

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Katarzyna Kaczyńska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

1998 - magister biologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

2004 - doktor nauk medycznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Pracownia Fizjologii Oddychania, Warszawa, tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola obwodowych receptorów gabaergiczných i glutaminianergiczných typu NMDA w regulacji oddychania u szczura”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

od 1998 roku - asystent w Pracowni Fizjologii Oddychania, Zakład Neurofizjologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie,

od 2006 roku - adiunkt w Pracowni Odruchów Oddechowych, Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

I. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Znaczenie wybranych neuropeptydów: bombezyny, somatostatyny i neuropeptydu Y w obwodowej regulacji wzorca oddechowego i funkcji sercowo-naczyniowych u uśpionych szczurów

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl publikacji o sumarycznym IF=12.57:

- 1. Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. 2009. Peripheral cardiorespiratory effects of bombesin in anaesthetized rats. Eur. J. Pharmacol. 602, 157-162 [IF=2.585]**
- 2. Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. 2011. Vasopressor and heart rate responses to systemic administration of bombesin in anaesthetized rats. Pharmacol. Rep. 63, 448-454 [IF=2.445]**
- 3. Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. 2010. Depressive cardio-respiratory effects of somatostatin in anaesthetized rats. Respir. Physiol. Neurobiol. 170, 273-278 [IF=2.382]**

4. **Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M.** 2010. NPY Y₁ receptors are involved in cardio-respiratory responses to intravenous injection of neuropeptide Y in anaesthetized rats. *Pharmacol. Res.* 62, 444-449 [IF=3.612]
5. **Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M.** 2011. Activation of neuropeptide Y₂ receptors exerts an excitatory action on cardio-respiratory variables in anaesthetized rats. *Neuropeptides*, 45, 281-286. [IF=1.553]

Szczegółowe informacje o wkładzie własnym autora w cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w załączniku nr 4.

II. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WSTĘP

Geneza rytmu oddechowego, fazowość oddychania i kontrola wentylacji zależne są od kombinacji synaptycznych interakcji pomiędzy populacjami neuronów oddechowych. Celem regulacji oddychania jest zapewnienie adekwatnego poziomu gazów oddechowych we krwi i sprostanie wymaganiom zmieniającego się środowiska. Funkcjonowanie generatora wzorca oddechowego w pniu mózgu jest zależne od stanu organizmu i znajduje się pod wpływem ośrodkowych i obwodowych pobudzeń czuciowych oraz różnego rodzaju endogennych sygnałów neuromodulacyjnych (Hilaire i Pasaro, 2003; Abdala i wsp., 2009).

Nerw błędny, X nerw czaszkowy, zaopatruje czuciowo oraz ruchowo drogi oddechowe poniżej noso-gardzieli. Jego zakończenia czuciowe o zidentyfikowanych funkcjonalnie receptorach, zlokalizowane są w mięśniówce gładkiej dróg oddechowych, w nabłonku oddechowym oraz w pobliżu naczyń krwionośnych dróg oddechowych i płuc. Do najważniejszych receptorów nerwu błędnego regulujących kształt wzorca oddechowego i zapewniających optymalną wymianę gazową należą: i) wolno adaptujące się receptory (SARs), pobudzane przez inflację płuc, przewodzą z nich włókna zmielinizowane, których aktywność stanowi podstawę odruchu Heringa-Breuera, hamującego wdech i inicjującego fazę wydechu (Schelegle i Green, 2001); (ii) receptory szybko adaptujące (RARs) o nieregularnej modulacji oddechowej, związane z włóknami zmielinizowanymi oraz (iii) płucno-oskrzelowe, niezmielinizowane zakończenia typu C, bez wyraźnej modulacji oddechowej, stanowiące przeważającą proporcję włókien dośrodkowych nerwu błędnego (Widdicombe, 2001). Dwa ostatnie rodzaje receptorów reagują na bodźce mechaniczne i chemiczne oraz bólowe, wywołując różnorodne odruchy oddechowe: hiperwentylację, kaszel, zwężenie oskrzeli, pojedyncze wdechy o charakterze westchnięć, spadek objętości oddechowej (Sant'Ambrogio i

Widdicombe, 2001; Lee i Pisarri, 2001). Do receptorów o nieopisanych właściwościach elektrofizjologicznych zalicza się także ciała neuroepitelialne, o charakterze neuroendokrynnym, aktywne w odruchach aksonalnych, pobudzające mięśniówkę gładką dróg oddechowych i łożysko naczyniowe płuc, związane prawdopodobnie z włóknami niezmielinizowanymi (Widdicombe, 2001).

Włókna dośrodkowe z receptorów czuciowych nerwu błędnego w drzewie tchawiczoskrzelowym docierają do ciał komórek nerwowych w zwoju guzkowym, których aksony przewodzą informację do podjądrza spoidłowego, śródmiąższowego i środkowego jądra pasma samotnego (NTS) w rdzeniu przedłużonym, tworząc tam pierwszą synapsę (Mazzone i Canning, 2002; Stornetta, 2008).

Chemiczna regulacja oddychania sterowana jest przez chemowrażliwe struktury w kłębkach szyjnych, znajdujące się w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej, reagujące na niski poziom pO_2 , wzrost pCO_2 i niskie pH w krwi tętniczej (Nurse i Piskuric, 2013). Kłębki szyjne unerwione są przez nerw zatokowy, będący odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego (IX), i tworzonym głównie przez włókna niezmielinizowane (Ichikawa, 2002).

Chemoreceptory kłębków aortalnych, zlokalizowane w łuku aorty i okolicy pnia tętnicy płucnej nie odgrywają istotnej roli w hipoksyjnym odruchu oddechowym. Ich udział w odpowiedzi na hipoksję u ludzi szacuje się na 5-10 % (Honda, 1999). Zakończenia nerwowe kłębków aortalnych tworzą nerw aortalny (n. depresyjny) stanowiący gałązkę nerwu błędnego, o przeważającym udziale włókien niezmielinizowanych u szczura (Oliveira i wsp., 2013). Sygnały z chemoreceptorów drogą nerwów zatokowych i aortalnych, poprzez ich zwoje skalisty i guzkowy przekazywane są do podjądrza spoidłowego NTS w rdzeniu przedłużonym (Jordan, 2001; Stornetta, 2008).

Zintegrowane w NTS informacje z wejść czuciowych z płuc i chemoreceptorów obwodowych mają swoje projekcje do neuronów oddechowych grupy grzbietowej i brzusznej rdzenia przedłużonego oraz mostu współuczestnicząc w tworzeniu napędu oddechowego (Alheid i McCrimmon, 2008). Zarówno zakończenia czuciowe nerwu błędnego, nerwy zatokowe jak i struktury przez nie zaopatrywane wykazują obecność wielu typów receptorów, pobudzanych w sytuacjach wymagających uruchomienia różnego rodzaju odruchów płucnych. Są to receptory pobudzane przez liczne neuroprzekaźniki, neuromodulatory, w tym neuropeptydy.

Neuroprzekaźniki pełnią kilka funkcji w kontroli rytmicznej aktywności oddechowej: regulują amplitudę i częstość aktywności oddechowej, działają na poziomie motoneuronów, neuronów czuciowych oraz neuronów zlokalizowanych w jądrach ośrodkowych (Doi i Ramirez, 2008). Wiele neurotransmiterów i neuromodulatorów zaangażowanych w kontrolę i regulację oddychania zostało już opisanych. Zasadniczą rolę pełnią klasyczne neuroprzekaźniki: aminokwasy pobudzające i hamujące oraz acetylocholina, katecholaminy i serotonina (Bianchi i wsp., 1995; Doi i Ramirez, 2010).

Neuropeptydy, zlokalizowane w neuronach oddechowych pnia mózgu, bardzo często współwystępują z klasycznymi neuroprzekaźnikami działając jako kotransmitery (Alheid i McCrimmon, 2008). Niektóre z nich są zaangażowane w ośrodkową kontrolę oddychania i biorą udział w adaptacji jego wzorca w określonych stanach chorobowych (Saaresranta i Polo, 2002). Pobudzające działanie na oddychanie po ośrodkowym podaniu wykazuje bombezyna, zwiększająca objętość oddechową (Hedner i wsp., 1985; Glazkova i Inyushkin, 2006). Z kolei mikroiniekcja neuropeptydu Y (NPY) na grzbietową powierzchnię jądra pasma samotnego wywołuje depresję oddechową, redukując zarówno objętość jak i częstość oddychania (Barraco i wsp., 1990). Pobudzenie licznie reprezentowanych w strukturach mózgu receptorów somatostatyny jej ośrodkowym podaniem, również hamuje napęd oddechowy prowadząc nierzadko do bezdechu (Chen i wsp., 1990; Burke i wsp., 2008).

Poznanie wpływu trzech wybranych neuropeptydów na oddychanie i układ krążenia wydaje się mieć istotne znaczenie odkąd oddziaływanie farmakologiczne na receptory neuropeptydowe rozważane jest w terapiach wielu schorzeń takich jak: stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie mózgu, choroba Parkinsona, kancerogeneza, czy astma (Whewey i wsp., 2007; Jensen i wsp., 2008, Decressac i Barker, 2012, Qin i Qu, 2013).

Receptory neuropeptydowe wykazują ekspresję poza ośrodkowym układem nerwowym: na zakończeniach czuciowych obwodowych włókien nerwowych, w mięśniówce naczyń krwionośnych oraz w płucach. Efekty oddechowe podanych obwodowo neuropeptydów zostały do tej pory słabo zbadane. Podobnie istnieją nieliczne dane na temat roli receptorów neuropeptydowych w strukturach obwodowych regulujących oddychanie, odpowiedzialnych za zmiany wzorca oddechowego. Istnieje jedno doniesienie dotyczące wzmacniającego działania bombezyny na chemoodruch płucny i wrażliwość płucnych włókien C pobudzanych kapsaicyną (Gu i Lee, 2005). Brak jest danych co do dośrodkowych dróg nerwowych uczestniczących w przekazie sygnałów z receptorów neuropeptydu Y i somatostatyny zlokalizowanych w płucach.

Obecność mRNA dla obu związków w zwoju guzkowym (Zhuo i wsp., 1997) wskazuje jednoznacznie na nerw błędny. Kategoria i udział włókien pozostają nieokreślone, podobnie jak nieznan jest typ odpowiedzi oddechowej i krążeniowej na iniekcję tych neuropeptydów do krążenia płucnego.

Celem badań przedstawionych w rozprawie publikacji było zbadanie udziału trzech endogennych neuropeptydów: bombezyny, somatostatyny i neuropeptydu Y (NPY) w obwodowej regulacji oddychania i krążenia krwi u uśpionych szczurów. Problem ten wymagał:

1. Zbadania zmian wzorca oddechowo-krążeniowego pojawiającego się po dożylnym podaniu wymienionych powyżej neuropeptydów.
2. Wyjaśnienia roli obwodowych struktur nerwowych zaangażowanych w regulację oddychania, pośredniczących w obserwowanych zmianach oddychania i krążenia.
3. Określenia receptorów odpowiedzialnych za generację zmian wentylacji i parametrów sercowo-naczyniowych.

Szczegółowe cele zostały opisane w omówieniu poszczególnych prac, bowiem różnią się one w zależności od badanego neuropeptydu.

METODYKA

Doświadczenia zostały przeprowadzone na szczurach szczepu Wistar, samcach o masie ciała 180-250g. Zwierzęta usypiano wstrzykiwanym dootrzewnowo uretanem (w dawce 600 mg/kg) z dodatkiem chloralozy (120 mg/kg).

Zwierzęta ułożone były w pozycji poziomej na grzbiecie na podgrzewanym stole operacyjnym i oddychały spontanicznie powietrzem atmosferycznym. Do wyizolowanej tchawicy zakładano rurkę tracheostomijną. Górny otwór rurki podłączony był do głowicy czujnikowej pneumotachografu (RSS 100 HR, Hans Rudolph) w celu pomiaru objętości oddechowej, częstości oddechowej, wentylacji minutowej, czasów wdechu i wydechu.

Do prawej żyły udowej i prawej tętnicy udowej wprowadzano kaniule polietylenowe wypełnione solą fizjologiczną wzbogaconą 0.1% roztworem heparyny. Poprzez tę umieszczoną w żyłę udowej wstrzykiwano dodatkowe dawki narkozy i badane substancje. Kaniula wprowadzona do prawej tętnicy udowej, sięgająca do aorty brzusznej, była podłączona do głowicy przetwornika ciśnienia (Columbus Instruments) i służyła do pomiaru ciśnienia tętniczego krwi i rytmu serca (HR). Przez odsłonięte powłoki brzuszne wprowadzano do przepony dwubiegunową elektrodę. Zintegrowaną i wzmocnioną aktywność mięśnia

przymostkowej części przepony (emg) rejestrowano w toku doświadczeń. Odcinki szyjne nerwów błędnych, nerwy aortalne, nerwy zatokowe i zwoje guzkowe (w zależności od przeprowadzanej serii eksperymentów) oddzielano od otaczających tkanek i wypreparowywano w celu późniejszych neurotomii wykonywanych w trakcie doświadczeń. Badania zostały przeprowadzone na podstawie zgody IV Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

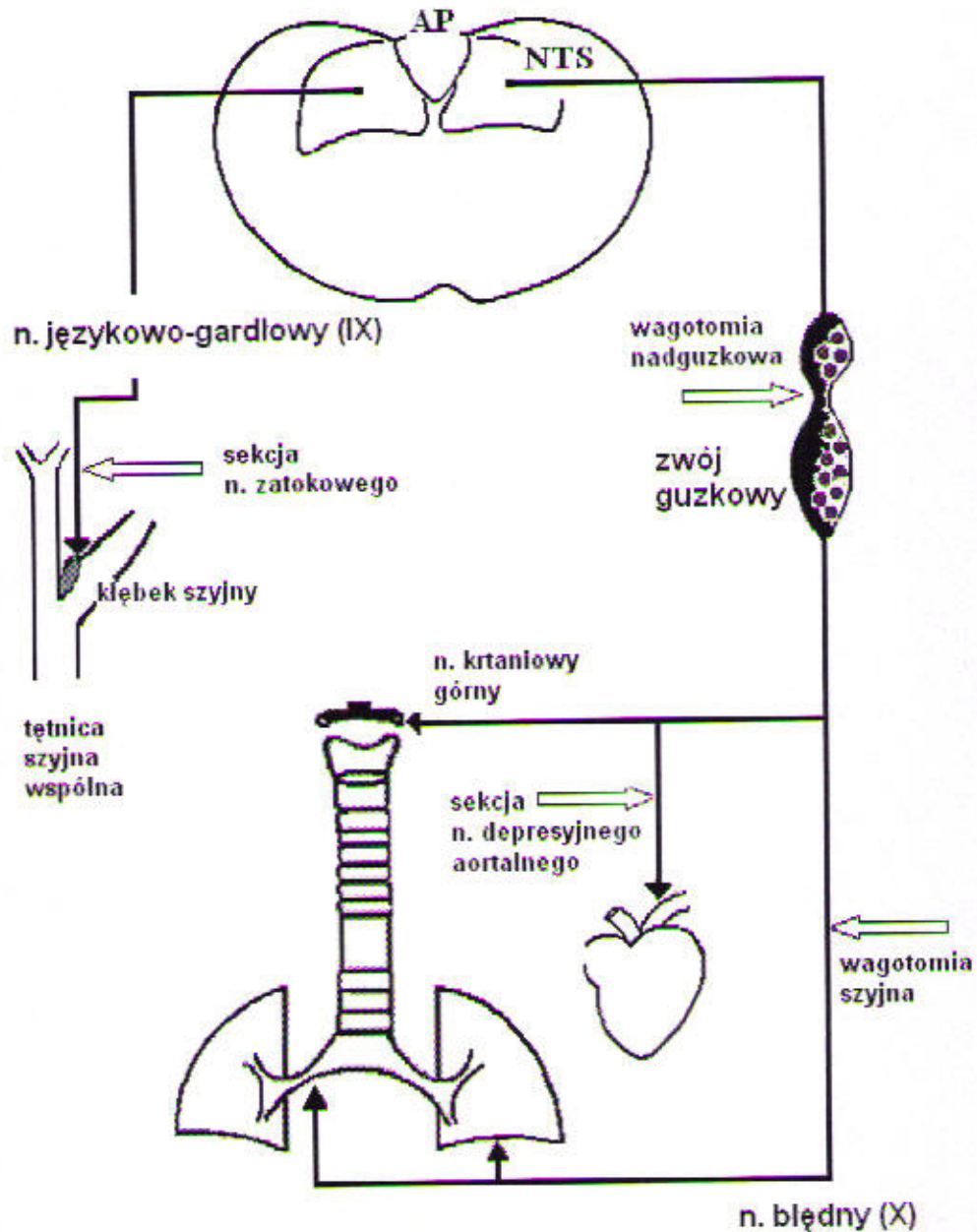


Fig. 1. Schemat neurotomii wykonywanych w trakcie doświadczeń; AP (Area Postrema - Pole najdalsze), NTS (nucleus tractus solitarii - jądro pasma samotnego).

OMÓWIENIE PUBLIKACJI

Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Peripheral cardiorespiratory effects of bombesin in anaesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 602, 157-162.

Bombezyna jest neuropeptydem wyizolowanym ze skóry kumaka nizinnego (*Bombina bombina*) strukturalnie i funkcjonalnie homologicznym z ssaczym peptydem uwalniającym gastrynę (GRP), o znacznie silniejszym powinowactwie do receptora bombezynowego BB₂ (Ashour i wsp., 2006). Związek ten reguluje takie procesy jak: pamięć, temperatura, ciśnienie krwi oraz funkcje układu pokarmowego (Ohki-Hamazaki i wsp., 2005; Yegen, 2003). Receptory bombezynowe odgrywają istotną rolę w normalnym rozwoju płuc (Shan i wsp., 2004), w uszkodzeniu płuc wcześniaków z dysplazją oskrzelowo-płucną (Ashour i wsp., 2006) i kancerogenezie raka płuc (Yegen, 2003). Ostatnie doniesienia wskazują na zaangażowanie peptydów podobnych do bombezyny oraz ich receptorów w rozwój astmy (Zhou i wsp., 2011).

Nieliczne dane literaturowe wskazują na pewną rolę bombezyny w regulacji oddychania. W obrębie ośrodkowego układu nerwowego, między innymi w jądrze pasma samotnego, potwierdzono immunoreaktywność peptydów podobnych do bombezyny (Moody i Merali, 2004; Jensen i wsp., 2008).

Według wcześniejszych doniesień bombezyna podana do komór mózgu zwiększała objętość oddechową (V_T) i przyspieszała rytm oddychania (Niewoehner i wsp., 1983; Brown i Gillespie, 1988). Hedner i wsp., (1985) z kolei, po iniekcji dokomorowej lub na powierzchnię jądra dwuznacznego szczura, zaobserwowali oprócz wzrostu V_T zwolnienie częstości i oddychania. Podanie natomiast do jądra NTS-u stymulowało wszystkie komponenty wzorca oddechowego, wywołując również epizody bezdechu. W 2006 roku Glazkova i Inyushkin opisali pobudzające działanie bombezyny (mikroiniekcja do NTS-u) wyłącznie na objętość oddechową. Ośrodkowy wpływ bombezyny na oddychanie był zatem przedmiotem kilku badań, natomiast jej działanie obwodowe jest mało znane. W 1993 Lach i wsp., opisali skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli świnki morskiej po zaaplikowaniu bombezyny *in vitro*, a w 2005 Gu i Lee wykazali, że jej obwodowe podanie nasila chemoodruch płucny wywołany kapsalcyną poprzez aktywację włókien płucnych C nerwu błędnego.

mRNA dla wszystkich trzech typów receptorów bombezyny: BB₁, BB₂ i BB₃ zostało udokumentowane w nabłonku dróg oddechowych ssaków (Kane i wsp., 1996; Shan i wsp.,

2004). Co więcej płucne neuroendokrynne komórki nabłonkowe, unerwione przez włókna czuciowe odchodzące od zwoju guzkowego, uwalniają bombezynę (Cutz i wsp., 2007).

Dokładana rola obwodowych receptorów bombezyny w generowaniu odruchów płucnych jak i udział w nich dróg wagalnych jest nieznana, dlatego też celem niniejszej pracy było: (i) określenie wzorca oddechowo-krażeniowego wywołanego dożylną iniekcją bombezyny, (ii) zbadanie udziału nerwu błędnego w obserwowanych efektach, oraz (iii) wykazanie, który z receptorów bombezynowych BB_1 czy BB_2 jest odpowiedzialny za zmiany parametrów oddechowych i ciśnienia krwi. Pomimo istnienia trzeciego receptora bombezynowego, jakim jest BB_3 , określenie stopnia jego zaangażowania w regulację oddychania i krążenia jest utrudnione. Jest to związane z brakiem jak dotąd selektywnego antagonisty tego receptora.

Do badań wybrano dawkę 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, która była najskuteczniejsza w wywoływaniu zmian zarówno w częstości oddychania jak i objętości oddechowej. Większa dawka 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nie nasilała efektów oddechowych. Dożylne podanie bombezyny uśpionym szczurom w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ spowodowało westchnienia (głębokie oddechy), zwiększenie objętości oddechowej, wzrost amplitudy elektromiogramu przepony oraz stymulację wentylacji minutowej (V_E), mimo zwolnienia rytmu oddechowego. Zmianom w oddychaniu, utrzymującym się do około 5 minut po podaniu, towarzyszył również wzrost ciśnienia tętniczego krwi i niewielka tachykardia. Obustronna wagotomia szyjna eliminowała wyłącznie efekty oddechowe, natomiast odpowiedź hipertensyjna została zachowana. Wzrost ciśnienia tętniczego krwi pojawił się bezpośrednio po iniekcji bombezyny i utrzymywał się do około 3 minut.

Zastosowanie [D-Phe]¹²-bombesin (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) - antagonisty o większym powinowactwie do receptorów BB_2 niż BB_1 zredukowało zmiany oddechowe i zmniejszyło odpowiedź ciśnienia krwi, wywołane przez neuropeptyd. Selektywny antagonist receptorów BB_1 (BIM 23127 w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) nie wpłynął na inicjowane bombezyną zmiany wzorca oddechowego i odpowiedź presyjną ciśnienia krwi.

Powyższa praca relacjonuje po raz pierwszy obwodowe efekty oddechowe w postaci zwiększonej wentylacji wywołane dożylnie podaną bombezyną, na które składały się westchnienia, wzrost objętości oddechowej, zwiększenie amplitudy emg przepony przy zwolnionym oddychaniu. Zmiany te zachodziły za pośrednictwem nerwu błędnego z udziałem klasycznie opisanego pozytywnego sprzężenia zwrotnego: płucne odcinki nerwów błędnych-motoneurony przepony (DiMarco i wsp., 1981). Po raz pierwszy wykazano, że za zmiany we wzorcu oddechowym, inicjowane przez bombezynę, odpowiada aktywacja receptorów BB_2 . W

odpowiedzi presyjnej ciśnienia krwi uczestniczyły receptory BB_2 niezwiązane z nerwem błędnym. Niewykluczone, że wzrost ciśnienia krwi był wynikiem bezpośredniego działania bombezyny na naczynia krwionośne. Zniesienie hipertensji przy użyciu innego antagonisty receptorów BB_2 (ICI-216,140) znalazło potwierdzenie w późniejszej pracy Zogovica i Pilowskyego (2011).

Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Vasopressor and heart rate responses to systemic administration of bombesin in anaesthetized rats. Pharmacol. Rep. 2011, 63, 448-454.

Istnieje kilka, niestety starych publikacji opisujących ośrodkowe i obwodowe działanie bombezyny na układ krążenia, nie wyczerpujących jednak tematu. Zarówno u uśpionych jak i czuwających zwierząt po ośrodkowym podaniu bombezyna powodowała odpowiedź presyjną ciśnienia krwi (Fisher i wsp., 1985; Brown i Gillespie, 1988). Podobnie iniekcja dożylna u uśpionych (Chahl i Walker, 1981; Bayorh i Feuerstein, 1985) i czuwających szczurów (Janssen i wsp., 1991) podwyższała ciśnienie krwi oraz rytm serca. Większość wymienionych powyżej autorów przypisuje sercowo-naczyniowe działanie bombezyny aktywacji układu noradrenergicznego. Niemniej jednak wciąż nie ma jasności co do rodzaju receptorów adrenergicznych odpowiadających za obserwowane efekty. Niektóre z doniesień sugerowały, że blokada receptorów α -adrenergicznych eliminowała hipertensję i tachykardię (Chahl i Walker, 1981; Fisher i wsp., 1985), inne wskazywały na udział β -adrenergicznej ścieżki (Fregnan i Glasser, 1975; Bayorh i Feuerstein, 1985).

Przedmiotem omawianej pracy było: (i) wyjaśnienie czy nerw aortalny oraz zwój guzkowy są zaangażowane w transmisję sercowo-naczyniowych efektów dożylnie podanej bombezyny oraz (ii) zweryfikowanie wiedzy na temat udziału receptorów α i β -adrenergicznych w obserwowanych odpowiedziach. W tym celu zmiany ciśnienia krwi oraz rytmu serca wywołane dożylnie podaną bombezyną badano po sekcji nerwów aortalnych i nerwów błędnych poniżej i powyżej zwojów guzkowych oraz po blokadzie receptorów α -adrenergicznych fentolaminą i β -adrenergicznych propranololem.

Nerw aortalny szczura zawiera włókna prowadzące z baroreceptorów znajdujących się w przydanie łuku aorty oraz znacznie mniejszą liczbę pobudliwych włókien stanowiących zakończenia czuciowe chemoreceptorów kłębków aortalnych (Brophy i wsp., 1999). Pobudzenie baroreceptorów następuje pod wpływem rozciągania naczyń krwionośnych (konsekwencji zwiększonego ciśnienia krwi), co na drodze odruchowej hamuje toniczne wyładowania nerwów

współczulnych i pobudza unerwienie błędne serca powodując hipotensję i bradykardię (Cortelli i wsp. 2012).

Chemiczna stymulacja kłębków aortalnych u kota i szczura nie wpływała na oddychanie, ale zwiększała w kilku przypadkach ciśnienie krwi oraz oddziaływała zmiennie na rytm serca (Daly, 1997; Daly i Jones, 1998; Brophy i wsp., 1999). Wydaje się więc, że nerw aortalny mógłby stanowić potencjalną drogę nerwową odpowiedzialną za efekt hipertensji wywołany działaniem bombezyny.

Natomiast przecięcie nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych odcina gałązki sercowe nerwu błędnego, eliminując przewodzenie impulsacji wzdłuż włókien dośrodkowych od ciał ich komórek nerwowych znajdujących się w zwojach guzkowych do jądra pasma samotnego, pierwszej synapsy ośrodkowej w odruchowej regulacji funkcji sercowo-naczyniowych.

We wszystkich badanych grupach zwierzęta wstępnie wagotomizowano w odcinku szyjnym, co eliminowało odpowiedź oddechową na bombezynę i pozwoliło na uniknięcie jakiegokolwiek wpływu zmian oddechowych na odpowiedzi układu krążenia.

Zarówno po wagotomii szyjnej jak i po następującym przecięciu nerwów aortalnych ciśnienie tętnicze krwi wzrastało bezpośrednio po podaniu bombezyny, z maksimum w 15 sekundzie, utrzymując się na podwyższonym poziomie do około 1-2 minut. Bombezyna inicjowała również wzrost częstości akcji serca, niezależnie od stanu unerwienia. Wzrost HR pojawił się około 1 minuty po wagotomii szyjnej i 2 minut po sekcji nerwów aortalnych i utrzymywał się powyżej 10 minut. Samo przecięcie nerwów aortalnych podwyższało rytm serca w porównaniu z wartością kontrolną po wagotomii szyjnej.

W drugiej serii doświadczalnej wzrost ciśnienia utrzymywał się do około 3 minut, zarówno po przecięciu nerwów błędnych poniżej jak i powyżej zwojów guzkowych. Po bombezynową tachykardię u zwierząt wagotomizowanych w odcinku szyjnym zredukowała wagotomia nadguzkowa, nie wykazując wpływu na odpowiedź ciśnienia krwi. U zwierząt z nerwami przeciętymi powyżej zwojów guzkowych zamiast tachykardii, bezpośrednio po iniekcji bombezyny, zaobserwowano krótkotrwałą i niewielką bradykardię. Wagotomia nadguzkowa podnosiła wartość kontrolną HR w porównaniu ze stanem wyjściowym po przecięciu szyjnych nerwów błędnych.

Blokada receptorów α -adrenergicznych przy użyciu fentolaminy (1 mg/kg), zastosowanej na 10 minut przed iniekcją bombezyny, zapobiegała wzrostowi ciśnienia tętniczego krwi, nie wpływając na podwyższenie HR. Podanie propranololu (1mg/kg), antagonisty receptorów β -

adrenergicznych nie zmieniało odpowiedzi presyjnej ciśnienia, redukując dwukrotnie tachykardię.

Podsumowując, hipertensja oraz tachykardia wywołane dożylną iniekcją bombezyny były niezależne od zachowanej ciągłości nerwów aortalnych i błędnych w odcinku szyjnym. Tachykardia była zależna od pobudzenia receptorów β -adrenergicznych serca oraz zachowanych zwojów guzkowych. Wzrost ciśnienia tętniczego krwi najprawdopodobniej inicjowany był poprzez bezpośrednią aktywację receptorów α -adrenergicznych mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych.

Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Depressive cardio-respiratory effects of somatostatin in anaesthetized rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010, 170, 273-278.

Somatostatyna - neuropeptyd wszechobecny w ośrodkowym układzie nerwowym jest ważnym neuromodulatorem aktywności nerwowej. Reguluje układ endokrynologiczny, trawienny, krążenia oraz posiada właściwości antyproliferacyjne (Patel, 1999; Ollas i wsp., 2004). Somatostatyna wydaje się być istotnym regulatorem oddychania w normoksji i hipoksji u ludzi (Pedersen i wsp., 1999). Istnieją hipotezy wiążące syndrom nagłej śmierci łóżeczkowej (SIDS) ze zwiększoną ekspresją somatostatyny w jądrach oddechowych rdzenia przedłużonego, co zostało potwierdzone u ofiar SIDS (Lavezzi i Maturri, 2008).

Wykazano immunoreaktywność somatostatyny w ciałach komórek i zakończeniach nerwowych szczura w grupie grzbietowej i brzusznej neuronów oddechowych rdzenia przedłużonego (Haji i wsp., 2000), w tym w kompleksie pre-Bötzingera, uważanym za generator wzorca oddechowego (Stornetta i wsp., 2003). W rdzeniu przedłużonym szczura zidentyfikowano 5 typów, zależnych od białka G, receptorów dla somatostatyny (sst_1 - sst_5) (Spary i wsp., 2008).

Badania doświadczalne na szczurach i kotach wykazały, że somatostatyna podana do komór mózgu lub zaaplikowana miejscowo w rejonie jądra okołowielkomórkowego bocznego w grzbietowo-bocznej części opuszki, inicjowała zniesienie napędu oddechowego prowadząc czasem do śmiertelnego bezdechu (Kalia i wsp., 1984; Chen i wsp., 1990). Mikroiniekcja neuropeptydu do kompleksu Bötzingera wywoływała apneustyczny wzorzec oddychania, natomiast celowana do kompleksu pre-Bötzingera powodowała zwolnienie oddychania i bezdech (Burke i wsp., 2010). W badaniach na wyizolowanych preparatach rdzenia

przedłużonego myszy Llona i wsp. (2004) wykazali, że somatostatyna obniżała częstość oraz amplitudę wyładowań wdechowych rejestrowanych w nerwie przeponowym.

Obecność mRNA somatostatyny w ciałach komórek nerwowych zwoju guzkowego (Czyżyk-Krzeska i wsp., 1991) oraz mRNA receptorów somatostatyny w płucach (Boy i wsp., 2011) wskazuje na istotną rolę tego neuropeptydu w fizjologii płuc i układu oddechowego. Immunoreaktywność somatostatyny opisano w płucach ssaków (Balaguer i wsp., 1992), a także jej uwalnianie z wrażliwych na kapsaicynę włókien C nerwu błędnego (Than i wsp., 2000). mRNA somatostatyny zostało potwierdzone w neuronach czuciowych chemoreceptorów tętnicznych (Kummer i wsp., 1989), we włóknach dośrodkowych nerwu językowo-gardłowego oraz ciałach komórek nerwowych zwoju skalistego (Helke i Hill, 1988; Czyżyk-Krzeska i wsp., 1991). Ponadto, somatostatyna hamowała przepływ jonów Ca^{2+} w kanałach wapniowych komórek chemoreceptorów typu I kłębków szyjnych szczura, wskazując na jej właściwości modyfikujące sygnał chemotransdukcji (eSilva i Lewis, 1995). Jej systemowe podanie u ludzi redukowało odpowiedź oddechową na hipoksję i wrażliwość na CO_2 (Filuk i wsp., 1988; Pedersen i wsp., 1999).

Przedstawione powyżej dane literaturowe implikują chemoreceptory kłębków szyjnych jako miejsce generacji odpowiedzi oddechowej na dożylnie podanie somatostatyny.

Przedstawione badania zostały przeprowadzone w celu: (i) scharakteryzowania wzorca oddechowo-kръżeniowego wywołanego dożylną iniekcją somatostatyny u uśpionych szczurów, (ii) określenia udziału obwodowych struktur istotnych w regulacji oddychania takich jak: płucne włókna dośrodkowe nerwu błędnego, zwój guzkowy tego nerwu oraz chemoreceptory kłębków szyjnych w obserwowanych zmianach oddychania i kръżenia indukowanych przez somatostatynę.

Z trzech testowanych dawek: 10, 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wybrano ostatnią, która wywoływała największe zmiany w oddychaniu i ciśnieniu krwi.

Somatostatyna wstrzyknięta w bolusie w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do kръżenia płucnego uśpionych szczurów powodowała natychmiastową, obecną do 30 sekund po podaniu depresję oddychania: przejściowe zwolnienie rytmu oddechowego i zmniejszenie objętości oddechowej skutkujące obniżoną wentylacją minutową. Spadek częstości oddychania był wynikiem przedłużenia czasu wydechu, przy niezmienionym czasie wdechu. Podobne zmiany wzorca oddechowego obserwowano po obustronnej wagotomii szyjnej. Sama wagotomia szyjna zwalniała rytm oddechowy i zwiększała objętość oddechową.

Wpływ wagotomii nadguzkowej na działanie neuropeptydu porównywano z jego efektami u zwierząt poddanych wagotomii szyjnej. W obu stanach odnerwienia zarejestrowano podobną depresję zarówno objętości jak i częstości oddychania. Zmiany pojawiały się bezpośrednio po iniekcji i trwały do około 30 i/lub 60 sekund. Maksymalne obniżenie wentylacji minutowej wynosiło 46% przed i 23% po wagotomii nadguzkowej.

Przecięcie nerwów zatokowych, odnerwiające kłębki szyjne, skutecznie wyeliminowało depresję oddychania wywołaną podaniem somatostatyny w warunkach kontrolnych, po wagotomii szyjnej. Zniesione zostały zarówno zwolnienie rytmu oddechowego jak i obniżenie objętości oddechowej. Sam zabieg obustronnego odnerwienia kłębków szyjnych wprowadzał niższe wartości badanych parametrów oddechowych w porównaniu z kontrolą po wagotomii szyjnej.

Efektom oddechowym somatostatyny towarzyszyły zmiany sercowo-naczyniowe: spadek ciśnienia tętniczego krwi i zwolnienie rytmu serca. Hipotensja pojawiła się natychmiast po podaniu i utrzymywała się do około 1 minuty. U zwierząt nieuszkodzonych maksymalny spadek o 45% wystąpił tuż po zakończeniu iniekcji, natomiast po wagotomii szyjnej maksymalne obniżenie o 46% obecne było w 15 sekund po podaniu. Po przecięciu nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych spadek ciśnienia wywołany somatostatyną wynosił 28%. Odnerwienie kłębków szyjnych zmniejszyło odpowiedź hipotensyjną do 17%. Bradykardia wywołana dożylnym działaniem somatostatyny była zjawiskiem stałym we wszystkich stanach odnerwienia. Obecna tuż po podaniu lub po 15 sekundach utrzymywała się powyżej 10 minut.

W niniejszej rozprawie po raz pierwszy opisano odpowiedź oddechową na dożylnie podaną somatostatynę oraz dośrodkową drogę dla tego odruchu. Badania nie potwierdziły udziału pętli wagalnej w depresji oddechowej, na co mogłaby wskazywać obecność mRNA receptorów somatostatyny w płucach szczura (Schloos i wsp., 1997; Fehlmann i wsp., 2000). W hipowentylacji pośredniczyły natomiast włókna dośrodkowe z chemoreceptorów kłębków szyjnych, docierające do nerwu językowo-gardłowego i dalej do NTS-u. Bradykardia pojawiała się niezależnie od zachowanej ciągłości nerwów błędnych i zatokowych, natomiast sekcja tych ostatnich zredukowała hipotensję. Zmiany sercowo-naczyniowe były prawdopodobnie wynikiem pobudzenia zarówno obwodowych jak i ośrodkowych receptorów somatostatyny, bowiem w dużych dawkach somatostatyna może penetrować barierę krew-mózg (Banks i wsp., 1990). W ośrodkowym układzie nerwowym, w neuronach ośrodków autonomicznych katecholaminergicznych i cholinergicznych rdzenia przedłużonego szczura wykazano

immunoreaktywność dla wszystkich receptorów ss_{1-5} (Spary et al., 2008). Na obwodzie ich ekspresję opisano w kardiomiocytach oraz w śródbłonku, warstwie mięśniowej i przydane trzewnych naczyń krwionośnych ssaków (Smith i wsp., 2005; Reynaert i wsp., 2007). Pozwala to na przypuszczenie, że za obecność hipotensji i bradykardii może odpowiadać bezpośrednie działanie somatostatyny na jej receptory w mięśniówce gładkiej naczyń oraz w miocytach serca, odpowiednio.

Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. NPY Y_1 receptors are involved in cardio-respiratory responses to intravenous injection of neuropeptide Y in anaesthetized rats. *Pharmacol. Res.* 2010, 62, 444-449.

Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Activation of neuropeptide Y_2 receptors exerts an excitatory action on cardio-respiratory variables in anaesthetized rats. *Neuropeptides* 2011, 45, 281-286.

Neuropeptyd Y jest 36 aminokwasowym peptydem występującym w znaczących ilościach w neuronach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, oddziałującym biologicznie poprzez 6 typów receptorów związanych z białkiem G: Y_1 - Y_6 . NPY oraz jego receptory odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu wielu systemów fizjologicznych takich jak: układ krwionośny, trawienny, regulacja pamięci, rytmu okołodobowego, stany zapalne, uwalnianie hormonów oraz przewodzenie bólu (Gehlert 2004; Lin i wsp., 2004).

Przypuszcza się, że neuropeptyd Y może regulować funkcje układu oddechowego. Obserwowana u ludzi niewydolność oddychania oraz ostra duszność były skorelowane z wysoką zawartością neuropeptydu w jądrze łukowatym podwzgórza (Corder i wsp., 1990). Zaobserwowano również podwyższenie poziomu NPY we krwi osób cierpiących na zespół obturacyjnego bezdechu śródsewnego (Li i wsp., 2010).

Obecność neuropeptydu Y opisano w polu najdalszym oraz w podjądrzu spoidłowym jądra pasma samotnego rdzenia przedłużonego, gdzie wywołuje on istotne zmiany oddechowo-krążeniowe. Mikroiniekcja neuropeptydu Y do komór mózgu lub na grzbietową powierzchnię rdzenia przedłużonego skutkowałą depresją oddechowo-krążeniową charakteryzującą się spowolnieniem oddychania, obniżeniem wentylacji oraz hipotensją i bradykardią (Barraco i wsp., 1990; Dunbar i wsp., 1992). W 1999 roku Morton i wsp. opisali depresję oddychania po ośrodkowym podaniu agonisty receptora Y_1 , oraz przeciwne, pobudzające działanie po podaniu agonisty receptora Y_2 . Potter i McCloskey (1987) są jedynymi autorami, którzy opisali efekty oddechowe podanego obwodowo neuropeptydu Y. Po infuzji NPY do tętnicy szyjnej wspólnej

kota obserwowano chwilową stymulację oddychania, ale nie zarejestrowano żadnych jednoznacznych zmian ciśnienia krwi i akcji serca. Brak odpowiedzi po odnerwieniu kłębków szyjnych autorzy przypisali naczyniokurczącemu działaniu neuropeptydu Y, pobudzającemu w ten pośredni sposób chemoreceptory kłębków szyjnych.

Neuropeptyd Y występuje w komórkach nabłonkowych płuc i w komórkach mięśni gładkich oskrzeli oraz we włóknach nerwowych zaopatrujących mięśnie gładkie drzewa oskrzelowego, błonę podśluzową i jej gruczoły oraz naczynia krwionośne ssaczych dróg oddechowych (Luts i wsp., 1993; Chanez i wsp., 1998; Makinde i wsp., 2013). Obecność NPY oraz jego receptorów: Y_1 i Y_2 potwierdzono w drogach dośrodkowych z płuc do rdzenia przedłużonego czyli w nerwie błędnym i jego zwoju guzkowym (Czyżyk-Krzeska i wsp., 1991; Kummer i wsp., 1993; Coelho i wsp., 2004). Oba typy receptorów mogą zatem wpływać modulująco na odruchy oddechowe i układ krwionośny.

Celem doświadczeń opisanych w kolejnej pracy była ocena wpływu pobudzenia obwodowych receptorów NPY przez neuropeptyd Y podany do krążenia płucnego na regulację oddychania i odpowiedzi krążeniowe. Doświadczenia wykonano na zwierzętach neurologicznie nieuszkodzonych oraz po przecięciu nerwów błędnych poniżej i powyżej zwojów guzkowych. W celu określenia typu receptorów odpowiedzialnych za zmiany parametrów oddechowych i sercowo-naczyniowych stosowano antagonistów receptorów NPY Y_1 i Y_2 .

Z trzech badanych dawek neuropeptydu Y: 10, 50 i 100 wybrano największą, powodującą stałe i maksymalne efekty oddechowo-krążeniowe. Neuropeptyd Y wstrzyknięty dożylnie w wybranej dawce powodował depresję oddechową na którą składały się zarówno obniżona objętość jak i częstość oddychania. We wszystkich stanach unerwienia: w pełni zachowanym, po wagotomii szyjnej i nadguzkowej spadek objętości oddechowej pojawiał się bezpośrednio po podaniu, osiągając maksymalną odpowiedź po 15 s. Obniżenie V_T utrzymywało się do około jednej minuty, a po 2 minutach obserwowano pełny powrót do wartości kontrolnych. U zwierząt poddanych wagotomii nadguzkowej zmniejszenie objętości było obecne tylko w 15 sekundzie.

Zwolnienie oddychania zainicjowane neuropeptydem Y pojawiło się tuż po zakończeniu iniekcji. Utrzymywało się ono, odpowiednio do 15 i 30 sekund u szczurów nieuszkodzonych i wagotomizowanych w odcinku szyjnym. Sekcja nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych zapobiegała tym zmianom.

NPY zmniejszał wentylację minutową. Jej najniższa wartość, obecna natychmiast po podaniu, wynosiła 58% wartości kontrolnej w stanie nieuszkodzonym oraz 64% po sekcji nerwów błędnych na szyi. Szczury wagotomizowane nadguzkowo zareagowały zredukowaną odpowiedzią wentylacji minutowej w porównaniu ze zwierzętami nieuszkodzonymi oraz poddanymi wagotomii śródzwyjnej. Istotny spadek V_E do 89% wartości bazowej zarejestrowano w 30 sekundzie.

Wzrost ciśnienia tętniczego krwi po dożylnym podaniu NPY osiągał najwyższą wartość po 15 sekundach i utrzymywał się na podwyższonym poziomie powyżej 2 minut we wszystkich stanach unerwienia. Towarzyszyła mu pojawiająca się jednocześnie bradykardia. Zarówno wagotomia szyjna jak i wagotomia nadguzkowa zwiększały kontrolne wartości częstości skurczów serca w porównaniu ze stanem nieuszkodzonym.

BMS 193885 - selektywny i kompetycyjny antagonist receptorów NPY Y_1 , w dawce 1 mg/kg zredukował obniżenie objętości oddechowej, zwolnienie rytmu oddechowego, hipertensję i bradykardię wywołane neuropeptydem Y. BIIE 0246-selektywny antagonist receptorów Y_2 w dawkach 1 i 2.5 mg/kg nie blokował ani zmian wentylacji oddechowej, ani zmian rytmu serca. Hipertensja została zredukowana po zastosowaniu większej dawki BIIE 0246 - 2.5 mg/kg. Jednakże wynik ten mógł być spowodowany nakładającym się działaniem NPY na efekt blokera, który w dużej dawce podwyższał a następnie obniżał ciśnienie tętnicze krwi.

Wykazano zatem, że dożylna iniekcja neuropeptydu Y powodowała depresję oddychania. W wydłużeniu komponenty czasowej wzorca oddechowego pośredniczyły receptory NPY Y_1 znajdujące się w zwojach guzkowych. Obniżenie objętości oddechowej można przypisać częściowo ośrodkowym NPY Y_1 zależnym mechanizmom, ponieważ NPY przekracza barierę krew-mózg, a odpowiedź V_T nie została całkowicie wyeliminowana po wagotomii nadguzkowej. Hipertensja oraz bradykardia były inicjowane poza dośrodkowymi drogami wagalnymi. Wydaje się, że można wykluczyć ośrodkowy wpływ NPY na zmiany ciśnienia krwi, ponieważ jak wspomniano wcześniej centralnie podany NPY indukuje hipotensję. Receptorami odpowiedzialnymi za zmiany sercowo-krażeniowe wywołane NPY mogły być obwodowe receptory NPY Y_1 , których obecność opisano w komórkach serca i mięśniówce gładkiej naczyń krwionośnych (Matsuda i wsp., 2002; Jacques i Abdel-Samad, 2007).

Niniejsze wyniki potwierdzają wcześniejsze ustalenia, w których myszy posiadające knock-out w genie kodującym receptor Y_1 nie reagowały ani hipertensją ani bradykardią na podanie systemowe neuropeptydu Y (Pedrazini i wsp., 1998).

Oprócz receptora Y_1 kolejnym istotnym w regulacji oddychania jest receptor Y_2 . Istnieją nieliczne i sprzeczne dane literaturowe dotyczące odpowiedzi oddechowo-kръżeniowych wywołanych stymulacją ośrodkowych receptorów Y_2 . W 1992 roku Barraco i wsp., (1990) opisali zahamowanie oddychania i obniżenie ciśnienia krwi po podaniu NPY 13-36 (agonisty receptora Y_2) do jądra pasma samotnego szczura, podczas gdy Morton i wsp., (1999) po iniekcji do komór mózgu psa zarejestrowali stymulację oddychania i odpowiedź hipertensyjną. Efekty oddechowe pobudzenia obwodowych receptorów neuropeptydu $Y - Y_2$, nie zostały jak dotąd opisane. Obecność receptora Y_2 obok Y_1 w zwoju guzkowym może sugerować jego modulujący wpływ na wzorzec oddechowy i niewykluczone, że pobudzenie tych dwóch receptorów powoduje odmienne skutki oddechowe.

Poniższa część rozprawy miała na celu: (i) opis wzorca oddechowo-kръżeniowego wywołanego dożylną iniekcją NPY 13-36- agonisty receptora Y_2 , (ii) określenie udziału drogi odruchowej wiodącej poprzez nerw błędny w odcinku pod- i nadguzkowym w obserwowanych efektach oraz (iii) potwierdzenie przypuszczenia, że za wpływ NPY 13-36 na parametry oddechowe i kръżeniowe odpowiada pobudzenie receptora Y_2 .

Testowano trzy dawki NPY 13-36: 1, 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wszystkie dawki jednakowo zwiększały ciśnienie krwi. Dawki 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ podobnie stymulowały wentylację minutową. Ponieważ dawka najwyższa nie zwiększała zmian oddechowo-kръżeniowych wybrano dawkę średnią. Dożylna iniekcja NPY 13-36 w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u nieuszkodzonych i następnie wagoatomizowanych w odcinku szyjnym szczurów zwiększała objętość oddechową, wentylację minutową oraz ciśnienie tętnicze krwi. Wzrost V_T był obecny w 15 sekund po podaniu i utrzymywał się powyżej 10 minut w obu stanach unerwienia. Krótkotrwałe przyspieszenie rytmu oddechowego, występujące bezpośrednio po iniekcji i trwające do około 30 sekund, zostało wyeliminowane przez obustronną wagoatomię szyjną. Znaczące podwyższenie wentylacji minutowej w stanie nieuszkodzonym spowodowane było jednoczesną stymulacją zarówno częstości jak i objętości oddechowej. Po wagoatomii szyjnej wzrost V_E był przesunięty w czasie i utrzymywał się powyżej 10 minut. Wagoatomia nadguzkowa zapobiegła wszystkim zmianom we wzorcu oddechowym wywołanym działaniem NPY 13-36, obserwowanym uprzednio w kontroli u zwierząt nieuszkodzonych.

Niezależnie od stanu unerwienia, obwodowa iniekcja NPY 13-36 wywoływała odpowiedź presyjną ciśnienia tętniczego krwi, utrzymującą się do 1 minuty z maksimum obserwowanym w

30 sekundzie. Dożylne podanie agonisty receptora Y_2 w stosowanej dawce nie miało wpływu na rytm serca.

Blokada receptorów NPY Y_2 przy użyciu BIIE 0246 (1 mg/kg), w przeciwieństwie do blokady receptorów Y_1 (BMS 193885-1mg/kg), skutecznie wyeliminowała zwiększenie objętości oddechowej, częstości oddychania oraz wentylacji minutowej, zainicjowanych podaniem NPY 13-36. Odpowiedź hipertensyjna uległa redukcji po zastosowaniu dwukrotnie większej dawki BIIE 0246.

Podsumowując, dożylne podanie NPY 13-36 stymulowało oddychanie oraz podnosiło ciśnienie tętnicze krwi poprzez obwodowe receptory Y_2 , ponieważ stosowany antagonistą tychże receptorów, BIIE 0246, blokujący obserwowane odpowiedzi, nie przechodzi bariery krew-mózg. Przyspieszenie oddychania generowane było na zakończeniach nerwów błędnych w obrębie płuc, natomiast w zwiększeniu objętości oddechowej pośredniczyły zwoje guzkowe. Indukowany przez NPY 13-36 wzrost ciśnienia tętniczego krwi mógł być wynikiem aktywacji receptorów Y_2 znajdujących się w mięśniu sercowym oraz mięśniówce i przydancie małych tętnic (Uddman i wsp., 2002; Gradin i wsp., 2006). Obserwowana hipertensja potwierdza wcześniejsze wyniki w których wykazano, że stymulacja obwodowych receptorów Y_2 u świnki morskiej powoduje zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi (Abrahamsson i wsp., 2000).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Bombezyna, somatostatyna i neuropeptyd Y są związkami o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Jednak jak dotąd nie ma badań opisujących wpływ ich obwodowego podania na funkcję układu oddechowego przy jednoczesnej ocenie funkcji układu krążenia. Systemowe działanie bombezyny i NPY na parametry sercowo-naczyniowe zostało częściowo opisane. Natomiast opis obwodowych efektów oddechowych trzech neuropeptydów, tworzący trzon niniejszej rozprawy, stanowi oryginalny wkład w poznanie ich znaczenia w fizjologii układu oddechowego. Po raz pierwszy wykazano zaangażowanie nerwów zatokowych w odpowiedź oddechową na dożylne podanie somatostatyny oraz pętli wagalnej w efekty oddechowe pobudzenia receptorów BB_2 , Y_1 i Y_2 . Na szczególną uwagę zasługuje tu rola zwojów guzkowych w modyfikowaniu wzorca oddechowego wywołanego podaniem NPY i NPY 13-36. Odcięcie drogi odruchowej powyżej zwoju guzkowego eliminowało transdukcję sygnału z wagalnych

neuronów czuciowych do jąder pasma samotnego, w różny sposób wpływając na komponenty wzorca oddechowego.

Aktywacja receptorów neuropeptydowych przy użyciu ich ligandów, transmitowana dośrodkowo poprzez nerw błędny i jego zwoje lub/i nerw zatokowy, generowała zarówno depresję oddechową jak i pobudzenie oddychania:

- Wykazano, że somatostatyna oraz NPY obniżały wentylację oddechową, działając depresyjnie zarówno na objętość jak i częstość oddychania. Odpowiedź oddechowa na dożylną iniekcję somatostatyny indukowana była pobudzeniem chemoreceptorów kłębków szyjnych, bowiem zapobiegło jej ich odnerwienie. W przypadku neuropeptydu Y hipowentylacja była zależna od aktywacji receptorów NPY Y_1 związanych ze zwojem guzkowym. Blokada wymienionych powyżej receptorów oraz sekcja neuronów dośrodkowych zwoju guzkowego znosiły zmiany we wzorcu oddechowym inicjowane dożylnym NPY.
- Bombezyna oraz NPY 13-36 (agonista receptorów NPY Y_2) podane systemowo stymulowały oddychanie. Bombezyna zwiększała wentylację pomimo zwolnionego rytmu oddechowego. Zwiększonej objętości oddechowej towarzyszyły westchnienia oraz wzrost amplitudy elektromiogramu przepony. NPY 13-36 stymulował oba parametry wzorca oddechowego. We wszystkich efektach oddechowych bombezyny oraz w przyspieszeniu oddychania indukowanym NPY 13-36 pośredniczyły wejścia czuciowe nerwu błędnego z płuc. Natomiast warunkiem wzrostu objętości oddechowej, inicjowanym przez NPY 13-36, było zachowanie ciągłości nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych. Wykazano, że w odpowiedź oddechową wywołaną bombezyną zaangażowane są receptory BB_2 , a w odpowiedź NPY 13-36 receptory NPY Y_2 .
- Bombezyna, neuropeptyd Y oraz NPY 13-36 powodowały hipertensję, zachodzącą poza pętlę wagalną. Bombezyna inicjowała wzrost ciśnienia tętniczego krwi poprzez pobudzenie receptorów bombezynowych BB_2 oraz α -adrenergicznych, NPY poprzez receptory NPY Y_1 a NPY 13-36 poprzez receptory NPY Y_2 . Tachykardia indukowana bombezyną zależna była od zachowanych ośrodkowych połączeń zwojów guzkowych i aktywacji receptorów β -adrenergicznych. W bradykardii wywołanej NPY pośredniczyły receptory NPY $_1$.
- Z efektów sercowo-naczyniowych dożylniej somatostatyny: bradykardia była niezależna od dróg dośrodkowych z nerwów błędnych oraz zatokowych, natomiast przecięcie tych ostatnich zredukowało odpowiedź hipotensyjną.

PIŚMIENNICTWO

- Abdala APL, Rybak IA, Smith JC, Zoccal DB, Machado BH, St-John WM, Paton JFR. Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009, 168, 19-25.
- Abrahamsson C. Neuropeptide Y₁- and Y₂-receptor-mediated cardiovascular effects in the anesthetized guinea pig, rat, and rabbit. *J. Card. Pharm.* 2000, 36, 451-458.
- Alheid GF, McCrimmon DR. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008, 164, 3-11.
- Ashour K, Shan L, Lee, JH, Schlicher W, Wada K, Wada E, Sunday ME. Bombesin inhibits alveolarization and promotes pulmonary fibrosis in newborn mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006, 173, 1377-1385.
- Balaguer L, Romano J, Ruiz-Pesini P. Localization of serotonin, cholecystokinin and somatostatin immunoreactivity in the lower respiratory tract of embryonic, foetal and postnatal sheep. *Histol. Histopathol.* 1992, 7, 703-708.
- Banks WA, Schally AV, Barrera CM, Fasold MB, Durham DA, Csernus VJ, Groot K, Kastin, AJ. Permeability of the murine blood-brain barrier to some octapeptide analogs of somatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, 87, 6762-6766.
- Barraco RA, Ergene E, Dunbar JC, El-Ridi MR. Cardiorespiratory response pattern elicited by microinjections of neuropeptide Y in the nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.* 1990, 24, 465-85.
- Bayorh MA, Feuerstein G. Bombesin and substance P modulate peripheral sympathetic and cardiovascular activity. *Peptides*, 1985, 1, 115-120.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* 1995, 75, 1-45.
- Boy C, Heusner TA, Poeppel TD, Redmann-Bischofs A et al. ⁶⁸Ga-DOTATOC PET/CT and somatostatin receptor (sst1-sst5) expression in normal human tissue: correlation of sst2 mRNA and SUV_{max}. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2011, 38, 1224-1236.
- Brophy S, Ford TW, Carey M, Jones JF. Activity of aortic chemoreceptors in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* 1999, 514, 821-828.
- Brown DR, Gillespie MA. Actions of centrally administered neuropeptides on rat intestinal transport: enhancement of ileal absorption by angiotensin II. *Eur. J. Pharmacol.* 1988, 148, 411-418.
- Burke PGR, Abbott SBG, McMullan S, Goodchild AK, Pilowsky PM. Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Botzinger complex. *Neurosci.* 2010, 167, 528-539.
- Chahl LA, Walker SB. Response of the rat cardiovascular system to substance P, neurotensin and bombesin. *Life Sci.* 1981, 29, 2009-2015.
- Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P, Bousquet J. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 158, 985-990.
- Chen Z, Hedner T, Hedner J. Local application of somatostatin in the ventrolateral brain medulla induces apnoea. *J. Appl. Physiol.* 1990, 69, 2233-2238.
- Coelho EF, Ferrari JR, Maximino JR, Fior-Chadi DR. Change in the expression of NPY subtypes Y1 and Y2 in central and peripheral neurons related to the control of blood pressure in rats following experimental hypertension. *Neuropeptides* 2004, 38, 77-82.
- Corder R, Pralong FP, Muller AF, Gaillard RC. Regional distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in human hypothalamus measured by immunoradiometric assay: possible influence of chronic respiratory failure on tissue levels. *Neuroendocrinol.* 1990, 51, 23-30.
- Cortelli P, Lombardi C, Montagna P, Parati G. Baroreflex modulation during sleep and in obstructive sleep apnea syndrome. *Auton. Neurosci.* 2012, 169, 7-11.
- Cutz E, Yeger H, Pan J. Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2007, 10, 419-435.
- Czyżyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Seroogy KB, Millhorn DE. Gene expression for peptides in neurons of the petrosal and nodose ganglia in rat. *Exp. Brain Res.* 1991, 83, 411-418.
- Daly M de B. Peripheral arterial chemoreceptors and respiratory-cardiovascular integration. In: *Monographs of the Physiological Society* No. 46 Clarendon Press, Oxford, 1997, 345-366.
- Daly M de B, Jones JFX. Respiratory modulation of carotid and aortic body reflex left ventricular inotropic responses in the cat. *J. Physiol.* 1998, 509.3, 895-907.
- Decressac M, Barker RA. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Exp. Neurol.* 2012, 238, 265-272.
- DiMarco AF, Euler von C, Romaniuk JR, Yamamoto Y. Positive feedback facilitation of external intercostals and phrenic inspiratory activity by pulmonary stretch receptors. *Acta Physiol. Scand.* 1981, 113, 375-386.
- Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir. Physiol. Neurobiol.*

- 2008, 164, 96-104.
- Doi A, Ramirez JM. State-dependent interactions between excitatory neuromodulators in the neuronal control of breathing. *J. Neurosci.* 2010, 30, 8251-8262.
- Dunbar JC, Ergene E, Anderson GF, Barraco RA. Decreased cardiorespiratory effects of neuropeptide Y in the nucleus tractus solitarius in diabetes. *Am. J. Physiol.* 1992, 262, R865-R871.
- e Silva MJM, Lewis DL. L- and N-type Ca^{2+} channels in adult rat carotid body chemoreceptor type I cells. *J. Physiol.* 1995, 489.3, 689-699.
- Fehlmann D, Langenegger D, Schuepbach E, Siehler S, Feuerbach D, Hoyer D. Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery. *J. Physiol. (Paris)* 2000, 94, 265-281.
- Filuk RB, Berezanski DJ, Anthonisen NR. Depression of hypoxic ventilatory response in humans by somatostatin. *J. Appl. Physiol.* 1988, 65, 1050-1054.
- Fisher LA, Cave CR, Brown MR. Central nervous system cardiovascular effects of bombesin in conscious rats. *Am J Physiol*, 1985, 248, H425-H431.
- Fregnan GB, Glasser AH. Cardiovascular pharmacology of bombesin, a new polypeptide from amphibian skin. *Farmaco Sci*, 1975, 30, 983-991.
- Gehlert DR. Introduction to the reviews on neuropeptide Y. *Neuropeptides* 2004, 38, 135-140.
- Glazkova EN, Inyushkin AN. Respiratory reactions to microinjection of bombesin into the solitary tract nucleus and their mechanisms. *Neurosc. Behav. Physiol.* 2006, 36, 403-408.
- Gradin KA, Buus CL, Li JY, Frobert O, Simonsen U. Neuropeptide Y_2 receptors are involved in enhanced neurogenic vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 2006, 148, 703-713.
- Gu Q, Lee LY. Sensitization of pulmonary chemosensitive neurons by bombesin-like peptides in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005, 289, L1104-L1112.
- Haji A, Taskeda R, Okazaki M. Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol. Ther.* 2000, 86, 277-304.
- Hedner J, Mueller RA, Hedner T, McCown TJ, Breese GR. A centrally elicited respiratory stimulant effect by bombesin in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1985, 115, 21-29.
- Helke CJ, Hill KM. Immunohistochemical study of neuropeptides in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Neurosci.* 1988, 26, 539-551.
- Hilaire G, Pasaro R. Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol. Sci.* 2003, 18, 23-28.
- Honda Y. Chemical control of breathing. In: *Control of breathing in health and disease*. Altose MD, Kawakami Y (eds.), Marcel Dekker, Inc. New York, 1999, p. 41-87.
- Ichikawa H. Innervation of the carotid body: immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc. Res. Tech.* 2002, 59, 188-195.
- Jacques D, Abdel-Samad D. Neuropeptide Y (NPY) and NPY receptors in the cardiovascular system: implication in the regulation of intracellular calcium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2007, 85, 43-53.
- Janssen PJ, Gardiner SM, Compton AM, Bennett T. Mechanisms contributing to the differential haemodynamic effects of bombesin and cholecystokinin in conscious, Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.* 1991, 102, 123-134.
- Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol. Rev.* 2008, 60, 1-42.
- Jordan D. Central nervous pathways and control of the airways. *Respir. Physiol.* 2001, 125, 67-81.
- Kalia M, Fuxe K, Agnata LF, Hokfelt T, Harfstrand A. Somatostatin produces apnea and is localized in medullary respiratory nuclei: a possible role in apneic syndromes. *Brain Res.* 1984, 236, 339-344.
- Kane MA, Toi-Scott M, Johnson GL, Kelley KK, Boose D, Escobedo-Morse A. Bombesin-like peptide receptors in human bronchial epithelial cells. *Peptides* 1996, 17, 111-118.
- Kobayashi M, Cheng ZB, Tanaka K, Nosaka S. Is the aortic nerve involved in arterial chemoreflex in rats. *J. Aut. Nerv. Sys.* 1999, 78, 38-48.
- Kummer W, Bachmann S, Neuhuber WL, Hanze J, Lang RE. Tyrosine-hydroxylase-containing vagal afferent neurons in the rat nodose ganglion are independent from neuropeptide-Y-containing populations and project to esophagus and stomach. *Cell Tissue Res.* 1993, 271, 135-144.
- Kummer W, Gibbins IL, Heym C. Peptidergic innervation of arterial chemoreceptors. *Arch. Histol. Cytol.* 1989, 52, 361-364.
- Lach E, Haddad EB, Gies JP. Contractile effect of bombesin on guinea pig lung in vitro: involvement of gastrin-releasing peptide-preferring receptors. *Am. J. Physiol.* 1993, 264, L80-L86.
- Lavezzi AM, Maturri L. Functional neuroanatomy of the human pre-Böttinger complex with particular reference to sudden unexplained perinatal and infant death. *Neuropathology* 2008, 28, 10-16.

- Lee LY, Pisarri TE. Afferent properties of reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir. Physiol.* 2001, 125, 47-65.
- Li NF, Yao XG, Zhu J, Yang J, Liu KJ, Wang YC, Wang XL, Zu FY. Higher levels of plasma TNF-alpha and neuropeptide Y in hypertensive patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Clin. Exp. Hypertens.* 2010, 32, 54-60.
- Lin S, Boey D, Herzog H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 2004; 38, 189-200.
- Llona I, Amuero E, Eugenin JL. Somatostatin inhibition of fictive respiration is modulated by pH. *Brain Res.* 2004, 1026, 136-142.
- Luts A, Uddman R, Alm P, Basterra J, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in human airway: distribution and coexistence pattern. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993, 101, 52-60.
- Makinde TO, Steininger R, Agrawal DK. NPY and NPY receptors in airway structural and inflammatory cells in allergic asthma. *Exp. Mol. Pathol.* 2013, 94, 45-50.
- Matsuda H, Brumowsky PR, Kopp J, Pedrazini T, Hokfelt T. Distribution of neuropeptide YY1 receptors in rodent peripheral tissues. *J. Comp. Neurol.* 2002, 449, 390-404.
- Mazzone SB, Canning BJ. Central nervous system control of the airways: pharmacological implications. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002, 2, 220-228.
- Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioural implications. *Peptides* 2004, 25, 511-520.
- Morton KD, McCloskey MJD, Potter E.K. Cardiorespiratory responses to intracerebroventricular injection of neuropeptide Y in anaesthetized dogs. *Regul. Pept.* 1999, 81, 81-88
- Niewoehner DE, Levine AS, Morley JE. Central effects of neuropeptides on ventilation in the rat. *Peptides* 1983, 4, 277-281.
- Nurse CA, Piskuric NA. Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Sem. Cell Develop. Biol.* 2013, 24, 22-30.
- Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int. J. Dev. Biol.* 2005, 49, 293-300.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J. Neurochem.* 2004, 89, 1057-1091.
- Oliveira FS, Nessler RA, Castania JA, Salgado HC, Fazan VP. Ultrastructural and morphometric alterations in the aortic depressor nerve of rats due to long term experimental diabetes: Effects of insulin treatment. *Brain Res.* 2013, 1491, 197-203.
- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 1999, 20, 157-198.
- Pedersen MEF, Dorrington KL, Robbins PA. Effects of somatostatin on the control of breathing in humans. *J. Physiol.* 1999, 521.1, 289-297.
- Pedrazini T, Seydoux J, Kunstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F et al. Cardiovascular response, feeding behaviour and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat. Med.* 1998, 4, 722-726.
- Potter EK, McCloskey DI. Excitation of carotid body chemoreceptors by neuropeptide Y. *Respir. Physiol.* 1987, 67, 357-365.
- Reynaert H, van Rossen E, Uyama N, Chatterjee N, Kumar U, Urbain D, Geerts A. Expression of somatostatin receptors in splanchnic blood vessels of normal and cirrhotic rats. *Liver Int.* 2007, 27, 825-831.
- Saareanta T, Polo O. Hormones and breathing. *Chest* 2002, 122, 2165-2182.
- Sant'Ambrogio G, Widdicombe J. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respir. Physiol.* 2001, 125, 33-45.
- Schelegle ES, Green JF. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respir. Physiol.* 2001, 125, 17-31.
- Schloos J, Raulf F, Hoyer D, Bruns C. Identification and pharmacological characterization of somatostatin receptors in rat lung. *Br. J. Pharmacol.* 1997, 121, 963-971.
- Shan L, Emanuel RL, Dewald D, Torday JS, Asokanathan N et al. Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004, 286, L165-L173.
- Smith WHT, Nair RU, Adamson D, Kearney MT, Ball SG, Balmforth J. Somatostatin receptor subtype expression in the human heart: differential expression by myocytes and fibroblasts. *J. Endocrinol.* 2005, 187, 379-386.
- Spary EJ, Maqbool A, Batten TFC. Expression and localisation of somatostatin receptor subtypes sst1-sst5 in areas of the rat medulla oblongata involved in autonomic regulation. *J. Chem. Neu.* 2008, 35, 49-66.
- Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. *J. Comp. Neurol.* 2003, 455, 499-512.

- Stornetta RL. Identification of neurotransmitters and co-localization of transmitters in brainstem respiratory neurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008, 164, 18-27.
- Than M, Nemeth J, Szilvassy Z, Pinter E, Helyes Z, Szolcsányi J. Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released fibres of the rat and guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 399, 251-258.
- Qin XQ, Qu X. Extraintestinal roles of bombesin-like peptides and their receptors: lung. *Curr. Opin.* 2013, 20, 22-26.
- Uddman R, Moller S, Nilsson T, Nystrom S, Ekstrand J, Edvinsson L. Neuropeptide YY₁ and neuropeptide YY₂ receptors in human cardiovascular tissues. *Peptides* 2002, 23, 927-934.
- Wheway J, Herzog H, Mackay F. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007, 17, 1743-1752.
- Widdicombe J. Airway receptors. *Respir. Physiol.* 2001, 125, 3-15.
- Yeğen BC. Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1013-1022.
- Zogovic B, Pilowsky PM. Intrathecal bombesin is sympathoexcitatory and pressor in rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011, 301, R1486-R1494.
- Zhou S, Potts EN, Cuttitta F et al. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 2100-2105.
- Zhuo H, Ischikawa H, Helke CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. *Progr. Neurobiol.* 1997, 52, 79-107.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Analiza bibliometryczna

Współautorstwo 21 publikacji naukowych (wszystkie objęte listą filadelfijską), w tym 20 prac oryginalnych i 1 poglądowej. Pierwszy autor w 18 publikacjach. 5 artykułów zostało opublikowanych przed doktoratem, 16 po doktoracie.

Sumaryczny **Impact Factor** wynosi **44.512** (według *Journal Citation Reports JCR*, zgodnie z rokiem opublikowania).

Główne osiągnięcia badawcze

1. Pracę naukową rozpoczęłam w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN gdzie pod kierunkiem Pani Prof. M. Szeredy-Przestaszewskiej obroniłam w 2004 roku pracę doktorską p.t.: „Rola obwodowych receptorów gabaergicznych i glutaminianergicznych typu NMDA w regulacji oddychania u szczura”. Jej celem było zbadanie wpływu pobudzenia obwodowych receptorów endogennych i egzogennych substancji neuroaktywnych takich jak: kwas γ -aminomasłowy (GABA), N-metyl-D-asparaginian (NMDA), klonidyna i kapsaicyna na zmiany wzorca oddechowego, wentylacji i ciśnienia krwi oraz próba wyjaśnienia udziału informacji dośrodkowej wywodzącej się z płuc, krtani i chemoreceptorów kłębków szyjnych w obserwowanych odruchach oddechowych.

Wykazałam, że efekty oddechowe badanych substancji były niezależne od dróg czuciowych przewodzonych nerwem błędnym z obszaru płuc. Po raz pierwszy opisałam bezdech

wydechowy jako stały efekt obwodowego działania kwasu γ -aminomasłowego (głównego neuroprzekaźnika hamującego w ośrodkowym układzie nerwowym) oraz udział wejść czuciowych z chemoreceptorów kłębków szyjnych w generowaniu zmian oddechowych wywołanych GABA. Wykazałam, że w powstawaniu zmian wzorca oddechowego oraz hipotensji pośredniczyły receptory GABA_A.

Odpowiedź oddechowa na kapsaicynę (alkaloid-wyciąg z papryki chili) różniła się od opisanego wcześniej klasycznego chemoodruchu u kota. Po bezdechu po-kapsaicynowym u szczura obserwowano hiperwentylację i cała sekwencja odpowiedzi obecna była po obustronnej wago-tomii szyjnej. Blokada receptorów waniloidowych oraz przecięcie nerwów krtanowych górnych, stanowiących w tym układzie doświadczalnym jedyną drogę do zwoju guzkowego, znosiły całkowicie odpowiedź oddechową na kapsaicynę. Badania te przyniosły pierwszy opis chemoodruchu płucnego u szczura.

Hamujący wpływ NMDA (agonisty receptorów NMDA, należących do grupy receptorów kwasu glutaminowego) 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 jej krótkotrwałym obniżeniem. Przecięcie nerwów zatokowych oraz blokada receptorów NMDA eliminowały zmiany we wzorcu oddechowym wywołane przez NMDA, niezależnie od ścieżki podania. Jest to pierwsze doniesienie dokumentujące obwodowe działanie NMDA na wzorec oddechowy oraz pośrednictwo drogi chemorecepcyjnej w odpowiedzi oddechowej na stymulację obwodowych receptorów NMDA.

Udział obwodowych receptorów α_2 -adrenergicznych w zmianach wentylacyjnych badałam stosując ich agonistę, klonidynę. Stwierdziłam, że poprzedzone krótkotrwałym spadkiem, zwiększenie objętości oddechowej, wywołane dożylnie podaną klonidyną wynikało z pobudzenia chemoreceptorów kłębków szyjnych i skojarzone było ze sterowanym ośrodkowo długotrwałym zwolnieniem rytmu oddechowego. Odpowiedzi te były niezależne od sprzężenia wagalnego z płuc. Ustaliłam, że odpowiedzi oddechowe na podanie klonidyny zachodziły za pośrednictwem receptorów α_2 -adrenergicznych.

Wyniki tych badań zostały zamieszczone w mojej pracy doktorskiej i opublikowane w formie artykułów w: *Acta Neurobiol. Exp.* 2000, 60:159-16; *Acta Neurobiol. Exp.* 2002, 2: 19- 24; *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2002, 13: 189-197; *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004, 31: 101-106; *Respir Physiol. Neurobiol.* 2005, 145: 127-134; *Exp. Physiol.* 2006, 91: 269-275.

2. Podczas rocznego stażu podoktorskiego w Zakładzie Farmakologii i Patofizjologii, Uniwersytetu w Utrechcie w Holandii zajmowałam się badaniem właściwości immunomodulacyjnych wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulinowych, w mysim modelu alergii kontaktowej i astmy nieatopowej. Pobyt w laboratorium Prof. Nijkampa pozwolił mi na praktyczne zapoznanie się z technikami histologicznymi, hodowlą komórek plazmatycznych oraz cytometrią przepływową. Swoją wiedzę pogłębiłam biorąc także udział w warsztatach odbywających się w Hanowerze (Niemcy), poświęconych astmie w modelach zwierzęcych.

W prowadzonej pracy doświadczalnej wykazałam, że wcześniejsza ekspozycja myszy (przed uczuleniem) na dożylnie podane łańcuchy lekkie moduluje obie fazy alergii kontaktowej. Zaobserwowałam zniesienie wczesnej fazy obrzęku uszu, podczas gdy późna faza była jedynie zredukowana. łańcuchy lekkie wpłynęły na odpowiedź nadwrażliwości w drogach oddechowych: w płynie pęcherzykowo-oskrzelowym zanotowano istotnie zmniejszoną infiltrację komórek pro-zapalnych oraz produkcję cytokiny IL-6. Immunomodulacja była niezależna od specyficzności antygenowej, oraz nie można jej było zastąpić łańcuchami ciężkim o tej samej specyficzności. F991-antagonista wiążący łańcuchy lekkie, znosił ich immunosupresyjne działanie.

Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że lokalnie (skórnice) zastosowany F991 zarówno przed i jak i po zaaplikowaniu haptenu, efektywnie zredukował reakcję nadwrażliwości kontaktowej u myszy, co manifestowało się brakiem obrzęku uczulanej tkanki oraz zredukowaną produkcją IL-6 w homogenatach z niej. Wyniki te weszły w skład publikacji: *Clinic. Exp. Allergy*. 2007, 37: 270-5. We współpracy z Zakładem Farmakologii i Patofizjologii w Utrechcie przygotowywana jest publikacja dotycząca immunomodulacyjnych właściwości łańcuchów lekkich w kilku różnych modelach alergii.

3. Kolejny cykl moich badań stanowił kontynuację pracy badawczej nad neurochemicznymi mechanizmami odruchów oddechowych oraz znaczeniem informacji czuciowej z odcinka płucnego nerwów błędnych, pośrednictwa zwoju guzkowego nerwu błędnego oraz chemoreceptorów kłębków szyjnych w regulacji wzorca oddechowego.

Morfina-niepeptydowy agonista opiatowy w dawkach terapeutycznych powoduje depresję wentylacji co uważane jest za rezultat zahamowania ośrodków oddechowych w rdzeniu przedłużonym. Celem moich badań było określenie udziału płucnych receptorów

opiodowych w powstawaniu oddechowo-kръżeniowej odpowiedzi wywołanej dożylną iniekcją morfiny. Uzyskane wyniki potwierdziły, że depresja częstości i objętości oddychania wywołane podaniem morfiny do żyły udowej u uśpionych szczurów jest wynikiem bezpośredniego oddziaływania opiatu na ośrodki oddechowe pnia mózgu. Natomiast obecność bezdechu wydechowego i spadku ciśnienia krwi warunkuje zachowanie wejść wagalnych z płuc. W odpowiedź oddechową zaangażowane są receptory opiodowe, bowiem użycie ich antagonisty-naloksonu zapobiegało depresji oddechowej. Wyniki opublikowano w: *J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 56: 195-203.

Kolejna praca doświadczalna pozwoliła na opisanie efektów kръżeniowo-oddechowych pobudzenia receptorów serotoninowych 5HT_{1A} po podaniu do kръżenia płucnego ich specyficznego agonisty (8-OH-DPAT). W mechanizmie wywołanej odpowiedzi hiperwentylacyjnej nie pośredniczy sprzężenie wagalne z płuc ani aferentacja ze zwojów guzkowych nerwu błędnego. Za wzrost komponenty objętościowej wzorca oddechowego jak i odpowiedź hipotensyjną odpowiedzialna jest aktywacja receptorów 5HT_{1A} w pniu mózgu, bowiem stosowany agonista przekracza barierę krew/mózg. W generacji przyspieszonego oddychania uczestniczą natomiast chemoreceptory kłębków szyjnych. Wyniki zostały opublikowane w: *Exp. Physiol.* 2007, 92.5: 953-961.

Adenozyna jest endogennym nukleozydem o depresyjnym działaniu na oddychanie za pośrednictwem receptorów A₁ i stymulującym poprzez receptory A₂, znajdujące się w chemoreceptorach obwodowych. Celem moich badań było określenie wpływu pobudzenia receptorów adenozynowych A₁, obecnych na dośrodkowych zakończeniach nerwu błędnego, na zachowanie się wzorca oddechowego i ciśnienia krwi u uśpionych szczurów. Wykazałam, że depresja wentylacji wywołana podaniem CPA (N⁶-cyklopentylu adenozyny-agonisty receptora A₁) obejmująca wszystkie komponenty wzorca oddechowego oraz spadek ciśnienia krwi zachodzą za pośrednictwem receptorów A₁ obecnych na drodze wagalnej pomiędzy zwojem guzkowym a rdzeniem przedłużonym. Badania te wskazały na istotną rolę zwoju guzkowego w modulacji wzorca oddechowego i stały się podstawą publikacji: *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 59 (4): 759-770.

4. Innym przedmiotem moich zainteresowań były badania nad wpływem intoksykacji ołowiu na ultrastrukturę mięszu płucnego szczura. Dzięki zastosowaniu mikroskopu elektronowego opisano zmiany patologiczne, pojawiające się w kilka dni po dootrzewnowym

podaniu octanu ołowiu. Stwierdzono akumulację monocytów i płytek krwi w naczyniach kapilarnych miąższu. W przegrodzie oddechowej obserwowano kumulację makrofagów, obecność włókien elastyny, kolagenu i fibroblastów. Ciała blaszkowate komórek nabłonkowych typu II wykazywały cechy rozwarstwienia i uszkodzenia blaszek. Badania te przyniosły pierwszy opis zmian na poziomie ultrastruktury płuc oraz pierwszy opis destrukcji surfaktantu i nieprawidłowości w jego wyglądzie wywołanych zatruciem ołowiem. Określono również poziom ołowiu we krwi obwodowej oraz płucach metodą absorbcyjnej spektrometrii atomowej. Wyniki tych powyższych eksperymentów opublikowano w *J. Electron Microsc. (Tokyo) 2011, 60: 289–294*. Manuskrypt, zawierający wyniki z badań monitorujących skutki intoksykacji ołowiem po kilku tygodniach od ekspozycji, został zaakceptowany do publikacji w *Microscopy & Microanalysis (opublikowany online 28.08.2013)*. Zastosowanie mikroanalizy rentgenowskiej wykonanej na wycinkach tkanki płuc wykazało, że metal ten skumulowany jest głównie w komórkach płucnych typu II i makrofagach płucnych. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego ujawniły włóknienie, zmiany rozedmowe miąższu płucnego oraz anomalie w produkcji surfaktantu.

5. Jednocześnie prowadzone i przygotowywane do publikacji są badania nad działaniem związku hybrydowego, składającego się z farmakoforu neurotensyny i reszty opioidowej [Ile⁹ PK20], na funkcje układu oddechowego i parametry sercowo-naczyniowe u uśpionych szczurów. Substancja ta syntetyzowana w Zakładzie Neuropeptydów rodzimego Instytutu ma obiecujące właściwości przeciwbólowe, ale brak jest jednoznacznego opisu jej działania na układ oddechowy i krążenie. Wyniki wcześniejszych badań nad neurotensyną opublikowanych w *Eur. J. Pharmacol. 2012, 691: 245-250*, pozwolą na porównanie wzorca odpowiedzi systemowych na chimerę [Ile⁹ PK20], oraz określenie stopnia zaangażowania w nie dróg odruchowych oraz receptorów neurotensynowych i opioidowych.

Obecnie współpracuję także z dr hab. M. Mazurem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego nad kontrolowanym uwalnianiem substancji neuroaktywnych zamkniętych w nano- i mikrokapsułkach polipirolowych, w warunkach eksperymentalnych *in vivo*.

Udział w konferencjach naukowych

Autor i współautor 31 doniesień konferencyjnych, w tym 14 o zasięgu międzynarodowym i 17 krajowych (szczegółowe informacje w załączniku nr 4).

12 komunikatów zjazdowych zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Jako pierwszy autor osobiście referowałam 15 wystąpień, 7 komunikatów prezentowałam na sesjach posterowych.

Stáže naukowe i nagrody

2005/2006 - roczny staż podoktorski w Zakładzie Farmakologii i Patofizjologii, Instytutu Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu w Utrechcie w Holandii

2005 - nagroda European Respiratory Society, stypendium na roczny pobyt zagraniczny dla młodych naukowców w Utrechcie w Holandii.

2006 - nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN dla młodego pracownika nauki za artykuł naukowy opublikowany w J. Physiol. Pharmacol. 2005, 56, 195-203.

2008 - nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN dla młodego pracownika nauki za artykuł naukowy opublikowany w Exp. Physiol. 2006, 91, 269-275.

2009 - nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN za artykuł naukowy opublikowany w J. Physiol. Pharmacol. 2008, 59, 759-770.

2011 - nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN za artykuł naukowy o wysokim współczynniku oddziaływania, opublikowany w Pharmacol. Res. 2010, 62, 444-449 [5-letni IF= 4.408].

Krzysztof K.