

Widdicombe J., Davies A., Respiratory Physiology. Edward Arnold LTD. London. 1983.

Wood J.N. Docherty R. Chemical activators of sensory neurones. Annu. Rev. Physiol. 59: 457-482. 1997.

Wu W.C., Yang C.Y., Chai C.Y. Nitric oxide mediates depressor responses by activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus tractus solitarius of cat. Chin. J. Physiol. 43 (2): 75-80. 2000.

Yajima Y., Hayakawa T., Hayashi Y. Evidence for $GABA_A$ receptor-mediated inhibition in ambiguous motoneurons. Acta Otolaryngol. 553: 132-134. 1997.

Yamada K.A., Norman W.P., Hamosh P., Gallis R.A. Medullary ventral surface GABA receptors affect respiratory and cardiovascular function. Bram. Res. 248: 71-78. 1982.

Yamazaki H., Haji A., Okazaki M., Takeda R. Immunoreactivity for glutamic acid decarboxylase and N-methyl-D-aspartate receptors of intracellularly labeled respiratory neurons in the cat. Neurosci. Lett. 293:61-64. 2000.

Yamazato M., Sakima A., Nakazato J., Sesoko S., Muratani H., Fukiyama K. Hypotensive and sedative effects of clonidine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 281: R1868-R1876. 2001.

Zezula J., Fuchs K., Sieghart W. Separation of α_1, α_2 and α_3 subunits of the $GABA_A$-benzodiazepine receptor complex by immunoaffinity chromatography. Brain Res. 563: 325-328. 1991.

http://rcin.org.pl

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie wpływu pobudzenia obwodowych receptorów wybranych endogennych i egzogennych substancji neuroaktywnych na zmiany wzorca oddechowego, wentylacji i ciśnienia krwi oraz próba wyjaśnienia udziału informacji dośrodkowej wywodzącej się z płuc, krtani i chemoreceptorów ciałek szyjnych w obserwowanych odruchach oddechowych. Badano efekty następujących substancji: kwas γ-aminomasłowy (GABA), N-metylo-D-asparaginian (NMDA), klonidyna i kapsaicyna.

Doświadczenia przeprowadzono na spontanicznie oddychających szczurach szczepu Wistar, w znieczuleniu uretanowo-chloralozowym.

Wypreparowywano: nerwy błędne, zwoje guzkowe, nerwy krtaniowe górne, zatokowe.

Rejestrowano: parametry wentylacyjne, ciśnienie tętnicze krwi, aktywność przepony.

Dokonywano tego w warunkach kontrolnych oraz po podaniu:

1. Kapsaicyny do żyły udowej :
   - u zwierząt nieuszkodzonych (z zachowanym unerwieniem)
   - po przecięciu nn. błędnych w odcinku szyjnym
   - po sekcji nn. krtaniowych górnych
   - po zablokowaniu receptorów waniloidowych czerwienią rutenu
2. GABA do tętnicy szyjnej wspólnej:
   - u zwierząt nieuszkodzonych
   - po przecięciu nn. błędnych w odcinku szyjnym
   - po sekcji nn. zatokowych
   - po zablokowaniu receptorów $GABA_A$ pikrotoksyną lub bikukuliną
   - po zablokowaniu receptorów $GABA_B$ przy użyciu CGP 35348
3. NMDA do żyły udowej i tętnicy szyjnej wspólnej:
   - u zwierząt nieuszkodzonych
   - po przecięciu nn. błędnych w odcinku szyjnym
   - po wagotomii nadguzkowej

http://rcin.org.pl

- po sekcji nn. zatokowych
- po zablokowaniu receptorów NMDA przy zastosowaniu AP-7

4. Klonidyny do żyły udowej:
   - u zwierząt nieuszkodzonych
   - po przecięciu nn. błędnych w odcinku szyjnym
   - po sekcji nn. zatokowych
   - po zablokowaniu receptorów α_2-adrenergicznych przy pomocy SKF 86466

Wykazano:

Efekty oddechowe badanych substancji były niezależne od dróg czuciowych przewodzonych nerwem błędnym z obszaru płuc.

Bezdech wydechowy, będący ekstremalną formą niestabilności wzorca oddechowego, jest efektem stałym obwodowego działania kwasu γ-amino-masłowego poprzez wejście czuciowe z chemoreceptorów ciałek szyjnych. W powstawaniu zmian oddechowych oraz hipotensji generowanych przez kwas γ-amino masłowy pośredniczą receptory $GABA_A$.

Podobnie stałym objawem jest bezdech po-kapsaicynowy, za którego generację odpowiedzialne są receptory waniloidowe i nerw krtaniowy górny.

Hamujący wpływ NMDA na objętość i częstość oddychania przy podaniu dożylnym w sporadycznych przypadkach prowadził do bezdechu. Dotętnicza iniekcja NMDA powodowała zatrzymanie oddychania oraz wzrost objętości oddechowej poprzedzony krótkotrwałym jej obniżeniem. Przecięcie nerwów zatokowych oraz blokada receptorów NMDA eliminowały zmiany we wzorcu oddechowym wywołane przez NMDA, niezależnie od ścieżki podania.

Poprzedzone krótkotrwałym spadkiem, zwiększenie objętości oddechowej, wywołane dożylną klonidyną wynikało z pobudzenia chemoreceptorów ciałek szyjnych i skojarzone było ze sterowanym ośrodkowo długotrwałym zwolnieniem rytmu

http://rcin.org.pl

oddechowego. Odpowiedzi oddechowe na podanie klonidyny zachodziły za pośrednictwem receptorów α_2-adrenergicznych.

Przeprowadzone badania wykazały, że obwodowe receptory neuroprzekaźników ośrodkowych (GABA, NMDA) i receptory waniloidowe (agonista-kapsaicyna), obecne na dośrodkowych włóknach nerwu błędnego zaopatrującego drogi oddechowe, uczestniczą w odruchowej regulacji oddychania poprzez wejścia czuciowe z chemoreceptorów ciałek szyjnych i nerwu krtaniowego górnego, odpowiednio.

Nie można jednoznacznie określić drogi dośrodkowej dla odruchów wywołanych pobudzeniem receptorów α_2-adrenergicznych (agonista-klonidyna) z uwagi na ich powszechną obecność w organizmie. Niewątpliwie jednak komponenta chemorecepcyjna oraz efekty ośrodkowe współuczestniczą w zmianach wzorca oddechowego.

http://rcin.org.pl