

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Piotr Wojciechowski

**Wpływ analogów neuropeptydowych o działaniu przeciwbólowym
na wzorzec oddechowy i funkcje sercowo-naczyniowe
u uśpionych szczurów**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Szereda-Przestaszewskiej
w Pracowni Odruchów Oddechowych Zakładu Farmakologii Doświadczalnej
IMDiK PAN



Warszawa, 2014

Serdecznie dziękuję:

*Pani Profesor Małgorzacie Szereda-Przestaszewskiej
za opiekę merytoryczną i wszechstronną pomoc na każdym etapie powstawania
niniejszej pracy oraz za nieocenioną życzliwość i cierpliwość*

*Panu Profesorowi Andrzejowi W. Lipkowskiemu
za udostępnienie fascynującego przedmiotu badań*

*Pani dr hab. Katarzynie Kaczyńskiej
za wszelkie niezwykle cenne konsultacje i uwagi*

*Pani Teresie Warnawin
za doskonałą pomoc techniczną w przeprowadzaniu doświadczeń*

*Moim Najbliższym, szczególnie Mamie
za wiarę we mnie, olbrzymie wsparcie i nieopisaną cierpliwość*

Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w:

1. Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Supranodose vagotomy eliminates respiratory depression evoked by dermorphin in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2007, 563: 209-212
2. Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Respiratory and cardiovascular effects of biphalin in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2009, 602: 50-53
3. Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Delta opioid receptors contribute to the cardiorespiratory effects of biphalin in anaesthetized rats. *Pharmacol Rep.* 2011, 63: 1235-1242

Spis treści

| | |
|---|----|
| SPIS TREŚCI | 4 |
| WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY | 6 |
| I WSTĘP | 7 |
| II CEL PRACY | 20 |
| III MATERIAŁ I METODY | 21 |
| III.1 Charakterystyka związków stanowiących przedmiot badań | 21 |
| III.2 Materiał doświadczalny | 21 |
| III.3 Procedury chirurgiczne | 22 |
| III.3.1 Znieczulenie ogólne | 22 |
| III.3.2 Preparatyka wstępna | 22 |
| III.3.3 Preparatyka nerwów błędnych w odcinku szyjnym oraz powyżej zwoju dolnego nerwu błędnego | 23 |
| III.4 Przygotowanie roztworów do iniekcji, pomiary | 23 |
| III.5 Przebieg doświadczeń | 25 |
| III.5.1 Badanie zmian wzorca oddechowego oraz parametrów sercowo-naczyniowych .. | 25 |
| III.5.2 Określenie udziału pętli wagalnej w obserwowanych efektach krążeniowo- oddechowych | 25 |
| III.5.3 Ocena udziału poszczególnych receptorów w efektach krążeniowo-oddechowych wywoływanych przez badane związki | 26 |
| III.5.3.1 Ocena udziału receptorów opioidowych | 26 |
| III.5.3.2 Badanie udziału receptorów tachykininowych NK ₁ | 26 |
| III.6 Analiza statystyczna | 26 |
| IV WYNIKI | 27 |
| IV.1 Wpływ AWL3106 na kształt wzorca oddechowego oraz udział nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach | 27 |
| IV.2 Udział receptorów opioidowych w reakcjach oddechowo-krążeniowych indukowanych przez AWL3106 | 34 |
| IV.3 Wpływ blokady receptorów opioidowych i tachykininowych na efekty oddechowo- krążeniowe wywoływane przez AWL3106 | 39 |
| IV.4 Efekty oddechowo-krążeniowe wywoływane przez dermorfinę: udział nerwów błędnych | 42 |
| IV.5 Efekty oddechowo-krążeniowe indukowane przez AWL2077 oraz rola nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach | 48 |

| | | |
|-------|--|-----|
| IV.6 | Efekt jednoczesnego podania dermorfiny i AWL2077 na oddychanie i parametry krążeniowe | 52 |
| IV.7 | Wpływ bifaliny na wzorzec oddechowo-krążeniowy i udział nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach | 57 |
| IV.8 | Rola receptorów opioidowych μ i δ w efektach krążeniowo-oddechowych wywołanych przez bifalinę | 64 |
| V | DYSKUSJA | 72 |
| V.1 | AWL3106 | 73 |
| V.1.1 | Zmiany oddechowe..... | 73 |
| V.1.2 | Zmiany sercowo-naczyniowe..... | 80 |
| V.2 | Bifalina | 83 |
| V.2.1 | Zmiany oddechowe..... | 83 |
| V.2.2 | Zmiany sercowo-naczyniowe..... | 86 |
| VI | PODSUMOWANIE I WNIOSKI | 88 |
| | PIŚMIENNICTWO | 90 |
| | STRESZCZENIE..... | 101 |
| | ABSTRACT | 106 |

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

BP – ciśnienie tętnicze krwi

BP MAX – maksymalne ciśnienie krwi

CVLM – część doogonowa brzuszno-bocznej części opuszki pnia mózgu

∫ Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

f – częstość oddychania

HR – częstość skurczów serca

MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi

MPE – maksymalny procentowy efekt przeciwbólowy

NLX – nalokson

NTL – naltrindol

NTS – jądro pasma samotnego

RVLM – część przednia brzuszno-bocznej części opuszki pnia mózgu

SP – substancja P

T_E – czas wydechu

V_E – wentylacja minutowa

VGnG – wagotomia nadguzkowa

VGS – wagotomia szyjna

V_T – objętość oddechowa

I WSTĘP

Rytmiczne oddychanie, funkcja niezbędna do życia kręgowców, generowane jest przez sieć neuronalną w pniu mózgu. Neurony oddechowe skoncentrowane są w trzech strefach, połączonych funkcjonalnie:

- (1) grzbietowej, której główną strukturę stanowią jądra pasma samotnego (NTS); tylna część tego jądra jest miejscem zakończeń czuciowych z obszaru płuc i chemoreceptorów obwodowych,
- (2) brzusznej, zawierającej kompleks pre-Bötzingera pełniący podstawową rolę w generacji rytmu oddechowego *in vitro* i *in vivo*,
- (3) grupie neuronów oddechowych mostu, współuczestniczącej w generacji rytmu oddechowego (Gray i wsp., 1999, 2001; Alheid i wsp. 2004, 2008).

Wzorzec eupneicznego oddychania, zapewniający homeostazę i adaptację organizmu do wymogów środowiskowych, kształtowany jest przez dopływ do sieci wyżej opisanych neuronów oddechowych pnia mózgu sygnałów z receptorów nerwu błędnego, zlokalizowanych w drzewie tchawiczo-oskrzelowym układu oddechowego. Informacja przewodzona jest przez pień nerwu błędnego oraz jego zwoje dolny (guzkowy) i górny (szyjny) do NTS. Podstawową rolę w modyfikacji wzorca oddechowego pełnią wolno-adaptujące zakończenia czuciowe w mięśniówce gładkiej dróg oddechowych (mechanoreceptory płucne), zaangażowane w odruch inflacyjny Heringa-Breuera. Bodźcem dla tego odruchu jest wzrost objętości lub ciśnienia w drogach oddechowych, a efekt ich działania polega na zakończeniu wdechu i obniżeniu objętości oddechowej. Zasadnicza funkcja to utrzymanie *status quo* (Schelegle i Green, 2001).

Szybko-adaptujące receptory o zmielinizowanych włóknach i oskrzelowo-płucne niezmielinizowane włókna C, mieszczące się w nabłonku oraz śluzówce, reagują na bodźce mechaniczne, drażniące i chemiczne w drogach oddechowych. Pobudzenie ich wywołuje różne odpowiedzi odruchowe, takie jak hiperwentylacja, głębokie oddechy, skurcz oskrzeli,

obniżenie objętości oddechowej, przyspieszenie oddychania i skutki sercowo-naczyniowe (Sant' Ambrogio i Widdicombe, 2001; Lee i Pisarri, 2001).

W obwodowej chemicznej regulacji oddychania uczestniczą struktury chemowrażliwe głównie kłębków szyjnych. Pobudza je hipoksja, hiperkapnia i spadek pH krwi tętniczej. Umiejscowione są symetrycznie w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej na zewnętrzną i wewnętrzną (Gonzalez i wsp., 1994). Zaopatruje je nerw zatokowy, niezmielinizowany w 86% u szczura (McDonald, 1983), będący gałązką nerwu językowo-gardłowego, którego komórki znajdują się w zwoju skalistym, a także włókna aferentne z obydwu zwojów nerwu błędnego (Ichikawa, 2002). Kłębki aortalne, zlokalizowane w okolicy pnia tętnicy płucnej i łuku aorty, unerwione są przez nerw aortalny (gałązka nerwu błędnego), zmielinizowany w 20% u szczura (Fazan i wsp., 1997). Mają nikły udział w odpowiedziach chemorecepcyjnych (Sapru i wsp., 1981a).

W stabilizacji ciśnienia tętniczego krwi uczestniczą baroreceptory umiejscowione w ścianach zatok szyjnych i łuku aorty, które zaopatrywane są przez wymienione powyżej nerw zatokowy i nerw aortalny. Impulsy nerwowe zarówno z receptorów płucnych nerwu błędnego jak i chemo- i baroreceptorów docierają w głównej mierze do jąder środkowego, spoidłowego i bocznego w paśmie samotnym pnia mózgu (Taylor i wsp., 1999).

W ośrodkową kontrolę krążenia zaangażowane są wzajemnie powiązane neurony przedniej (RVLM) i doogonowej (CVLM) brzuszno-bocznej części opuszki pnia mózgu, określane pierwotnie jako, odpowiednio, ośrodek naczynioruchowy i pole depresyjne. Mają projekcje do rdzenia kręgowego, a sterowane są przez wejścia baroreceptorowe (Pilowsky i Goodchild, 2002).

Receptory opioidowe: μ , δ i κ , znajdujące się w układzie nerwowym są miejscem wiązania substancji przeciwbólowych pochodnych opium, takich jak morfina, kodeina, papaweryna, syntetycznych opioidów o morfino-podobnej aktywności oraz endogennych peptydów opioidowych obejmujących m.in. enkefaliny, endorfiny i dynorfiny.

Typowe endogenne peptydy opioidowe nie są selektywne w stosunku do jednego typu receptora. Pochodzą z trzech różnych prekursorów oraz charakteryzują się wspólną sekwencją na N-końcu Tyr-Gly-Gly-Phe. Wywodząca się z proopiomelanokortyny β -endorfina wykazuje podobną siłę wiązania do receptorów μ i δ oraz znacznie mniejszą do κ . Pochodzące z proenkefaliny Leu- i Met-enkefalina prezentują silne powinowactwo do receptorów δ , znacznie mniejsze do μ oraz znikome do κ . Peptydy o wydłużonym łańcuchu Met-enkefaliny (Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷ oraz Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸) wykazują zmniejszoną preferencję wiązania do receptora δ , natomiast metorphamid (Met-enkefalina-Arg⁶-Arg⁷-Val⁸-NH₂) charakteryzuje się zwiększonym wiązaniem do receptora μ . Endogennymi ligandami preferującymi wiązanie do receptora κ , ale wykazującymi także znaczne powinowactwo do receptorów μ i δ , są powstające z prodynorfiny dynorfina A, dynorfina B oraz α - i β -neoendorfina (Janecka i wsp., 2004; Perlikowska i wsp., 2009; Corbett i wsp., 2013).

Inne peptydy wyizolowane z mózgu, charakteryzujące się wysoką selektywnością względem receptora μ lecz nie mające do tej pory ustalonego endogennego prekursora to: endomorfina-1 i endomorfina-2. Nie wykazują one podobieństwa strukturalnego do ww. typowych peptydów opioidowych. Pod tym względem najbliższe im do pochodzących z β -kazeiny β -kazomorfin i morficeptyn lub też hemorfiny-4 pochodzącej z hemoglobiny, które sklasyfikowano jako nietypowe peptydy opioidowe (Janecka i wsp., 2004; Terskiy i wsp., 2007; Perlikowska i wsp., 2009). W tej grupie znalazły się także dermorfiny i deltorfiny, peptydy wyizolowane ze skóry południowoamerykańskich rzekotek (*Phylomedusinae*), wykazujące selektywność względem, odpowiednio, receptorów opioidowych μ i δ . Pomimo opisanej immunoreaktywności dermorfinopodobnej w mózgu i tkankach obwodowych ssaków nie sklasyfikowano tego heptapeptydu jako opioidu endogennego (Negri i wsp., 1981; Melchiorri i Negri, 1996; Negri i wsp., 2000; Terskiy i wsp., 2007).

Peptydy opioidowe obecne w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym stanowią wewnętrzny system kontroli bólu, a nadto zaangażowane są w funkcje autonomiczne tego układu, sprawując między innymi kontrolę nad czynnościami fizjologicznymi organizmu poprzez regulację uwalniania neuroprzekaźników i modulację endokrynną (Akil i wsp., 1984; Mansour i wsp., 1995; Melchiorri i Negri, 1996).

Obecność opioidów, a także poszczególnych receptorów mniej licznie występujących niż w układzie nerwowym, udokumentowano w narządach obwodowych: nadnerczach, nerkach, układzie pokarmowym, sercu i płucach, (Tang i wsp., 1982; Shimosegawa i wsp., 1990; Wittert i wsp., 1996).

Badania immunohistochemiczne i badania ekspresji mRNA receptorów opioidowych u szczura wykazały, że mózg i rdzeń kręgowy wypełnia głównie sieć receptorów μ , o największym zagęszczeniu na linii śródmózgowie/podwzgórze. W zwojach czuciowych, skolokalizowane są z receptorami δ (Ding i wsp., 1996; Búzás i Cox, 1997). W grupach grzbietowej i brzusznej neuronów oddechowych pnia mózgu, sprawujących kontrolę oddychania, wykazano intensywne zagęszczenia receptorów μ i κ w jądrach pasma samotnego i w jądrze ruchowym (dwuznacznym) nerwu błędnego oraz receptora δ w jądrach mostu u szczura i kota (Mansour i wsp., 1994, 1995; Nomura i wsp., 1996; Haji i wsp., 2003). Wszystkie endogenne opioidy zlokalizowane są w obszarach opuszkowych i mostowych związanych z oddychaniem (Lalley, 2008).

Przytoczony na początku wstępu NTS, wchodzący w skład grupy grzbietowej neuronów oddechowych, jest pierwszą ośrodkową synapsą dla informacji dośrodkowej z dróg oddechowych, struktur baro- i chemoreceptyjnych, a także wejść nocycetywnych (Boscan i wsp., 2002). Włókna dośrodkowe nerwu błędnego, zaopatrującego serce, płuca i trzewia, a kończące się w NTS, wyposażone są w receptory opioidowe, których transport aksonalny zachodzi dwukierunkowo, tak samo do ośrodków w rdzeniu przedłużonym, jak i na obwód. Toteż znajdowano je zarówno w błonie pre- jak i postsynaptycznej (Atweh i wsp., 1978;

Zarbin i wsp., 1990; Nomura i wsp., 1996; Li i wsp., 1996; Aicher i wsp., 2000a, b). W NTS zlokalizowana jest większość substancji neuroaktywnych obecnych w organizmie, między innymi wszystkie endogenne opioidy oraz substancja P (Maley, 1996).

Wszystkie typy receptorów opioidowych umiejscowione są w neuronach zwojów grzbietowych rdzenia i uczestniczą w transmisji bodźców czuciowych na drodze dośrodkowej do mózgu poprzez rdzeń kręgowy i jądro rdzeniowe nerwu trójdzielnego (Bourgoin i wsp., 1994; Mansour i wsp. 1995). Na tym poziomie zachodzi regulacja percepcji bólu, w której pośredniczy substancja P, najlepiej poznany spośród neuroprzekaźników neuropeptyd, magazynowany w neuronach zwojów grzbietowych rdzenia, odpowiedzialny za przekaz informacji bólowej z obwodu do rdzenia kręgowego (Otsuka i Yoshioka, 1993; Hökfelt i wsp., 2000).

Własności analgetyczne opioidów decydują o ich powszechnym stosowaniu w znoszeniu bólu, a morfina i jej syntetyczne pochodne w dalszym ciągu pozostają na pierwszej linii w walce z nim.

Związki te charakteryzują się powinowactwem przede wszystkim do receptorów μ i δ a wywoływana przez nie depresja oddechowa stanowi poważny problem kliniczny. Powodują zaburzenia wentylacji dotykając czasowej i objętościowej komponenty wzorca oddechowego poprzez zwolnienie rytmu (prowadzące często do bezdechu) i spłycenie oddychania. Rozwinięte w ostatnich trzech dekadach badania doświadczalne na gryzoniach wzbogaciły wiedzę na temat ośrodkowych, i rzadziej, obwodowych efektów iniekcji agonistów receptorów opioidowych. Dane eksperymentalne wskazują, że agoniści działają depresyjnie na sieć neuronów oddechowych w centralnym jak i w obwodowym układzie nerwowym.

I tak efekty dokomorowej (icv) iniekcji dermorfiny, egzogenne peptydu opioidowego, zastosowanej w niskich dawkach u czuwających szczurów, to wzrost ciśnienia tętniczego krwi i pobudzenie oddychania (Feurestein i Faden, 1983). Stosowanie wyższych dawek obniżało wartość wentylacji minutowej wywołując zwolnienie oddychania oraz wzrost

objętości oddechowej (Feuerstein i Faden, 1983; Paakkari i wsp., 1990; Colman i Miller, 2001). U zwierząt będących w narkozie ta sama droga iniekcji indukowała bezdech oraz następujące po nim zwolnienie oddychania (Portolano i wsp., 1991). Podanie obwodowe (dożylnie bądź dootrzewnowe) powodowało spadek ciśnienia tętniczego krwi i bradykardię u czuwających szczurów (Portolano i wsp., 1991, Broccardo i wsp., 2003), a u zwierząt poddanych narkozie peptyd ten indukował dodatkowo bezdech i depresję objętości oddechowej (Eager i wsp., 1994). Dermorfina odznacza się silnym działaniem przeciwbólowym zarówno przy stosowaniu podskórnym jak i dożylnym. Jej degradacja we krwi, wątrobie i mózgu jest trzydziestokrotnie wolniejsza w porównaniu do endogennych peptydów opioidowych, przede wszystkim z powodu obecności D-alaniny zmniejszającej dostępność dla enzymów. Jej głównym metabolitem jest deaminowany czteroaminokwasowy fragment, dermorfina[1-4] nie wykazujący jednak znaczącej aktywności względem receptorów μ . Dlatego też podejrzewa się, iż długotrwałe działanie przeciwbólne dermorfiny wynika raczej ze spowolnionej degradacji niż na skutek działania jej metabolitów (Mizoguchi i wsp., 2011).

Najlepiej przebadane analogi enkefaliny wywołują podobne do opisanych powyżej odpowiedzi sercowo-naczyniowe i oddechowe. Po mikroiniekcjach dokomorowych i do NTS Leu- oraz Met-enkefalin u uśpionych szczurów opisano zmniejszenie objętości oddechowej oraz zwolnienie oddychania i obniżenie aktywności mięśni międzyżebrowych. Zmianom tym towarzyszyły spadek ciśnienia tętniczego krwi oraz zwolnienie rytmu serca (Rabkin, 1991a, b; Iniuskin, 1997). Met-enkefalina w iniekcji dożylny także powodowała hipotensję i bradykardię, niezależnie od stanu świadomości szczurów, inicjując depresję z następującą stymulacją wentylacji (Czapla i wsp., 2000). Opisano lokalizację zarówno Met- jak i Leu-enkefaliny w kłębkach szyjnych u kota (Lundberg i wsp., 1979), a iniekcja ich w tę okolicę hamowała wyładowania z chemoreceptorów (Kirby i McQueen, 1986). Prowadzone w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia prace badawcze w New Jersey dostarczyły danych na

temat udziału nerwów błędnych w odpowiedziach odruchowych na podanie analogów enkefaliny do krążenia płucnego. Wzorzec odpowiedzi krążeniowo-oddechowej w postaci hipotensji, bradykardii, bezdechu i następowego przyspieszenia oddychania o zmniejszonej objętości oddechowej u decerebrowanych¹ szczurów opisano jako „opiatowy odruch płucny”. Znoszony był przez obustronną wagotomię szyjną i nalokson, a uczestniczyły w nim głównie nizmielinizowane włókna C nerwu błędnego (Sapru i wsp., 1981b; Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982b; Willette i wsp., 1983).

Konstelacja odruchów będących efektem zastosowania endorfin odbiega nieco od wzorca opisanych powyżej skutków opioidów. Dokomorowa iniekcja β -endorfiny u szczurów aktywnych obniżała ciśnienie tętnicze krwi i zwalniała rytm serca, nie oddziałując na częstość oddychania. Zwierzęta będące w narkozie reagowały na takie podanie β -endorfiny depresją oddechową, często prowadzącą do śmierci. Dożylna dawka indukowała długotrwały spadek ciśnienia tętniczego krwi i bradykardię, bez wpływu na oddychanie (Sitsen i wsp., 1982).

Podanie α -neoendorfiny u zwierząt z wykształconą tolerancją na morfinę nie wywoływało efektów, natomiast u zwierząt ‘naiwnych’ pogłębiało depresję częstości oddechowej indukowanej morfiną (Woo i wsp., 1983).

Dynorfiny są peptydami, które najczęściej modulują działanie innych opioidów. Same nie wykazują efektu przeciwbólowego, jednakże nasilają aktywność przeciwbólową opioidów u zwierząt z wykształconą tolerancją oraz znoszą ją u zwierząt ‘naiwnych’. Nie wykazują bezpośredniego działania na parametry oddechowe lub wywierają na nie nikły wpływ, wzmacniają jednak ostre reakcje wywoływane przez morfinę (Smith i Lee, 1988). Dynorfina w mikroiniekcji do NTS u kotów w narkozie nie zmieniała parametrów krążeniowo-oddechowych (Hassen i wsp., 1982), a u sztucznie wentylowanych szczurów obniżała wartość ciśnienia tętniczego krwi, pozostając bez wpływu na częstość pracy serca. Efektem iniekcji

¹ decerebracja – chirurgiczna separacja pnia mózgu od przodomózgowia na poziomie wzgórków czworaczych; model doświadczalny w badaniu odruchów oddechowo-krążeniowych bez użycia narkozy

tego peptydu do jądra dwuznacznego był znaczny spadek ciśnienia krwi bez zmian częstości pracy serca (Hassen i wsp., 1984).

Wpływ opioidów na generację rytmu oddechowego zachodzi najprawdopodobniej poprzez hamowanie przewodnictwa nerwowego pochodzącego z wrażliwych na nie chemoreceptorów (Pattinson, 2008).

Agoniści receptorów opioidowych powodują redukcję lub zniesienie przewodnictwa bólowego na poziomie rdzenia poprzez hamowanie uwalniania substancji P z dośrodkowych włókien nerwowych (Bourgoin i wsp., 1994; Ding i wsp., 1996; Aicher i wsp., 2000 a, b; Lipkowski i wsp., 2006). Substancja P magazynowana w neuronach zwojów grzbietowych rdzenia odpowiedzialna jest za przekaz informacji bólowej z obwodu do rdzenia kręgowego (Hökfelt i wsp., 2000).

Substancja P — endogeny agonista receptora NK_1 — jest szeroko rozpowszechniona zarówno w sieci neuronalnej, jak i w narządach obwodowych i tkankach. Wykazano jej obecność w dolnych drogach oddechowych, gdzie włókna SP w tchawicy i oskrzelach są pochodzenia wagalnego, w płucach zaś dodatkowo rdzeniowego. Oba zwoje nerwu błędnego zawierają substancję P, skolokalizowaną z innymi neuropeptydami, a jej synteza i transport zachodzi we włóknach dośrodkowych tego nerwu. Komórki chemoreceptyjne kłębków szyjnych są zaopatrzone przez włókna SP-ergiczne (Lundberg i wsp., 1984; Nakaya i wsp., 1994; Ding i wsp., 1998; Otsuka i Yoshioka, 1993; Helke i Seagard, 2004).

Immunoreaktywne włókna substancji P zidentyfikowano w rdzeniu przedłużonym: w jądrach dwuznacznym i grzbietowym nerwu błędnego oraz w jądrach wymienionego powyżej pasma samotnego, gdzie jest ona neuroprzekaznikiem w ośrodkowej projekcji zakończeń czuciowych z chemo- i baro-receptorów. Neurony i zakończenia nerwowe zawierające substancję P znajdują się także w grupach grzbietowej i brzusznej neuronów oddechowych opuszki (Gillis i wsp., 1980; Helke i wsp., 1984; Holtman, 1991; Otsuka i Yoshioka, 1993; Ribeiro-da-Silva i Hökfelt, 2000).

Podana w mikroiniekcji dokomorowo, do NTS lub neuronów opuszki stymulowała wentylację u szczurów poprzez zwiększenie objętości oddechowej z dodatnim, ujemnym bądź zerowym wpływem na częstość oddychania (Hedner i wsp., 1981; Hedner i wsp., 1984; Chen i wsp. 1990; Mazzone i Geraghty, 2000). Istnieją również dane wskazujące, że iniekcja do jądra pasma samotnego skutkowałą bezdechem, spadkiem ciśnienia tętniczego krwi i bradykardią (Kubo i Kihara, 1987; Bauman i wsp., 2002). Podanie dokomorowe substancji P u czuwających szczurów wywoływało wzrost ciśnienia krwi i tachykardię oraz towarzyszące tym efektom ogólne pobudzenie zwierząt manifestujące się m. in. zwiększoną ruchliwością, drapaniem, gryzieniem, nasileniem zabiegów pielęgnacyjnych (Tomlinson 1990, Severini i wsp., 2002; Abdala i wsp., 2003).

Uważana za neuromodulator w procesie chemotransdukcji, wstrzyknięta w poblize kłębków szyjnych, zwiększała wyładowania z chemoreceptorów u kotów (McQueen, 1980; Prabhakar i wsp., 1989; Prabhakar i wsp., 1995) i szczurów (Cragg i wsp., 1994) inicjując stymulację oddychania.

W warunkach hipoksji ustrojowej u królików opisano zależną od zachowania obwodowych wejść chemoreceptyjnych zwiększoną zawartość substancji P w obszarze NTS (Srinivasan i wsp., 1991).

Zaobserwowano różnice gatunkowe we wzorcu odpowiedzi oddechowej na systemową iniekcję substancji P. Opisywano zahamowanie wentylacji u kóz (Pizarro i wsp., 1995), zwiększenie oporów oddechowych oraz zwolnienie oddychania u owiec (Corcoran i Haigh, 1992), ale przyspieszenie i obecność głębokich wdechów u królików (Prabhakar i wsp., 1987).

W zależności od drogi podania substancja P wykazywała przeciwstawne działanie na parametry krążeniowe. Podana dokomorowo u uśpionych szczurów wywoływała spadek z następowym wzrostem ciśnienia tętniczego (Hedner i wsp., 1984), a po mikroiniekcji do NTS obserwowano zarówno spadek ciśnienia krwi i zwolnienie rytmu serca (Feldman, 1995;

Mazzone i Geraghty, 1999), stymulację obydwu tych parametrów jak również brak efektów (Abdala, 2003).

Obwodowe pobudzenie receptorów tachykininowych NK₁ tym peptydem prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i spadku ciśnienia tętniczego krwi oraz bradykardii u wszystkich gatunków zwierząt doświadczalnych (McQueen, 1980; Prabhakar i wsp., 1987; Corcoran i Haigh, 1992; Belluci i wsp., 2002). Jej wazodylatacyjne właściwości obserwowane są przy nienaruszonym endotelium. Sugeruje to stymulację receptorów tachykininowych znajdujących się w śródbłonku naczyń krwionośnych, skutkującą uwolnieniem endogennych czynników redukujących napięcie mięśniówki gładkiej takich jak prostaglandyny czy tlenek azotu (Severini i wsp., 2002).

Stosunkowo nieliczne prace dotyczyły udziału nerwów błędnych w reakcjach oddechowych i sercowo-naczyniowych wywołanych przez substancję P. Pobudzenie wentylacji i spadek ciśnienia tętniczego w wyniku mikroiniekcji dokomorowej lub do NTS u szczurów zachodziły drogą pozawagalną, natomiast bradykardia była zależna od zachowania sprzężenia wagalnego z płuc (Hedner i wsp., 1984; Feldman, 1995). O ile stymulację oddychania indukowaną obwodowym podaniem substancji P u królików i jego depresję u owiec przypisywano drodze wagalnej, to u szczurów zmiany oddechowe obserwowano także po wagotomii szyjnej (Prabhakar i wsp., 1987; Joos i wsp., 1988; Corcoran i Haigh, 1995).

Substancja P może działać zarówno nocyceptywnie jak i antynocyceptywnie w zależności od stosowanej dawki (Maszczyńska i wsp., 1998). Ponadto zaobserwowano, że jednoczesne, dordzeniowe wstrzyknięcie niewielkich ilości substancji P razem z minimalnie aktywną dawką morfiny, powodowało wzmocnienie jej opioidowego, przeciwbólowego działania (Kream i wsp., 1993). Podobne, silniejsze przeciwbólowe działanie innego agonisty receptorów opioidowych — bifaliny — osiągnięto przy podaniu tą samą drogą subtoksycznej dawki antagonisty substancji P (Misterec i wsp., 1994).

Przedstawione dane literaturowe wskazują na ważną, aczkolwiek nie w pełni wyjaśnioną, rolę receptorów opioidowych i SP-ergicznego unerwienia dróg oddechowych w obwodowej regulacji oddychania. Prowadzone w ostatnim piętnastoleciu badania wykazały, że w sieci neuronów oddechowych pnia mózgu u szczura, tak *in vivo* jak *in vitro*, podstawową funkcją opioidów oraz substancji P jest, odpowiednio, hamująca i pobudzająca modulacja generatora rytmu oddechowego (Doi i Ramirez, 2008). Wszechobecność i kolokalizacja obu rodzajów receptorów w tych samych strukturach (NTS i jądro wielkie szwu) sprawia, że pobudzenie jednych przez odpowiednie ligandy, prowadzi w efekcie do wzajemnych interakcji. Istnieje wiele dowodów wskazujących, że opioidy wywierają hamujący wpływ na uwalnianie substancji P zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w czuciowym unerwieniu dróg oddechowych. Przytoczone we wstępie dane doświadczalne uzyskane w wyniku iniekcji ligandów opioidowych i substancji P do łoża naczyniowego płuc wydają się mieć bardziej jednoznaczny charakter w porównaniu z mikroiniekcjami dokomorowymi i do NTS. Zatem w odruchach oddechowych wywołanych pobudzeniem receptorów w obszarze płuc istotnym ogniwem pośredniczącym jest aferentacja w nerwie błędnym, przewodzona do ośrodków oddechowych pnia mózgu.

Na podstawie przedstawionych danych można więc przypuszczać, że jednoczesna aktywacja układu opioidowego i tachykininowego, zwiększając objętość oddechową zminimalizuje lub wyeliminuje depresję wentylacji będącą głównym mankamentem stosowania analgetyków opioidowych.

Substancjami charakteryzującymi się działaniem na receptory opioidowe jak i tachykininowe oraz wywołującymi synergiczny efekt przeciwbólowy są peptydy syntetyzowane w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN. Wśród związków o takich właściwościach można wyróżnić chimery:

1. działające na receptory opioidowe μ i δ (np. bifalina),

2. będące agonistami receptorów opioidowych i antagonistami tachykininowych (np. AWL3266),
3. które są agonistami zarówno receptorów opioidowych i tachykininowych (np. AWL3106).

Bifalina jest peptydem zsyntetyzowanym w zespole prof. Lipkowskiego (1982). To czteroaminokwasowy dimer aktywnego fragmentu enkefaliny. Wykazuje silne powinowactwo wobec receptorów opioidowych μ i δ (Misicka i wsp., 1997). Pomimo, że z receptorami opioidowymi μ wiąże się z podobną siłą co morfina, to w modelach zwierzęcych wykazuje silniejsze od niej działanie przeciwbólowe przy podaniu do komórek mózgu (Horan i wsp., 1993) lub dordzeniowo (Kosson i wsp., 2005, 2008). Ponadto jest peptydem przekraczającym bariery krew/mózg oraz krew/płyn mózgowo-rdzeniowy (Abruscato i wsp., 1997). Poza silniejszym działaniem przeciwbólowym, stymulacja wspomnianych dwóch typów receptorów opioidowych sprawia, że bifalina prezentuje ograniczony rozwój tolerancji oraz uzależnienia (Ananthan, 2006).

Druga grupa związków, blokując receptory tachykininowe i stymulując jednocześnie opioidowe, wykazuje synergistyczne działanie antynocyceptywne obydwu farmakoforów, a przy dłuższym podawaniu powoduje także wolniejszy, w porównaniu do typowych opioidów, rozwój tolerancji (Lipkowski, 2006).

Trzeci typ peptydów, aktywuje receptory opioidowe i tachykininowe, pobudza antagonistycznie nastawione względem siebie systemy. Regulacja stopnia aktywności poszczególnych farmakoforów umożliwia otrzymanie związków działających pronocyceptywnie, antynocyceptywnie lub też działających neutralnie.

AWL3106 jest peptydową chimerą farmakoforów: opioidowego (dermorfiny) i tachykininowego, którego rolę pełni fragment substancji P₇₋₁₁. Peptyd ten wykazuje silne powinowactwo do receptorów μ i NK₁ oraz aktywność przeciwbólową zarówno przy stosowaniu dożylnym, jak i dordzeniowym. Długotrwałe podawanie tego związku skutkuje

bardzo wolnym rozwojem tolerancji w porównaniu z morfiną. Przypuszcza się też, że z uwagi na dość mocno rozbudowaną komponentę hydrofobową, peptyd ten może pokonywać barierę krew/mózg (Lipkowski, 2006).

II CEL PRACY

Niniejsza praca ma na celu określenie efektów oddechowych i sercowo-naczyniowych analogów neuropeptydowych, wykazujących działanie przeciwbólne.

Zadanie to obejmuje:

1. ustalenie kształtu i stabilności wzorca oddechowego, z uwzględnieniem jego komponent czasowej i objętościowej, inicjowanego systemową iniekcją badanych chimer peptydowych;
2. określenie typu zmian parametrów sercowo-naczyniowych (ciśnienia tętniczego krwi i rytmu serca);
3. weryfikację wpływu otwarcia pętli wagalnej jako wspólnego obwodowego ogniwa kontroli napędu oddechowo-sercowego na reakcje indukowane przez peptydy;
4. udokumentowanie stopnia udziału receptorów opioidowych i SP-ergiczných w obserwowanych odpowiedziach.

III MATERIAŁ I METODY

III.1 Charakterystyka związków stanowiących przedmiot badań

AWL3106 Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-D-Ala-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ – peptyd – chimera farmakoforów opioidowego (dermorfina – agonista receptorów opioidowych μ) i tachykininowego (fragment substancji P₇₋₁₁ agonista receptorów NK₁).

Bifalina (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH)₂ – analog enkefaliny

Dermorfina Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂ – egzogeny peptyd opioidowy, agonista receptorów opioidowych μ

AWL2077 Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ – fragment substancji P₇₋₁₁

Peptydy powyższe zsyntetyzowane zostały w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN.

Antagoniści:

chlorowoderek naloksonu – antagonist receptorów opioidowych (Sigma-Aldrich)

chlorowoderek naltrindolu – antagonist receptorów opioidowych δ (Tocris)

SR140333 – (S)-1-{2-[3-(3,4-dichlorphenyl)-1-(3-isopropoxyphenyl-acetyl)-piperidin-3-yl]-ethyl}-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2.] octane chloride – antagonist receptorów tachykininowych NK₁ (Sanofi-Research)

III.2 Materiał doświadczalny

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar [CrI:WI(Han)] o masie ciała mieszczącej się w zakresie 180 – 230 g. Badania zostały wykonane za zgodą IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach; numery pozwoleń: 12/2007, 46/2008, 19/2012.

III.3 Procedury chirurgiczne

III.3.1 Znieczulenie ogólne

Narkozę wprowadzano poprzez dootrzewnowe podanie zwierzętom 750 mg/kg uretanu i 150 mg/kg α -chloralozy (Sigma-Aldrich).

Przez cały czas doświadczenia monitorowano temperaturę rektalną utrzymywaną na poziomie 38°C przy pomocy maty grzejnej i/lub dodatkowo włączanej lampy.

Poziom znieczulenia ogólnego kontrolowano obserwując reakcje na bodźce bólowe oraz oceniając wartości ciśnienia tętniczego krwi (uciśnięcie ogona powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz przyspieszenie oddychania). Uzupełniające dawki narkozy podawano dożylnie.

III.3.2 Preparatyka wstępna

Spontanicznie oddychające zwierzęta będące w narkozie układano na grzbiecie na stoliku operacyjnym i wstępnie preparowano.

Skórę na szyi, powieź i mięśnie powierzchowne przecinano, mięśnie głębokie rozdzielano na tępo wyosabiając tchawicę wraz z krtanią. Środkową część tchawicy przecinano pomiędzy pierścieniami i wprowadzano polietylenową rurkę tracheostomijną (1,8 mm – 2,4 mm średnicy), do której, po zakończonej preparatyce, podłączano głowicę pneumatometru.

Skórę w prawym dole pachwinowym nacinano, wypreparowywano żyłę i tętnicę udową i do tak przygotowanych naczyń krwionośnych wprowadzano kaniule polietylenowe (0,58 mm/0,965 mm średnicy) wypełnione solą fizjologiczną wzbogaconą 0,1% roztworem heparyny (Polfa, Warszawa). Poprzez kaniulę umieszczoną w żyłę udowej wstrzykiwano badane substancje oraz uzupełniające dawki narkozy, natomiast tę umieszczoną w tętnicy udowej i doprowadzoną do aorty brzusznej wykorzystywano do pomiarów ciśnienia tętniczego i rytmu serca.

Mięśnie brzucha w okolicy wyrostka mieczykowatego mostka odsłaniano wycinając niewielki fragment skóry. Dwubiegunową elektrodę igłową wprowadzano pod ostrym kątem do części przymostkowej przepony w celu rejestracji jej zintegrowanego sygnału.

III.3.3 Preparatyka nerwów błędnych w odcinku szyjnym oraz powyżej zwoju dolnego nerwu błędnego

Nerw błędny przebiegający wzdłuż tchawicy w pęczku naczyniowo-nerwowym odseparowywano wstępnie od otaczających tkanek w kierunku dogłowym, bądź też, w części doświadczeń izolowano powyżej zwoju dolnego, zwracając szczególną uwagę na zachowanie nienaruszonego unaczynienia. Następnie w zależności od układu doświadczalnego dokonywano obustronnej wagotomii szyjnej, przecinając pień nerwu błędnego poniżej krtani, bądź też wagotomii nadguzkowej, wykonując cięcia ponad zwojami dolnymi.

III.4 Przygotowanie roztworów do iniekcji, pomiary

Dermorfinę, morfinę, bifalinę oraz chlorowodorek naloksonu rozpuszczano w 0,9% roztworze chlorku sodu (Polfar, Warszawa). AWL3106 i SR140333 wstępnie rozpuszczano w kropli DMSO (dimetylosulfotlenek), a następnie rozcieńczano solą fizjologiczną tak, aby maksymalne stężenie tego rozpuszczalnika w roztworze podawanym zwierzęciu nie przekraczało 6%. Roztwory do iniekcji przygotowywane były przed każdym doświadczeniem.

Wszystkie substancje, poza uzupełniającymi dawkami narkozy, podawano dożylnie w objętości 1000 μ l/kg i dopełniano 200 μ l soli fizjologicznej.

W oparciu o wyniki wstępnych doświadczeń i dane z piśmiennictwa odnośnie rozwoju tolerancji na ligandy opioidowe i substancję P przy powtarzanych iniekcjach (Monteau i wsp., 1996; Negri i wsp., 1998; Fong i Potts, 2006), badane peptydy stosowano jednokrotnie u każdego zwierzęcia w dawce 0,3 μ mol/kg.

Rurkę tracheostomijną podłączano do głowicy pneumatometru RSS 100HR (Hans Rudolph Inc., USA) celem pomiaru i rejestracji parametrów oddechowych (m.in. objętości (V_T) i częstości oddychania (f), wentylacji minutowej (V_E), czasu trwania wydechu (T_E)). Sygnał był zbierany i analizowany przez program komputerowy Research Pneumotach System (Windows software ver. 3.07.02, Korr Medical Technologies Inc., USA). Sygnał aktywności przepony odbierany przez dwubiegunowe elektrody integrowano przy pomocy integratora o stałej czasu 100 ms (S 101, Asbit, Polska) i wzmacniano przy użyciu wzmacniacza NL 104 (Digitimer Ltd, UK). Ciśnienie tętnicze krwi i rytm serca rejestrowano za pomocą miernika ciśnienia krwi BP-2 monitor (Columbus Instruments, USA).

Zapisy objętości oddechowej, przepływu powietrza przez drogi oddechowe, ciśnienia tętniczego krwi oraz zintegrowanego elektromiogramu przepony rejestrowano za pomocą aparatu Omnilight 8M 36 (Honeywell, Japonia). Wartość średniego ciśnienia tętniczego (MAP) wyliczano na podstawie zapisu graficznego korzystając ze wzoru:

$$MAP \approx DP + \frac{SP - DP}{3}$$

gdzie: MAP – średnie ciśnienie krwi, DP – wartość ciśnienia rozkurczowego, SP – wartość ciśnienia skurczowego.

III.5 Przebieg doświadczeń

III.5.1 Badanie zmian wzorca oddechowego oraz parametrów sercowo-naczyniowych

Po chirurgicznym przygotowaniu zwierzęcia i podłączeniu aparatury sprawdzano poziom uśpienia i w razie potrzeby podawano uzupełniające dawki narkozy. Następnie rozpoczynano rejestrację i zapis zmiennych. Zmienne uśredniano w warunkach kontrolnych i w przebiegu doświadczenia. Wszystkie dane wyrażone są jako wartości absolutne. Po wstrzyknięciu badanego związku mierzone parametry rejestrowano w sposób ciągły do 2 min, a następnie po 5, 10, 20 i 30 min. Po zakończeniu rejestracji zwierzęta poddawano eutanazji przedawkowując narkozę.

III.5.2 Określenie udziału pętli wagalnej w obserwowanych efektach krążeniowo-oddechowych

Po wstępnej preparatyce i podłączeniu układu mierzącego ciśnienie krwi i rytm serca, oraz elektrod odbierających sygnał aktywności przepony rozpoczynano przygotowania do neurotomii zgodnie z opisem w punkcie III.3.3. Po skontrolowaniu stopnia znieczulenia i jego ewentualnym uzupełnieniu, rejestrowano parametry wyjściowe, po czym dokonywano wagoatomii szyjnej lub nadguzkowej i po ustabilizowaniu się parametrów oddechowo-krążeniowych przystępowano do doświadczenia.

III.5.3 Ocena udziału poszczególnych receptorów w efektach krążeniowo-oddechowych wywoływanych przez badane związki

III.5.3.1 Ocena udziału receptorów opioidowych

Aktywność receptorów opioidowych blokowano wstrzykując do żyły udowej chlorowoderek naloksonu na 2 min przed iniekcją badanego związku. Nalokson stosowano w dawce 1,0 mg/kg przed podaniem bifaliny oraz w dawce 2,0 mg/kg poprzedzającej iniekcję AWL3106 i dermorfiny. Dawki te wybrano na podstawie doświadczeń wstępnych oraz posiłkując się danymi literaturowymi (Kwok i Dun, 1998; Czapla i wsp., 1998).

Receptory opioidowe δ blokowano naltrindolem w dawce 2,0 mg/kg na 5 min przed podaniem bifaliny. Dawkę naltrindolu wybrano na podstawie wstępnych doświadczeń.

III.5.3.2 Badanie udziału receptorów tachykininowych NK₁

Receptory tachykininowe NK₁ pobudzane przez AWL3106 blokowano przy użyciu SR140333 w dawkach 0,3 (Fu i wsp., 2007) oraz 2,0 μ mol/kg na 10 min przed iniekcją badanej chimery.

III.6 Analiza statystyczna

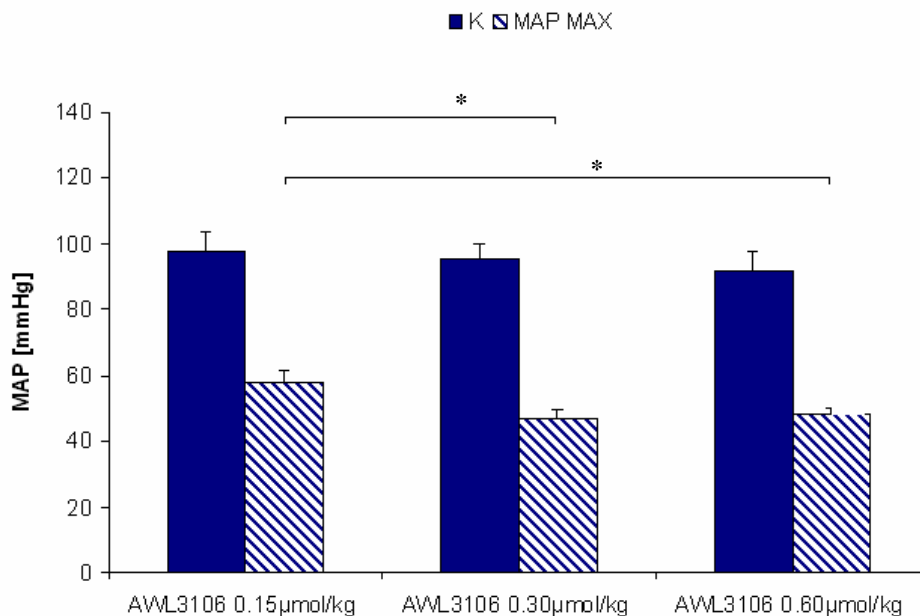
Zgromadzone dane analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z powtarzanymi pomiarami. W ramach porównań wielokrotnych (post-hoc) korzystano przede wszystkim z testów Tukey'a i Tukey'a dla nierównych liczebności (Spjotvolla-Stoline'a), testu Newman-Keulsa oraz testu najmniejszych istotnych różnic (NIR) Fishera; ponadto skorzystano również z testu Wilcoxon. Dokładną informację nt. analizy statystycznej umieszczono w podpisie do ryciny bądź tabeli. Wyniki uznawano za znamienne przy poziomie istotności $p < 0,05$. Dane przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM).

IV WYNIKI

IV.1 Wpływ AWL3106 na kształt wzorca oddechowego oraz udział nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach

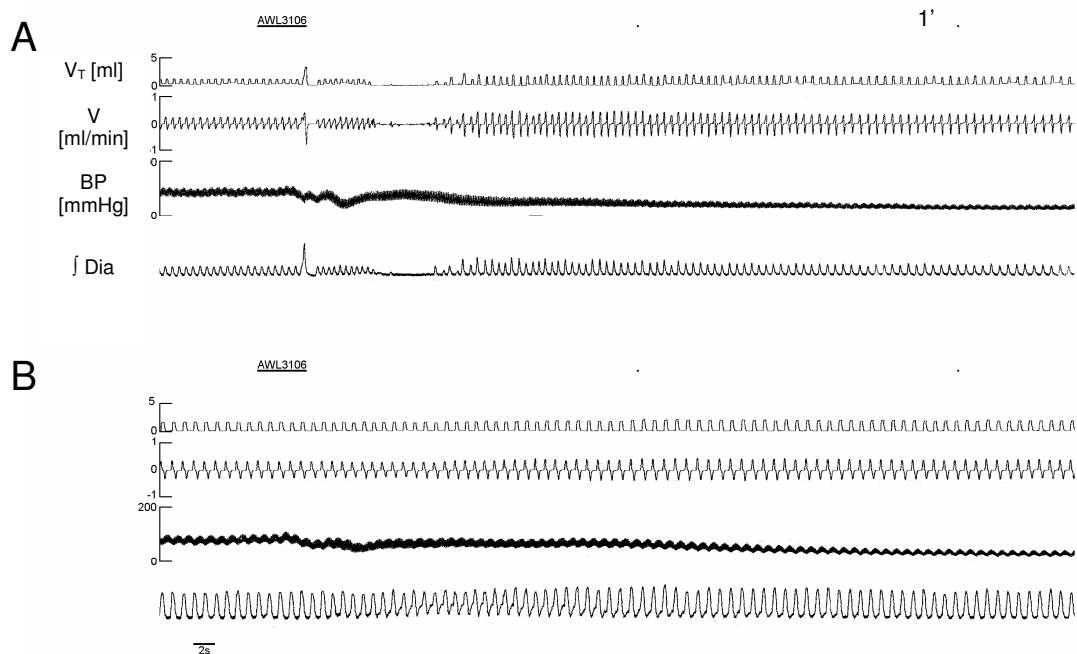
Doświadczenia stanowiące trzon niniejszego rozdziału przeprowadzone zostały na 54 szczurach, będących w narkozie i oddychających spontanicznie. Dawkę peptydu hybrydowego AWL3106, chimery farmakoforów opioidowego i tachykininowego, ustalono we wstępnych doświadczeniach na podstawie maksymalnych zmian średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP MAX) – parametru, którego spadek wykazywał największą powtarzalność (Ryc. 1).

Największy spadek ciśnienia krwi występował 1 min po wstrzyknięciu peptydu, analiza wariancji oraz test Tukey'a nie wykazały istotnych różnic między największymi użytymi dawkami, w związku z czym zdecydowano się stosować dawkę 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ tego peptydu. Graficzny zapis prezentuje Ryc. 1.



Ryc. 1 Średnie ciśnienie tętnicze krwi przed (K) i największy spadek (MAP MAX) po dożylniej iniekcji AWL3106
ANOVA, test Tukey'a; n=30; * – $p < 0,05$
ANOVA ujawniła statystycznie istotny wpływ dawki AWL3106 na ciśnienie krwi ($p < 0,02$)

Na początku każdego doświadczenia wykonywano rejestrację kontrolną parametrów oddechowo-krażeniowych po wstrzyknięciu do prawej żyły udowej 1,0 ml/kg roztworu DSMO, celem wykazania braku reakcji na sam rozpuszczalnik AWL3106, a także stanowiącego kontrolę objętości. Po upływie 10 min podawano powyższy peptyd w dawce 0,3 μ mol/kg. Doświadczenia przeprowadzono w trzech oddzielnych grupach zwierząt: szczurów z zachowanymi nerwami błędnymi (n=9), poddanych wstępnie obustronnej wagoatomii szyjnej (n=9), oraz po przecięciu nerwów błędnych powyżej zwoju dolnego nerwu błędnego (n=6). Rejestracja parametrów oddechowo-krażeniowych w wymienionych schematach doświadczalnych trwała do 20 min po podaniu peptydu.

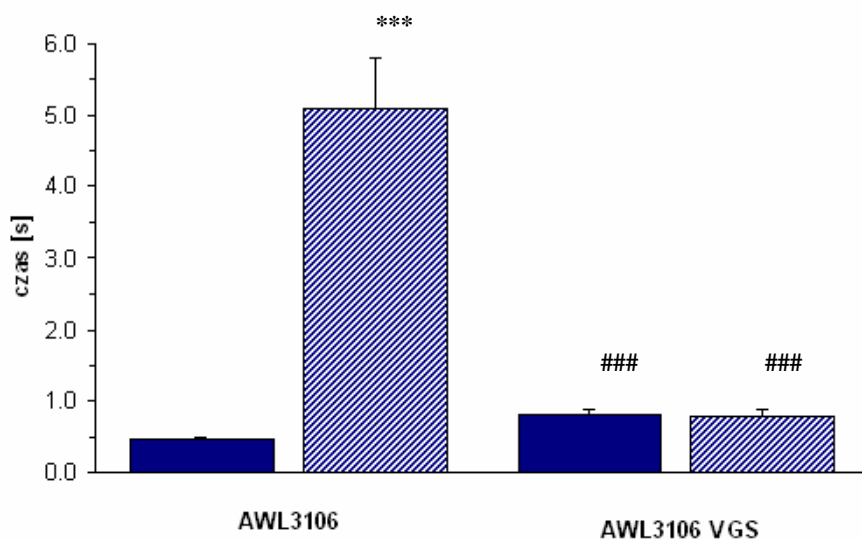


Ryc. 2 Wpływ dożylnego podania AWL3106 na oddychanie i ciśnienie tętnicze krwi szczurów z zachowanymi nerwami błędnymi (A) n=9 oraz wagoatomizowanych w odcinku szyjnym (B) n=9
 V_T – objętość oddechowa, V – przepływ powietrza przez drogi oddechowe, BP – ciśnienie tętnicze krwi, \int Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

Dożylna iniekcja AWL3106 u szczurów z zachowanym unerwieniem błędnym wywoływała depresję oddechową przyjmującą postać bezdechu wydechowego o średniej długości trwania wynoszącej $5,1 \pm 0,7$ s (Ryc. 2A, Ryc. 3). Wzorec wznowionego po bezdechu oddychania charakteryzował się obniżeniem częstości i zwiększoną objętością

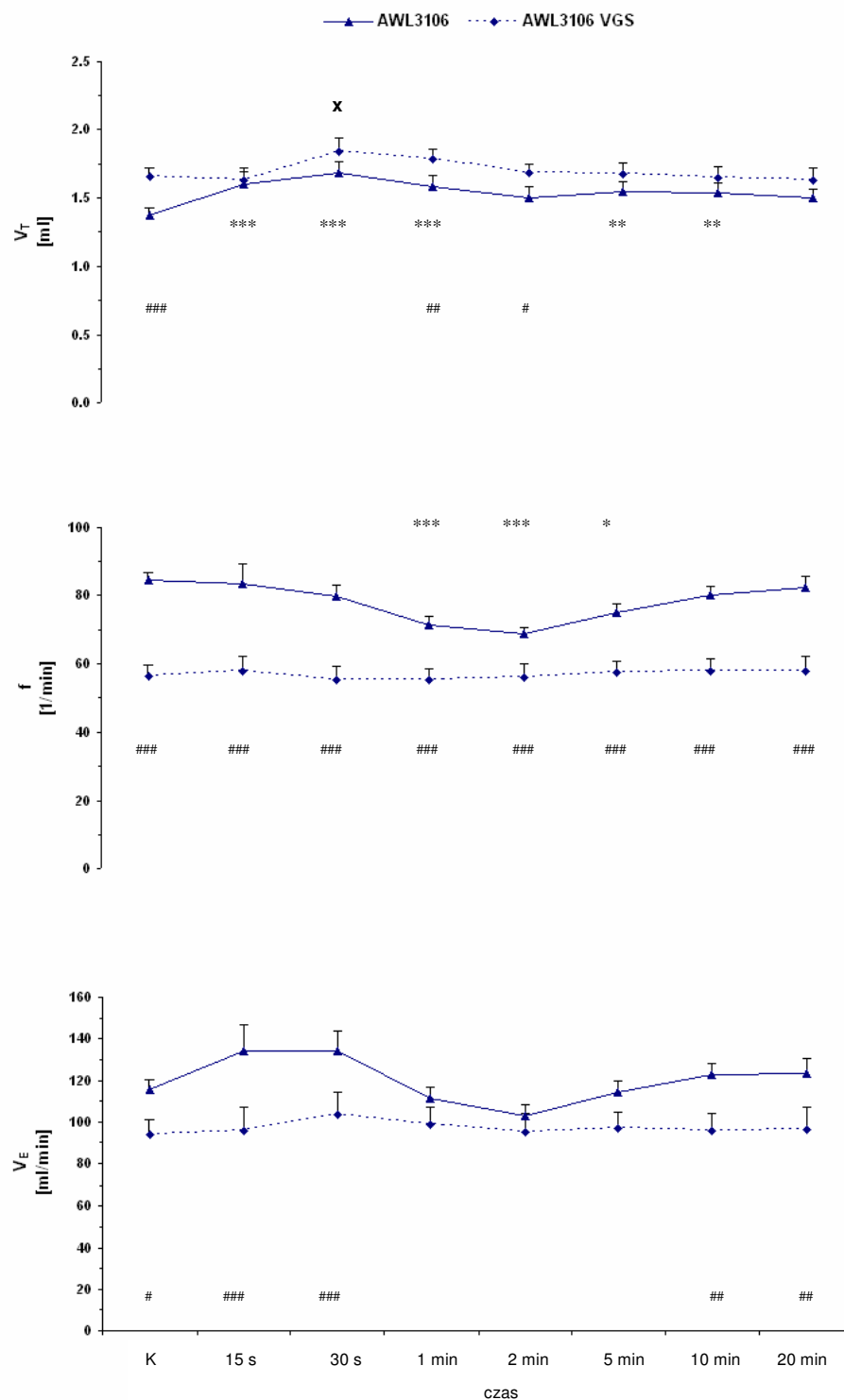
oddechową. Wzrost V_T był równoczesny ze wzrostem amplitudy elektromiogramu przepony. Zmianom powyższym towarzyszył znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 2A).

W grupie zwierząt z otwartą pętlą wagalną po iniekcji AWL3106 nie obserwowano bezdechu i zwolnienia oddychania, redukcji ulegał przyrost objętości oddechowej oraz w nieznacznym stopniu spadek ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 2B, Ryc. 3).



Ryc. 3. Średni czas trwania wydechu u zwierząt nieuszkodzonych i wagotomizowanych (VGS, kolumny lite) oraz średnia długość bezdechu i średni czas trwania wydechu w obu grupach odpowiednio po AWL3106 i AWL3106 VGS (kolumny prążkowane) ANOVA; test Tukey'a; ***, ### – $p < 0,001$ względem, odpowiednio: wartości przed podaniem peptydu oraz pomiędzy grupami; $n=18$
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ AWL3106 ($p < 0,001$) i wagotomii szyjnej ($p < 0,001$) na bezdech, oraz interakcję pomiędzy tymi czynnikami ($p < 0,001$)

W badanych grupach doświadczalnych obserwowano intensywne ślinienie rozpoczynające się około 15 s po podaniu chimery i utrzymujące się do 2 min, będące swoistym efektem substancji P, farmakoforu chimery AWL3106 (Otsuka i Yoshioka, 1993).



Ryc. 4. Zmiany parametrów oddechowych wywołane iniekcją AWL3106 w grupach szczurów z zachowaną (\blacktriangle ; ciągła linia) i przeciętą (\blacklozenge ; przerywana linia) pętlą wagalną (V_T (objętość oddechowa), f (częstość oddychania), V_E (wentylacja minutowa); ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p < 0,05$; **, xx, ## – $p < 0,01$; ***, xxx, ### – $p < 0,001$; * oraz x znamienność statystyczna, odpowiednio: względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed, oraz po wagoTomii szyjnej; # – różnice pomiędzy grupami. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ AWL3106 ($p < 0,001$), interakcję stanu unerwienia i AWL3106 ($p < 0,05$) oraz brak wpływu wagoTomii na V_T ($p = 0,16$); wpływ stanu unerwienia ($p < 0,001$), wpływ peptydu ($p < 0,001$) oraz interakcję między nimi ($p < 0,001$) na f ; wpływ stanu unerwienia ($p < 0,05$) i AWL3106 ($p < 0,001$) na V_E oraz interakcję między tymi czynnikami ($p < 0,01$).

Wartości parametrów oddechowych zawarte w Tabeli 1 ilustrują efekt wyłączenia sprzężenia wagalnego wprowadzający wzrost objętości oddechowej i zwolnienie rytmu oddechowego bez względu na poziom dokonywanego przecięcia pni nerwów błędnych. Wynikały stąd znamienne różnice w wartościach kontrolnych parametrów oddechowych między stanem nieuszkodzonym i wagotomii szyjnej, zaprezentowane na Ryc. 4.

Tabela 1. Wartości zmiennych oddechowo-krażeniowych u znieczulonych szczurów

| | V _T ml | f 1/min | V _E ml/min | MAP mmHg | HR 1/min |
|-----------------------------|----------------------|------------|--------------------------|-------------|-------------|
| nieuszkodzone n=9 | 1,37 ± 0,06 | 85 ± 2 | 115 ± 5 | 97 ± 5 | 482 ± 5 |
| wagotomia szyjna n=9 | 1,65 ± 0,07 | 56 ± 3 | 94 ± 7 | 75 ± 5 | 481 ± 22 |
| wagotomia nadguzkowa n=6 | 1,81 ± 0,07 | 63 ± 2 | 114 ± 5 | 115 ± 6 | 525 ± 11 |

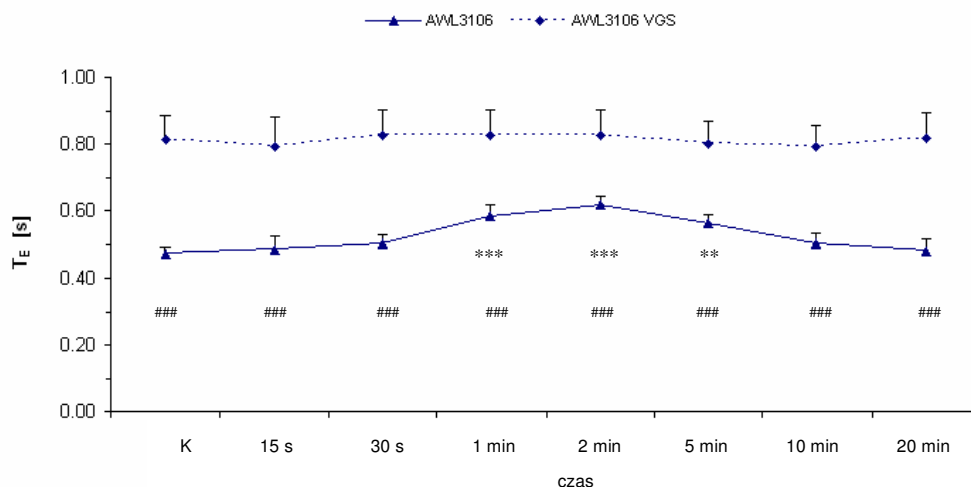
wartości średnie ± SEM.

Dożylna iniekcja AWL3106 wywierała podobny efekt na objętość oddechową zarówno u szczurów nieuszkodzonych jak i poddanych wagotomii szyjnej. Statystycznie znamienne wzrost tego parametru osiągał wartość maksymalną w 30 s po podaniu peptydu i wynosił: 1,68 ± 0,09 ml (p<0,001), 1,84 ± 0,10 ml (p<0,05) oraz 2,03 ± 0,07 ml (p<0,05), odpowiednio, u zwierząt z zachowanym oraz wyeliminowanym unerwieniem wagalnym na wysokości szyi i powyżej zwoju dolnego nerwu błędnego. O ile u zwierząt z zachowaną ciągłością nerwów błędnych wzrost ten pozostawał znamienne istotny przez 10 min od iniekcji peptydu, to u zwierząt wagotomizowanych miał on charakter przejściowy i występował wyłącznie w 30 s od podania związku (Ryc. 4).

Zwolnienie oddychania pojawiało się tylko u zwierząt z zachowaną ciągłością nerwów błędnych. Maksymalny spadek obserwowano w drugiej minucie od podania AWL3106, i częstość oddychania wynosiła wówczas 69 ± 2 1/min (p<0,001) w porównaniu z kontrolą będącą na poziomie 85 ± 2 1/min. Efekt ten utrzymywał się do 5 min i zachodził kosztem wydłużenia czasu wydechu.

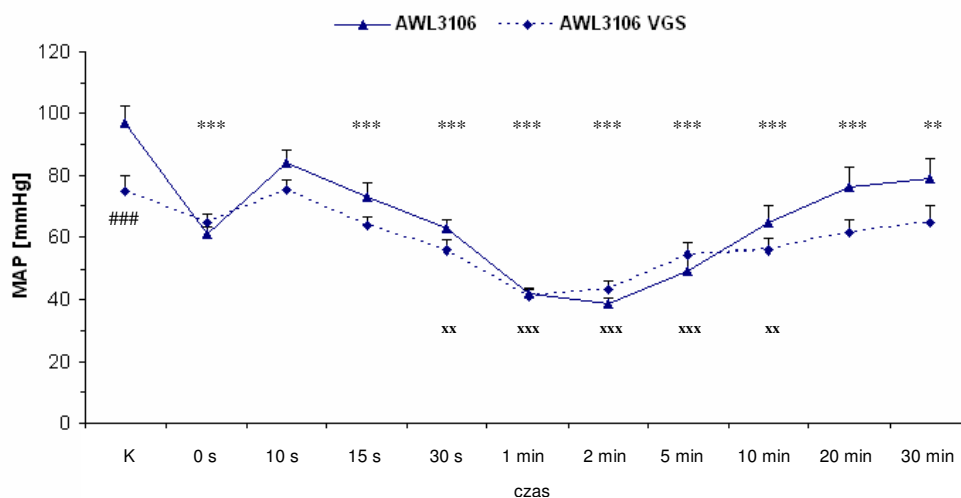
Maksymalne wydłużenie T_E z wartości wyjściowej 0,47 ± 0,02 s do 0,62 ± 0,03 s (p<0,001)

obserwowano w 2 min po podaniu (Ryc. 5), co odpowiada maksymalnemu efektowi wywieranemu przez AWL3106 na częstość oddychania (Ryc. 4).



Ryc. 5. Czas trwania wydechu po podaniu AWL3106 w warunkach zachowanego i przerwane go sprzężenia wagalnego (oznaczenia jak na Ryc. 4)
ANOVA, test Tukey'a; ** – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; * – znamienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed wagotomią szyjną; # – różnice pomiędzy grupami. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ stanu unerwienia ($p < 0,002$) i AWL3106 ($p < 0,0002$) na T_E , oraz interakcje ww. czynników ($p < 0,01$).

Pomimo znacznego zwolnienia oddychania, zwiększenie objętości oddechowej zapobiegało istotnej depresji wentylacji minutowej (V_E) (Ryc. 4).



Ryc. 6. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi (MAP) po dożylnym podaniu AWL3106 przed oraz po wagotomii szyjnej (oznaczenia jak na Ryc. 4)
ANOVA, test Tukey'a; **, xx – $p < 0,01$; ***, xxx, ### – $p < 0,001$; * oraz x znamienność statystyczna, odpowiednio: względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed, oraz po wagotomii szyjnej; # – różnice pomiędzy grupami. Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła: brak wpływu stanu unerwienia ($p = 0,13$), wpływ AWL3106 ($p < 0,001$) na MAP oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$).

Obwodowe podanie AWL3106 znamienne obniżało wartość średniego ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt we wszystkich grupach doświadczalnych, a przebieg zmian wykazywał podobny wzorzec. Bezpośrednio po iniekcji do żyły udowej peptyd ten wywoływał chwilowy spadek ciśnienia tętniczego z początkowych 97 ± 5 mmHg do 61 ± 2 mmHg ($p < 0,001$) u zwierząt z zachowanymi nerwami błędnymi, natomiast w grupie szczurów poddanych wagotomii szyjnej nie zaobserwowano w tym czasie istotnych statystycznie zmian MAP. Po krótkotrwałym powrocie wartości MAP do poziomu wyjściowego obserwowano jego spadek, i w ciągu drugiej minuty od momentu podania parametr ten osiągał najniższy poziom 39 ± 2 mmHg ($p < 0,001$) i 41 ± 2 mmHg ($p < 0,001$), odpowiednio u szczurów nieuszkodzonych i wagotomizowanych na szyi (Ryc. 6).

Tabela 2 prezentuje porównanie spadku MAP wywołanego przez AW3106 jako odsetek wartości wyjściowych obserwowanych u zwierząt z zachowaną jak i z przerwana ciągłością nerwów błędnych. Najniższe procentowe wartości średniego ciśnienia krwi w odstępie czasowym 1–2 minut po podaniu AWL3106, kształtowały się u zwierząt z zachowanymi nerwami błędnymi na poziomie $45 \pm 4\%$ oraz $56 \pm 3\%$ i $61 \pm 8\%$ u zwierząt po wagotomii szyjnej i nadguzkowej, nie różniąc się istotnie pomiędzy sobą.

Tabela 2. Procentowe zmiany średniego ciśnienia krwi u zwierząt nieuszkodzonych, oraz zwierząt po wagotomii szyjnej (VGS) i nadguzkowej (VGnG).

| | Czas od iniekcji AWL3106 | | | | | | | | | |
|------|--------------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| | K | 0 s | 10 s | 15 s | 30 s | 1 min | 2 min | 5 min | 10 min | 20 min |
| K | 100 | 64 ± 4 *** | 87 ± 4 ** | 76 ± 4 *** | 66 ± 3 *** | 45 ± 4 *** | 41 ± 4 *** | 52 ± 5 *** | 67 ± 6 *** | 79 ± 5 * |
| VGS | 100 | 88 ± 3 ## | 102 ± 5 | 86 ± 2 | 75 ± 3 *** | 56 ± 3 *** | 59 ± 2 *** | 73 ± 3 *** | 76 ± 3 *** | 83 ± 4 # |
| VGnG | 100 | 100 ± 6 ### | 100 ± 4 | 84 ± 8 | 74 ± 9 * | 61 ± 8 *** | 64 ± 7 *** | 79 ± 8 ## | 77 ± 8 | 80 ± 9 |

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała efekt zarówno neurotomii ($p < 0,01$), działania AWL3106 ($p < 0,001$) oraz wpływ neurotomii na działanie AWL3106 ($p < 0,01$)

Test Tukey'a dla nierównych liczebności (Spjotvolla-Stoline'a); K – grupa z zachowaną ciągłością nerwów błędnych ($n=9$), VGS – grupa zwierząt wagotomizowanych na szyi ($n=9$), VGnG – grupa zwierząt wagotomizowanych nad zwojem dolnym nerwu błędnego ($n=6$);

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ względem odpowiedniej wartości początkowej, # – względem grupy K. Między grupami zwierząt wagotomizowanych nie wykryto różnic wykazujących istotność statystyczną.

W badanych grupach zwierząt nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu AWL3106 na częstość skurczów serca.

IV.2 Udział receptorów opioidowych w reakcjach oddechowo-krążeniowych indukowanych przez AWL3106

Dermorfina stanowiąca farmakofor w analogu neuropeptydowym AWL 3106 wykazuje wysokie powinowactwo do receptorów μ i jest ich pełnym agonistą (Melchiorri i Negri, 1996; Mizoguchi i wsp., 2011). Aby zbadać udział tych receptorów w odpowiedziach na badany peptyd blokowano je przy użyciu chlorowodoru naloksonu, nieselektywnego kompetycyjnego antagonisty receptorów opioidowych μ , κ i δ .

Dawkę naloksonu użytą do określenia wpływu blokady receptorów opioidowych na efekty wywoływane przez dożylnie podanie AWL3106 wybrano na podstawie wstępnych doświadczeń, w których blokowano receptory opioidowe przed podaniem dermorfiny. Szczurom wstrzykiwano nalokson rozpuszczony w soli fizjologicznej w dawkach 0, 0,5, 1,0 oraz 2,0 mg/kg. Bloker podawany w bolusie do żyły udowej w wymienionych dawkach nie powodował zmian mierzonych parametrów oddechowo-krążeniowych. Następnie po upływie 2 min podawano dermorfinę w dawce 0,3 μ mol/kg. Prezentowane doświadczenia przeprowadzono na 12 szczurach.

Analizując skuteczność dawek naloksonu w blokadzie receptorów opioidowych brano pod uwagę obecność bezdechu, oraz czasy, w których dochodziło do największej zmiany badanego parametru. Zgodnie z opisanym w rozdziale IV.4 wpływem dermorfiny na parametry oddechowo krążeniowe znieczulonego szczura były to: okres bezdechu pojawiającego się bezpośrednio po iniekcji peptydu, 1 min dla objętości oddechowej oraz 30 s dla zmian średniego ciśnienia krwi i rytmu serca.

Jak zaprezentowano w Tabeli 3, dożylna iniekcja dermorfiny prowokowała bezdech o średniej długości $9,17 \pm 2,94$ s. Nalokson, począwszy od najniższej dawki (0,5 mg/kg) znosił jego obecność.

Tabela 3. Długość bezdechu indukowanego dermorfiną przed oraz po blokadzie receptorów opioidowych

| Dawka naloksonu [mg/kg] | K [s] | Bezdech [s] |
|-------------------------|-------------|---------------|
| 0,0 | 0,42 ± 0,05 | 9,17 ± 2,94** |
| 0,5 | 0,49 ± 0,02 | 0,48 ± 0,02 |
| 1,0 | 0,47 ± 0,03 | 0,47 ± 0,03 |
| 2,0 | 0,57 ± 0,04 | 0,55 ± 0,02 |

ANOVA, test Tukey'a, ** – p<0,01 względem wartości początkowej (K); n=12

Największą skutecznością w hamowaniu wywoływanych przez dermorfinę zmian objętości oddechowej, rytmu serca oraz średniego ciśnienia tętniczego, charakteryzowała się najwyższa stosowana dawka (2,0 mg/kg) (Tabela 4), i tę dawkę zdecydowano się używać w dalszych badaniach.

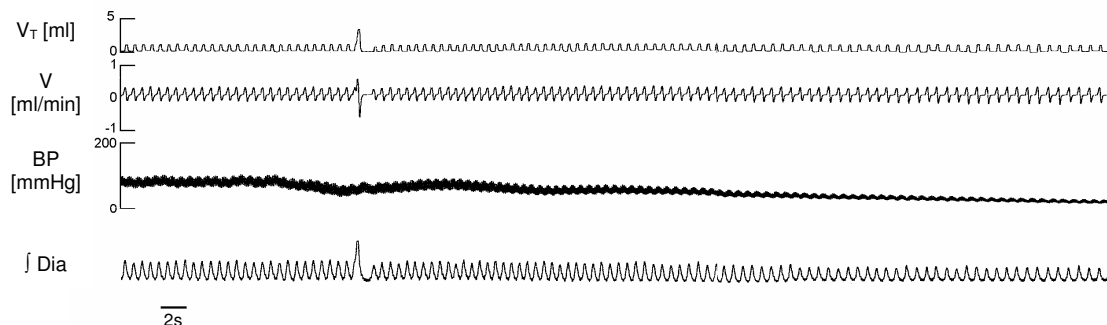
Tabela 4. Wpływ dawek naloksonu na wywołane podaniem dermorfiny maksymalne zmiany V_T, HR i MAP.

| Dawka naloksonu [mg/kg] | V _t | | HR | MAP |
|-------------------------|----------------|----------|---------|-----------|
| | K | % | % | % |
| 0,0 | 100 | 114 ± 6* | 88 ± 2* | 48 ± 3*** |
| 0,5 | 100 | 116 ± 4* | 86 ± 9* | 70 ± 17* |
| 1,0 | 100 | 114 ± 7* | 95 ± 2 | 87 ± 9 |
| 2,0 | 100 | 103 ± 2 | 99 ± 1 | 104 ± 4 |

Dane przedstawiono jako procent wartości początkowej
ANOVA, test NIR; * – p<0,05, *** – p<0,001 względem wartości wyjściowej (K)
n=12

Doświadczenia mające na celu ocenę udziału receptorów opioidowych w reakcjach oddechowo-kръżeniowych indukowanych przez AWL3106 przeprowadzono na 9 szczurach z zachowanymi nerwami błędnymi a uzyskane wyniki porównano z grupą szczurów kontrolnych traktowanych AWL3106, opisanych w rozdziale IV.1.1. Kontrolna, dożylna iniekcja naloksonu w dawce 2,0 mg/kg nie wywierała dostrzegalnych efektów na żaden z badanych parametrów. Po upływie dwóch minut tą samą drogą podawano 0,3 µmol/kg AWL3106.

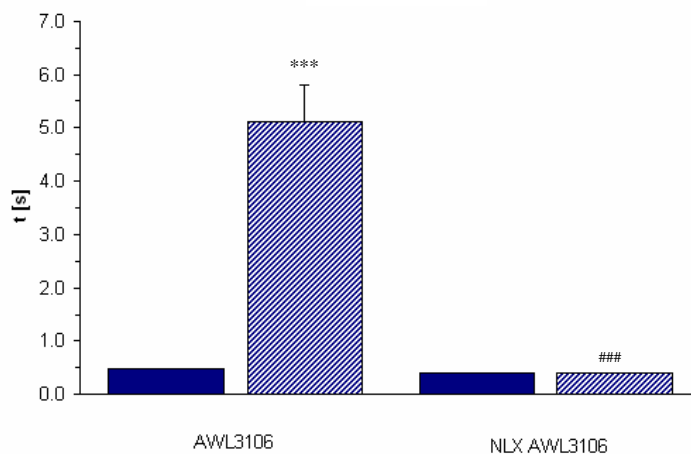
Odpowiedź oddechowo-kръżeniową na AWL3106 przy zablokowanych receptorach opioidowych ilustruje Ryc. 7.



Ryc. 7 Efekt dożylniej iniekcji AWL3106 na krążenie i oddychanie szczura po blokadzie receptorów opioidowych

V_T – objętość oddechowa, V – przepływ powietrza przez drogi oddechowe, BP – ciśnienie tętnicze krwi, \int Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

Zastosowanie antagonisty zapobiegło pojawieniu się bezdechu wywołanego przez AWL3106 u wszystkich badanych 9 szczurów (Ryc. 7, 8).



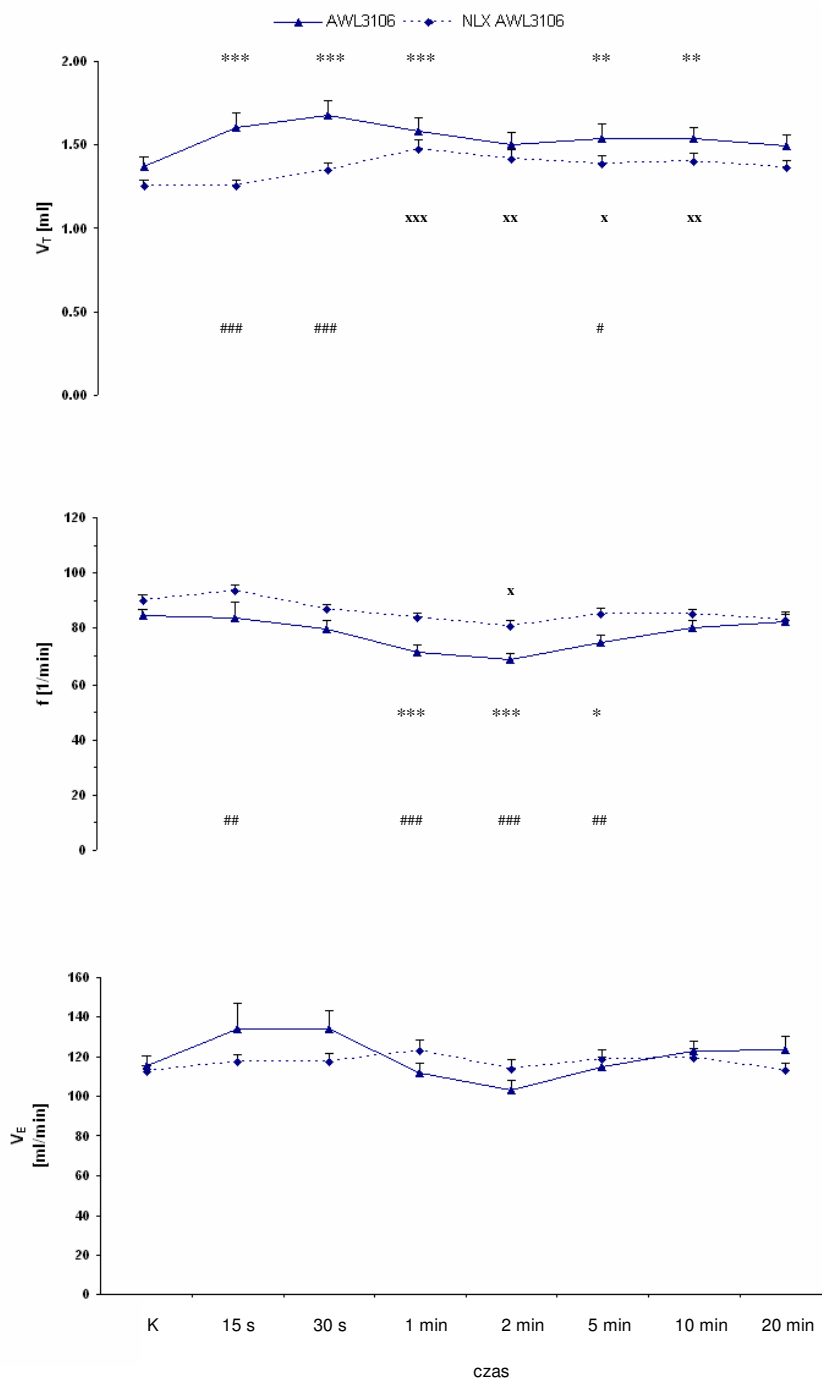
Ryc. 8 Średni czas trwania wydechu przed (n=9) oraz po blokadzie receptorów opioidowych (n=9) (kolumny lite) oraz średnia długość bezdechu i średni czas trwania wydechu po AWL3106 odpowiednio przed oraz po blokadzie receptorów opioidowych (kolumny prążkowane)

ANOVA, test Tukey'a; ***, ### – $p < 0,001$ względem, odpowiednio: wartości przed podaniem peptydu oraz pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła efekty blokady receptorów opioidowych ($p < 0,001$), AWL3106 ($p < 0,001$) oraz interakcję między tymi czynnikami ($p < 0,001$) na bezdech.

Blokada nie znosiła wzrostu objętości oddechowej, ani w pełni nie likwidowała zwolnienia oddychania. Zwiększenie V_T u zwierząt, którym zablokowano receptory opioidowe było opóźnione i pojawiało się po 1 min od iniekcji wykazując znamienność do 10 min obserwacji. Podobnie, blokada receptorów opioidowych nie zniosła, lecz znacznie osłabiła oraz skróciła okres zwolnienia oddychania po AWL3106 (Ryc. 9). Zmiana częstości oddechowej, podobnie

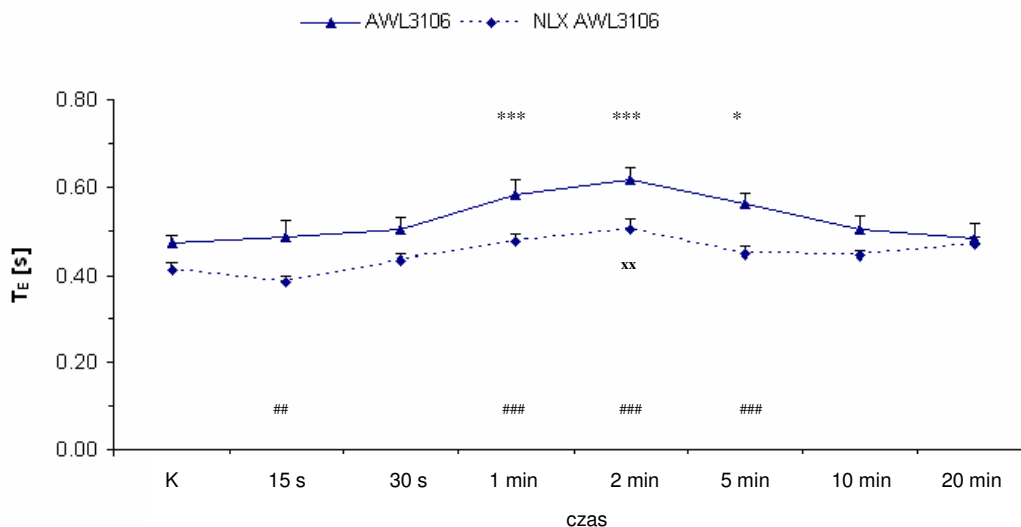
jak w grupie zwierząt, którym nie blokowano receptorów opioidowych, zachodziła kosztem wydłużenia czasu wydechu (Ryc. 10).



Ryc. 9 Zmiany objętości oddechowej (V_T), częstości oddychania (f) oraz wentylacji (V_E) indukowane przez AWL3106 u zwierząt kontrolnych (\blacktriangle ; linia ciągła) oraz poddanych blokadzie receptorów opioidowych (\blacklozenge ; linia przerywana)

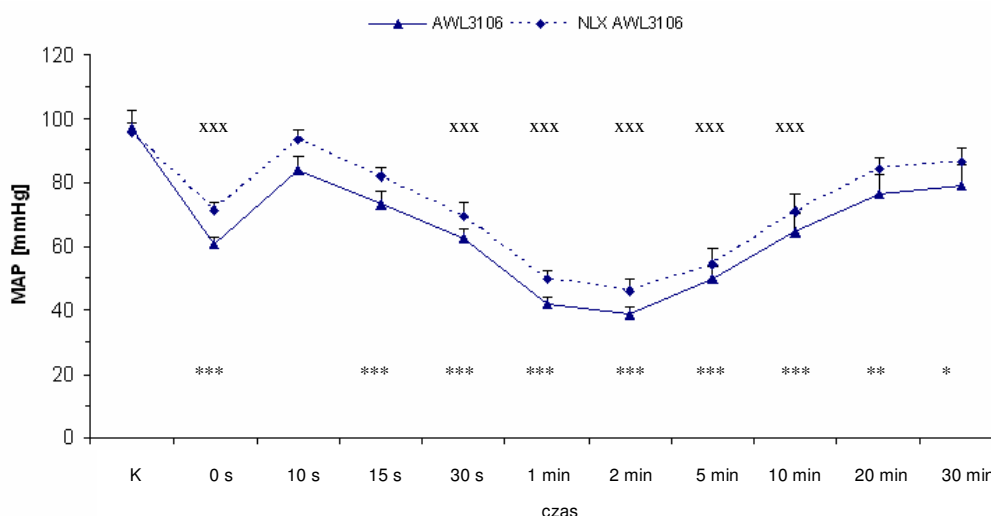
ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p<0,05$; **, xx, ## – $p<0,01$; ***, xxx, ### – $p<0,001$; *, x, # – znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed ($n=9$), po blokadzie receptorów ($n=10$) oraz pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ blokady receptorów opioidowych ($p<0,05$) i AWL3106 ($p<0,001$) oraz interakcję ww. czynników ($p<0,001$) na V_T ; wpływ blokady receptorów opioidowych ($p<0,05$), AWL3106 ($p<0,001$) oraz efekt interakcji ww. czynników na f, oraz brak wpływu blokady receptorów opioidowych ($p=0,6$), ale wpływ AWL3106 ($p<0,001$) oraz efekt interakcji między czynnikami na V_E .



Ryc. 10 Czas trwania wydechu po AWL3106 u zwierząt kontrolnych oraz po blokadzie receptorów opioidowych
ANOVA, test Tukey'a; *, x – $p < 0,05$; xx, ## – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; *, x, # – znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed, po blokadzie receptorów oraz pomiędzy grupami
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ: blokady receptorów opioidowych ($p < 0,01$), AWL3106 ($p < 0,001$) oraz interakcji powyższych czynników ($p < 0,05$) na T_E .

Blokada receptorów opioidowych nie miała znamiennego wpływu na wywołany przez AWL3106 spadek ciśnienia tętniczego krwi. Efekt tego peptydu był statystycznie nierozróżnialny pomiędzy obiema grupami doświadczalnymi, co ilustruje przedstawiona poniżej Ryc. 11.



Ryc. 11 Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi indukowane AWL3106 przed (▲; ciągła linia) oraz po blokadzie receptorów opioidowych (◆; przerywana linia)
ANOVA, test Tukey'a; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; ***, xxx – $p < 0,001$; *, x, # – znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 przed i po blokadzie receptorów opioidowych oraz pomiędzy grupami
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ AWL3106 ($p < 0,001$) oraz brak wpływu blokady receptorów opioidowych ($p = 0,09$) na MAP i interakcji powyższych czynników ($p = 0,9$).

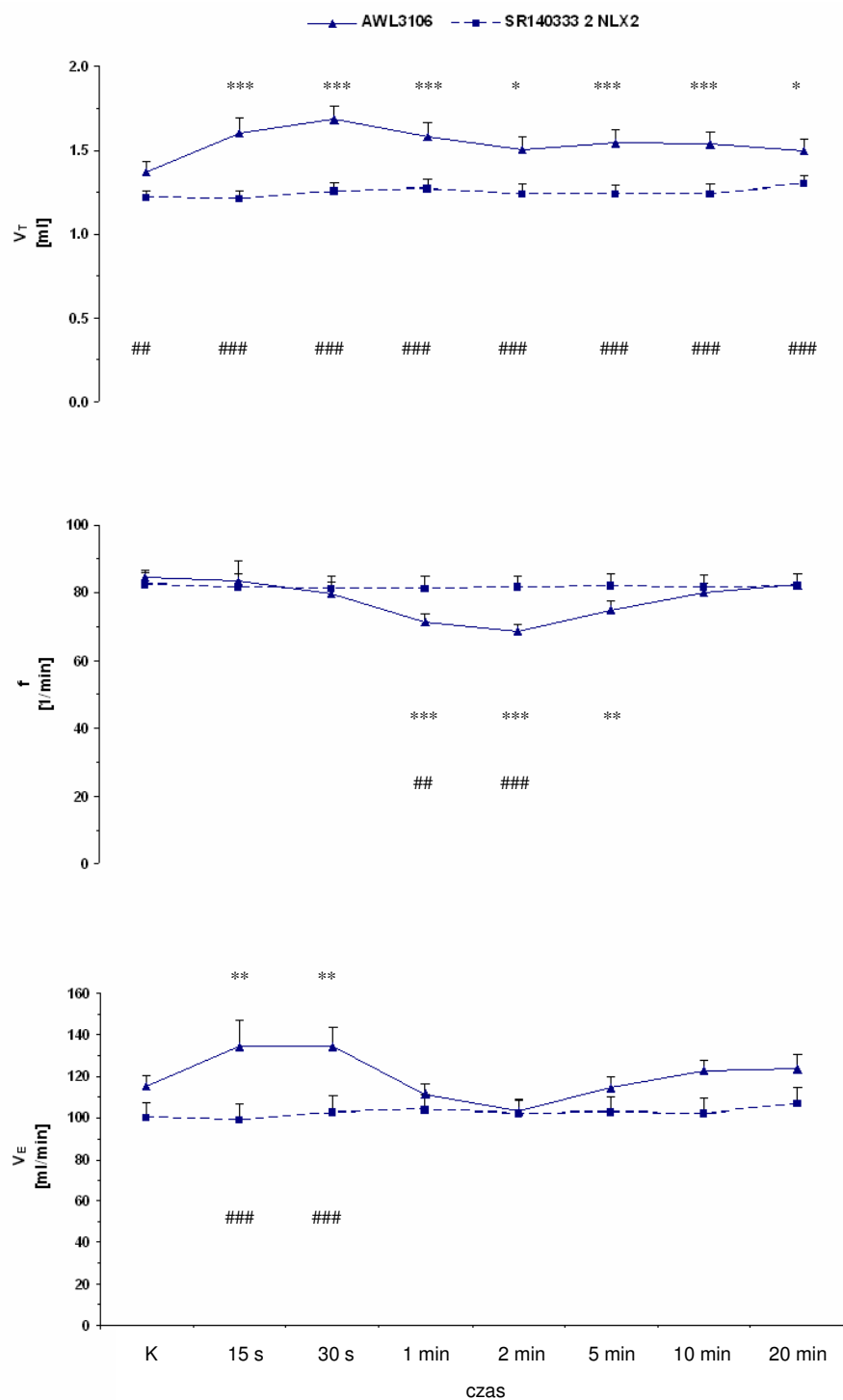
IV.3 Wpływ blokady receptorów opioidowych i tachykininowych na efekty oddechowo-krażeniowe wywoływane przez AWL3106

Opisana w poprzednim rozdziale blokada receptorów opioidowych znosiła obecność bezdechu po podaniu AWL3106. Jednak w dalszym ciągu obecne były: wzrost objętości oddechowej, zwolnienie oddychania oraz utrzymująca się hipotensja.

Aby wyeliminować ww. zmiany badanych parametrów zablokowano receptory tachykininowe NK₁ stosując, dzięki uprzejmości firmy Sanofi-Research, niepeptydowego antagonistę – SR140333.

SR140333 rozpuszczano w niewielkiej ilości DMSO, a następnie uzupełniano solą fizjologiczną tak, aby stężenie końcowe DMSO nie przekraczało 6%. Tak przygotowanego antagonistę podawano 13 szczurom dożylnie w dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ (Fu i wsp., 2007) (n=4) oraz 2,0 $\mu\text{mol/kg}$ (n=9). Następnie po 8 min wstrzykiwano 2,0 mg/kg naloksonu, po czym, po kolejnych 2 min do żyły udowej podawano peptyd AWL3106.

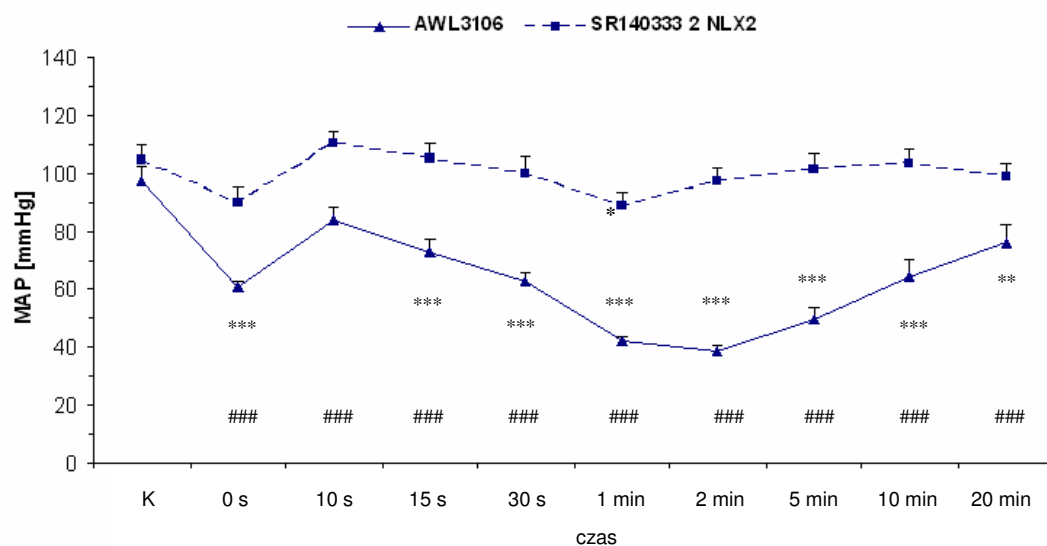
Po jednoczesnym zablokowaniu receptorów opioidowych oraz tachykininowych przez obie dawki SR140333 nie odnotowano wpływu badanej chimery peptydowej na V_T , f ani jej depresyjnego działania na V_E (Ryc. 12). Jednakże, w dalszym ciągu obserwowano minimalny, w porównaniu do opisanego w rozdziałach: IV.1 i IV.2, wpływ iniekcji badanego peptydu na wartość średniego ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 13). Po zablokowaniu receptów tachykininowych NK₁ dawką 2,0 mg/kg SR140333 średnie ciśnienie krwi po podaniu AWL3106 ulegało nieznacznemu obniżeniu z wyjściowych 104 ± 5 mmHg do 89 ± 5 mmHg 1 min po iniekcji ($p=0,03$). Wartości MAP obserwowane po podaniu peptydu w grupie zwierząt, którym wstrzyknięto antagonistów obu typów receptorów, różniły się w istotny sposób od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.



Ryc. 12 Zmiany objętości oddechowej (V_T), częstości oddychania (f) oraz wentylacji (V_E) indukowane przez AWL3106 u zwierząt kontrolnych (AWL3106; ▲; linia ciągła) oraz po zablokowaniu receptorów opioidowych i tachykininowych NK_1 2,0 $\mu\text{mol/kg}$ SR140333, (SR140333 2 NLX 2; ■; linia przerywana)

(ANOVA, test Tukey'a; *, # – $p < 0,05$; **, ## – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; * – zmienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych AWL3106 ($n=9$); # – różnice pomiędzy grupą kontrolną a grupą z zablokowanymi receptorami opioidowymi)

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ antagonistów ($p=0,004$) i AWL3106 ($p=0,001$) na V_T oraz interakcję ww. czynników ($p=0,001$); brak wpływu antagonistów ($p=0,4$), ale wpływ działania AWL3106 ($p < 0,001$) na f oraz interakcję tych czynników ($p=0,001$); brak efektu blokady receptorów ($p=0,08$), wpływ działania AWL3106 ($p < 0,0002$) na V_E oraz interakcję ww. czynników ($p < 0,001$).



Ryc. 13 Odpowiedź średniego ciśnienia tętniczego krwi na dożylną iniekcję AWL3106 przed (AWL3106; ▲; ciągła linia) oraz po blokadzie receptorów opioidowych i tachykininowych (SR140333 2 NLX 2; ■; linia przerywana)

ANOVA, test Tukey'a; *, # – $p < 0,05$; **, ## – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; * – znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości kontrolnej; # – różnice między grupą zwierząt kontrolnych a grupą z zablokowanymi receptorami opioidowymi i tachykininowymi (n=9)

Dwukierunkowa ANOVA ujawniła wpływ jednoczesnej blokady receptorów opioidowych i tchykininowych (SR140333 2,0 $\mu\text{mol/kg}$) ($p < 0,001$), wpływ działania AWL3106 ($p < 0,001$) oraz interakcję ww. czynników na MAP ($p < 0,001$).

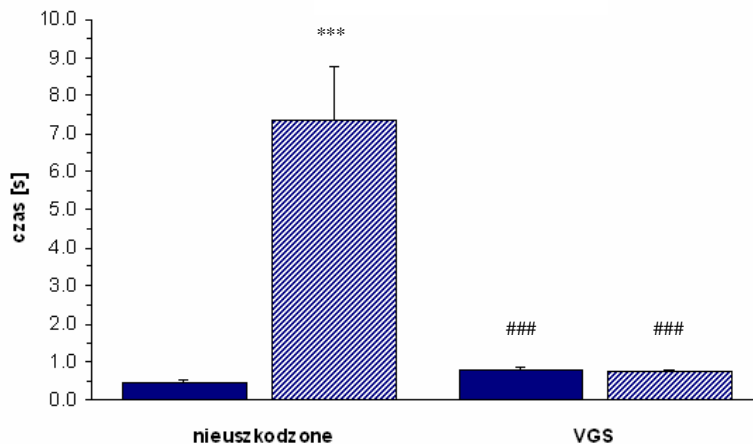
IV.4 Efekty oddechowo-krazeniowe wywoływane przez dermorfinę: udział nerwów błędnych

Dermorfina jest najsilniejszym analgetykiem wśród peptydów opioidowych, agonistą receptorów opioidowych μ . Przytoczone we wstępie prace, dotyczące efektów oddechowych dermorfiny u zwierząt doświadczalnych dostarczają niejednoznacznych danych. Opisywane reakcje uwarunkowane były miejscem iniekcji, stopniem dojrzałości zwierzęcia, narkozą, dawką.

W doświadczeniach opisanych w niniejszym rozdziale badano efekty dożylniej iniekcji dermorfiny w dwóch grupach szczurów: z zachowanym unerwieniem błędnym (n=9) i poddanych wagoatomii szyjnej (n=8). Wszystkim zwierzętom podawano kontrolnie 1,0 ml/kg roztworu soli fizjologicznej (rozpuszczalnik dermorfiny). Stosowana dawka 0,3 μ mol/kg odpowiada zawartości dermorfiny w analogu neuropeptydowym AWL3106.

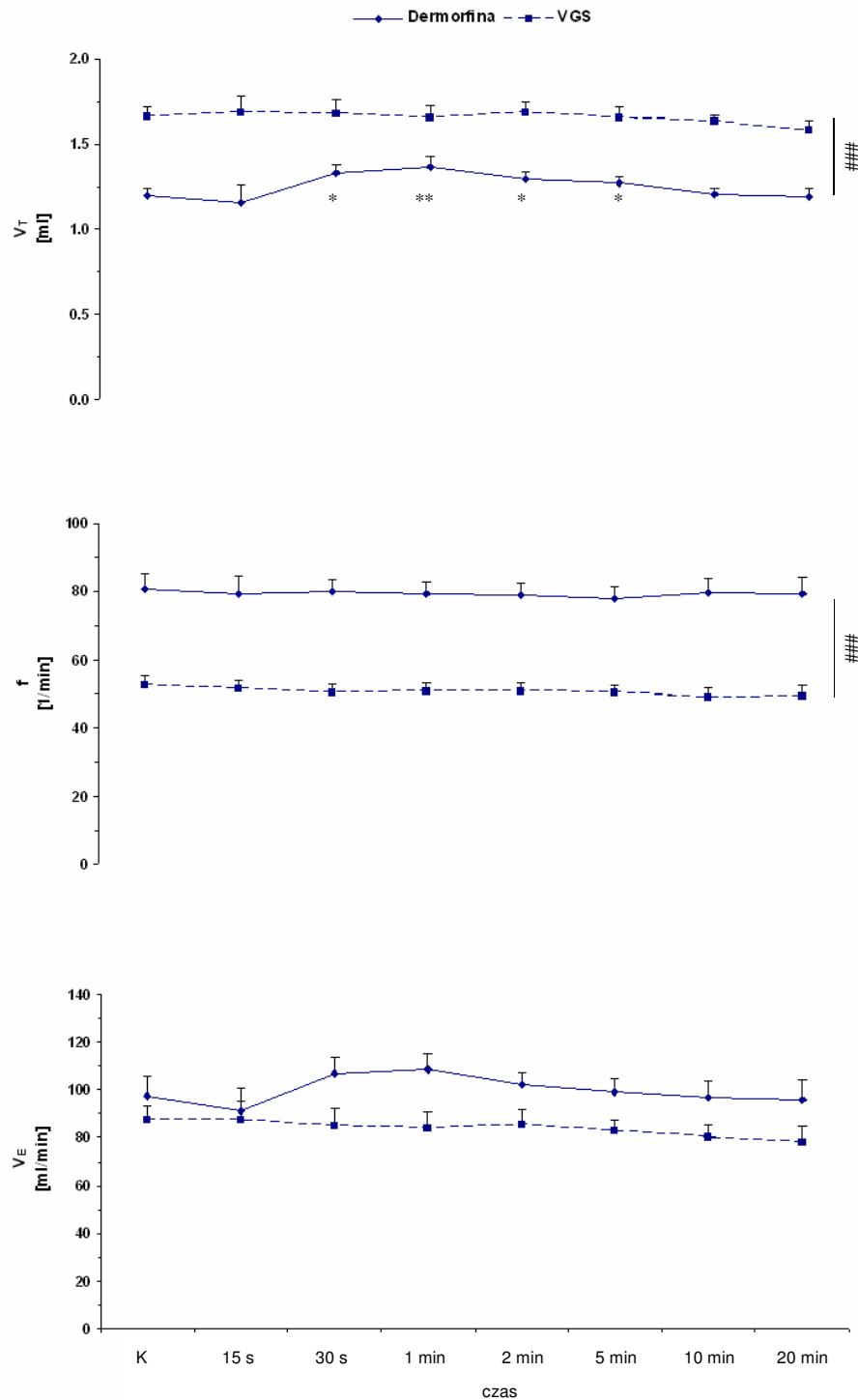
Bezpośrednio po dożylniej iniekcji dermorfiny obserwowano bezdech, po którym następował wzrost objętości oddechowej oraz towarzyszące tym zmianom efekty krążeniowe manifestujące się znacznym spadkiem ciśnienia tętniczego krwi i zwolnieniem akcji serca.

Peptyd ten podany w iniekcji do żyły udowej dziewięciu szczurom z zachowanym unerwieniem wagalnym wywoływał bezdech trwający średnio $7,3 \pm 1,4$ s ($p < 0,001$) zilustrowany na Ryc. 14.



Ryc. 14 Średni czas trwania wydechu na tle dożylniej iniekcji dermorfiny u szczurów nieuszkodzonych (n=9) i wagotomizowanych (VGS) (n=8) (kolumny lite) oraz średnia długość bezdechu przed i średni czas trwania wydechu po wagotomii szyjnej (kolumny prążkowane) ANOVA, test Tukey'a; *** – p<0,001 względem wartości przed podaniem peptydu oraz ### – p<0,001 pomiędzy grupami. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływy: wagotomii (p<0,001), dermorfiny (p<0,001) oraz efekt interakcji tych czynników (p<0,001) na długość bezdechu.

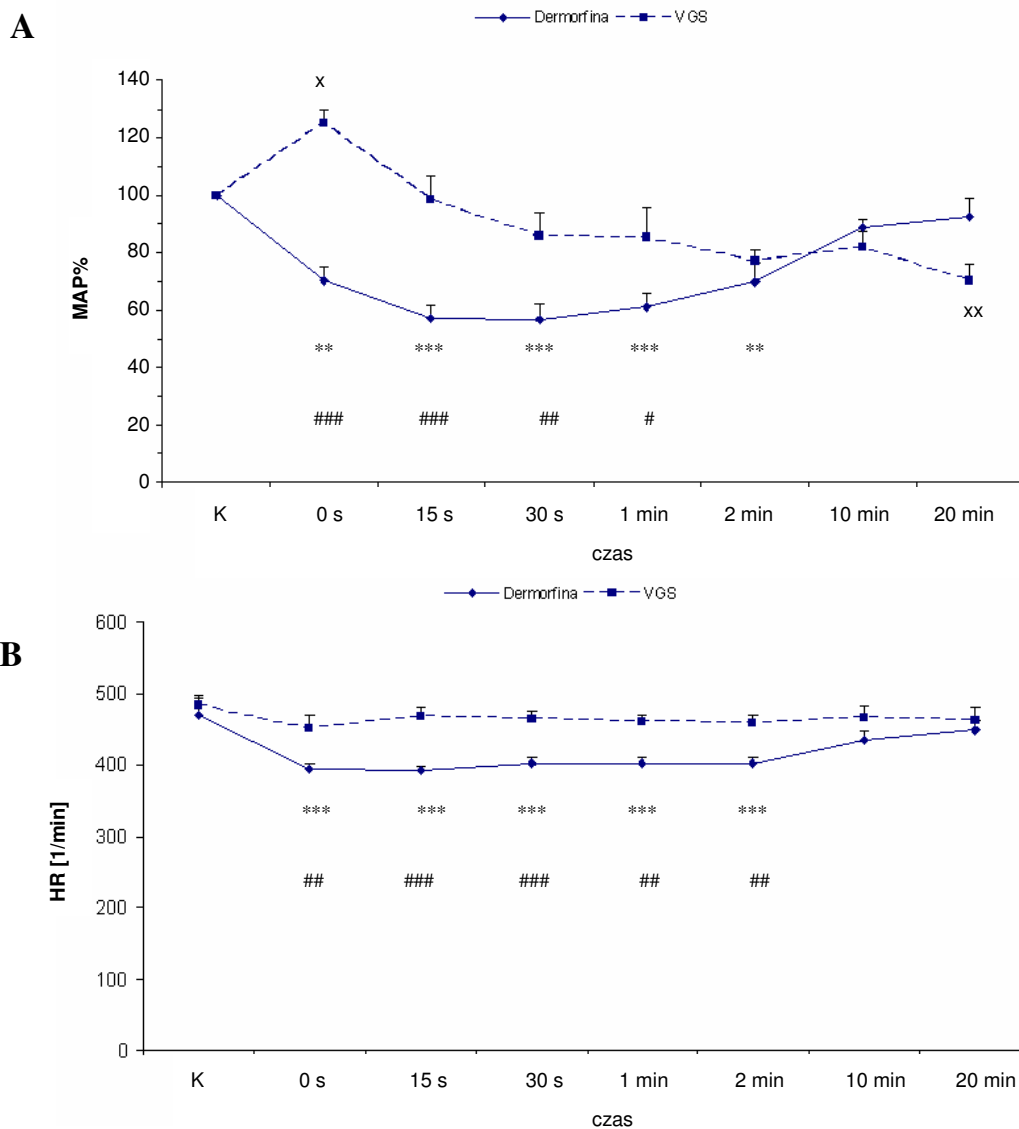
Wzrost objętości oddechowej obserwowany po bezdechu wykazywał znamienność statystyczną od 30 s (p<0,05) do 2 min osiągając maksymalną wartość $1,37 \pm 0,05$ ml w porównaniu z kontrolą $1,20 \pm 0,05$ ml w 1 min po iniekcji związku. Zastosowana dawka dermorfiny nie wpływała na częstość oddychania, oraz nie miała istotnego wpływu na wartość wentylacji minutowej (Ryc. 15).



Ryc. 15 Efekt podania dermorfiny szczurom nieuszkodzonym (◆; ciągła linia) oraz poddanym wagotomi szyjnej (■; przerywana linia) na objętość oddechową (V_T), częstość odychania (f) oraz wentylację (V_E). ANOVA, porównania zaplanowane; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$; *, # – znamienność statystyczna odpowiednio, względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych dermorfina przed wagotomią szyjną oraz różnice pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ stanu unerwienia ($p < 0,001$) i dermorfiny ($p < 0,01$) oraz brak efektu interakcji tych czynników ($p = 0,09$) na V_T ; wpływ unerwienia ($p < 0,001$) oraz brak wpływu dermorfiny ($p = 0,85$) i interakcji ww. czynników ($p = 0,98$) na f ; oraz brak wpływu stanu unerwienia ($p = 0,09$) i dermorfiny ($p = 0,07$) oraz brak interakcji czynników ($p = 0,10$) na V_E .

Przecięcie nerwów błędnych na szyi znosiło odpowiedź objętości oddechowej na dermorfine, pozostając bez istotnego wpływu na wentylację (Ryc. 15).



Ryc. 16 Średnie procentowe zmiany ciśnienia tętniczego krwi (A) oraz zmiany częstości skurczów serca (B) po dożylnym podaniu dermorfiny zwierzętom z zachowaną (♦; ciągła linia); i otwartą pętlą wagalną (■; przerywana linia)

ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p < 0,05$; **, xx, ## – $p < 0,01$; ***, xx, ### – $p < 0,001$; *, x, # – odpowiednio, znamienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych dermorfina przed i po wagoTomii szyjnej oraz różnice pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ stanu unerwienia ($p = 0,005$) i dermorfiny ($p < 0,001$) oraz interakcję między tymi czynnikami ($p < 0,001$) na MAP%; oraz wpływ stanu unerwienia ($p < 0,01$) i dermorfiny ($p < 0,001$) oraz interakcję powyższych czynników ($p < 0,01$) na HR.

0,3 $\mu\text{mol/kg}$ dermorfiny podanej dożylnie wywołało znaczny spadek ciśnienia krwi u zwierząt z zachowanymi nerwami błędnymi. Hipotensyjna reakcja na ww. peptyd w tej grupie doświadczalnej rozpoczynała się w momencie bezdechu, następnie w 30 s po iniekcji średnie

ciśnienie tętnicze osiągało minimum, $57 \pm 5\%$ wartości wyjściowej, by następnie po 10 min powrócić do poziomu sprzed iniekcji.

Wagotomia szyjna zmieniała wzorzec odpowiedzi ciśnienia tętniczego na bolus dermorfiny zapobiegając pojawieniu się efektu hipotensyjnego, który obserwowano u zwierząt z zachowaną ciągłością nerwów błędnych. Bezpośrednio po iniekcji tego hepta-peptydu do żyły udowej średnie ciśnienie krwi przejściowo wzrastało osiągając $125 \pm 5\%$ wartości wyjściowej poczym wracało do wartości początkowych (Ryc. 16A).

W grupie zwierząt z nienaruszonymi nerwami błędnymi iniekcja dermorfiny wywołała znamienne zwolnienie rytmu serca. Częstość skurczów serca ulegała zmniejszeniu z początkowych 470 ± 23 1/min do 394 ± 9 1/min ($p < 0,001$) bezpośrednio po podaniu i pozostawała na tym poziomie przez 2 min od iniekcji. Przecięcie nerwów błędnych na szyi znosiło wpływ tego peptydu na rytm serca (Ryc. 16B).

Wpływ dermorfiny podanej do żyły udowej w dawkach 0,1 i 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ na parametry oddechowo-krażeniowe oceniono porównując największe oraz najmniejsze wartości rejestrowane w ciągu 1 min od podania z wartościami początkowymi.

Zarówno niższa (0,1 $\mu\text{mol/kg}$; $n=4$), jak i wyższa dawka (0,6 $\mu\text{mol/kg}$; $n=10$) dermorfiny wstrzyknięta do żyły udowej prowokowała bezdech trwający $3,30 \pm 0,54$ s w pierwszej a $10,40 \pm 1,74$ s w drugiej grupie doświadczalnej (Tabela 5). Obie dawki wykazywały ponadto, podobny do opisanej na początku niniejszego rozdziału, wpływ na objętość oddechową, której największą wartość obserwowano w ciągu pierwszej minuty po wstrzyknięciu związku. V_T wzrastała w tym czasie z początkowych $1,23 \pm 0,16$ ml do $1,49 \pm 0,18$ ml ($p=0,068$; test Wilcoxon, $n=4$) po iniekcji dawki 0,1 $\mu\text{mol/kg}$, oraz z $1,65 \pm 0,09$ ml do $2,28 \pm 0,19$ ml po podaniu 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ tego peptydu ($p < 0,02$; ANOVA, test Tukey'a).

Wyższa i niższa dawka dermorfiny charakteryzowały się natomiast odmiennym wpływem na częstość oddychania. O ile dermorfina w dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ (Ryc. 15) nie

zaburzała rytmu oddechowego, o tyle w ciągu 1 min po podaniu dawki 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ pojawiało się przyspieszenie oddychania z 81 ± 5 1/min do 93 ± 7 1/min ($p=0,068$, test Wilcoxon), natomiast 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ dermorfiny, za sprawą istotnego wydłużenia czasu trwania wydechu z $0,54 \pm 0,02$ s do $1,22 \pm 0,18$ s ($p<0,001$; ANOVA, test Tukey'a), wywołało zwolnienie f z 75 ± 2 1/min do 45 ± 5 1/min ($p<0,001$; ANOVA, test Tukey'a).

Wentylacja minutowa w pierwszej minucie zwiększyła swoją wartość ze wstępnych 99 ± 12 ml/min na 128 ± 12 ml/min ($p=0,068$, test Wilcoxon) po 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ dermorfiny. Natomiast dawka 0,6 $\mu\text{mol/kg}$ wywoływała depresję V_E , której wartość obniżała się ze 101 ± 8 ml/min do 78 ± 6 ml/min ($p<0,01$; ANOVA, test Tukey'a). Powyższe dane zestawiono w Tabeli 5.

Tabela 5

Długość bezdechu oraz największe i najmniejsze wartości V_T , f , V_E , T_E w pierwszej minucie po iniekcji dermorfiny.

| Dawka $\mu\text{mol/kg}$ | Bezdech s | V_T ml | | | f 1/min | | | V_E ml/min | | | T_E s | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------------------|------------|-------------------|------------------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| | | K | MIN | MAX | K | MIN | MAX | K | MIN | MAX | K | MIN | MAX |
| 0,1 | $3,30 \pm 0,54$ | $1,23 \pm 0,16$ | $1,32 \pm 0,24$ | $1,49 \pm 0,18$ * | 81 ± 5 | 81 ± 5 | 93 ± 7 * | 99 ± 12 | 113 ± 16 * | 128 ± 12 * | $0,49 \pm 0,03$ | $0,40 \pm 0,04$ | $0,46 \pm 0,05$ |
| 0,6 | $10,4 \pm 1,74$ | $1,65 \pm 0,09$ | $2,02 \pm 0,17$ * | $2,28 \pm 0,19$ *** | 75 ± 2 | 45 ± 5 *** | 56 ± 4 ** | 101 ± 8 | 78 ± 6 ** | 103 ± 6 | $0,54 \pm 0,02$ | $0,89 \pm 0,09$ * | $1,22 \pm 0,18$ *** |

K- wyjściowa wartość badanego parametru, MIN, MAX – najmniejsza oraz największa wartość badanego parametru w ciągu pierwszej minuty.
Dawka dermorfiny 0,1 $\mu\text{mol/kg}$: *- $p=0,068$ względem wartości początkowej; test Wilcoxon, $n=4$
Dawka dermorfiny 0,6 $\mu\text{mol/kg}$: *- $p<0,05$, **- $p<0,01$, ***- $p<0,001$ względem wartości początkowej; ANOVA, test Tukey'a. $n=10$

Tabela 6 przedstawia wpływ podania obu dawek dermorfiny na rytm serca oraz średnie ciśnienie tętnicze i wskazuje, iż obydwie dawki wywoływały zwolnienie rytmu serca oraz indukowały znaczny spadek średniego ciśnienia tętniczego krwi.

Tabela 6 Najniższe oraz najwyższe wartości HR i MAP w pierwszej minucie po iniekcji dermorfiny

| Dawka $\mu\text{mol/kg}$ | HR 1/min | | | MAP mmHg | | |
|--------------------------|--------------|--------------------|--------------|------------|-------------------|------------------|
| | K | MIN | MAX | K | MIN | MAX |
| 0,1 | 449 ± 19 | 381 ± 20 * | 456 ± 23 | 94 ± 6 | 63 ± 3 * | 89 ± 5 |
| 0,6 | 388 ± 19 | 310 ± 19 ** | 383 ± 21 | 96 ± 5 | 59 ± 5 *** | 76 ± 6 ** |

Oznaczenia jak w Tab. 5

IV.5 Efekty oddechowo-kръżeniowe indukowane przez AWL2077 oraz rola nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach

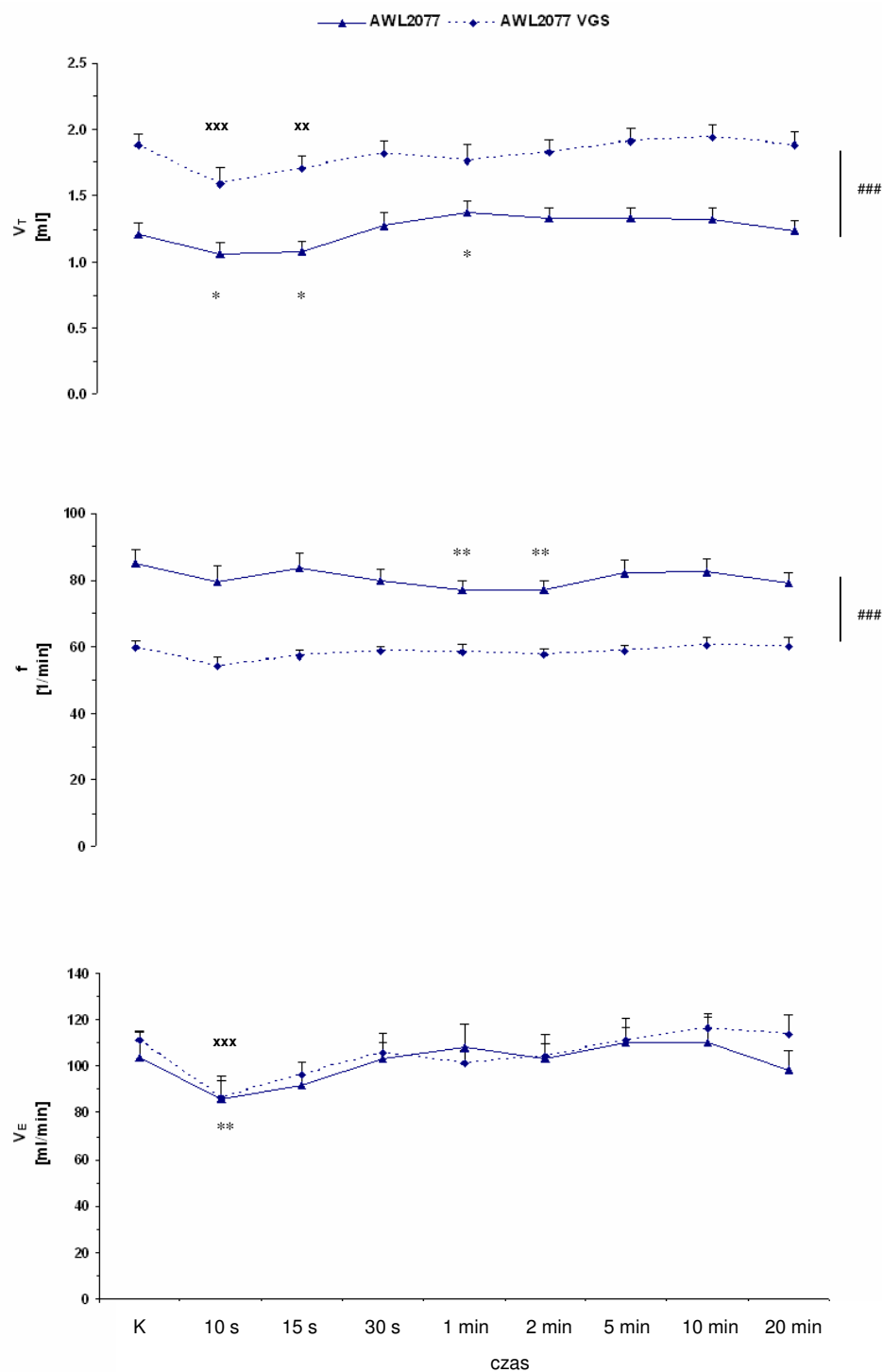
AWL2077 jest peptydem odpowiadającym fragmentowi Substancji P pełniącym w chimerze AWL3106 funkcję farmakofora wykazującego agonistyczne działanie względem receptora tachykininowego NK₁.

Badania, których rezultaty prezentowane są poniżej przeprowadzono na 19 szczurach. Przed każdym doświadczeniem podawano 1,0 ml/kg roztworu DMSO w soli fizjologicznej, który nie zaburzał mierzonych parametrów, po czym po upływie 10 min wstrzykiwano badany peptyd.

Na Ryc. 17 przedstawiono wpływ dożylniej iniekcji AWL2077 na objętość oddechową, częstość oddychania oraz wentylację. Peptyd ten podany w dawce 0,3 µmol/kg u zwierząt z nienaruszonymi nerwami błędnymi wywołał we wstępnej fazie, do 15 s po iniekcji, spadek objętości oddechowej z wyjściowych $1,21 \pm 0,08$ ml do $1,06 \pm 0,08$ ml ($p < 0,05$) i $1,08 \pm 0,08$ ml ($p < 0,05$) odpowiednio 10 i 15 sekund po podaniu. Następnie, 1 min po wstrzyknięciu związku wartość V_T krótkotrwale wzrastała do $1,38 \pm 0,08$ ml, w tym samym czasie zaobserwowano nieznaczne zwolnienie oddychania z 85 ± 4 1/min do 77 ± 3 1/min ($p < 0,01$).

Eliminacja sprzężenia wagalnego wprowadzała widoczne na Ryc. 17 podwyższenie objętości oddechowej i zwolnienie oddychania.

Dożylna iniekcja AWL2077 u tych zwierząt wywołała podobny efekt, jak w grupie z zachowaną aferentacją wagalną. V_T zmniejszała się z wyjściowego poziomu $1,88 \pm 0,08$ ml do $1,59 \pm 0,13$ ml ($p < 0,001$) oraz $1,70 \pm 0,10$ ml ($p < 0,01$), odpowiednio 10 s oraz 15 s od wstrzyknięcia, po czym utrzymywała wartości zbliżone do wyjściowych przez dalszy czas obserwacji. Nie obserwowano natomiast zwolnienia oddychania indukowanego uprzednio przez AWL2077 u szczurów z zachowanym unerwieniem wagalnym.



Ryc. 17 Wpływ podania AWL2077 na objętość oddechową, częstość, wentylację przed (AWL2077; \blacktriangle , linia ciągła; n=9) oraz po wagoTomii szyjnej (AWL2077VGS; \blacklozenge , linia przerywana; n=10)

ANOVA, test Newman-Keulsa; *, x, # – $p < 0,05$, **, xx, ## – $p < 0,01$, ***, xxx, ### – $p < 0,001$ *, x, #, – odpowiednio: względem wartości wyjściowej przed i po przecięciu nerwów błędnych na szyi oraz pomiędzy grupami.

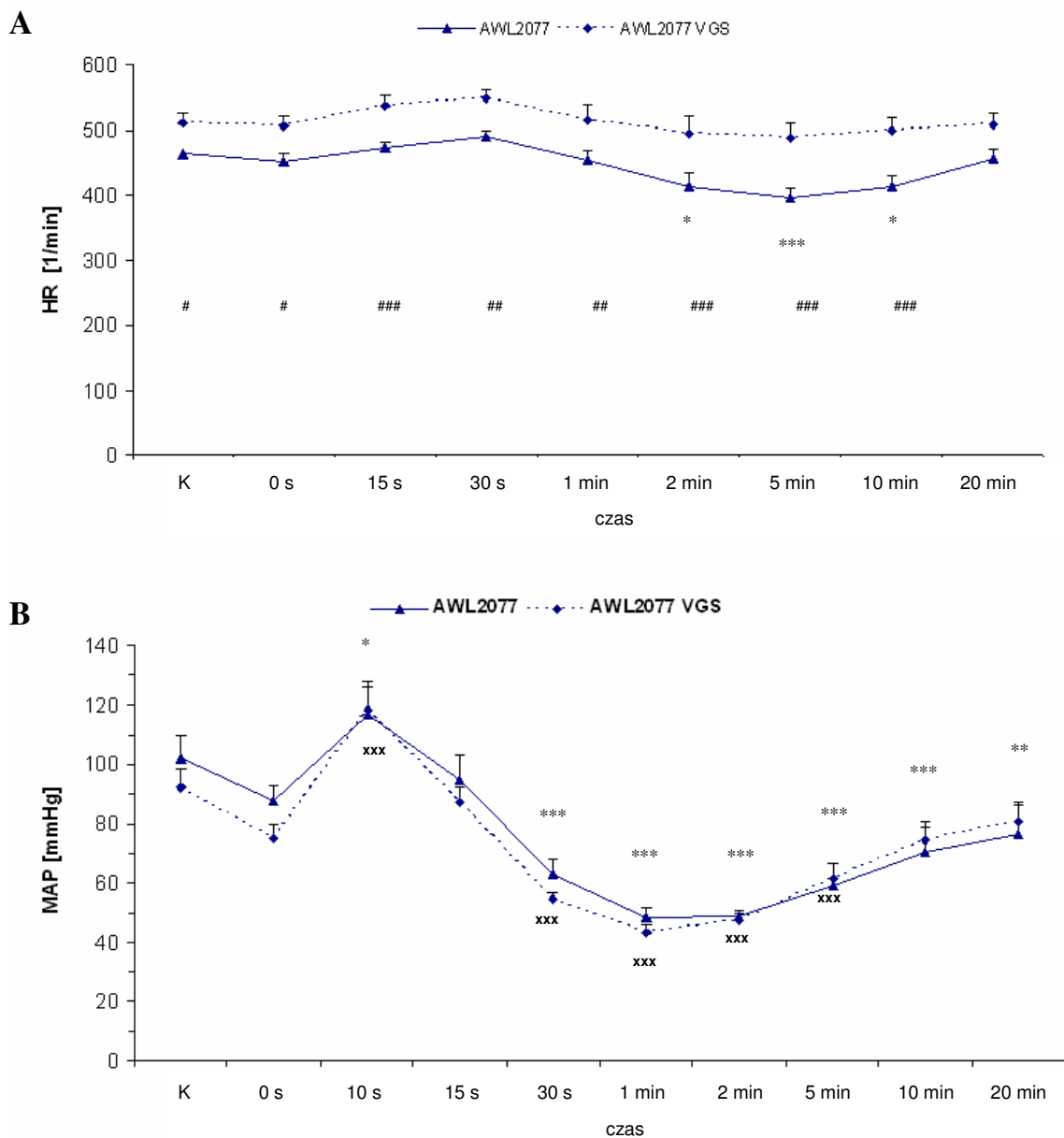
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ stanu unerwienia ($p < 0,001$), AWL2077 ($p < 0,001$) oraz interakcję powyższych czynników ($p = 0,002$) na V_T ; wpływ stanu unerwienia ($p < 0,001$), AWL2077 ($p = 0,004$) oraz efekt interakcji czynników ($p = 0,03$) na f ; wpływ AWL2077 ($p < 0,001$) oraz brak wpływów stanu unerwienia, jak i interakcji czynników ($p = 0,07$) na V_E .

W obu grupach doświadczalnych dochodziło do redukcji wentylacji minutowej bezpośrednio po iniekcji AWL2077. Wartość tego parametru u zwierząt z zachowaną ciągłością nerwów błędnych zmniejszała się ze 104 ± 11 ml/min do 86 ± 10 ml/min ($p < 0,01$), podobnie jak w grupie szczurów wagotomizowanych ze 111 ± 4 ml/min do 86 ± 8 ml/min ($p < 0,001$) (Ryc. 17).

AWL2077 podany do żyły udowej grupie szczurów z nienaruszoną ciągłością nerwów błędnych indukował spadek częstości akcji serca. 5 min po iniekcji tego peptydu rytm serca zwalniał z początkowych 462 ± 11 1/min do 396 ± 15 1/min ($p < 0,01$). Deaferentacja wagalna znosiła tę odpowiedź (Ryc. 18A).

W obu grupach doświadczalnych podanie badanego peptydu do żyły udowej w podobny sposób wpływało na wartość średniego ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 18B). W grupie zwierząt z zachowaną pętlą wagalną AWL2077 wywoływał nieistotny statystycznie spadek ciśnienia krwi z wstępnych 102 ± 8 mmHg do 88 ± 5 mmHg, po którym następował jego wzrost powyżej wartości początkowej do 117 ± 11 mmHg ($p < 0,05$ względem wartości początkowej), i ponowny spadek, by w 1 min po iniekcji sięgnąć do najniższej wartości 48 ± 3 mmHg ($p < 0,001$ versus wartość wyjściowa). Hipotensja utrzymywała się do końca prowadzenia obserwacji.

W grupie zwierząt wagotomizowanych bezpośrednio po podaniu peptydu obserwowano nieistotny statystycznie spadek ciśnienia tętniczego krwi z 92 ± 6 mmHg do 75 ± 5 mmHg, po czym następował różniący się znamienne w porównaniu do wartości początkowej wzrost tego parametru do 118 ± 8 mmHg ($p < 0,001$). Po krótkotrwałym wzroście ciśnienia, podobnie jak u zwierząt z nienaruszonymi nerwami błędnymi, ponownie dochodziło do hipotensji i 1 min po wstrzyknięciu AWL2077 ciśnienie krwi osiągało najniższą wartość 43 ± 3 mmHg ($p < 0,001$). Spadek ciśnienia tętniczego krwi w tej grupie doświadczalnej utrzymywał się przez 5 min.



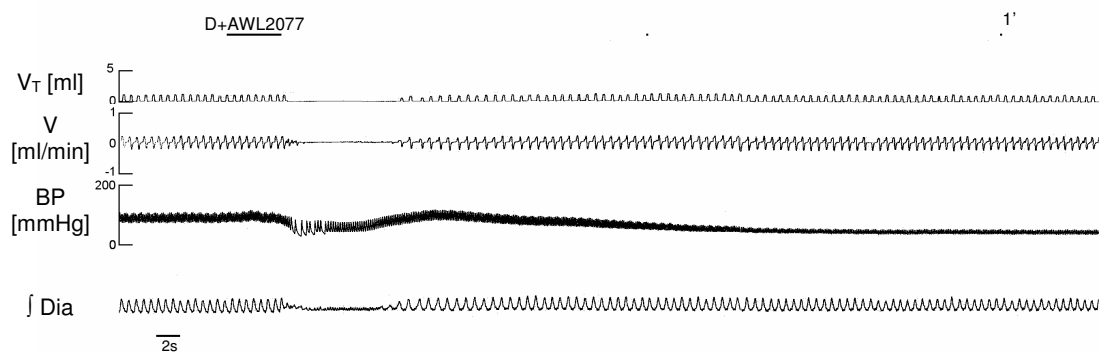
Ryc. 18 Wpływ AWL2077 na częstość pracy serca (A) i wartość średniego ciśnienia tętniczego (B) przed (▲, linia ciągła) oraz po przecięciu nerwów błędnych na szyi (◆, linia przerywana) ANOVA, test Newman-Keulsa; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, ***, xxx – $p < 0,001$ *, x – odpowiednio: względem wartości wyjściowej przed i po przecięciu nerwów błędnych na szyi. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ stanu unerwienia ($p < 0,01$), wpływ AWL2077 ($p < 0,001$) oraz brak efektu interakcji czynników ($p = 0,4$) na HR; wpływ AWL2077 ($p < 0,001$) oraz brak wpływów stanu unerwienia ($p = 0,6$) i interakcji ww. czynników ($p = 0,6$) na MAP.

IV.6 Efekt jednoczesnego podania dermorfiny i AWL2077 na oddychanie i parametry krążeniowe

W Rozdziale IV.1 opisano wzorzec oddechowo-krążeniowy peptydu AWL3106 będącego hybrydą zbudowaną z farmakoforów: opioidowego — dermorfiny — oraz tachykininowego — substancji P₇₋₁₁. W doświadczeniach opisanych w niniejszym podrozdziale porównano efekty oddechowe i krążeniowe indukowane przez AWL3106 z efektami wywoływanymi przez jednoczesne podanie obu ww. niepowiązanych ze sobą wzajemnie aktywnych fragmentów peptydu.

Badania przeprowadzono na 8 uśpionych szczurach z nienaruszonym unerwieniem wagalnym, a otrzymane wyniki porównano z grupą zwierząt traktowanych AWL3106. Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach kontrolnie podawano 1,0 ml/kg rozpuszczalnika, który nie wykazywał wpływu na żaden z rejestrowanych parametrów.

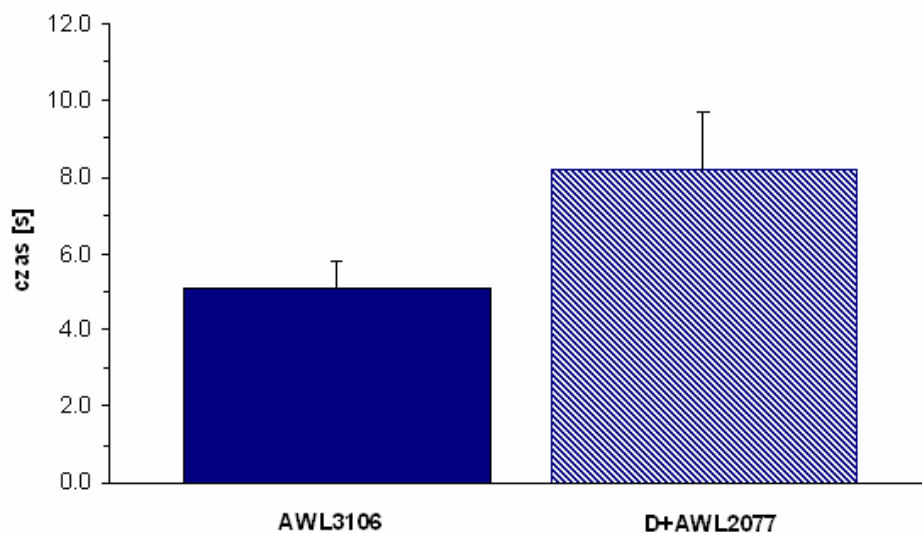
Bezpośrednio po dożylniej iniekcji mieszaniny farmakoforów opioidowego i tachykininowego w dawce 0,3 μmol/kg obserwowano bezdech. We wznowionym oddychaniu brak było istotnych zmian objętości oddechowej w porównaniu do jej zwiększenia wywoływanego przez AWL3106. Efektem oddechowym, podobnie jak po podaniu chimery peptydowej, towarzyszył spadek ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 19).



Ryc. 19 Wpływ jednoczesnego, dożylnego podania dermorfiny i AWL2077 na oddychanie i krążenie u szczura

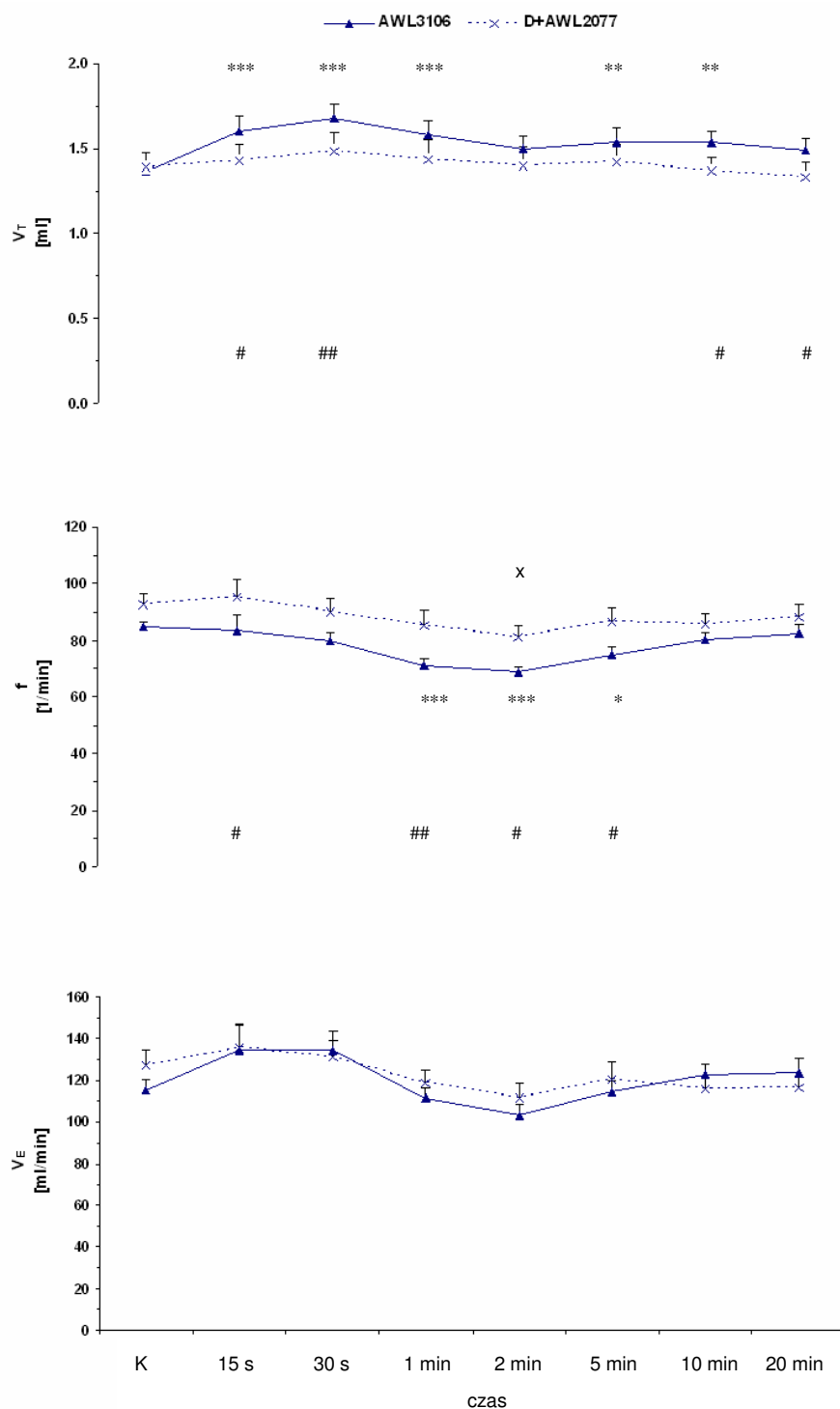
V_T – objętość oddechowa, V – przepływ powietrza przez drogi oddechowe, BP – ciśnienie tętnicze krwi, ∫Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

Czas trwania bezdechu wywołanego podaniem mieszaniny farmakoforów ($8,2 \pm 1,6$ s) nie różnił się istotnie statystycznie od bezdechu indukowanego przez AWL3106 ($5,1 \pm 0,7$ s) ($p=0,074$) (Ryc. 20).



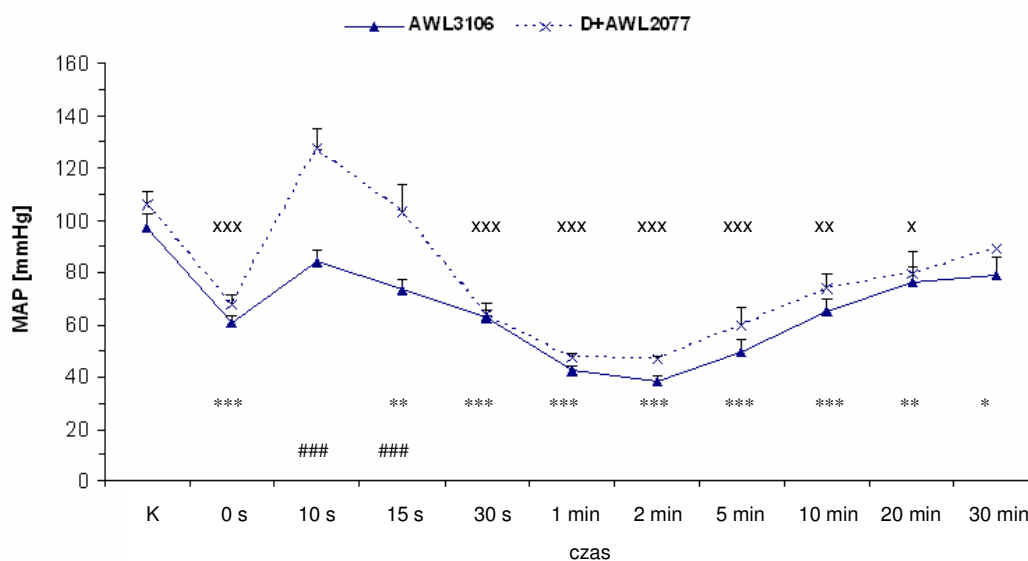
Ryc. 20 Średnia długość bezdechu wywołanego przez AWL3106 oraz spowodowanego przez jednoczesne podanie dermorfiny i AWL2077 (D+AWL2077)
Jednoczynnikowa ANOVA nie ujawniła wpływu podawanych związków na długość bezdechu ($p=0,07$)

W przeciwieństwie do AWL3106 równoległe podanie dermorfiny i AWL2077 (D+AWL2077) nie powodowało wzrostu objętości oddechowej. Natomiast zwolnienie oddychania pojawiało się w obu grupach doświadczalnych i swoją największą wartość osiągało w 2 min po iniekcji. Częstość oddychania zmniejszała się krótkotrwale z wyjściowych 93 ± 4 1/min do 81 ± 4 1/min ($p<0,05$). Podobnie jak opisano w rozdziale IV.1 zmiana częstości oddechowej była spowodowana wydłużeniem czasu wydechu z $0,39 \pm 0,02$ s do $0,47 \pm 0,03$ s po 2 min od podania D+AWL2077 ($p<0,05$). W obu sytuacjach doświadczalnych nie zaobserwowano obniżenia wentylacji minutowej (Ryc. 21).



Ryc. 21 Wpływ AWL3106 oraz jednoczesnego podania dermorfiny i AWL2077 (D+AWL2077) na objętość oddechową (V_T), częstość (f) i wentylację (V_E)
 ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p < 0,05$; **, xx, ## – $p < 0,01$; ***, xxx, ### – $p < 0,001$; względem odpowiedniej wartości początkowej po podaniu AWL3106 (*), D+AWL2077 (x) oraz pomiędzy grupami (#); Dwuczynnikowa ANOVA wykazała: brak wpływu rodzaju związku ($p = 0,3$), wpływ badanych peptydów ($p < 0,001$) oraz efekt interakcji tych czynników ($p = 0,036$) na V_T ; wpływ badanych peptydów ($p < 0,001$) oraz brak wpływu rodzaju związku ($p = 0,06$) i interakcji tych czynników ($p = 0,4$) na f ; wpływ substancji ($p < 0,001$) oraz brak wpływów związanych z rodzajem substancji ($p = 0,8$) i interakcją ww. czynników ($p = 0,2$) na V_E .

Wpływ badanych związków na wartość ciśnienia krwi przedstawia Ryc. 22. Hipotensyjne działanie badanych substancji obserwowane w obu grupach doświadczalnych wykazuje podobny przebieg. Wpływ AWL3106 na wartość tego parametru opisano w rozdziale IV.1. Jednoczesna iniekcja dermorfiny i AWL2077 powodowała spadek ciśnienia tętniczego krwi bezpośrednio po podaniu z początkowych 106 ± 5 mmHg do 67 ± 4 mmHg ($p < 0,001$), po czym następował krótkotrwały wzrost do 127 ± 8 mmHg, który znamienne różnił się od wartości MAP w grupie AWL3106 (84 ± 4 mmHg) ($p < 0,001$). W 2 min od podania peptydów średnie ciśnienie krwi osiągało swoją najniższą wartość 47 ± 2 mmHg, nie różniącą się od indukowanej przez chimerę peptydową.

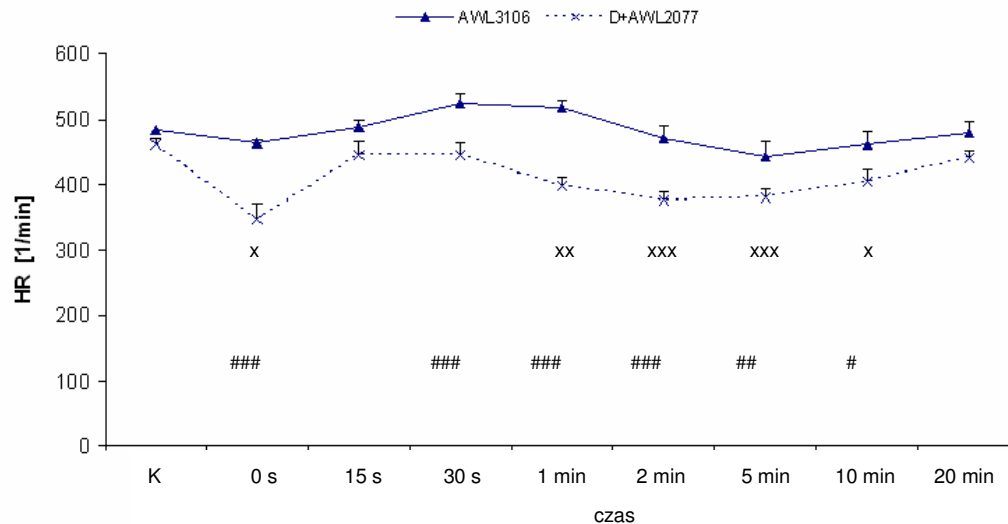


Ryc. 22 Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi wywołane przez AWL3106 oraz po jednoczesnym podaniu dermorfiny i AWL2077 (D+AWL2077)

ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p < 0,05$, **, xx, ## – $p < 0,01$, ***, xxx, ### – $p < 0,001$ względem odpowiedniej wartości początkowej po podaniu AWL3106 (*), D+AWL2077 (x) oraz pomiędzy grupami (#).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła wpływy: rodzaju substancji ($p = 0,01$), ich działania ($p < 0,001$) oraz interakcję ww. czynników ($p < 0,001$) na MAP.

AWL 3106 nie zmieniał w sposób istotny rytmu serca, natomiast D+AWL2077 powodowały dwufazową zmianę tego parametru. Bezpośrednio po podaniu obserwowano zmniejszenie liczby uderzeń serca z 462 ± 9 1/min do 346 ± 25 1/min ($p < 0,05$), po czym po przejściowym powrocie do wartości wyjściowych następowe zwolnienie utrzymywało się od 1 do 10 min po iniekcji mieszaniny farmakoforów, co przedstawia Ryc. 23.



Ryc. 23 Zmiany częstości skurczów serca wywołane przez AWL3106 oraz dermorfinę i AWL2077 (D+AWL2077)

ANOVA, test Tukey'a; *, x, # – $p < 0,05$, **, xx, ## – $p < 0,01$, ***, xxx, ### – $p < 0,001$ względem odpowiedniej wartości początkowej po podaniu AWL3106 (*), D+AWL2077 (x) oraz pomiędzy grupami (#).

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła wpływy: rodzaju substancji ($p = 0,002$), ich działania ($p < 0,001$) oraz interakcję ww. czynników ($p < 0,001$) na HR.

IV.7 Wpływ bifaliny na wzorzec oddechowo-krażeniowy i udział nerwów błędnych w obserwowanych reakcjach

Jak wspomniano we wstępie bifalina zsyntetyzowana w 1982 r. w zespole prof. Lipkowskiego charakteryzuje się wysokim powinowactwem do receptorów opioidowych μ oraz δ (Misicka i wsp., 1997). Mimo że jej zdolność wiązania do receptorów μ jest podobna do tej, jaką wykazuje morfina, to przejawia znacznie silniejsze działanie przeciwbólne (Horan i wsp., 1993; Kosson i wsp., 2005, 2008).

W opisanych poniżej doświadczeniach badano kształt wzorca oddechowo-krażeniowego szczurów po dożylnym podaniu bifaliny. Dawkę peptydu wybrano na podstawie wstępnych doświadczeń przeprowadzonych na 8 szczurach, których rezultaty zebrano w Tabeli 7. Oceniano wpływ bifaliny na czas trwania bezdechu oraz maksymalne wartości objętości oddechowej, rytmu serca oraz średniego ciśnienia tętniczego krwi. W wyborze dawki kierowano się także powtarzalnością obserwowanych reakcji. Na podstawie danych zebranych w poniższej tabeli w dalszych badaniach postanowiono stosować bifalinę w dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$.

Tabela 7. Wpływ dożylniej iniekcji bifaliny na czas trwania bezdechu, V_T , HR i MAP.

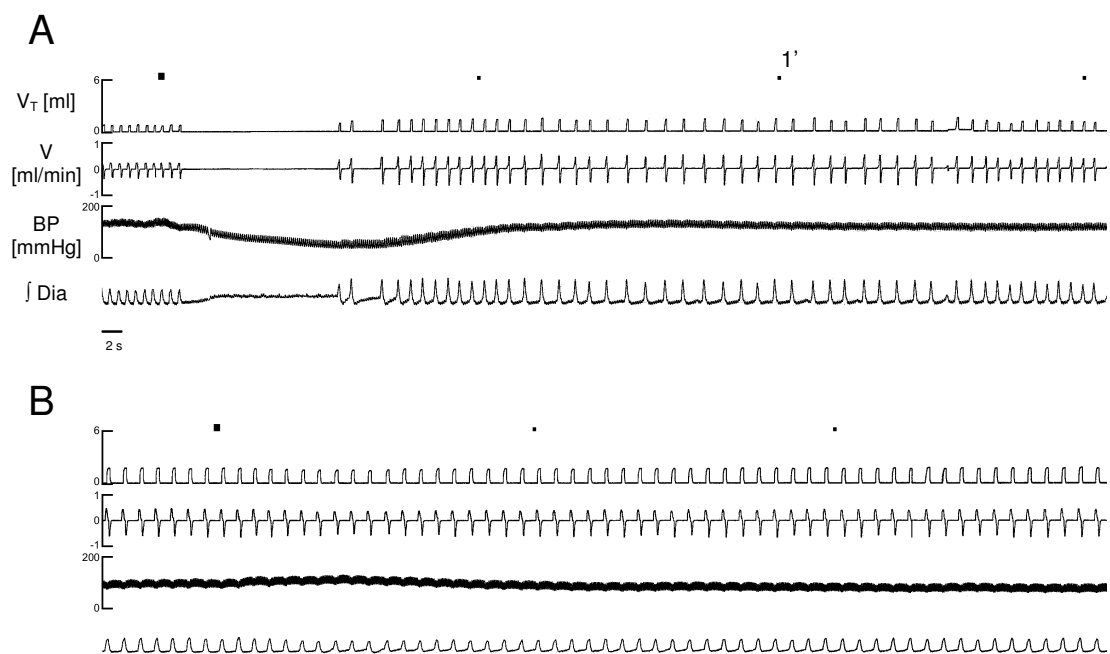
| Dawka [$\mu\text{mol/kg}$] | K | Współczynnik wydłużenia bezdechu $T_E/T_{E \text{ początkowe}}$ (min – max) | V_T | HR | MAP |
|---------------------------------|-----|--|------------------|-----------------|-----------------|
| 0,1 | 100 | $15,0 \pm 4,3^*$ (7,6 – 22,4) | $112 \pm 5^*$ | 90 ± 7 | 48 ± 2 |
| 0,3 | 100 | $24,3 \pm 2,5^*$ (21,2 – 29,2) | $114 \pm 7^*$ | $84 \pm 8^*$ | $46 \pm 6^*$ |
| 0,6 | 100 | $8,2 \pm 3,5^{**}$ (0,9 – 28,4) | $106 \pm 2^{**}$ | $92 \pm 3^{**}$ | $52 \pm 3^{**}$ |

V_T , HR, MAP przedstawione jako procent wartości początkowej (K). T_E -długość bezdechu, $T_{E \text{ początkowe}}$ – kontrolna długość wydechu, min – max – wartości minimalne i maksymalne.

** – $p < 0,05$; * – $p = 0,1$ względem wartości początkowych; test Wilcoxon

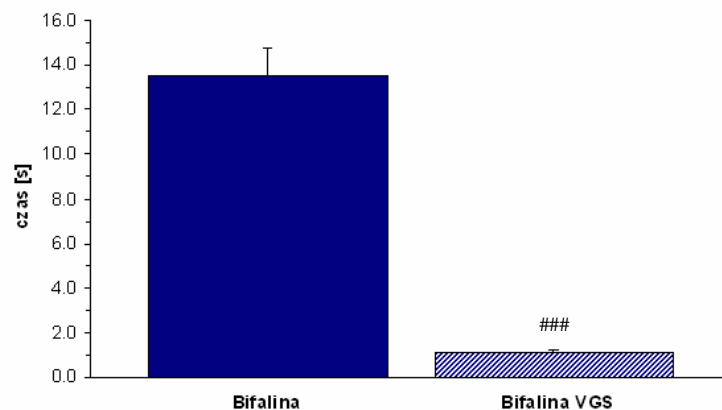
Badania mające na celu ustalenie kształtu wzorca oddechowego wywoływanego przez dożylną iniekcję bifaliny oraz określenie roli sprzężenia wagalnego w obserwowanej reakcji przeprowadzono na 8 uśpionych szczurach. Badany peptyd rozpuszczano w soli fizjologicznej i wstrzykiwano do żyły udowej w dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ przed oraz po przecięciu nerwów błędnych na szyi z zachowanym 60 min odstępem pomiędzy iniekcjami. Stanowi to okres

regeneracyjny dla uzyskania pełnej odpowiedzi na ponownie podany peptyd (Fong i Potts, 2006). Kontrolne podanie 1,0 ml/kg 0,9% NaCl nie powodowało zmian parametrów oddechowo-kръżeniowych. Ciągła rejestracja danych oddechowo-kръżeniowych w wymienionych schematach doświadczalnych trwała 2 min, a dalsza, okresowa obejmowała czas do 20 min po podaniu peptydu.



Ryc. 24 Wpływ dożylnego podania bifaliny na oddychanie i ciśnienie tętnicze krwi szczurów z zachowanymi nerwami błędnymi (A) oraz wagtomizowanych w odcinku szyjnym (B)
 V_T – objętość oddechowa, V – przepływ powietrza przez drogi oddechowe, BP – ciśnienie tętnicze krwi, \int Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

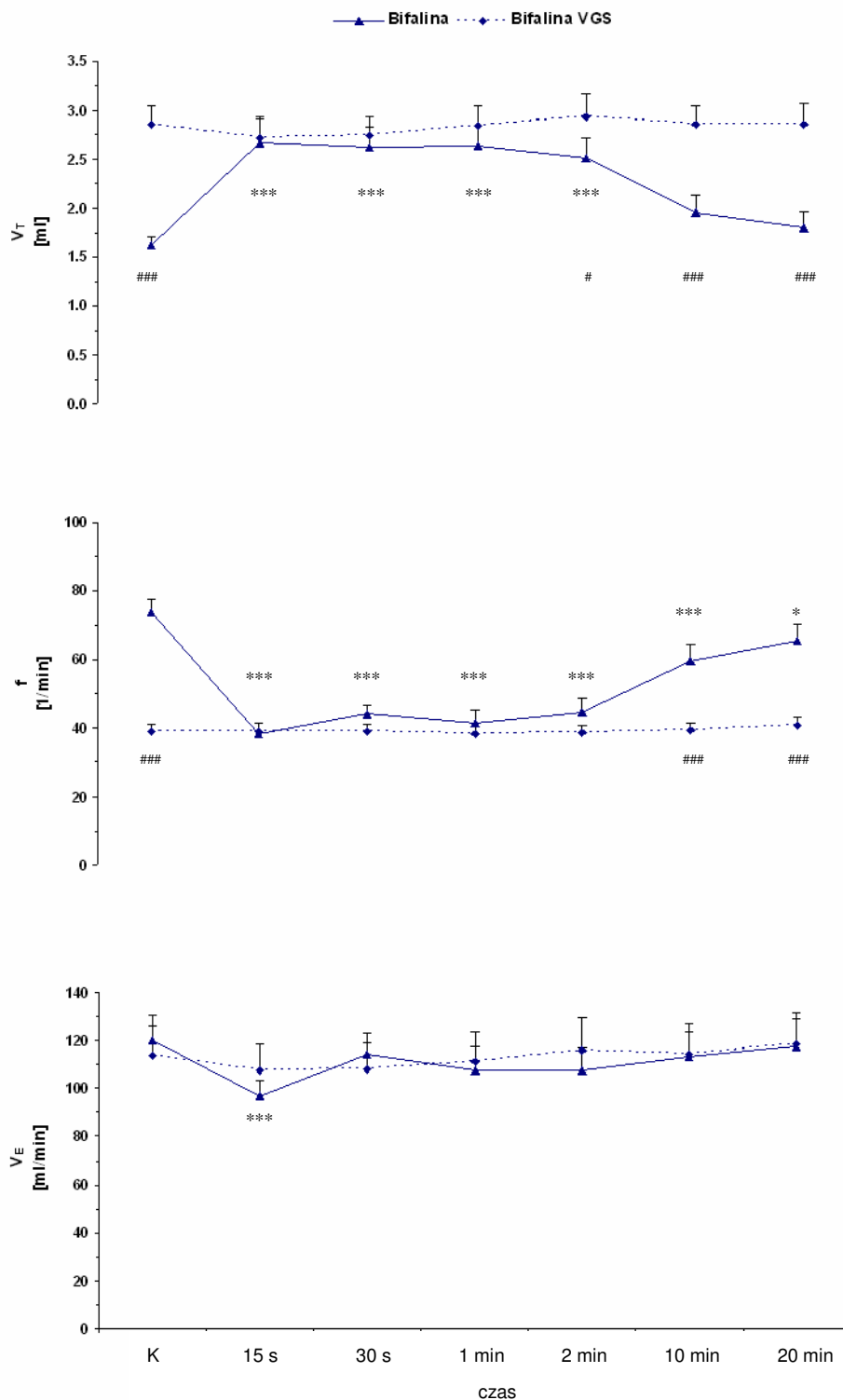
U szczurów z zachowanym unerwieniem błędnym dożylna iniekcja bifaliny wywoływała bezdech wydechowy o średnim czasie trwania $13,5 \pm 1,25$ s (Ryc. 24, Ryc. 25). Wznowione po bezdechu oddychanie charakteryzowało się zmniejszoną częstością oraz zwiększoną objętością oddechową. Wzrost V_T był równoczesny ze wzrostem amplitudy elektromiogramu przepony. Zmianom powyższym towarzyszył znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi (BP) (Ryc. 24A).



Ryc. 25 Średni czas trwania bezdechu u zwierząt z ciągłością unerwienia wagalnego (kolumna lita) oraz długość wydechu u zwierząt watomizowanych (kolumna prążkowana) ANOVA ($p < 0,001$), test Tukey'a, ### – $p < 0,001$; $n = 8$.

W grupie zwierząt poddanych watomii bifalina nie powodowała bezdechu i bradypnoicznego oddychania, ponadto wyraźnie zredukowany został wzrost objętości oddechowej oraz spadek ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 24B).

Sekcja nerwów błędnych na szyi, podobnie jak w prezentowanych wcześniej doświadczeniach, wprowadzała zwiększenie objętości oddechowej z wstępnych $1,62 \pm 0,09$ ml do $2,86 \pm 0,19$ ml ($p < 0,001$), oraz zwolnienie oddychania z 74 ± 4 1/min do 39 ± 2 1/min ($p < 0,001$), co ilustrują wartości wyjściowe na wykresach Ryc. 26.

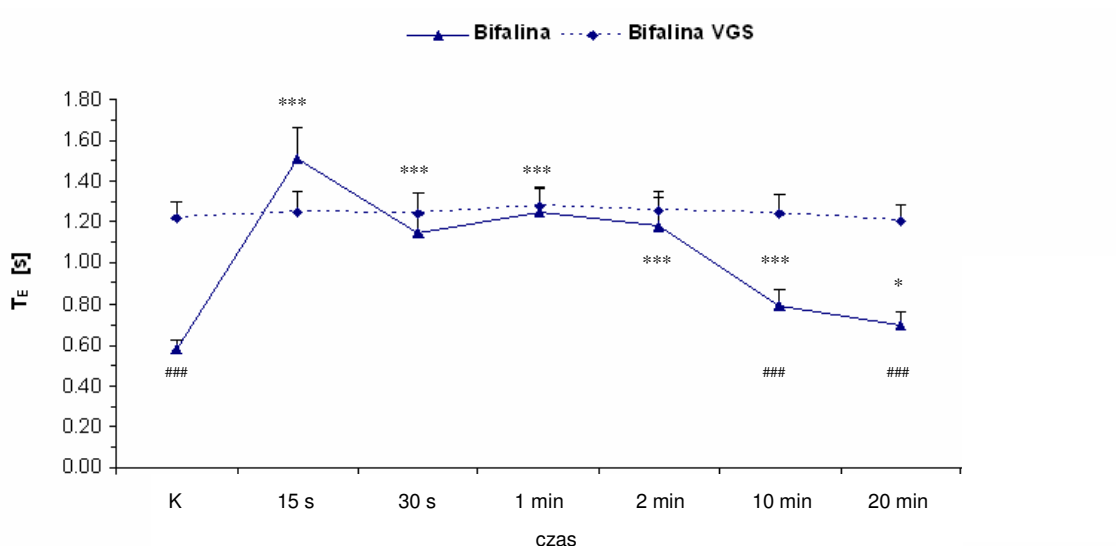


Rys. 26 Zmiany parametrów oddechowych wywołane iniekcją bifaliny w grupach szczurów z zachowaną (\blacktriangle ; ciągła linia) i przeciętą pętlą wagalną (\blacklozenge ; przerywana linia): V_T (objętość oddechowa), f (częstość oddychania), V_E (wentylacja minutowa)

ANOVA, test Tukey'a; *, # – $p < 0,05$; ***, ### – $p < 0,001$; * – znamienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych bifaliną przed wagotomią szyjną, # – różnice pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ bifaliny ($p < 0,05$) i wagotomii ($p < 0,001$) oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$) na V_T ; wpływ stanu unerwienia ($p < 0,01$), peptydu ($p < 0,001$) oraz interakcję między nimi ($p < 0,001$) na f ; brak wpływu stanu unerwienia ($p = 0,91$), wpływ bifaliny ($p < 0,001$) na V_E oraz brak interakcji między tymi czynnikami ($p = 0,07$).

Dożylna iniekcja 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ bifaliny u szczurów z zachowaną ciągłością nerwów błędnych we wznowionym po bezdechu oddychaniu indukowała wzrost objętości oddechowej z $1,62 \pm 0,09$ ml do $2,67 \pm 0,27$ ml ($p < 0,001$), istotnie różny od wartości początkowej i trwający przez 2 min obserwacji. Po upływie 10 min V_T powracała do wartości kontrolnej (Ryc. 26).

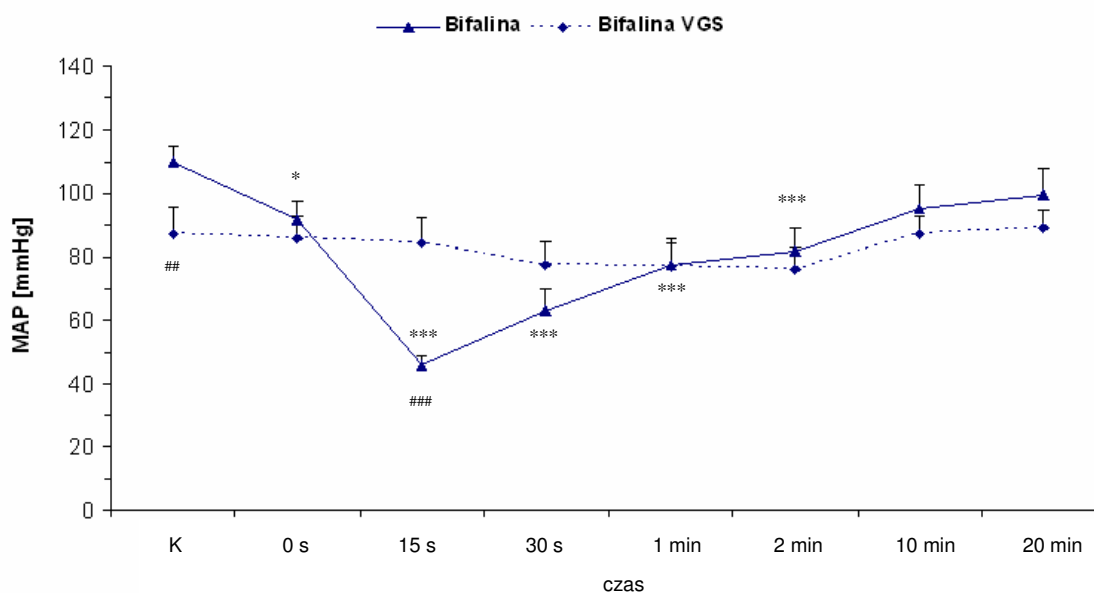


Ryc. 27 Czas trwania wydechu po podaniu bifaliny przed i po wagotomii szyjnej (oznaczenia jak na Ryc. 26) ANOVA, test Tukey'a; * – $p < 0,05$; ***, ### – $p < 0,001$; * - znamiennosc statystyczna wzgledem wartosci kontrolnej u zwierzat traktowanych bifalinala przed wagotomia, # – różnice pomiędzy grupami. Dwuczynnikowa ANOVA ujawnila brak efektu stanu unerwienia ($p=0,1$), efekt bifaliny ($p < 0,001$) na T_E oraz interakcje ww. czynnikow ($p < 0,001$).

Stymulacja objętości oddechowej była równoległa ze zwolnieniem rytmu oddechowego, którego maksymalny spadek do 38 ± 3 l/min ($p < 0,001$) w 15 s po iniekcji utrzymywał się przez cały czas obserwacji na obniżonym poziomie, znamiennie różnym od wartości początkowej (74 ± 4 l/min) (Ryc. 30). Zwolnienie oddychania zachodziło kosztem wydłużenia czasu wydechu, zilustrowanym na Ryc. 27.

Bifalina wprowadzała przejściowe, krótkotrwałe obniżenie wartości wentylacji minutowej tuż po bezdechu z początkowych 120 ± 11 ml/min do 97 ± 7 ml/min ($p < 0,001$).

Otwarcie pętli wagalnej znosiło obserwowane po bifalinie: bezdech, wzrost objętości oddechowej, zwolnienie rytmu oddechowego, jak również zapobiegało pojawieniu się zmian wentylacji minutowej (Ryc. 26).

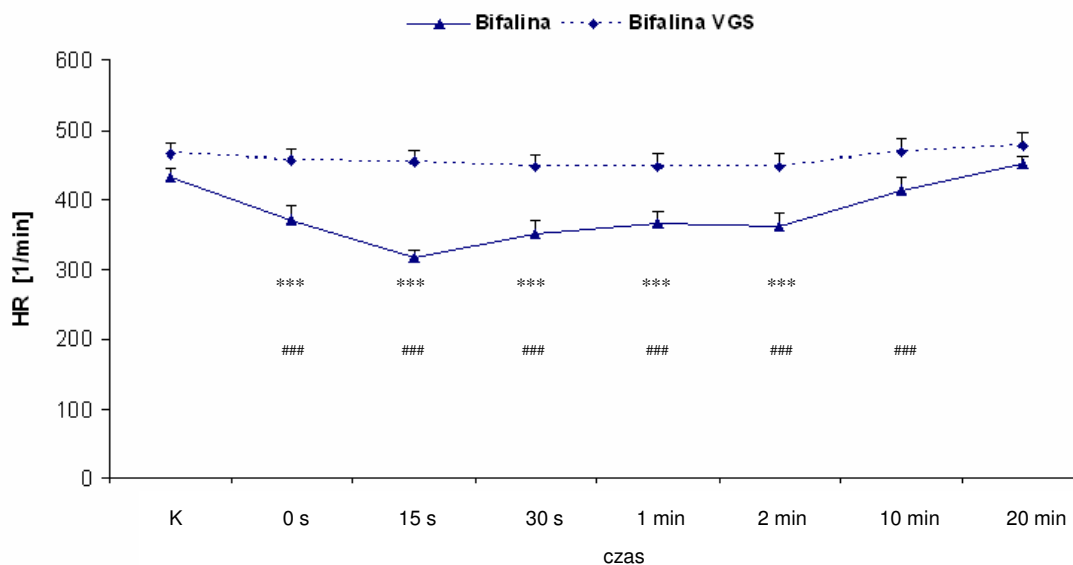


Ryc. 28 Zmiany średniego ciśnienia krwi po dożylnym podaniu bifaliny zwierzętom przed oraz po wagotomii szyjnej. (oznaczenia jak na Ryc. 26)
ANOVA, test Tukey'a; * – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; * – znamienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych bifaliną przed wagotomią szyjną, # – różnice pomiędzy grupami; Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła brak efektu związanego ze stanem unerwienia ($p = 0,99$), wpływ działania bifaliny ($p < 0,001$) na MAP oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$).

Bifalina wywoływała znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt z zachowanym unerwieniem wagalnym (Ryc. 28). Reakcja ta rozpoczynała się bezpośrednio po iniekcji peptydu osiągając w 15 s najniższą wartość 46 ± 3 mmHg ($p < 0,001$), by powrócić do kontroli (110 ± 5 mmHg) po 10 min.

Wagotomia szyjna zapobiegała pojawieniu się opisanego powyżej efektu hipotensyjnego (Ryc. 28).

W grupie zwierząt z nienaruszonymi nerwami błędnymi bifalina indukowała rozpoczynające się bezpośrednio po iniekcji znamienne zwolnienie rytmu serca, którego najniższe wartości zanotowano 15 s po podaniu. Częstota skurczów wynosiła wówczas 317 ± 12 1/min ($p < 0,001$) w porównaniu do początkowych 432 ± 12 1/min, pozostając na obniżonym poziomie przez 2 min. Przecięcie nerwów błędnych na szyi zapobiegało tym efektom bifaliny (Ryc. 29).



Ryc. 29 Zmiany rytmu serca po dożylnym podaniu bifaliny zwierzętom przed oraz po wagotomii szyjnej (oznaczenia jak na Ryc. 26)

ANOVA, test Tukey'a; *, # – $p < 0,05$; **, ## – $p < 0,01$; ***, ### – $p < 0,001$; * – znamienność statystyczna względem wartości kontrolnej u zwierząt traktowanych bifaliną przed wagotomią szyjną, # – różnice pomiędzy grupami.

Dwuczynnikowa analiza wariancji ujawniła wpływ stanu unerwienia ($p < 0,01$), wpływ bifaliny ($p < 0,001$) na HR oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$)

IV.8 Rola receptorów opioidowych μ i δ w efektach krążeniowo-oddechowych wywoływanych przez bifalinę

W prezentowanych poniżej badaniach określano rolę obu rodzajów receptorów opioidowych w efektach oddechowo-krążeniowych po systemowym podaniu dienkefaliny. Do blokady użyto chlorowodoru naltrindolu — wysoce selektywnego, niepeptydowego antagonisty receptorów opioidowych δ oraz chlorowodoru naloksonu – nieselektywnego, niepeptydowego antagonisty receptorów opioidowych μ , δ i κ . Bifalinę, chlorowodorek naltrindolu oraz chlorowodorek naloksonu rozpuszczano w 0,9% NaCl i wstrzykiwano dożylnie w objętości 1,0 ml/kg.

Doświadczenia przeprowadzono w dwóch grupach zwierząt: 1) 18 osobnikom na 5 min przed wstrzyknięciem badanego peptydu podawano chlorowodorek naltrindolu w dawkach 2,0 oraz 4,0 mg/kg, 2) 11 osobnikom na 2 min przed iniekcją bifaliny podawano chlorowodorek naloksonu w dawkach 0,2, 0,4 i 1,0 mg/kg. Wyniki uzyskane w obu seriach doświadczalnych porównano z opisaną w rozdziale IV.7 grupą kontrolną zwierząt z zachowaną ciągłością nerwów błędnych, traktowanych bifaliną.

Dawki blokerów wybrano na podstawie prac Czaplí i wsp., 2000 oraz Su i wsp., 1998 oraz wstępnych doświadczeń, których wyniki zebrano w Tabelach 8 i 9. W wyborze dawek antagonistów kierowano się zdolnością znoszenia opisanych w poprzednim rozdziale bezdechu oraz największych zmian pozostałych mierzonych parametrów. Brano więc pod uwagę okres bezdechu bezpośrednio po iniekcji peptydu oraz czas największych zmian pozostałych parametrów, tj. 15 s po iniekcji dla objętości oddechowej, częstości oddychania, rytmu serca, oraz średniego ciśnienia tętniczego krwi. Dla porównania w poniższych tabelach umieszczono dodatkowo dane grupy kontrolnej (bifalina).

Tabela 8. Długość bezdechu indukowanego bifaliną przed oraz po blokadzie receptorów opioidowych przez nalokson oraz naltrindol

| | Dawka | K [s] | Bezdech [s] |
|-----------------------|-----------|-------------|--------------------|
| Bifalina [μmol/kg] | 0,3 (n=8) | 0,58 ± 0,04 | 13,5 ± 1,25*** |
| Nalokson [mg/kg] | 0,2 (n=1) | 0,58 | 0,5## |
| | 0,4 (n=2) | 0,67 ± 0,07 | 0,83 ± 0,21### |
| | 1,0 (n=8) | 0,53 ± 0,05 | 0,54 ± 0,06### |
| naltrindol [mg/kg] | 2,0 (n=9) | 0,55 ± 0,04 | 4,40 ± 1,10*, ### |
| | 4,0 (n=9) | 0,42 ± 0,02 | 0,42 ± 0,02###, ++ |

K – początkowy czas trwania wydechu;

ANOVA, post-hoc: test Spjotvolla-Stoline'a i test Tukey'a odpowiednio w grupie zwierząt traktowanych naloksonem i naltrindolem;

* – p<0,05; ##, ++ – p<0,01; ***, ### – p<0,001; * – względem odpowiedniej wartości początkowej,

– względem grupy kontrolnej (Bifalina), + – między dawkami naltrindolu.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła efekt blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,001), jej wpływ na działanie bifaliny (p<0,01) oraz interakcję ww. czynników (p<0,001) na długość bezdechu.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała efekt naltrindolu (p<0,001), jego wpływ na działanie bifaliny (p<0,001) oraz interakcję ww. parametrów (p<0,001) na bezdech.

Dane zebrane w Tabeli 8, wskazują, iż bezdech indukowany przez bifalinę trwający średnio 13,5 ± 1,25 s znoszony był przez wszystkie użyte dawki naloksonu, natomiast największą skuteczność w redukcji wywołanych przez bifalinę zmian V_T, HR oraz MAP wykazała dawka 1,0 mg/kg (Tabela 9).

Tabela 9. Wpływ dawek naloksonu i naltrindolu na wywołane bifaliną maksymalne zmiany V_T, f, HR i MAP.

| | Dawka | K % | V _t % | F % | HR % | MAP % |
|-----------------------|-----------|--------|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| Bifalina [μmol/kg] | 0,3 (n=8) | 100 | 165 ± 15*** | 52 ± 4*** | 73 ± 2*** | 42 ± 3*** |
| Nalokson [mg/kg] | 0,2 (n=1) | 100 | 126 | 57* | 100### | 79*, ### |
| | 0,4 (n=2) | 100 | 105 ± 9 | 87 ± 17## | 102 ± 2### | 101 ± 1###, x |
| | 1,0 (n=8) | 100 | 99 ± 1### | 101 ± 1###, xx | 99 ± 1### | 103 ± 1###, x |
| Naltrindol [mg/kg] | 2,0 (n=9) | 100 | 128 ± 9*, ### | 55 ± 5*** | 86 ± 2***, ### | 76 ± 4***, ### |
| | 4,0 (n=9) | 100 | 94 ± 2###, + | 98 ± 4###, +++ | 92 ± 2**, ### | 70 ± 4***, ### |

K – wartość wyjściowa mierzonych parametrów wyrażona w procentach;

ANOVA, post-hoc: test Spjotvolla-Stoline'a i test Tukey'a odpowiednio w grupie zwierząt traktowanych naloksonem i naltrindolem;

*, +, x – p<0,05; **, ##, +, xx – p<0,01; ***, ### – p<0,001; * – względem odpowiedniej wartości początkowej, #-względem grupy kontrolnej (Bifalina), + – między dawkami naltrindolu, x – między dawkami 0,4 mg/kg i 1,0 mg/kg a 0,2 mg/kg naloksonu.

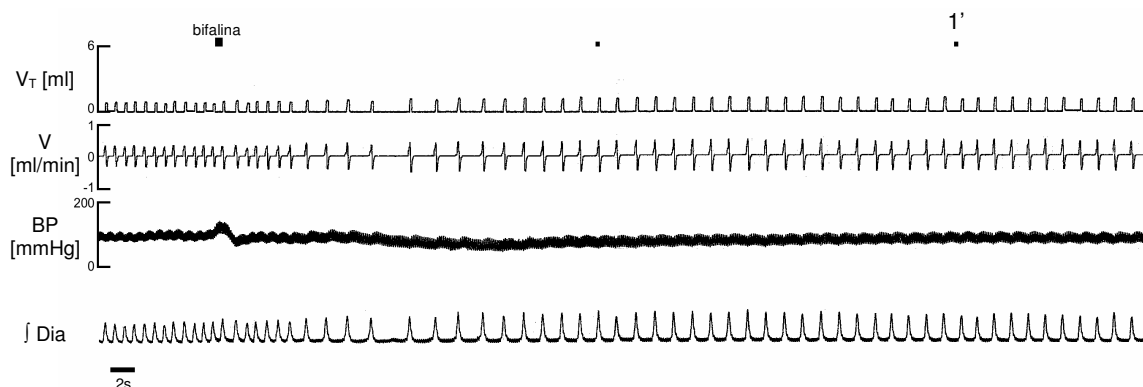
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła efekt blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,01), jej wpływ na działanie bifaliny (p<0,05) oraz interakcję ww. czynników (p<0,01) na V_T; efekt naloksonu (p<0,001) jego wpływ na aktywność bifaliny (p<0,001) oraz interakcję między tymi czynnikami (p<0,001) na f; efekt naloksonu (p<0,001) jego wpływ na działanie bifaliny (p<0,001) oraz interakcję czynników (p<0,001) na HR; efekt blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,001), jej wpływ na działanie bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,001) na MAP.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała również efekt działania naltrindolu (NLT) (p<0,001), jego wpływ na działanie bifaliny (p<0,001) oraz interakcję ww. parametrów (p<0,001) na V_T; ujawniła efekt NTL (p<0,001), jego wpływ na działanie bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,001) na f; efekt blokady receptorów δ (p<0,001), wpływ na działanie bifaliny

($p < 0,001$) oraz interakcję ww. czynników na HR; oraz efekt naltrindolu ($p < 0,001$) jego wpływ na działanie bifaliny ($p < 0,001$) i interakcję czynników ($p < 0,001$) na MAP.

Zaczerpnięta z pracy Su i wsp. (1998) najniższa dawka naltrindolu (4,0 mg/kg), wykazująca wpływ na maksymalny procentowy efekt przeciwbólowy (MPE) alfentanilu, w pełni znosiła indukowany przez bifalinę bezdech, wzrost V_T oraz zwolnienie oddychania, jak również w istotny sposób hamowała zwolnienie HR i spadek MAP (Tabela 8 i 9). Należy zauważyć, że istniała możliwość wysycania przez naltrindol receptorów opioidowych μ (Verborgh i Meert, 1999), pomimo że jego aktywność względem nich jest trzynastokrotnie słabsza niż wobec receptorów δ , a jego powinowactwo do nich jest pięcioipółkrotnie słabsze od powinowactwa naloksonu (Bonner i wsp., 2000). Stąd też prawdopodobne jest, iż omawiana poniżej, dwukrotnie mniejsza od stosowanej przez Su i wsp. (1998) dawka chlorowodorku naltrindolu blokowała receptory opioidowe δ przy jednoczesnym niewielkim wpływie na receptory μ .

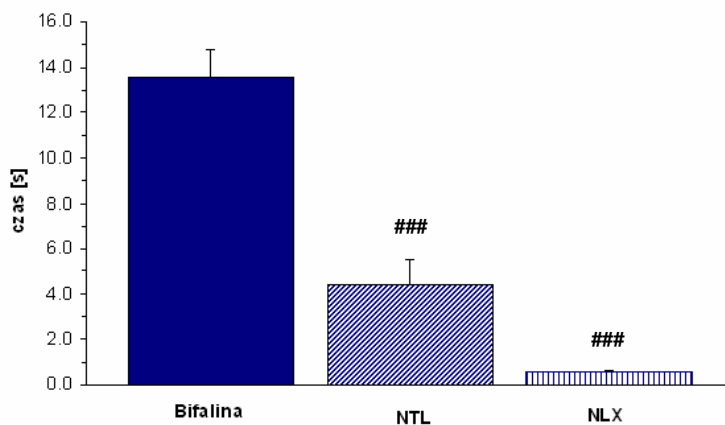
Kontrolna, dożylna iniekcja antagonisty receptorów opioidowych δ nie wpływała na wielkość parametrów oddechowych, jednakże we wczesnej fazie odpowiedzi, 30 s po podaniu, obserwowano wzrost średniego ciśnienia tętniczego krwi z 91 ± 5 mmHg do 99 ± 6 mmHg (ANOVA, Test t z poprawką Bonferroni'ego, $p < 0,05$; $n=9$).



Ryc. 30 Iniekcja bifaliny u szczura z blokadą receptorów opioidowych δ (naltrindol w dawce 4,2 $\mu\text{mol/kg}$). V_T – objętość oddechowa, V – przepływ powietrza przez drogi oddechowe, BP – ciśnienie tętnicze krwi, \int Dia – zintegrowany elektromiogram przepony

Ryc. 30 przedstawia efekt dożylnego podania 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ bifaliny na tle blokady receptorów opioidowych δ , która redukowałą zarówno depresję oddechową w postaci bezdechu jak i spadek ciśnienia krwi.

U 5 spośród 9 szczurów traktowanych naltrindolem występował bezdech o wyraźnie krótszym czasie trwania ($4,4 \pm 1,1$ s; $p < 0,001$) w porównaniu do bezdechu obserwowanego w grupie kontrolnej, utrzymującego się $13,5 \pm 1,25$ s (Ryc. 31).



Ryc. 31 Średni czas trwania bezdechu indukowanego dożylną iniekcją bifaliny przed (kolumna lita) oraz po uprzednim podaniu cholorowodorku naltrindolu (NTL, kolumna ukośnie prążkowana) i naloksonu (NLX, kolumna w pionowe prążki)

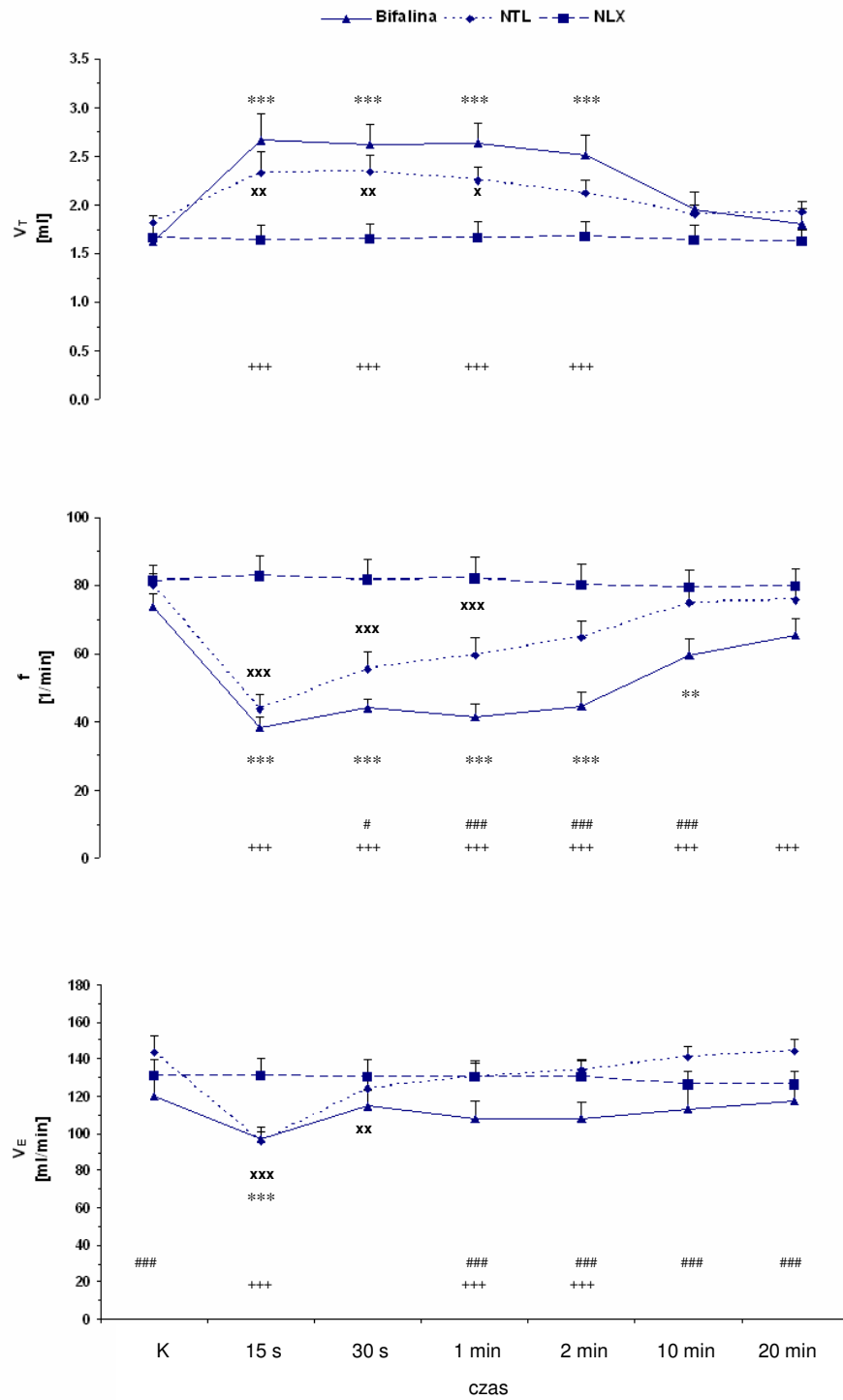
ANOVA, test Tukeya dla nierównych liczebności (Spjotvolla-Stoline'a), ### – $p < 0,001$ względem grupy z niezablokowanymi receptorami.

Jednoczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ blokady receptorów opioidowych ($p < 0,001$).

Podobnie jak w grupie kontrolnej, w warunkach blokady receptorów opioidowych δ dożylna iniekcja bifaliny wywoływała wzrost objętości oddechowej. Wartości tego parametru nie różniły się w sposób istotny pomiędzy opisywanymi grupami doświadczalnymi. W czasie blokady receptorów δ największy wzrost V_T zanotowano 15 s po iniekcji peptydu, osiągający $2,32 \pm 0,22$ ml w porównaniu do kontroli $1,81 \pm 0,09$ ml ($p < 0,01$) i powrót do wartości wyjściowych po 2 min (Ryc. 32).

Maksymalne zwolnienie oddychania wywołane bifaliną w grupie szczurów z zablokowanymi receptorami opioidowymi δ było porównywalne z efektem bifaliny w grupie kontrolnej (rytm oddechowy obniżał się w tych grupach doświadczalnych, odpowiednio: z 80 ± 3 1/min do 44 ± 4 1/min ($p < 0,001$) oraz z 74 ± 4 1/min do 38 ± 3 1/min ($p < 0,001$)). Blokada naltrindolem skutkowała znacznie szybszym powrotem tego parametru do wartości początkowych, a istotna różnica pomiędzy grupami była widoczna już po 30 s od iniekcji i utrzymywała się do 10 min obserwacji.

Bezpośrednio po bezdechu wywołanym podaniem bifaliny w obydwu ww. grupach doświadczalnych obserwowano krótkotrwałą, o podobnym nasileniu depresję wentylacji minutowej.



Ryc. 32 Zmiany objętości oddechowej (V_T), częstości oddychania (f) oraz wentylacji minutowej (V_E) wywoływane przez dożylną iniekcję bifaliny u zwierząt kontrolnych (bifalina, \blacktriangle ; linia ciągła) oraz po poprzedniej iniekcji naltrindolu (NTL, \blacklozenge ; linia kropkowa) i naloksonu (NLX, \blacksquare ; linia przerywana) ANOVA, t-Tukey test; x, # – $p < 0,05$; **, xx – $p < 0,01$; ***, xxx, ###, +++ – $p < 0,001$; * oraz x znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości początkowej u zwierząt traktowanych bifaliną przed ($n=8$) oraz

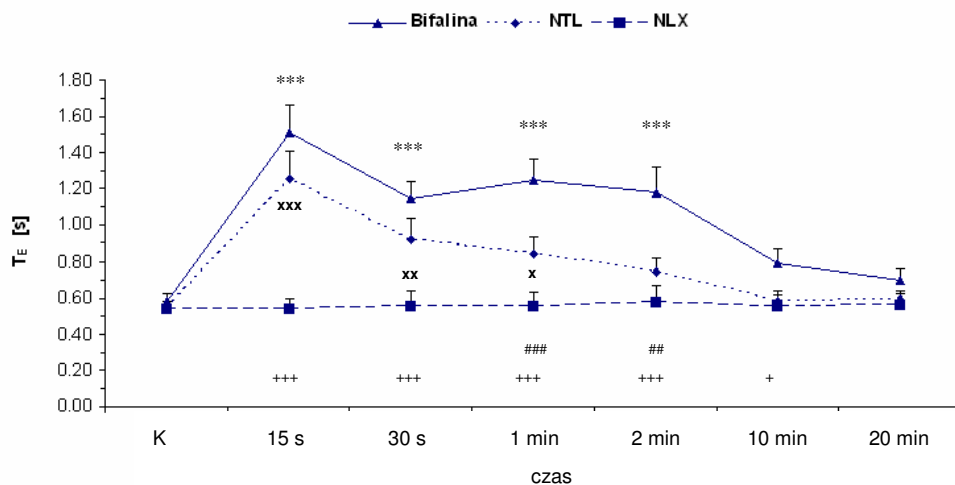
po blokadzie receptorów opioidowych cholorowodorkiem naltrindolu (n=9); #, + – różnice pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną odpowiednio naltrindolem lub naloksonem.

Dwuczynnikowa ANOVA nie ujawniła wpływu blokady receptorów δ (p=0,46), wykazała efekt działania bifaliny (p<0,001) oraz interakcję ww. czynników na V_T ; wpływ blokady receptorów δ (p<0,05), efekt działania bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,01) na f; ujawniła: brak wpływu blokady (p=0,08), efekt działania bifaliny (p<0,001) oraz interakcję między tymi czynnikami (p<0,001) na V_E .

Dwuczynnikowa ANOVA pokazała wpływ blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,02), wpływ bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,001) na V_T ; wykazała wpływ blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,001), wpływ bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,001) na f; ukazała brak efektu blokady receptorów opioidowych naloksonem (p=0,17), wpływ bifaliny (p<0,05) oraz interakcję tych czynników (p<0,01) na V_E .

Dożylna iniekcja naloksonu zapobiegała pojawieniu się zmian parametrów oddechowych wywoływanych przez bifalinę, co obrazują Ryc. 31, 32 i 33.

Zmiany częstości oddychania zachodziły kosztem wydłużenia czasu wydechu, co obrazuje Ryc. 33. Zarówno w kontrolnej grupie zwierząt, jak też u traktowanych wstępnie naltrindolem maksymalną zmianę czasu wydechu obserwowano 15 s po iniekcji bifaliny, co było równoległe ze zwolnieniem oddychania, i czasem jego trwania.



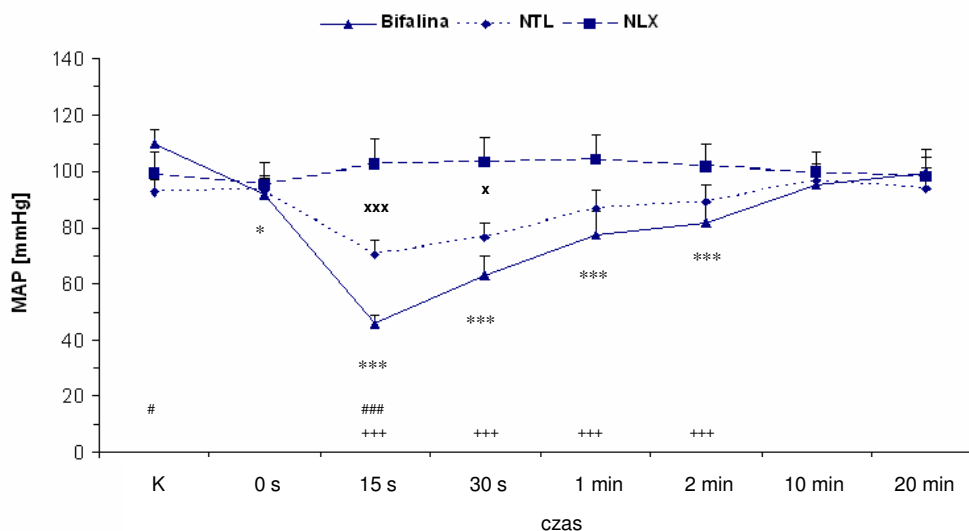
Ryc. 33 Czas trwania wydechu po dożylniej iniekcji bifaliny u zwierząt kontrolnych (oznaczenia jak na Ryc. 32) ANOVA, t-Tukey test; x, + – p<0,05; xx, ## – p<0,01; ***, xxx, ###, +++ – p<0,001; * oraz x znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości początkowej u zwierząt traktowanych bifaliną przed (n=8) oraz po blokadzie receptorów opioidowych cholorowodorkiem naltrindolu (n=9); #, + – różnice pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną odpowiednio naltrindolem lub naloksonem.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ blokady receptorów δ (p<0,05), wpływ bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,05) na T_E .

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ blokady receptorów opioidowych naloksonem (p<0,001), efekt bifaliny (p<0,001) oraz interakcję tych czynników (p<0,001) na T_E .

Bifalina wywołała spadek średniej wartości ciśnienia tętniczego krwi zarówno w grupie kontrolnej jak i w warunkach blokady receptorów opioidowych δ . Blokada istotnie zmniejszyła maksymalny efekt hipotensyjny (obniżenie MAP z początkowych 93 ± 4 mmHg do 70 ± 5 mmHg (p<0,001)), a wartość ta w sposób znamienny różniła się od najniższego

poziomu MAP obserwowanego w grupie kontrolnej (46 ± 3 mmHg; $p < 0,001$). Podobnie wyłączenie receptorów δ redukowało okres trwania hipotensji (Ryc. 34).



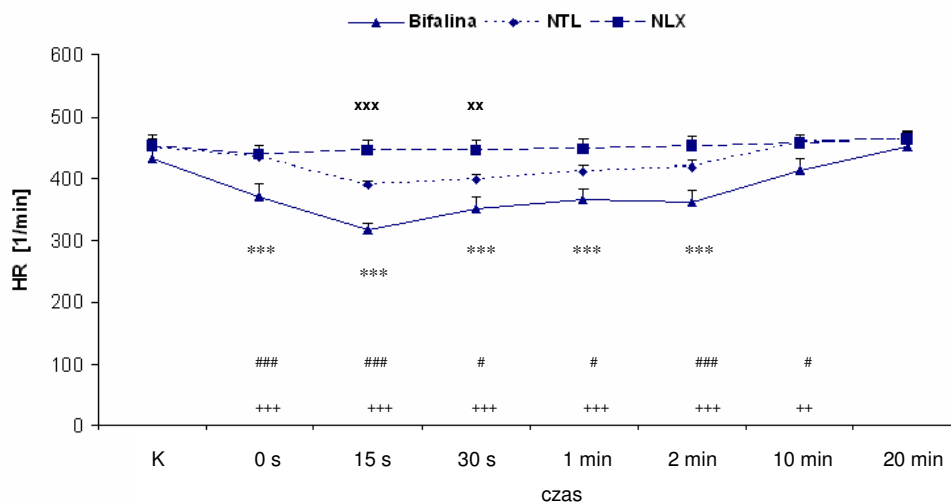
Ryc. 34 Wartości średniego ciśnienia tętniczego krwi po iniekcji bifaliny u zwierząt kontrolnych (oznaczenia jak na Ryc. 32)

ANOVA, t-Tukey test; *, x, # – $p < 0,05$; ***, xxx, ###, +++ – $p < 0,001$; * oraz x znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości początkowej u zwierząt traktowanych bifaliną przed ($n=8$) oraz po blokadzie receptorów opioidowych cholorowodorkiem naltrindolu ($n=9$); #, + – różnice pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną, odpowiednio naltrindolem lub naloksonem.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała brak efektu blokady receptorów δ ($p=0,58$), efekt działania bifaliny ($p < 0,001$) oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$) na MAP.

Dwuczynnikowa ANOVA wykryła brak efektu blokady receptorów opioidowych naloksonem ($p=0,1$), efekt działania bifaliny ($p < 0,001$) oraz interakcję tych czynników ($p < 0,001$) na MAP.

Zwolnienie rytmu serca wywołane bifaliną obserwowano w obydwu grupach doświadczalnych (Ryc. 35). W grupie zwierząt, które wstępnie traktowano naltrindolem, wykazywało ono znacznie łagodniejszy przebieg. Maksymalną zmianę obserwowano 15 s po podaniu peptydu. W grupie kontrolnej rytm serca obniżał się z $432 \pm 1/\text{min}$ do $317 \pm 1/\text{min}$ ($p < 0,001$). Zmiana ta wykazywała istotność przez 2 min od iniekcji bifaliny, natomiast po blokadzie receptorów δ HR zmniejszał się z $451 \pm 1/\text{min}$ do $388 \pm 1/\text{min}$ ($p < 0,001$) i po minucie od iniekcji jego wartości nie różniły się w istotny sposób od poziomu wyjściowego.



Ryc. 35 Średnie wartości częstości skurczów serca po iniekcji bifaliny u zwierząt kontrolnych (oznaczenia jak na Ryc. 32)

ANOVA, t-Tukey test; # – $p < 0,05$; xx, ++ – $p < 0,01$; ***, xxx, ###, +++ – $p < 0,001$; * oraz x znamienność statystyczna względem odpowiedniej wartości początkowej u zwierząt traktowanych bifaliną przed ($n=8$) oraz po blokadzie receptorów opioidowych cholorowodorkiem naltrindolu ($n=9$); #, + – różnice pomiędzy grupą kontrolną a traktowaną, odpowiednio naloksonem lub naloksonem.

Dwuczynnikowa ANOVA wykryła wpływ blokady receptorów δ ($p < 0,05$), wpływ bifaliny ($p < 0,001$) oraz interakcję tych czynników ($p < 0,005$) na HR.

Dwuczynnikowa ANOVA wykryła wpływ blokady receptorów opioidowych naloksonem ($p < 0,01$), wpływ bifaliny ($p < 0,001$) oraz interakcję tych czynników na ($p < 0,001$) HR.

Iniekcja naloksonu w dawce 1,0 mg/kg na 2 min przed podaniem bifaliny zapobiegała wywoływany przez nią zmianom średniego ciśnienia tętniczego krwi oraz rytmu serca (Ryc. 34, 35).

V DYSKUSJA

Niebezpieczeństwo depresji oddechowej, jakie niesie ze sobą stosowanie opioidów w terapii przeciwbólowej skłania do poszukiwań środków analgetycznych o ograniczonych szkodliwych skutkach oddechowych i naczyniowo-sercowych. Efekty oddechowo-krażeniowe wywołane u znieczulonych szczurów przez wybrane analogi neuropeptydowe o działaniu przeciwbólowym są przedmiotem badań przeprowadzonych w niniejszej rozprawie. Dotyczą w głównej mierze dwóch chimer: (i) AWL3106, złożonej z farmakoforu opioidowego (dermorfiny) i tachykininowego (fragmentu substancji P) oraz (ii) bifaliny stanowiącej dimeryczny analog enkefaliny. Jak zaznaczono we wstępie, dermorfina jest opioidem egzogennym, natomiast bifalina jest pochodną enkefaliny — endogennego peptydu syntetyzowanego i obecnego w mózgu, układzie trawiennym oraz nadnerczach, który pełni ważną rolę w endogennych właściwościach przeciwbólowych.

Badania prowadzone od szeregu lat na modelu zwierzęcym bólu ostrego wykazały wysoki potencjał przeciwbólowy obydwu analogów hybrydowych, zarówno przy podaniu ośrodkowym jak i obwodowym. Bifalina i AWL3106 przechodzą barierę krew/mózg (Lipkowski i wsp., 2002; 2004). Transport obu farmakoforów tworzących AWL3106 tj. dermorfiny i fragmentu substancji P poparty jest wynikami odrębnych badań (Freed i wsp., 2002; Chappa i wsp., 2006; Van Dorpe i wsp., 2010).

Podjęto zatem próbę oceny wpływu powyżej wymienionych chimer na zmiany wzorca oddechowego i układu krążenia pojawiających się po podaniu systemowym, w modelu doświadczalnym szczura w narkozie.

V.1 AWL3106

V.1.1 Zmiany oddechowe

Na wzorzec odpowiedzi oddechowej po iniekcji AWL3106 w zastosowanej dawce składał się bezdech wydechowy, zwiększenie objętości oddechowej oraz zwolnienie oddychania zachodzące poprzez wydłużenie fazy wydechu. Depresja oddychania była stosunkowo krótkotrwała, zamykająca się w okresie dziesięciu minut, nie powodująca obniżenia wentylacji minutowej.

Pojawiający się bezdech jest odruchowym zahamowaniem napędu wentylacyjnego, z zatrzymaniem oddychania w pozycji wydechowej i stanowi formę niestabilności wzorca oddechowego. Z przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wynika, że za bezdech wywołany iniekcją AWL3106 odpowiedzialny jest farmakofor dermorfinowy (rozdz. IV.4), bowiem fragment substancji P, będący drugą domeną chimery, nie inicjował bezdechu (rozdz. IV.5). Ten efekt dermorfiny jest zgodny z wynikami wcześniejszych prac opisujących bezdech u czuwających szczurów po podaniu do komór mózgu i dożylnym w warunkach narkozy (Portolano i wsp., 1991; Eager i wsp., 1994). Według ostatnich danych jest on stałym elementem odpowiedzi indukowanej przez systemową iniekcję dermorfiny u szczurów będących w narkozie (Wojciechowski i wsp., 2007). Bezdech wpisuje się w klasyczny wzorzec depresji oddechowej wywołanej dożylnie podaną morfiną (Willette i Sapru, 1982c; Willette i wsp., 1983; Sahibzada i wsp., 2000; Kaczyńska i Szereda-Przestaszewska, 2005). Na podkreślenie zasługuje fakt, że blokada receptorów opioidowych przy użyciu chlorowodoru naloksonu zapobiegała pojawieniu się bezdechu indukowanego przez AWL3106. Badanie skuteczności blokad efektów dermorfiny w stosowanej dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ przy użyciu ww. antagonisty wykazały, że już jego najniższa dawka (0,5 mg/kg) zapobiegała wystąpieniu bezdechu, a 2,0 mg/kg były skuteczne w całkowitym zniesieniu odpowiedzi oddechowo-krażeniowej (Tab. 2, 3). Chlorowodorek naloksonu jest powszechnie

stosowany jako remedium w wyprowadzaniu z depresyjnych efektów przedawkowania opioidów u ludzi. W doświadczeniach na zwierzętach opisano jego skuteczność w odwracaniu pomorfinowego bezdechu u decerebrowanych, czuwających, a także będących w narkozie szczurów (Willette i Sapru, 1982c; Willette i wsp., 1983; Kaczyńska i Szereda-Przestaszewska, 2005). Odnosi się to też do efektów dermorfiny podanej dokomorowo i podskórnice u nieuśpionych szczurów (Portolano i wsp., 1991; Negri i wsp., 1998), a także enkefalin aplikowanych do krążenia płucnego (Sapru i wsp., 1981b, Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982b).

Warunkiem pojawienia się bezdechu w doświadczeniach tej pracy, jak i przytoczonych doniesień było zachowanie aferentacji wagalnej z płuc. Pozostaje problemem nierozwiązanym, czy odruchowa supresja oddychania jest bezdechem inflacyjnym odruchu Heringa-Breuera, wywołanego stałym pobudzeniem mechanoreceptorów płucnych przez podany do krążenia płucnego opioid (dermorfin), czy pojawiający się bezdech jest pierwszym z triady objawów chemoodruchu płucnego, wywołanego stymulacją oskrzelowo-płucnych włókien C. Wydaje się, że odpowiedź wzorca oddechowego obserwowana w naszych doświadczeniach po AWL3106 tj. zwiększenie objętości i zwolnienie rytmu oddechowego, w odróżnieniu od płytkiego, szybkiego oddychania w chemoodruchu przemawiają raczej za aktywacją mechanoreceptorów płucnych. Znajduje to potwierdzenie w wynikach badań zarówno neuronów oddechowych jak i efektorów obwodowych wskazujących, że opioidy wzmagają zwolnienie oddychania w odruchu Heringa-Breuera (Delpierre i wsp., 1995; Lalley, 2006).

W przeciwieństwie do efektów obwodowego podania innych opioidów, wywołana przez AWL3106 stymulacja objętości oddechowej jawi się jako zjawisko korzystne, ponieważ przy jednoczesnym zwolnieniu rytmu oddechowego nie doprowadza do zmniejszenia wentylacji minutowej. Za zwiększenie objętości oddechowej może być odpowiedzialny farmakofor dermorfinowy, bowiem wszystkie dawki dermorfiny użyte w doświadczeniach

niniejszej pracy wywołują wzrost objętości oddechowej, co ilustruje Tabela 5. Omawiane we wstępie reakcje oddechowe na iniekcję dermorfiny do komór mózgu u czuwających szczurów opisywały pobudzenie obu składowych wzorca oddechowego: objętości i częstości oddychania (Paakari i wsp., 1990, 1993; Melchiorri i Negri, 1996; Negri i wsp., 1998, 2000). Nieliczne prace dotyczące obwodowego podania dermorfiny dokumentowały zarówno zwiększenie objętości oddechowej (Negri i wsp., 1998), jak i jej depresję (Eager i wsp., 1994). Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań na szczurach potwierdzają przyrost objętości oddechowej po dożylnym podaniu dermorfiny (Wojciechowski i wsp., 2007).

Testowane w doświadczeniach tej pracy odpowiedzi oddechowe, będące efektem iniekcji AWL3106 tj. wyżka objętości oddechowej i zwolnienie rytmu oddechowego w fazie wznowionej po bezdechu wentylacji, nie poddawały się blokadzie chlorowodorkiem naloksonu. Odpowiedzi obu komponent wzorca oddechowego były przesunięte w czasie a odpowiedź częstotliwościowa uległa zredukowaniu. Podobnie niepełną efektywność naloksonu wykazano przy blokowaniu zwiększonej objętości oddechowej wywołanej przez hybrydę opioidowo-neurotensynową (Kaczyńska i wsp., 2014), jak i przy odwracaniu antynocyceptywnych skutków chimery AWL60, której farmakofor opioidowy był pochodną endorfiny a tachykininowy-antagonistą substancji P (Lipkowski i wsp., 2006). Również depresji częstości i zwiększenia objętości oddechowej po dokomorowym podaniu dermorfiny nie blokowała naloksonazina – antagonistą receptorów μ_1 (Coleman i Miller, 2001).

Rozważając po części skuteczną blokadę, należy wziąć pod uwagę drugą domenę AWL3106 – fragment substancji P₇₋₁₁. Jej efekty oddechowe, badane w tej pracy po raz pierwszy, to początkowe obniżenie objętości oddechowej z następowym krótkotrwałym jej zwiększeniem oraz zwolnienie oddychania. Nie ma danych doświadczalnych dotyczących tego fragmentu substancji P. Jednakże jego wysokie powinowactwo do receptora NK₁ (Lipkowski i wsp., 2006) oraz obserwowane przez nas skutki hipotensyjne skłaniać mogą do rozpatrywania go jak pełnoskładowej substancji P. Udział tej ostatniej w kształtowaniu

wzorca oddechowego nie jest w pełni określony. Przytoczone we wstępie dane jednoznacznie wskazują na ośrodkowy, pobudzający wpływ na objętość oddechową (Hedner i wsp., 1981; Hedner i wsp., 1984; Chen i wsp., 1990). Efekty oddechowe pobudzenia receptorów płucnych przez egzogenną substancję P dokumentują aktywację obu składowych cyklu oddechowego mierzonych u królika (Prabhakar i wsp., 1987). Nie został opisany wpływ substancji P na wzorzec oddechowy, wynikający z jej zawartości i stymulującego wpływu na wyładowania z chemoreceptorów kłębków szyjnych. Rejestracji aktywności dokonywano bowiem u zwierząt porażonych i sztucznie wentylowanych. Spośród zwierząt doświadczalnych nie ustalono obecności mRNA receptorów NK₁ w tej strukturze u szczura, aczkolwiek jest ono obecne w zwoju skalistym (Gauda i wsp., 1996, Gauda i wsp., 1998). W nawiązaniu do przytoczonych danych, poprzedzone spadkiem zwiększenie objętości oddechowej wywołane w naszych doświadczeniach przez fragment substancji P może być znaczące w indukowanym przez AWL3106 wzroście objętości oddechowej. Do tego zagadnienia powrócimy w dalszej części dyskusji.

Wzorzec odpowiedzi oddechowej inicjowany przez AWL3106 w doświadczeniach tej pracy stanowi trudny problem, bowiem odstaje od opisanych dotychczas efektów wywoływanych przez morfinę, peptydy opioidowe i nieopiodowe. W oparciu o dotychczasową wiedzę wiadomo jest, że opioidy o powinowactwie do receptorów μ (w tym wypadku dermorfina) są modulatorami o działaniu pierwotnie hamującym częstość aktywności oddechowej, podczas gdy substancja P klasyfikowana jest jako modulator o pierwotnie pobudzającym działaniu w ośrodkowej sieci nerwowej (Doi i Ramirez, 2008). Pobudzenie przez AWL3106 receptorów opioidowych znajdujących się w zasięgu krążenia płucnego skutkowało zwolnieniem rytmu oddechowego, którego warunkiem była integralność nerwów błędnych. Badana przez nas dermorfina w dawce 0,3 $\mu\text{mol/kg}$, równoważnej do dawki farmakofora opioidowego w stosowanym peptydzie AWL3106, nie zmieniała częstości oddychania, natomiast iniekcja substancji P₇₋₁₁ wprowadzała niewielkie,

wagozależne jego zwolnienie. Jak podano we wstępie, włókna aferentne nerwu błędnego zawierają substancję P, natomiast nie ma danych co do obecności receptorów NK₁ (Helke i Seagard, 2004). Hamujący efekt opioidów na uwalnianie substancji P udokumentowano w ośrodkowym układzie nerwowym (Barnes, 1992) i można przypuszczać, że dotyczy on także włókien czuciowych nerwu błędnego w płucach. W naszych doświadczeniach jednoczesna iniekcja obu substancji pełniących rolę poszczególnych farmakoforów chimery AWL3106 prowokowała bezdech i hamowała rytm oddechowy. Należy podkreślić, że związek hybrydowy stanowi nową molekułę o odmiennych właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych w stosunku do farmakoforów wyjściowych (Lipkowski i wsp., 2004).

O ile zwolnieniu oddychania wprowadzonemu przez AWL3106 zapobiegała wagotomia szyjna, to zwiększenie objętości oddechowej utrzymywało się nadal, także po deaferentacji zwojów guzkowych. W warunkach zniesienia wagalnego sprzężenia objętościowego, komponenty wzorca oddechowego regulowane są aktywnością struktur mostowo-opuszkowych (Sant'Ambrogio i Sant'Ambrogio, 1997). Zatem w stymulacji objętości oddechowej indukowanej przez badaną chimerę pośredniczyć może pozawagalna droga dośrodkowa, albo odpowiedzialna za ten efekt jest aktywacja ośrodkowych receptorów obu domen AWL3106. Przy pierwszej ewentualności należałoby rozpatrywać aferentację z chemoreceptorów kłębków szyjnych, w której pośredniczy nerw zatokowy, zachowany w naszym układzie doświadczalnym. Spośród opioidów opisano chemodepresyjny wpływ egzogennych enkefalin u kota (Kirby i McQueen, 1986). Nie badano efektów dermorfiny w kształtowaniu napędu chemoreceptyjnego. Obserwowane przez nas zmiany oddechowe indukowane przez fragment substancji P: eliminowane przez wagotomię zwiększenie objętości oddechowej i zwolnienie oddychania odbiegają zdecydowanie od wzorca klasycznej odpowiedzi hiperwentylacyjnej, powstałej w wyniku pobudzenia chemoreceptorów kłębków szyjnych (Marshall, 1994). Nie podporządkowują się również reakcji hipowentylacyjnej z depresją obu składowych wzorca oddechowego, opisanej u szczurów z otwartą pętlą wagalną,

w odpowiedzi na endogenny neuropeptyd jakim jest somatostatyna (Kaczyńska i Szereda-Przestaszewska, 2010). Niemniej jednak w świetle wymienionych powyżej danych, niewykluczone jest, że stymulacja objętości oddechowej indukowana przez AWL3106 u wagotomizowanych szczurów może zachodzić za pośrednictwem aferencji z chemoreceptorów kłębków szyjnych.

Przytoczoną uprzednio sugestią aktywacji ośrodkowych receptorów opioidowych i specyficznych dla substancji P receptorów neurokininowych NK₁ w intensyfikacji objętości oddechowej może uzasadniać przenikanie bariery krew/mózg zarówno przez dermorfinę, jak i fragment substancji P₇₋₁₁, cytowane na początku dyskusji. Opierając się na wynikach zawartych w rozdziale IV.4 oraz opublikowanych danych (Wojciechowski i wsp., 2007) można wykluczyć zaangażowanie receptorów opioidowych μ , których ligandem jest dermorfina, ponieważ warunek zwiększenia objętości oddechowej stanowiła integralność nerwów błędnych zarówno w odcinku szyjnym, jak i na drodze nadguzkowej.

Unerwienie SP-ergiczne i ekspresja receptorów neurokininowych NK₁ w kompleksie pre-Bötzingera neuronów oddechowych opuszki zapewniają wymóg prawidłowej czynności oddechowej: generacji i stabilizacji rytmu oddechowego. Badania *in vitro* i *in vivo* tej struktury wykazały, będące wynikiem stymulacji receptorów NK₁, przyspieszenie rytmu oddechowego, a także udowodniły, że stanowi ona miejsce krytyczne w wywoływanej przez opioidy depresji rytmu oddechowego (Monteau i wsp., 1996; Gray i wsp., 1999, 2001; Fong i Potts, 2006; Montandon i wsp., 2011). Należy zaznaczyć, że w cytowanych badaniach neuropeptydy stosowane były lokalnie. Z tymi wynikami wiążą się sugestie o możliwości uwalniania endogennej substancji P w kompleksie pre-Bötzingera. Brak jest danych co do takiego efektu systemowo podanej egzogennej substancji P, a tym bardziej jej nie badanego fragmentu [7-11]. Natomiast wymienione wcześniej w dyskusji mikroiniekcje ośrodkowe substancji P, szczególnie zaś celowana do jądra spoidłowego NTS u szczura jednoznacznie wykazała stymulację objętości oddechowej i zwolnienie oddychania, w której pośredniczyły

obecne tam receptory NK_1 (Mazzone i Geraghty, 2000). W świetle tych danych, obserwowane w naszych doświadczeniach zwiększenie objętości oddechowej w warunkach otwarcia pętli wagalnej, po iniekcji chimery AWL3106, można by przypisać efektom ośrodkowym.

Analizowany na początku dyskusji bezdech indukowany iniekcją AWL3106 poddawał się blokadzie chlorowodorkiem naloksonu, która jedynie przesuwała w czasie reakcje wzorca oddechowego. Zastosowana przez nas jednoczesna blokada receptorów opioidowych (nalokson) i receptorów NK_1 (SR 140333) eliminowała w pełni odpowiedź oddechową na iniekcję AWL3106 (Ryc. 12). SR 140333 jest selektywnym, niepeptydowym antagonistą tych receptorów skutecznie zapobiegającym zarówno odpowiedziom wazodepresyjnym wywołanym przez substancję P, jak i reakcjom bólowym u szczurów (Bakhle i wsp., 1999; Luccarini i wsp., 2003; Fu i wsp., 2007). Zważywszy, że SR 140333 nie penetruje bariery krew/mózg (Rupniak i wsp., 2003), uprzednie rozważania mogą być nadal brane pod uwagę, jednakowoż blokada receptorów obwodowych okazała się wystarczająca dla zapobieżenia efektom oddechowym i krążeniowym AWL3106.

V.1.2 Zmiany sercowo-naczyniowe

Poddana badaniom w tej pracy chimera AWL3106, której efekty oddechowe rozpatrywano powyżej, nie była pozbawiona niepożądanych skutków krążeniowych w postaci spadku ciśnienia tętniczego krwi. Niedociśnienie jest swoistym elementem aktywności każdego ze składowych farmakoforów. Wymienione we wstępie podstawowe rodziny endogennych peptydów opioidowych wykazują depresyjny wpływ na rytm serca i ciśnienie tętnicze, będące skutkiem zahamowania napięcia układu sympatycznego i zwiększenia napięcia układu parasympatycznego (Holaday, 1983).

Indukowany systemową iniekcją dermorfiny — domeny opioidowej AWL3106 — spadek ciśnienia tętniczego krwi i częstości skurczów serca uwarunkowane były integralnością nerwów błędnych (Ryc. 16) i eliminowane przy użyciu blokady naloksonem (Tabela 3, 4). Wyniki nasze, dotyczące samego wzorca odpowiedzi sercowo-naczyniowej są zgodne z wcześniej badanymi efektami obwodowego podania tego peptydu u szczurów w narkozie (Portolano i wsp., 1991; Eager i wsp., 1994; Melchiorri i Negri, 1996). Opisany poprzednio po raz pierwszy udział sprzężenia wagalnego w modulacji tych zmian, po zastosowaniu dermorfiny w dawce 0,5 mg/kg (Wojciechowski i wsp., 2007), znalazł potwierdzenie w obecnych wynikach z użyciem dawki 0,3 μ mol/kg. Oba zastosowane poziomy wagotomii (szyjna i nadguzkowa) eliminowały wywoływane przez dermorfine zwolnienie czynności serca i spadek ciśnienia tętniczego krwi, wskazując, że jest to odruch wagalny, właściwy także dla zmian sercowo-naczyniowych indukowanych przez analogi enkefalinowe (Randich i wsp., 1993) i relacjonowany w przytaczanych wielokrotnie pracach Willette i Sapru.

Obserwowana przez nas u zwierząt wagotomizowanych po iniekcji dermorfiny początkowa, krótkotrwała zwyżka ciśnienia tętniczego i spadek w 20 min. rejestracji (Ryc. 16A) jest analogiczna do efektu presyjnego morfiny u szczurów poddanych wagotomii (Randich i wsp.; 1991) i mogła pojawiać się w wyniku pobudzenia układu sympatycznego.

Druga domena chimery, fragment substancji P₇₋₁₁ (AWL 2077) wpływała depresyjnie na rytm serca i ciśnienie tętnicze krwi. Zwolnienie czynności serca było pochodzenia wagalnego, bowiem znosiła je wago-tomia szyjna (Ryc. 18A). Wynikało to prawdopodobnie z pobudzenia receptorów sercowych, z których prowadzą włókna aferentne nerwu błędnego, zawierające substancję P (Otsuka i Yoshioka, 1993). Jak wykazano, pobudzenie receptorów lewej połowy serca u myszy wywoływało sercowy odruch wagalny w postaci bradykardii, osłabiany miejscową blokadą receptorów NK₁, jak i blokadę transmisji sercowych aferentów wagalnych w NTS (Paton, 1998). Opisane u szczurów mikroiniekcje substancji P do NTS obniżały rytm serca i wywoływały spadek ciśnienia tętniczego krwi. Bradykardia znoszona była przez wago-tomię, która nie zapobiegała jednak depresji naczyniowej, podobnie jak blokada receptorów NK₁ (Feldman, 1995). Spadek ciśnienia wywołany w naszych doświadczeniach przez AWL 2077 był niezależny od dróg wagalnych (Ryc. 18B).

Obniżenie ciśnienia tętniczego krwi wprowadzane przez analog hybrydowy AWL3106 osiągało podobny, nie różniący się istotnie stopień spadku, zarówno u zwierząt nieuszkodzonych, jak i wago-tomizowanych poniżej i powyżej zwojów guzkowych (Ryc. 6, Tabela 2). Eliminacja nerwów błędnych skutkowała opóźnieniem pojawiania się reakcji hipotensyjnej w odpowiedzi na iniekcję AWL3106 i skracała czas jej trwania. Zatem w obserwowanej odpowiedzi depresyjnej sprzężenie wagalne zdaje się pełnić jedynie rolę transmisyjną. Ponadto w reakcji na AWL3106 nie obserwowano, jak w przypadku dermorfiny, wagalnego zwolnienia czynności serca, ani skuteczności blokady receptorów opioidowych naloksonem w zapobieganiu spadkowi ciśnienia tętniczego krwi (Ryc. 11).

Pojawieniu się opisywanej hipotensji zapobiegało jednoczesne zastosowanie naloksonu i niepeptydowego antagonisty receptorów NK₁ SR 140333 (Ryc. 13). Skuteczność tego związku w blokowaniu efektów hipotensyjnych substancji P potwierdzają doświadczenia przeprowadzone na szczurach i świnkach morskich (Bakhle i wsp., 1999; Belluci i wsp., 2002; Fu i wsp., 2007).

Badana przez nas chimera AWL3106 wykazywała jednoznaczny wpływ na oddychanie o wyraźnej komponentcie odruchowej z udziałem aferencji wagalnej. Pozostaje jednak kwestią dalszych ustaleń w jakiej mierze jej właściwości wynikają z wzajemnych powiązań farmakoforów oraz czy fragment substancji P₇₋₁₁ należy rozpatrywać w kontekście efektów wywieranych przez ten peptyd.

Prezentowane wyniki sugerują, że indukowana przez ten analog hybrydowy hipotensja wynika z interakcji obydwu systemów receptorowych.

V.2 Bifalina

V.2.1 Zmiany oddechowe

Efektami dożylniej iniekcji bifaliny u uśpionych szczurów z nienaruszonym unerwieniem wagalnym, były: bezdech z następowym zwolnieniem rytmu oddechowego, skojarzonym ze zwiększoną objętością, krótkotrwałe obniżenie wentylacji minutowej oraz znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi i zwolnienie rytmu serca.

Powyższy wzorzec oddechowy występujący po bezdechu różnił się od odpowiedzi opisanej przez Kamei i Kasuya (1988), jedyne doniesienia traktującego o skutkach bifaliny wstrzykniętej szczurom dootrzewnowo. Obniżenie objętości oddechowej oraz zwolnienie oddychania nie były poprzedzane przez bezdech. Za tę różnicę w stosunku do naszych wyników najprawdopodobniej odpowiedzialna jest droga podania, wysoka dawka oraz czas rozpoczęcia obserwacji (15 min). Dożylnie zastosowane DAMGO (analog enkefaliny) inicjowało pojawienie się bezdechu u szczurów (Czapla i wsp., 2000). W warunkach decerebracji u tego gatunku iniekcja analogów enkefalinowych do prawego przedsionka prowokowała bezdech, który zapoczątkowywał odpowiedź o odmiennym, szybkim i płytkim oddychaniu (Sapru i wsp., 1981b; Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982b; Willette i wsp., 1983). To różne od obserwowanego w naszych doświadczeniach zachowanie się wzorca oddechowego wynikało z zastosowania decerebracji, eliminującej użycie narkozy. Uważa się, że znieczulenie ogólne zwierząt doświadczalnych odwraca pobudzające odpowiedzi opioidowe na depresyjne (Santiago i Edelman, 1985).

Obecność bezdechu wywołanego dożylną iniekcją bifaliny znajduje potwierdzenie w doniesieniach o takim efekcie obwodowego podania czuwającym i uśpionym szczurom innych agonistów receptorów opioidowych μ takich jak: morfina czy dermorfina (Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982c; Sahibzada i wsp., 2000; Kaczyńska i Szereda-Przestaszewska, 2005; Wojciechowski i wsp. 2007). Nie zaobserwowano jednak, aby

ośrodkowe mikroiniekcje ligandów enkefalinergicznych skutkowały pojawieniem się tego odruchu (Hassen i wsp., 1982; Pazos i Florez, 1983; Rabkin 1991a, b; Chen i wsp., 1996).

O ile zwolnienie rytmu oddechowego wywołane bifaliną jest zgodne z depresyjnym wpływem peptydów opioidowych na oddychanie, to obserwowany po bezdechu wzrost objętości oddechowej nie znajduje potwierdzenia w danych literaturowych dotyczących udziału ligandów enkefalinergicznych w zwiększaniu objętości oddechowej. Opisany został natomiast taki efekt działania dożylnie podanych agonistów receptorów opioidowych μ : dermorfiny i jej pochodnej – Lys⁷-dermorfiny (Negri i wsp., 1998; Wojciechowski i wsp., 2007).

Obserwowany przez nas wzrost objętości oddechowej może zachodzić na skutek pobudzenia, odpowiadających za wywołanie hiperwentylacji, szybkoadaptujących się receptorów płucnych (RAR) (Sant’Amborgio i Widdicombe, 2001). Jednakże obserwowany wzorzec oddechowy obejmuje tylko jeden z elementów hiperwentylacji – zwiększoną objętość oddechową, co może być efektem hamującego wpływu opioidów na aktywację zakończeń czuciowych nerwu błędnego w płucach. Na taką możliwość wskazuje także przejściowe obniżenie wentylacji minutowej, które było przede wszystkim skutkiem zwolnienia rytmu oddechowego.

Warunkiem pojawienia się efektów oddechowych bifaliny była integralność sprzężenia wagalnego z płuc. Pośredniczy ono w przekazie pobudzenia przez bifalinę receptorów opioidowych zlokalizowanych na zakończeniach nerwu błędnego w płucach. Jest to zgodne z uprzednio opublikowanymi danymi odnośnie komponenty odruchowej w odpowiedziach oddechowych wywołanych przez analogi enkefalinowe (Sapru i wsp., 1981b; Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982b; Willette i wsp., 1983).

Nalokson, będący antagonistą wszystkich trzech typów receptorów opioidowych skutecznie blokował efekty bifaliny (rozd. IV.8). Jak nadmieniono we wstępie, silne przeciwbólowe działanie bifaliny związane jest z jednoczesnym pobudzeniem receptorów

opiodowych μ i δ . Według Morin-Surun i współpracowników (1984), objętość oraz częstość oddychania kontrolowana jest przez, odpowiednio, receptory μ oraz δ .

Przeprowadzone przez nas badania nad udziałem obu typów receptorów w odpowiedzi wzorca oddechowego na bifalinę potwierdziły, że stymulacja objętości oddechowej zachodzi głównie przy udziale receptorów μ , bowiem jej przyrost nie zmieniał swojej wielkości w warunkach blokady receptorów δ przy użyciu ich selektywnego blokera — naltrindolu. Ta zaś wyraźnie redukowała czas trwania bezdechu wywołanego przez bifalinę, skracając okres spowolnionego oddychania oraz wydłużyła nieznacznie obniżenie wentylacji minutowej.

Przytoczone dane wskazują, że wzrost objętości oddechowej związany był przede wszystkim z pobudzeniem receptorów μ , co zaobserwowano również po dożylniej iniekcji wspomnianych powyżej innych agonistów receptorów opiodowych μ , dermorfiny oraz jej pochodnej – Lys⁷-dermorfiny (Negri i wsp., 1998; Wojciechowski i wsp. 2007). Wyniki naszych doświadczeń sugerują, że aktywność receptorów δ moduluje hamujący wpływ bifaliny na częstość oddychania. Istnieją dane wskazujące, że aktywacja tych receptorów w neuronach oddechowych pnia mózgu nie wykazuje wpływu na rytm oddechowy (Lonergan i wsp., 2003). Należy jednak wziąć pod uwagę wzajemne interakcje między receptorami μ i δ (omówione w rozdz. IV.8), w tym zdolność naltrindolu do odwracania depresji oddechowej wywołanej agonistami receptorów μ , opisaną u nieuśpionych szczurów (Su i wsp., 1998; Verborgh i Meert, 1999). Przytoczone informacje wskazują, że pobudzenie receptorów δ , oprócz intensyfikacji działania przeciwbólowego (Ananthan, 2006), może także wzmacniać depresyjny wpływ pobudzenia receptorów μ na oddychanie.

V.2.2 Zmiany sercowo-naczyniowe

Silne działanie obwodowo podawanych peptydów opioidowych na ciśnienie krwi i rytm serca wskazuje na ich rolę w centralnej i obwodowej kontroli krążenia. Skutkiem dożylniej iniekcji bifaliny było zwolnienie rytmu serca oraz długotrwałe obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Podobny wzorzec reakcji krążeniowych zaobserwowano po obwodowym podaniu uśpionym szczurom endomorfiny-1, endomorfiny-2 oraz DAMGO (Kwok i Dun, 1998; Czapla i wsp., 1998; 2000), a także opisano skutki endomorfina w postaci obniżenia pojemności wyrzutowej serca i obwodowego oporu naczyniowego (Chapman i wsp., 1997).

Zwolnienie akcji serca i spadek ciśnienia tętniczego krwi wywołane przez bifalinę zachodziły poprzez stymulację aferentnych włókien nerwowych zaopatrujących obszar płuc i serca. Redukcja skurczów serca mogła być następstwem wspomnianego wyżej zmniejszenia pojemności wyrzutowej lub też efektem stymulacji baroreceptorów, prowadzącymi do niedociśnienia. Obu efektom krążeniowym bifaliny zapobiegała blokada receptorów opioidowych naloksonem, jak również przecięcie nerwów błędnych na szyi eliminujące przekaz informacji z obszaru krążenia płucnego. Znajduje to potwierdzenie w wielu wcześniejszych pracach badających skutki krążeniowe analogów enkefalinowych i endorfin, zarówno u czuwających jak i będących w narkozie szczurów (Sapru i wsp., 1981b; Willette i Sapru, 1982a; Willette i wsp., 1982b; Willette i wsp., 1983; Czapla i wsp., 1998, 2000). Prócz wspomnianych powyżej prac Willette i Sapru, które w całej rozciągłości potwierdzają istotny udział aferencji wagalnej w obserwowanych reakcjach, wyniki Kwok i Dun'a (1998) dodatkowo weryfikowały efekty sercowe endomorfina. Natomiast zachowana po wagotomii szyjnej droga przekazu sygnału z obwodowych baroreceptorów do NTS poprzez nerw zatokowy i aortalny oraz zwoje skalisty i dolny nerwu błędnego wydaje się nie odgrywać istotnej roli w efektach krążeniowych bifaliny, co mogłoby potwierdzać uprzednio sugerowane po-opioidowe osłabienie odruchu z baroreceptorów (Punnen i wsp., 1984).

Badane przez nas zmiany parametrów sercowo-naczyniowych indukowane bifaliną przebiegały z udziałem receptorów opioidowych δ , na co wskazywało znaczne osłabienie nagłego spadku ciśnienia tętniczego krwi oraz istotne zmniejszenie zwolnienia rytmu serca obserwowane po ich zablokowaniu (Ryc. 38, 39).

Dane dotyczące wpływu pobudzenia receptorów opioidowych δ na parametry sercowo-krażeniowe nie są jednak jednoznaczne. Obwodowe podanie ligandów tych receptorów czuwającym szczurom nie zmieniało wartości MAP i HR (Sezen i wsp., 1998), jednak uśpione zwierzęta reagowały spadkiem ciśnienia (Sorrentino i wsp., 2001). Hipotensję obserwowano również w wyniku pobudzenia wszystkich trzech typów receptorów opioidowych (van den Brink i wsp., 2003). Stąd też kluczową rolę w regulacji odpowiedzi zarówno oddechowej jak i krążeniowej na ligandy opioidowe może odgrywać zdolność receptorów opioidowych δ do tworzenia heterodimerów zarówno z receptorami μ jak i κ , (Jordan i wsp., 2000, Rozenfeld i Devi, 2007).

Receptory opioidowe, jak większość receptorów neuropeptydowych i nie-peptydowych, związane są z białkami G. Ich interakcje mogą zarówno potęgować, jak też hamować stymulujące działania specyficznych ligandów dla różnych receptorów. Wykazano, m. in., że peptydy opioidowe mogą blokować aktywność receptorów β -adrenergicznych w sercu (Pepe i wsp., 2004) ale też wzmacniać działanie przeciwbólowe receptorów A_1 -adenozynowych i α_2 -adrenergicznych (Aly i Levine, 1997). Istotne znaczenie ma także udział w tych reakcjach wyzwalanych opioidów endogennych. Prowadzi to do wniosku, że obserwowana reakcja jest wypadkową działania poszczególnych ligandów i interakcji stymulowanych jednocześnie receptorów.

VI PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badane po raz pierwszy konsekwencje oddechowe i krążeniowe systemowych iniekcji dwóch zsyntetyzowanych w naszym Instytucie peptydów o silnym działaniu przeciwbólowym wykazały:

1. Przejściowe zahamowanie oddychania w formie bezdechu wydechowego, za który odpowiedzialne są receptory opioidowe μ i δ , a pośredniczy w nim droga wagalna.
2. Następowe zwolnienie rytmu oddechowego (rec. μ i δ) przy zachowanej integralności nerwów błędnych.
3. Przyrost objętości oddechowej związany z aferentacją wagalną (bifalina) i odbywający się poza nią (AWL3106).
4. Zachowanie niezmienionej wentylacji minutowej (AWL3106) i jej przejściowe obniżenie (bifalina).
5. Wagozależny spadek ciśnienia tętniczego krwi i rytmu serca (bifalina).
6. Przedłużająca się hipotensja autonomiczna w stosunku do sprzężenia wagalnego, indukowana pobudzeniem obwodowych receptorów tachykininowych NK_1 .

Powyższe wyniki nasuwają następujące wnioski:

1. Efekty oddechowe generowane przez obie chimery, opisane po raz pierwszy w tej rozprawie, prezentowały analogiczny (jednakowy) wzorzec odpowiedzi, o znaczącej aktywności składowej objętościowej, odsuwający niebezpieczeństwo depresji oddechowej.
2. W mechanizmie tego zjawiska pośredniczyło, w przypadku bifaliny, kluczowe w obwodowej regulacji oddychania sprzężenie wagalne z płuc, natomiast poza nim przebiegała aktywacja komponenty objętościowej indukowana przez AWL3106.

3. Istotny problem stanowił spadek ciśnienia tętniczego krwi, który wprowadzany przez farmakofory opioidowe był skutkiem wagalnego odruchu z baroreceptorów, podczas gdy udziałem domeny tachykininowej była aktywacja receptorów NK₁, prowadząca do rozszerzenia łoża naczyniowego.

Piśmiennictwo:

Abdala APL, Haibara AS, Colombari E. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003, 285: H891–H898

Abruscato TJ, Thomas SA, HrubyVJ, Davis TP. Brain and spinal cord distribution of biphalin: Correlation with opioid receptor density and mechanism of CNS entry. *J Neurochem.* 1997, 69: 1236-1245

Aicher SA, Goldberg A, Shrama S, Pickel VM. μ -Opioid receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the medial nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol.* 2000, 422: 181-190 A

Aicher SA, Punnose A, Goldberg A. M-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci.* 2000, 20: 4345-4354 B

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Am Rev Neurosci.* 1984, 7: 223-235

Alheid GF, McCrimmon DR. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008, 164: 3-11

Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR. Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004, 143: 105-114

Aly KO, Levine JD. Multiple receptors involved in peripheral α_2 , μ , and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci.* 1997, 17: 735-744

Ananthan S. Opioid Ligands With mixed μ/δ opioid receptor interactions: An emerging approach to novel analgesics. *The AAPS Journal.* 2006, 8: E118-E125

Atweh SF, Murrin LC, Kuhar MJ. Presynaptic localization of opiate receptors in the vagal and accessory optic systems: an autoradiographic study. *Neuropharmacol.* 1978, 17: 65-71

Bakhle YS, Brogan JD, Bell C. Decreased vascular permeability response to substance P in airways of genetically hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1999, 126: 933-938

Barnes PJ. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev.* 1991, 72: 699-729

Bauman NM, Lushei ES, Wang D, Talman WT. Effect of substance P injection into the nucleus tractus solitarius of rats on cricothyroid and thyroarytenoid motor activity and cardiovascular and respiratory systems. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002, 111: 875-883

Bellucci F, Carini F, Catalani C, Cucchi P, Lecci A, Meini S, Patacchini R, Quartara L, Ricci R, Tramontana M, Giuliani S, Maggi CA. Pharmacological profile of the novel mammalian tachykinin, hemokinin 1. *Br J Pharmacol.* 2002, 135: 266-74

Bonner G, Meng F, Akil H. Selectivity of mu-opioid receptor determined by interfacial residues near third extracellular loop. *Eur J Pharmacol.* 2000, 403: 37-44

- Boscan P, Pickering AE, Paton JFR. The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents. *Exp Physiol*. 2002, 87: 259-266
- Bourgoin S, Benoliel JJ, Collin E, Mauborgne A, Pohl M, Hamon M, Cesselin F. Opioidergic control of the spinal release of neuropeptides. Possible significance for the analgesic effects of opioids. *Fundam Clin Pharmacol*. 1994, 8: 307-321
- Broccardo M, Usenko AB, Uranova MG, Guzevatykh LS, Kamensky AA, Andreeva LA, Alfeeva LY, Myasoedov NF, Giannini E, Improta G, Emel'yanova TG. In vitro and in vivo opioid activity of [DPro6]dermorphin, a new dermorphin analogue. *Peptides*. 2003, 24: 419-428
- Búzás B, Cox BM. Quantitative analysis of Mu and Delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. *Neuroscience*. 1997, 76: 479-489
- Champion HC, Zadina JE, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Kadowitz PJ. Endomorphin 1 and 2, endogenous ligands for the μ -opioid receptor, decrease cardiac output, and total peripheral resistance in the rat. *Peptides*. 1997, 18: 1393-1397
- Chappa AK, Audus KL, Lunte SM. Characteristics of substance P transport across the blood brain barrier. *Pharmacol Res*. 2006, 23: 1201-1208
- Chen Z, Hedner J, Hedner T. Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *J Appl Physiol*. 1990, 68: 693-699
- Chen Z, Hedner J, Hedner T. Substance P-induced respiratory excitation is blunted by delta-receptor specific opioids in the rat medulla oblongata. *Acta Physiol Scand*. 1996, 157: 165-173
- Colman AS, Miller JH. Modulation of breathing by μ 1 and μ 2 opioid receptor stimulation in neonatal and adult rats. *Respir Physiol*. 2001, 127: 157-172
- Corbett A, McKnight S, Henderson G. Opioid Receptors. www.opioids.com/receptors/ dostęp 26. 07. 2013
- Corcoran BM, Haigh AL. Effect of vagotomy and vagal cooling on bronchoconstrictor response to substance P in sheep. *Respir Physiol*. 1995, 102: 71-77
- Corcoran BM, Haigh AL. The effects of tachykinins on sheep bronchomotor tone. *Exp Physiol*. 1992, 77: 471-479
- Cragg PA, Runold M, Kou YR, Prabhakar N. Tachykinin antagonists in carotid body responses to hypoxia and substance P in the rat. *Respir Physiol*. 1994, 95: 295-310
- Czapla MA, Champion HC, Zadina JE, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Kadowitz PJ. Endomorphin 1 and 2, endogenous μ -opioid agonists, decrease systemic arterial pressure in the rat. *Life Sci*. 1998, 62: 175-179
- Czapla MA, Gozal D, Alea OA, Beckerman R, Zadina JE. Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1 endomorphin 2, DAMGO and morphine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000, 162: 994-999

- Delpierre S, Pognat C, Duté C, Jammes Y. Role of vagal afferents in the ventilatory response to naloxone during loaded breathing in the rabbit. *Neurosci Lett*. 1995, 186: 69-73
- Ding YQ, Kaneko K, Nomura S, Mizuno N. Immunohistological localization of μ -opioid receptors in the central nervous system. *J Comp Neurol*. 1996, 367: 375-402
- Ding YQ, Li JL, Lü BL, Wang D, Zhang ML, Li JS. Co-localization of μ -opioid receptor- like immunoreactivity with substance P-LI, calcitonin gene-related peptide LI and nitric oxide synthase-LI in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Brain Res*. 1998, 792: 149-153
- Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008, 164: 96-104
- Eager KR, Robinson BJ, Galletly DC, Miller JH. Endogenous opioid modulation of hypercapnic-stimulated respiration in the rat. *Respir Physiol*. 1994, 96: 13-24
- Fazan VPS, Salgado HC, Brreira AA. A descriptive and quantitative light and electron microscopy of the aortic depressor nerve in normotensive rats. *Hypertension*. 1997, 30: 693-698
- Feldman PD. Neurokinin1 receptor mediation of the vasodepressor effects of substance P in nucleus of the tractus solitarius. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995, 273: 617-623
- Feuerstein G, Faden AI. Central autonomic effects of dermorphin in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983, 226: 151-156
- Fong AY, Potts JT. Neurokinin-1 receptor activation in Bötzing complex evokes bradypnoea. *J Physiol*. 2006, 575.3: 869-885
- Freed AL, Audus KL, Lunte SM. Investigation of substance P transport across the blood-brain barrier. *Peptides*. 2002, 23: 157-165
- Fu C-Y, Kong Z-Q, Long Y, Chen Q, Wang R. Cardiovascular responses to rat/mouse hemokinin-1, a mammalian tachykinin peptide: Systemic study in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol*. 2007, 572, 157-181
- Gauda EB, Bamford OS, Northington FJ. Lack of induction of Substance P gene expression by hypoxia and absence of neurokinin 1-receptor mRNAs in the carotid body. *J Auton Nerv Syst*. 1998, 74: 100-108
- Gauda EB, Gerfen CR. Expression and localization of enkephalin, substance P, and substance P receptor genes in the rat carotid body. w: red. Zapata i wsp. *Frontiers in Arterial Chemoreception*. Plenum Press, New York, 1996: 313-318
- Gillis RA, Helke CJ, Hamilton BL, Norman WP, Jacobowitz DM. Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents in nucleus tractus solitarius. *Brain Res*. 1980, 181: 476-481
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994, 74: 829-898

- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in preBötzinger complex. *Science*. 1999, 286: 1566-1568
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL. Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor expressing neurons. *Nat Neurosci*. 2001, 4: 927-930
- Haji A, Yamazaki H, Oki Y, Takeda RO. Distribution of μ receptors in the ventral respiratory group neurons; immunohistochemical and pharmacological studies in decerebrate cats. *Neurosci Lett*. 2003, 351: 37-40
- Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Bioch & Cell Biol*. 2001, 33: 555-576
- Hassen AH, Feuerstein G, Faden AI. Kappa opioid receptors modulate cardiorespiratory function in hindbrain nuclei of rat. *J Neurosci*. 1984, 4: 2213-2221
- Hassen AH, Feuerstein GZ, Faden AI. Cardiovascular responses to opioid agonists injected into the nucleus of tractus solitarius of anesthetized cats. *Life Sci*. 1982, 31: 2193-2196
- Hedner J, Hedner T, Wessberg P, Jonason J. Interaction of substance P with the respiratory control system in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984, 288: 196-201
- Hedner T, Hedner J, Jonason J, Lundberg D. Evidence suggesting a role for Substance P in central respiratory regulation in the rat. *Acta Physiol Scand*. 1981, 112: 487-489
- Helke CJ, Seagard JL. Substance P in the baroreceptor reflex: 25 years. *Peptides* 2004, 25: 413-423
- Helke CJ, Shults CW, Chase TN, O'Donohue TL. Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy. *Neuroscience*. 1984, 12: 215-223
- Hökfelt T, Broberger C, Xu Z-Q D, Sergeev V, Ubnik R, Diez M. Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacol*. 2000, 39: 1337-1356
- Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*. 2001, 249: 27-40
- Holaday JW. Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983, 23: 541-94
- Holtman JR, Jr. Immunohistochemistry of central respiratory neurotransmitters. *Am J Physiol*. 1991, 260: L374-L380
- Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L. Actions of Tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol*. 2000, 84: 367-373
- Horan PJ, Mattia A, Bilsky EJ, Weber S, Davis TP, Yamamura HI, Malatynska E, Appleyard SM, Slaninova J, Misicka A. Antinociceptive profile of biphallina dimeric enkephalin analog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993, 265: 1446-1454

- Ichikawa H. Innervation of the carotid body: immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Micr Res Tech.* 2002, 59: 188-195
- Iniushkin AN. Respiratory and hemodynamic responses to microinjections of opioids into the solitary tract nucleus. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 1997, 83: 112-121
- Janecka A, Fichna J, Janecki T. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem.* 2004, 4: 1-17
- Joos GF, Pauwels A, Van der Straeten E. The mechanism of tachykinin-induced bronchoconstriction in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1988, 137: 1038-1044
- Jordan AJ, Cvejic S, Lakshmi AD. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropharmacol.* 2000, 23: S5-S18
- Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of neurotensin and opioid receptors in the cardiorespiratory effects of [Ile⁹]pK20, a novel antinociceptive chimeric peptide. *Eur J Pharmac Sci.* 2014, 63: 699-729
- Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Depressive cardio-respiratory effects of somatostatin in anaesthetized rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010, 170: 273-278
- Kaczyńska K, Szereda-Przestaszewska M. Involvement of vagal opioid receptors in respiratory effects of morphine in anaesthetized rats. *J Physiol Pharmacol.* 2005, 56: 195-203
- Kamei J, Kasuya Y. Effects of double-enkephalin (Biphalin), an enkephalin analogue, on respiration and the cough reflex in rats. *J Pharmacobio-Dyn.* 1988, 11: 645-650
- Kirby GC, McQueen DS. Characterization of opioid receptors in the cat carotid body involved in chemosensory depression in vivo. *Br J Pharmac.* 1986, 88: 889-898
- Kosson D, Klinowiecka A, Kosson P, Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E, Lipkowski AW. Intrathecal antinociceptive interaction between the NMDA antagonist ketamine and the opioids morphine and biphalin. *Eur J Pain.* 2008, 12: 611-616
- Kosson D, Maszczyńska-Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E, Lipkowski AW. Antinociception after intrathecal biphalin application in rats: a reevaluation and novel, rapid method to confirm correct catheter tip position. *Pharmacol Rep.* 2005, 57: 545-549
- Kream RM, Kato T, Shimonaka H, Marchand JE, Wurm WH. Substance P Markedly Potentiates the Antinociceptive Effects of Morphine Administered at the Spinal Level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, 90: 3564-3568
- Kubo T, Kihara M. Blood pressure modulation by substance P in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1987, 413: 379-383
- Kwok EH, Dun NJ. Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats. *Brain Res.* 1998, 803: 204-207
- Lalley PM. Opiate slowing of feline respiratory rhythm and effects on putative medullary phase-regulating neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006, 290: R1387-1396

- Lalley PM. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008, 164: 160-167
- Lee LY, Pisarri TE. Afferent properties of reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol.* 2001, 125: 47-65
- Li JL, Kaneko T, Mizuno N. Effects of peripheral nerve ligation on expression of μ -opioid receptor in sensory ganglion neurons: an immunohistochemical study in dorsal root and nodose ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett.* 1996, 214: 91-94
- Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczyńska I. Double-enkephalins –synthesis, activity on guinea-pig ileum, and analgesic effect. *Peptides.* 1982, 3: 697-700
- Lipkowski AW, Misicka A, Kosson D, Kosson P, Lachwa-From M, Brodzik-Bienkowska A, Hruby VJ. Biological properties of a new fluorescent biphalin fragment analogue. *Life Sci.* 2002, 70: 893-7
- Lipkowski AW, Misicka A, Carr DB, Ronsisvalle G, Kosson D, Maszczyńska Bonney I. Neuropeptide mimetics for pain management. *Pure Appl Chem.* 2004, 76: 941-950
- Lipkowski AW, Carr DB, Bonney I, Kosson P. Opioid-Substance P chimeric peptides. w: red. Kastin AJ. *Handbook of Biologically Active Peptides.* Elsevier 2006: 1373-1378
- Lonergan T, Goodchild AK, Christie MJ, Pilowsky PM. Presynaptic delta opioid receptors differentially modulate rhythm and pattern generation in the ventral respiratory group of the rat. *Neuroscience.* 2003, 121: 959-973
- Luccarini P, Hemy M, Alvarez P, Gaydier AM, Dallel R. Contribution of neurokinin 1 receptors in the cutaneous orofacial inflammatory pain. *Naunyn-Schmiedeber' s Arch Pharmacol.* 2003, 368: 320-323
- Lundberg JM, Hökfelt T, Fahrensburg J, Nilson G, Terenius L. Peptides in the cat carotid body (glomus caroticum): VIP-enkephalin, and substance P-like immunoreactivity. *Acta Physiol Scand.* 1979, 107: 279-281
- Lundberg JM, Hökfelt T, Martling CR, Saria A, Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 1984, 235: 251-261
- Maley BE. Immunohistochemical localization of neuropeptides and neurotransmitters in the nucleus solitarius. *Chem Senses.* 1996, 21: 367-376
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid receptor mRNA expression in the rats CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 1995, 18: 22-29
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu, Delta, and Kappa opioid receptor mRNA expression in the CNS; an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 1994, 350: 412-438
- Marshall JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 1994, 74: 543-594

- Maszczyńska I, Lipkowski AW, Carr DB, Kream RM. Alternative forms of interaction of substance P and opioids in nociceptive transmission. *Letters in Peptide Science* 1998, 5: 395-398
- Mazzone SB, Geraghty DP. Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. *Brain Res.* 1999, 826: 139-142
- Mazzone SB, Geraghty DP. Respiratory actions of tachykinins in the nucleus of the solitary tract: characterization of receptors using selective agonists and antagonists. *Br J Pharmacol.* 2000, 129: 1121-1131
- McDonald DM. Morphology of the rat carotid sinus nerve. II. Number and size of axons. *J Neurocytol.* 1983, 12: 373-392
- McQueen DS. Effects of substance P on carotid chemoreceptor activity in the cat. *J Physiol.* 1980, 302: 31-4
- Melchiorri P, Negri L. The dermorphin peptide family. *Gen Pharmac.* 1996, 27: 1099-1107
- Misicka A, Lipkowski AW, Horvath R, Davis P, Porreca F, Yamamura HI, Hruby VJ. Structure-activity relationship of biphalin. The synthesis and biological activities of new analogues with modifications in positions 3 and 4. *Life Sci.* 1997, 60: 1263-1269
- Misterec K, Maszczyńska I, Dorociak A, Gumułka SW, Carr DB, Szyfelbein SK, Lipkowski AW. Spinal co-administration of peptide substance P antagonist increases antinociceptive effect of the opioid peptide biphalin. *Life Sci.* 1994, 54: 939-944
- Mizoguchi H, Bagetta G, Sakurada T, Sakurada S. Dermorphin tetrapeptide analogs as potent and long-lasting analgesics with pharmacological profiles distinct from morphine. *Peptides.* 2011, 32: 421-427
- Montandon G, Qiu W, Lin H, Reu J, Greer JJ, Horner RL. Pre-Bötzing complex neurokinin-1 receptor expressing neurons mediate opioid-induced respiratory depression. *J Neurosci.* 2011, 31: 1292-1301
- Monteau R, Ptak K, Broquère N, Hilaire G. Tachykinins and central respiratory activity: an in vitro study on the newborn rat. *Eur J Pharmacol.* 1996, 314: 41-50
- Morin-Surun MP, Boudinot E, Gacel G, Champagnat J, Roques BP, Denavit-Saubie M. Different effects of μ and δ opiate agonists on respiration. *Eur J Pharmacol.* 1984, 98: 235-240
- Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol.* 1994, 347: 249-274
- Negri L, Lattanzi R, Tabacco F, Melchiorri P. Respiratory and cardiovascular effects of the μ -opioid receptor agonist [Lys7] dermorphin in awake rats. *Br J Pharmacol.* 1998, 124: 345-355

- Negri L, Melchiorri P, Erspamer GF, Erspamer V. Radioimmunoassay of dermorphin-like peptides in mammalian and non-mammalian tissues. *Peptides*. 1981, 2 Suppl2: 45-49
- Negri L, Melchiorri P, Lattanzi R. Pharmacology of amphibian opiate peptides. *Peptides*. 2000, 21: 1639-1647
- Nomura S, Ding YQ, Kaneko T, Li JL, Mizuno N. Localization of mu-opioid receptor-like immunoreactivity in the central components of the vagus nerve: a light and electron microscope study in the rat. *Neuroscience* 1996, 73: 277-286
- Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*. 1993, 73: 229-308
- Paakkari P, Paakkari I, Sirén A-L, Feuerstein G. Respiratory and locomotor stimulation by low doses of dermorphin, a Mu1 receptor-mediated effect. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990, 252: 235-239
- Paton JFR. Importance of neurokinin-1 receptors in the nucleus tractus solitarii of mice for the integration of cardiac vagal inputs. *Eur.J.Neurosci*. 1998, 10: 2261-2275
- Pattinson KTS. Opioids and the control of respiration. *Br J Anaesth*. 2008, 100: 747-758
- Pazos A, Florez J. Interaction of naloxone with mu- and delta-opioid agonists on the respiration of rats. *Eur J Pharmacol*. 1983, 87: 309-314
- Pepe S, van den Brink OWV, Lakatta EG, Xiao RP. Cross-talk of opioid peptide receptor and β -adrenergic receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2004, 63: 414-422
- Perlikowska R, Fichna J, Janecka A. Endomorfiny – endogenne ligandy receptora opioidowego μ . *Postępy Biochemii*. 2009, 55: 388-393
- Pilowsky PM, Goodchild AK. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters. 10 years on. *J Hypertens*. 2002, 20: 1675-1688
- Pizarro J, Ryan ML, Hedrick DH, Hue IM, Keith IM, Bisgard GE. Intracarotid substance P infusion inhibits ventilation in the goat. *Respir Physiol*. 1995, 101: 11-22
- Portolano F, Filippelli A, Marrazzo R, Susanna V, Russo S, Stella L, Losasso C, Budetta SN, Molinaro L, Angrisani M, Falzarano C, Marmo E. Cardiovascular and respiratory effects of dermorphin in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1991, 71: 131-152
- Prabhakar NR, Gouda E, Kumar GK, Kou YR. Analysis of carotid chemoreceptor responses to substance P analogue in anaesthetized cats. *J Auton Ner Syst*. 1995, 52: 43-50
- Prabhakar NR, Landis SC, Kumar GK, Mullikin-Kilpatrick D, Cherniack NS, Leeman S. Substance P and neurokinin A in the cat carotid body: localization, exogenous effects and changes in content in response to arterial pO₂. *Brain Res*. 1989, 481: 205-214
- Prabhakar NR, Runold M, Yamamoto Y, Lagercrantz H, Cherniack NS, Euler von C. Role of the vagal afferents in substance P-induced respiratory responses in anaesthetized rabbits. *Acta Physiol Scand*. 1987, 131: 63-71

- Punnen S, Willette R, Krieger AJ, Sapru HN. Cardiovascular response to injections of enkephalin in the pressor area of the ventrolateral medulla. *Neuropharmacol.* 1984, 23: 939-946
- Rabkin SW. D-Ala-2-Me-Phe-4-Met-(O)-ol-enkephalin in the nucleus tractus solitarius of the rat produces cardiorespiratory depression. *Gen Pharmacol.* 1991, 22: 479-484 A
- Rabkin SW. Cardiorespiratory responses to D-Ala-2-Me-Phe-4-Met-(O)-ol-enkephalin after administration into the fourth cerebral ventricle of the rat: interaction with cholinergic mechanisms. *Pharmacology.* 1991, 42: 68-78 B
- Randich A, Robertson JD, Willingham T. The use of specific opioid agonists and antagonists to delineate the vagally mediated antinociceptive and cardiovascular effects of intravenous morphine. *Brain Res.* 1993, 603: 186-200
- Randich A, Thurston CL, Ludwig PS, Timmerman MR, Gebhart GH. Antinociception and cardiovascular responses produced by intravenous morphine: the role of vagal afferents. *Brain Res.* 1991, 543: 256-270
- Ribeiro-da-Silva A, Hökfelt T. Neuroanatomical localization of substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides.* 2000, 34: 256-271
- Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signalling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *FASEB J.* 2007, 21: 2455-2465
- Rupniak NMJ, Carlson EJ, Shephard S, Bentley G, Williams AR, Hill A, Swain Ch, Mills SG, Di-Salvo J, Kilburn R, Cascieri MA, Kurtz MM, Tsao KL, Gould SL, Chicchi GG. Comparison of the functional blockade of rat substance P (NK1) receptors by GR 20171, RP 67580, SR 140333 and NKP-608. *Neuropharmacol.* 2003, 45: 231-241
- Sahibzada N, Ferreira M, Wasserman AM, Taveira-DaSilva AM, Gillis RA. Reversal of morphine-induced apnoea in the anaesthetized rat by drugs that activate 5-hydroxytryptamine 1A receptors. *J.Pharmacol Exp Ther.* 2000, 292: 704-713
- Sant' Ambrogio G, Sant' Ambrogio FB. Reflexes from the upper airway, lungs, chest wall, and limbs. *The lung.* Chapter 134, wyd. R.G.Crystal, J.B.West, Lippincott-Raven Press Publishers, Philadelphia 1997: 1805-1819
- Sant' Ambrogio G, Widdicombe J. Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respir Physiol.* 2001, 125: 33-45
- Santiago TV, Edelman NH. Opioids and breathing. *J Appl Physiol.* 1985, 59: 1675-1685
- Sapru HN, Gonzalez E, Krieger AJ. Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses. *Brain Res Bull.* 1981, 6: 393-398 A
- Sapru HN, Willette RN, Krieger AJ. Stimulation of pulmonary J receptors by an enkephalin-analog. *J Pharmac Exp Ther.* 1981, 217: 228-234 B
- Schelegle ES, Green JF. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respir Physiol.* 2001, 125: 17-31

- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* 2002, 54: 285-322
- Sezen SF, Kenigs VA, Kapusta DR. Renal excitatory responses produced by the Delta opioid agonist, BW 373U86, in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 287: 238-245
- Shimosegawa T, Foda HD, Said SI. [Met]enkephalin Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerves in guinea-pig and rat lungs: distribution, origin and coexistence with vasoactive intestinal polipeptide immunoreactivity. *Neuroscience* 1990, 36: 737-750
- Sitsen JM, Van Ree JM, De Jong W. Cardiovascular and respiratory effects of beta-endorphin in anesthetized and conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982, 4: 883-888
- Smith AP, Lee NM. Pharmacology of dynorphin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988, 28: 123-140
- Sorrentino R, Capasso A, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Pinto A. Dexamethasone modulates hypotension induced by opioids in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2001, 430: 79-85
- Srinivasan M, Goigny M, Pantaleo T, Lagerkrantz H, Brodin E, Runold M, Yamamoto Y. Enhanced in vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. *Brain Res.* 1991, 546: 211-216
- Su YF, McNutt R, Chang KJ. Delta-opioid ligands reverse alfentanil-induced respiratory depression but not antinociception. *J.Pharmacol Exp Ther.* 1998, 287: 815-823
- Tang J, Yang H-YT, Costa E. Distribution of met5-enkephalin-Arg6-Phe7 (MEAP) in various tissues of rats and guinea pigs. *Life Sci.* 1982, 31: 2303-2306
- Taylor EW, Jordan D, Coote JH. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol Rev.* 1999, 79: 855-916
- Terskiy A, Wannemacher KM, Yadav PN, Tsai M, Tian B, Howells RD. Search of the human proteome for endo endomorphin-2 precursor proteins. *Life Sci.* 2007, 81: 1593-601
- Tomlinson KC, Gardiner SM, Bennett T. Central effects of substance P and somatostatin in conscious, streptozotocin-treated rats. *Am J Physiol.* 1990, 259: R405-410
- Usenko AB, Emel'yanova TG, Myasoedov NF. Dermorphins are natural opioids with an unique primary structure that determines their biological specificity. *Biol Bull.* 2002, 29 (2): 154-164
- van den Brink OMV, Delbridge LM, Rosenfeldt FL, Penny D, Esmore DS, Quick D, Kaye D M, Pepe S. Endogenous cardiac opioids: enkephalins in adaptation and protection of the heart. *Heart Lung and Circulation.* 2003, 12: 178-187
- Van Dorpe S, Adrieans A, Polis I, Peremans K, Van Bocxlaer J, De Spiegeleer B. Analytical characterization and comparison of the blood-brain barrier permeability of eight opioid peptides. *Peptides.* 2010, 31: 1390-1399

- Verborgh C, Meert TF. The effects of intravenous naltrindole and naltrindole 5'-isothiocyanate on sufentanil-induced respiratory depression and antinociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999, 63: 175-183
- Willette RN, Barcas PP, Krieger AJ, Sapru HN. Pulmonary resistance and compliance changes evoked by pulmonary opiate receptor stimulation. *Eur J Pharmacol.* 1983, 91: 181-188
- Willette RN, Sapru HN. Pulmonary opiate receptor activation evokes cardiorespiratory reflex. *Eur J Pharmacol.* 1982, 78: 61-70 A
- Willette RN, Gatti P, Gertner SB, Sapru HN. Pulmonary vagal afferent stimulants in the conscious rat: opioids and phenyldiguamide. *Pharmacol Bioch Beh.* 1982, 17: 19-23 B
- Willette RN, Sapru HN. Peripheral versus central cardiorespiratory effects of morphine. *Neuropharmacol.* 1982, 21: 1019-1026 C
- Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Bioch Biophys Res Commun.* 1996, 218: 877-881
- Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Delta opioid receptors contribute to the cardiorespiratory effects of biphalin in anaesthetized rats. *Pharmacol Rep.* 2011, 63: 1235-1242
- Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Respiratory and cardiovascular effects of biphalin in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2009, 602: 50-53
- Wojciechowski P, Szereda-Przestaszewska M, Lipkowski AW. Supranodose vagotomy eliminates respiratory depression evoked by dermorphin in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 2007, 563: 209-212
- Woo SK, Tulunay FC, Loh HH, Lee NM. Effect of dynorphin-(1-13) and related peptides on respiratory rate and morphine-induced respiratory rate depression. *Eur J Pharmacol.* 1983, 96: 117-122
- Zadina JE, Hacker L, Ge LJ, Kasin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature.* 1997, 386: 499-502
- Zarbin MA, Wamsley JK, Kuhar MJ. Anterograde transport of opioid receptors in rat vagus nerves and dorsal roots of spinal nerves: pharmacology and sensitivity to sodium and guanine nucleotides. *Exp Brain Res.* 1990, 81: 267-278

Streszczenie

Rytmiczne oddychanie, niezbędne do życia wszystkich kręgowców, generowane jest przez ośrodki oddechowe zlokalizowane w pniu mózgu i kształtowane przez informacje dopływające z chemo- i mechanoreceptorów płucnych.

Receptory opioidowe i tachykininowe oraz ich ligandy biorą udział w regulacji oddychania i przewodzeniu sygnałów bólowych. Obydwa te systemy wykazują przeciwstawne działanie na kształtowanie wzorca oddechowego. Podstawową funkcją opioidów oraz substancji P (SP) — agonisty receptorów tachykininowych NK_1 — jest, odpowiednio hamowanie i pobudzanie generatora rytmu oddechowego. Masowe rozmieszczenie w organizmie wspomnianych receptorów oraz ich kolokalizacja w tych samych strukturach umożliwia ich wzajemną interakcję. Istnieją dane wskazujące, że opioidy wywierają hamujący wpływ na uwalnianie substancji P zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w czuciowym unerwieniu dróg oddechowych. Dowiedziono także, że niewielkie dawki SP, nie wykazujące działania nocyceptywnego potęgują przeciwbólowe działanie morfiny. Stąd też można przypuszczać, że jednoczesna aktywacja układu opioidowego i tachykininowego może minimalizować depresję oddychania będącą głównym mankamentem stosowania analgetyków opioidowych.

Celem niniejszej pracy było określenie efektów oddechowych i sercowo-naczyniowych wybranych analogów neuropeptydowych o działaniu przeciwbólowym.

Zadanie to obejmowało:

- ustalenie kształtu wzorca oddechowego inicjowanego systemową iniekcją badanych chimer peptydowych, z uwzględnieniem jego komponent: czasowej i objętościowej;
- określenie typu zmian parametrów sercowo-naczyniowych;
- zbadanie wpływu odcięcia dróg dośrodkowych nerwu błędnego, wspólnego obwodowego ogniwa kontroli napędu oddechowo-sercowego, na reakcje indukowane przez peptydy;

- ocenę stopnia udziału receptorów opioidowych i tachykininowych NK₁ w obserwowanych odpowiedziach.

Przedmiotem badań były: (i) AWL3106 — chimera peptydowa zbudowana z dwóch farmakoforów będących agonistami: receptorów opioidowych (dermorfiny) oraz tachykininowych NK₁ (substancji P₇₋₁₁) oraz (ii) bifalina — peptyd złożony z dwóch aktywnych fragmentów enkefaliny. Doświadczenia przeprowadzono na szczurach stada Wistar, spontanicznie oddychających, w narkozie uretanowo-chloralozowej.

Jednoczesna aktywacja receptorów opioidowych μ oraz tachykininowych NK₁ przez dożylnie podanie chimery peptydowej AWL3106 wywoływała bezdech, a wznowione po nim oddychanie charakteryzowało się zmniejszoną częstością (f) i zwiększoną objętością (V_T). Zmianom tym towarzyszył spadek ciśnienia tętniczego krwi.

Bezdech oraz zwolnienie oddychania indukowane przez AWL3106 zależne było od zachowanej aferencji w nerwie błędnym natomiast wzrost V_T oraz spadek ciśnienia tętniczego krwi zachodziły poza jej udziałem.

Blokady receptorów opioidowych naloksonem i tachykininowych NK₁ za pomocą nieprzechodzącego przez barierę krew/mózg SR140333 wykazały, że obecność bezdechu była wynikiem pobudzenia receptorów opioidowych μ nerwu błędnego, zaś wzrost objętości oddechowej stanowił prawdopodobnie efekt wypadkowy aktywacji receptorów opioidowych w obrębie krążenia płucnego oraz receptorów tachykininowych NK₁ także poza obszarem unerwianym przez nerw błędny.

Spadek ciśnienia tętniczego krwi był rezultatem zarówno pobudzenia obwodowych receptorów opioidowych zlokalizowanych w płucach jak i tachykininowych NK₁, obecnych w śródbłonku naczyń krwionośnych.

Dermorfina — farmakofor opioidowy peptydu AWL3106 — podana obwodowo w małych dawkach działała pobudzająco, natomiast jej większe dawki wykazywały depresyjny wpływ na czasową składową wzorca oddechowego.

Dośrodkową drogę dla obserwowanych po iniekcji dermorfiny zmian: bezdechu, wzrostu objętości oddechowej, zwolnieniu rytmu serca, a także spadku ciśnienia tętniczego krwi stanowił nerw błędny. Wymienione efekty iniekcji tego heptapeptydu zależały od pobudzenia receptorów opioidowych w obszarze kontrolowanym przez nerw błędny.

Tachykininowy komponent chimery AWL3106 — AWL2077, podany dożylnie powodował zależne od aferencji wagalnej: wzrost objętości oddechowej, zwolnienie oddychania i akcji serca, oraz zachodzące poza kontrolą nerwu błędnego: początkowe, prowadzące do depresji wentylacji, obniżenie objętości oddechowej oraz spadek ciśnienia tętniczego krwi.

Natomiast jednoczesne podanie wchodzących w skład AWL3106 agonistów receptorów opioidowych μ i tachykininowych NK₁, odpowiednio dermorfiny i AWL2077, w mniejszym stopniu niż badana chimera wpływało na czasową składową wzorca oddechowego bez zmian objętości oddechowej. Indukowane przez mieszaninę ww. agonistów zmiany ciśnienia tętniczego krwi, obejmujące przejściową hipotensję z następowym krótkotrwałym wzrostem ciśnienia krwi powyżej wartości początkowej oraz ponowny, maksymalny spadek wartości. Sekwencja tych zmian była podobna do odpowiedzi obserwowanej po AWL2077.

Zwolnienie rytmu serca prezentowało dwufazowy charakter: bezpośrednie, krótkotrwałe obniżenie częstości z następowym powrotem tego parametru do wartości początkowej, po czym rytm serca ponownie zwalniał osiągając poziom wyjściowy przed końcem obserwacji.

Dożylna iniekcja bifaliny wywoływała depresję oddechową obejmującą bezdech, a wznowione po nim oddychanie charakteryzowało się przejściowym zmniejszeniem wentylacji minutowej, zmniejszoną częstością oraz zwiększoną objętością oddechową. Zmianom tym towarzyszył znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi oraz zwolnienie rytmu serca. Powyższe efekty zależne były od zachowanej aferencji wagalnej.

Aktywacja receptorów δ przez bifalinę nie wykazywała istotnego wpływu na odpowiedź objętościową wzorca oddechowego, uczestniczyła jednak w pogłębianiu depresji rytmu

oddechowego poprzez nasilenie czasu trwania bezdechów i wydłużenie czasu wydechu, oraz nasilała spadek ciśnienia tętniczego krwi i zwolnienie rytmu serca.

Przeprowadzone badania wykazały, że:

- Bezdech był skutkiem pobudzenia receptorów opioidowych μ .
- Stymulacja receptorów opioidowych δ przez bifalinę nasilała depresję czasowej składowej wzorca oddechowego.
- Warunkiem pojawienia się bezdechu, zwolnienia rytmu oddechowego, wzrostu objętości oddechowej, jak również spadku ciśnienia tętniczego krwi — efektów indukowanych agonistami receptorów opioidowych μ — była zachowana aferentacja wagalna z płuc.
- Pobudzenie receptorów opioidowych μ i tachykininowych NK_1 przez peptyd hybrydowy AWL3106 prowadziło do wzrostu objętości oddechowej, jednak efekt ten nie był obserwowany po jednoczesnym pobudzeniu tych receptorów przez substancje pełniące role poszczególnych farmakoforów.
- Zwiększenie objętości oddechowej indukowane przez AWL3106 obecne po przecięciu nerwów błędnych powyżej zwojów guzkowych można przypisać efektom pobudzenia receptorów tachykininowych NK_1 zlokalizowanych w nerwie zatokowym.
- Spadek ciśnienia krwi obserwowany po podaniu AWL3106 był efektem przede wszystkim obwodowego działania tego peptydu.

Reakcje indukowane przez związki hybrydowe działające na dwie odmienne grupy receptorów nie stanowią prostego sumarycznego działania wynikającego z aktywności poszczególnych substancji wchodzących w ich skład, są li tylko efektem działania nowej molekuly charakteryzującej się odmiennymi właściwościami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi. Wpływ na końcowy efekt może mieć również szereg dyskretnych

interakcji zachodzących między funkcjonowaniem poszczególnych receptorów oraz szlaków przekazywania sygnału, tak między- lub wewnątrzkomórkowego jak i do odpowiednich struktur nerwowych zawiadujących poszczególnymi funkcjami.

Abstract

The rhythmicity of breathing is vital for all vertebrates. It is generated within the neuronal networks of respiratory groups located in the medulla and pons and modulated by the information from chemo- and lung mechanoreceptors.

Both opioid and tachykinin receptors and their ligands are engaged in the regulation of breathing and in the transmission of nociceptive stimuli. They also present adverse effects on the generation of respiratory pattern: suppressed by the action of opioids and stimulated by substance P (SP). Ubiquitous presence and co-localisation of both kinds of receptors within the same neural structures leads to their subtle interaction. Opioids are known to suppress the release of SP in the central nervous system and pulmonary sensory neurons. It has also been shown that sub-active doses of SP stimulate the antinociceptive action of morphine. Therefore it might be assumed that concurrent stimulation of opioid and tachykinin receptors may minimise the depression of ventilation which is the main side effect of opioid analgetics.

The purpose of this study was to describe cardio-respiratory effects of antinociceptive neuropeptide analogs which involved:

- delineation of respiratory pattern after systemic injection of chimeric peptides (timing and volume components);
- defining the type of evoked cardiovascular changes;
- describing the share of vagal afferent pathways in the effects induced by peptide analogs;
- estimating the contribution of μ -opioid and tachykinin NK₁ receptors in cardiorespiratory responses.

Peptides used in the research were: (i) AWL3106 – a chimeric peptide comprising two pharmacophores – dermorphin and substance P₇₋₁₁ which are agonists of μ -opioid and tachykin NK₁ receptors, respectively and (ii) biphalin – a dimer of enkephalin with high affinity to μ - and δ -opioid receptors. All the peptides were synthesised in the Department of

Neuropeptides of our Institute. Anaesthetised spontaneously breathing Wistar rats were used in the experiments. Respiratory (tidal volume (V_T), respiratory frequency (f), expiratory time (T_E)) and cardiovascular (blood pressure (BP), heart rate (HR)) parameters were registered after injection of peptides in the intact rats, following section of the vagi at the midcervical and supra-nodose levels and after opioid and/or tachykinin receptors blockade.

Simultaneous activation of μ -opioid and tachykinin NK_1 receptors by an intravenous injection of AWL3106 evoked apnoea. Breathing that followed was of increased tidal volume and decreased frequency. The respiratory changes were accompanied by the fall in mean arterial blood pressure (MAP).

Integrity of vagal afferent pathways was essential for the occurrence of apnoea and reduction in respiratory frequency whereas the increase in tidal volume and fall in blood pressure were not dependent on the vagus nerves.

The blockade of opioid receptors with naloxone (Tocris) and tachykinin NK_1 receptors with poorly brain penetrant SR140333 (Sanofi-Research) showed that the apnoea was a result of stimulation of μ -opioid receptors present on vagus nerve endings, whereas the increase in tidal volume was presumably a consequence of μ -opioid receptors activation in the lungs as well as tachykinin NK_1 receptors beyond the vagal innervation.

The fall in blood pressure resulted from either μ -opioid receptor stimulation in lungs or tachykinin NK_1 receptors present in endothelium.

Small doses of dermorphin – an opioid receptor agonist compound of AWL3106 – injected into femoral vein acted as a respiratory stimulant, the larger doses depressed the timing component of respiratory pattern.

Vagal afferent pathway shaped the dermorphin-induced: apnoea, an increase in tidal volume and drops in respiratory frequency and blood pressure. These effects depended on the stimulation of μ -opioid receptors in the area supplied by the vagus nerve.

Intravenous injection of the tachykinin pharmacophore of AWL3106 – AWL2077 resulted in an increase in tidal volume, reduction in respiratory and heart rate, effects that relied on intact vagal innervation. The post-AWL2077 initial decrease in ventilation due to reduction in tidal volume and hypotension occurred behind the vagal control.

Peripheral administration of both – dermorphin and AWL2077 – affected timing component of respiratory pattern to a lesser extent than AWL3106 with no increase in the tidal volume. Change in blood pressure induced by the mixture of agonists constituted of: initial fall then transient increase in blood pressure above the baseline, followed by severe hypotension lasting for almost the whole time of the experiment, like that evoked by AWL2077.

The slowing down of heart rate presented biphasic character: immediate short-lived fall followed by a return to its baseline then the heart rate was slowed down again and reached the initial value right before the end of observation.

Biphalin injected into femoral vein evoked an apnoea followed by breathing of reduced frequency and increased tidal volume which transiently lessened minute ventilation. The changes in respiratory parameters were accompanied by arterial hypotension and reduction in heart rate. All of the effects of biphalin depended on the integrity of vagal afferentation.

The activation of δ -opioid receptors by biphalin had no essential effect on the tidal component of respiratory pattern but significantly intensified the depression of respiratory frequency by prolongation of apnoea and expiratory time. It also deepened hypotension and reduction in heart rate.

Presented results showed that:

- Apnoea was an effect of stimulation of μ -opioid receptors.
- δ -opioid receptors activated by biphalin intensified depression of timing component of the respiratory pattern.

- Lung vagal afferentation was essential to the effects provoked by μ -opioid receptor agonists (apnoea, fall in respiratory frequency, increase in tidal volume and hypotension).
- Simultaneous activation of opioid and tachykinin receptors by chimeric peptide – AWL3106 induced an increase in tidal volume, an effect that was absent after concomitant stimulation of these receptors by a mixture of compounds comprised in this hybrid.
- Increase in tidal volume evoked by AWL3106 observed after supranodose vagotomy might be a result of tachykinin NK₁ receptor stimulation on the carotid sinus nerve.
- AWL3106-induced fall in blood pressure was of a peripheral origin.

Reactions induced by hybrid compounds acting on two distinct groups of receptors are not a simple summation of effects presented by both individual substances of their composition, but are the result of activity of the new molecule which exhibits different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. The final effect may be a consequence of a number of discrete interactions between individual receptors and their intracellular signal transduction pathways as well as those to relevant neural structures controlling various functions.

