

Aneta Dymecka

ULTRASTRUKTURA I CZYNNOŚĆ  
KŁĘBKÓW SZYJNYCH SZCZURA  
W PROCESIE STARZENIA

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Mieczysław Pokorski

Zakład Neurobiologii Oddychania  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
*im. M. Mossakowskiego*  
Polska Akademia Nauk



WARSZAWA 2006

LS 264

43983

<http://rcin.org.pl>

*Badania prezentowane w rozprawie doktorskiej wykonano częściowo w ramach grantu nr 2 P05A 092 28 przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji.*

## Podziękowania

- Pragnę serdecznie podziękować Panu Prof. Mieczysławowi Pokorskiemu za pomoc merytoryczną i wsparcie w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej
- Składam podziękowanie prof. Henk K. Koerten z Centrum Mikroskopii Elektronowej w Leiden, w Holandii za dogłębne zapoznanie mnie z najbardziej współczesnymi technikami mikroskopii elektronowej i umożliwienie pracy na mikroskopach elektronowych w trakcie mojego długoterminowego pobytu w jego zakładzie.
- Dziękuję także doc. Michałowi Walskiemu za pomoc i dalsze szkolenie w technikach elektronowych w zakładzie Ultrastruktury Komórki Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.
- Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Neurobiologii Oddychania za ciepłość i wyrozumiałość.

Pozycje piśmiennictwa powstałe w oparciu o fragmenty niniejszej rozprawy.

1. A. Dymecka, M. Walski, M. Marczak, M. Pokorski. Ultrastrukturalne zmiany w chemoreceptorach tętnicznych związane z wiekiem. *Gerontologia Polska* 10: 132-135, 2002.
2. M. Pokorski, M. Walski, A. Dymecka, i wsp. The aging carotid body. *J. Physiol. Pharmacol.* 55: 107-113, 2004.
3. A. Dymecka, M. Pokorski, M. Walski. Starzenie się kłębków szyjnych a miażdżycza tętnic szyjnych u szczura. *Gerontologia Polska* 13: 99-102, 2005.

# SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	1-27
1.1. Kłębki szyjne i oddychanie	
1.2. Anatomia kłębków szyjnych	
1.3. Czynność kłębków	
1.4. Odpowiedź oddechowa na hipoksję	
1.5. Zmiany odpowiedzi oddechowej na hipoksję zależne od wieku.	
1.6. Zmiany w tętnicach szyjnych związane z wiekiem	
1.7. Przyczyny powstawania dysfunkcji śródbłonek w miażdżycy oraz główne etapy tego procesu.	
1.8. Syntaza tlenu azotu	
1.9. Badania nad kłębkami szyjnymi	
2. CELE PRACY .....	28-29
2.1. Cel ogólny	
2.2. Cele szczegółowe	
3. MATERIAŁ I METODY .....	30-38
3.1. Zwierzęta doświadczalne	
3.2. Badania <i>in vivo</i>	
3.2.1. Preparatyka i pomiary	
3.2.1.1. Badania ultrastrukturalne	
3.2.1.2. Badania neurofizjologiczne	
3.2.1.2.1. Protokół badawczy	
3.3. Badania <i>in vitro</i>	
3.3.1. Analiza biochemiczna krwi	
3.3.1.1. Oznaczenie cholesterolu całkowitego (CH)	
3.3.1.2. Oznaczenie frakcji HDL	
3.3.2. Mikroskopia elektronowa	
3.3.2.1. Przygotowanie materiału do analizy ultrastrukturalnej	
3.3.2.2. Przygotowanie materiału do analizy histochemicznej	
3.4. Kryteria oceny zmian ultrastrukturalnych w kłębkach szyjnych	
3.5. Analiza danych	
4. WYNIKI .....	38-59
4.1. Ogólna ocena zmian ultrastrukturalnych w parenchymie kłębków szyjnych oraz tętnicach szyjnych	

4.2. Ultrastruktura parenchymy kłębków szyjnych	
4.2.1. Szczury 3-miesięczne	
4.2.2. Szczury 6-miesięczne	
4.2.3. Szczury 12-miesięczne	
4.2.4. Szczury 18-miesięczne	
4.2.5. Szczury 24-miesięczne	
4.3. Ultrastruktura tętnic szyjnych	
4.3.1. Szczury 3-miesięczne	
4.3.2. Szczury 6-miesięczne	
4.3.3. Szczury 12-miesięczne	
4.3.4. Szczury 18-miesięczne	
4.3.5. Szczury 24-miesięczne	
4.4. Cytochemiczne badania lokalizacji aktywności NADPH-diaforazy w komórkach chemoreceptorowych i kapilarach szyjnych u zwierząt młodych i starych	
4.4.1. Szczury 3-miesięczne	
4.4.2. Szczury 24-miesięczne	
4.5. Cytochemiczne badania lokalizacji aktywności NADPH-diaforazy w ścianach tętnic szyjnych u zwierząt młodych i starych	
4.6. Biochemiczne oznaczenie poziomu cholesterolu całkowitego oraz frakcji HDL we krwi tętniczej szczurów młodych i starych	
4.7. Zmiany odpowiedzi oddechowej na hipoksję z postępującym	
4.7.1. Informacje ogólne	
4.7.2. Przebieg odpowiedzi oddechowej na hipoksję	
4.7.3. Czulość odpowiedzi oddechowej na hipoksję u starych i młodych szczurów	
4.7.4. Dwufazowość odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny u starych i młodych szczurów	
4.7.5. Wpływ bodźca hipoksyjnego na skład gazowy i ciśnienie krwi tętniczej u starych i młodych szczurów	
5. DYSKUSJA .....	60-82
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	82-83
7. STRESZCZENIE.....	84-91
8. PIŚMIENNICTWO.....	92-106

# 1. WSTĘP

## 1.1. KLĘBKI SZYJNE I ODDYCHANIE

Wentylacja płucna jest procesem polegającym na dostarczaniu tlenu atmosferycznego do krwi, z którą rozprowadzany jest on do poszczególnych komórek. Utlenianie dostarcza energii, która jest „zamknięta” w związkach chemicznych. Dwutlenek węgla ( $\text{CO}_2$ ) powstający w wyniku tych reakcji usuwany jest na zewnątrz. Oddychanie jest złożonym procesem, który generowany jest w ośrodkowym układzie nerwowym i kontrolowany zarówno na poziomie ośrodkowym jak i obwodowym. W swojej pracy zajmuję się jednym z najistotniejszych elementów złożonego systemu kontroli oddychania - chemoreceptorami tętnicznymi. W kontroli oddychania biorą udział chemoreceptory znajdujące się w kłębkach szyjnych i aortalnych. Te ostatnie, u większości ssaków, odgrywają znikomą rolę w odpowiedziach oddechowych na bodźce chemiczne. Dla celów praktycznych przyjmuje się więc, że odpowiedzi te są wytwarzane w komórkach chemoreceptorowych kłębków szyjnych, których morfologii i czynności poświęcona jest moja praca.

Pierwsza wzmianka na temat kłębków szyjnych pojawiła się już w 1743 roku w rozprawie doktorskiej niemieckiego uczonego, Hartwiga Taube. Zrozumienie funkcji i budowy kłębków szyjnych było jednak niemożliwe w tamtych czasach. W XIX w rozpoczęto intensywne badania nad anatomią, histologią, cytologią i embriologią kłębków szyjnych, lecz dopiero w 1928 roku De Castro (Gonzalez i wsp., 1994) jako pierwszy wysunął przypuszczenie, że kłębki szyjne „testują” krew, a więc są organem czuciowym. Główna ich rola polega na wykrywaniu zmian ciśnienia parcjalnego tlenu ( $\text{PaO}_2$ ), dwutlenku węgla ( $\text{PaCO}_2$ ) oraz stężenia jonów wodorowych [ $\text{H}^+$ ] we krwi tętniczej. Kłębki szyjne są tonicznymi receptorami z niską częstością wyładowań (<2 impulsów/sek/włókno nerwowe), które odgrywają niewielką rolę w procesie regulacji

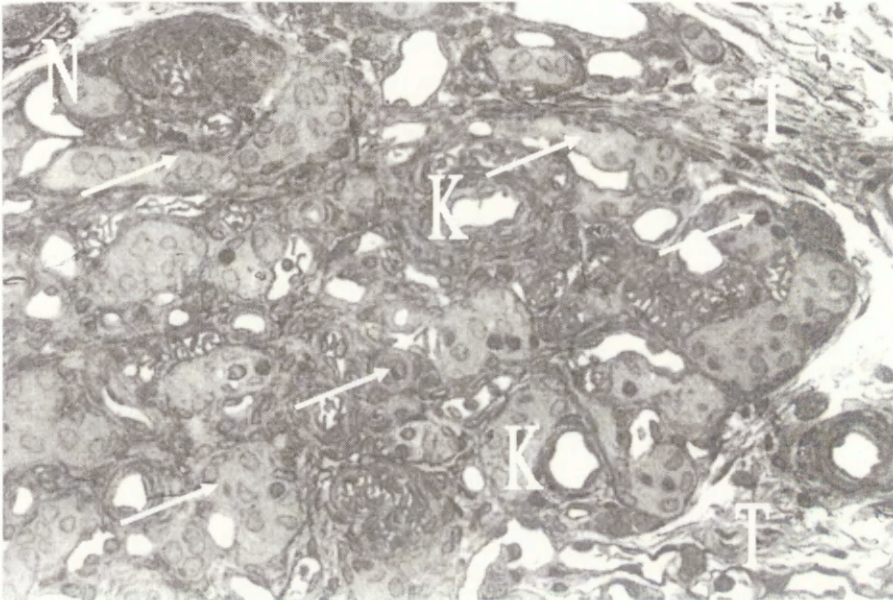
oddychania normoksyjnego (przy  $\text{PaO}_2=100$  mmHg,  $\text{PaCO}_2=40$  mmHg i  $\text{pH}=7,4$ ). Znaczenie ich rośnie, gdy poziom  $\text{PaO}_2$  spada poniżej 60 mmHg (Kazemi i wsp., 2002). Uznaje się, że są one odpowiedzialne za 95% wentylacji w hipoksji (Lahiri i wsp., 1975), która jest najsilniejszym, naturalnym bodźcem dla tych chemoreceptorów oraz za 20-50% wentylacji podczas kwasicy metabolicznej lub oddechowej (Gonzalez i wsp., 1992). Pozostała, znikoma część odpowiedzi oddechowej związana jest z aktywacją możliwych innych grup chemoreceptorowych, w przypadku hipoksji, oraz chemoreceptorów ośrodkowych w przypadku kwasicy i hiperkapnii. Kłębki szyjne mogą zostać również pobudzone przez podwyższoną temperaturę i osmolarność, a także substancje farmakologiczne, jak trucizny metaboliczne, neuroprzekaźniki lub substancje będące ich agonistami.

## **1.2. ANATOMIA KLĘBKÓW SZYJNYCH**

Kłębki szyjne są małymi (0,2 do 1,5 mm), owalnymi organami umiejscowionymi obustronnie w szyi ssaków w okolicy rozgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej na tętnicę zewnętrzną i wewnętrzną, do której są one przytwierdzone za pomocą tzw. więzadła Mayera (Khan i wsp., 1988). Waga kłębków szyjnych uzależniona jest od gatunku zwierzęcia. W przypadku kota, królika czy szczura ważą one odpowiednio: 0,55; 0,40; 0,06 mg (Gonzalez i wsp., 1994). Kłębki szyjne zbudowane są z dwóch typów komórek tworzących tzw. gronka lub wysepki. Po raz pierwszy „gronkowy” charakter parenchymy kłębkowej został opisany w 1900 roku przez A. Khona. Poszczególne gronka oddzielone są od siebie warstwą tkanki łącznej, która formuje także zewnętrzną otoczkę nadając ostateczny kształt kłębkom. Pomiędzy gronkami, w otaczającej je torebce łącznotkankowej, znajdują się liczne naczynia kapilarne oraz zakończenia nerwowe. Komórki typu I, które są właściwymi komórkami chemoreceptorowymi,



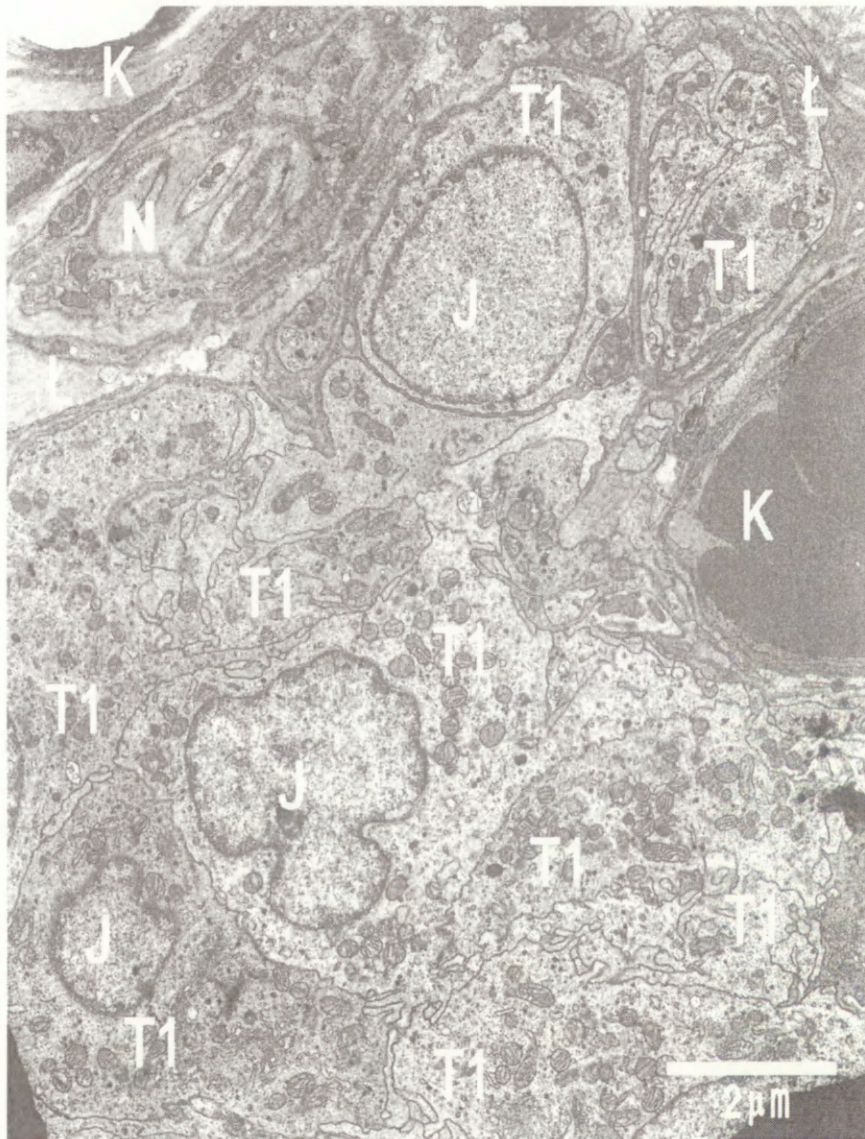
wywodzą się z cewy nerwowej. Charakteryzują się owalnym, jasnym jądrem oraz bogactwem organelli komórkowych takich jak: mitochondria, które zajmują około 12-15% powierzchni komórki chemoreceptorowej,



Ryc.1 Obraz morfologiczny kłębka szyjnego na poziomie mikroskopu świetlnego. Zdjęcie przedstawia „gronka” komórek z wyraźnie zaznaczonymi ciemnymi jądrami (oznaczone strzałkami). Gronka te są perforowane przez naczynia kapilarne (K) i otoczone litą warstwą torebki łącznotkankowej, w której „zatopione” są zakończenia nerwowe (N). Powiększenie pierwotne 0,4k. (*Badania własne*).

bogata strefa aparatu Golgiego, retikulum endoplasmatyczne szorstkie i gładkie, rybosomy, wakuole, lizosomy, centriole, mikrotubule oraz cząsteczki glikogenu. Najbardziej charakterystycznym elementem komórek chemoreceptorowych, na podstawie którego się je identyfikuje morfologicznie, są ziarnistości sekrecyjne wypełnione neuroprzekaznikami. Ze względu na zróżnicowaną wielkość (35-200 nm) oraz zawartość pęcherzyków sekrecyjnych niektórzy autorzy wyróżniają trzy podtypy komórek chemoreceptorowych (A, B, C) (Hellstrom i wsp., 1975; McDonald, 1981; Mitchell i wsp., 1984). Komórki typu II, zwane również podporowymi, otaczają komórki typu I lub wciskają się swymi odnogami między nie. W przeciwieństwie do komórek typu I charakteryzują się ubóstwem organelli komórkowych oraz brakiem ziarnistości neurosekrecyjnych. Komórki te, których rola jest dotąd całkowicie

nieznana, porównywane są do komórek glejowych w mózgu. Stosunek komórek typu I do II wynosi około 5:1 (Perez-Garcia i wsp., 1992; Gonzalez i wsp., 1994).



Ryc. 2 Mikrografia przedstawia fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 3 mies. szczura. Gronko komórek chemoreceptorowych (T1) otoczone jest torebką łącznotkankową (Ł), w której znajdują się zakończenia nerwowe (N), kapilary (K) oraz (J) jądra komórek chemoreceptorowych. Powiększenie pierwotne 3k. (*Badania własne*).

Kłębki szyjne unaczynione są przez jedną lub kilka tętniczek „biorących początek” w odgałęzieniu tętnicy szyjnej wspólnej oraz przez kapilary rozpoczynające się w gęstym splocie naczyniowym znajdującym się na powierzchni organu. Kapilary te uchodzą do żyły szyjnej wewnętrznej lub do jednego z jej odgałęzień. Wyróżnia się dwa typy kapilar drenujących kłębki. Różnią się one między sobą typem śródbłonna,

średnicą światła oraz ilością połączeń tętniczo-żylnych. Kapilary typu 1 stanowią około 60% wszystkich kapilar. Posiadają one cienką ścianę ( $<1\mu\text{m}$ ) uformowaną przez okienkowy śródbłonek, posiadający na niektórych segmentach mikrokosmki, niekompletną osłonę utworzoną przez perycyty oraz błonę podstawną. Średnica tych kapilar zawiera się w przedziale od 8 do 20  $\mu\text{m}$ . W odróżnieniu od kapilar typu 2 mają one bezpośredni kontakt z komórkami chemoreceptorowymi. Kapilary typu 2 mają stałą średnicę  $\sim 7\mu\text{m}$ , otoczone są przez perycyty i nie posiadają okienkowego śródbłonka. Naczynia krwionośne zajmują około 1/4 do 1/3 całej powierzchni kłębków szyjnych (Gonzalez i wsp., 1994), co sześciokrotnie przewyższa unaczynienie mózgu. Ponad połowę unaczynienia kłębków stanowią naczynia małe, których średnica wynosi od 5 do 12  $\mu\text{m}$ . Dane te dotyczą kota i szczura (Clarke i wsp., 1993). Przepływ krwi przez kłębki szyjne wynosi 2000 ml/min/g tkanki i jest większy niż w jakiegokolwiek innej tkance (Bee i wsp., 1993).

Unerwienie kłębków szyjnych jest czuciowe, parasympatyczne i sympatyczne. Unerwienie czuciowe kłębków stanowi nerw zatokowy, zwany również nerwem Heringa, będący odgałęzieniem IX nerwu czaszkowego, czyli nerwu językowo-gardłowego. Do nerwu zatokowego dołączają się również pojedyncze włókna nerwowe pochodzące od nerwu błędnego. Badania McDonalda i Mitchella (1975) wykazały, że ponad 95% włókien nerwu zatokowego stanowią włókna aferentne, których ciała komórkowe znajdują się w zwoju skalistym, a nie w pniu mózgu, jak początkowo sądzono. Ostatnie badania neurochemiczne wykazały, że do nerwu zatokowego przyłączają się również zazwojowe włókna współczulne. Za tym odkryciem przemawia fakt, iż istniejące w nerwie zatokowym NZ niewielkie ilości noradrenaliny (NE) znikają po przecięciu nerwu sympatycznego (Gonzalez i wsp., 1994). Główne unerwienie współczulne kłębków szyjnych pochodzi ze zwoju szyjnego górnego i dociera do nich

poprzez nerw zwojowo-kłębkowy. Większość włókien tego nerwu dociera też do pobliskich naczyń krwionośnych bez penetracji tkanki kłębków szyjnych, regulując w nich przepływ krwi, co ma ogromny wpływ na chemorecepcję. Zakończenia nerwowe znajdujące się w apozycji do komórek chemoreceptorowych charakteryzują się dużym polimorfizmem. Można wśród nich wyróżnić zakończenia, których powierzchnia kontaktowa z komórką chemoreceptorową jest mniejsza niż  $1 \mu\text{m}^2$  oraz takie gdzie powierzchnia ta jest większa niż  $10 \mu\text{m}^2$ . Zakończenia nerwów sympatycznych posiadają zwykle małe synapsy (Gonzalez i wsp., 1994). Zasadnicza różnica między przedzwojowymi zakończeniami ruchowych i czuciowych nerwów sympatycznych polega na ilości pęcherzyków przypadających na jednostkę powierzchni synapsy. W zakończeniach czuciowych, w szczurzych kłębkach szyjnych, występuje średnio 20,9 pęcherzyków z jasnym rdzeniem „clear core”/ $\mu\text{m}^2$  i 7,7 pęcherzyków z ciemnym rdzeniem „dense core”/ $\mu\text{m}^2$ , podczas gdy w zakończeniach ruchowych proporcje te wyglądają nieco inaczej (81,3 „clear core” pęcherzyków/ $\mu\text{m}^2$  i 7,7 „dense core” pęcherzyków/ $\mu\text{m}^2$ ) (Biscoe, 1971). Niemniej jednak nie jest to cecha, która pozwalałaby na jednoznaczną klasyfikację typów zakończeń nerwowych. Ilość zakończeń przypadających na jedną komórkę chemoreceptorową jest cechą gatunkową i wynosi odpowiednio: u szczura ok. 1, a u kota ok. 1,7 (McDonald, 1981).

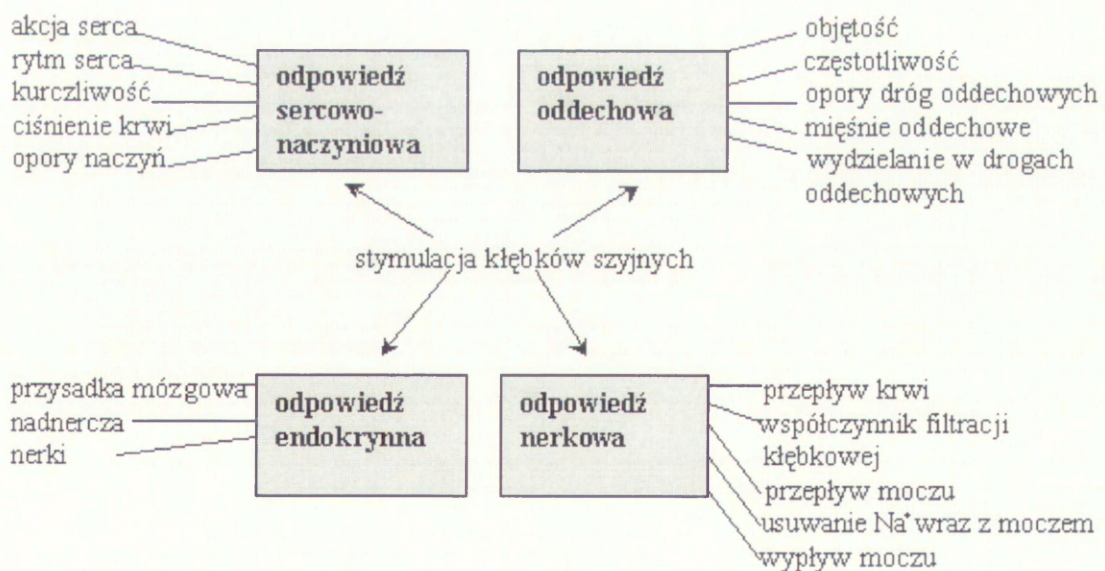
### **1.3. CZYNNOŚĆ KLĘBKÓW**

Pobudzenie wentylacji płuc jest podstawowym, widocznym efektem stymulacji kłębków szyjnych. Mogą one wpływać również na czynność innych mechanizmów odgrywających rolę w utrzymaniu homeostazy w organizmie ssaków (Fitzgerald, 2000). Moja praca koncentruje się na oddechowej funkcji kłębków szyjnych. Dla chemicznej regulacji oddychania zachodzącej za pośrednictwem kłębków szyjnych, podstawową

sprawą jest proces przekaźnictwa sygnału w komórce chemoreceptorowej, od momentu jego dotarcia do błony komórkowej poprzez przekształcenie wewnątrz komórki aż po zwiększoną „impulsację” bioelektryczną w zakończeniu nerwowym, prowadząca do pobudzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Mechanizmy te jednak wciąż wymykają się naukowej weryfikacji nie pozwalając na pełne zrozumienie problemu. W związku z tym stworzono szereg hipotez, które pomogłyby zobrazować procesy zachodzące we wnętrzu komórki kłębkowej oraz zidentyfikować pierwszorzędkowy „czujnik” tlenu. W czasie trwających dekady badań nad tym zagadnieniem wysunięto wiele hipotez co do natury tego „czujnika”.

Sugerowano, że czujnikiem tym mogą być komórki chemoreceptorowe kłębków szyjnych, aferentne włókna nerwowe, zwój skalisty, a nawet komórki podporowe (typ II) kłębków szyjnych (Fidone i wsp., 1988).



Ryc.3 Oddechowe i pozaoddechowe funkcje kłębków szyjnych.

Ostatnio przeprowadzone badania zdają się jednak potwierdzać słuszność wysuniętej, w 1926 roku, przez De Castro teorii, że przekaźnictwo sygnału rozpoczyna się w komórkach chemoreceptorowych (Ponte i wsp., 1989; Monteiro i wsp., 1996; Nurse i wsp., 1999). Pytanie jednak czy wszystkie komórki chemoreceptorowe są

wrażliwe na hipoksję pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi. Istnieje przypuszczenie, że komórki te nie stanowią homogennej populacji. Różnice między nimi polegają nie tylko na typie unerwienia (McDonald, 1977), ale również na kompozycji neuroprzekaźników w poszczególnych komórkach (Verna i wsp., 1993).

W związku z tym, że przekaznictwo sygnału może następować tylko w niektórych z nich, prawdopodobnie tych, które posiadają aferentne unerwienie, natomiast pozostałe, dzięki połączeniom międzykomórkowym, regulują aktywność tego procesu (Gonzalez i wsp., 1994). Bazując na ostatnio przyjętej teorii, że hipoksja powoduje uwolnienie neuroprzekaźników z komórek chemoreceptorowych kłębków szyjnych zwiększając tym samym częstość wyładowań w aferentnych zakończeniach nerwowych, skupiono się na problemie, w jaki sposób zmiany poziomu tlenu we krwi tętniczej mogą powodować uwolnienie neuroprzekaźników.

Jednym z domniemanych „czujników” tlenu może być hem i/lub białka, wrażliwe na zmiany stanów redox, znajdujące się w błonie komórkowej komórek chemoreceptorowych oraz procesy biochemiczne powiązane z tymi białkami (Lahiri i wsp., 2001). Innym natomiast mogą być kanały  $K^+$ , których zablokowanie pod wpływem hipoksji powoduje zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego  $K^+$ , depolaryzację błony komórkowej, napływ  $Ca^{2+}$  do komórki i uwolnienie neuroprzekaźników na drodze egzocytozy.

### **Rola cytochromów mitochondrialnych**

Za jeden z dominujących „czujników” tlenu uważa się cytochromy mitochondrialne. Wiele enzymów biorących udział w produkcji energii w mitochondriach posiada w swej budowie hem oraz duże powinowactwo do łączenia się z tlenem. Na tej podstawie sugerowano, że mitochondria mogą posiadać również cytochromy o bardzo niskim powinowactwie do tlenu, które pełniłyby funkcję

„czujników” tlenu. Poparciem tej hipotezy było odkrycie przez Biscoe i wsp. (1989), iż hipoksja depolaryzuje błonę mitochondrialną w kłębkach oraz, że substancje jak cyjanek czy antymycyna A powodują zahamowanie transportu elektronów w mitochondriach i rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej stymulując chemoreceptory kłębków szyjnych (Mulligan i wsp., 1982; Gonzalez i wsp., 1994). Wadą tej teorii jest jednak fakt, iż do tej pory nie zlokalizowano w kłębkach cytochromów o niskim powinowactwie do tlenu oraz brak wyjaśnienia, w jaki sposób stany oksydacyjne cytochromów mitochondrialnych mogą powodować zwiększoną aferentację nerwów. Teoria o pierwszoplanowej roli cytochromów mitochondrialnych łączy się bezpośrednio z najstarszą hipotezą dotyczącą przekaznictwa sygnału w kłębkach szyjnych, tzw. hipotezą metaboliczną, która zakładała, że zmniejszenie metabolizmu energetycznego komórki i związane z nim obniżenie produkcji ATP powoduje zahamowanie procesów biochemicznych zależnych od niego. Szybki rozwój technik badawczych w ostatnich latach umożliwił pomiar poziomu ATP w komórce ujawniając, iż hipoksja, jak i inne bodźce, w stężeniach maksymalnie stymulujących chemoreceptory nie obniża w istotny sposób ilości produkowanego ATP (Gonzalez i wsp., 2002). Brak obniżenia się poziomu ATP w komórkach może być jednak spowodowany początkowym wzrostem glikolizy, która utrzymuje ATP na poziomie pozwalającym na pobudzenie chemoreceptorów (Lahiri i wsp., 2001). Kolejnym dowodem na poparcie słuszności hipotezy metabolicznej jest wpływ światła na aktywność kłębków szyjnych, w obecności wysokiego poziomu CO. Wzrost PaCO z 75 do 550 mmHg stymuluje chemoreceptory w ciemności. Reakcja ta jest odwracana w obecności światła. Badania fotochemiczne wykazały, że widmo tworzącego się kompleksu  $[Fe^{2+}]$  hemoproteina + CO odpowiada absorpcji kompleksu cytochromu  $aa^3$  (cyt.  $aa^3$ ) i CO. Co może przemawiać za tym, że cyt.  $aa^3$  byłby „czujnikiem” tlenu (Lahiri i wsp., 2001)

## **Rola enzymów**

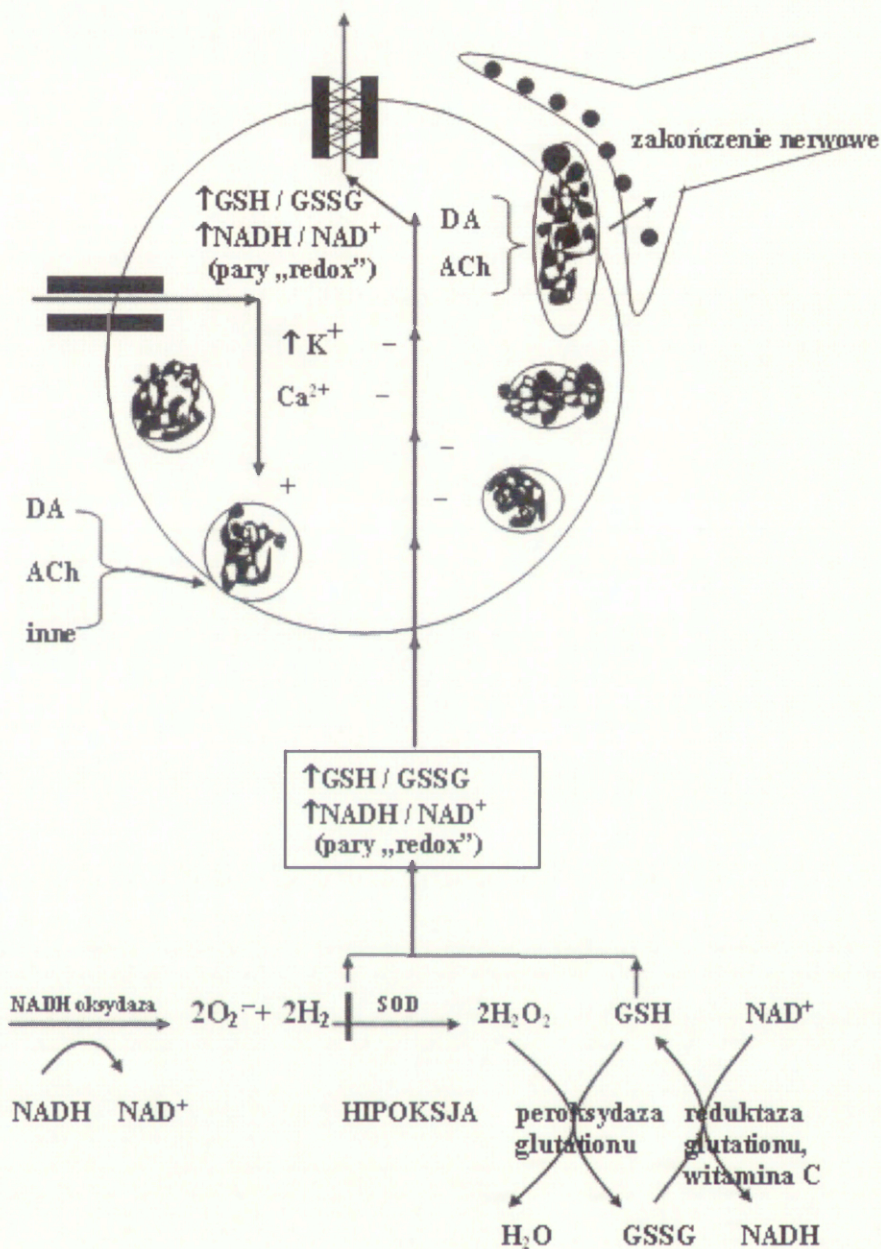
Niemitochondrialne enzymy takie jak NADPH-oksydaza, syntaza tlenku azotu (NOS) czy oksygenaza hemowa (HO), które w swej budowie również zawierają hem i wymagają tlenu do działania. Enzymy te występują w komórkach chemoreceptorowych kłębków szyjnych.

Początkowo NADPH-oksydaza była opisywana jako kompleks występujący wyłącznie w neutrofilach i generujący wolne rodniki tlenowe (głównie  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ). Dopiero Gorlach i wsp. (1993) zidentyfikowali w komórkach HepG2 niemitochondrialny cytochrom b558, który mógł odgrywać istotną rolę w procesie ekspresji genów podczas hipoksji. Późniejsze badania potwierdziły fakt, iż enzym ten występuje w błonie komórkowej komórek chemoreceptorowych. Jest on odpowiedzialny za produkcję wolnych rodników, w ilościach zależnych od ilości tlenu oraz za regulację aktywności kanałów  $K^+$ . Badacze jednak nie są zgodni, co do tego czy poziom wolnych rodników spada (Acker, 1993; Archer i wsp., 1993; Paky i wsp., 1993; Halliwell i wsp., 1999; Prabhakar i wsp., 2000) lub wzrasta (Chandel i wsp., 2000a; Chandel i wsp., 2000b; Kietzmann i wsp., 2000; Lahiri i wsp., 2001; Gonzalez i wsp., 2002) w czasie hipoksji, co powoduje zahamowanie kanałów  $K^+$ , depolaryzację błony komórkowej, aktywację kanałów  $Ca^{2+}$ , napływ  $Ca^{2+}$  do komórki i uwolnienie neuroprzekaźników. Wielu badaczy uważa NADPH-oksydazę za pierwszoplanowy „czujnik” tlenu (Cross i wsp., 1990; Kummer i wsp., 1995). Równoległe prowadzone badania dowodzą jednak, że NADPH-oksydaza może nie odgrywać kluczowej roli w mechanizmach wyczuwania zmian ciśnienia parcjalnego tlenu. Obeso i wsp. (1999) zaobserwowali, że podanie selektywnych inhibitorów dla NADPH-oksydazy, jakimi są neopteryna czy tlenek arsenu, nie wywołuje efektu hipoksji czy sekrecji katecholamin z kłębków szyjnych.



## Rola kanałów jonowych

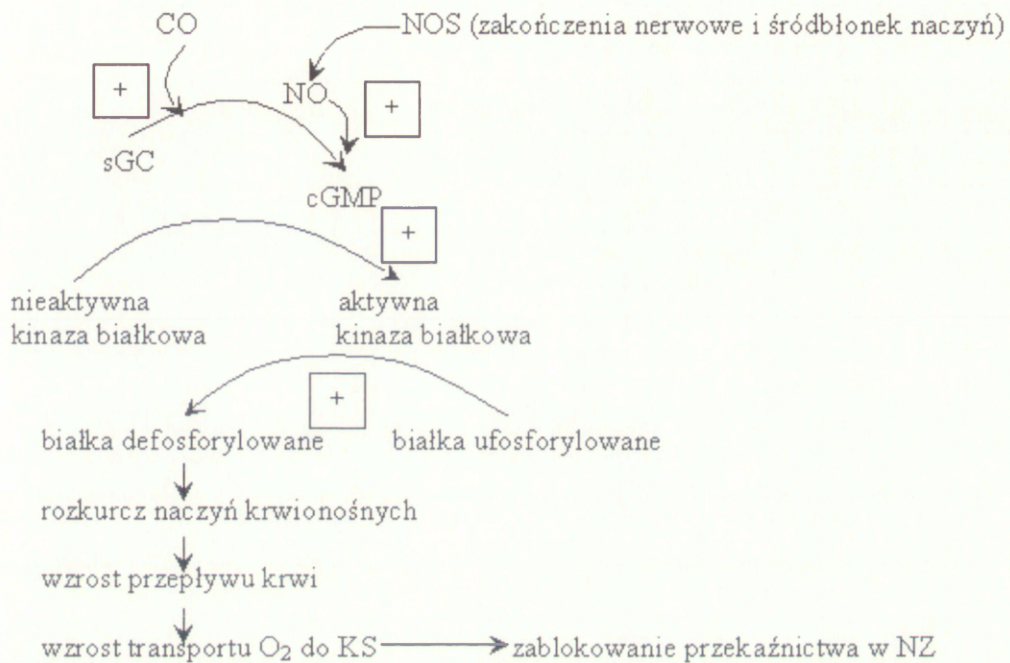
Prabhakar i wsp. (2000) zasugerowali kanały jonowe jako główny „czujnik” tlenu. Jednak ze względu na różnorodność w ich budowie, wyróżnia się przynajmniej cztery typy kanałów  $K^+$ . W zależności od gatunku zwierzęcia oraz odmienności mechanizmów, które modulują prąd potasowy, sugeruje się, że zahamowanie kanałów  $K^+$  nie zachodzi bezpośrednio pod wpływem niskiego  $P_{aO_2}$ , ale także za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych stanów redox (GSH/GSSG). Wzrost współczynnika GSH/GSSG podczas hipoksji być może powoduje zmianę ilości tioli i dwusiarczków w białkach kanałowych, przez co zmienia się przewodnictwo kanałów prowadząc do depolaryzacji błony i aktywacji kanałów wapniowych (L, N, P, Q, R), co odbywa się przy współudziale kinazy białkowej. Największy udział w tym procesie odgrywają kanały wapniowe typu L. Istnieją również dowody na to, że wysoki poziom wapnia, który jest bardzo istotny w procesie przekazywania sygnału hipoksyjnego nie zależy tylko od aktywności kanałów wapniowych, ale również od uwolnienia zasobów  $Ca^{2+}$  znajdujących się w mitochondriach i siateczce endoplazmatycznej (ER). Jednak same zasoby wapniowe (przy zablokowanych kanałach  $Ca^{2+}$ ) nie wystarczą do zainicjowania sekrecji neuroprzekaźników i zwiększenia ilości wyładowań w nerwie zatokowym (Lahiri i wsp., 1996; Pozzan i wsp., 2000; Lahiri i wsp., 2001). Głównym zarzutem dla, wydawałoby się logicznej, hipotezy kanałowej jest to, że kanały potasowe ulegają maksymalnemu zahamowaniu przy  $P_{aO_2}$  równym 85 mmHg, a nie przy 30-40 mmHg, kiedy to następuje maksymalne uwolnienie neuroprzekaźników i pobudzenie kłębków szyjnych. Jak do tej pory, najbardziej prawdopodobna wydaje się być hipoteza mieszana, którą obrazuje Ryc.4, gdzie wszystkie elementy współgrają ze sobą wzajemnie się uzupełniając.



Ryc.4 Schemat przedstawia proponowany model przekazywania sygnału nerwowego w komórkach chemoreceptorowych kłębków szyjnych. (Ramadan A. i wsp. *Current Pneumology* 4: 65-69, 2000). Reprodukacja za zgodą wydawcy.

Na funkcjonowanie kłębków w istotny sposób wpływają również tlenek azotu (NO) i tlenek węgla (CO). Są to gazowe neuromodulatory o podobnej masie cząsteczkowej (30,01 i 28,01 g/mol), które oddziałują na aktywność kłębków szyjnych poprzez regulację przepływu krwi. Ponadto NO może ograniczać zużycie tlenu poprzez współzawodnictwo z tlenem o miejsce w ferocytochromie  $a_3$  znajdującym się

w mitochondriach. Może on modulować neurosekrecję poprzez kontrolowanie poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cGMP-zależnym mechanizmie. Może również zmniejszać produkcję  $\text{H}_2\text{O}_2$  poprzez wyłapywanie anionów nadtlenkowych (Ryc.5).



Ryc. 5 Regulacja aktywności nerwu zatokowego poprzez CO i NO na drodze procesów cGMP zależnych. Kłębki szyjne (KS), nerw zatokowy (NZ) (zmodyfikowana za Lahiri i wsp., *Int. J. Biochem. Cell B.* 33: 755-774, 2001).

### Rola neuroprzekazników

Większość teorii dotyczących mechanizmów chemorecepcji w kłębkach szyjnych uwzględnia w nich udział neuroprzekazników i neuromodulatorów. Do tej pory w kłębkach szyjnych zidentyfikowano szerokie spektrum neuroprzekazników i neuromodulatorów, których rola nie jest w pełni poznana. Do najważniejszych z nich zalicza się: acetylocholinę, katecholaminy, adenozyne, bombazyne, cholocystokininę, galaminę, neuropeptyd Y, peptydy opioidowe, prostacykliny, serotoninę, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), natridiuretyczny peptyd przedsionkowy, tachikininę oraz wiele innych. Do pierwszoplanowej roli w kłębkach szyjnych pretenduje przede wszystkim acetylocholina (ACh) i dopamina (DA). Hipoteza cholinergiczna jest najstarszą dotyczącą przekąźnictwa sygnału w kłębkach szyjnych. Kluczową rolę w niej

odgrywa ACh. Na rozwój tej hipotezy niewątpliwie miał wpływ Dale, który w 1914 roku jako pierwszy wyizolował ACh i zademonstrował wpływ tego neuroprzekaźnika na nerwy parasympatyczne (Nurse i wsp., 1999; Fitzgerald, 2000). Wydawałoby się, że ACh jest idealnym neuroprzekaźnikiem. Przemawiało za tym odkrycie w komórkach chemoreceptorowych acetylotransferazy cholinowej (ChAT), enzymu odpowiedzialnego za syntezę ACh, receptorów M1 i M2 oraz zjawiska zwiększania wydzielania ACh podczas hipoksji. Główny dowód świadczący przeciwko ACh polegał jednak na tym, że choć blokery cholinergiczne hamują odpowiedź kłębków na acetylocholinę, to nie hamują ich odpowiedzi na hipoksję lub inne bodźce (Gonzalez i wsp., 1994). Ostatnio hipoteza cholinergiczna zaczyna ponownie odżywać. W latach 1994-2000 Fitzgerald udowodnił, że perfuzja kłębków szyjnych normoksyjnym płynem Ringera zawierającym odpowiednio galaninę (bloker receptorów muskarynowych M2), piranzepinę (bloker receptorów M1), atropinę (bloker M1 i M2) oraz mylanyloaminę (bloker receptorów nikotynowych) powoduje znaczne zmniejszenia efektu wywołanego hipoksją w przypadku wszystkich wspomnianych blokerów, z wyjątkiem galaniny, gdzie zaobserwowano wzrost odpowiedzi. Sugeruje to, że receptory M2 mają hamujący wpływ na czynność chemoreceptorów, ale ich udział w odpowiedzi na hipoksję jest słabszy w porównaniu z pobudzającym wpływem receptorów M1 (Fitzgerald, 2000). Niewyjaśnione pozostaje jednak czy substancje te zmniejszają ilości produkowanej ACh poprzez blokadę receptorów presynaptycznych czy postsynaptycznych.

Dopamina (DA) jest główną katecholaminą występującą w kłębkach szyjnych. Podobnie jak ACh spełnia wszystkie kryteria, jakie powinien spełniać neuroprzekaźnik. Zarówno DA jak i enzymy limitujące jej syntezę obecne są w komórkach chemoreceptorowych kłębków szyjnych. Hipoksja i inne bodźce powodują uwolnienie DA w ilościach zależnych od siły bodźca i od aktywności w nerwie zatokowym. Jednak

egzogennie podana DA, w zależności od gatunku i od dawki czy okoliczności doświadczalnych, powoduje hamujący efekt na aktywność chemoreceptorów (Gauda i wsp., 2000). Gonzalez i wsp. (1994) zaproponowali hipotezę o istnieniu presynaptycznych autoreceptorów D<sub>2</sub> na komórkach typu I, które mają duże powinowactwo do DA. W związku z tym niskie dawki DA powodują blokadę dalszego wydzielania DA, natomiast postsynaptyczne receptory D<sub>2</sub> o małym powinowactwie do DA, zostają pobudzone przez dużą dawkę DA.

#### **1.4. ODPOWIEDŹ ODDECHOWA NA HIPOKSJĘ**

Odpowiedź oddechowa na ostrą hipoksję hipoksyjną, czyli związaną z niedoborem tlenu w powietrzu wdychanym i konsekwentnie w pęcherzykach płucnych i krwi tętniczej jest podstawowym wskaźnikiem stanu czynności układu oddechowego. Odpowiedź ta wykazuje znaczne różnice w zależności od metody badawczej, siły bodźca, czy czasu jego działania. Stosuje się kilka metod na określenie tej odpowiedzi. Najczęściej używaną metodą jest tzw. metoda „steady-state” polegająca na wdychaniu mieszaniny gazów o stałym poziomie tlenu. Wentylacja zaczyna wzrastać w ciągu kilku sekund od podania bodźca, osiągając maksimum po kilku minutach od początku testu. Po następnych kilku minutach następuje spadek wentylacji utrzymujący się jednak powyżej linii podstawowej. Test kontynuuje się zwykle do momentu fazy depresji, tzw. „roll-off”, którego etiologia nie jest w pełni wyjaśniona. Przy obniżeniu poziomu PaO<sub>2</sub> do około 40 mmHg wentylacja płuc zwykle podwaja się. W metodzie tej zwykle, choć nie zawsze, utrzymuje się drugi bodziec chemiczny, CO<sub>2</sub>, na stałym poziomie, by uniknąć interakcji między bodźcami i by mierzona odpowiedź oddechowa związana była z czynnością tylko jednej grupy chemoreceptorów. W przypadku hipoksji chodzi

o chemoreceptory kłębków szyjnych. W mojej pracy zastosowałam tę technikę do badania odpowiedzi oddechowych na ostrą hipoksję o dwóch poziomach nasilenia bodźca, co umożliwia określenie nie tylko odpowiedzi oddechowej, ale i jej wzmocnienia, tzw. „gain”, wraz z narastaniem siły bodźca.

Inną metodą jest test progresywnej hipoksji polegający na oddychaniu zwrotnym. Wdychany jest ten sam gaz, który został usunięty z płuc, w związku z tym zawartość tlenu stopniowo maleje. Test ten trwa kilka minut, a kształt odpowiedzi jest hiperboliczny i zaczyna gwałtownie narastać po obniżeniu  $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$ . W metodzie tej wentylacja płuc nie osiąga stałego poziomu, narasta stale wraz z pogłębiającym się spadkiem zawartości tlenu we wdychanej mieszance gazowej. Jeszcze inna metoda, rzadziej stosowana, opiera się na interakcji między bodźcami hipoksyjnymi i hiperkapnicznymi. Bada się odpowiedź na hiperkapnię, metodą zwrotnego oddychania, przy wysokim i niskim poziomie tlenu w mieszance wdychanej. Różnica w nachyleniu linii regresji opisującej odpowiedź oddechową na  $\text{CO}_2$  określana jest jako wyraz napędu hipoksyjnego, gdyż spowodowana jest różnym nasileniem stosowanych bodźców hipoksyjnych. Metoda ta zwykle związana jest z trudnościami interpretacyjnymi związanymi ze skojarzeniem dwóch bodźców chemicznych oddziałujących na te same receptory. Istnieje też metoda polegająca na podaniu czystego tlenu na 1-3 wdechy w trakcie oddychania mieszanką hipoksyjną. Jest to tzw. test Dejour'a. Z wielkości zahamowania oddychania hipoksyjnego przez tlen, który wyłącza kłębki szyjne, oblicza się udział kłębków, czyli czułość odpowiedzi na hipoksję. Metoda ta jest mało dokładna i wymaga wielokrotnego powtarzania dla poprawnej interpretacji wyników.

## **1.5. ZMIANY ODPOWIEDZI ODDECHOWEJ NA HIPOKSJĘ ZALEŻNE OD WIEKU**

Od lat odpowiedź oddechowa na hipoksję podlega wnikliwym badaniom. Badany jest między innymi wpływ wieku na tę odpowiedź. Badacze nadal jednak nie są zgodni, co do tego wpływu. Wielu z nich twierdzi, iż wiek powoduje osłabienie odpowiedzi na hipoksję (Peterson i wsp., 1981; Poulin i wsp., 1993; Klawe i wsp., 2003), czasem niemal o połowę (Kronenberg i wsp., 1973), inni natomiast twierdzą, że odpowiedź ta zmienia się w minimalnym stopniu lub wcale (Hirshman i wsp., 1975; Ahmed i wsp., 1991; Smith i wsp., 1992; Marczak i wsp., 2002).

Starzenie jest procesem bardzo złożonym. Można zatem przypuszczać, iż na spadek odpowiedzi oddechowej na hipoksję (zakładając, że taki istnieje) wpływa szeroka gama czynników. Pierwszym źródłem zmian w reaktywności odpowiedzi oddechowej może być ośrodkowy układ nerwowy (OUN), a dokładniej szybkość, z jaką są generowane i przewodzone impulsy nerwowe. O tym, że aspekt ośrodkowy istnieje, może świadczyć spadek ciśnienia okluzji w trakcie testu hipoksyjnego z wiekiem (Peterson i wsp., 1981). Ciśnienie to jest wykładnikiem mózgowego napędu oddechowego. Jest ono mierzone w jamie ustnej w 100 lub 200 ms od początku wdechu, a więc w okresie, w którym brak jeszcze przepływu powietrza w drogach oddechowych i odzwierciedla siłę skurczu izometrycznego mięśni wdechowych (Whitelaw i wsp., 1975). Drugim etapem, na którym mogą występować zaburzenia, jest mechanika płuc i klatki piersiowej. Objawiają się one między innymi osłabieniem siły i sprężystości mięśni oddechowych, a także zmniejszeniem się powierzchni oddechowej płuc spowodowanej zanikiem pęcherzyków płucnych i przyrostem tkanki łącznej. Degeneracji ulegają włókienka elastynowe stanowiące strukturalną podporę dla

pęcherzyków płucnych. Wraz z wiekiem zmienia się ich stosunek do włókienek kolagenowych, który w młodym wieku wynosi 2:3. Zmianie ulega również skład i szybkość produkowanego surfaktantu (Peterson i wsp., 1981; Poulin i wsp., 1993). Odbiciem spadku dynamicznej podatności płuc i klatki piersiowej są zwiększone opory oddechowe, zwłaszcza w drobnych drogach oskrzelowych, powodujące wzrost czynnościowej pojemności zalegającej i spadek pojemności życiowej płuc. Zmiany w odpowiedzi oddechowej mogłyby być także spowodowane procesami zachodzącymi z wiekiem w parenchymie kłębków szyjnych. Jednak procesy te i ich etiologia nie są dotąd w pełni poznane. Patrz podrozdział 1.9. (Badania nad kłębkami szyjnymi).

## **1.6. ZMIANY W TĘTNICACH SZYJNYCH ZWIĄZANE Z WIEKIEM**

Czynność kłębków szyjnych jest bezpośrednio uzależniona od bogatej sieci naczyniowej zaopatrującej organ w krew tętniczą i od kontaktu kapilar z komórkami chemoreceptorowymi umożliwiającemu natychmiastową percepcję spadku ciśnienia parcjalnego tlenu. Kłębki szyjne znajdują się w miejscu rozwidlenia tętnicy szyjnej na tętnicę zewnętrzną i wewnętrzną. Wszelkie rozwidlenia i zagięcia naczyń, ze względu na zawirowania w przepływie krwi, są najbardziej narażone na powstawanie blaszki miażdżycowej (Sachais, 2002). Badania Zarinsa i wsp. (1983) wykazały, że tętnica szyjna wewnętrzna jest znacznie bardziej narażona na zmiany miażdżycowe niż tętnica zewnętrzna czy wspólna. Tętnica zewnętrzna i wewnętrzna należą do tzw. tętnic typu mięśniowego. Poza tym można wyróżnić także tętnice typu sprężystego oraz tętnice małe tzw. tętniczki. Wszystkie one określane są wspólną nazwą; tętnic właściwych, których średnica przekracza 50  $\mu\text{m}$ . Ich ściany zbudowane są z kilku warstw i typów komórek. Najbardziej wewnętrzną stanowi warstwa komórek śródbłonkowych, którą od zewnątrz otacza błona podstawna oraz warstwa włókien kolagenowych tworząca tzw.



błone elastynową wewnętrzną. Poniżej tej warstwy leżą komórki mięśni gładkich, między którymi przebiegają włókna nerwowe, których zakończenia stykają się z najbardziej zewnętrzną warstwą miocytów otoczonych włóknami kolagenowymi, tworzącymi grubą błonę elastynową zewnętrzną zwaną również przydanką.

Śródbłonek naczyniowy długo postrzegano jako „warstwę celofanu zawierającą jądra komórkowe”, tzn. bierną, choć selektywną warstwę wyścielającą naczynia krwionośne i limfatyczne, pełniącą rolę mechanicznej przegrody pomiędzy krwią a otaczającym naczynia tkankami. Dopiero w latach 60 XX wieku Sir Howard Fleming skorygował tę teorię (Chłopicki i wsp., 2002). Rozwój technik badawczych w latach 70-80 pozwolił na dokładniejsze poznanie ultrastruktury komórek śródbłonkowych, ich interakcji z komórkami krwi, odkrycie mediatorów śródbłonkowych oraz ich czynności biochemicznych. Komórki śródbłonkowe są jednojądrowymi elementami o wielokątnym lub wydłużonym kształcie, szerokości 10-15  $\mu\text{m}$  i długości 25-50  $\mu\text{m}$  (Socha, 1996). Oprócz typowych organelli komórkowych zawierają charakterystyczne tylko dla nich struktury cytoplazmatyczne zwane ciałkami Weibla-Palade'a. Struktury te związane są z sekrecją czynnika von Willebranda, będącego białkiem nośnikowym VIII czynnika krzepnięcia. Ponadto, w komórkach śródbłonkowych znajdują się liczne pęcherzyki pinocytarne transportujące przeróżne substancje. Na transport przez ścianę naczynia ma wpływ także typ połączeń między komórkami. Opisane zostały następujące typy: strefy zamykające (zonulae occludante, fuscia occludens), połączenia typu nexus (gap junction), strefy przylegania (zonulae adherentes) oraz syndesmosy (complexus adherentes). Lokalizacja ich jest uzależniona od umiejscowienia oraz od funkcji narządu. Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym wyróżniono trzy zasadnicze typy śródbłonek:

- a) bezokienkowy występujący głównie w mięśniach, ośrodkowym układzie nerwowym, siatkówce, grasicy i gruczołach płciowych
- b) okienkowy
- z okienkami otwartymi np. w kłębuszkach nerkowych
  - zamkniętymi przeponą: w gruczołach dokrewnych, kosmkach jelitowych, ciałku rzęskowym, splocie naczyńówkowym
- c) nieciągly - jego cechą oprócz okienek jest obecność niepełnej błony podstawnej. Występuje w naczyniach zatokowych w wątrobie, szpiku i śledzionie (Risau, 1995).
- Różnorodność komórek śródbłonkowych związana jest nie tylko z cechami morfologicznymi czy funkcjonalnymi, ale także z ich antygenowością i charakterystyką biochemiczną. Oprócz odrębności w ekspresji antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC) śródbłonki różnią się między sobą także receptorami powierzchniowymi, syntezą cytokin i aktywnością enzymów. Tę różnorodność wykazano nie tylko pomiędzy naczyniami, ale nawet w obrębie tego samego naczynia.
- Cechą charakterystyczną komórek śródbłonkowych jest bogactwo produkowanych przez nie substancji biologicznych mogących regulować czynność naczyń. Do najbardziej znanych należy tlenek azotu (NO) wytwarzany przez syntazę tlenku azotu (NOS-3, charakterystyczna dla komórek śródbłonkowych), prostacyklina, prostaglandyny, metabolity kwasu arachidonowego oraz metabolity N-arachidonylofosfatydyloetanolaminy. Ponadto inne mediatory lipidowe (np. PAF, LTC<sub>4</sub>), peptydowe (np. endotelina-1) oraz mediatory drobnocząsteczkowe jak anion nadtlenny (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nadtlenek wodoru wytwarzany przez NAD(P)H i tlenek węgla (CO) wytwarzany przez oksygenazę hemową. Poza tym, śródbłonek produkuje całą gamę mediatorów homeostazy naczyniowej takich jak: plazminogen tkankowy (TPA), inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), trombomodulina, białko C, czynnik

tkankowy (TF), inhibitor czynnika tkankowego (TFPI) aktywowany przez trombinę, inhibitor fibrynolizy (TAFI), czy czynnik von Willebranda. Ważną rolę spełniają również czynniki wzrostowe (GM-CSF, TGF $\beta$ , IGF-1), cytokiny (IL-6, IL-8) oraz chemokiny (MCP-1). Od współdziałania wszystkich elementów zależy utrzymanie prawidłowej czynności śródbłoków, a co za tym idzie homeostazy w układzie krążenia.

Obecnie wiadomo, że dysfunkcja śródbłoków towarzyszy nie tylko chorobom typu kardiopatologicznego, ale również miażdżycy, nadciśnieniu płucnemu i systemowemu, niewydolności krążenia, wstrząsowi septycznemu, ARDS, cukrzycy, chorobom endokrynologicznym, reumatoidalnemu zapaleniu stawów, rzucawce, zespołowi policystycznych jajników czy anemii sierpowatej (Quyyumi, 1998). Mechanizmy prowadzące do upośledzonej czynności śródbłoków nie są w pełni poznane. Można przypuszczać, że pewne elementy tego upośledzenia są wspólne dla różnych chorób, inne natomiast są przypisane tylko ściśle określonej chorobie. Na płaszczyźnie biochemicznej, poznanym wspólnym elementem dla wszystkich wymienionych patologii jest upośledzenie produkcji NO. Jednak mechanizmów prowadzących do upośledzenia produkcji NO może być bardzo wiele np. niedobór kofaktora syntazy NO takiego jak tetrahydrobiopteryna (BH<sub>4</sub>) i substratu jak L-argininy (przy ich niedoborze NOS staje się reduktazą i wytwarza O<sub>2</sub><sup>-</sup> zamiast NO), czy podwyższony poziom niesymetrycznej L-metylo-argininy będącej endogennym inhibitorem NOS-3. Zmniejszona aktywność NO może być także spowodowana zwiększoną produkcją O<sub>2</sub><sup>-</sup> przez oksydazę NAD(P)H. Do dezaktywacji NOS może prowadzić również jej glikozylacja lub zwiększona aktywność kaweoliny-1 tworzącej z NOS-3 nieaktywny kompleks (Feron i wsp., 2001). Poza tym zwiększona ekspresja NOS-2 (charakterystycznej dla komórek nerwowych) może również wtórnie upośledzać

aktywność NOS-3. Ostatnio kładzie się nacisk na stres oksydacyjny powstający na skutek nadmiernej produkcji  $O_2^-$ , a także zmniejszonej produkcji dysmutazy nadtlenkowej (SOD) i reduktazy glutationowej (GSH) (Robert, 1996; Barton i wsp., 1997; Nickering i wsp., 2002).

Wyróżnione zostały trzy typy SOD: SOD mitochondrialna zawierająca mangan, SOD cytozolowa zawierająca w swej budowie miedź i cynk oraz SOD zewnątrzkomórkowa. Najważniejszą rolę w regulacji biosyntezy NO odgrywa SOD cytozolowa, której inhibicja powoduje produkcję NO, a także pewnych ilości azotynów i azotanów. SOD jest głównym elementem systemu chroniącego organizm przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Mając duże powinowactwo do  $O_2^-$  konkuruje z NO, dzięki czemu unieszkodliwia rodnik tlenowy, a także zapobiega powstawaniu rodników peroksynitrylowych i hydroksylowych, które są głównymi sprawcami uszkodzeń w komórkach, oraz utlenieniu grup sulfhydrolowych i lipidów o niskiej gęstości (LDL).

## **1.7. PRZYCZYNY POWSTAWANIA DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKÓW W MIAŻDŻYCY ORAZ GŁÓWNE ETAPY TEGO PROCESU**

Wszelkie znane dotychczas czynniki ryzyka miażdżycy takie jak: nadciśnienie, palenie, cukrzyca, dna moczanowa, menopauza, otyłość, brak ruchu, hipercholesterolemia, hiperhomocysteinemia, wiek, obciążenie dziedziczne, stres psychiczny, uszkodzenia mechaniczne czy czynniki infekcyjne prowadzą do dysfunkcji śródbłonek. Uszkodzony śródbłonek stanowi wrota dla związków lipidowych, które wnikają do wnętrza ściany naczynia na drodze tzw. transcytozy, czyli poprzez cytoplazmę lub w miejscach kontaktu pomiędzy sąsiadującymi komórkami

śródbłonkowymi. Tam ulegają utlenieniu w wyniku reakcji zachodzących w komórkach śródbłonkowych, komórkach mięśni gładkich i makrofagach.

Pierwszy etap powstawania miażdżycy polega na interakcji leukocytów, monocytów czy płytek krwi z aktywowanymi komórkami śródbłonka. Proces rozpoznania i adhezji uwarunkowany jest przez wzajemne rozpoznanie cząsteczek eksponowanych na powierzchni błony komórkowej obydwu „partnerów” tego procesu, tj. śródbłonka i komórek adherujących. W zależności od typu komórek biorących udział w procesie adhezji, ekspresji ulegają różne selektyny (L, E, P), dla których ligandami są odpowiednie reszty oligosacharydowe eksponowane na powierzchni komórki. Oddziaływania selektyna/oligosacharydów są dosyć słabe i mogą zostać odwrócone w ciągu kilku sekund, dlatego stabilizują je związki zwane integrynami (np. PECAM-1, ICAM, VCAM). Po silnej adhezji, pod wpływem chemoatraktyn, leukocyty czy monocyty rozpoczynają transmigrację w głąb ściany naczynia. Kluczową rolę w tym etapie odgrywają, podobnie jak w poprzednim, PECA-1, ICAM a także MCP-1 i oxy-LDL. Zmodyfikowane cząsteczki LDL są wychwytywane przez specyficzne receptory eksponowane na powierzchni makrofagów (SR-A i CD36). Wchłonięty przez makrofagi cholesterol nie podlega cyklowi regulacji, przez co nie zostaje zahamowana synteza cholesterolu wewnątrz komórek. Makrofagi z nadmiarem fagocytowanego cholesterolu w swoim wnętrzu przekształcają się w tzw. komórki piankowe, które obumierając uwalniają zgromadzony cholesterol. Utleniony LDL indukuje migrację i proliferację komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów, zaburzając tym samym rozkurcz i przyczyniając się do wzrostu produkcji ET-1, a przez zwiększoną agregację płytek wyzwalając proces krzepnięcia. W chwili, gdy dochodzi do rozplemu fibroblastów ściana naczynia ulega pogrubieniu, przez co spada jej sprężystość, a także dochodzi do zmniejszenia się światła naczynia, a więc też dopływu krwi do narządów.

Tkanka łączna zaczyna „obracać” rdzeniem blaszki miażdżycowej ze złogów cholesterolu i komórek piankowatych, czyniąc całą strukturę bardziej spoistą. Powstające w ten sposób patologiczne struktury tworzą dogodne warunki do odkładania się soli wapnia (apatytu i innych). Takie zjawisko określane jest mianem wapnienia heterotropowego (obcosiedliskowego) następującego przy fizjologicznym stężeniu wapnia w surowicy i płynach ustrojowych.

## 1.8. SYNTAZA TLENKU AZOTU

NO początkowo identyfikowano jako śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia krwionośne (EDRF). Gaz ten jest bardzo nietrwały szczególnie w środowisku biologicznym (5-30 s) (Hibbs i wsp., 1987; Delaney i wsp., 1993) i ma charakter wolnego rodnika. Reaguje z tlenem oraz z cząsteczkami zawierającymi niesparowane elektrony takimi jak: anion nadtlenkowy, jony metali czy zredukowany glutation przekształcając się w nietrwałe związki wchodzące w reakcję ze składnikami komórki. Tlenek azotu powstaje w organizmie pod wpływem jednego z trzech izoenzymów syntazy tlenku azotu (NOS), przekształcających L-argininę do L-cytruliny (Loesch i wsp., 1998, praca przeglądowa). Proces ten wymaga obecności kofaktorów: fosforanodwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), tetrahydrabiopteryny (BH<sub>4</sub>) oraz mono- i dwunukleotydu flawinowego (FMN i FAD). Alternatywnie L-arginina może być również metabolizowana z udziałem arginazy do ornityny i mocznika (Harrison, 1997).

Poszczególne izoformy NOS różnią się między sobą strukturą, kofaktorami i umiejscowieniem w komórce. Dwie spośród nich ulegają konstytutywnej ekspresji głównie w neuronach (NOS I, nNOS, 150-160 kDa) oraz w komórkach śródbłonka (NOS III, eNOS, 135 kDa). Ich funkcjonowanie uzależnione jest od

wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia oraz kalmoduliny. Aktywność syntaz konstytutywnych pozostaje pod kontrolą modulatorów takich jak acetylocholina, trombina, ADP, bradykinina czy innych czynników fizykochemicznych, które prowadzą do wzrostu poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  (Wójcik i wsp., 2001).

Natomiast trzecia z nich (NOS II, iNOS, 130 kDa) ulega indukcji w makrofagach lub innych komórkach. Dzieje się to pod wpływem licznych cytokinin, lecz bez udziału wapnia i kalmoduliny (Marletta, 1993). Poszczególne izoformy NOS są kodowane przez geny umiejscowione w trzech różnych chromosomach. W chromosomie 7 znajduje się gen odpowiedzialny za produkcję eNOS, w 12 nNOS, a w 17 iNOS (Zdzisińska i wsp., 1998).

## 1.9. BADANIA NAD KLĘBKAMI SZYJNYMI

Badania nad kłębkami szyjnymi, z wyjątkiem badań czynnościowych, mają głównie charakter eksperymentalny na zwierzętach. Czynność kłębków, oceniana jako czułość odruchu hipoksyjnego, może być badana u ludzi. Badania morfologiczne są jednak niezwykle trudne lub niemożliwe, ponieważ wymagają perfuzji utrwalającej narząd przez serce lub natychmiastowego utrwalenia materiału po jego pobraniu, by zapobiec jatrogennym zmianom wynikającym z niedotlenienia komórek chemoreceptorowych w wyniku ustania krążenia. Dodatkowe trudności wynikają z niewielkiego rozmiaru kłębków i utrudnionego do nich dostępu. Problemy te wywarły wpływ na prowadzone przeze mnie badania. Odnośnie wpływu wieku na kłębki dostępna była dla mnie tylko jedna praca morfologiczna wykonana na ludziach. Autorzy tej pracy badali morfologię kłębków szyjnych na poziomie mikroskopii świetlnej. Kłębki zostały pobrane od ludzi w podeszłym wieku (60-100 lat) metodą *post mortem* (Lowe i wsp., 1987). Opisano zmiany degeneracyjne i rozrost tkanki łącznej w obrębie parenchymy organu. Jednocześnie stwierdzono też zaawansowane zmiany

miażdżycowe w dużych tętnicach doprowadzających krew do kłębków, które są spodziewane u ludzi w tym przedziale wiekowym. W pracy tej nie badano czynności kłębków szyjnych. U zwierząt, wpływ wieku na ultrastrukturę i funkcję kłębków szyjnych nie był do tej pory systematycznie badany. Wyniki tych badań są kontrowersyjne. Stwierdzono upośledzenie (Fukuda, 1992) lub brak istotnych zmian w reaktywności oddechowej na hipoksję u starych szczurów, a nawet jej zwiększenie u starych samic w porównaniu z młodymi (Schlenker i wsp., 1985). W parenchymie kłębków szczurzych w nielicznych pracach na ten temat stwierdzono pewne zmniejszenie liczby komórek chemoreceptorowych oraz ich przebudowę a także rozrost tkanki łącznej. Zmiany te miały jednak niejednorodny charakter i nie pozwalały na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków (Nouhouayi i wsp., 1981; Di Giulio i wsp., 2003). Pojawia się więc pytanie badawcze nie tylko o charakter zmian w komórkach chemoreceptorowych rozwijających się z wiekiem w kłębkach szyjnych, lecz nade wszystko czy zmiany takie są wynikiem procesu starzenia się kłębków *per se*, czy też są wtórne do innych procesów zachodzących jednocześnie, jak np. upośledzenie dopływu krwi do kłębków w związku z rozwojem uogólnionych naczyniowych zmian miażdżycowych. W mojej pracy podjęłam próbę odpowiedzi na to pytanie, formułując poniższą hipotezę badawczą i wykonując badania u starych szczurów, gatunku, u którego w normalnych warunkach proces starzenia nie przebiega z wyraźnie zaznaczonymi zmianami miażdżycowymi w naczyniach, podobnymi do tych u starszych ludzi (Constantinides, 1977; Robert, 1996). Brak takich zmian miażdżycowych został także przeze mnie wstępnie potwierdzony (opis w sekcji Wyniki na str. 46-49).



## **HIPOTEZA BADAWCZA**

Jeżeli chemoreceptory starych kłębków szyjnych ulegałyby morfologicznej degeneracji przy jednoczesnym braku zmian miażdżycowych w naczyniach doprowadzających krew do kłębków, to mogłoby to świadczyć o niezależnym procesie starzenia się zachodzącym w kłębkach. Pozostaje sprawą otwartą, czy zmiany morfologiczne miałyby swoje odzwierciedlenie w osłabionej czynności kłębków, objawiającej się zmniejszeniem generowanej przez nie odpowiedzi oddechowej na hipoksje, czy też mechanizmy kompensujące zapewniają prawidłową czynność chemoodruchu.

## **2. CELE PRACY**

### **2.1. CEL OGÓLNY**

Ogólnym celem pracy jest ultrastrukturalna i czynnościowa ocena kłębków szyjnych u szczura w trakcie procesu starzenia się. Ocena ta ma posłużyć do określenia wzajemnej relacji między ultrastrukturą a czynnością narządu oraz tego czy zmiany te są wynikiem procesu starzenia się kłębków szyjnych *per se*, czy też mogą zależeć od upośledzonego do nich dopływu krwi w wyniku rozwijających się z wiekiem zmian miażdżycowopodobnych. Morfologia kłębków badana będzie na poziomie ultrastrukturalnym przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Czynność kłębków oszacowana zostanie z wielkości i czułości odpowiedzi oddechowej na stopniowaną hipoksję.

### **2.2. CELE SZCZEGÓŁOWE**

1. Porównanie budowy ultrastrukturalnej kłębków szyjnych pochodzących od zdrowych, młodych (3 miesięcznych) szczurów z budową kłębków od starych szczurów (24 miesięcznych).
2. Prześledzenie, w półrocznych odstępach czasu, dynamiki procesu starzenia się kłębków szyjnych.
3. Zbadanie stopnia miażdżycy tętnic szyjnych przy pomocy oceny:
  - zmian ultrastrukturalnych w ścianie tętnicy szyjnej pod wpływem postępującego wieku
  - określenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi tętniczej 3- i 24-miesięcznych szczurów

- określenie metodą NADPH-diaforazy poziomu syntazy tlenku azotu, jako markera stanu zapalnego, w komórkach śródbłonkowych tętnic szyjnych pochodzących od młodych i starych szczurów
4. Zbadanie wpływu wieku na czynność kłębków szyjnych na podstawie oceny nasilenia odpowiedzi oddechowej na hipoksję *in vivo*, i poprzez porównanie tych odpowiedzi u młodych i starych szczurów.

### **3. MATERIAŁ I METODY**

#### **3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE**

Badania wykonano w na 37 szczurach płci męskiej w wieku od 3 do 24 miesięcy, o wadze 240-651 g. Szczury znajdowały się w narkozie  $\alpha$ -chloralozowo-uretanowej podanej dootrzewnowo w dawce 15 i 75 mg/100g m.c. (w przypadku młodych zwierząt) oraz 10 i 50 mg/100 g m.c. (w przypadku zwierząt 24 miesięcznych). Różnice w dawce były spowodowane przyczynami technicznymi związanymi z tym, że narkoza stosowana standardowo u młodych zwierząt była zbyt silna dla zwierząt starych, które charakteryzowały się większą śmiertelnością. Temperaturę ciała zwierząt utrzymywana była na poziomie 37-38 °C przy pomocy poduszki grzejnej. Po zakończeniu eksperymentów zwierzęta uśmiercano poprzez podanie letalnej dawki środka anestetycznego lub lewokomorowej perfuzji mieszaniną aldehydów (patrz niżej). Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni instytutowej, gdzie hodowane były przy zachowaniu 12 godz. systemu dnia i nocy, karmione standardową paszą V1324-000 (SSniff Spezialdiäten GmbH, Niemcy) przy nieograniczonym dostępie do wody. Badania składały się z dwóch części: *in vitro* i *in vivo*. Obie części uzyskały zezwolenie Lokalnej Komisji Etycznej (zezwolenia nr 109, 137).

#### **3.2. BADANI *IN VIVO***

##### **3.2.1. PREPARATYKA I POMIARY**

###### **3.2.1.1. BADANIA ULTRASTRUKTURALNE**

Zmiany ultrastrukturalne badano u 25 szczurów podzielonych na 5 grup wiekowych: 3, 6, 12, 18 i 24 miesiące w części ultrastrukturalnej oraz na 4 szczurach

w wieku 3 i 24 miesiące w części histochemicznej. U wszystkich szczurów wykonano tracheostomię oraz kaniulację naczyń udowych. Zwierzęta przygotowano do pobrania kłębków szyjnych i fragmentów tętnic szyjnych zgodnie z preparatyką wg metody Lahiriego i DeLaney (1975). Preparatykę tę wykonano w odcinku szyjnym, u podstawy czaszki.

W skrócie polegała ona na podwiązaniu i przecięciu tchawicy wraz z przełykiem i odciążeniu ich „kikutów” dogłowo. Zabieg ten ułatwiał dostęp do rozwidlenia tętnic szyjnych wspólnych w okolicy, których zlokalizowane są kłębki szyjne. Następnie usunięto zwoje współczulne szyjne górne, uzyskując bezpośredni dostęp do kłębków szyjnych. Eksperymenty kończono lewokomorową perfuzją mieszaniną aldehydów: odpowiednio 2,5% glutaraldehyd (GA) (Merck, Niemcy) i 2% paraformaldehyd (PA) (Fluka Chemie GmbH, Niemcy) na bazie 0,1 M buforu kakodylanowego o pH 7,4 (Serva, Niemcy), jeśli materiał pobierano w celu ultrastrukturalnej analizy procesu starzenia się kłębków szyjnych lub 3% PA i 0,5% GA na bazie 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4 jeśli materiał pobierano w celu ilościowej analizy aktywności NADPH-diaforazy.

### **3.2.1.2. BADANIA NEUROFIZJOLOGICZNE**

Część neurofizjologiczna badań stanowiła oddzielny segment pracy. Wymagała ona większych grup zwierząt, co związane jest z wymogami opracowań statystycznych tego typu badań. Część tą wykonano w grupie 18 szczurów podzielonych na dwie skrajne podgrupy wiekowe: 3 miesiące (11 szczurów) i 24 miesiące (7 szczurów). W każdej z tych 2 podgrup znajdowało się po 5 szczurów, które jednocześnie podlegały ocenie morfologicznej. U wszystkich szczurów wykonano tracheostomię, kaniulację żyły i tętnicy udowej. W przeponie umieszczono elektrody do rejestracji zintegrowanej

aktywności mięśnia przepony (EMG). Sygnał EMG wzmacniano, integrowano, ze stałą czasową 100 ms, oraz filtrowano w paśmie od 50 Hz do 5 kHz za pomocą zestawu elektrofizjologicznego (Digitimer-Neurolog System, Anglia). Ze zintegrowanego sygnału EMG przepony wyznaczono: maksymalną amplitudę (A), jako indeks objętości oddechowej (Huszczuk i Widdicombe, 1973), oraz częstotliwość (f) uzyskaną z wyliczenia  $60/T_{TOT}$  (czas trwania całego cyklu oddechowego). Wentylację minutową ( $V_E$ ) obliczono jako iloczyn wartości A i f ( $V_E = A \cdot f$ ). Za pomocą kapnografu (Respina IH 26, NEC Sanei-ei Instruments, Tokio, Japonia) oznaczano frakcję dwutlenku węgla ( $P_{ET}CO_2$ ) w powietrzu wydychanym.

Z tętnicy udowej pobierano próbki krwi w celu zbadania ciśnienia parcjalnego tlenu ( $PaO_2$ ), dwutlenku węgla ( $PaCO_2$ ), poziomu pH (Compact 2 Blood Gas Analyzer, AVL List GmbH, Austria) oraz w celu zbadania zawartości cholesterolu we krwi. Ciśnienie krwi i rytm serca monitorowano przy użyciu miernika typu MCK 4011S TEMED- Zabrze (Polska). Przez cewnik w żyłę udowej uzupełniano płyny fizjologiczne i w razie potrzeby regulowano kwasowo-zasadowość krwi podając 8,4% roztwór dwuwęglanu sodu (Polfa, Polska). Parametry oddechowe oraz ciśnienie krwi zapisywano przy pomocy rejestratora typu Honeywell-Omnilight 8M36 (NEC Sanei-ei Instruments, Tokio, Japonia). Zwierzęta uśmiercano po zakończeniu eksperymentu przez podanie letalnej dawki anestetyków. Wyrzykowo pobierano też kłębki szyjne i tętnice szyjne w celu potwierdzenia wyników morfologicznych. W tym ostatnim przypadku perfuzja mieszaniną aldehydów przez serce była równoznaczna z uśmierceniem zwierząt.

### **3.2.1.2.1. PROTOKÓŁ BADAWCZY**

W każdej grupie wiekowej, po okresie stabilizacji wszelkich parametrów życiowych, badano chemiczną regulację oddychania poprzez ocenę wielkości odpowiedzi oddechowej po podaniu bodźca chemicznego, jakim były mieszanki gazowe o składzie 14% O<sub>2</sub> i 11% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. Worek o pojemności 0,7 L wypełniony określonym gazem łączono z zastawką znajdującą się na rurce umieszczonej w tchawicy. Test, przeprowadzony metodą „steady-state”, trwał ok. 2 min. Jako pierwszy przeprowadzano test przy użyciu 14% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>, a następnie podawano kolejny bodziec, jakim była mieszanina gazowa o składzie 11% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. Przerwa między testami wynosiła około 20 min. Był to czas niezbędny do tego, aby parametry życiowe wróciły to stanu wyjściowego sprzed pierwszego testu. Ze względu na to, że zwierzęta nie miały porażonych mięśni oddechowych (oddychały spontanicznie) nie regulowano poziomu P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub>. Poziom bodźca hipoksyjnego oceniano z próbek krwi pobieranej po 1,5 min. trwania testu. Po zakończonym eksperymencie zwierzęta uśmiercano podając im letalną dawkę środka anestetycznego.

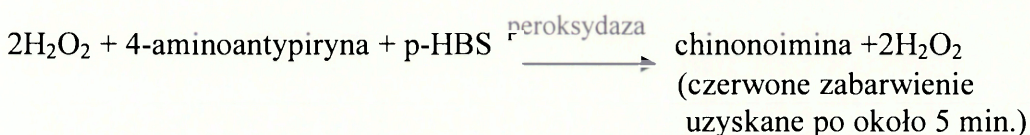
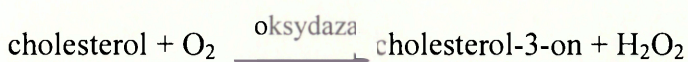
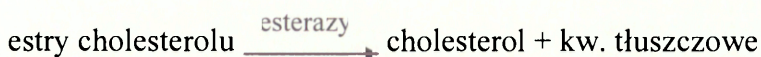
## **3.3. BADANIA *IN VITRO***

### **3.3.1. ANALIZA BIOCHEMICZNA KRWI**

Od 6 starych (24 miesięcznych) i 6 młodych (3 miesięcznych) szczurów pobrano po 1 cm<sup>3</sup> krwi przez cewnik umieszczony w tętnicy udowej, bez dodatku heparyny, w celu oznaczenia poziomu cholesterolu (CH) oraz HDL. W celu oddzielenia elementów morfotycznych pobraną krew wirowano 10 min. w temp. 20 °C przy 3500 rpm. Uzyskane osocze przechowywano w temperaturze -20 °C do momentu zebrania całej serii próbek.

### 3.3.1.1. OZNACZENIE CHOLESTEROLU CAŁKOWITEGO (CH)

Całkowity cholesterol oznaczano zmodyfikowaną, enzymatyczną metodą wg Trinder'a (1969), gdzie wykorzystano reakcję enzymatyczną esterazy i oksydazy cholesterolowej.



Absorbcję powstałego czerwonego zabarwienia mierzono przy długości fali 520 nm wobec próby ślepej i odczynnikowej przy użyciu analizatora chemicznego (Pointe 180 Plus, Polska). Po odczytaniu absorpcji, ilości cholesterolu całkowitego wyliczono ze wzoru:

$$\text{cholesterol (mg/dL)} = \frac{\text{abs próbki}}{\text{abs stand}} \times \text{stężenie stand (mg/dL)}$$
$$(\text{mg/dL}) \times 0,011 = \text{mmol/L}$$

\*abs - absorpcja

### 3.3.1.2. OZNACZENIE FRAKCJI HDL

Fracje HDL oznaczono przy użyciu ilościowej metody wytrąceniowej. Do osocza dodano odczynnik wytrąceniowy (20% glikol polietylenowy w buforze glicynowym o pH =10,0 (Poite Scientific, Polska). Po odwirowaniu, przez 10 min. przy około 2000 rpm, w supernatancie pozostała jedynie frakcja HDL, która stanowiła próbkę do oznaczenia metodą enzymatyczną (jw.).



### **3.3.2. MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA**

#### **3.3.2.1. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO ANALIZY**

##### **ULTRASTRUKTURALNEJ**

Pobrano materiał, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.2.1.1, dodatkowo utrwalano w mieszaninie użytej do perfuzji. Proces ten zachodził przez 24 godz., w temperaturze 4 °C. Utrwalony materiał, w celu wypłukania mieszaniny utrwalającej, kilkakrotnie przelewano 0,1 M buforem kakodylanowym. Następnie, przez 2 godz., materiał inkubowano w 1% roztworze czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) (Sigma, USA) i 0,8% żelazocyjanku potasu (Merck, Niemcy). Po inkubacji materiał odwodniono przez kilkakrotne przepłukanie roztworami alkoholu etylowego (cz.d.a., Polchem, Polska) o stężeniu od 30% do 99,8% oraz tlenkiem propylenu (Merck, Niemcy). Po odwodnieniu, materiał stopniowo przesycono żywicą Spurr (Sigma, USA) z domieszką tlenku propylenu w różnych proporcjach: 1:3 (15 min), 1:1 (30 min) i 3:1 (3 godz.). Ostatnim etapem było zatopienie tkanki w czystej żywicy i polimeryzacja odbywająca się przez noc, w temperaturze 70 °C. Tak przygotowane preparaty cięto na ultramikrotomie typu MT-XL (RMC, Inc, USA) na ultracienkie (50 nm) oraz półcienkie (5  $\mu\text{m}$ ) skrawki. Ultracienkie skrawki nanoszono na miedziane siateczki, barwiono przez ok.10 min 9% roztworem octanu uranylu i cytrynianu ołowiu w 25% roztworze alkoholu etylowego, płukano w wodzie destylowanej, suszono w temperaturze pokojowej i następnie analizowano pod mikroskopem elektronowym typu JEOL JEM 1200 EX (Japonia). Skrawki półcienkie nanoszono na szkiełka podstawowe, barwiono 1% błękitem toluidyny w 1% boraksie, płukano w wodzie destylowanej, suszono w temperaturze pokojowej i analizowano pod mikroskopem świetlnym.

### **3.3.2.2. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO ANALIZY HISTOCHEMICZNEJ**

Pobrany i oczyszczony materiał utrwalano, przez okres 24 godz., w temperaturze 4 °C, w mieszaninie użytej wcześniej do perfuzji i następnie kilkakrotnie płukano 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,4. Przez kolejne 30 min. materiał biologiczny płukano w 50 mM Tris-HCl o pH 7,6 oraz pre-inkubowano przez 10 min. w 0,025% roztworze nitroblue tetrazolium, NBT (Sigma, USA) rozpuszczonym w Tris-HCl. Kolejnym etapem była inkubacja przez 120 min w temperaturze 37 °C w ciemności, w roztworze zawierającym: 80,7 mg NADPH, 3 mg NBT, 15 mg jabłczanu sodu w 15 ml Tris-HCl. Reakcję przzerwano przepłukując materiał zimnym 4 °C Tris-HCl. Materiał następnie dodatkowo utrwalano przez 1 godz. w 1% roztworze czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) rozpuszczonego w 0,1 M buforze fosforanowym, odwodniono w roztworach alkoholu etylowego i zatapiano w żywicy Spurr jak opisano w części 3.3.2.1.

### **3.4. KRYTERIA OCENY ZMIAN ULTRASTRUKTURALNYCH W KLĘBKACH SZYJNYCH**

Jakość i stopień nasilenia zmian, jakie zachodzą w strukturze kłębków szyjnych pod wpływem postępującego wieku, oceniono na podstawie opracowanych wcześniej kryteriów morfologicznych takich jak: rozłożenie heterochromatyny i eurochromatyny w jądrach komórkowych, stopień rozrzedzenia macierzy komórkowej, stopień wakuolizacji i poszerzenia siateczki endoplazmatycznej, stopień uszkodzenia i liczba mitochondriów komórkowych, liczebność stref aparatów Golgiego, obecność ciał wielopęcherzykowych, obecność lizosomów oraz tzw. procesu krynofagii, a także liczebność oraz wygląd ziarnistości neurosekrecyjnych. Oceniano również obecność

ciemnych, nekrotycznych i jasnych komórek chemoreceptorowych oraz proces przebudowy otaczającej je torebki łącznotkankowej. W naczyniach kapilarnych w kłębku szyjnym oraz w tętnicach szyjnych oceniano wygląd śródbłonków, stopień agregacji płytek, intensywność procesu angiogenezy, obecność ciał Weibla-Pallade'a, ciągłość warstwy elastynowej, proliferację włókienek kolagenowych i mięśni gładkich oraz obecność złogów wapniowych. W komórkach chemoreceptorowych oraz śródbłonkach naczyń w polach równych  $2,5 \mu\text{m}^2$  zliczano produkt reakcji na NADPH-diaforazę. Ilość mitochondriów oraz ziarnistości neurosekrecyjnych liczone na całej powierzchni komórek chemoreceptorowych sfotografowanych pod powiększeniem 6000k. Procentowy udział prawidłowych i zmienionych komórek chemoreceptorowych budujących gronka kłębków szyjnych oceniano na całej powierzchni mikrografii sfotografowanej pod powiększeniem 3000k.

Analiza zmian ultrastrukturalnych w komórkach chemoreceptorowych oraz ścianach naczyń krwionośnych została wykonana metodą półilościową przy zastosowaniu skali od (-) do (+++), gdzie (-) oznacza brak występowania określonej cechy lub zjawiska natomiast (+++) oznacza maksymalne nasilenie zmiany.

Elementy policzalne, takie jak liczba ziarnistości neurosekrecyjnych, mitochondriów komórkowych oraz ilość produktu reakcji, przedstawiono w postaci liczb. W celu uniknięcia subiektywnej oceny zmian, ich nasilenia oraz liczby elementów subkomórkowych dane z każdej mikrografii były ponownie oceniane przez niezależnego arbitra.

### 3.5. ANALIZA DANYCH

Wszystkie dane przedstawione w pracy wyrażone są jako wartości średnie  $\pm$ SE.

U każdego zwierzęcia, z oddechu na oddech, rejestrowano  $A$ ,  $f = 60/T_{TOT}$  oraz  $V_E = A \cdot f$

Dalsza analiza polegała na porównaniu z wartością wyjściową poszczególnych zmiennych w kolejnych punktach czasowych testów hipoksyjnych. Dla każdego parametru wyliczano średnią z pięciu kolejnych oddechów, którą przeliczano na wartości procentowe zależne od „punktu zerowego” (przed rozpoczęciem testu) uznanego za 100%. Dane te zostały uśrednione dla poszczególnych grup i ocenione przy pomocy testu Mann-Whitney. Czułość odpowiedzi oddechowej na hipoksję była oceniana z nachylenia linii regresji liniowej opisującej zależność między  $V_E$  i  $f$ , a siłą zadanego bodźca, czyli 14% i 11% hipoksją, w poszczególnych grupach wiekowych szczurów. Zależność ta była wyliczona ze wzoru  $y=a(x-b)$ . We wzorze „a” oznacza wartość tangensa kąta nachylenia prostej do osi odciętych (ang. slope), a „b” jest punktem przecięcia prostej osią rzędnych. Miarą wielkości odpowiedzi oddechowej na hipoksję, czyli oddechowej czułości hipoksyjnej, stanowiła wielkość „slope”. Uzyskane wyniki dotyczące czułości odpowiedzi oddechowej na hipoksję były porównane statystycznie także przy pomocy testu Mann-Whitney. Pozostałe parametry oddechowe oraz elementy morfotyczne oceniane na fotomikrografiach porównywane były niesparowanym testem Studenta i nieparametrycznym testem Wilcoxon.

Dla wszystkich metod statystycznych za poziom istotności uznałam  $P < 0,05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1. OGÓLNA OCENA ZMIAN ULTRASTRUKTURALNYCH

#### W PARENCHYMIE KLĘBKÓW SZYJNYCH ORAZ

#### W TĘTNICACH SZYJNYCH

KRYTERIA OCENY ZMIAN MORFOLOGICZNYCH W KLĘBKACH SZYJNYCH	WIEK SZCZURÓW				
	3 m-ce	6 m-cy	12 m-cy	18 m-cy	24 m-ce
<b>I. Jądro komórkowe</b>					
1. nieprawidłowa agregacja heterochromatyny	-	-	+	+	++
2. rozwarstwienie ściany jądrowej	-	-	+	++	++
3. obecność jąder apoptotycznych	-	-	-	+	++
<b>II. Cytoplazma komórkowa</b>					
1. rozrzedzenie macierzy cytoplazmatycznej	-	-	+/-	+	+++
2. wakuolizacja	-	-	+	++	+++
3. poszerzenie siateczki endoplazmatycznej	-	-	+	++	+++
<b>III. Organelle komórkowe</b>					
1. liczba mitochondriów (w polu widzenia)	38,6 ±6,1	++	++	++	31,7 ±3,5
2. procent zmienionych mitochondriów	23,3 ±3,1	+	+	++	49,6 ±4,9 *
3. liczebność stref aparatu Golgiego	+++	+++	+++	++	+
4. obecność ciał wielopęcherzykowych	+	+	++	++	+
5. obecność ciał mielinopodobnych	-	-	-	-	++
6. obecność krynofagii	-	-	+/-	+	+
7. obecność lizosomów	+	++	++	+++	+++
<b>IV. ZIARNISTOŚCI</b>					
1. liczba ziarnistości (w polu widzenia)	101,3 ±10,2				84,1 ±24,1
2. obecność ziarnistości z ciemnym rdzeniem	+++	+++	++	++	+
3. obecność ziarnistości z jasnym rdzeniem	+	++	++	++	+++
<b>V. Uszkodzenie komórek chemoreceptorowych</b>					
1. stopień uszkodzenia	-	-	+	++	+++
2. obecność komórek ciemnych	-	-	+	+	+++
<b>VI. Torebka łącznotkankowa</b>					
1. poszerzenie torebki łącznotkankowej	-	-	++	+++	+++

<b>VII. Stan naczyń kapilarnych w kłębkach</b>					
1. stan śródbłonnków	+++	+++	+++	+++	++
2. agregacja płytek krwi	-	-	-	-	-
3. stopień nasilenia angiogenezy	-	-	-	++	++
<b>VIII. STAN TĘTNIC SZYJNYCH</b>					
1. stan śródbłonnków	+++	+++	+++	+++	++
2. obecność ciał Weibla – Pallade'a w śródbłonku	+	+	+	+	+
3. rozwarstwienie błony elastynowej	-	+	+	++	++
4. proliferacja komórek mięśni gładkich	-	-	+	++	++
5. proliferacja włókienek kolagenowych	-	+/-	++	++	+++
6. obecność złogów wapniowych	-	-	-	-	-
<b>IX. Ilość produktu reakcji NADPH-diaforazy</b>					
1. w komórkach chemoreceptorowych	42,0 ±1,7				94,0 ±9,9 *
2. w śródbłonnkach kapilar kłębkowych	47,5 ±3,5				77,6 ±9,5 *
3. w śródbłonnkach tętnic szyjnych	52,0 ±2,6				89,0 ±9,3 *
4. w komórkach mięśni gładkich w ścianach tętnic szyjnych	69,1 ±5,4				78,2 ±5,4

(+++ bardzo dużo, ++ dużo, + mało, +/- bardzo mało, - brak)

\*P<0,05

## 4.2. ULTRASTRUKTURA PARENCHYMY KŁĘBKÓW SZYJNYCH

### 4.2.1. SZCZURY 3-MIESIĘCZNE

Kłębki szyjne tej grupy wiekowej zostały przyjęte za kontrolę, z którą porównywałam kłębki od kolejnych grup wiekowych. Kłębki pochodzące od najmłodszych szczurów charakteryzowały się prawidłową ultrastrukturą. Zbudowane są z komórek chemoreceptorowych (komórki typu I) oraz rzadko występujących komórek podporowych (komórki typu II) tworzących razem charakterystyczne gronka. Gronka te otoczone są torebką łącznotkankową w skład, której wchodzi fibroblasty oraz włókienka kolagenowe. W przestrzeni łącznotkankowej, przylegającej do ściany kapilar

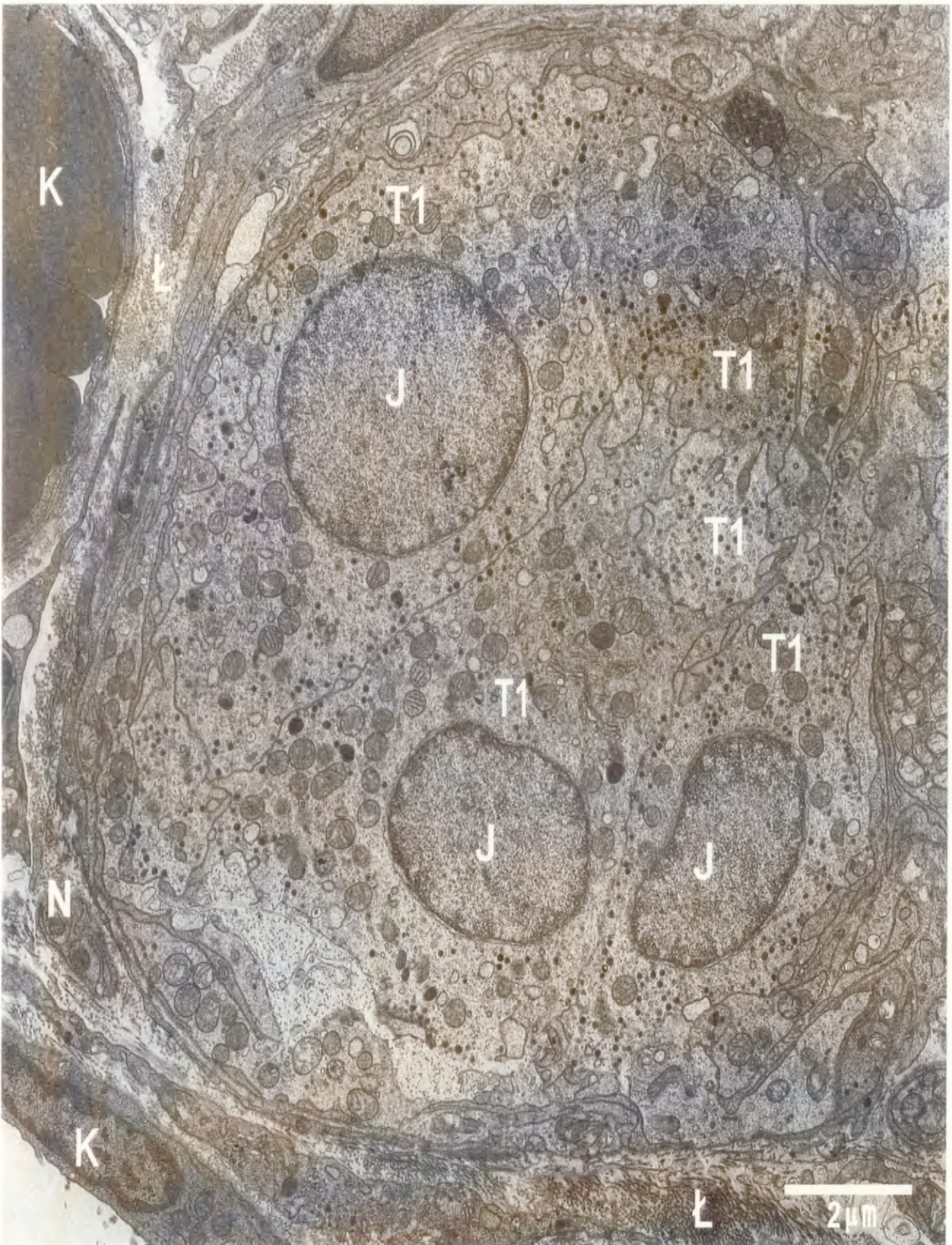
z jednej strony, a z drugiej do struktur kłębka znajdują się włókna nerwowe będące wypustkami nerwu zatokowego (Ryc. 6). Najważniejszym elementem morfologicznym struktury kłębkowej są komórki chemoreceptorowe. W centralnej części tych komórek znajdują się owalne, jasne jądra z regularnie rozłożoną euchromatyną oraz heterochromatyną zagregowaną w okolicy ściany jądrowej. W jądrach tych komórek rzadko obserwowane są struktury jądrowe zwane jąderkami. W części cytoplazmatycznej komórek chemoreceptorowych obserwuje się regularnie rozmieszczone organelle oraz ziarnistości neurosekrecyjne często układające się w pobliżu błony presynaptycznej (Ryc. 7). Najliczniej reprezentowane wśród organeli komórkowych są mitochondria (Ryc. 8) (średnio  $38,6 \pm 6,1$  w polu widzenia) charakteryzujące się regularnie rozłożoną macierzą oraz licznymi grzebieniami (Ryc. 9). W strefie perykarialnej komórek chemoreceptorowych uwagę zwraca bogata strefa Golgiego, zbudowana z licznych cystern oraz przylegających do nich pęcherzyków (Ryc. 10). W niektórych pęcherzykach daje się zauważyć elektronowo-gęsty materiał, co przemawia za udziałem aparatu Golgiego w opakowywaniu neurosektów komórkowych. Struktury błonowe kanałów siateczki śródplazmatycznej reprezentowane są przez pojedyncze kanały, na których znajdują się rybosomy występujące w postaci pojedynczych lub zagregowanych cząstek rybosomalnych niezwiązanych z siateczką śródplazmatyczną (Ryc. 11). Ponadto w komórkach chemoreceptorowych znajdują się bardzo liczne ziarnistości neurosekrecyjne (średnio  $101,3 \pm 24,1$  w polu widzenia) otoczone pojedynczą błoną typu „unit membrane”. Wnętrze ich wypełnione jest elektronowo-gęstym materiałem oddzielonym od błony limitującej rozrzedzoną warstwą (Ryc. 6). Jednocześnie obserwowano pęcherzyki niezawierające w swym wnętrzu elektronowo-gęstego materiału. W niektórych

komórkach, w strefie przyjądrowej obecne są centriole, z charakterystycznym rozkładem mikrotubul, świadczące o zdolnościach podziałowych komórek (Ryc. 11).

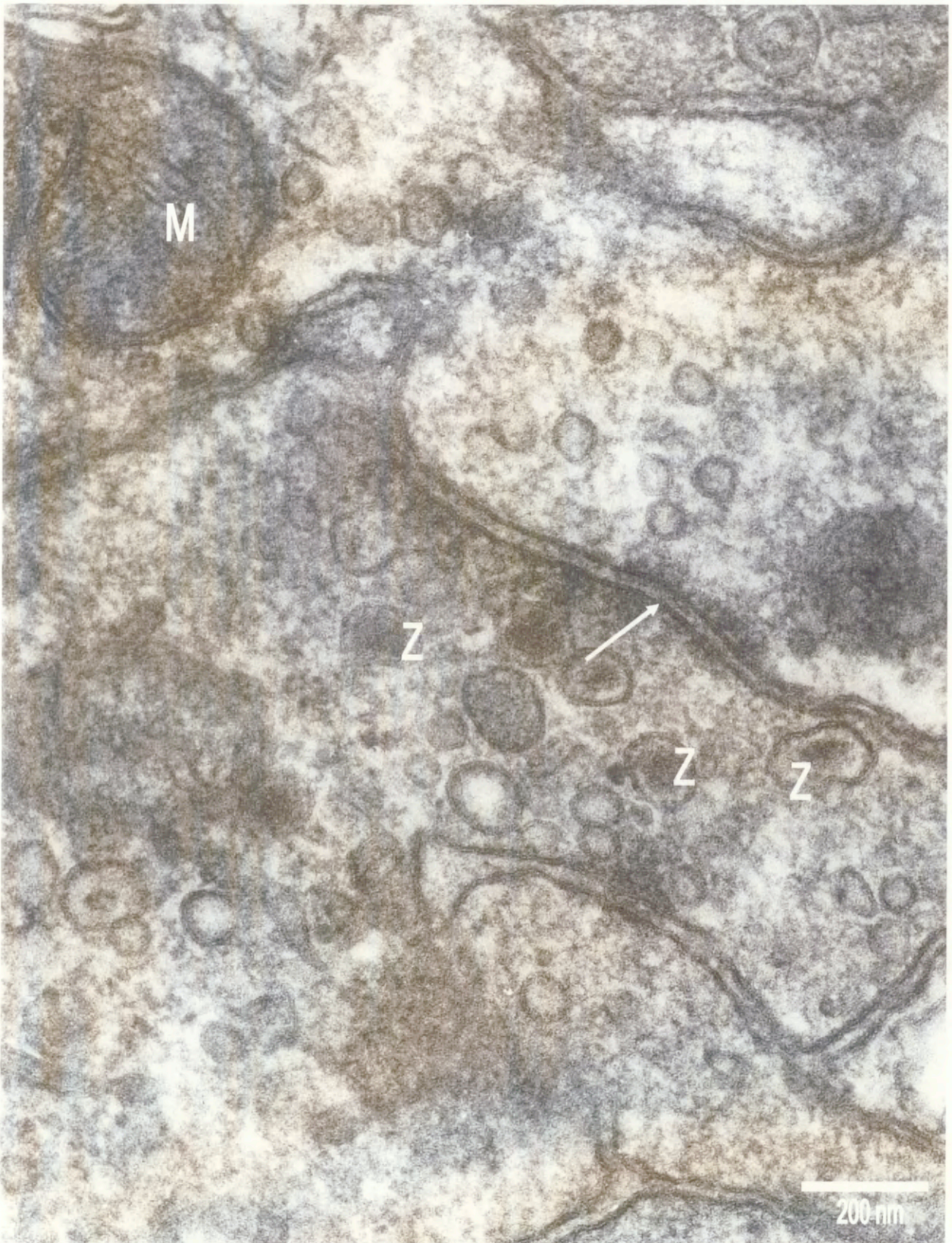
Do błon limitujących komórki chemoreceptorowe przylegają zakończenia włókien nerwowych tworzących zakończenia synaptyczne. Szerokość szczeliny synaptycznej wynosi 30-50 nm. Na powierzchni błon pre- i postsynaptycznych znajdują się charakterystyczne zagęszczenia stanowiące miejsca receptorowe. We wnętrzu zakończeń znajdują się pęcherzyki o zróżnicowanej wielkości (50-200 nm) i zróżnicowanym wypełnieniu (Ryc. 7).

Komórki typu II reprezentowane są w strukturach kłębka przez pojedyncze wypustki cytoplazmatyczne. Rzadko udaje się zaobserwować ich strefy perykarialne. Jądra tych komórek posiadają nieregularny, wydłużony kształt oraz bogatą heterochromatynę. W wąskim paśmie cytoplazmy znajdują się pojedyncze mitochondria, niewielka strefa aparatu Golgiego, uboga siateczka śródplazmatyczna oraz włókienka typu filamentów pośrednich. Istotnym elementem różnicującym te komórki od typu I jest brak ziarnistości neurosekrecyjnych (Ryc. 11). Pomiędzy gronkami komórek parenchymy kłębka przebiegają liczne naczynia kapilarne, wyścielone pojedynczą warstwą płaskich komórek śródbłonkowych połączonych ze sobą w sposób ciągły (*tight* lub *gap junction*) i otoczonych od zewnątrz błoną podstawną oraz przydanką. Komórki śródbłonkowe mają pojedyncze mitochondria, spłaszczone jądra komórkowe oraz pojedyncze pęcherzyki pinocytarne (Ryc. 6). Błona komórek śródbłonkowych nie zawiera włóknistych elementów łącznotkankowych, natomiast w przydance tych naczyń występują niezbyt liczne komórki mięśni gładkich. Dodatkowym elementem strukturalnym ściany naczyń są perycyty. Stanowią one strukturalne rusztowanie dla naczyń kapilarnych.

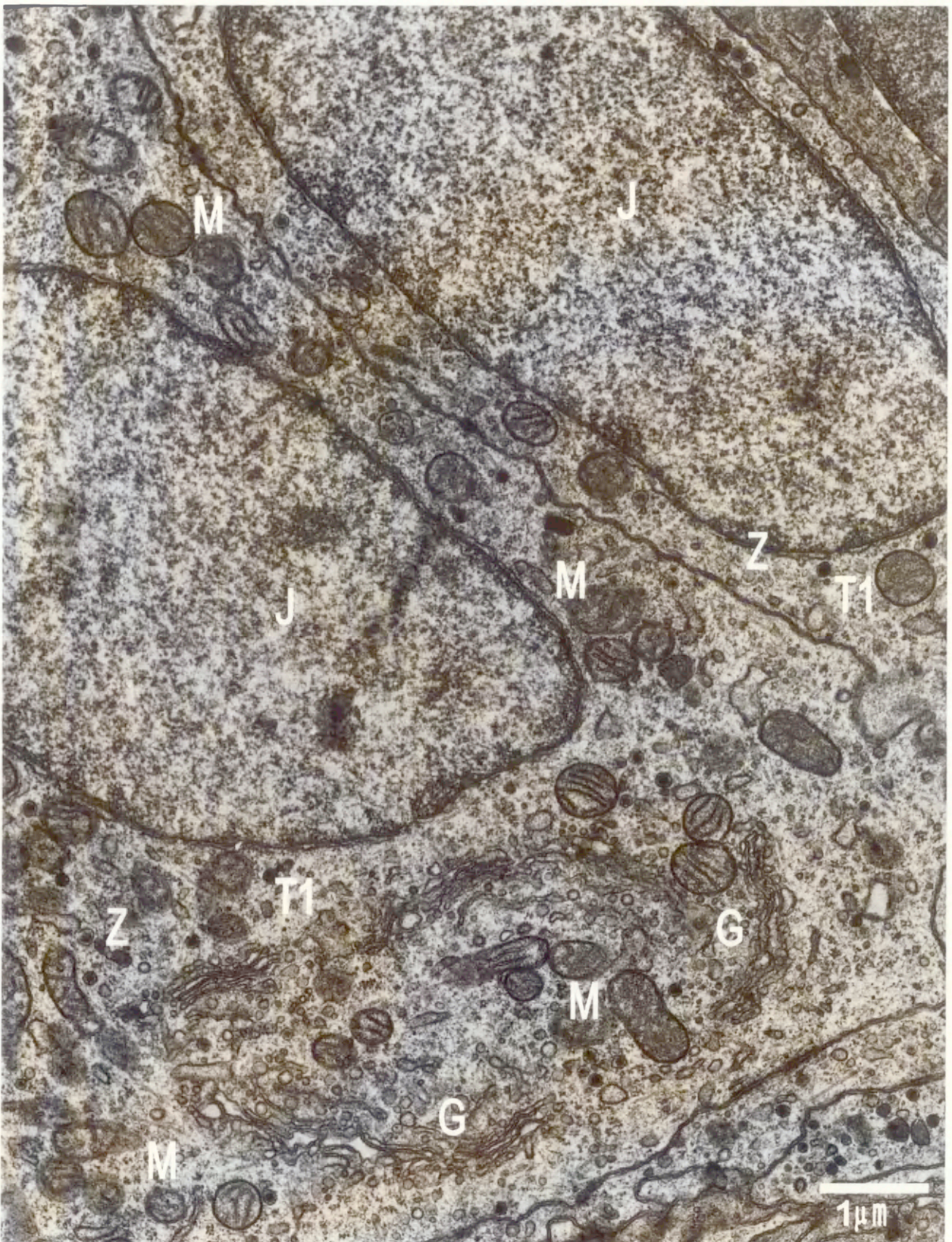




Ryc. 6. Mikrografia przedstawia fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 3 mies. szczura. Gronka komórek chemoreceptorowych (T1) otoczone są torebką łącznotkankową (Ł), w której znajdują się zakończenia nerwowe (N) oraz kapilary (K). (J) jądra komórek chemoreceptorowych. Powiększenie pierwotne 3k.



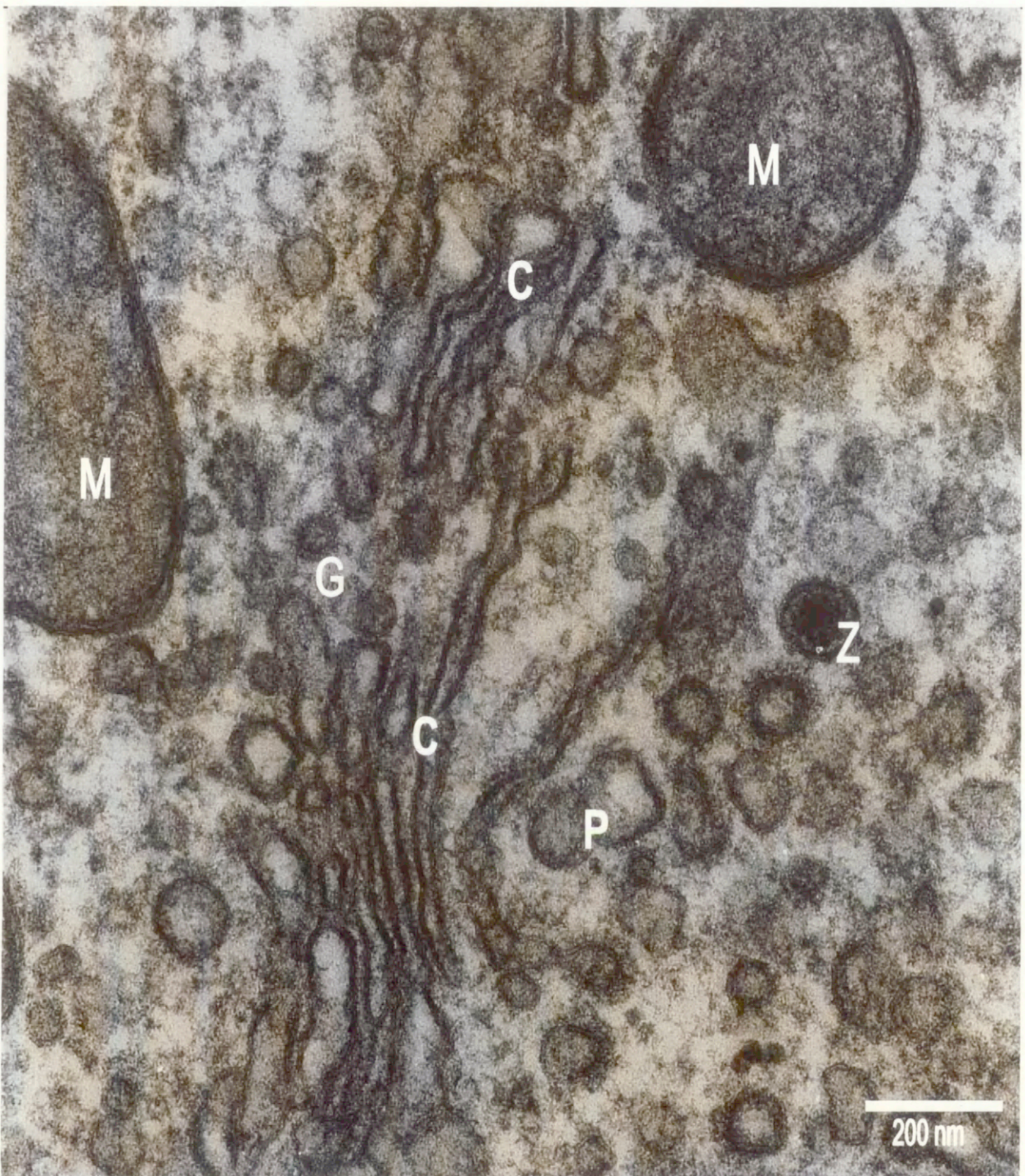
Ryc. 7. Fragment prawidłowej parenchymy kłębka szyjnego pochodzącego od młodego 3 mies. szczura. Na mikrografii widoczna szczelina synaptyczna (zaznaczona strzałką), ziarnistości neurosekrecyjne (Z) oraz mitochondria o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej (M). Powiększenie pierwotne 40k.



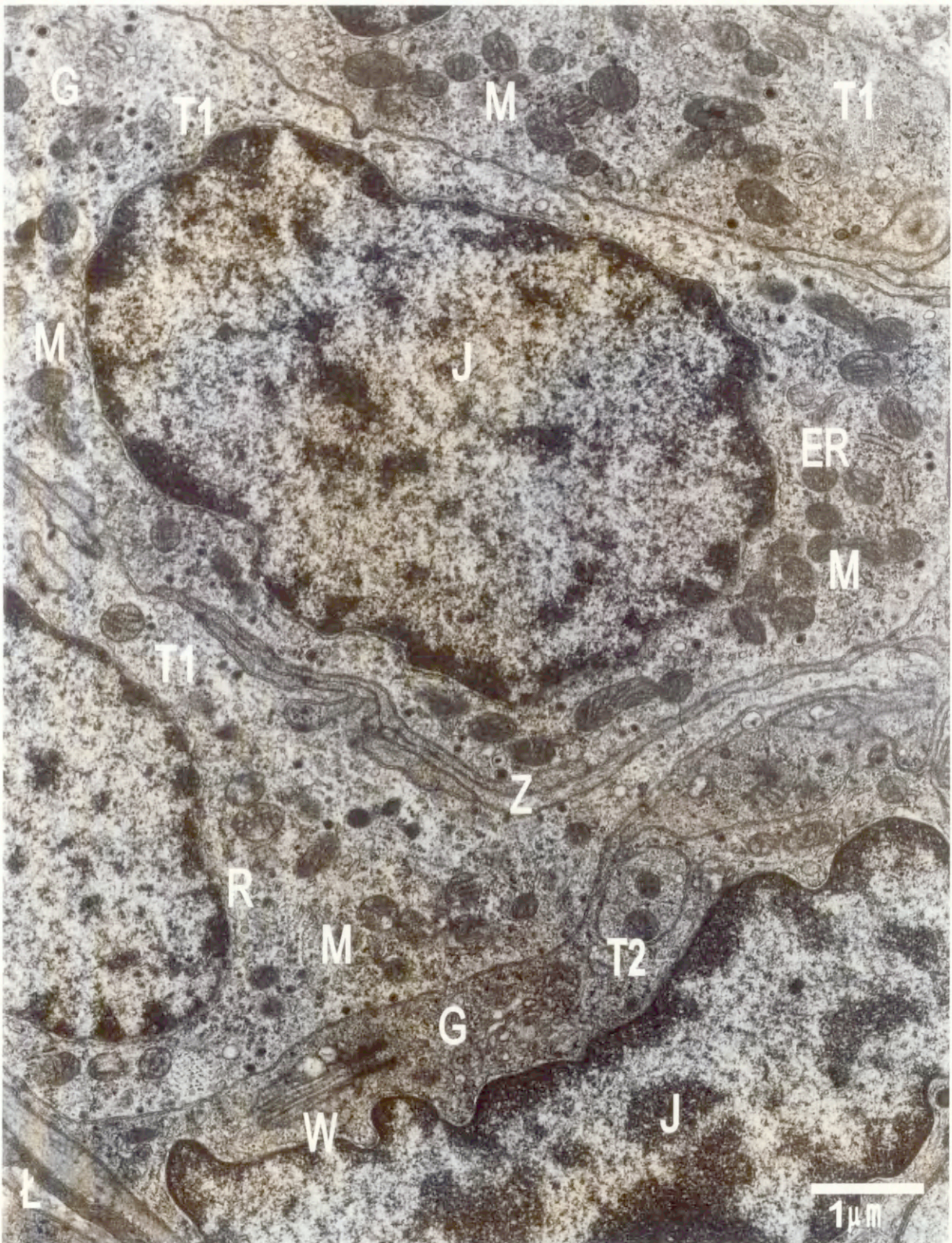
Ryc. 8. Fragment prawidłowej parenchymy kłębka szyjnego pochodzącego od 3 mies. szczura. W centralnej części komórek typu I (T1) widoczne jasne jądra komórkowe (J), liczne mitochondria (M), bogata strefa aparatu Golgiego (G) oraz ziarnistości neurosekrecyjne (Z) będące elementem charakterystycznym tylko dla komórek chemoreceptorowych. Powiększenie pierwotne 6k.



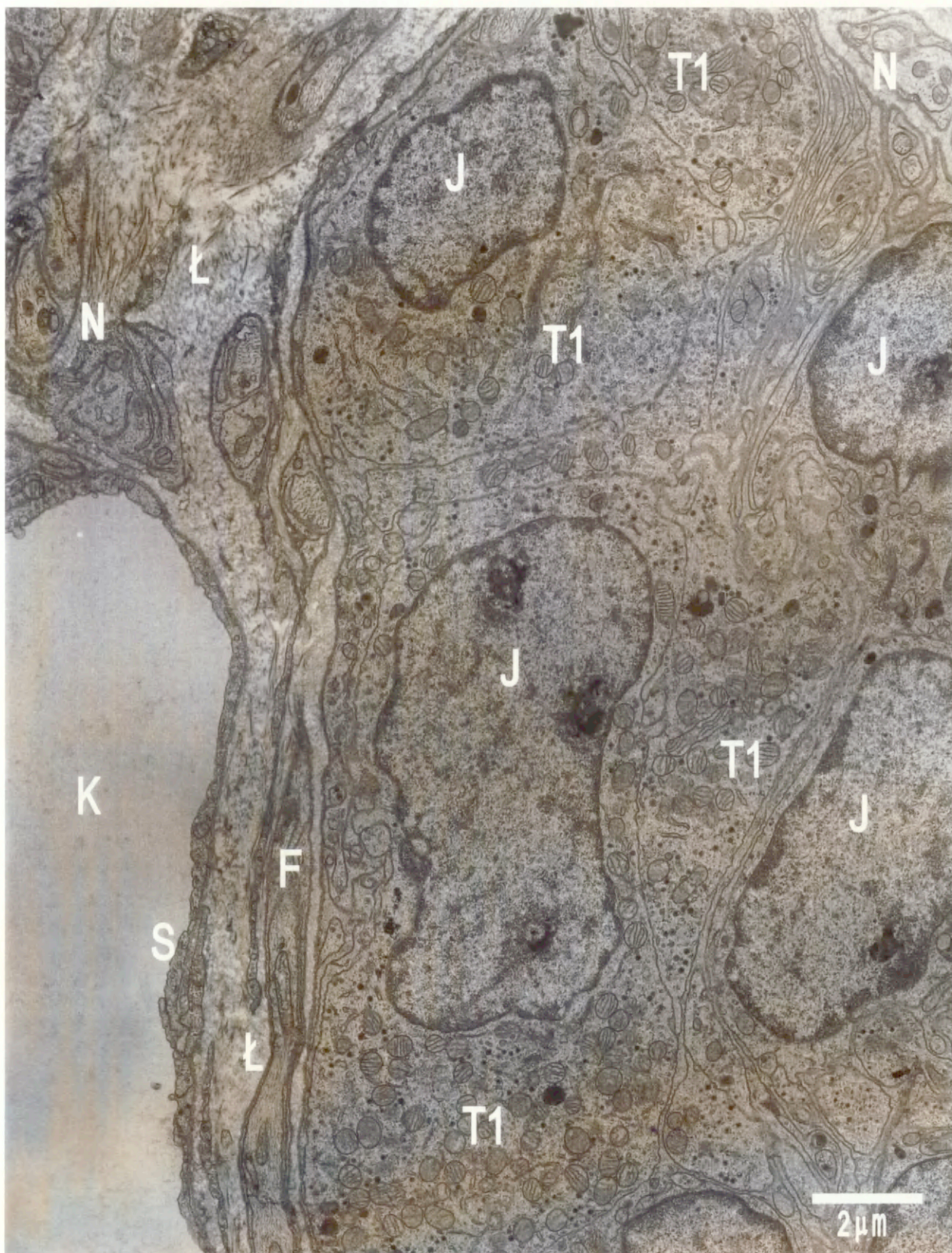
Ryc. 9. Fragment parychymy kłębka szyjnego pochodzącego od 3 mies. szczura. Na mikrografii widoczne liczne mitochondria (M) o zachowanej prawidłowej strukturze błon zewnętrznych i wewnętrznych oraz o prawidłowej kondensacji macierzy mitochondrialnej. Ziarnistości neurosekrecyjne (Z), jądro komórkowe (J). Powiększenie pierwotne 40k.



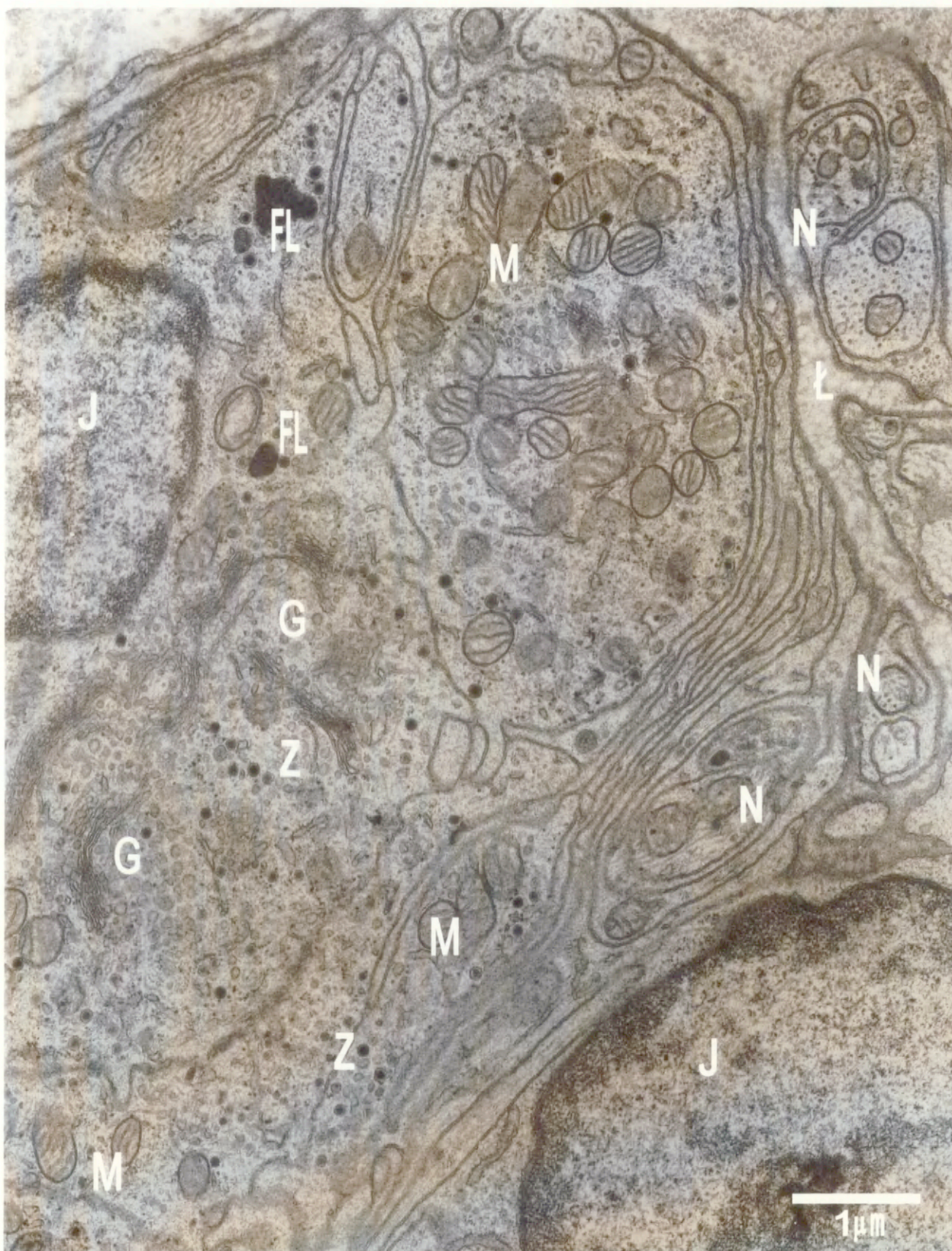
Ryc. 10. Fragment prawidłowej parenchymy kłębków szyjnych pochodzących od 3 mies. szczura. Mikrografia przedstawia strefę aparatu Golgiego (G) zbudowaną z cystern (C) i licznych pęcherzyków (P). W strefie perykariowej widoczne są również mitochondria (M) i ziarnistości neurosekrecyjne (Z). Powiększenie pierwotne 40k.



Ryc. 11. Prawidłowy obraz kłębka szyjnego pochodzącego od młodego 3 mies. szczura. W centralnej części zdjęcia widoczne dwie komórki chemoreceptorowe (T1) oraz przylegająca do nich komórka typu II (T2). We wnętrzu komórek chemoreceptorowych widoczne duże, jasne jądra komórkowe (J), liczne ziarnistości neursekrecyjne (Z), mitochondria komórkowe (M), rybosomy (R) oraz siateczka endoplasmatyczna szorstka (ER), a także strefa aparatu Golgiego (G). W komórce typu II widoczne wrzeciono podziałowe (W). Struktura kłębka otoczona jest torebką łącznotkankową (Ł). Powiększenie pierwotne 6k.



Ryc. 12. Mikrografia przedstawia obraz niezmienionego fragmentu kłębka szyjnego, pochodzącego od 6 mies. szczura. Gronko komórek chemoreceptorowych (T1) z dużymi charakterystycznymi jądrami komórkowymi (J) otoczone jest torebką łącznotkankową (Ł) z licznymi zakończeniami nerwowymi (N). Z komórkami chemoreceptorowymi sąsiaduje kapilara (K) z prawidłowo zachowanymi komórkami śródbłonkowymi (S). W pobliżu kapilary znajduje się fibroblast (F). Powiększenie pierwotne 3k.



Ryc. 13. Obraz parenchymy komórek chemoreceptorowych, pochodzących od 6 mies. szczura. W strefie perykarialnej pojawiają się pojedyncze fagolizosomy (FL). Pozostałe elementy morfotyczne jak: jądro komórkowe (J), ziarnistości neurosekrecyjne (Z), aparat Golgiego (G), mitochondria (M), włókna nerwowe (N), torebka łącznotkankowa (Ł) zachowują prawidłową strukturę. Powiększenie pierwotne 7.5k.





Ryc. 14. Obraz parenchymy komórek chemoreceptorowych pochodzących od 6 mies. szczura. W lewym dolnym rogu widoczne jasne jądro komórkowe (J) z charakterystycznie rozłożoną chromatyną. W strefie perykarialnej znajduje się rozbudowana strefa aparatu Golgiego (G) zbudowana z licznych cystern (C) i pęcherzyków (P). W pobliżu znajdują się ciała wielopęcherzykowe (oznaczone strzałkami), prawidłowo wyglądające mitochondria komórkowe (M) i wrzeciono podziałowe (W). Powiększenie pierwotne 15k.



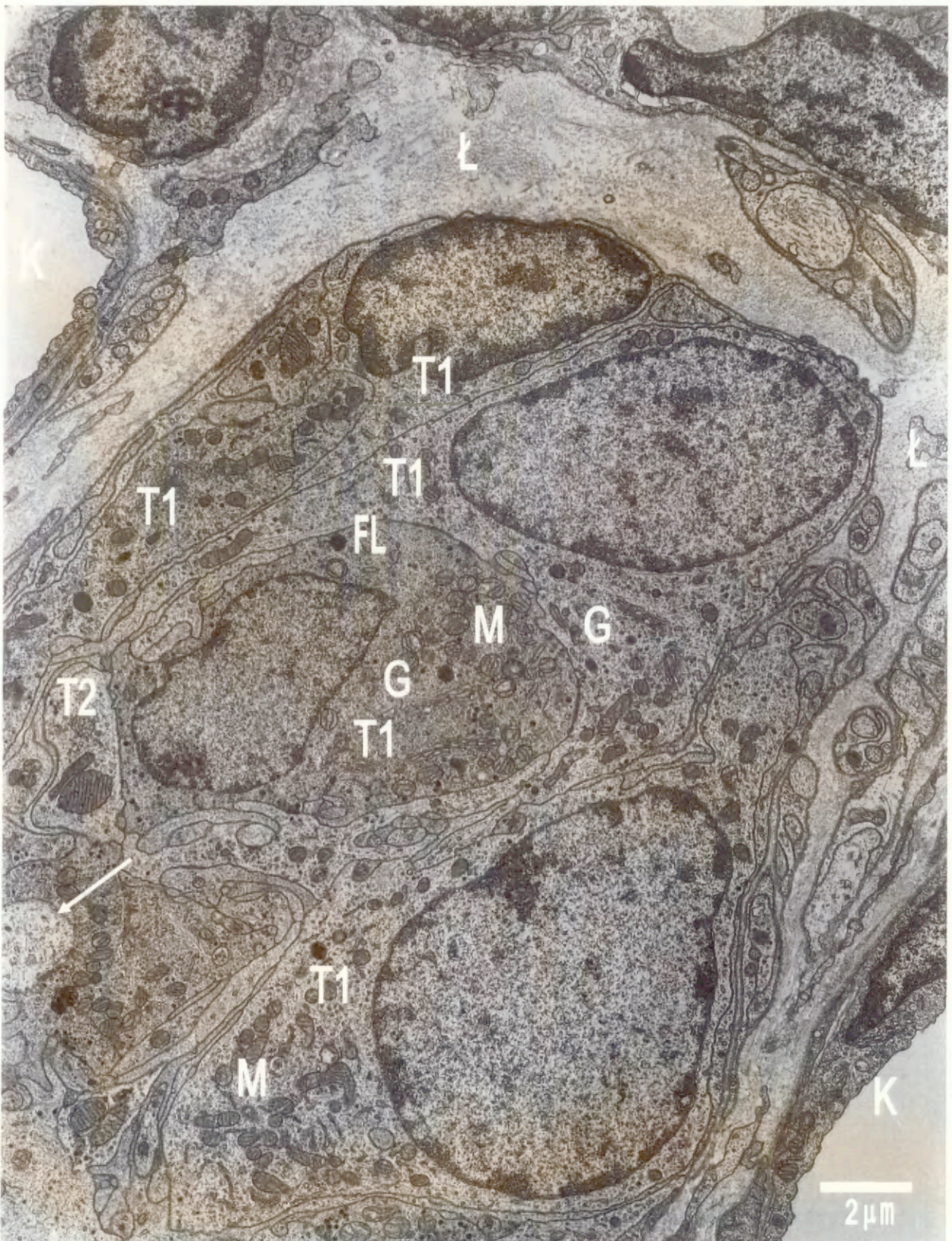
Ryc. 15. Mikrografia przedstawia obraz struktury kłębka szyjnego pochodzącego od 6 mies. szczura. Pomiedzy dwie komórki chemoreceptorowe (T1) z dużymi jasnymi jądrami (J) „wciska” się odnoga komórki podporowej (T2) o charakterystycznym włóknikowym fenotypie. We wnętrzu obydwu typów komórek widoczne są mitochondria (M) oraz siateczka plazmatyczna (ER). Komórki typu I (T1) odróżniają się od komórek typu II obecnością ziarnistości sekrecyjnych w swym wnętrzu (Z). Powiększenie pierwotne 15k.

#### **4.2.2. SZCZURY 6-MIESIĘCZNE**

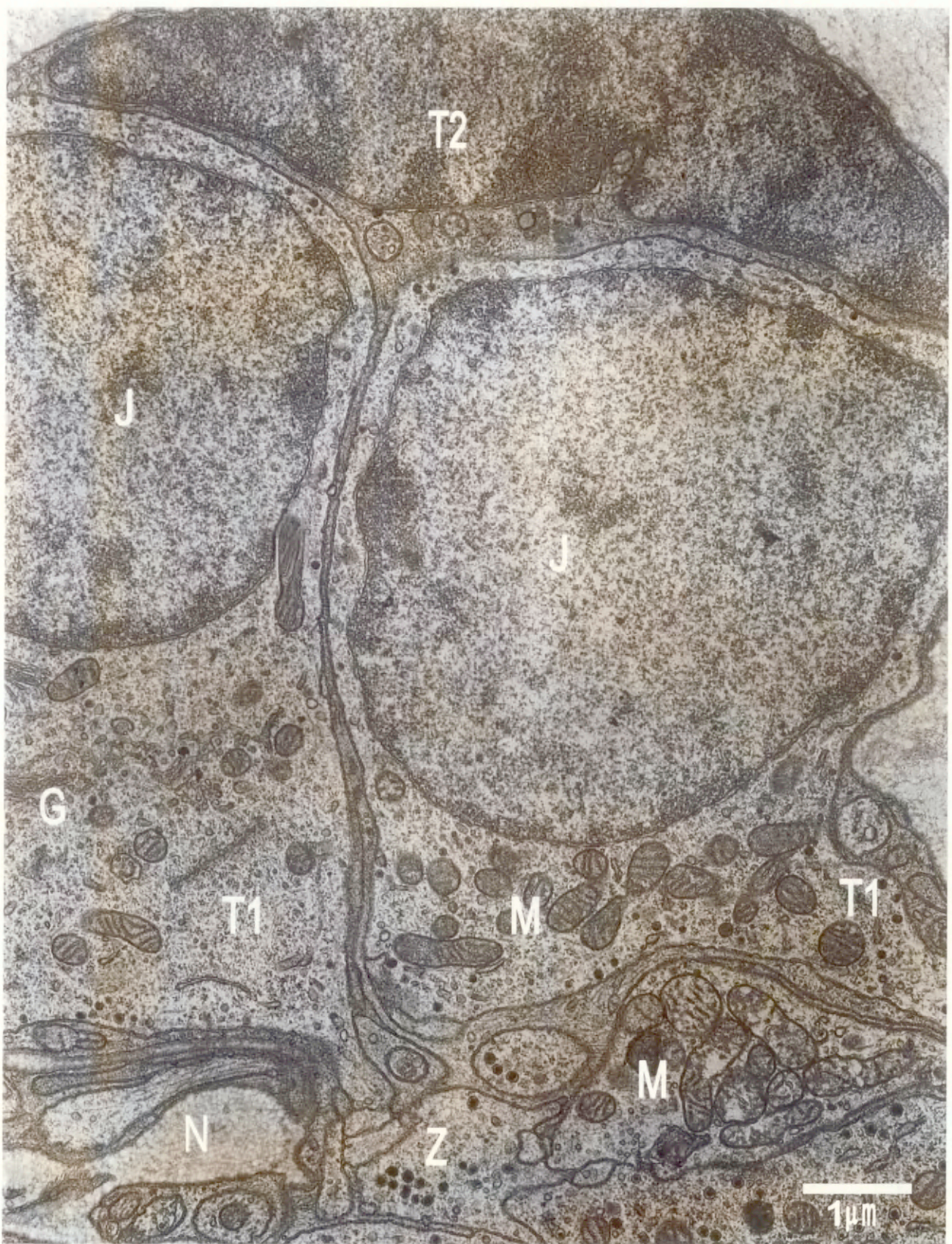
Morfologia kłębków szyjnych w tym przedziale wiekowym nie odbiega istotnie od ultrastrukturalnej budowy kłębków 3-miesięcznych opisanych powyżej i przyjętych jako kontrolny punkt odniesienia (Ryc. 12). W komórkach typu I pojawiają się zróżnicowane morfologicznie, nieliczne fagolizosomy we wnętrzu, których znajdują się agregaty elektronowo-gęstego materiału lub owalne krople lipidów (Ryc. 13). W bezpośrednim sąsiedztwie aparatu Golgiego znajdują się ciała wielopęcherzykowe zawierające zwielokrotnioną liczbę pęcherzyków (Ryc. 14). Zaobserwowano zwiększoną liczbę pęcherzyków jasnych w porównaniu z kłębkami kontrolnymi. Równie rzadko jak w przypadku kłębków szyjnych pochodzących od 3 miesięcznych zwierząt pojawiają się komórki podporowe z charakterystycznym włókienkowym fenotypem (Ryc. 15).

#### **4.2.3. SZCZURY 12-MIESIĘCZNE**

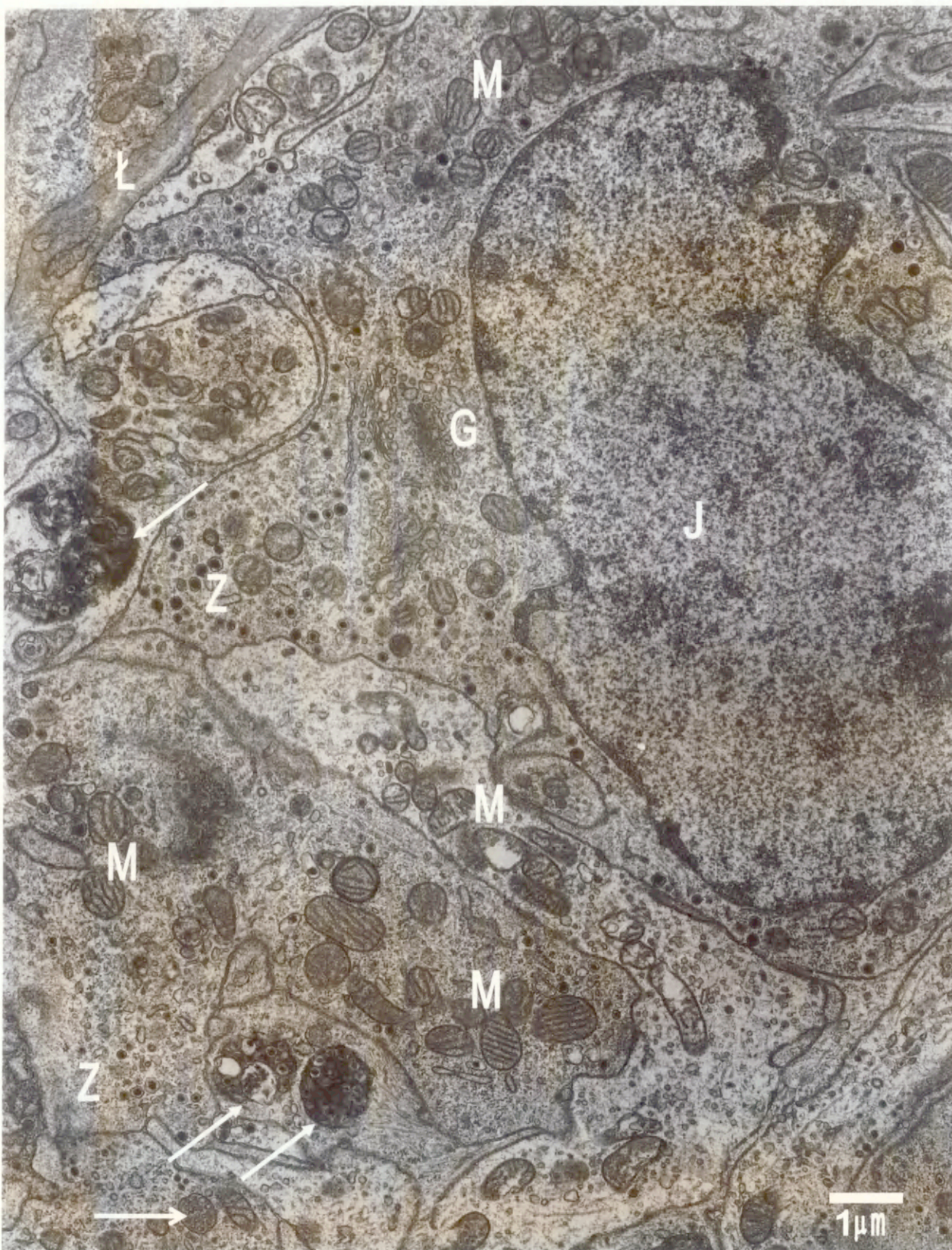
W tej grupie wiekowej zaobserwowano pierwsze wyraźniejsze zmiany patologiczne w obrębie parenchymy kłębków szyjnych. Torebka łącznotkankowa otaczająca strukturę kłębków szyjnych była pogrubiała (Ryc. 16). Efekt ten był spowodowany zwiększoną ilością włókienek kolagenowych, pomiędzy którymi występują liczne fibroblasty oraz wypustki komórek nerwowych. W obrębie struktury gronek, zbudowanych z komórek chemoreceptorowych (Ryc. 16) jak i komórek podporowych (Ryc. 17), wyraźnie zaznaczone jest zróżnicowanie elektronowo-gęstej cytoplazmy komórek chemoreceptorowych. Zróżnicowanie między komórkami związane jest z powstawaniem komórek ciemnych z charakterystyczną obkurczoną cytoplazmą, do czego przyczynia się proces oddawania wody przez komórkę. Uwagę zwraca również zwiększona ilość zróżnicowanych pod względem morfologicznym



Ryc. 16. Mikrografia przedstawia fragment węzła szyjnego pochodzącego od 12 mies. szczura. Struktura węzłkowa utworzona przez komórki typu I (T1) i II (T2) otoczona poszerzoną torebką łącznotkankową (Ł). W centralnej części mikrografii widoczna komórka z zaburzeniami osmotycznymi tzw. komórka ciemna. Mitochondria komórkowe (M) są ogniskowo uszkodzone, pojawiają się pojedyncze fagolizosomy (FL). Strefa aparatu Golgiego (G) nie ulega zmianie. Strzałką oznaczona nadmierna wakuolizację we wnętrzu. Budowa kapilar (K) węzłkowych nie ulega uszkodzeniu. Powiększenie pierwotne 3k.



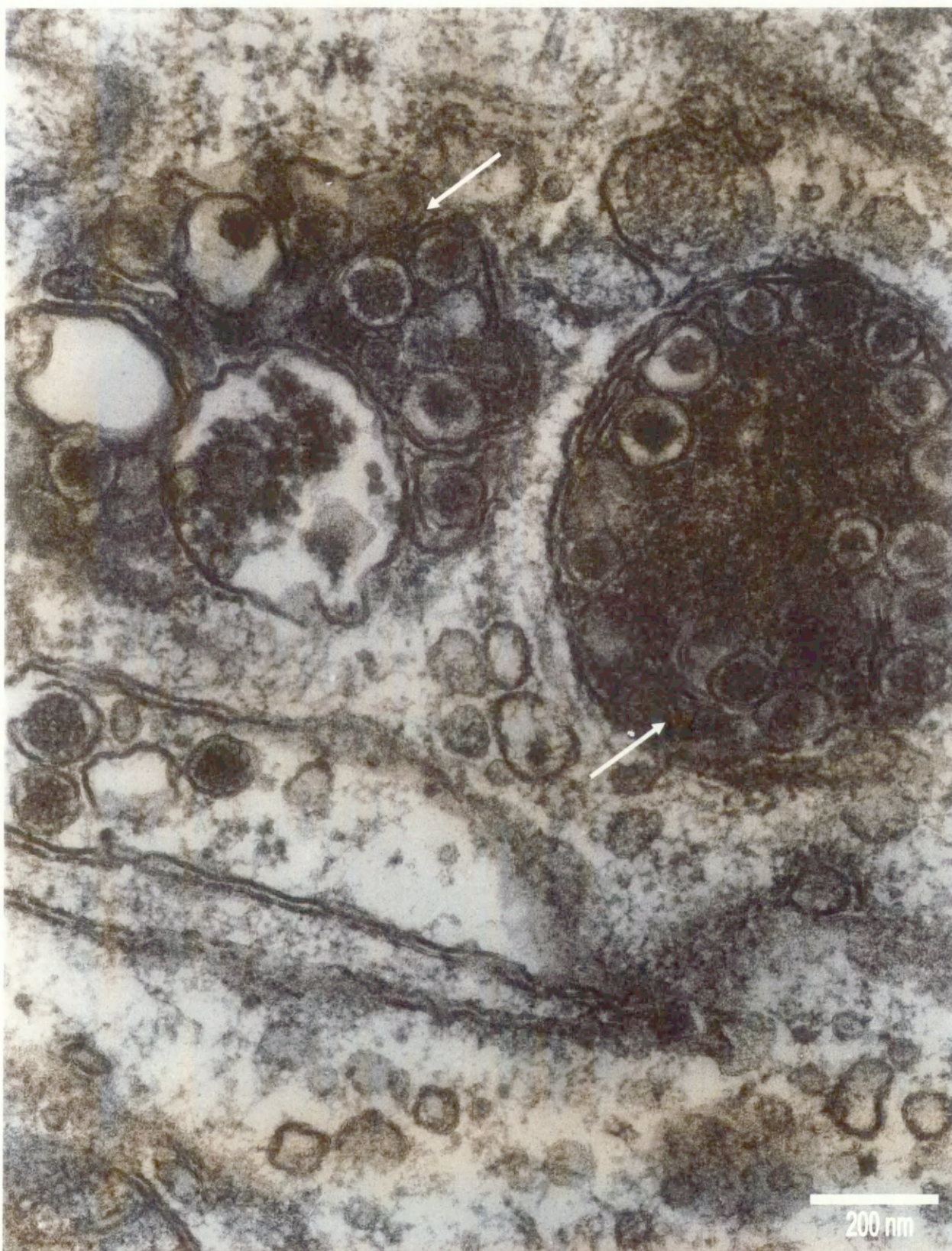
Ryc. 17. Fragment kłębków szyjnych pochodzących od 12 mies. szczura. Widoczne dwie komórki chemoreceptorowe (T1) o niezmienionej budowie oraz część perykaryalna komórki typu II (T2), która swoją „nogą” wciska się pomiędzy komórki chemoreceptorowe. Elementy komórkowe: (J) jądro komórkowe, (Z) ziarnistości neurosekrecyjne, aparat Golgiego (G), a także włókna nerwowe (N) są prawidłowo zachowane. (M) mitochondria ulegają niewielkim ogniskowym zmianom. Powiększenie pierwotne 6k.



Ryc. 18. Mikrografia przedstawia fragment struktury kłębka szyjnego pochodzącego od 12 mies. szczura. Pojawiają się ogniskowe zmiany w mitochondriach komórkowych (M) oraz zjawisko tzw. krynofagii (oznaczonej strzałkami). Strefa aparatu Golgiego (G) nie ulega uszkodzeniom. Ziarnistości neurosekrecyjne (Z) są nadal licznie reprezentowane. (J) jądro komórkowe, torebka łącznotkankowa (Ł). Strzałką otwartą oznaczone ciało wielopęcherzykowe. Powiększenie pierwotne 6k.



Ryc. 19. Fragment parenchymy komórek chemoreceptorowych pochodzących od 12 mies. szczura. Widoczne ogniskowe zmiany w mitochondriach (M). Większość błon mitochondrialnych zachowana jednak w niezmienionej postaci. Strzałkami oznaczono uszkodzenia w obrębie zewnętrznej błony ściany jądrowej (J). Powiększenie pierwotne 40k.



Ryc. 20. Mikrografia przedstawia fragment parenchymy komórek chemoreceptorowych pochodzących od 12 mies. szczura. Strzałką oznaczone tzw. krynofagię. Powiększenie pierwotne 40k.

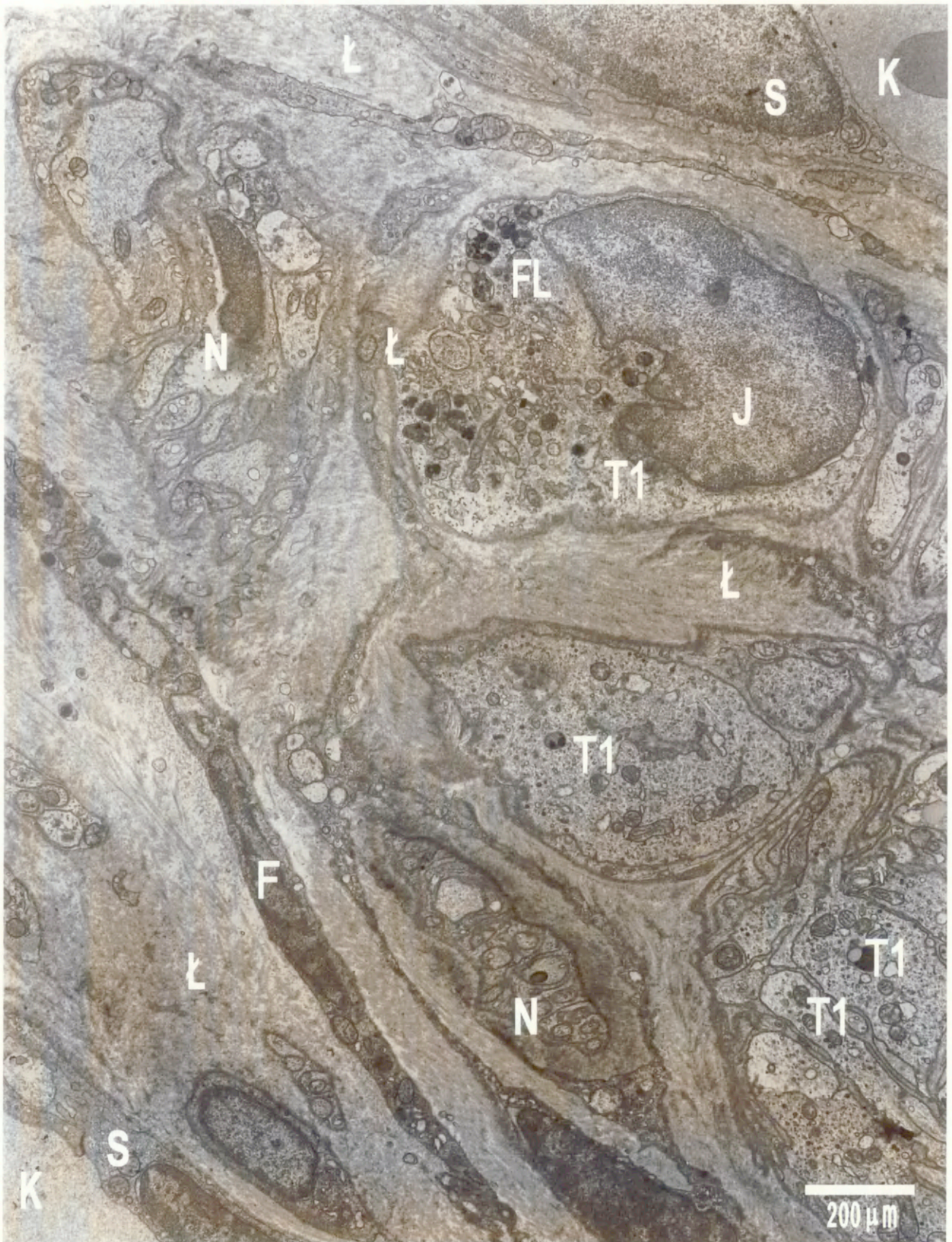


lizosomów, ciał wielopęcherzykowych (Ryc. 18), a także mitochondriów o różnym stopniu uszkodzenia (Ryc. 19). Zmiany te przemawiają za wybiórczym, nekrotycznym uszkodzeniem tych organelli. W jądrze komórkowym zaobserwowałam ogniskowe rozwarstwienie blaszek ściany jądrowej (Ryc. 19). U szczurów w tej grupie wiekowej po raz pierwszy zaobserwowano zjawisko tzw. krynofagii (Ryc. 20) polegające najprawdopodobniej na wchłanianiu i niszczeniu ziarnistości neurosekrecyjnych przez endogenne hormony komórkowe. Generalnie jednak zmiany te miały umiarkowany charakter.

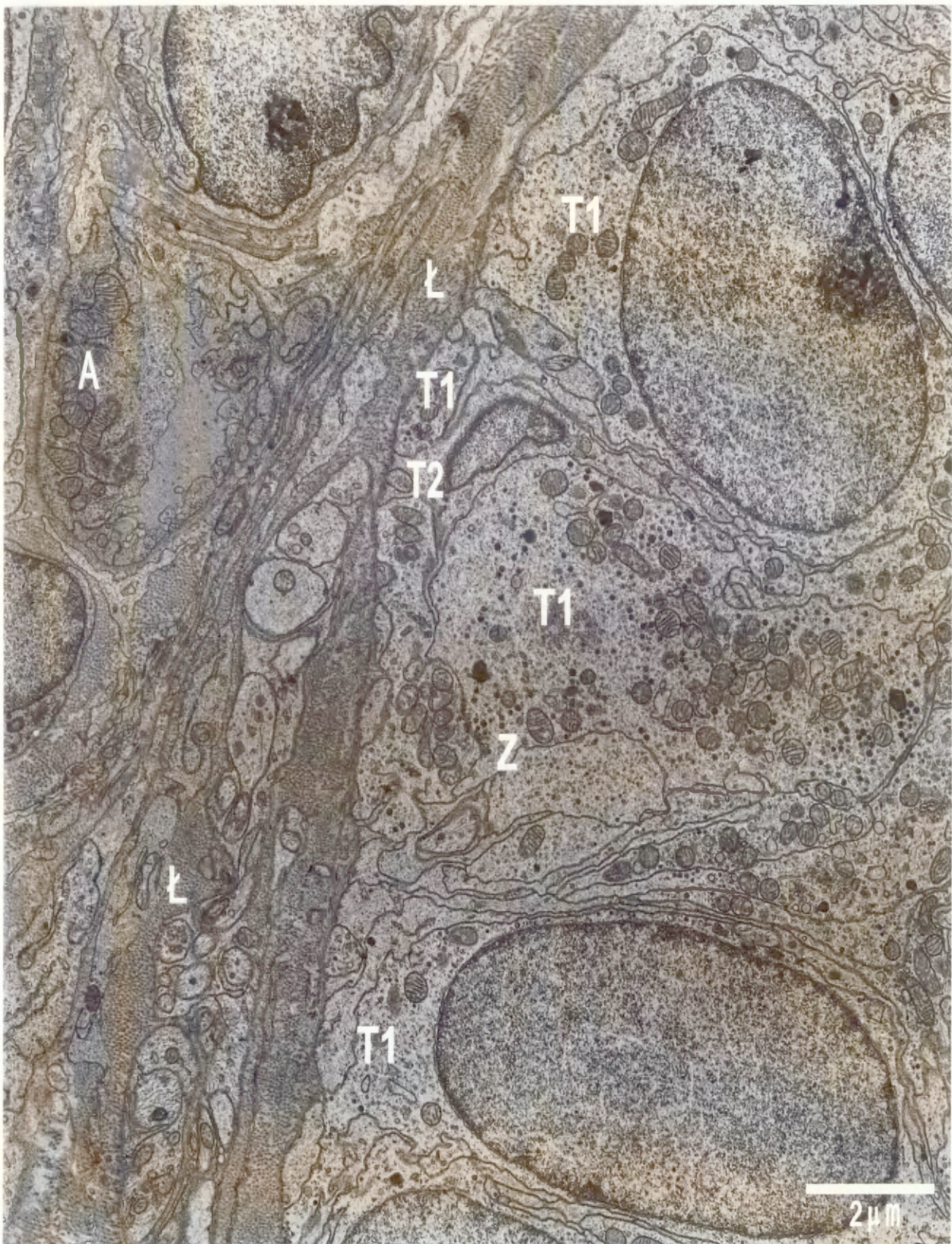
#### **4.2.4. SZCZURY 18-MIESIĘCZNE**

W strukturach kłębkowych dochodzi do znacznego rozplemu elementów łącznotkankowych. W torebce łącznotkankowej zwiększa się liczebność aktywnych fibroblastów jak również ilość pęczków włókienek kolagenowych, które penetrują w struktury komórek kłębkowych (Ryc. 21). W znacznie pogrubionej warstwie łącznotkankowej dochodzi do powstawania młodych naczyń kapilarnych, czyli angiogenezy (Ryc. 22). Nowotworzone naczynia krwionośne charakteryzują się wysokim śródbłonkiem i małym światłem stanowiącym niekiedy wąską szczelinę.

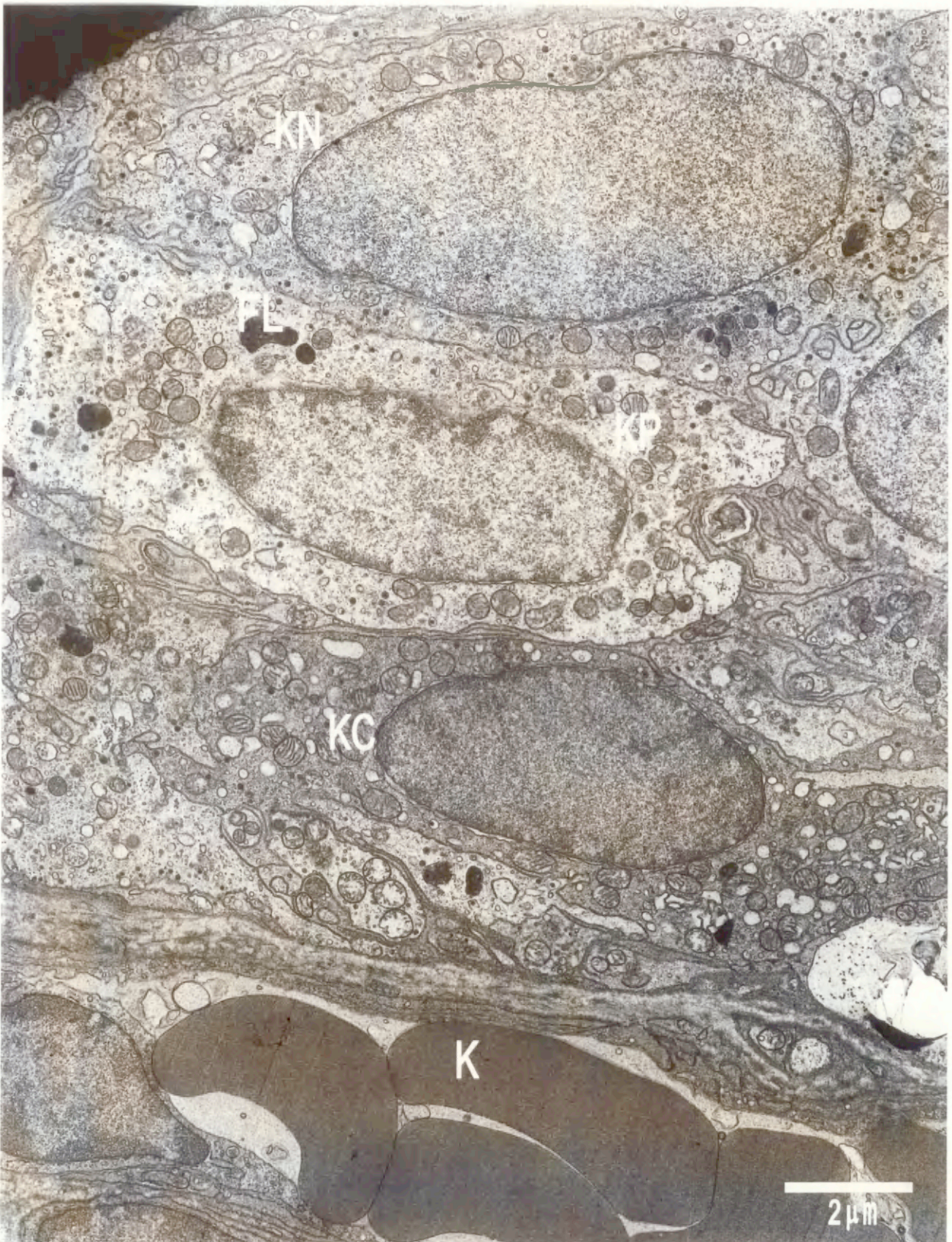
Komórki chemoreceptorowe wykazują zróżnicowaną morfologię. Wśród nich występują komórki o bardzo przerzedzonej cytoplazmie, natomiast inne zachowują wygląd komórek prawidłowych (Ryc. 23). W zależności od stopnia uszkodzenia komórek zmienia się morfologia jąder komórkowych z rozwarstwieniem ściany jądrowej włącznie (Ryc. 24). W cytoplazmie tych komórek daje się zaobserwować liczne, zróżnicowane fagolizosomy zawierające niekiedy w swym wnętrzu sfagocytowane ziarnistości neurosekrecyjne, czyli tzw. krynofagia. W strefie przyjądrowej dochodzi do redukcji strefy aparatu Golgiego i do silnej wakuolizacji



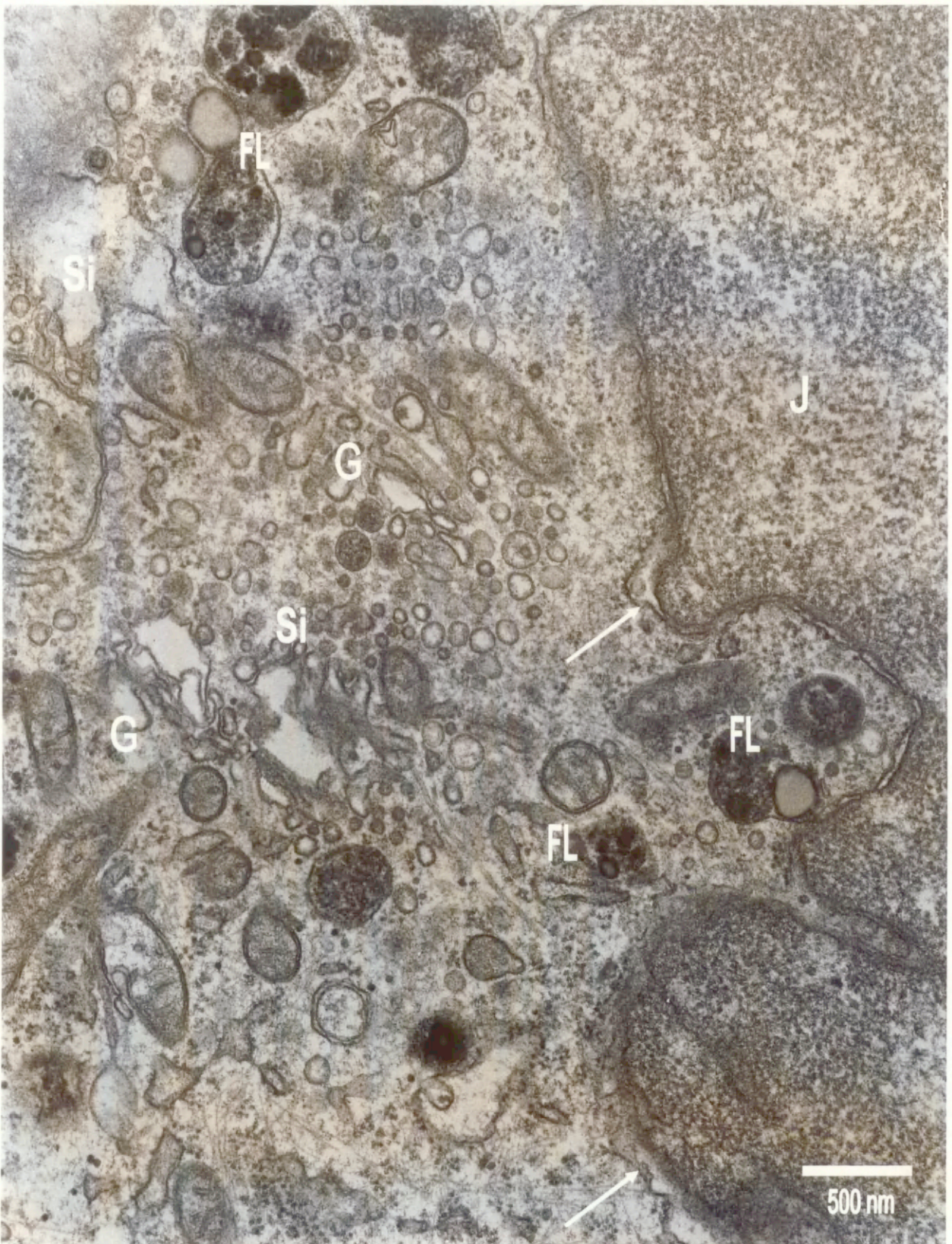
Ryc. 21. Fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. Gronko komórek chemoreceptorowych zlokalizowanego jest między dwoma naczyniami krwionośnymi (K) wyścielonymi niezmiennymi komórkami śródbłonkowymi (S). W pogrubionej, w wyniku zwiokrotnienia ilości komórek fibroblastów (F), torebce łącznotkankowej (Ł) znajdują się włókna nerwowe (N) ulegają stopniowej dezintegracji. W parenchymie komórek typu I pojawiają się liczne fagolizosomy (FL). Powiększenie pierwotne 3k.



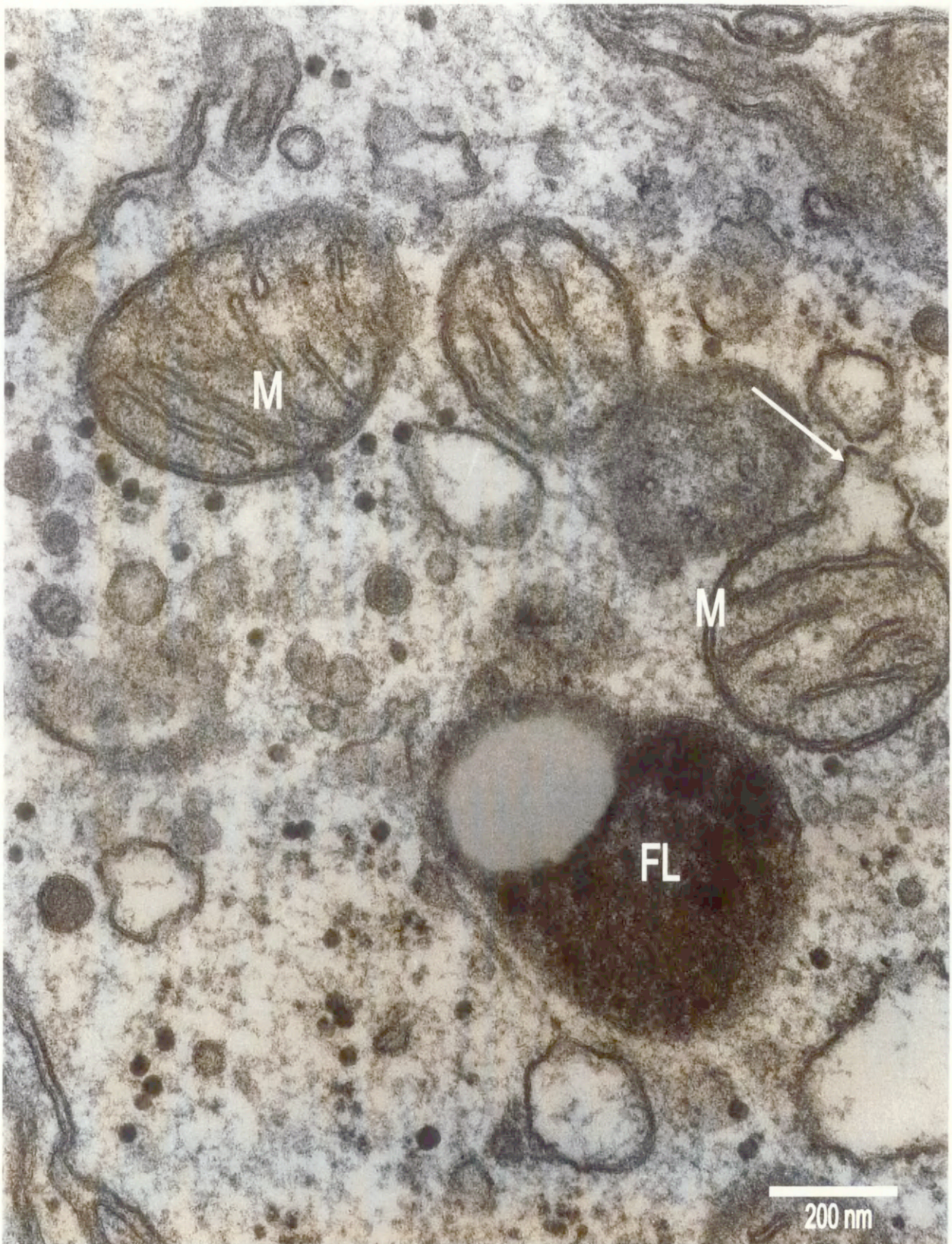
Ryc. 22. Parenchyma kłębaka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. W znacznie poszerzonej torebce łącznotkankowej (Ł) powstają nowe naczynia krwionośne charakteryzujące się wysokim śródbłonkiem. (A) - angiogeneza. Komórki chemoreceptorowe (T1) charakteryzują się zredukowaną strefą aparatu Golgiego oraz zmniejszoną ilością ziarnistości neurosekrecyjnych (Z). Pomiedzy komórki typu I wciskają się „nogi” komórek typu II (T2). Powiększenie pierwotne 3k.



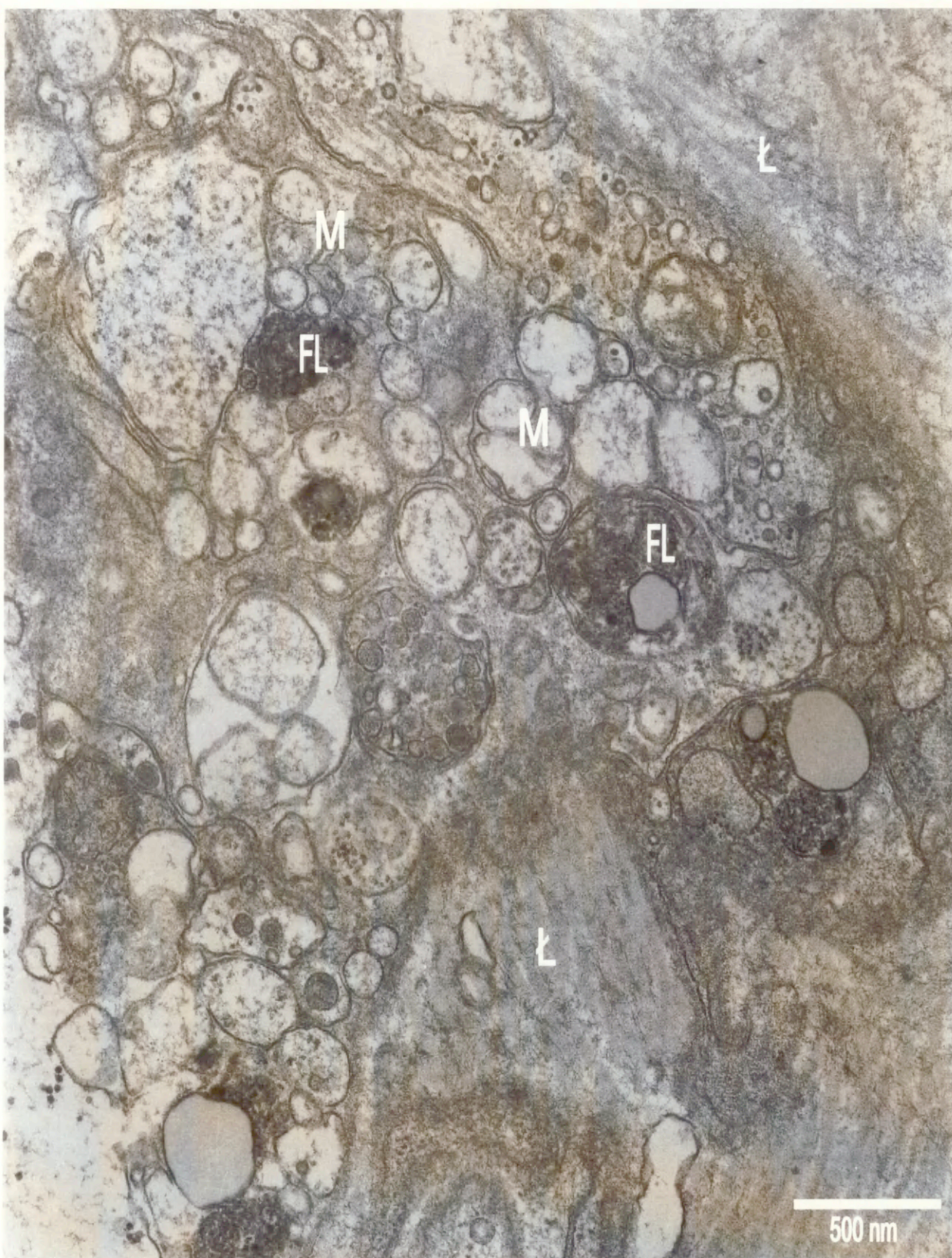
Ryc. 23. Fragment struktury kłębka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. Komórki chemoreceptorowe wykazują znaczne zróżnicowanie morfologiczne. Występują wśród nich komórki o bardzo przerzedzonej cytoplazmie (KP), komórki ciemne (KC), oddające wodę oraz komórki prawie niezmienione (KN). W cytoplazmie widoczne liczne fagolizosomy (FL). Powiększenie pierwotne 3k.



Ryc. 24. Fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. Ściana jądrowa ulega rozwarstwieniu (oznaczone strzałkami). W strefie przyjądrowej dochodzi do silnej wakuolizacji kanałów siateczki cytoplazmatycznej (Si) oraz do zaniku strefy aparatu Golgiego (G). Pojawiają się liczne lizosomy (FL) wypełnione niehomogenną materią. Powiększenie pierwotne 15k.



Ryc. 25. Fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. Ogniskowe uszkodzenie mitochondriów komórkowych (M). Część z nich zachowuje prawidłową strukturę błon natomiast inne ulegają opustoszeniu z grzebieni mitochondrialnych oraz przerwaniu ulega ich błona zewnętrzna (oznaczone strzałką). W cytoplazmie występują liczne fagolizosomy (FL) wypakowane sfagocytowanym materiałem. Powiększenie pierwotne 40k.



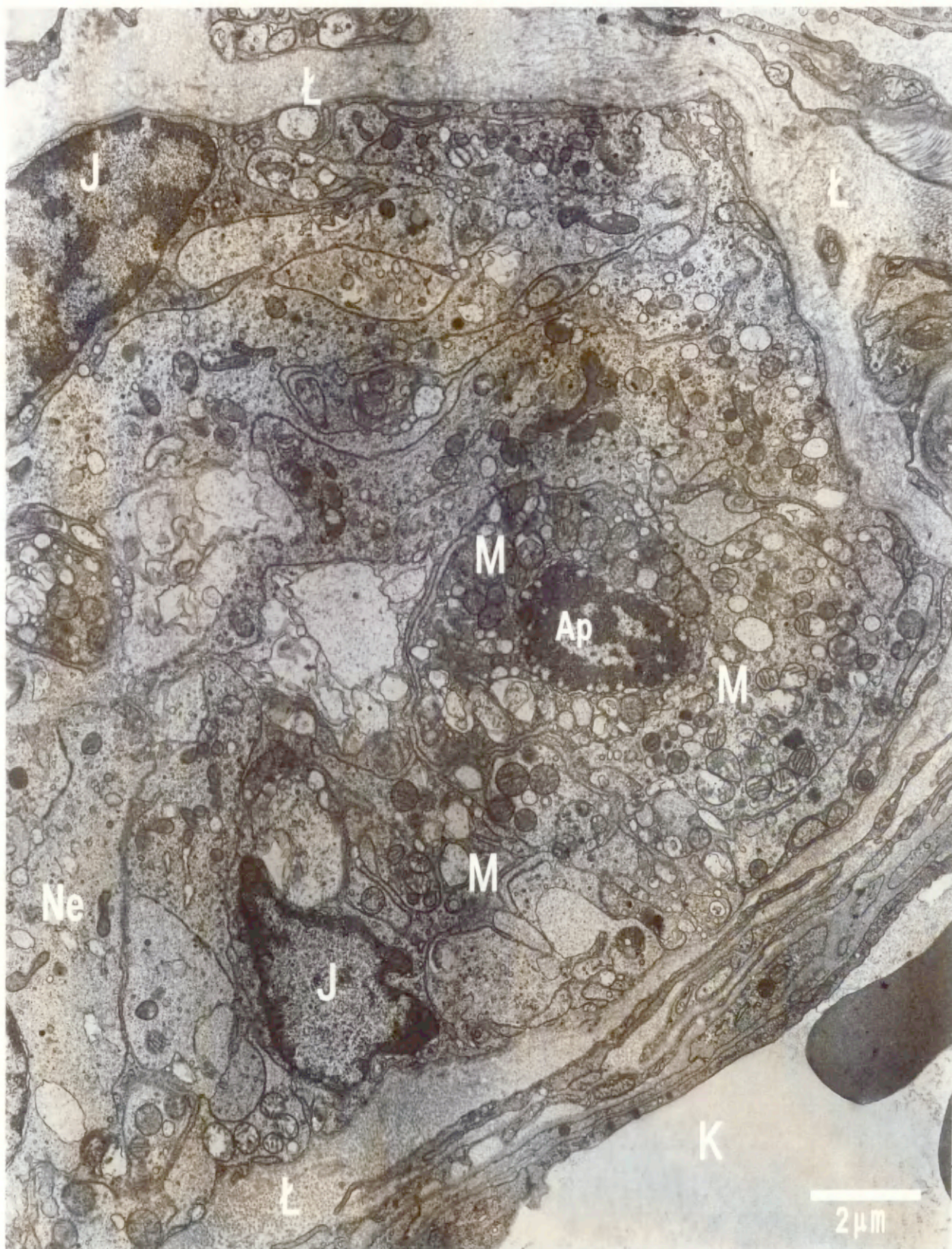
Ryc. 26. Fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 18 mies. szczura. Całkowita degradacja komórek chemoreceptorowych prowadząca do wymieszania organelli komórkowych z włóknkami tkanki łącznej (Ł). W cytoplazmie występują całkowicie opustoszałe mitochondria (M) oraz obszary w obrębie, których nie można wyróżnić żadnych organelli komórkowych. Pojawiają się liczne fagolizosomy (FL). Powiększenie pierwotne 15k.

kanałów siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 24). Istotną cechą jest redukcja ilości ziarnistości neurosekrecyjnych. Uwagę zwraca również niejednorodne uszkodzenie mitochondriów, w których występują cechy obrzęku i przerwania ciągłości limitującej ich błony (Ryc. 25). Proces degradacji morfologicznej zachodzący w komórkach chemoreceptorowych niejednokrotnie prowadzi do ich całkowitego zniszczenia, za czym przemawiają fragmenty komórek „zatopione” w elementach włókienkowych tkanki łącznej (Ryc. 26). Kłębki szyjne pochodzące od 18 miesięcznych szczurów wykazują istotne różnice w budowie morfologicznej w porównaniu z kłębkami pochodzącymi od młodszych zwierząt. Zmiany te mają jednak charakter ogniskowy, co powoduje dużą różnorodność stanu komórek. Ocena ilościowa wykazuje, że zmiany patologiczne dotyczą około 1/3 całej puli komórek chemoreceptorowych. W zakończeniach nerwowych daje się zaobserwować proces dezintegracji polegający na koncentrycznym nawijaniu się blaszek osłonek nerwowych.

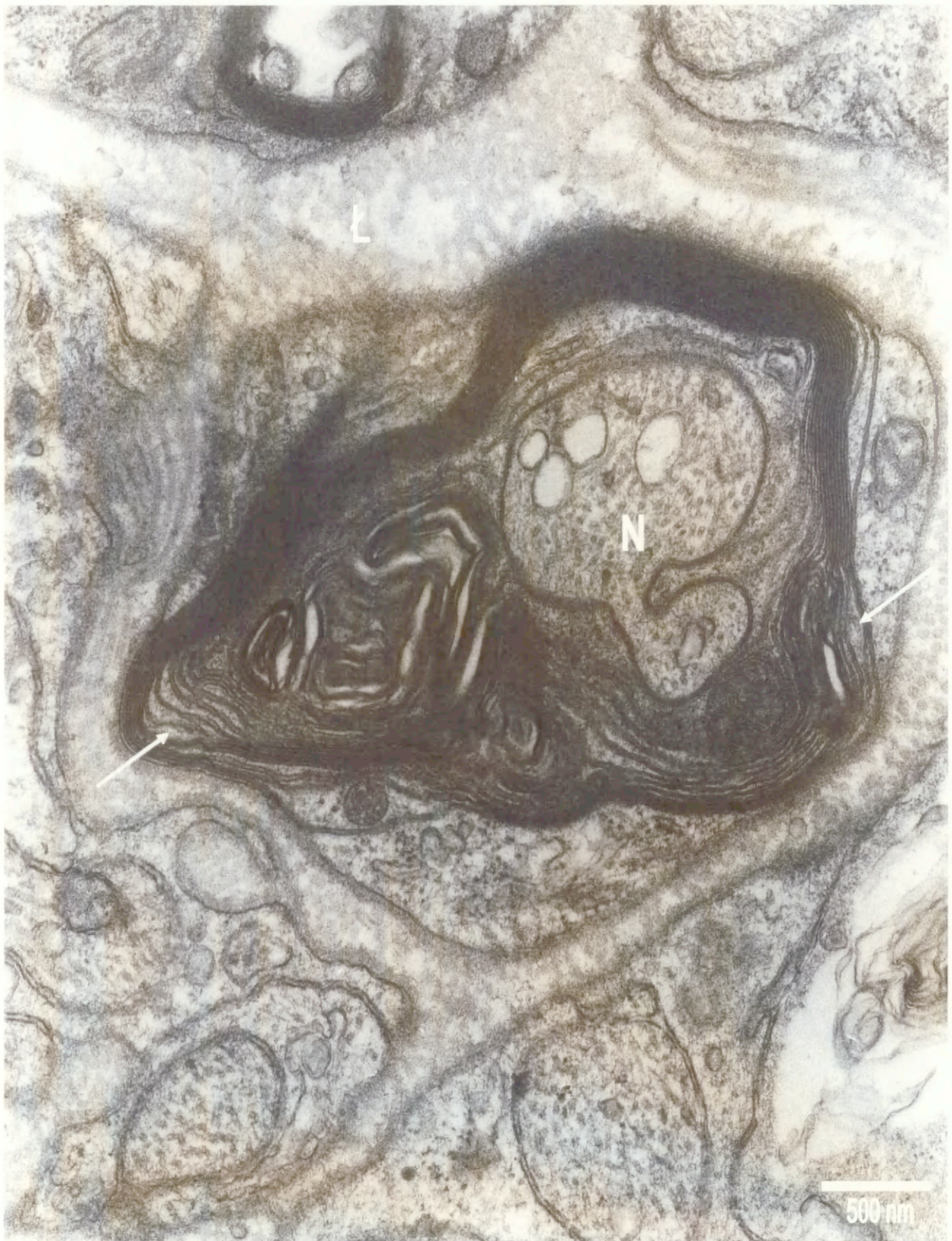
#### **4.2.5. SZCZURY 24-MIESIĘCZNE**

W kłębkach szyjnych najstarszej grupy wiekowej zwraca uwagę rozbudowana i bogata w elementy łącznotkankowe torebka, która może powodować pogorszenie dyfuzji gazów z naczyń krwionośnych do parenchymy kłębków szyjnych oraz okluzji strefy kłębkowej (Ryc. 27). Osłonki mielinowe ulegają degradacji powodującej trwałe uszkodzenie wnętrza otaczanych przez nie włókien komórek nerwowych (Ryc. 28). W gronkach komórek chemoreceptorowych daje się zauważyć „mozaikowość”. Wśród nich można wyróżnić komórki o morfologicznych cechach apoptozy, jak i takie, w których przebiega proces nekrotyczny (Ryc. 27). W tych pierwszych występuje charakterystyczna agregacja heterochromatyny z jednoczesnym zachowaniem prawidłowej struktury mitochondriów. W komórkach podlegających procesom

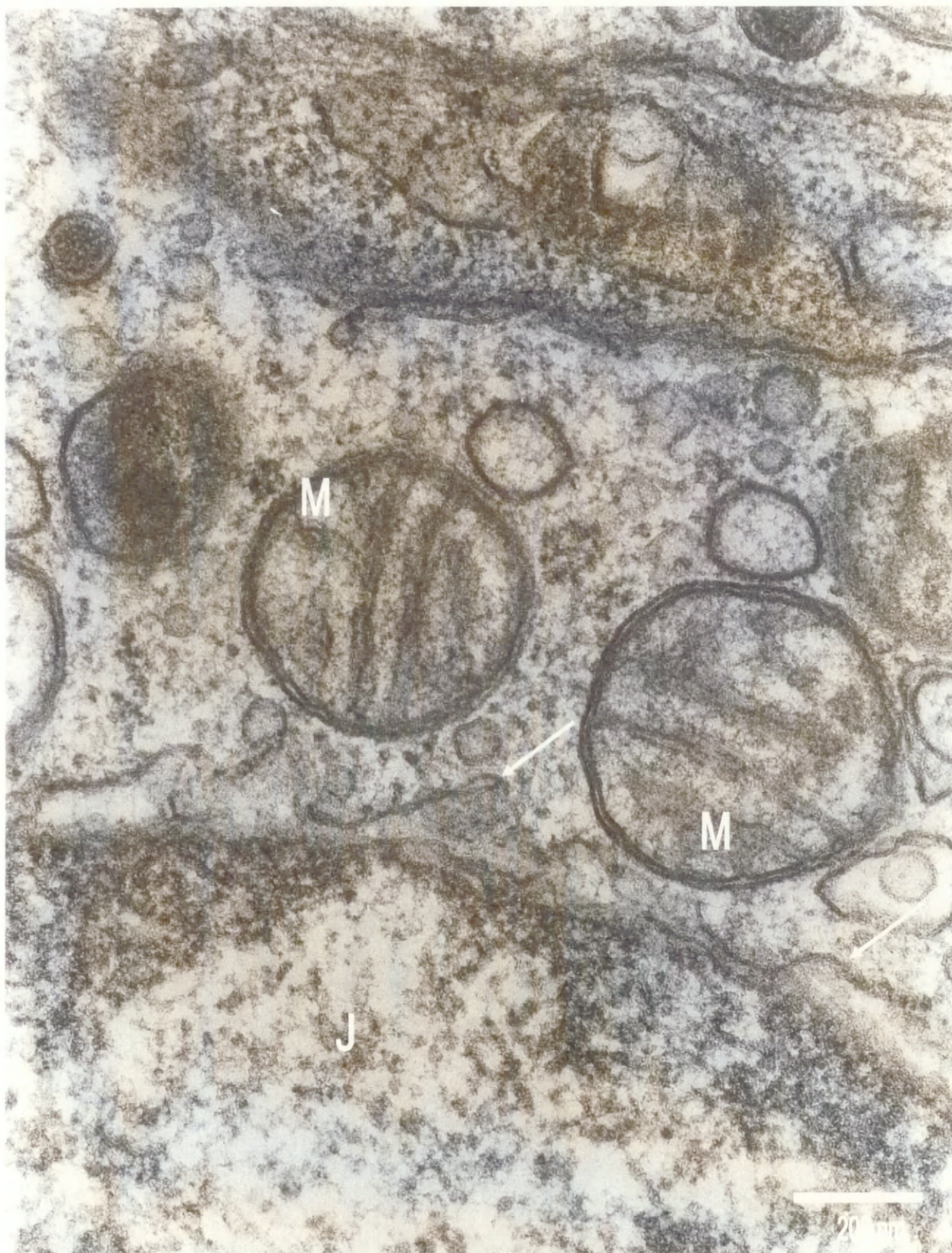




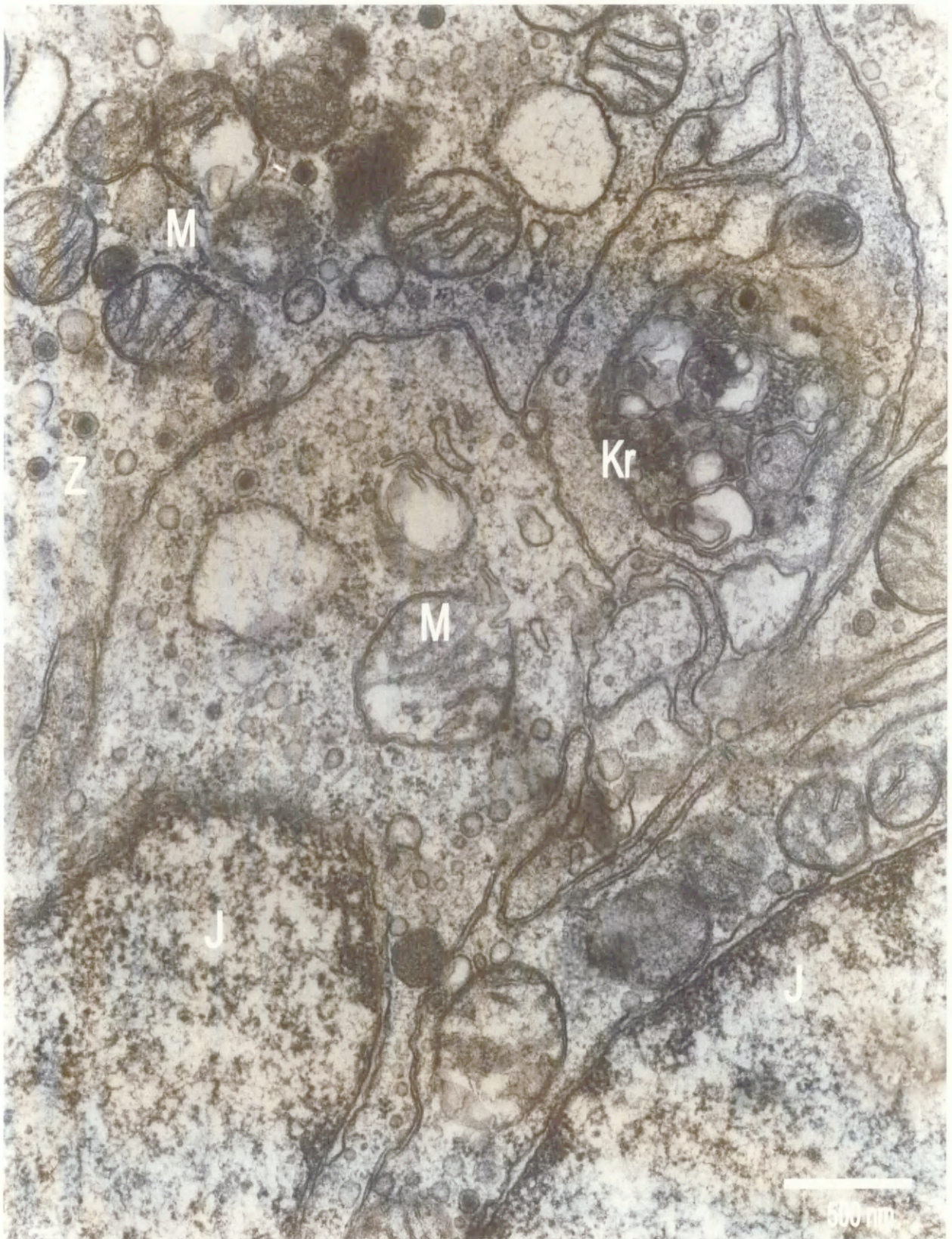
Ryc. 27. Fragment kłębka szyjnego, pochodzącego od 24 mies. szczura, zlokalizowanego w pobliżu naczynia krwionośnego (K), od którego kłębek jest odizolowany znacznie zgrubiałą torebką łącznotkankową (Ł). W gronku komórek chemoreceptorowych daje się zauważyć różnorodność wśród komórek. Występują w nim komórki o cechach apoptozy (Ap) z charakterystyczną zagregowaną chromatyną we wnętrzu jądra komórkowego (J) i z zachowaną strukturą mitochondriów (M), a także komórki o cechach nekrozy (Ne) z przerzedzoną macierzą mitochondriów oraz z zanikiem organelli komórkowych. Powiększenie pierwotne 3k.



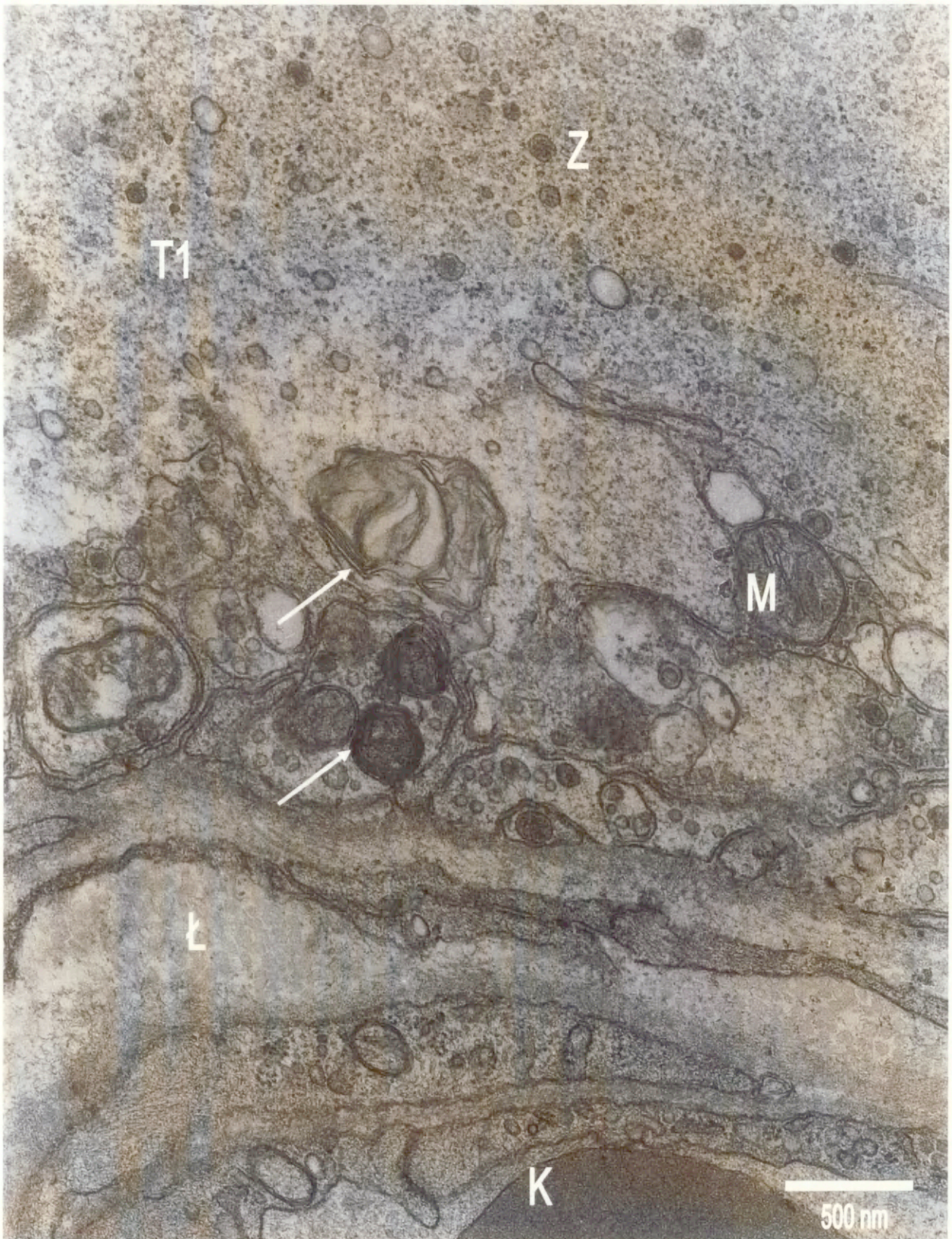
Ryc. 28. Mikrografia przedstawia przekrój przez nerw zmielinizowany znajdujący się w okolicy kłębka szyjnego, pochodzącego od 24 mies. szczura. Nerw ten jest zatopiony w poszerzonej warstwie kolagenowej (λ). Osłonki mielinowe ulegają rozwarstwieniu (oznaczone strzałką) i degeneracji powodując trwałe uszkodzenie włókienek komórek nerwowych (N). Powiększenie pierwotne 15k.



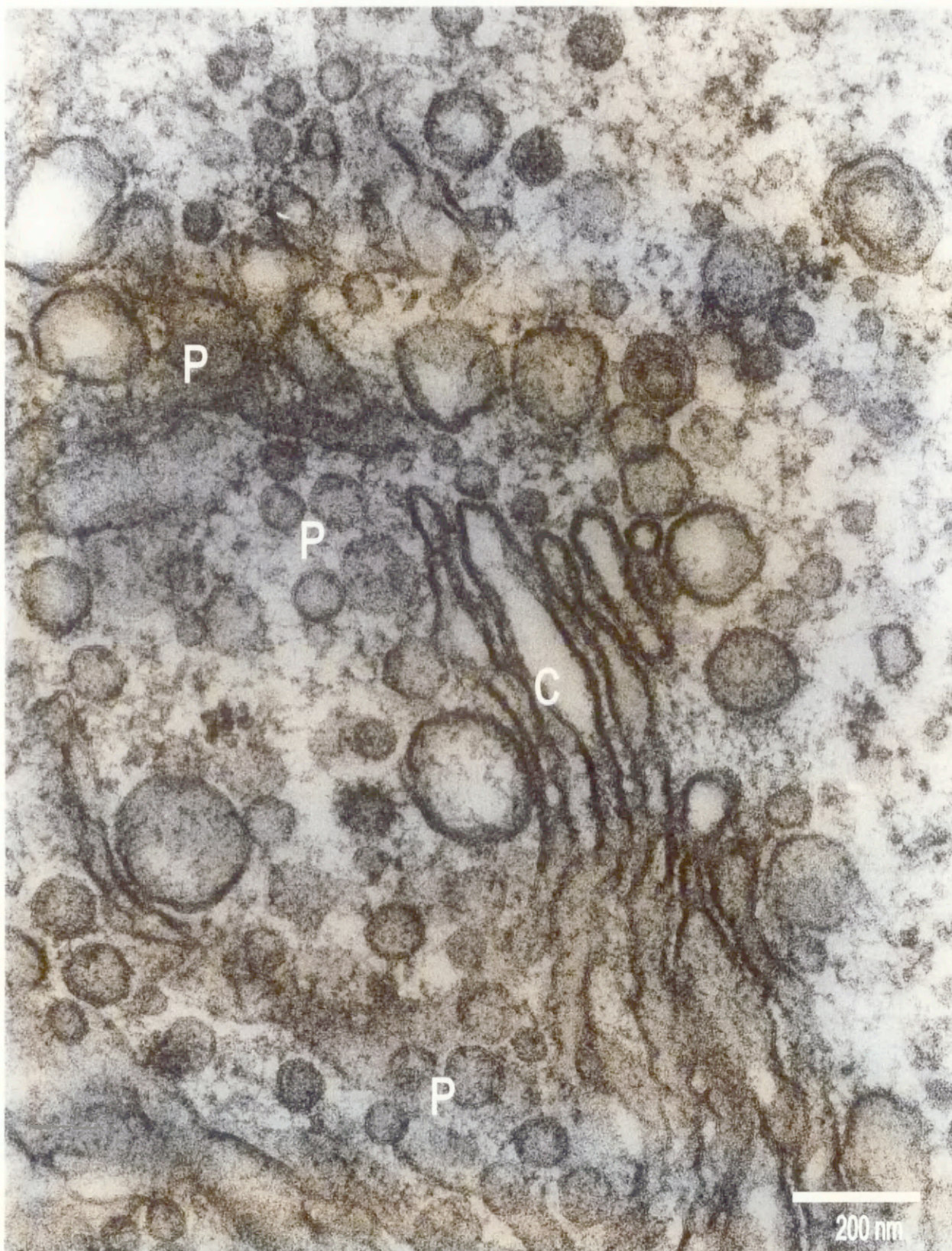
Ryc. 29. Fragment komórki chemoreceptorowej z kłębka szyjnego pochodzącego od 24 mies. szczura. Rozwarstwieniu ulega ściana jądrowa (oznaczone strzałkami). Część mitochondriów zachowuje prawidłową budowę ultrastrukturalną (M). Jądro komórkowe (J). Powiększenie pierwotne 40k.



Ryc. 30. Fragment kłębka szyjnego pochodzącego od 24 mies. szczura. Mitochondria komórkowe (M) ulegają ogniskowemu uszkodzeniu. Zmianie ulega także kształt tych organelli, ilość grzebieni oraz wygląd macierzy mitochondrialnej. Zmniejsza się ilość ziarnistości neurosekrecyjnych (Z). W cytoplazmie komórkowej pojawia się krynofagia (Kr). Jądro komórkowe (J) charakteryzuje się rozwarstwowaną ścianą jądrową. Powiększenie pierwotne 15k.



Ryc. 31. Fragment parenchymy komórek chemoreceptorowych (T1) pochodzących z kłębka szyjnego 24 mies. szczura. Komórki ulegają całkowitej dezintegracji. W ich cytoplazmie znajdują się pojedyncze, zmienione mitochondria komórkowe (M), nieliczne ziarnistości neurosekrecyjne (Z) oraz ciała mielinopodobne (oznaczone strzałką). Cała struktura kłębkowa otoczona jest znacznie poszerzoną torebką łącznotkankową (Ł). Naczynie krwionośne (K) zachowują prawidłową strukturę. Powiększenie pierwotne 15k.



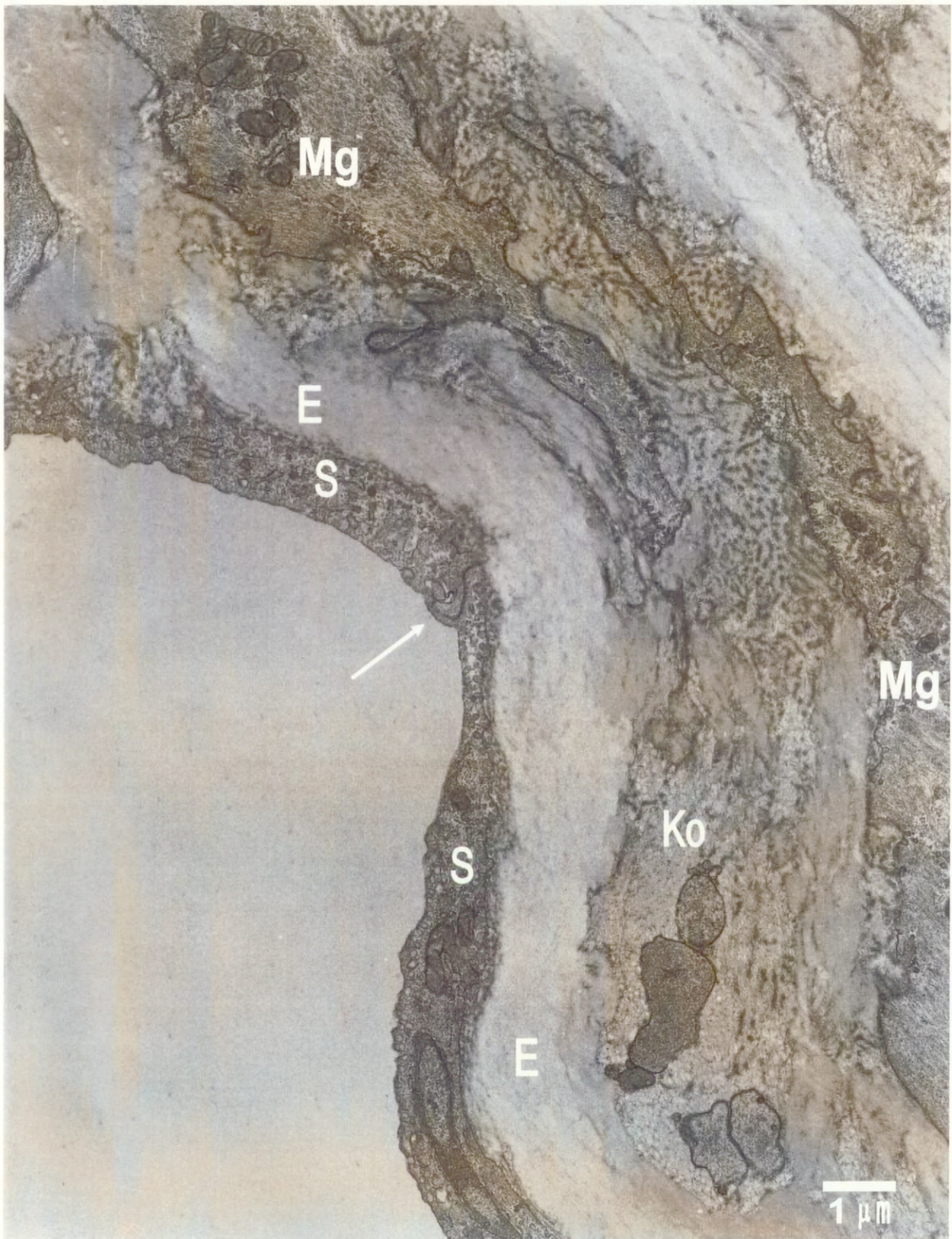
Ryc. 32. Fragment komórki chemoreceptorowej z kłębka szyjnego pochodzącego od 24 mies. szczura. Rozwarstwieniu i „obrzękowi” ulegają cysterny (C) aparatu Golgiego. W pobliżu strefy Golgiego znajdują się tylko nieliczne pęcherzyki (P) z ciemnym rdzeniem. Powiększenie pierwotne 40k.

nekrotycznym obserwuje się rozwarstwienie ściany jądrowej (Ryc. 29) oraz zmniejszenie całkowitej ilości organelli komórkowych z przewagą tych o zmienionym kształcie ( $49,6 \pm 4,9\%$  mitochondriów uległo różnego typu uszkodzeniom w porównaniu z młodymi szczurami, u których zaobserwowano  $23,3 \pm 3,1\%$  zmienionych mitochondriów,  $P < 0,05$ ) i przerzedzonej macierzy (Ryc. 30). W obrębie komórek chemoreceptorowych pojawiają się liczne tzw. ciała mielinopodobne (Ryc. 31). Cysterny aparatów Golgiego ulegają rozwarstwieniu, a w ich pobliżu nie obserwuje się pęcherzyków z ciemnymi rdzeniami (Ryc. 32). Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych ma tendencję do zmniejszania się w porównaniu z młodymi zwierzętami ( $101,3 \pm 10,2$  u młodych vs.  $84,1 \pm 10,2$  u starych szczurów). Większość, ponad 1/2 komórek chemoreceptorowych wchodzących w skład gronek uległa uszkodzeniom. Około 20% spośród komórek uszkodzonych ulega zupełnej fragmentacji. Zmiany te mają charakter podobny do tych zaobserwowanych u 18 miesięcznych szczurów, lecz są znacznie bardziej nasilone.

### **4.3. ULTRASTRUKTURA TĘTNIC SZYJNYCH**

#### **4.3.1. SZCZURY 3-MIESIĘCZNE**

Tętnica szyjna wspólna, według histologicznej klasyfikacji zaliczana jest do tętnic typu sprężystego (zewnątrzna i wewnętrzna do typu mięśniowego). U szczurów ściana zbudowana jest z kilku warstw i typów komórek. Najbardziej wewnętrzna warstwa zbudowana jest z komórek śródbłonkowych i leżącej pod nimi cienkiej warstwy tkanki łącznej włóknistej oraz błony podstawnej (Ryc. 33). Śródbłonek zbudowany jest z płaskich komórek połączonych ze sobą różnego typu złączami. W komórkach tych znajdują się liczne pęcherzyki pinocytarne, pojedyncze mitochondria, kanały siateczki cytoplazmatycznej (Ryc. 34). Warstwa środkowa zbudowana jest głównie z włókien

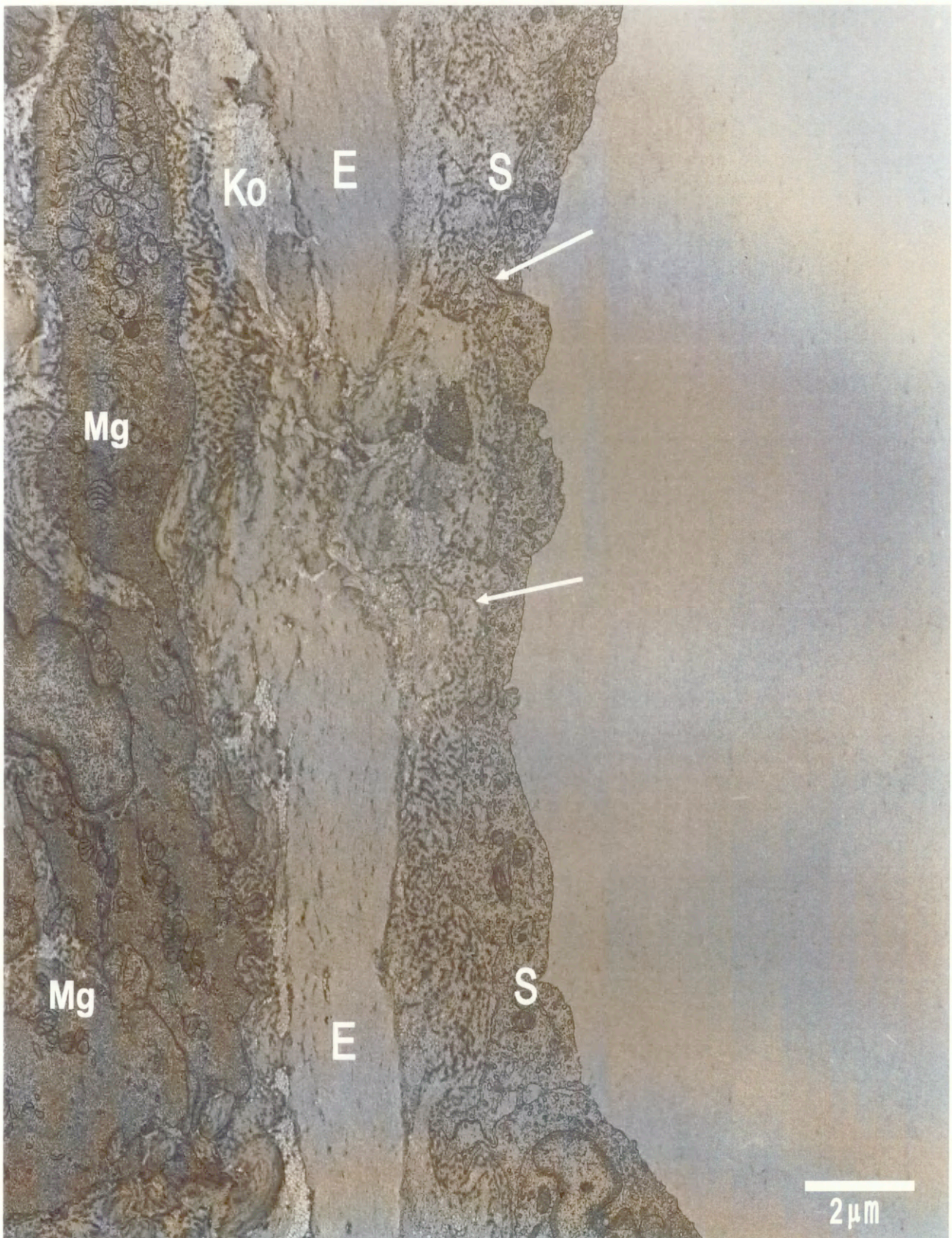


Ryc. 33. Mikrografia przedstawia fragment prawidłowej tętnicy szyjnej pochodzącej od 3 mies. szczura. Z lewej strony mikrografii widoczne światło naczynia wystlane warstwą komórek śródbłonkowych (S), między którymi widoczne są charakterystyczne połączenia (oznaczone strzałką). Kolejne warstwy stanowi warstwa elastynowa (E) oraz warstwa mięśni gładkich (Mg) przerośniętych niewielką ilością kolagenu (Ko). Powiększenie pierwotne 5k.





Ryc. 34. Mikrografia przedstawia fragment tętnicy szyjnej pochodzącej od 3 mies. szczura. Prawidłowy obraz komórki śródbłonkowej (S) z wyraźnie zaznaczonym jądrem komórkowym (J), mitochondriami komórkowymi (M) oraz licznymi pęcherzykami pinocytarnymi (P). Poniżej warstwy śródbłonkowej widoczna warstwa elastynowa (E). Strzałką oznaczone połączenie między komórkami śródbłonkowymi. Powiększenie pierwotne 12k.



Ryc. 35. Przekrój przez tętnicę szyjną pochodzącą od 6 mies. szczura. Warstwa komórek śródbłonkowych (S) oraz połączenia między nimi (oznaczone strzałkami) są prawidłowo zachowane. Leżąca pod nią warstwa elastynowa ulega ogniskowemu pofragmentowaniu (E). Zwiększają się nieznacznie odległości między komórkami mięśni gładkich (Mg) w tych miejscach pojawiają się włókienka kolagenowe (Ko). Powiększenie pierwotne 3k.

elastynowych połączonych w blaszkowate struktury tworzące litą warstwę (Ryc. 33). Bezpośrednio do warstwy elastynowej przylegają komórki mięśni gładkich, między którymi znajdują się liczne włókna nerwowe, których zakończenia stykają się z najbardziej zewnętrzną warstwą miocytów. Warstwę miocytów otaczają od zewnątrz włókna kolagenowe, tworząc grubą błonę elastynową zewnętrzną, zwaną przydanką. Włókna kolagenowe przydanki przebiegają podłużnie lub skośnie do długiej osi naczynia. Elementem komórkowym przydanki są fibroblasty. Tętniczki mięśniowe, do których zalicza się tętnicę szyjną zewnętrzną i wewnętrzną, charakteryzują się dobrze rozbudowaną błoną środkową, która składa się z miocytów gładkich, leżących w kilku warstwach. Ilość warstw wzrasta wraz ze wzrostem średnicy naczynia. Opisany przekrój przez ścianę tętnic szyjnych młodych szczurów stanowi przykład prawidłowej budowy i w związku z tym został potraktowany jako kontrola w stosunku do dalszej części doświadczeń.

#### **4.3.2. SZCZURY 6-MIESIĘCZNE**

Warstwa elastynowa niekiedy ulega fragmentacji (Ryc. 35). W przerwach utworzonych między elementami elastynowymi pojawiają się włókienka kolagenowe. Jednocześnie zwiększa się przestrzeń między komórkami mięśniowymi, w których również pojawiają się włókienka kolagenowe (Ryc.35). Komórki śródbłonkowe i złącza między nimi zachowują prawidłową budowę ultrastrukturalną. Zaobserwowana przebudowa ściany tętnic szyjnych jest powolnym, fizjologicznym procesem polegającym na delikatnym usztywnieniu się naczyń. Najistotniejszy element czynnościowy naczyń, jakim jest warstwa śródbłonkowa, nie ulega zmianom pod wpływem wieku, co świadczy o tym, że jego czynność może być zachowana (Ryc. 35).

### **4.3.3. SZCZURY 12-MIESIĘCZNE**

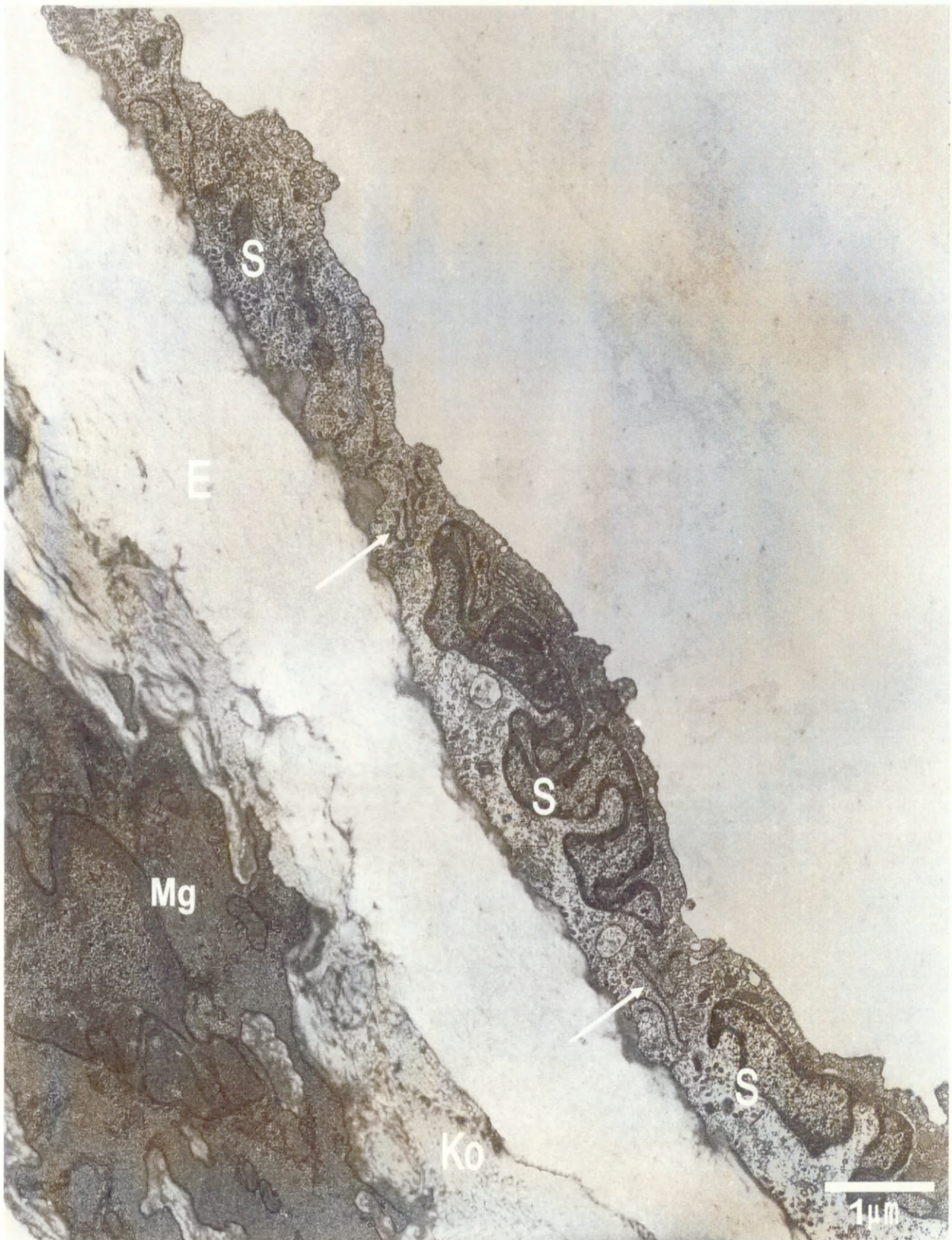
Warstwa śródbłonkowa jest w pełni zachowana. Połączenia między komórkami zachowują swoją strukturę (Ryc. 36). Uwagę zwraca fakt pojawienia się włókienek kolagenowych, tworzących pęczki pod błoną elastynową oraz wypełniających przestrzenie między komórkami mięśniowymi (Ryc. 37). Jest to proces nieco bardziej nasilony niż to było w przypadku szczurów 6 miesięcznych.

### **4.3.4. SZCZURY 18-MIESIĘCZNE**

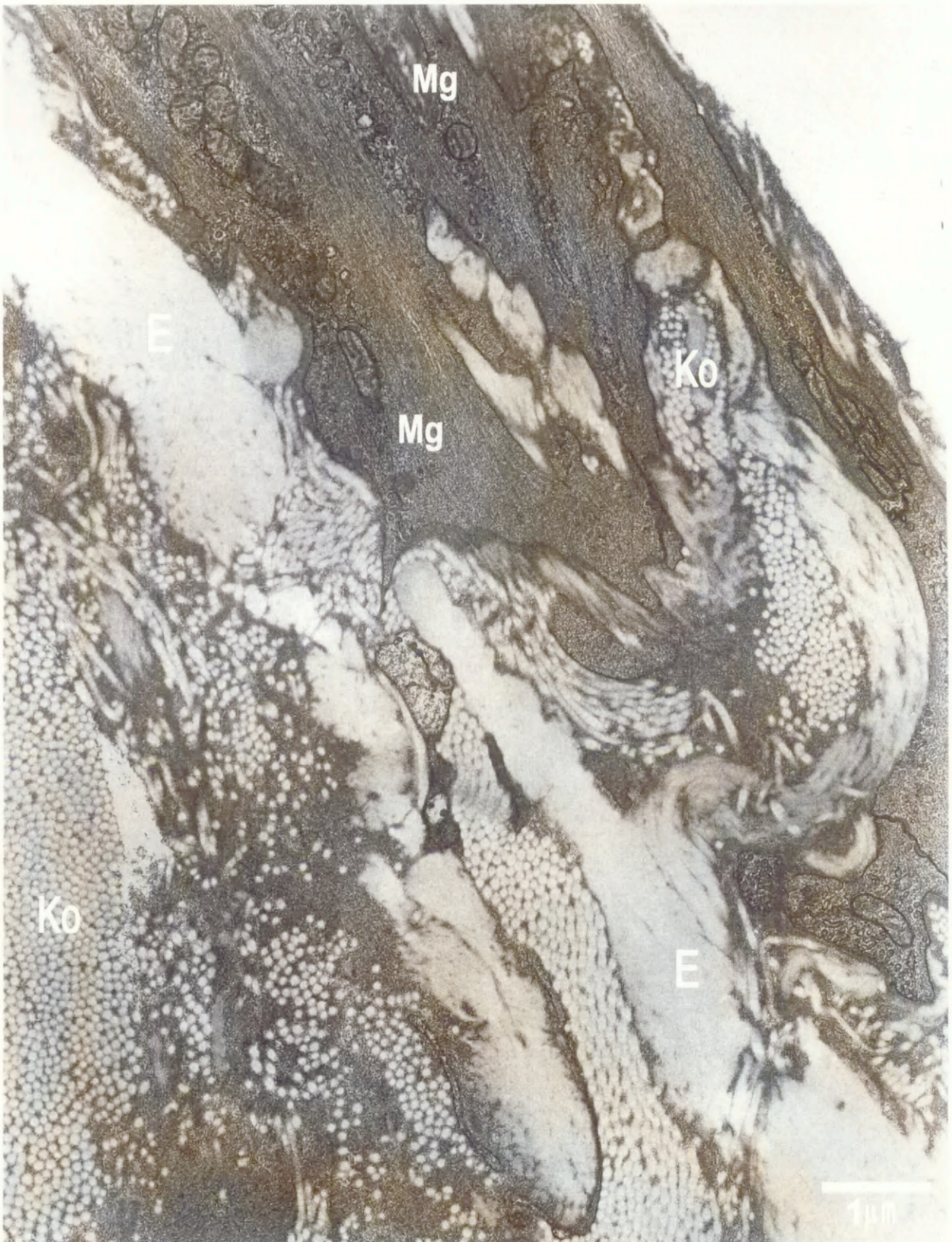
U szczurów w tym przedziale wiekowym daje się zaobserwować znaczne rozwarstwienie błony sprężystej (elastynowej) (Ryc. 38) oraz rozrośniętą warstwę komórek mięśni gładkich. Wszystkie przestrzenie międzykomórkowe wypełniają, ulegające rozplemowi włókienka kolagenowe. Warstwa laminarna, jaką stanowią komórki śródbłonkowe nadal zachowuje prawidłową strukturę. Charakteryzują się one obecnością mitochondriów, licznych pęcherzyków pinocytarnych (Ryc. 39) oraz pojedynczymi ciałami Weibla-Palade'a (Ryc. 38). Nie zaobserwowano żadnych agregatów płytkowych, które mogłyby świadczyć o procesie miażdżycowym. Zachodzące zmiany świadczą o przebudowie naczyń krwionośnych, która ma charakter fizjologicznych zmian z wiekiem.

### **4.3.5. SZCZURY 24-MIESIĘCZNE**

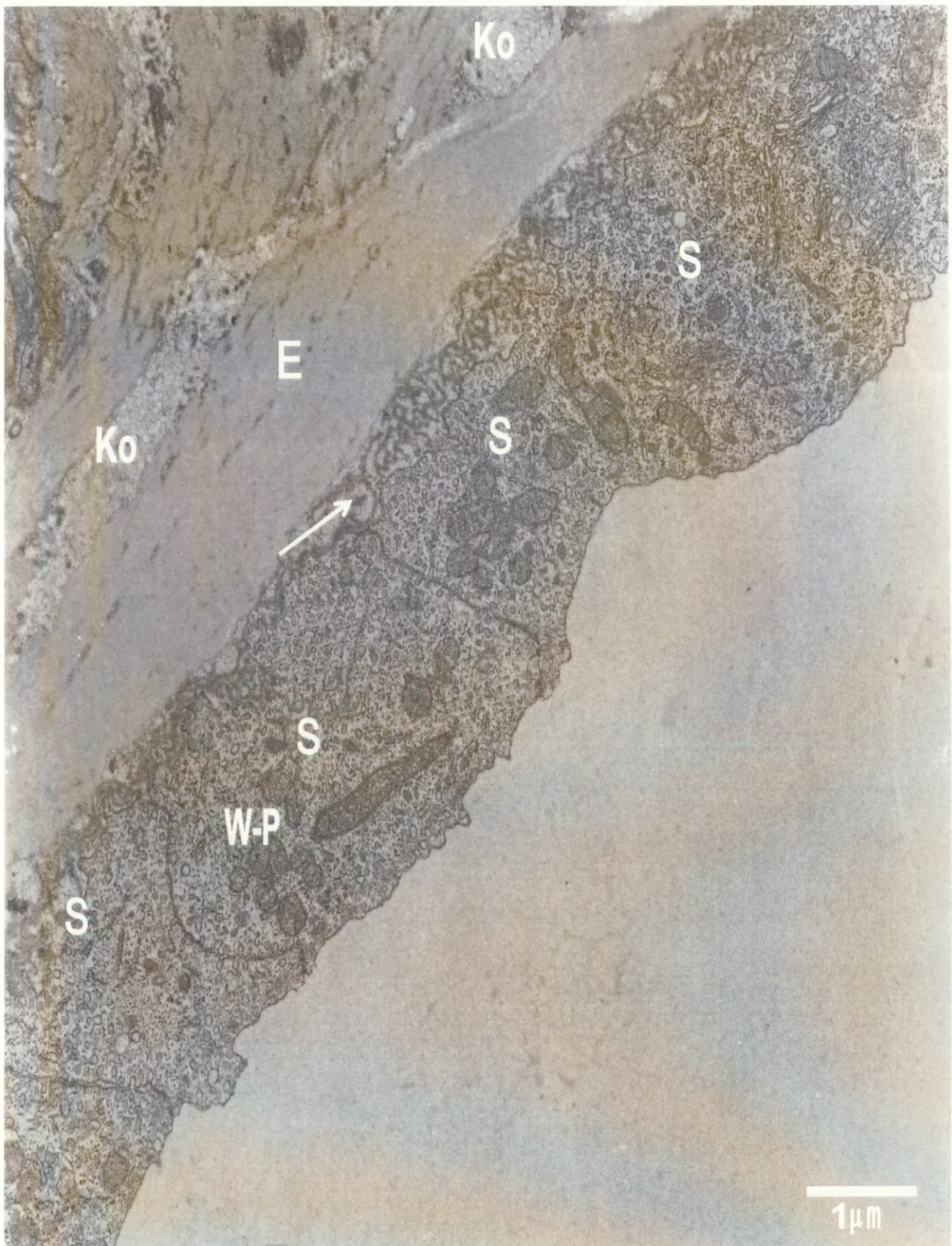
Komórki śródbłonkowe tworzą lita warstwę wyścielającą światło naczynia. Na powierzchni laminarnej widoczne są pojedyncze mikrokosmki świadczące o częściowej zmianie w budowie błony plazmatycznej. Połączenia między komórkami są w pełni zachowane (Ryc. 40). Warstwa elastynowa jest bardzo zróżnicowana. Widoczne są fragmenty z zachowaną ciągłością jak również miejsca z jej ogniskowym rozpadem.



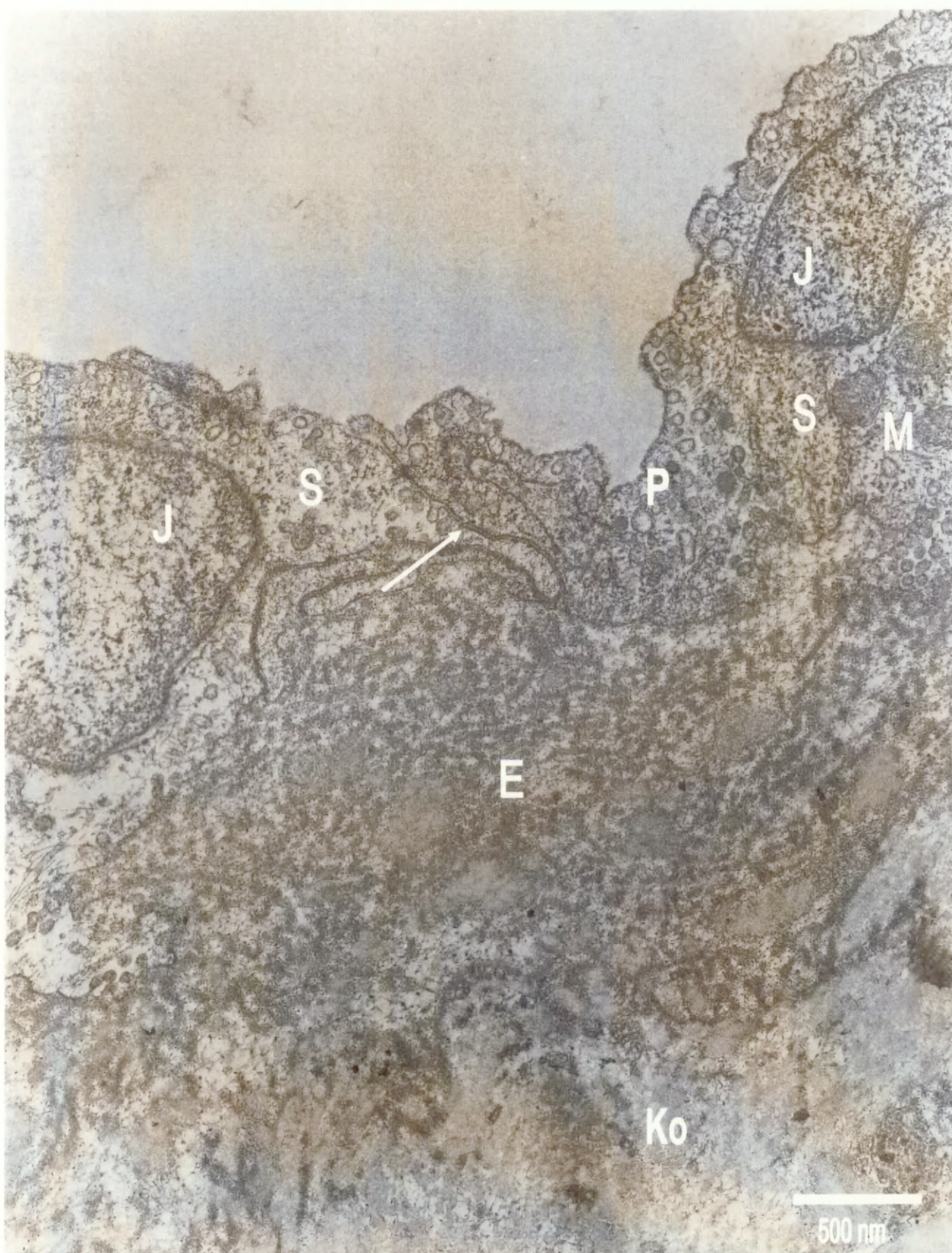
Ryc. 36. Mikrografia przedstawia fragment tętnicy szyjnej 12 mies. szczura. Komórki śródbłonkowe (S) oraz połączeniami międzykomórkowymi (oznaczone strzałkami) zachowane w prawidłowej postaci. Warstwa elastynowa (E) nieco przerośnięta włóknami kolagenowymi (Ko). (Mg), komórki mięśni gładkich. Powiększenie pierwotne 5k.



Ryc. 37. Mikrografia przedstawia przekrój przez tętnicę szyjną 12 mies. szczura. Warstwy mięśni gładkich (Mg) przerastają włóknami kolagenowymi (Ko). Widoczny jest również brak ciągłości warstwy elastynowej (E). Powiększenie pierwotne 6k.

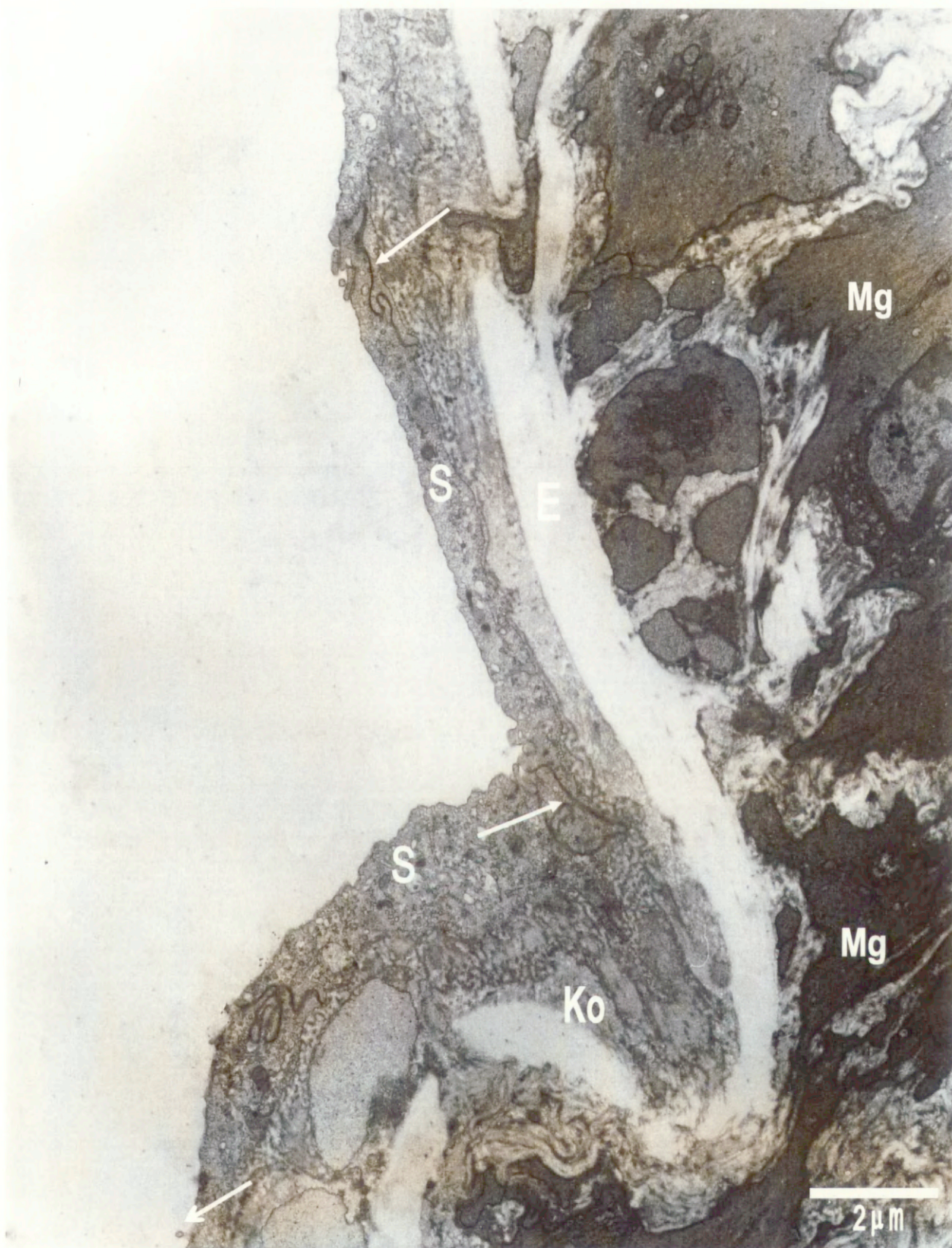


Ryc. 38. Fragment tętnicy szyjnej pochodzącej od 18 mies. szczura. Komórki śródbłonkowe (S) wraz ze złączami komórkowymi zachowują prawidłową strukturę. Warstwa elastynowa (E) ulega rozwarstwieniu i stopniowej degeneracji (zaznaczone strzałką). Włókna kolagenowe wypełniają przestrzenie międzykomórkowe (Ko), (W-P)- ciała Weibla-Palada`e. Powiększenie pierwotne 5k.

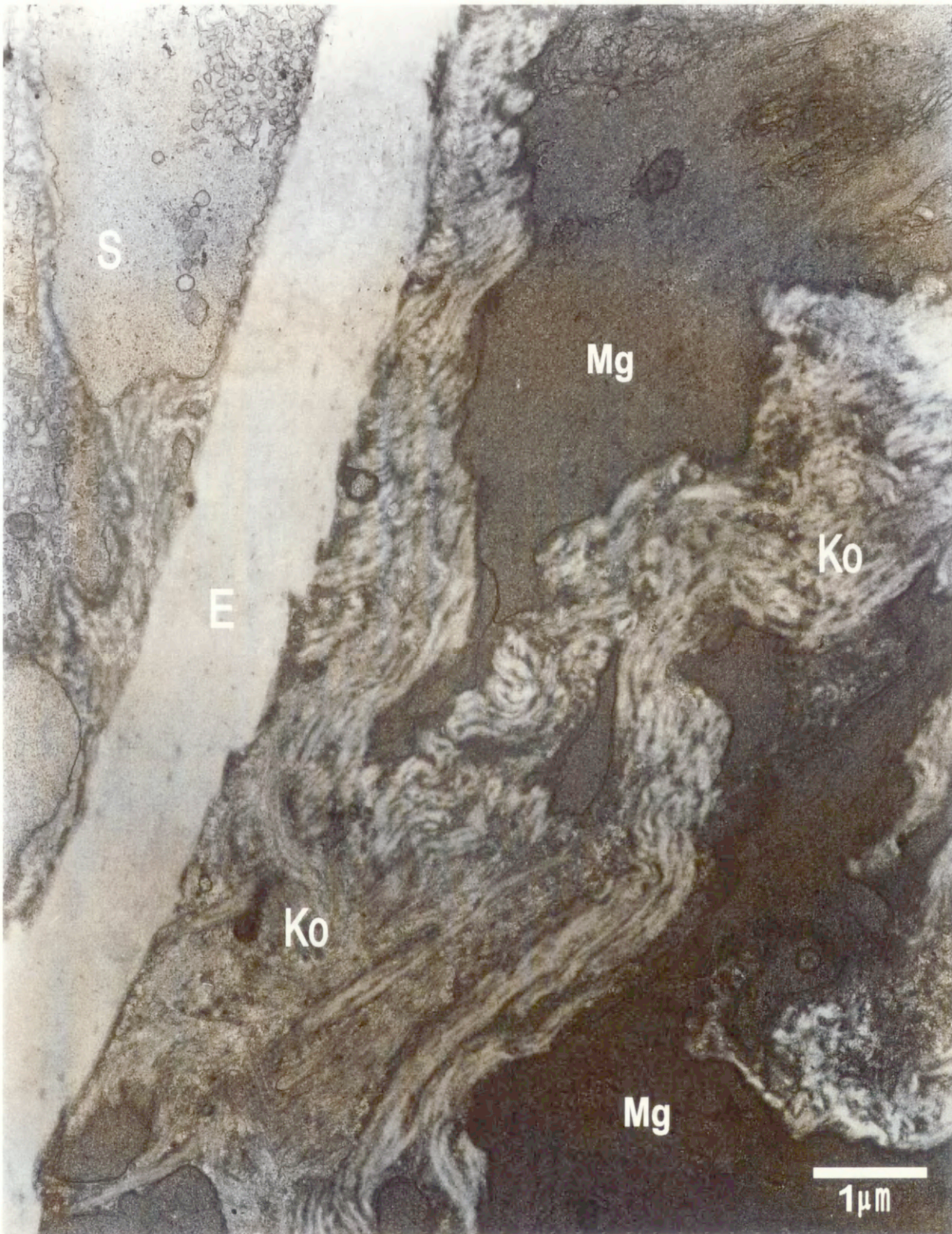


Ryc. 39. Mikrografia przedstawia fragment tętnicy szyjnej pochodzącej od 18 mies. szczura. Komórki śródbłonkowe zachowują prawidłową strukturę (S), prawidłowo wyglądają również połączenia międzykomórkowe (oznaczone strzałką). W śródbłonkach widoczne są liczne pęcherzyki pinocytarne (P), mitochondria (M) oraz duże jądra komórkowe (J). Warstwa elastynowa (E) ulega pofragmentowaniu. Przestrzenie międzykomórkowe wypełniane są przez włókna kolagenowe (Ko). Powiększenie pierwotne 10k.





Ryc. 40. Fragment tętnicy szyjnej pochodzącej od 24 mies. szczura. Komórki śródbłonkowe (S) tworzą litą warstwę od strony światła naczynia. Niewielkie mikrokosmki (oznaczone strzałką otwartą) na powierzchni świadczą o częściowej zmianie w budowie błony plazmatycznej. Połączenia między komórkami są w pełni zachowane (oznaczone strzałką zamkniętą). Warstwa elastynowa (E) ulega miejscowemu rozpadowi. Włókienka kolagenowe (Ko) przerastają przestrzenie międzykomórkowe. Komórki mięśni gładkich (Mg). Powiększenie pierwotne 4k.



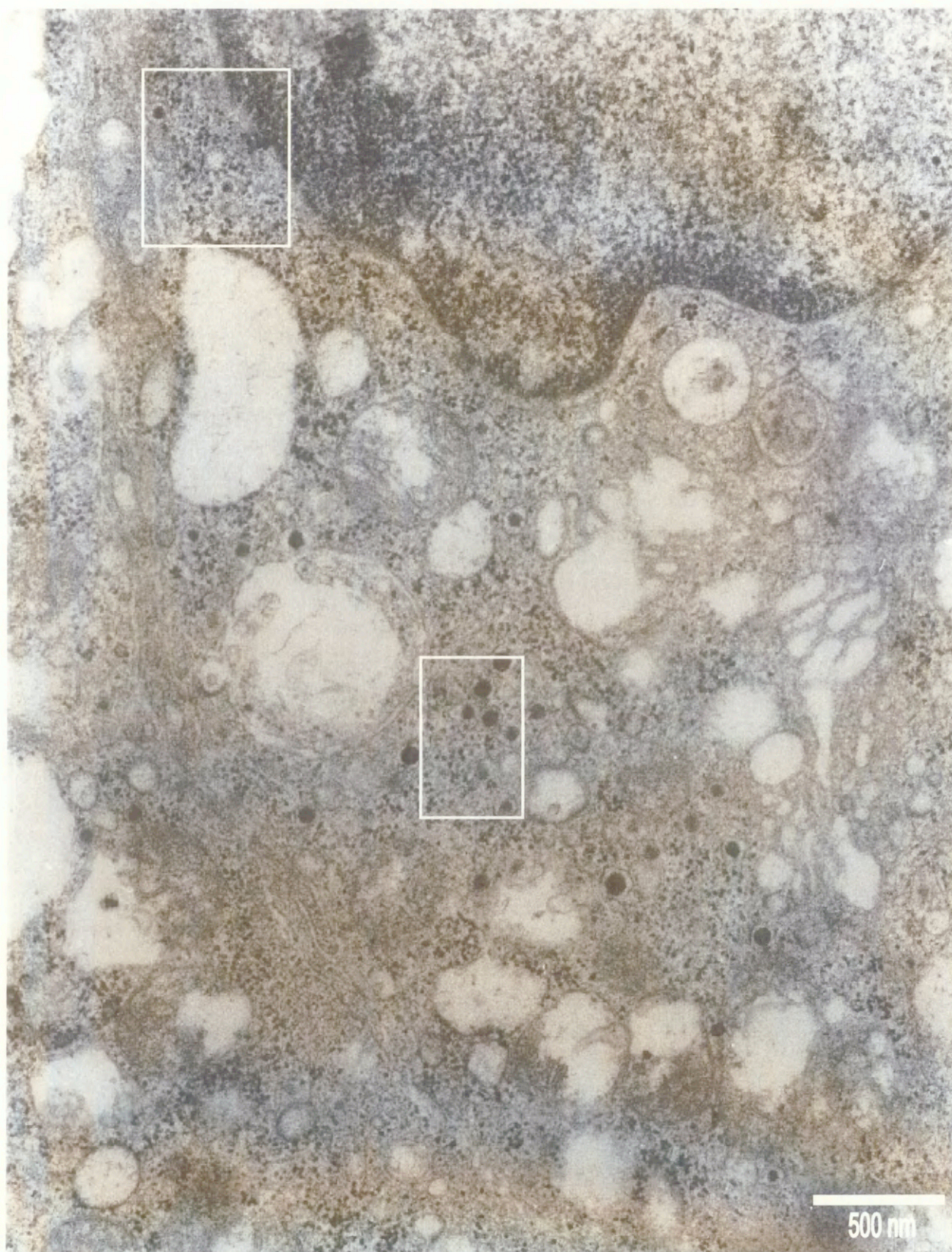
Ryc. 41. Fragment tętnicy szyjnej pochodzącej od 24 mies. szczura. Komórki mięśni gładkich (Mg) charakteryzują się nieregularnym kształtem spowodowanym rozbudową ich wypustek plazmatycznych. Przestrzenie między komórkami przerastają włóknami kolagenowymi (Ko). (E)- warstwa elastynowa, (S)- komórka śródbłonna. Powiększenie pierwotne 7,5k.

Uwagę zwraca fakt występowania licznych pęczków kolagenowych w warstwie elastynowej jak również poszerzenie przestrzeni między komórkami mięśniowymi (Ryc. 41). Komórki mięśni gładkich mają bardzo nieregularny kształt wynikający z rozbudowy ich wypustek plazmatycznych. Zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o stopniowym sztywnieniu naczyń, co jest procesem fizjologicznym z upływem wieku. Ciągłość warstwy śródbłonkowej, która jest istotna dla procesu miażdżycowego, została jednak zachowana.

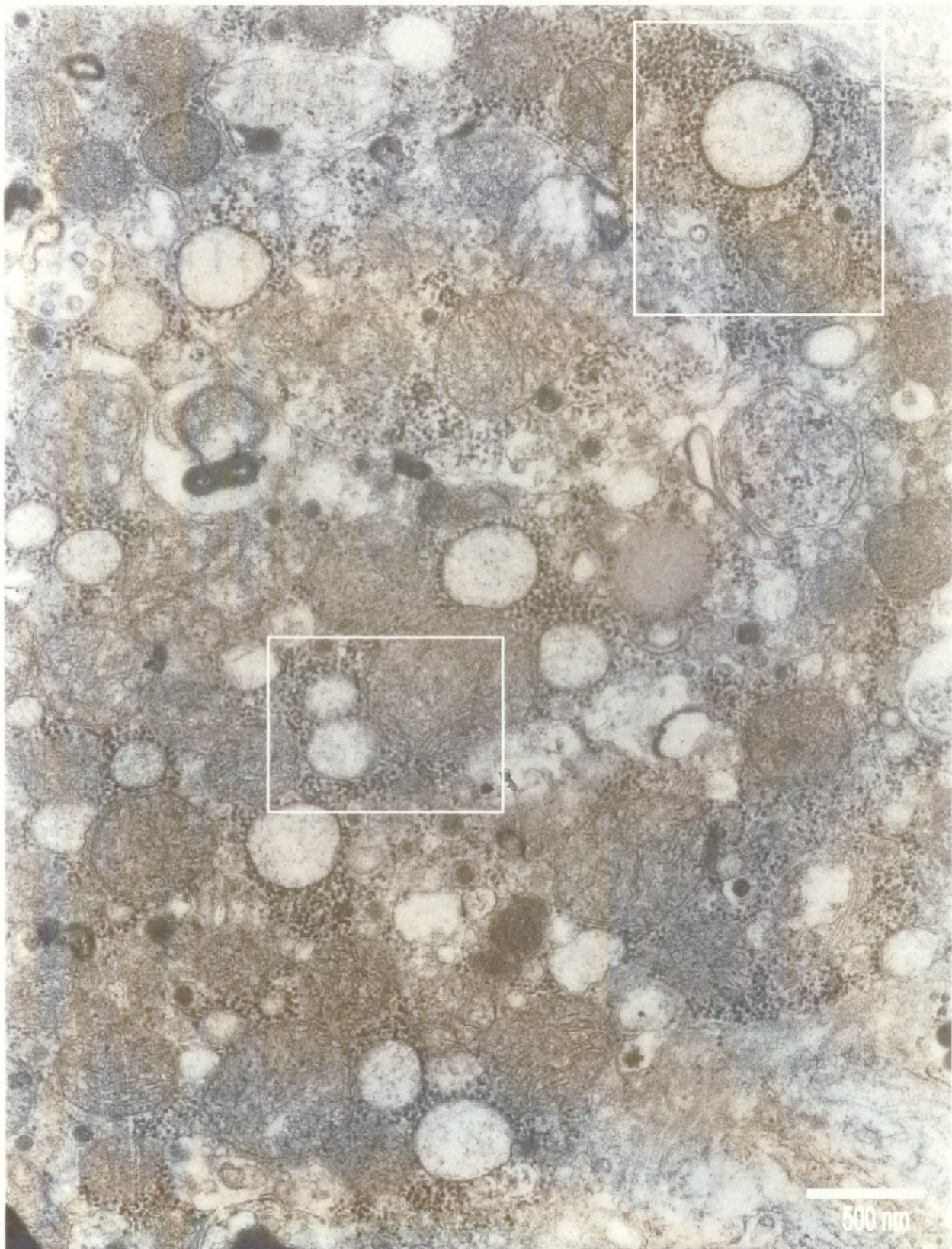
#### **4.4. CYTOCHEMICZNE BADANIA LOKALIZACJI AKTYWNOŚCI NADPH-DIAFORAZY W KOMÓRKACH CHEMORECEPTOROWYCH I KAPILARACH SZYJNYCH U ZWIERZĄT MŁODYCH I STARYCH**

##### **4.4.1. SZCZURY 3-MIESIĘCZNE**

Na poziomie rozdzielczości mikroskopu elektronowego dokonana została półilościowa analiza rozmieszczenia produktu reakcji syntazy tlenu azotu (NOS). Produkt reakcji wykazany został za pomocą elektronowo-gęstych cząsteczek o średnicy 15 nm. Cząsteczki te znajdowały się głównie na terenie cytoplazmy komórek chemoreceptorowych kłębków szyjnych (Ryc. 42). U młodych zwierząt w przeliczeniu na powierzchnię równą  $2,5 \mu\text{m}^2$  przypadały  $42,0 \pm 1,7$  cząsteczki produktu reakcji. Ponadto zlokalizowany został również produkt reakcji w komórkach śródbłonkowych naczyń kapilarnych przylegających do kłębków. W przeliczeniu na powierzchnię równą  $2,5 \mu\text{m}^2$  przypadały  $47,5 \pm 3,5$  cząsteczki produktu reakcji.



Ryc. 42. Mikrografia przedstawia obraz kłębka szyjnego pochodzącego od 3 mies. szczura. W ramkach ukazany został produkt reakcji zlokalizowany w cytoplazmie komórkowej, uzyskany przy zastosowaniu metody NADPH- diaforazy. Nieprawidłowości w wyglądzie ultrastrukturalnym kłębków szyjnych spowodowane są słabszym utwalaniem wymagającym do metod histochemicznych. Powiększenie pierwotne 15k.



Ryc. 43. Mikrografia przedstawia obraz parenchymy kłębka szyjnego pochodzącego od 24 mies. szczura. W ramkach ukazany został produkt reakcji, zlokalizowany w cytoplazmie komórkowej, uzyskany przy zastosowaniu metody NADPH- diaforazy. Nieprawidłowości w wyglądzie ultrastrukturalnym kłębków szyjnych spowodowane są słabszym utrwaleniem wymaganym dla metod histochemicznych. Powiększenie pierwotne 15k.

#### **4.4.2. SZCZURY 24-MIESIĘCZNE**

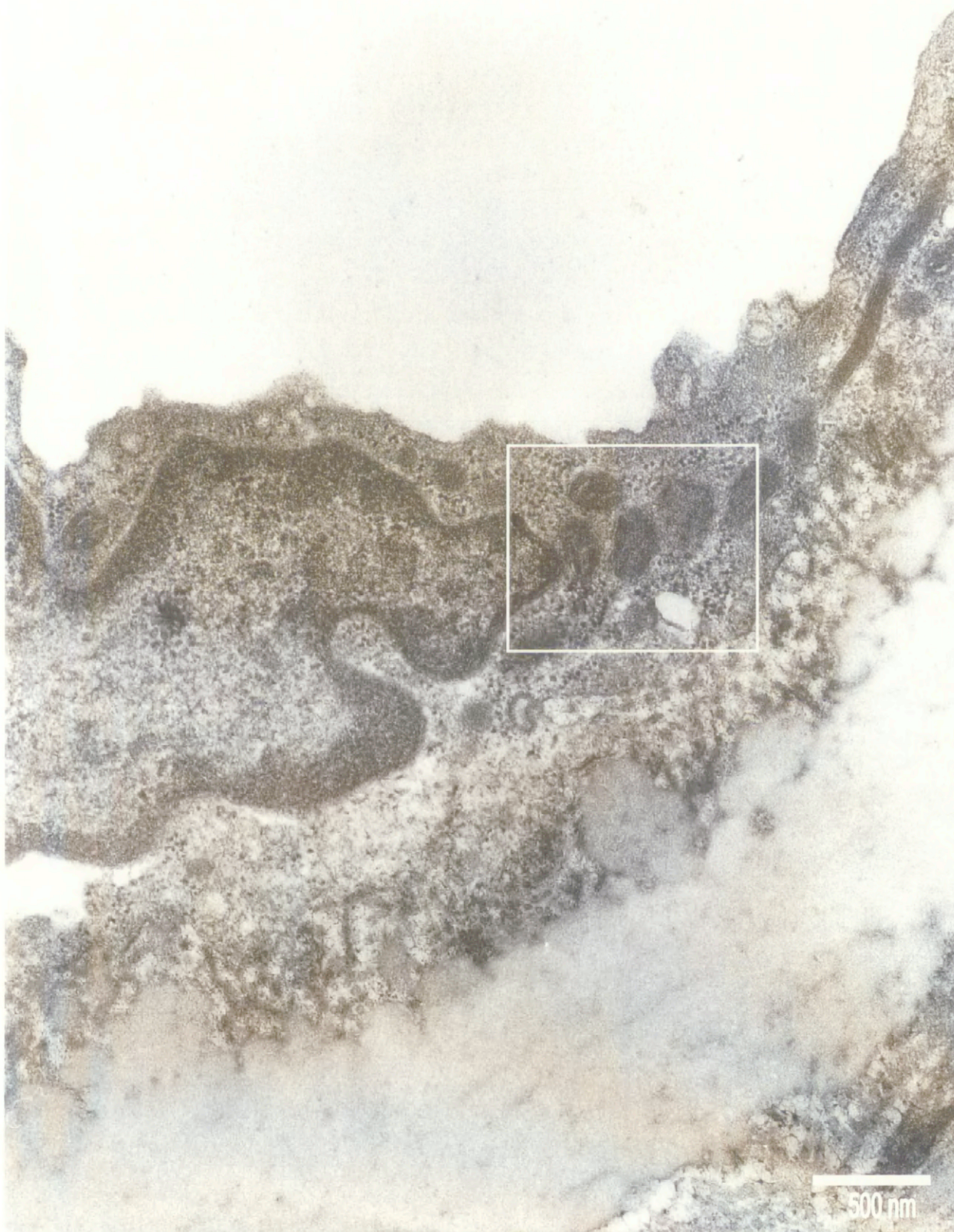
Komórki chemoreceptorowe pochodzące od zwierząt starych posiadały w swojej cytoplazmie znamienne większą w porównaniu do szczurów 3 mies. ilość cząsteczek produktu reakcji. W przeliczeniu na powierzchnię równą  $2,5 \mu\text{m}^2$  przypadają  $94,0 \pm 9,9$  cząsteczki produktu reakcji (Ryc. 43), w porównaniu z  $42,0 \pm 1,7$  u młodych szczurów, co było różnicą znamienne statystycznie. Jednocześnie zaobserwowano wzrost ilości elektronowo gęstych cząsteczek NADPH-diaforazy w komórkach śródbłonkowych naczyń kapilarnych w kłębkach szyjnych starych szczurów ( $77,6 \pm 9,5$ ) w porównaniu z młodymi szczurami  $47,5 \pm 3,5$  co także było różnicą znamienne statystycznie.

#### **4.5. CYTOCHEMICZNE BADANIA LOKALIZACJI**

##### **AKTYWNOŚCI NADPH-DIAFORAZY W ŚCIANACH TĘTNIC SZYJNYCH U ZWIERZĄT MŁODYCH I STARYCH**

Wykonana reakcja NADPH-diaforazy wykazała lokalizację aktywności enzymatycznej NOS w elementach morfotycznych ściany tętnic zwierząt młodych (Ryc. 44). Produkt reakcji znajdował się przede wszystkim w cytoplazmie komórek śródbłonkowych jak również w cytoplazmie komórek mięśni gładkich. Analiza półilościowa wykazała, iż na powierzchnię  $2,5 \mu\text{m}^2$  komórki śródbłonkowej przypadało  $52,0 \pm 2,6$  cząsteczki produktu reakcji i  $69,1 \pm 5,4$  na komórki mięśni gładkich.

Podobnie jak u młodych zwierząt, w komórkach śródbłonkowych i komórkach mięśni gładkich starych zwierząt zlokalizowano cząsteczki produktu reakcji (Ryc. 45). W przeliczeniu na tę samą powierzchnię komórek śródbłonkowych zaobserwowano zwiększoną ilość produktu  $89,0 \pm 9,3$  co było znamienym wzrostem w porównaniu z młodymi szczurami ( $P < 0,05$ ) oraz  $78,2 \pm 5,4$  w komórkach mięśni gładkich, co nie było znamienne.



Ryc. 44. Mikrografia przedstawia przekrój przez tętnicę szyjną pochodzącą od 3 mies. szczura. W ramkach zaznaczono produkt reakcji zlokalizowany głównie w komórkach śródbłonkowych oraz w mięśniach gładkich, uzyskany przy zastosowaniu metody NADPH- diaforazy. Powiększenie pierwotne 15k.



Ryc. 45. Mikrografia przedstawia przekrój przez tętnicę szyjną pochodzącą od 24 mies. szczura. W ramkach zaznaczono produkt reakcji zlokalizowany głównie w komórkach śródbłonkowych oraz w mięśniach gładkich, uzyskany przy zastosowaniu metody NADPH- diaforazy. Powiększenie pierwotne 15k.



## 4.6. BIOCHEMICZNE OZNACZENIE POZIOMU CHOLESTEROLU CAŁKOWITEGO ORAZ FRAKCJI HDL WE KRWI TĘTNICZEJ SZCZURÓW MŁODYCH I STARYCH

W Tabeli 1 podane zostały wartości poziomu cholesterolu we krwi tętniczej pochodzącej od zwierząt młodych i starych. U starych szczurów nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości cholesterolu całkowitego oraz HDL w stosunku do szczurów młodych.

**Tabela 1.** Poziom cholesterolu całkowitego (CH) oraz HDL (mg/dL) we krwi tętniczej młodych (M) i starych (S) szczurów.

LP	WIEK	CH	HDL	WIEK	CH	HDL
1	M	63,7	34,2	S	95,0	58,7
2	M	63,9	37,8	S	51,5	36,1
3	M	58,8	47,3	S	46,7	35,2
4	M	46,4	34,5	S	58,2	38,9
5	M	51,7	35,7	S	58,0	44,6
6	M	51,8	27,5	S	63,6	39,9
SREDNIA		56,0	36,1		62,2	42,2
SE		3,2	2,9		7,7	3,9

Nie zaobserwowano znamienych różnic dla obu frakcji cholesterolu między badanymi grupami wiekowymi ( $P > 0,05$ )

## 4.7. ZMIANY ODPOWIEDZI ODDECHOWEJ NA HIPOKSJĘ Z POSTĘPUJĄCYM WIEKIEM

### 4.7.1. INFORMACJE OGÓLNE

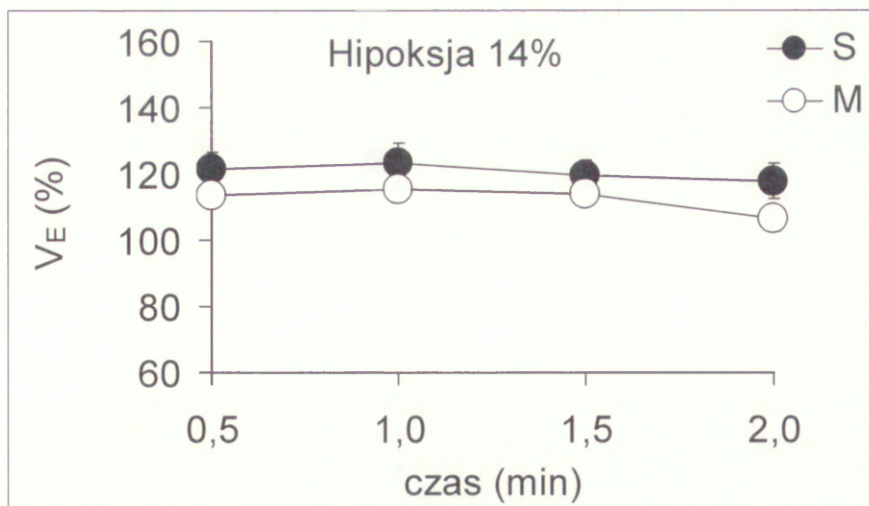
Część neurofizjologiczna badań została wykonana w grupie 18 szczurów w wieku 3 mies. i 24 mies. Grupa szczurów młodych liczyła 11 osobników o średniej wadze  $302 \pm 6,8$  g (295-315 g) natomiast grupa starych szczurów liczyła 7 osobników o wadze  $604 \pm 18,5$  g (540-651 g). Oddechowe i gazowe parametry spoczynkowe we krwi tętniczej

nie odbiegały od wartości normalnych u uśpionych spontanicznie oddychających zwierząt. U zwierząt starych  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ,  $SaO_2$ , pH oraz  $P_{ET}CO_2$  wynosiły odpowiednio:  $91,1 \pm 5,4$  mmHg,  $41,3 \pm 4,6$  mmHg,  $96,2 \pm 0,6\%$ ,  $7,35 \pm 0,02$ ,  $31,9 \pm 0,3$  mmHg. Dla młodych zwierząt parametry te wynosiły odpowiednio:  $92,5 \pm 2,1$  mmHg,  $38,9 \pm 1,2$  mmHg,  $97,0 \pm 0,2\%$ ,  $7,36 \pm 0,01$ ,  $32,7 \pm 0,1$  mmHg. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy między grupą starych i młodych szczurów.

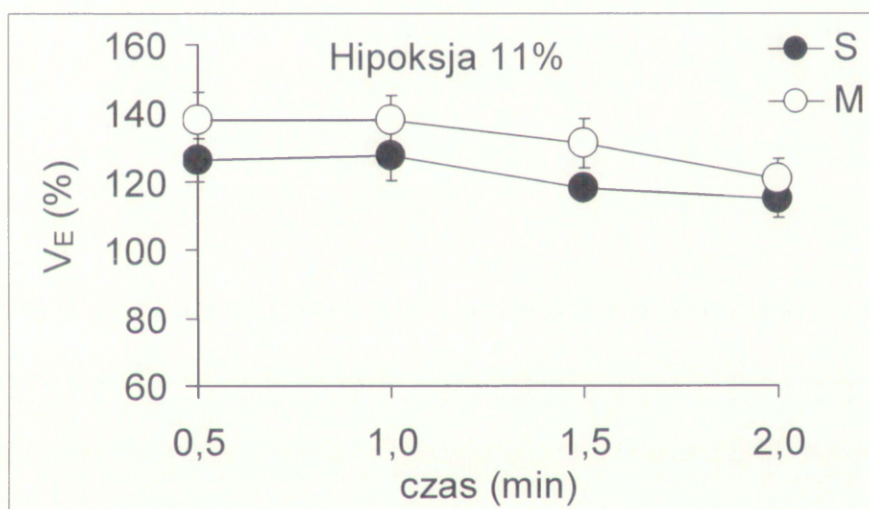
Obydwie grupy wiekowe poddane zostały testom na poikilokapniczną hipoksję typu „steady state”. Testy zostały przeprowadzone na dwóch poziomach bodźca hipoksyjnego: 14%  $O_2$  w  $N_2$  (hipoksja umiarkowana) oraz 11%  $O_2$  w  $N_2$  (hipoksja silna), w sekwencji umiarkowana – silna z 20 min. przerwą między nimi. Wyniki przedstawione w następnych podrozdziałach opisują przebieg i czułość odpowiedzi oddechowej na hipoksję w badanych grupach wiekowych szczurów.

#### **4.7.2. PRZEBIEG ODPOWIEDZI ODDECHOWEJ NA HIPOKSJĘ**

Odpowiedź wentylacyjna płuc na hipoksję różniła się w zależności od siły bodźca hipoksyjnego. Hipoksja umiarkowana (14%) powodowała wzrost wentylacji płuc 15-20% powyżej poziomu kontrolnego (Ryc. 46). Maksimum odpowiedzi występowało po 1 min od zadania bodźca, po czym obserwowano stopniowy spadek wentylacji, będący wyrazem depresyjnego działania hipoksji u uśpionych zwierząt. Stare szczury odpowiadały na hipoksję z tendencją do większego wzrostu wentylacji.



Ryc. 46. Porównanie przebiegów odpowiedzi oddechowej na 14% hipoksję u młodych i starych szczurów. Symbolem zamkniętym oznaczono zwierzęta stare (S), a otwartym zwierzęta młode (M).



Ryc. 47. Porównanie przebiegów odpowiedzi oddechowej na 11% hipoksję u młodych i starych szczurów.

Hipoksja silna (11%) powodowała większy wzrost wentylacji w obu grupach wiekowych, którego stymulująco-depresyjny profil czasowy był podobny (Ryc. 47). W przeciwieństwie do hipoksji umiarkowanej, szczury młode wykazywały tutaj, średnio, tendencję do silniejszych odpowiedzi.

Wzorzec oddechowy tworzony jest przez składową objętościową i częstotliwościową oddychania. Składowa częstotliwościowa była głównym motorem zwiększonego oddychania w hipoksji w obu grupach wiekowych. Zanotowano jednak

międzygrupowe różnice w hipoksyjnym wzorcu oddychania. O ile stare szczury odpowiadały wzrostem zarówno częstotliwości jak i objętości, to młode, w szczególności w hipoksji silnej, bardziej reagowały częstotliwością (Tabela 2A i B).

**Tabela 2.** Udział komponenty częstotliwościowej (f) oraz objętościowej (A) w procesie formowania odpowiedzi oddechowej na hipoksję w grupie młodych i starych szczurów.

<b>A Hipoksja – 14%</b>						
Test (Minuty)	Młode szczury			Stare szczury		
	f	A	f/A	f	A	f/A
0,5	114,7 ± 3,9	99,3 ± 2,3	1,16	115,7 ± 3,2	105,2 ± 4,4	1,10
1,0	117,7 ± 4,8	98,9 ± 2,7	1,19	116,2 ± 2,2	106,2 ± 4,6	1,09
1,5	116,8 ± 4,8	99,2 ± 4,1	1,18	113,6 ± 1,4	105,3 ± 4,0	1,08
2,0	110,2 ± 4,7	97,4 ± 3,4	1,13	110,9 ± 1,9	106,2 ± 4,4	1,04

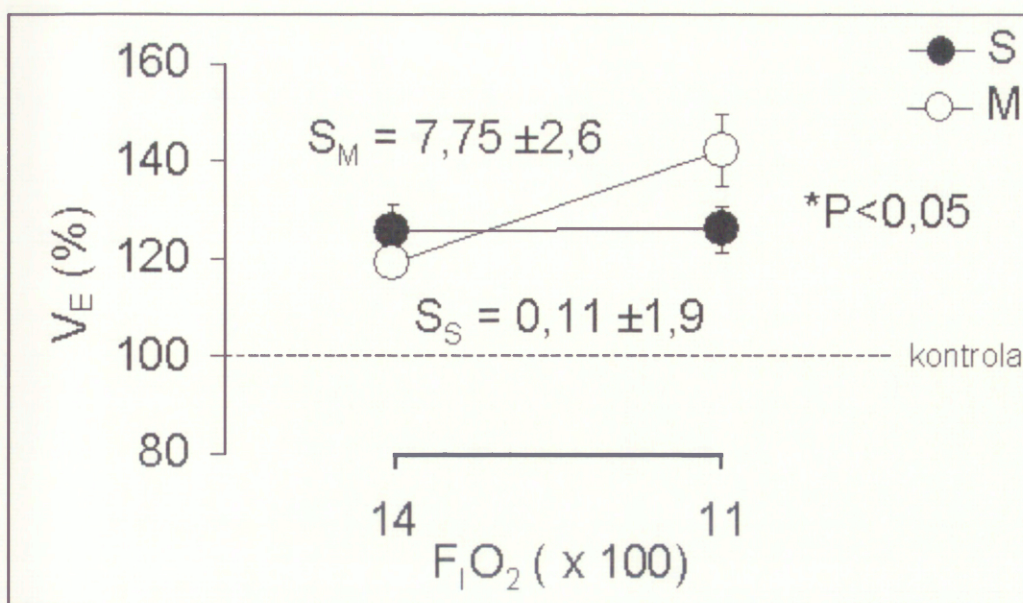
  

<b>B Hipoksja – 11%</b>						
Test (Minuty)	Młode szczury			Stare szczury		
	f	A	f/A	f	A	f/A
0,5	139,5 ± 6,3*	98,6 ± 1,9	1,41	122,6 ± 7,3	104,1 ± 6,0	1,18
1,0	139,8 ± 5,1*	98,5 ± 2,2	1,42	121,9 ± 5,8	105,4 ± 6,2	1,16
1,5	136,9 ± 5,1*	96,1 ± 2,7	1,42	120,1 ± 4,4	99,1 ± 4,1	1,21
2,0	129,3 ± 5,2	94,1 ± 3,6	1,37	117,0 ± 6,1	99,0 ± 4,6	1,18

Przedstawione dane są wartościami średnimi (± SE) wyliczonymi jako procent wartości kontrolnej przyjętej za 100%. f/A jest współczynnikiem opisującym średnią kontrybucję obu komponent wzorca oddechowego tworzącego wentylację minutową. \*P<0,05 między korespondującymi ze sobą minutami testu w obu grupach wiekowych szczurów

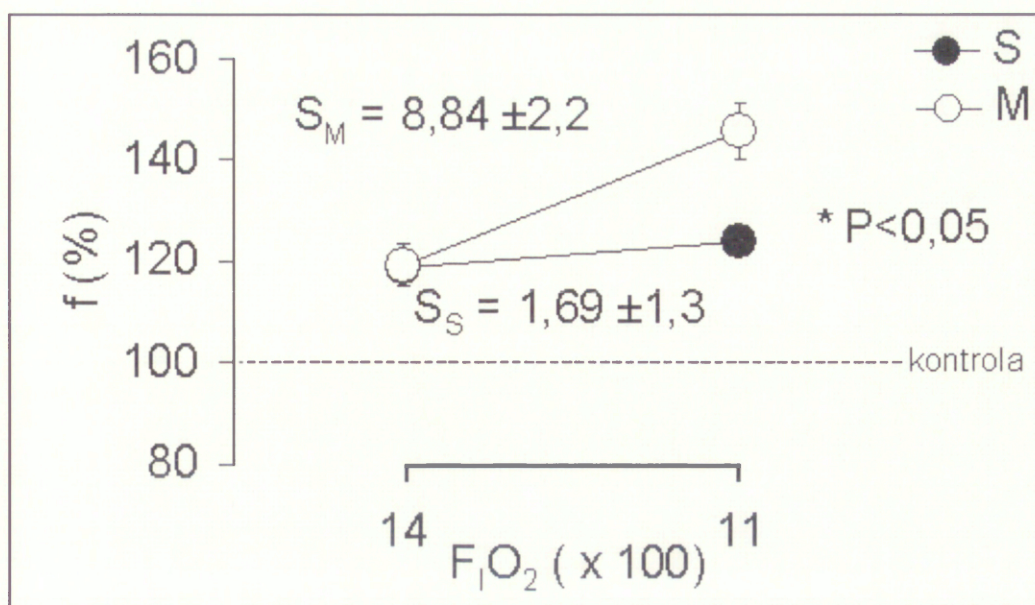
### 4.7.3. CZUŁOŚĆ ODPOWIEDZI ODDECHOWEJ NA HIPOKSJĘ U STARYCH I MŁODYCH SZCZURÓW

Ryc. 48 i Ryc. 49 przedstawiają średni szczytowy wzrost minutowej wentylacji płucnej i komponenty częstotliwościowej na dwóch poziomach bodźca hipoksyjnego w obu grupach wiekowych, wyrażony w procentach wartości kontrolnej. Czulość odpowiedzi oddechowej na hipoksję wyrażona jest przez nachylenie linii prostej opisującej wzrost wentylacji wraz ze wzrostem siły bodźca.



Ryc. 48. Czułość odpowiedzi oddechowej na hipoksję wyrażona przez nachylenie linii prostej „slope” (S) opisującej wentylację minutową w odpowiedzi na 14% i 11% hipoksję. Symbole oznaczają średni  $\pm$ SE maksymalny wzrost wentylacji ( $V_{E_{max}}$ ) w % kontroli. Symbolem zamkniętym oznaczono zwierzęta stare (S), a otwartym zwierzęta młode (M). Różnica w czułości odpowiedzi oddechowej na hipoksję u zwierząt młodych osiągnęła znamienność statystyczną w porównaniu ze zwierzętami starymi (\* $P < 0,05$ ).

Zarówno u starych jak i u młodych zwierząt obserwowano wzrost  $V_{E_{max}}$  w obydwu zakresach hipoksji. Był on jednak nierównomierny. U młodych zwierząt  $V_{E_{max}}$  osiągnęła  $118,9 \pm 2,5\%$  i  $142,2 \pm 7,5\%$  w stosunku do kontroli w odpowiedzi na 14% i 11%. Różnica w wielkości odpowiedzi na te dwa bodźce hipoksyjne u młodych zwierząt była znamienna ( $P < 0,05$ ). U zwierząt starych wzrost  $V_{E_{max}}$  wynosił odpowiednio:  $125,5 \pm 5,8\%$  i  $125,8 \pm 4,7\%$ . Choć wzrost wentylacji u młodych zwierząt w odpowiedzi na umiarkowaną hipoksję był o 6-7% niższy, to był on o ok. 17% wyższy w ciężkiej hipoksji od wzrostu u starych zwierząt. Zwiększona czułość odpowiedzi oddechowej na hipoksję u młodych zwierząt, wyrażona przez nachylenie linii prostej „slope” (S) opisującej wentylację minutową w odpowiedzi na hipoksję, była istotnie różna od czułości u zwierząt starych ( $P < 0,05$ ).



Ryc. 49. Czułość odpowiedzi komponenty częstotliwościowej wzorca oddechowego na hipoksję wyrażona przez nachylenie linii prostej „slope” (S) opisującej wzrost częstości oddychania (f) na dwóch poziomach hipoksji. Symbole jak na Ryc. 48. Wartości „slope” dla starych i młodych zwierząt różniły się znacząco (\*  $P < 0,05$ ).

Odpowiedź wentylacji minutowej na hipoksję napędzana była częstością oddychania przy nikłych zmianach komponenty objętościowej. Wzrost komponenty częstotliwościowej obserwowano w obydwu grupach wiekowych szczurów. Wzrost ten był jednak, podobnie jak w przypadku wentylacji minutowej, znamieny jedynie u młodych zwierząt, gdzie wynosił  $119,4 \pm 4,4\%$  i  $145,8 \pm 5,6\%$ , odpowiednio dla 14% i 11% hipoksji ( $P < 0,05$ ). U starych szczurów wartości te były  $119,0 \pm 2,2\%$  i  $124,1 \pm 2,8\%$  ( $P > 0,05$ ). Zwierzęta stare miały, podobnie jak w przypadku wentylacji minutowej, spłaszczoną czułość odpowiedzi częstotliwościowej na hipoksję ( $P < 0,05$ ).

#### 4.7.4. DWUFAZOWOŚĆ ODPOWIEDZI ODDECHOWEJ NA BODZIEC HIPOKSJYNY U STARYCH I MŁODYCH SZCZURÓW

Odpowiedź oddechową na hipoksję można podzielić na dwie fazy. Wczesną fazę stymulacji, za którą odpowiedzialne są chemoreceptory obwodowe oraz fazę depresji oddychania, która zachodzi przede wszystkim przy udziale ośrodkowego układu

oddechowego. Niezależnie od siły zadanego bodźca oraz wieku zwierząt zachowany był dwufazowy charakter odpowiedzi oddechowej na hipoksję typu „steady–state”.

W pierwszej fazie odpowiedzi następował szybki wzrost wentylacji minutowej zachodzący głównie za pośrednictwem komponenty częstotliwościowej. W obydwu grupach szczurów wentylacja minutowa osiągała swoje maksimum po ok. 1,0 min testu.

Wartości szczytowe uzyskane w odpowiedzi na 14% i 11% hipoksję zostały podane w Tabeli 2A i B w części 4.7.2. Po pierwszej minucie,  $V_E$  zaczęła stopniowo maleć aż do zakończenia testu, przy czym wentylacja utrzymywała się na poziomie wyższym od poziomu wyjściowego. Siła, z jaką została wyrażona depresja wentylacji minutowej uzależniona była zarówno od wieku zwierząt jak i od mocy zadanego bodźca.

W odpowiedzi na umiarkowaną hipoksję, depresja oddychania była dwukrotnie silniejsza u zwierząt młodych i wynosiła 8% w porównaniu z wartością szczytową.

W odpowiedzi na silną hipoksję, procent, o jaki zmniejszyła się wentylacja minutowa był zbliżony w obydwu grupach wiekowych i wynosił ok. 12% z tendencją do silniejszego zaakcentowania w grupie młodych szczurów.

W podsumowaniu można stwierdzić, że odpowiedzi na silną hipoksję u starych zwierząt charakteryzowały się „spłaszczonym” przebiegiem w porównaniu z młodymi szczurami. Spłaszczenie to obejmowało też drugą, depresyjną fazę odpowiedzi, co powodowało, że depresja oddechowa miała łagodniejszy przebieg.

#### **4.7.5. WPŁYW BODŹCA HIPOKSYJNEGO NA SKŁAD GAZOWY I CIŚNIENIE KRWI TĘNICZEJ U STARYCH I MŁODYCH SZCZURÓW**

Opisanym zmianom wzorca oddechowego podczas hipoksji towarzyszyły zmiany w składzie gazowym i równowadze kwasowo-zasadowej krwi tętniczej oraz w wartości

ciśnienia tętniczego (BP). Pomiarów tych parametrów wykonywano w punkcie kontrolnym przed podaniem mieszanki hipoksyjnej do oddychania oraz w 1,5 min testu hipoksyjnego. Zwierzęta oddychały spontanicznie i wydechowy CO<sub>2</sub> nie był sztucznie utrzymywany na stałym poziomie, co powodowało indywidualny rozrzut danych. U starych zwierząt, P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub> ulegało zmniejszeniu z 38,0 ±0,4 mmHg w kontroli do 32,7 ±0,3 mmHg w 14% hipoksji oraz z 32,7 ±0,4 mmHg do 28,1 ±0,8 mmHg w 11% hipoksji. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między średnimi wartościami punktów kontrolnych ani punktów hipoksyjnych.

U młodych zwierząt, P<sub>ET</sub>CO<sub>2</sub> z wyjściowego 41,0 ±0,2 mmHg uległo zmniejszeniu do 36,5 ±0,2 mmHg w 14% hipoksji i z 38,0 ±0,2 mmHg do 31,2 ±0,2 mmHg w 11% hipoksji. Punkty kontrolne obu poziomów hipoksji, podobnie jak u starych szczurów, nie różniły się znamienne, natomiast między punktami 1,5 min obu hipoksji wykazano istotne różnice (P<0,05). Stwierdzono też różnice między punktami kontrolnymi a 1,5 min hipoksji (P<0,05). Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic między korespondującymi punktami kontrolnymi i 1,5 min testów hipoksyjnych między grupami wiekowymi szczurów. Analizę przeprowadzono przy użyciu niesparowanego testu Studenta.

U starych zwierząt, ciśnienie krwi (BP) z wyjściowego 72,3 ±0,4 mmHg zmalało do 51,7 ±0,8 mmHg w 14% hipoksji i z 70,0 ±1,1 mmHg do 50,4 ±0,3 mmHg w hipoksji 11% i spadki te były znamienne statystycznie (P<0,05). U młodych zwierząt, BP z wyjściowego 96,1 ±1,0 mmHg maleje do 76,7 ±0,7 mmHg w 14% hipoksji oraz z 88,9 ±1,0 mmHg do 60,0 ±0,7 mmHg w 11% hipoksji (P<0,05). Wyjściowe ciśnienie krwi u starych i młodych szczurów różniło się istotnie (P<0,05), lecz spadki ciśnienia związane z hipoksją były podobne. Pod koniec testu, BP spadało w obydwu grupach



wiekowych, lecz nigdy poniżej punktu krytycznego, który ma wpływ na odpowiedzi oddechowe na hipoksję, przyjętego w literaturze za 50 mmHg (Lahiri i wsp., 1980).

Parametry gazowe oraz pH dla obu grup wiekowych przedstawione są w Tabeli 3A i B. Wyjściowy skład gazowy krwi młodych i starych szczurów nie różnił się istotnie. Niewielki różnice w poziomach PaO<sub>2</sub> ujawniły się dopiero pod koniec testu na 11% hipoksję.

**Tabela 3.** Średnie wartości PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub>, pH w grupie młodych (A) i starych (B) szczurów.

<b>A</b> Parametry	Kontrola_1	1,5 min. 14% hipoksji	Kontrola_2	1,5 min. 11% hipoksji
PaCO <sub>2</sub>	48,4 ±1,55	41,3 ±1,8*	45,2 ±2,2	35,6 ±1,8*
PaO <sub>2</sub>	87,3 ±2,4	59,4 ±1,61*	91,1 ±1,7+	53,5 ± 1,0*##+
SaO <sub>2</sub>	96,5 ±0,7	90,3 ±0,9*	96,9 ±0,3	87,6 ±0,8*
pH	7,35 ±0,01	7,41 ±0,01*	7,36 ±0,02##+	7,42 ±0,02*+

<b>B</b> Parametry	Kontrola_1	1,5 min. 14% hipoksji	Kontrola_2	1,5 min. 11% hipoksji
PaCO <sub>2</sub>	42,2 ±4,7	36,8 ±6,3	37,5 ±6,3	31,1 ±5,5
PaO <sub>2</sub>	82,3 ±5,9	61,9 ±4,5*	84,6 ±3,0	47,6 ±2,0*+
SaO <sub>2</sub>	94,8 ±0,9	90,3 ±1,5*	94,4 ±0,8	82,5 ±2,4*+
pH	7,34 ±0,02	7,37 ±0,02	7,32 ±0,03	7,37 ±0,03

(\* ) w porównaniu z wartością kontrolną, (+) w zależności od siły bodźca w tej samej grupie wiekowej zwierząt, (#) w zależności od wieku zwierząt

## 5. DYSKUSJA

Przeprowadzone przeze mnie badania miały na celu ocenę wpływu wieku na ultrastrukturę i czynność kłębków szyjnych, a także próbę wniknięcia we wzajemne zależności między ultrastrukturą a czynnością wraz z postępującym wiekiem. Badania zostały przeprowadzone na szczurach w grupach, w których wiek zwierząt zwiększał się o pół roku, poczynając od 3 miesięcy. Część ultrastrukturalna badań wykazała, iż kłębki szyjne ulegają wyraźnym zmianom degeneracyjnym z postępującym wiekiem.

Wpływ zmian ultrastrukturalnych rozwijających się z wiekiem na czynność kłębków szyjnych oceniano na podstawie odpowiedzi oddechowych na hipoksję, które generowane są przez ten organ. Czynność kłębków oceniano w dwóch skrajnych grupach wiekowych 3 i 24 miesiące; grupa starsza u szczurów odpowiada bardzo podeszłemu wiekowi ludzi. Zastosowanie dwóch poziomów nasilenia bodźca hipoksyjnego umożliwiło ocenę hipoksyjnej czułości kłębków. Stwierdzono istotne różnice czułości hipoksyjnej kłębków w zależności od wieku. Czułość ta była znamienne wyższa u młodych szczurów. Bez względu na wiek, zmiany oddychania napędzane były składową częstotliwościową wzorca oddechowego. Zmniejszenie oddechowej reaktywności hipoksyjnej u starych zwierząt może wynikać ze zmian degeneracyjnych rozwijających się z wiekiem w parenchymie kłębków szyjnych. Fizjologiczna zgodność zmian czynnościowych i ultrastrukturalnych nie wyjaśnia jednak podłoża degeneracji kłębków szyjnych rozwijającej się w starszym wieku. Powstaje pytanie, czy zmiany ultrastrukturalne są wyrazem procesu starzenia się kłębków szyjnych *per se*, czy też może zależą od przyczyn wtórnych, jak np. upośledzonego dopływu krwi do organu w wyniku zmian miażdżycowo-podobnych, które zwykle związane są z wiekiem.

W dalszej części badań stwierdziłam, że zmiany ultrastrukturalne w kłębkach szyjnych kontrastują z brakiem cech typowych dla aktywnej miażdżycowej przebudowy ścian naczyń krwionośnych doprowadzających do nich krew, takich jak: uszkodzenia w obrębie warstwy śródbłonkowej wyścielającej naczynia, agregacji płytek krwi czy innych elementów morfotycznych. Zmianom morfologicznym nie towarzyszył również wysoki poziom cholesterolu całkowitego i frakcji HDL w surowicy krwi. Wyniki moich badań wskazują, że u starych szczurów nie występują zmiany naczyniowe, które upoważniałyby do stwierdzenia, że może być istotnie ograniczony dopływ krwi i tym samym substancji odżywczych do tkanki kłębków. Zmiany morfologiczne w kłębkach, prowadzące do upośledzenia ich czynności są najpewniej skutkiem naturalnego procesu zużycia czy starzenia się tkanki w zaawansowanym wieku.

### **Ultrastrukturalne zmiany w parenchymie kłębków szyjnych i rozwidleniu tętnic szyjnych wspólnych u szczura z postępującym wiekiem**

Pierwsze istotne różnice w strukturze gronek kłębkowych ujawniły się dopiero u szczurów w wieku 12 miesięcy. Zaobserwowano niewielkie pogrubienie tkanki łącznej otaczającej strukturę kłębkową oraz różnice w dystrybucji heterochromatyny w jądrach komórek chemoreceptorowych. Zwiększyła się liczba pęcherzyków sekrecyjnych z jasnym rdzeniem „clear-cored vesicles” przy braku istotnych różnic w liczbie pęcherzyków z ciemnym rdzeniem „dense-cored vesicles”. Zmiana w proporcji pęcherzyków z ciemnym i jasnym rdzeniem może świadczyć o zmianach w składzie neuroprzekaźników znajdujących się w tych pęcherzykach (Di Giulio i wsp., 1998a). Ponadto, zaobserwowano początek morfologicznego zróżnicowania komórek chemoreceptorowych. Pojawiły się charakterystyczne ciemne komórki. W ich cytoplazmie zaobserwowałam zwiększoną liczbę fagolizosomów, poszerzoną siateczkę

endoplazmatyczną i zwiększoną ilość wakuol, zmiany podobne do stwierdzonych także przez innych autorów (Nouhouayi i wsp., 1981). W tej grupie zwierząt, po raz pierwszy zaobserwowałam zjawisko, określona terminem krynofagii, które powtarzało się w kolejnych grupach wiekowych zwierząt. Zjawisko to polega na niszczeniu pęcherzyków neurosekrecyjnych przez endogenne enzymy komórki. Podobne zjawisko zaobserwowali Walski i wsp.(1991) w mózgu szczura po 5 i 10 minutowym zatrzymaniu akcji serca. Zjawisku temu towarzyszy wzmożona aktywność lityczna, będąca istotnym czynnikiem w utrzymaniu homeostazy w komórkach (Meijer i wsp., 2004). Bergamini i wsp. (2003) uważali, że autofagia jest mechanizmem szczególnie użytecznym przy usuwaniu niechcianych lub uszkodzonych molekuł powstałych między innymi w wyniku starzenia się organizmu. Wszystkie wymienione powyżej procesy występowały też u szczurów w wieku 18 i 24 miesiące, lecz były one bardziej nasilone. Stare kłębki szyjne (pochodzące od 24 mies. szczurów) charakteryzowały się znaczną różnorodnością komórek chemoreceptorowych. W pojedynczym gronku komórek chemoreceptorowych obok prawidłowo wyglądających komórek występowały komórki o bardzo zmienionej morfologii, aż do ich całkowitego rozpadu włącznie. Degradacja komórek chemoreceptorowych jest zapewne powodem, obserwowanego z wiekiem, zmniejszenia się ich liczby (Hurst i wsp.,1985, Bee i wsp., 1993, Lowe i wsp., 1987, Di Giulio i wsp., 2003). Hurst i wsp. (1985) w swoich badaniach, przeprowadzonych na ludzkich kłębkach pobranych pośmiertnie, zaobserwował, że u młodych osób komórki chemoreceptorowe zajmują około 45% całej powierzchni kłębka, natomiast u starych już tylko 29% powierzchni. Komórki, które pozostały, wydawały się być „ściśnięte” przez znacznie rozrośniętą, otaczającą je tkankę łączną (Hurst i wsp., 1985, Di Giulio i wsp., 2003). Prowadziło to do stopniowej dezintegracji

gronkowej struktury kłębków szyjnych, gdzie poszczególne gronka oddzielone były od siebie grubą warstwą tkanki łącznej. Powodowało to zapewne „złudny” przyrost masy i rozmiarów kłębków szyjnych. Od ludzki materiał był pobierany w czasie autopsji, co mogło być źródłem niedokładności wynikających z jatrogennych zmian morfologicznych spowodowanych pośmiertną anoksją. W obecnych badaniach, choć powierzchnia zajmowana przez komórki chemoreceptorowe nie była oceniana, potwierdziłam zanik części tych komórek, a także przerost tkanki łącznej. W badaniach tych materiał był pobierany przyżyciowo w wyniku lewokomorowej perfuzji mieszaninami utrwalającymi, co zapewniało zachowanie prawidłowego obrazu pobieranych tkanek.

W grupie najstarszych szczurów zaobserwowałam zmianę stosunku liczby pęcherzyków sekrecyjnych z jasnym rdzeniem do pęcherzyków z ciemnym rdzeniem, na korzyść tych pierwszych. Zmiana ta, wynikająca głównie z przyrostu liczby pęcherzyków z jasnym rdzeniem, przy nieznacznie tylko zmniejszonej ilości pęcherzyków z ciemnym rdzeniem. Podobne zmiany, choć bez podania stosunku licztowego, opisali Di Giulio i wsp. (2003). Hansen (1989) i Donnelly i wsp. (1993) w swoich pracach donoszą, że w wyniku starzenia się, jak i chronicznej hipoksji, wzrasta poziom katecholamin w kłębkach szyjnych. Podobne zjawisko zaobserwowano we krwi zwierząt żyjących w warunkach chronicznej hipoksji (Mazzeo, 1993). Zmiany pęcherzyków sekrecyjnych związana są najpewniej ze zmianami w składzie wewnątrzpęcherzykowych neuroprzekaźników.

Torbati i wsp. (1993) i Di Giulio i wsp. (2003) opisują zmiany liczby mitochondriów w komórkach chemoreceptorowych starych szczurów. Potwierdza to moje obserwacje. Dodatkowo, zaobserwowałam znaczne różnice w wyglądzie mitochondriów z wpływem wieku. W pośrednich grupach wiekowych dało się zauważyć

tylko ogniskowe zmiany. Natomiast w komórkach chemoreceptorowych najstarszej grupy wiekowej ok. 50% całkowitej puli mitochondrialnej uległo różnego typu uszkodzeniom, co istotnie różniło tę grupę od szczurów młodych. Mitochondria charakteryzowały się zmienionym kształtem, przerzedzoną macierzą, zmniejszoną ilością grzebieni, a czasem nawet brakiem ciągłości błony mitochondrialnej. Mitochondria są organellami charakteryzującymi się znaczną plastycznością, która pozwala im na bardzo szybkie dostosowanie się do metabolicznych potrzeb komórek (Bereiter-Hahn, 1990). Może to być przyczyną stopniowego zmniejszania się ilości mitochondriów u starych szczurów, u których konsumpcja tlenu zmniejsza się z wiekiem. Przedłużający się jednak stan niedoboru tlenu, spowodowany okluzją dopływu krwi do tkanki, może prowadzić do utraty zdolności rekonstrukcyjnych i trwałego uszkodzenia tych struktur. Uszkodzenie wewnętrznej błony mitochondrialnej prowadzi do inaktywacji lub zmiany aktywności enzymów łańcucha oddechowego i uniemożliwia utrzymania prawidłowego gradientu jonów  $[H^+]$  (Schoonen i wsp., 1990), a tym samym zaburza gospodarkę energetyczną komórki. Jeśli zgodzić się z Biscoe i wsp. (1989), że pierwotnym „czujnikiem” tlenu w komórkach chemoreceptorowych są właśnie mitochondria, to uszkodzenia tych struktur mogłoby mieć odzwierciedlenie w zmniejszonej chemoczułości kłębków szyjnych na bodziec hipoksyjny. Natura „czujnika” zmian stężenia tlenu w komórkach chemoreceptorowych wymyka się jednak ciągle pozytywnej weryfikacji naukowej.

W skład parenchymy kłębkowej wchodzi także, rzadko obserwowane, komórki podporowe, tzw. typ II. Komórki te, w moich badaniach, nie ulegały istotnym zmianom ultrastrukturalnym z wiekiem. Wiadomo jednak, że u starych zwierząt mogą one ulegać przekształceniu w fibroblasty przyczyniając się do rozrostu tkanki łącznej (Hurst i wsp. 1985). Zaobserwowałam natomiast zmiany w zakończeniach nerwowych zatopionych

w tkance łącznej w bliskim sąsiedztwie komórek chemoreceptorowych. Liczba włókien nerwowych ulega zmniejszeniu, ich wnętrze degeneruje a otaczające je osłonki mielinowe ulegają rozwarstwieniu wraz z wiekiem.

Kłębki szyjne są organem bardzo obficie unaczynionym. Przepływ krwi sześciokrotnie przewyższa przepływ mózgowy i wynosi 2000 ml/min/g tkanki (Gonzalez i wsp., 1994). Jest oczywiste, że stan naczyń wnikaających do struktury kłębków szyjnych oraz rozwidlenia tętnic szyjnej wspólnej w okolicy, w której umiejscowione są kłębki, będzie miał bezpośrednie przełożenie na ich funkcję i strukturę. W celu weryfikacji tych przypuszczeń, od części szczurów w każdym przedziale wiekowym, pobrałam fragmenty rozwidlenia tętnic szyjnych wspólnych. Badania prowadzone od wielu lat na ludziach ujawniły, że rozwidlenie tętnicy szyjnej wspólnej, a zwłaszcza tętnica szyjna wewnętrzna są szczególnie podatne na zmiany miażdżycowe, co spowodowane jest specyficznym kształtem tego fragmentu naczynia i kątem odejścia tętnicy wewnętrznej od pnia tętnicy szyjnej wspólnej, a także stosunkiem powierzchni przekroju opuszki do powierzchni przekroju tętnicy szyjnej wewnętrznej i zewnętrznej (Sitzer i wsp., 2003). W tego typu miejscach dochodzi do turbulencji i zaburzeń w przepływie krwi, co powoduje specyficzną interakcję między przepływającym strumieniem krwi a śródbłonkiem naczyń (Wójcik i wsp., 2001). Śródbłonek ściany tętnic poddawany jest działaniu trzech głównych sił mechanicznych: ciśnieniu hydraulicznemu krwi, sile rozciągającej oraz tzw. sile ścinania (Traub i wsp., 1998; Małek i wsp. 1999). Opuszka tętnicy szyjnej wewnętrznej jest pięciokrotnie bardziej narażona na zmiany miażdżycowe niż tętnica wspólna i trzykrotnie bardziej niż zaopuskowy fragment tętnicy wewnętrznej (Zarins i wsp., 1983). Lowe i wsp. (1987) w swoich badaniach przeprowadzonych pośmiertnie na ludziach w wieku od 29 do 100 lat opisali rozległe zmiany miażdżycowe w poszczególnych fragmentach tętnic

szyjnych. Autorzy, u kilku pacjentów, mimo znacznej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej spowodowanej zmianami miażdżycowymi, nie zaobserwował zmian w ultrastrukturze kłębków szyjnych. U młodszych osób, mimo spodziewanej większej podatności na miażdżycę tętnicy szyjnej wewnętrznej, lepszym „markerem” świadczącym o stanie kłębków szyjnych okazały się zmiany w tętnicy szyjnej zewnętrznej.

Nie znalazłam danych literaturowych przedstawiających podobne badania u szczurów. W związku z tym zdecydowałam się pobierać wycinki ze wszystkich elementów rozgałęzienia tętnicy szyjnej. Wiedząc również, że niedokrwienie organów w około 25% powodowane jest przez tzw. „chorobę małych naczyń” zwróciłam uwagę na budowę naczyń kapilarnych wnikających do struktury kłębków szyjnych. Badania wykazały brak zmian w budowie kapilar kłębkowych u szczurów w wieku od 3 do 18 miesięcy. U najstarszej grupy szczurów połączenia między komórkami śródbłonkowymi, będące jednym z najistotniejszych elementów ich czynności, były także prawidłowo zachowane. Zaobserwowałam jednak pojedyncze mikrokosmki na powierzchni komórek śródbłonkowych, co może świadczyć o subtelnych zmianach w budowie błony komórkowej. Zaburzenie w budowie błony komórkowej mogą powodować zwiększoną przyczepność śródbłonek dla elementów morfotycznych krwi. Dysfunkcja śródbłonek uważana jest przez wielu badaczy za kluczowy etap w rozwoju miażdżycy (Ross, 1993; Barton i wsp., 1997; Besse i wsp., 2002; Verma i wsp., 2003). Moje wyniki morfologiczne nie potwierdziły jednak zwiększonej adhezji na powierzchni komórek śródbłonka, która mogłaby przyczyniać się do zapoczątkowania procesu miażdżycowego. Być może zwiększona adhezja i typowe zmiany miażdżycowe rozwijają się w jeszcze późniejszym wieku szczurów. Szczury starsze niż 2 lata, co w przybliżeniu można porównywać do bardzo podeszłego wieku



u człowieka, były jednak poza zakresem moich obecnych badań. Śmiertelność u takich starszych szczurów, zwłaszcza po ich uśpieniu, gwałtownie wzrasta, co ze względów praktycznych i etycznych uniemożliwia prowadzenia badań. Poza tym, u starych 24 miesięcznych szczurów stwierdziłam ewidentne zmiany morfologiczne i czynnościowe w kłębkach szyjnych i uwzględnienie roli miażdżycy w tych zmianach wymagałoby obecności typowych dla niej cech w tym zakresie wieku.

Elementem, który szczególnie wyróżniał parenchymę kłębków szyjnych pochodzących od 18 i 24 miesięcznych szczurów była angiogeneza. Angiogeneza jest procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych pod wpływem różnego rodzaju czynników. W patologii, gdy dochodzi do zaburzenia równowagi między czynnikami pobudzającymi a hamującymi angiogenezę, na korzyść tych pierwszych, dochodzi do zapoczątkowania tego procesu. Istotnym czynnikiem pobudzającym angiogenezę jest środowisko hipoksyjne (Witzenbichler i wsp., 1998). Środowisko takie mogło powstać w wyniku proliferacji tkanki łącznej otaczającej komórki chemoreceptorowe i w jej konsekwencji wydłużonej drogi dyfuzji tlenu z kapilar do komórek chemoreceptorowych.

W tętnicach szyjnych szczurów, począwszy od 6 miesiąca życia, stopniowo postępowały procesy prowadzące do przebudowy ściany tych naczyń. Objawiało się to rozwarstwieniem błony elastynowej, zmianą fenotypu mięśni gładkich z osadzonego na migrujący, proliferacją komórek mięśniowych oraz proliferacją włókienek kolagenowych. Nie stwierdziłam jednak zwiększonej ilości ciał Weibla-Palade, w których składowany jest prozakrzepowy czynnik von Willebranda, będący „markerem” dysfunkcji śródbłonnków. Zależność między tym czynnikiem a zapoczątkowaniem procesu miażdżycowego zaobserwowali De Meyer i wsp. (1999) u królików karmionych przez 26 tygodni dietą zawierającą 0,3% cholesterolu.

W najstarszej grupie szczurów, w komórkach śródbłonkowych tętnic szyjnych zaobserwowałam, podobnie jak w naczyniach kapilarnych kłębków szyjnych, pojedyncze mikrokosmki. Ciągłość warstwy śródbłonkowej była jednak zachowana w niezmienionej formie. Nie obserwowałam również adhezji elementów morfotycznych krwi na powierzchni śródbłków, napływowych makrofagów przekształcających się w komórki piankowe, ani kumulacji lipidów w ścianach naczyń. Proces przebudowy naczyń polegał na stopniowym sztywnieniu i spadku elastyczności ich ścian bez uszkodzenia warstwy śródbłonna. Nie powodował on również deformacji ściany naczyń ani jej pęknięcia. Uznaje się, że utrata elastyczności przez ściany naczyń jest procesem fizjologicznym, rozpoczynającym się już we wczesnym okresie rozwojowym u szczurów (Connat i wsp., 2001), a także u człowieka (Lévy, 1992), co dzieje się nawet bez udziału wyraźnych czynników podwyższających ryzyko ujawnienia się miażdżycy (Lüscher i wsp., 1997). Stopniowa przebudowa ściany naczyń z wiekiem, którą zaobserwowałam u szczurów, może się wiązać ze zmniejszoną biosyntezą makromolekuł zewnątrzkomórkowej macierzy. W przypadku elastyny proces ten jest dodatkowo wzmocniony przez działanie dwóch niezależnych czynników, takich jak: odkładania się soli wapnia oraz przez rosnącą z wiekiem aktywność elastaz prowadzącą do fragmentacji warstwy elastynowej (Connat i wsp., 2001). Z drugiej strony, włókna kolagenowe są stabilizowane w wyniku działania reakcji Maillarda, polegającej na chemicznej reakcji pomiędzy białkami i węglowodanami. Reakcje takie mają związek z naturalnym procesem starzenia się białek tkankowych (Ferreira i wsp., 2003).

Reakcja ta czyni włókna kolagenowe bardziej opornymi na działanie kolagenaz (Robert, 1996). Wzrastający współczynnik kolagen/elastyna z wiekiem świadczy o postępującym sztywnieniu naczyń. Proces ten, poza wiekiem, może rozpocząć również szereg innych czynników takich jak: wirusy, czynniki immunologiczne,

uszkodzenia mechaniczne, urazy spowodowany niską temperaturą, a także wysokotłuszczowa dieta i wywołana przez nią hipercholesterolemia (Robert, 1996; Shimokawa, 1999). Dowodem na istotność poziomu lipidów we krwi w procesie formowania się zmian miażdżycopodobnych były badania przeprowadzone przez Moczar i wsp. (1976), gdzie do hodowli komórkowej aorty królika dodano wysokotłuszczowe serum, co spowodowało zahamowanie wbudowywania się radioaktywnej proliny do większości białek syntetyzowanych w okresie 24-48 godzinnej inkubacji, z wyjątkiem kolagenu, w którym poziom ten wyraźnie wzrósł.

Z literatury wiadomo, że szczury należą do gatunku zwierząt, u których nie rozwijają się płytki miażdżycowe w wyniku karmienia dietą wysokotłuszczową (Robert, 1996), prowadzącą do wzrostu poziomu cholesterolu w surowicy krwi nawet do 500 mg%, o ile warstwa śródbłonkowa jest zachowana prawidłowo. Jeśli jednak dojdzie do uszkodzenia komórek śródbłonkowych, to proces formowania się złożeń postępuje bardzo szybko. Pierwsze wyraźne zmiany widoczne są już po 7 dniach od momentu uszkodzenia śródbłonnków, nawet przy umiarkowanie podwyższonym stężeniu cholesterolu we krwi (150 mg%) (Constantinides, 1977). Jakkolwiek zmiany miażdżycowe w ścianach naczyń nie muszą być bezpośrednio powiązane z poziomem lipidów we krwi, to jednak wiele badań wskazuje na to, że hipercholesterolemia ma istotny wpływ na funkcje wydzielnicze i regulacyjne śródbłonnków (Miyachi i wsp., 1992; Zeiher i wsp., 1993; Ren i wsp., 2001) oraz na zdolności regeneracyjne tych komórek (Buján i wsp., 1996). W związku z tym w swojej pracy sprawdziłam poziom cholesterolu i jego frakcji HDL we krwi najmłodszej i najstarszej grupy badanych szczurów. Uważałam, że pomiar wybranych frakcji lipidów w surowicy był tym bardziej uzasadniony, że nie znalazłam w literaturze danych dotyczących poziomu cholesterolu u starych szczurów karmionych standardową paszą. U młodych zwierząt

poziom cholesterolu i frakcji HDL wynosiły, odpowiednio,  $56,0 \pm 3,2$  mg/dL i  $36,1 \pm 2,9$  mg/dL. U starych zwierząt dane te wynosiły  $62,2 \pm 7,7$  mg/dL dla cholesterolu i  $42,2 \pm 3,9$  mg/dL dla frakcji HDL. Nieznaczny wzrost wartości lipidów w surowicy krwi 2 letnich szczurów nie był istotny statystycznie i jego wielkość wydaje się pomijalna. Wyniki uzyskane przeze mnie u młodych szczurów nie odbiegały zasadniczo od danych literaturowych. Dane te wskazują, że poziom cholesterolu całkowitego u młodych szczurów waha się w granicach 58-84 mg/dL, a poziom frakcji HDL 27-61 mg/dL (Cinci i wsp., 2000; Yoshida i wsp., 2000; Drobnik i wsp., 2001; Fukushima i wsp., 2001; Slowing i wsp., 2001; Tsutsumi i wsp., 2001). Różnice w wartościach lipidów podawanych przez literaturę są zapewne wynikiem różnych metod zastosowanych do pomiaru ich poziomu. Różnice te raczej nie wynikają z rodzaju szczepu szczurów użytych do badań. Potwierdzili to w swoich badaniach Tsutsumi i wsp. (2001), którzy wykazali brak różnic między 7 tygodniowymi szczurami ze szczepów: Wistar, Fisher i Sprague-Dawley. Stwierdzili oni natomiast istotne różnice międzygatunkowe w poziomach wymienionych lipidów. U myszy (szczep ddY) poziom cholesterolu i frakcji HDL wynosiły, odpowiednio,  $135 \pm 8$  mg/dL i  $102 \pm 11$  mg/dL, u psa (rasy Beagle)  $167 \pm 19$  mg/dL,  $141 \pm 28$  mg/dL, podczas gdy u królika (Nowozelandzki, biały) były one zbliżone do wartości oznaczonych u szczurów, wynosząc  $60 \pm 16$  mg/dL i  $20 \pm 4$  mg/dL (Tsutsumi i wsp., 2001).

Mimo udokumentowanego wpływu poziomu lipidów na funkcje śródbłonnków, obecnie coraz częściej wraca się do spostrzeżeń dwóch wybitnych patologów XIX wieku Rudolfa von Virchowa i Carla von Rokitanskiego, którzy toczyli spór o to czy pierwotne przyczyny powstawania miażdżycy związane są z procesem zapalnym czy zakrzepowym ściany naczyń (Chłopicki, 2005). Zgodnie z ich teoriami miażdżycę uważa się dziś najczęściej za chorobę, w której procesy zapalne i zakrzepowe

wzajemnie się przeplatają i aktywują, a wysokie stężenie cholesterolu może, ale nie musi ich wywoływać. Znając rolę, jaką odgrywa śródbłonek w układzie krwionośnym oraz jego zdolności homeostatyczne można stwierdzić, że dysfunkcja śródbłonek stanowi swoisty barometr mówiący o zagrożeniu układu krwionośnego. Jednym z elementów, który obecnie wiązany jest ściśle z czynnością śródbłonek, a więc także z procesem miażdżycowym i procesem starzenia się, jest NO. W swojej pracy wzięłam pod uwagę aspekt możliwych zmian NO. NO jest gazem o bardzo krótkim czasie półtrwania 5-30 s (Hibbs i wsp., 1987, Delaney i wsp., 1993), dlatego bezpośredni pomiar jego poziomu nastęrcza wielu problemów. Oznaczyłam poziom NOS, który pośrednio może mówić o ilości produkowanego NO przez te komórki, w śródbłonekach naczyń kapilarnych, tętnic szyjnych oraz mięśniach gładkich naczyń. Stwierdziłam, że w śródbłonekach kapilar kłębkowych i dużych tętnic u starych szczurów poziom NOS był około dwukrotnie wyższy niż u szczurów młodych. Poziom NOS nie różnił się jednak istotnie między skrajnymi grupami wiekowymi w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń. Te zmiany poziomu NOS są trudne do jednoznacznej interpretacji.

O istotnej roli NO w tych procesach świadczyć może przyspieszony rozwój miażdżycy w zwierzęcych modelach, w których farmakologiczne zahamowanie wytwarzania śródbłonekowego NO lub genetyczne pozbawiono śródbłonekowej NOS (Cayatta i wsp., 1994). Badacze wciąż nie są jednak zgodni czy w przebiegu procesu starzenia i procesu miażdżycowego poziom NO oraz NOS rośnie (Minor, 1990; Lüscher i wsp., 1997), czy też maleje (Tschundi i wsp., 1996; Barton i wsp., 1997; Wever i wsp., 1998; Chłopicki, 2005). Rozbieżności wydają się być zależne od stopnia zaawansowania miażdżycy, czy procesu starzenia oraz od metod, jakich użyto do oznaczenia poziomu NO i NOS. Wczesne stadia tych procesów charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów NOS, ale w późniejszym etapie następuje zmniejszenie

ekspresji NOS i produkcji NO. (Tschundi i wsp., 1996; Shimokawa, 1999). Jest to zgodne z naturą śródbłonek, które wydzielając szerokie spektrum czynników do pewnego momentu działają ochronnie na naczynia krwionośne, natomiast w późniejszej fazie zmieniony fenotyp śródbłonek może podsycać proces zapalny czy zakrzepowy (Verma i wsp., 2003). Inną z przyczyn może być również płeć użytych do badań zwierząt. Wiadomo, że żeńskie hormony płciowe mają duży wpływ na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. Powodują między innymi zahamowanie proliferacji mięśni gładkich, zmniejszają oksydację LDL oraz stymulują proces syntezy NO (Barett-Connor i wsp., 1991). Te ostatnie problemy nie dotyczą moich badań, ponieważ używałam wyłącznie szczurów płci męskiej.

Jednym z czynników, który może wpływać na interpretację różnic w NOS stwierdzonych przeze mnie w skrajnych grupach wiekowych jest poziom wolnych rodników tlenowych, którego nie kontrolowałam. Poziom ten rośnie zarówno z postępującym wiekiem jak i w miażdżycy (Wickens, 2001) czemu towarzyszy spadek zdolności antyoksydacyjnych (Azhar i wsp., 1995). Loo i wsp. (2000) w swoich badaniach nad procesem starzenia się naczyń krwionośnych zaobserwowali siedmiokrotne zwiększenie ekspresji NOS u starych zwierząt, przy około trzykrotnym obniżeniu ilości produkowanego NO, co wiązało się ze zwiększoną produkcją rodnika nadtlenkowego. Szybkość, z jaką NO reaguje z rodnikiem nadtlenkowym trzykrotnie przewyższa, bowiem tą, z jaką dysmutaza nadtlenkowa (SOD) katabolizuje ten rodnik (Wever i wsp., 1998). W wyniku reakcji dwóch wolnych rodników dochodzi do powstania nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ), który w wysokim stężeniu jest bardzo toksyczny i może uszkadzać DNA komórki oraz powodować fragmentację białek poprzez nitrację aminokwasów (Ischiropoulos i wsp., 1995). Postępujące uszkodzenia nagromadzają się

z wiekiem, co objawia się bardziej nasilonymi objawami u starych osobników. Wzrost ekspresji NOS nie przekłada się, więc w prosty sposób na wzrost poziomu NO.

Ponadto, metoda NADPH-diaforazy, użyta w moich badaniach, nie określa rodzaju izoformy NOS, której ekspresja zachodzi w danych warunkach. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby zwiększona ilość oznaczonej przeze mnie NOS wynikała ze wzmożonej ekspresji iNOS, której aktywacja zachodzi w wyniku działania czynników zapalnych. Głównym źródłem tej izoformy NOS są makrofagi, których adhezji ani napływu do ścian naczyń nie zaobserwowałam. W patologicznych warunkach dochodzi również do ekspresji iNOS we wszystkich komórkach budujących ścianę naczyń, a ja nie stwierdziłam istotnych różnic w poziomie NOS w komórkach mięśni gładkich naczyń między młodymi i starymi szczurami. Wydaje się zatem możliwe, iż nadprodukcja NOS może stanowić swoistego rodzaju proces kompensacyjny dla zmniejszonej aktywności NO w wyniku dezaktywacji przez rodnik nadtlenkowy. Proces ten może także sprzyjać rozkurczaniu usztywnionych pod wpływem przebudowy i umiarkowanej kalcyfikacji naczyń krwionośnych. We wczesnym stadium procesu miażdżycy oraz procesu starzenia (te dwa procesy we wczesnej fazie są często niemożliwe do rozróżnienia, zwłaszcza u szczurów) dochodzi do osłabienia reaktywności naczyniowych komórek mięśni gładkich na czynniki naczynio-rozkurczające, takie jak NO (Lüscher i wsp., 1997; Shimokawa 1999). Nadprodukcja NOS przyczyniałaby się do poprawienia tej reaktywności. Stopień przebudowy ścian naczyń zaobserwowany w moich badaniach u starych szczurów nie może istotnie zaburzać przepływu krwi, a tym samym nie powinien powodować tak drastycznych, jak obserwowane, zmian w parenchymie kłębków szyjnych.

## Tlenek azotu w kłębkach szyjnych

Poza istotną rolę, jaką NO odgrywa w układzie krwionośnym, może on również pełnić rolę neuroprzekaźnika w ośrodkowym układzie nerwowym (Kandel i wsp., 1992; Snyder i wsp., 1992). Uwalniany jest przede wszystkim przez astrocyty i mikroglej. Kłębki szyjne są pochodzenia nerwowego. NO jest w nich obecny i ma hamujący wpływ na hipoksyjną odpowiedź oddechową (Prabhakar i wsp., 1993; Prabhakar, 1999; Iturriaga, 2001). W związku z tym uważałam za istotne ocenić ekspresję NOS w kłębkach szyjnych i jej możliwą relację do zmian chemoczułości kłębków wraz z wiekiem. W komórkach chemoreceptorowych starych szczurów, ilość produktu reakcji NADPH-diaforazy była znamienne wyższa w porównaniu z młodymi komórkami. Są to pierwsze dane porównujące ekspresję NOS w starych i młodych komórkach chemoreceptorowych, nie znalazłam bowiem podobnej informacji w literaturze. Wiadomo jedynie, że poziom syntazy NO rośnie w kłębkach szyjnych w warunkach chronicznej hipoksji (Di Giulio i wsp., 1998b; Di Giulio i wsp., 2005). Potwierdza to możliwość, że rozrastająca się tkanka łączna w kłębkach szyjnych starych szczurów powoduje zaburzenia w dyfuzji gazów i substancji odżywczych do parenchymy kłębków, przyczyniając się tym samym do powstania warunków podobnych do tych, jakie mogłaby wywołać chroniczna hipoksja (Di Giulio i wsp., 1998b, 2005). Wciąż kontrowersje budzi jednak fakt obecności NOS w komórkach chemoreceptorowych. Większość badaczy uważa, że NO obecny w kłębkach jest wyprodukowany przez komórki endotelialne naczyń (eNOS) oraz zakończenia nerwów czuciowych i sympatycznych (nNOS) (Iturriaga, 2001; Valdés i wsp., 2003; Di Giulio i wsp., 2005). Jedynie Prabhakar i wsp. (1993) potwierdzili obecność NOS w komórkach chemoreceptorowych, co nie jest uniwersalnie akceptowane. Poziom NOS w komórkach był jednak zmienny i znacznie niższy od poziomu w zakończeniach



nerwowych (Prabhakar i wsp., 1993). Buerk i Lahiri (2000) odkryli bardzo wysokie stężenie NO w parenchymie kłębków szyjnych ( $\approx 300$  nM), co sugerowało, że odgrywa on istotną rolę w funkcjach metabolicznych tego organu. Głównym celem działania NO w komórkach są enzymy cGMP oraz oksydaza cytochromowa  $a_3$ , które są najbardziej wrażliwe na działanie tego gazu (Iturriaga, 2001). W mitochondriach, NO może współzawodniczyć z  $O_2$  i łączyć się z oksydazę cytochromową  $a_3$ , hamując jej działanie i przyczyniając się do zmniejszenia potencjału transbłonowego, zmniejszenia zużycia tlenu przez komórki oraz zmniejszenia syntezy ATP (Mosqueira i wsp., 2002). Mechanizmy takie mogą przyczyniać się do osłabienia chemoczułości kłębków szyjnych u starych szczurów. Nie jest jednak do końca wyjaśnione, w jaki sposób NO jest zaangażowany w proces przekazywania sygnału hipoksyjnego w komórkach chemoreceptorowych. NO nie wpływa na czynność błonowych kanałów potasowych, które uczestniczą w detekcji spadków ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi u szczura (Haton i wsp., 1996). NO może łączyć się bezpośrednio z błonowymi białkami hemowymi komórek chemoreceptorowych, zawierającymi żelazo, które, wg jednej teorii, mogą stanowić pierwotny „czujnik”  $O_2$  (Di Giulio i wsp., 1998a), co poprzez zmiany konfiguracji tych białek przyczyniałoby się do osłabienia chemoczułości.

Chroniczna hipoksja stymuluje aktywność NOS, a także hydroksylazy tyrozynowej, enzymu limitującego syntezę katecholamin w kłębku, co może świadczyć o współdziałaniu systemu nitroergicznego z dopaminergicznym. Obydwa te enzymy są wrażliwe na poziom tlenu i być może podwyższony poziom NOS, i w konsekwencji NO, wpływa na syntezę dopaminy, która jest odpowiedzialna za hamowanie aktywności kłębków szyjnych (Di Giulio i wsp., 1998a). Zatem, wzrost ilości NOS u starych szczurów może brać udział we swoistym procesie adaptacyjnym do nowo zaistniałych warunków środowiskowych, jakim jest zmniejszenie ilości tlenu docierającego do

struktur kłębkowych spowodowane znacznym przerostem tkanki łącznej otaczającej kłębki.

## **Zmiany w układzie oddechowym i w odpowiedziach oddechowych na hipoksję z wiekiem**

W odpowiedzi na umiarkowany bodziec hipoksyjny (spadek  $\text{PaO}_2$  do ok. 60-62 mmHg) następował wzrost minutowej wentylacji płucnej o 15-20% zarówno u młodych jak i starych zwierząt. Wielkość tego wzrostu, jak też typowy dwufazowy stymulująco-depresyjny profil odpowiedzi na hipoksję był podobny w badanych skrajnych grupach wiekowych i odpowiadał danym z literatury przy tak umiarkowanym poziomie bodźca hipoksyjnego (Powell i wsp., 1998). Wentylacja płucna, postępując za aktywnością chemoreceptorów kłębkowych, zaczyna gwałtownie narastać, gdy  $\text{PaO}_2$  spadnie poniżej 60 mmHg (Gonzalez i wsp., 1994). Zgodnie z tym, wzrost wentylacji płucnej był w moich badaniach większy przy silniejszym bodźcu hipoksyjnym, który powodował obniżenie  $\text{PaO}_2$  do ok. 53-48 mmHg. Nie stwierdziłam znaczących różnic w amplitudzie wzrostu wentylacji, na którykolwiek bodziec hipoksyjny między młodymi i skrajnie starymi grupami wiekowymi szczurów. Przy silniejszym 11% bodźcu, wentylacja młodych szczurów odpowiadała nieco silniej (Ryc. 48). Może świadczyć to o ujawnianiu się pewnego stopnia niedomogi u starych szczurów w warunkach dużego obciążenia układu (metaboliczna konieczność do dużego, szybkiego wzrostu wentylacji) do generacji właściwego poziomu wentylacji płucnej (Pokorski i wsp., 2003). Niedomoga ta może wynikać z procesu starzenia na poziomie zarówno ośrodkowym jak i obwodowym. Dane takie znane są głównie z badań na ludziach. Osłabienie odpowiedzi oddechowej na hipoksję u starych ludzi może być związane z wieloma czynnikami jak: zmiany w mechanice i budowie płuc i klatki piersiowej (Mittman i wsp., 1965; Kronenberg i wsp., 1973; Peterson i wsp., 1981),

tendencją do zamykania się dróg oddechowych podczas wydechu (Levitzky, 1984), przekazywaniem sygnału w ośrodkowym układzie nerwowym a także zmianą chemoczułości receptorów obwodowych czy też chroniczną hipoksją (Forster i wsp., 1971; Carpenter i wsp., 1998; Xu i wsp., 2005). Rola tych zmian w osłabieniu hipoksyjnego oddychania jest jednak kontrowersyjna. Niektórzy badacze nie potwierdzają osłabienia siły mięśni oddechowych u starych ludzi (Kronenberg i wsp., 1973; Peterson i wsp., 1981), a zmiany związane ze wzrostem pojemności zalegającej płuc (RV), czy spadkiem pojemności życiowej płuc (VC) nie wydają się być wystarczające, aby doszło do osłabienia odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Pokorski i wsp., 2003), albowiem mogą być kompensowane przez układ oddechowy. Powyższe dane z badań na ludziach trudno dyskutować w kontekście uzyskanych przeze mnie wyników, ponieważ brak jest porównawczych odniesień dotyczących badań na zwierzętach. W jedynej dostępnej dla mnie pracy odpowiedź oddechowa na hipoksję malała wraz z wiekiem, co było związane przede wszystkim ze zmniejszoną konsumpcją u starych zwierząt (Fukuda, 1992). W moich badaniach na szczurach ocenie nie podlegały konsumpcja  $O_2$  ani siła mięśni oddechowych i parametry oddechowe płuc.

Odpowiedź młodych szczurów charakteryzowała się silnie wyrażoną fazą stymulacji jak i fazą depresji oddychania. Nasilenie fazy depresyjnej w odpowiedzi oddechowej u starych szczurów zgodne jest generalnie z obserwacjami Georgopoulos i wsp. (1989), choć nie można dokonać bezpośredniego porównania, ponieważ te ostatnie wykazane zostały w badaniach na ludziach. Autorzy ci stwierdzili uzależnienie wielkości hipoksyjnej fazy depresji od fazy stymulacji oddychania, za którą odpowiedzialne są kłębki szyjne. Potwierdzają to badania przeprowadzone na noworodkach owiec, którym wycięto kłębki szyjne. Depresja oddychania była znacznie mniejsza u tych zwierząt w porównaniu ze zwierzętami, którym nie usunięto

chirurgicznie kłębków (Bureau i wsp., 1985). Świadczy to o roli chemoreceptorów kłębkowych w regulacji mechanizmów depresji oddychania, a także wskazuje na upośledzoną czynność kłębków w możliwym mechanizmie osłabienia odpowiedzi oddechowej na hipoksję.

W obecnych badaniach wzrost wentylacji minutowej w odpowiedzi na hipoksję u starych jak i młodych szczurów zachodził głównie przy udziale komponenty częstotliwościowej przy niewielkim udziale komponenty objętościowej. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy wskazują na przeważającą rolę komponenty częstotliwościowej oddychania w napędzaniu wentylacji płucnej u uśpionych szczurów Marczak i wsp. (2004).

Podobnie jak oddychanie, czułość odpowiedzi wentylacyjnej na hipoksję może także ulegać zmianie z wiekiem. Brak jest jednak ostatecznej zgody odnośnie wpływu wieku na tę czułość. Część autorów podaje, że hipoksyjna odpowiedź wentylacyjna u ludzi maleje wraz z wiekiem (Kronenberg i wsp., 1973; Peterson i wsp., 1981; Klawe i wsp., 2003), inni, że nie ulega zmianie (Ahmed i wsp., 1991; Pokorski i wsp., 2003), a jeszcze inni, że wzrasta (Chapman i wsp., 1987). Nieliczne badania na szczurach wykazują osłabienie chemoczułości kłębków szyjnych, ale tylko u zwierząt płci męskiej (Schlenker i wsp., 1985). W moich badaniach, oddechowa czułość hipoksyjna była istotnie silniejsza u młodych niż u starych szczurów. Wyniki moich badań popierają doniesienia tych autorów, którzy wskazują na możliwość osłabienia hipoksyjnej odpowiedzi oddechowej z wiekiem.

Zmniejszona reaktywność starych kłębków szyjnych na bodźce pośrednio potwierdzają badania Di Giulio i wsp., (1998a), którzy wykazali niewielki wpływ przewlekłej hiperoksji na ultrastrukturalną morfologię tego organu w przeciwieństwie do młodych kłębków szyjnych. O upośledzonej czynności kłębków szyjnych u starych

szczurów może również świadczyć zmniejszone nachylenie „slope” komponenty częstotliwościowej wzorca oddechowego na hipoksję stwierdzone w moich badaniach. Kłębki szyjne są bowiem w szczególności odpowiedzialne za regulację częstości oddychania u uśpionych gryzoni (Izumizaki i wsp., 2004).

Zmiany ciśnienia tętniczego krwi mogą wpływać na oddychanie. W moich badaniach ciśnienie to było niższe u starych zwierząt ( $72,3 \pm 0,4$  mmHg u starych vs.  $96,1 \pm 1,0$  mmHg u młodych). Wydaje się jednak wątpliwym, by te różnice mogły w istotny sposób wpływać na stwierdzone przeze mnie osłabienie oddechowej czułości hipoksyjnej u starych szczurów. Kłębki szyjne nie reaguje na zmiany ciśnienia krwi, jeśli utrzymuje się ono powyżej 50 mmHg (Lahiri i wsp., 1980). Obserwowany spadek ciśnienia krwi, choć w końcowej fazie testu zbliżał się do tej granicznej wartości, to jednak jej nie przekraczał. Poza tym, spadki ciśnienia, które są cechą charakterystyczną dla hipoksji, nie wpływają zasadniczo na ostre odpowiedzi oddechowe na hipoksję (Richter i wsp., 1999). Podobnie, zmiany składu gazowego krwi tętniczej, w tym w szczególności dwutlenku węgla – drugiego bodźca chemicznego, były porównywalne w obu skrajnych grupach wiekowych i nie odbiegały w istotny sposób od danych z literatury (Pokorski i wsp., 2003; Marczak i wsp., 2004). Wyjściowo niższe  $\text{PaO}_2$  i  $\text{SaO}_2$  u starych szczurów, które nie osiągnęło znamiennej różnicy, zgodne jest z doniesieniami na temat stopniowego obniżania się zawartości tlenu we krwi z wiekiem (Guenard i wsp., 1996). Istotne międzygrupowe różnice w wartości  $\text{PaO}_2$  odnotowano dopiero w 1,5 min testu badającego odpowiedź na 11% hipoksję;  $\text{PaO}_2$  u starych =  $47,6 \pm 2,0$  mmHg, a u młodych  $53,5 \pm 1,0$  mmHg. Różnice te wystąpiły w końcowej fazie testu, już po wystąpieniu depresji oddychania, zatem nie powinny one mieć wpływ na przebieg wczesnej fazy stymulacji, za którą odpowiedzialne są kłębki

szyjne, i która stanowiła główny przedmiot obecnych rozważań. Wyniki moich badań pozwalają, więc na sformułowanie, że za mniejszą odpowiedź oddechową na hipoksję u starych szczurów odpowiedzialny jest czynnik ośrodkowy, czyli osłabienie ośrodkowego napędu oddechowego, oraz czynnik obwodowy związany z osłabieniem chemoczułości kłębków szyjnych na O<sub>2</sub> (Peterson i wsp., 1981; Di Giulio i wsp., 1998a; Xu i wsp., 2005), a także zmniejszona impulsacja aferentna wytwarzana przez kłębki i przesyłana do grup neuronów oddechowych w pniu mózgu.

### **Związek zmian ultrastrukturalnych z czynnością kłębków szyjnych**

Wpływ zmian w ultrastrukturalnej morfologii kłębków szyjnych na ich czynność może być porównany w skrajnych, najmłodszej – 3 miesięcznej i najstarszej – 24 miesięcznej grupach wiekowych, w których badałam oba te elementy. Kłębki szyjne starych szczurów wykazywały istotne zmiany degeneracyjne. Jednocześnie, czułość odpowiedzi oddechowej na hipoksję była u tych szczurów istotnie niższa w porównaniu z grupą młodych szczurów. Uzasadnione jest więc stwierdzenie, że zmniejszona reaktywność hipoksyjna u starych zwierząt spowodowana była zmianami morfologicznymi kłębków szyjnych rozwijającymi się z wiekiem. Opisany przeze mnie około 20% ubytek komórek chemoreceptorowych i inne rozległe zmiany degeneracyjne w parenchymie kłębków, jak np. w zakończeniach nerwowych mających połączenia synaptyczne z tymi komórkami, wydają się jednak być nieproporcjonalnie duże do osłabienia odpowiedzi oddechowych na hipoksję. Możliwe, że mechanizmy kompensacyjne, które zostają uruchomione w wyniku rozwijającej się stopniowo z wiekiem hipoksji tkankowej w kłębkach, spowodowanej przez proliferację otaczającej tkanki łącznej i wydłużoną z tego powodu drogą dyfuzji tlenu i substancji odżywczych z krwi tętniczej do organu, przyczyniły się do wzrost podstawowego poziomu aktywacji „set point” przetrwałych komórek chemoreceptorowych. Wyższy poziom podstawowy

pozwala na uzyskanie wyższego poziomu pobudzenia podczas aktywacji w wyniku hipoksji. Innym wyjaśnieniem może być to, że liczba komórek chemoreceptorowych i/lub zakończeń nerwowych w kłębkach szyjnych przewyższa tę, która jest niezbędna do podtrzymania aktywności kłębków, lub też nie wszystkie komórki chemoreceptorowe biorą normalnie udział w procesie wytwarzania impulsu nerwowego (Gonzalez i wsp., 1994). W takim przypadku komórki, które nie zostały istotnie naruszone przez proces starzenia byłyby w stanie utrzymać hipoksyjną odpowiedź oddechową na relatywnie wysokim poziomie. Należy też wziąć pod uwagę, że mózg jest organem, który charakteryzuje się ogromnymi zdolnościami adaptacyjnymi pozwalającymi na dostosowanie się do zmniejszonej aferencji z kłębków szyjnych (Pokorski i wsp., 2004), co pozwala na wygenerowanie wentylacji oddechowej, która nie różni się dramatycznie od poziomu wentylacji u młodych zwierząt. Niezależnie od wieloczynnikowych mechanizmów wytwarzania i utrzymania hipoksyjnej odpowiedzi oddechowej, obecne badania wskazują jednoznacznie na zwyrodnieniowe zmiany w parenchymie kłębków szyjnych, jako przyczynę osłabienia tej odpowiedzi z wiekiem.

Pozostaje jeszcze odpowiedź na pytanie, czy zmiany w kłębkach szyjnych obserwowane z postępującym wiekiem wynikają z naturalnego procesu starzenia się tkanki organu, czy też, być może, spowodowane są czynnikami zewnętrznymi dla tego procesu. Wyniki moich badań wskazują na brak istotnych, typowo miażdżycowych zmian w ścianach naczyń doprowadzających krew do kłębków szyjnych u starych szczurów. Brak było płytek miażdżycowych oraz nie było istotnie podwyższonego poziomu cholesterolu we krwi. Zaobserwowane zmiany w budowie ultrastrukturalnej ścian tych naczyń, odpowiadają stopniowej przebudowie, prowadzącej do sztywnienia ścian. Jest to proces fizjologiczny, rozpoczynający się we wczesnym okresie rozwojowym i postępujący z wiekiem, który nie prowadzi jednak do okluzji światła

naczyń i ograniczenia w dostawach krwi. Wyniki sugerują, więc że zmiany morfologiczne w kłębkach szyjnych prowadzące do osłabienia ich funkcji są związane z naturalnym procesem zużycia czy starzenia się tkanki w zaawansowanym wieku.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Kłębki szyjne pochodzące od starych szczurów charakteryzują się zmniejszoną o około 20% liczbą komórek chemoreceptorowych w porównaniu z grupą najmłodszych zwierząt. Pozostałe komórki chemoreceptorowe charakteryzują się ogniskowymi zmianami zwyrodnieniowymi o różnym stopniu nasilenia, do martwicy włącznie.
2. Zmiany zwyrodnieniowe dotyczą także innych elementów parenchymy starych kłębków szyjnych, w szczególności zakończeń nerwowych tworzących synapsy na komórkach chemoreceptorowych. Torebka łącznotkankowa otaczająca kłębki szyjne ulega pogrubieniu z wiekiem. Proces dezintegracji parenchymy kłębków szyjnych nasila się stopniowo, poczynając od 12 miesiąca życia szczurów.
3. Badania potwierdziły, że u użytego do badań gatunku szczura nie obserwuje się tworzenia się typowych złogów miażdżycowych w dużych naczyniach krwionośnych u szczurów starszym wieku. Warstwa komórek śródbłonkowych, będąca „markerem” świadczącym o stanie i czynności naczyń krwionośnych, zachowuje ciągłość mimo zaawansowanego wieku zwierząt.
4. Poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcja HDL nie zmienia się istotnie z wiekiem.
5. Ekspresja NOS w komórkach śródbłonkowych naczyń, oznaczona przy użyciu metody NADPH-diaforazy, zwiększa się z wiekiem. Wzrost ten może być efektem uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych mających na celu



poprawę osłabionej reaktywności naczyniowych komórek mięśni gładkich na czynniki naczynio-rozkurczające, takie jak NO.

6. Zmiany w komórkach chemoreceptorowych mogą być przyczyną znamiennego osłabienia czułości kłębków szyjnych na bodźce chemiczne u starych zwierząt.
7. Słabszy wzrost wentylacji płucnej u starych szczurów w odpowiedzi na silny bodziec hipoksyjny może świadczyć o ujawnianiu się niedomogi regulacji oddychania w warunkach dużego obciążenia układu (metaboliczna konieczność do dużego, szybkiego wzrostu wentylacji). Brak typowo miażdżycowej przebudowy naczyń, która upośledzałyby dopływu krwi do kłębków szyjnych sugeruje, że zmiany morfologiczne, które rozwijają się w starych kłębkach są wynikiem naturalnego procesu starzenia się tkanki.

## 7. STRESZCZENIE

### Wstęp

Kłębki szyjne są organami czuciowymi. Główna ich rola polega na wykrywaniu zmian ciśnienia parcjalnego tlenu ( $\text{PaO}_2$ ), dwutlenku węgla ( $\text{PaCO}_2$ ) oraz stężenia jonów wodorowych [ $\text{H}^+$ ] we krwi tętniczej. Odgrywają one niewielką rolę w procesie regulacji oddychania normoksyjnego (około 10-20%), znaczenie ich rośnie, gdy poziom  $\text{PaO}_2$  spada poniżej 60 mmHg. Kłębki szyjne są głównym organem, w którym generowana jest stymulująca odpowiedź na hipoksję. Kłębki umiejscowione są obustronnie w szyi ssaków w okolicy rozgałęzienia tętnicy szyjnej wspólnej na tętnicę zewnętrzną i wewnętrzną. Zbudowane są z dwóch typów komórek tworzących tzw. gronka lub wysepki, które oddzielone są od siebie warstwą tkanki łącznej, formującej także zewnętrzną otoczkę nadając ostateczny kształt kłębkom. Pomiędzy gronkami, w otaczającej je torebce łącznotkankowej, znajdują się liczne naczynia kapilarne oraz zakończenia nerwowe. Sprawą, która od wielu dekad wymyka się naukowej weryfikacji jest proces przekaźnictwa sygnału w komórce chemoreceptorowej, od momentu jego dotarcia do błony komórkowej aż po zwiększoną impulsację bioelektryczną w zakończeniu nerwowym i pobudzenie ośrodkowego układu nerwowego. Nie jest również znany wpływ wieku na czynność kłębków. Badacze nie są zgodni, co do tego czy odpowiedzi te ulegają osłabieniu, pozostają niezmienione czy też może, jak niektórzy twierdzą, ulegają wzmocnieniu z wiekiem. Problem ten jest istotny, ponieważ istotą stymulacji oddychania w czasie hipoksji jest utrzymanie dowozu tlenu do organizmu na poziomie niezbędnym do zaspokojenia bieżących potrzeb organizmu. Utrzymanie dowozu tlenu jest szczególnie pożądane w starszym wieku, w którym

w wyniku naturalnego procesu starzenia się dochodzi do stopniowego obniżania  $\text{PaO}_2$  we krwi tętniczej. Obniżenie to pogłębia się przy obciążeniu układu oddechowego, np. w czasie wysiłku fizycznego lub sytuacji stresowych. Rola kłębków szyjnych i generowanych przez nie odpowiedzi na hipoksję jest więc w starszym wieku niebagatelna. Rola ta w dużej mierze zależy od tego czy kłębki szyjne podlegają procesowi starzenia się i od jakich czynników proces ten może zależeć. Zmiany w parenchymie kłębków szyjnych mogą bowiem zachodzić nie tylko w wyniku bezpośredniego wpływu wieku na struktury kłębkowe, ale również w wyniku ograniczonego dopływu tlenu i substancji odżywczych spowodowanego miażdżycopochodną okluzją głównych naczyń doprowadzających.

W badaniach nad rolą kłębków szyjnych w tworzeniu oddechowej reaktywności hipoksyjnej w starszym wieku niezwykle istotne wydaje się połączenie zmian ultrastrukturalnej morfologii organu z jego czynnością, także prześledzenie kinetyki zmian w relacji morfologia-czynność wraz z postępującym wiekiem. Brak jest takich prac w literaturze. Przedstawione przeze mnie w niniejszej pracy badania są próbą wypełnienia tej luki.

### **Hipoteza i cele badawcze**

Hipoteza badawcza zakładała, że jeżeli w komórkach chemoreceptorowych starych kłębków szyjnych występowałyby zmiany ultrastrukturalne o typie degeneracyjnym przy jednoczesnym braku zmian miażdżycowych w naczyniach doprowadzających krew do kłębków, to mogłoby to świadczyć o naturalnym procesie starzenia się tkanki kłębka. Pozostaje sprawą otwartą, czy zmiany morfologiczne miałyby swoje odzwierciedlenie w osłabionej czynności kłębków, objawiającej się zmniejszeniem generowanej przez nie odpowiedzi oddechowej na hipoksję, czy też mechanizmy kompensujące zapewniają prawidłową czynność chemoodruchu. Próbowałam

odpowiedzieć na to pytanie badając, w skrajnych grupach wiekowych szczurów, odpowiedź oddechową na dwustopniową hipoksję.

W mojej pracy postawiłam następujące cele badawcze:

1. Porównanie budowy ultrastrukturalnej kłębków szyjnych pochodzących od zdrowych, młodych (3 miesięcznych) szczurów z budową kłębków starych szczurów (24 miesięcznych).
2. Prześledzenie, w półrocznych odstępach czasu, dynamiki ultrastrukturalnego procesu starzenia się kłębków szyjnych.
3. Zbadanie stopnia miażdżycy tętnic szyjnych poprzez ocenę:
  - zmian ultrastrukturalnych w ścianie tętnicy szyjnej pod wpływem postępującego wieku
  - określenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi tętniczej 3- i 24-miesięcznych szczurów
  - określenie metodą NADPH-diaforazy poziomu syntazy tlenu azotu, markera stanu zapalnego, w komórkach śródbłonkowych tętnic szyjnych pochodzących od młodych i starych szczurów
4. Zbadanie wpływu wieku na czynność kłębków szyjnych, ocenianą na podstawie wielkości i czułości odpowiedzi oddechowej na hipoksję *in vivo* w dwóch skrajnych grupach wiekowych zwierząt.

## **Metodyka**

Badania wykonano w sumie na 37 szczurach płci męskiej w wieku od 3 do 24 miesięcy, o wadze 240-651g. Szczury znajdowały się w narkozie  $\alpha$ -chloralozowo-uretanowej podanej dootrzewnowo. Po zakończeniu eksperymentów zwierzęta uśmiercano poprzez podanie letalnej dawki środka anestetycznego lub lewokomorowej perfuzji mieszaniną aldehydów. Zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni instytutowej,

gdzie hodowane były przy zachowaniu 12 godz. systemu dnia i nocy, karmione standardową paszą przy nieograniczonym dostępie do wody. Badania składały się z dwóch części: *in vitro* i *in vivo*. Obie części uzyskały zezwolenie Lokalnej Komisji Etycznej (zezwolenia nr 109, 137).

Morfologiczną część badań wykonano na 25 szczurach podzielonych na 5 grup wiekowych: od 3 do 24 miesięcy, w półrocznych odstępach czasowych oraz na 4 szczurach w wieku 3 i 24 miesiące w części histochemicznej. Od wymienionych grup wiekowych pobierano kłębki szyjne oraz fragmenty tętnic szyjnych, które utrwalano w odpowiednich mieszaninach aldehydów użytych do perfuzji. Pobrany materiał poddawano następnie standardowej procedurze do mikroskopii elektronowej i oceniano według wcześniej przyjętych kryteriów.

Część neurofizjologiczną badań wykonano na 18 szczurach podzielonych na dwie skrajne podgrupy wiekowe: 3 miesiące (11 szczurów) i 24 miesiące (7 szczurów). W każdej z tych 2 podgrup znajdowało się 5 szczurów, które jednocześnie podlegały ocenie morfologicznej oraz kilka dodatkowych szczurów, co wynikało z konieczności powiększenia grup dla opracowań statystycznych. Oddychanie rejestrowano na podstawie zintegrowanej aktywności EMG przepony. Badano odpowiedź oddechową na 14% i 11% bodziec hipoksyjny. Parametry oddechowe wyznaczano z sygnału EMG przepony: maksymalna amplituda (A), jako indeks objętości oddechowej, częstotliwość (f) uzyskaną z wyliczenia  $60/T_{TOT}$  oraz wentylację minutową ( $V_E$ ) obliczono jako iloczyn wartości A i f ( $V_E = A \cdot f$ ). W trakcie badania odpowiedzi oddechowych na hipoksję rejestrowano frakcję dwutlenku węgla ( $P_{ET}CO_2$ ) w powietrzu wydychanym, ciśnienia parcjalnego tlenu ( $PaO_2$ ), dwutlenku węgla ( $PaCO_2$ ), poziomu pH oraz ciśnienie krwi (BP). Od skrajnych grup wiekowych pobierano także próbki krwi tętniczej w celu określenia poziomu cholesterolu całkowitego (CH) oraz frakcji HDL

przy użyciu zmodyfikowanej, enzymatycznej metody wg Trinder'a oraz ilościowej metody wytrąceniowej. Protokół badawczy części neurofizjologicznej polegał na zbadaniu odpowiedzi na 14% i 11% poikilokapniczną hipoksję typu „steady-state” z 20 minutową przerwą między kolejnymi testami. Testy prowadzono przez 2 minuty, co uwzględnia okres fazy hipoksyjnej depresji oddychania. Czułość odpowiedzi na hipoksję oceniano z nachylenia linii regresji liniowej opisującej zależność między  $V_E$  i  $f$  a siłą bodźca hipoksyjnego wg wzoru  $y=a(x-b)$ . We wzorze tym „a” oznacza wartość tangensa kąta nachylenia prostej do osi odciętych (tzw. „slope”), a „b” jest punktem przecięcia prostej osią rzędnych.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci średnich  $\pm$ SE i porównane statystycznie przy pomocy testu Mann-Whitney. Różnice między młodymi i starymi szczurami w poziomach CH, HDL,  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ,  $SaO_2$ ,  $P_{ET}CO_2$  określano przy użyciu niesparowanego testu Studenta lub testu Wilcoxon. Dla wszystkich metod statystycznych za poziom istotności uznałam  $P<0,05$ .

## **Wyniki i omówienie**

Część morfologiczna badań wykazała, iż kłębki szyjne ulegają rozległym zmianom degeneracyjnym z wiekiem. Wraz z postępującym wiekiem zmniejszała się ilość komórek chemoreceptorowych (o około 20%) a znacznemu rozrostowi ulegała otaczająca je torebka łącznotkankowa. W pozostałych komórkach zwiększała się liczba i stopień uszkodzenia mitochondriów, malała ilość ziarnistości neurosekrecyjnych oraz liczba zakończeń nerwowych. Zjawiska te były szczególnie mocno zaznaczone w grupie 18 i 24 miesięcznych szczurów. Kłębki szyjne są organem bardzo obficie unaczynionym. Przepływ krwi sześciokrotnie przewyższa przepływ mózgowy i wynosi 2000 ml/min/g tkanki. Wydaje się, więc oczywiste, że stan naczyń wnikaających do struktury kłębków szyjnych oraz rozwidlenia tętnic szyjnej wspólnej w okolicy,

w której umiejscowione są kłębki, będzie miał bezpośrednie przełożenie na ich funkcję i strukturę. W celu weryfikacji tych przypuszczeń, od części szczurów w każdym przedziale wiekowym, pobrałam fragmenty rozwidlenia tętnic szyjnych wspólnych oraz przeanalizowałam zmiany w budowie ścian naczyń kapilarnych kłębka szyjnego. Badania wykazały umiarkowane zmiany w budowie ścian naczyń krwionośnych, objawiające się brakiem ciągłości warstwy elastylowej i proliferacją tkanki łącznej oraz zmianą fenotypu komórek mięśni gładkich. Nie zaobserwowałam jednak zmian w warstwie komórek śródbłonkowych, agregacji i adhezji elementów morfotycznych krwi na powierzchni śródbłonków oraz tworzenia się komórek piankowatych czy złogów wapniowo-cholesterolowych. Nie zaobserwowałam także wzrostu stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji HDL we krwi starych szczurów.

Dodatkowo, zbadalam poziom ekspresji NOS w ścianach naczyniowych. Poziom ten był zwiększony w komórkach śródbłonkowych ( $52,0 \pm 2,6$  u młodych szczurów w porównaniu ze szczurami starymi  $89,0 \pm 9,3$ ), ale nie w komórkach mięśni gładkich naczyń starych szczurów. Przemawia to raczej za procesem kompensacyjnym wymuszonym przez sztywniejące ściany naczyń, co ma charakter fizjologicznego starzenia się, a nie za aktywnym procesem miażdżycopodobnym.

Poza istotną rolę, jaką NO odgrywa w układzie krwionośnym, może on również pełnić rolę neuroprzekaźnika w ośrodkowym układzie nerwowym. W związku z tym, że kłębki szyjne są pochodzenia nerwowego uważałam za istotne ocenić w komórkach chemoreceptorowych ekspresję NOS i jej możliwą relację do zmian chemoczułości kłębków wraz z wiekiem, tym bardziej, że brak jest podobnych danych w literaturze. U starych szczurów poziom NOS istotnie wzrósł w porównaniu z najmłodszymi szczurami ( $42,0 \pm 1,7$  u młodych i  $94,0 \pm 9,9$  u starych). Wiadomo, że poziom NOS rośnie w kłębkach szyjnych w warunkach chronicznej hipoksji, co byłoby zgodne

z przypuszczeniem, że rozrastająca się tkanka łączna w kłębkach szyjnych starych szczurów powoduje zaburzenia w dyfuzji gazów i substancji odżywczych do parenchymy kłębków, przyczyniając się tym samym do powstania warunków podobnych do tych, jakie mogłaby wywołać chroniczna hipoksja.

Wpływ zmian morfologicznych na czynność kłębków oceniano przy użyciu testu badającego odpowiedź oddechową na hipoksję, która jest generowana przez ten organ. Użycie dwóch poziomów bodźca hipoksyjnego, 11% i 14%, umożliwiło ocenę czułości kłębków szyjnych. Czułość ta była istotnie mniejsza u starych zwierząt ( $S = 0,11 \pm 1,9$ ) w porównaniu z najmłodszą grupą wiekową ( $S = 7,75 \pm 2,6$ ).

Zmiany morfologiczne miały więc odzwierciedlenie w stłumionej czynności kłębków. Moje badania wskazują, że u starych szczurów nie występują zmiany naczyniowe mogące powodować ograniczenia w dowozie krwi do parenchymy kłębków szyjnych. Wydaje się zatem, że zaobserwowane zmiany degeneracyjne w kłębkach szyjnych starych szczurów są skutkiem naturalnego procesu zużycia czy starzenia się narządu w zaawansowanym wieku, co powoduje osłabienie chemoczułości kłębków szyjnych oraz osłabienie odpowiedzi wentylacyjnej na bodziec hipoksyjny.

### **Podsumowanie i wnioski**

1. Kłębki szyjne pochodzące od starych szczurów charakteryzują się zmniejszoną o około 20% liczbą komórek chemoreceptorowych w porównaniu z grupą najmłodszych zwierząt. Pozostałe komórki chemoreceptorowe charakteryzują się ogniskowymi zmianami zwyrodnieniowymi o różnym stopniu nasilenia, do martwicy włącznie.
2. Zmiany zwyrodnieniowe dotyczą także innych elementów parenchymy starych kłębków szyjnych, w szczególności zakończeń nerwowych tworzących synapsy na komórkach chemoreceptorowych. Torebka łącznotkankowa otaczająca kłębki szyjne



ulega pogrubieniu z wiekiem. Proces dezintegracji parenchymy kłębków szyjnych nasila się stopniowo, poczynając od 12 miesiąca życia szczurów.

3. Badania potwierdziły, że u użytego do badań gatunku szczura nie obserwuje się tworzenia się typowych złożeń miażdżycowych w dużych naczyniach krwionośnych u szczurów starszym wieku. Warstwa komórek śródbłonkowych, będąca „markerem” świadczącym o stanie i czynności naczyń krwionośnych, zachowuje ciągłość mimo zaawansowanego wieku zwierząt.
4. Poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcja HDL nie zmienia się istotnie z wiekiem.
5. Ekspresja NOS w komórkach śródbłonkowych naczyń, oznaczona przy użyciu metody NADPH-diaforazy, zwiększa się z wiekiem. Wzrost ten może być efektem uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych mających na celu poprawę osłabionej reaktywności naczyniowych komórek mięśni gładkich na czynniki naczynio-rozkurczające, takie jak NO.
6. Zmiany w komórkach chemoreceptorowych mogą być przyczyną znamiennego osłabienia czułości kłębków szyjnych na bodźce chemiczne u starych zwierząt.
7. Słabszy wzrost wentylacji płucnej u starych szczurów w odpowiedzi na silny bodziec hipoksyjny może świadczyć o ujawnianiu się niedomogi regulacji oddychania w warunkach dużego obciążenia układu (metaboliczna konieczność do dużego, szybkiego wzrostu wentylacji). Brak typowo miażdżycowej przebudowy naczyń, która upośledzałyby dopływ krwi do kłębków szyjnych sugeruje, że zmiany morfologiczne, które rozwijają się w starych kłębkach są wynikiem naturalnego procesu starzenia się tkanki.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Acker H. Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir. Physiol.* 95: 1-10, 1993.
2. Ahmed M., Giesbrecht G.G., Serrette C., i wsp. Ventilatory response to hypoxia in elderly humans. *Respir. Physiol.* 83: 343-352, 1991.
3. Archer S. L., Huang J., Henry T., i wsp. A redox-based O<sub>2</sub> sensor in rat pulmonary vasculature. *Circ. Res.* 73: 1100-1112, 1993.
4. Azhar S., Cao L., Reaven E. Alteration of the adrenal antioxidant defence system during aging in rats. *J. Clin. Invest.* 95: 1414-1424, 1995.
5. Barrett-Connor E, Bush T. L. Estrogen and coronary heart disease. *J. Am. Med. Assoc.* 265: 1861-1867, 1991.
6. Barton M., Cosentino F., Brandes R., i wsp. Anatomic heterogeneity vascular ageing: Role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension.* 30: 817-824, 1997.
7. Bee D., Howard P. The carotid body: a review of its anatomy, physiology and clinical importance. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 48: 48-53, 1993.
8. Bereiter-Hahn J. Behaviour of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* 122: 1-63, 1990.
9. Bergamini E., Cavallini G., Donati A. i wsp. The anti-ageing effect of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed. Pharmacother.* 57: 203-208, 2003.
10. Besse S., Tanguy S., Boucher F., i wsp. Aortic vasoreactivity during prolonged hypoxia and hypoxia – reoxygenation in senescent rats. *Mech. Ageing Dev.* 123: 275-285, 2002.
11. Biscoe T. J. Carotid body structure and function. *Physiol. Rev.* 51: 437-495, 1971.

12. Biscoe T. J., Duchon M. R., Eisner D. A., i wsp. Measurements of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in dissociated type I cells of the rabbit carotid body. *J. Physiol. Lond.* 416: 421-434, 1989.
13. Buerk D. G., Lahiri S. Evidence that nitric oxide plays a role in  $\text{O}_2$  sensing from tissue NO and  $\text{PO}_2$  measurements in cat carotid body. *Adv. Exp. Biol.* 475: 337-347, 2000.
14. Buján J., Bellón J. M., Sabater C. Modifications induced by atherogenic diet in the capacity of the arterial wall in rats to respond to surgical insult. *Atherosclerosis* 122: 141-152, 1996.
15. Bureau M. A., Lamarche J., Foulon P., i wsp. The ventilatory response to hypoxia in the newborn lamb after carotid body denervation. *Respir. Physiol.* 60: 109-119, 1985.
16. Carpenter E., Bee D., Peers C. Ionic currents in carotid body type I cells isolated from normoxic and chronically hypoxic adult rats. *Brain Research.* 811: 79-87, 1998.
17. Cayatta A. J., Palacino J. L., Horten K., i wsp. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 14: 753-759, 1994.
18. Chandel N. S., McClintock D. S., Feliciano C. E., i wsp. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of  $\text{O}_2$  sensing. *J. Biol. Chem.* 275: 25130-25138, 2000a.
19. Chandel N. S., Schumacker P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old question, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88: 1880-1889, 2000b.
20. Chapman K. R., Cherniack N. S. Aging effects on the interaction of hypercapnia and hypoxia as ventilatory stimuli. *J. Gerontol.* 42: 202-209, 1987.

21. Chlopicki S. Zapalenia śródbrłnka w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 4: 77-88, 2005.
22. Chlopicki S., Gryglewski R. P. Farmakologia śródbrłnka. *Kardiol. Pol.* 57: 5-15, 2002.
23. Cinci G., Guerranti R., Pagani R., i wsp. Fatty acid composition of phospholipids, triglycerides and cholesterol in serum of castrated and estradiol treated rats. *Life Sciences.* 66: 1647-1654, 2000.
24. Clarke J. A., de Burgh D. M., Ead H. W., i wsp. A morphological study of the size of the vascular compartment of the carotid body in non-human primate (*Cercopithecus ethiopus*), and a comparison with cat and rat. *Acta. Anat.* 147: 240-247, 1993.
25. Connat J-L. Busseuil D., Gambert S., i wsp. Modification of the rat aortic wall during ageing: possible relation with decrease of peptidergic innervation. *Anat. Embryol.* 204: 455-468, 2001.
26. Constantinides P. The morphological basis for altered endothelial permeability in atherosclerosis. *Adv. in Exp. Medicine and Biology.* 82: 969-974, 1977.
27. Cross A., Henderson L., Jones O. T. G., i wsp. Involvement of NAD(P)H oxidase as a PO<sub>2</sub> sensor protein in the rat carotid body. *Biochem. J.* 272: 743-747, 1990.
28. De Meyer G. R. Y., Hoylaerts M. F., Kockx M. M., i wsp. Intimal Deposition of function von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2524-2534, 1999.
29. Delaney C. A., Green M. H. L., Lowe J. E. i wsp. Endogenous nitric oxide induced by interleukin 1 $\beta$  in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells caused significant DNA damage as measures by the comet assay. *FEBS Lett.* 333: 291-295, 1993.

30. Di Giulio C., Bianchi G., Cacchio M., i wsp. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 $\alpha$ , VEGF and NOS during ageing. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 147: 31-38, 2005.
31. Di Giulio C., Cacchio M., Bianchi G., i wsp. Selected contribution: carotid body as a model for aging studies: is there a link between oxygen and aging? *J. Appl. Physiol.* 95: 1755-1758, 2003.
32. Di Giulio C., Grill A., De Lutiis M. A., i wsp. Does chronic hypoxia increase rat carotid body nitric oxide? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 120: 243-247, 1998a.
33. Di Giulio C., Muzio M. D., Sabatino G., i wsp. Effect of chronic hyperoxia on young and old rat carotid body. *Exp. Gerontol.* 33: 319-329, 1998b.
34. Donnelly D. F., Doyle T. P. Free tissue catecholamines of rat carotid body, in vitro, during maturation and following chronic hypoxia. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 574, 1993.
35. Drobnik M., Latour T. Czynne działanie biologiczne średniozmineralizowanej wody wodorowęgłanowo-sodowej z ujęcia "Pitoniakówka" w Szczawnicy, przeznaczonej do uzdrowskiej kuracji pitnej. *Roczn. PZH.* 52: 41-47, 2001.
36. Ferreira A. E., Ponces Freire A. M., Voit E. O. A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem. J.* 376: 109-121, 2003
37. Feron O., Kelly R. A. The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ. Res.* 88: 129-131, 2001.
38. Fidone S. J., Gonzalez C., Dinger B. G., i wsp. Mechanisms of chemotransmission in the mammalian carotid body. *Prog. Brain Res.* 74: 169-179, 1988.

39. Fitzgerald R. S. Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis – a brief history and new evaluation. *Respir. Physiol.* 120: 89-104, 2000.
40. Forster H. V., Demsey J. A., Birnbaum M. L., i wsp. Effect of chronic exposure to hypoxia on ventilatory response to CO<sub>2</sub> and hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 31: 586-592, 1971.
41. Fukuda Y. Changes in ventilatory response to hypoxia in the rat during growth and aging. *Pflügers Arch.* 421: 200-203, 1992.
42. Fukushima M., Ohhashi T., Ohno S., i wsp. Effects of diets enriched in n-6 or n-3 fatty acids on cholesterol metabolism in older rats chronically fed a cholesterol-enriched diet. *Lipids* 36: 261-266, 2001.
43. Gauda E. B., Lawson E. E. Developmental influences on carotid body responses to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121: 199-208, 2000.
44. Goergopoulos D., Walker S., Anthonisen N. R. Increased chemoreceptor output and ventilatory response to sustained hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 67: 1157-1163, 1989.
45. Gonzalez C., Almarez L., Obeso A., Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from nature stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* 74: 829-898, 1994.
46. Gonzalez C., Almarez L., Obeso A., Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends. Neurosci.* 15: 146-153, 1992.
47. Gonzalez C., Sanz-Alfayate G., Agapito M. T., i wsp. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitive to physiological hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132: 17-41, 2002.
48. Gorlach A., Holtermann G., Jelkmann W., i wsp. Photometric characteristics of heme proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2). *Biochem. J.* 290: 771-776, 1993.

49. Guenard H., Marthan R. Pulmonary gas exchange in elderly subjects. *Eur. Respir. J.* 9: 2573-2577, 1996.
50. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Free radicals and antioxidant in the year, a historical look to the future. *Ann. New York Acad. Sci.* 899: 136-147, 1999.
51. Hansen J. T. Morphology of the carotid body chemoreceptor in aged primates. *W Chemoreceptor and Reflexes in Breathing.* Oxford University Press, New York. 31-36, 1989.
52. Harrison D. G. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20: 11-17, 1997.
53. Haton C. J., Peers C. Hypoxic inhibition of  $K^+$  currents in isolated rat type I carotid body cells: Evidence against the involvement of cyclic nucleotides. *Pflügers Arch.* 433: 129-135, 1996.
54. Hellstrom S., Koslow S. H. Biogenic amines in carotid body of adult and infant rats- a gas chromatographic-mass spectrometric assay. *Acta Physiol. Scand.* 93: 540-547, 1975.
55. Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino-nitrogen oxidation to nitrate. *Science.* 235: 473-476, 1987.
56. Hirshman C. A., McCullough, Weil J. V. Normal values for hypoxic and hypercapnic ventilatory drives in man. *J. Appl. Physiol.* 38: 1095-1098, 1975.
57. Hurst G., Heath D., Smith P. Histological changes associated with ageing of the human carotid body. *J. Pathol.* 147: 181-187, 1985.
58. Huszczuk A., Widdicombe J. G. Studies on central respiratory activity in artificially ventilated rabbits. *Acta Neurobiol. Exp.* 33: 391-400, 1973.
59. Ischiropoulos H., Al-Mehdi A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. *FEBS Lett.* 364: 279-282, 1995.

60. Iturriaga R. Nitric oxide and carotid body chemoreception. *Biol. Res.* 34: 135-139, 2001.
61. Izumizaki M., Pokorski M., Homma I. Role of the carotid bodies in chemosensory ventilatory responses in the anesthetized mouse. *J. Appl. Physiol.* 97: 1401-1407, 2004.
62. Kandel E. R., Hawkins R. D. Biologiczne podstawy uczenia się i osobowości. *Świat Nauki* 11: 53-62, 1992.
63. Kazemi S., Wenzel D., Kolossov E I wsp. Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis. *Cell Physiol. Biochem.* 12: 12-55, 2002.
64. Khan Q., Heath D., Smith O. Anatomical variations in human carotid bodies. *J. Clin. Pathol.* 41: 1196-1199, 1988.
65. Kietzmann T., Fandrey J., Acker H. Oxygen radicals as messengers in oxygen-dependent gene expression. *News Physiol. Sci.* 15: 202-208, 2000.
66. Klawe J. J., Tafil-Klawe M. „Age- related response of the genioglosses muzzle EMG-activity to hypoxia in humans. *J. Physiol. Pharmacol.* 54: 14-19, 2003.
67. Kronenberg R. S., Drage C. W. Attenuation of the ventilatory and heart rate responses to hypoxia and hypercapnia with aging in normal men. *J. Clin. Invest.* 52: 1812-1819, 1973.
68. Kummer W., Acker H. Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J. Appl. Physiol.* 78: 1904-1909, 1995.
69. Lahiri S., Delaney R. G. Stimulus interaction in the response of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir. Physiol.* 24: 249-266, 1975.
70. Lahiri S., Nishino T., Mokashi A., i wsp. Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to hypotension. *J. Appl. Physiol.* 48: 781-788, 1980.



71. Lahiri S., Osanai D. G., Buerk A., i wsp. Thapsigargin enhances carotid body chemosensory discharge in response to hypoxia in zero  $[Ca^{2+}]_i$ : evidence for intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Brain Res.* 709: 141-144, 1996.
72. Lahiri S., Rozanow C., Roy A., i wsp. Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 755-774, 2001.
73. Levitzky M. G. Effects of aging on the respiratory system. *Physiologist.* 27: 102-107, 1984.
74. Lévy B. I. Aging of the arterial system. *Press Med.* 21: 1200-1203, 1992
75. Loesch A., Burnstock G. Perivascular nerve fibres and endothelial cells of the rat basilar artery: immuno-gold labeling of antigenic sites for type I and II nitric oxide synthase. *J. Neurocytol.* 27: 197-204, 1998.
76. Loo B., Labugger R., Skepper J. N., i wsp. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 192: 1731-1743, 2000.
77. Lowe P., Heath D., Smith P. Relation between histological age-changes in the carotid body and atherosclerosis in the carotid arteries. *J. Laryngol. Otol.* 101: 1271-1275, 1987.
78. Lüscher T. F., Barton M. Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol.* 20: II3-II10, 1997.
79. Malek A. M., Alper S. L., Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in the atherosclerosis. *JAMA.* 282: 2035-2042, 1999.
80. Marczak M., Kolesnikova E., Pokorski M. Hypoxic ventilatory profile in the anesthetized rat. *J. Physiol. Pharmacol.* 55: 89-94, 2004.
81. Marczak M., Pokorski M. Oxygen breathing and ventilation. *J. Physiol. Pharmacol.* 55: 127-134, 2002.

82. Marletta M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 12231-12234, 1993.
83. Mazzeo S. R. Pattern of sympathoadrenal activity at altitude. In *Hypoxia and Molecular Medicine*. Queen City Press, Burlington V. T. 53-61, 1993.
84. McDonald D. M. Peripheral chemoreceptors. In: Hornbein T. F. (Ed), *Regulation of Breathing*, Part I. MerceL Dekker Inc., New Your. 105-319, 1981.
85. McDonald D. M. Structure-function relationships of chemoreceptive nerves in the carotid body. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 193-207, 1977.
86. McDonald D. M., Mitchell R. W. The innervation of glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* 4: 177-230, 1975.
87. Meijer A. J., Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2445-2462, 2004.
88. Minor R. L., Mayers P. R., Guerra R., i wsp. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 86: 2109-2116, 1990.
89. Mitchell G. S., Smith C. A., Demsey J. A. Changes in the VI-VCO<sub>2</sub> relationship during exercise in goats: role of carotid bodies. *J. Appl. Physiol.* 57: 1894-1900, 1984.
90. Mittman C., Edelman N. H., Norris A., i wsp. Relationship between chest wall and pulmonary compliance and age. *J. Appl. Physiol.* 20: 1211-1216, 1965.
91. Miyauchi T., Sugishita Y., Matsuda M., i wsp. Increased plasma concentration of endothelin-1 in cholesterol-fed rats. *Atherosclerosis* 93: 257-259, 1992.

92. Moczar M., Ouzilou J., Courtois Y., i wsp. Age dependence of the biosynthesis of intracellular matrix macromolecules of rabbit aorta in organ culture and cell culture. *Gerontology* 22: 461-472, 1976.
93. Monteiro R. J., Urena J., Fernandezchacon R., i wsp. Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J. Gen. Physiol.* 107: 133-143, 1996.
94. Mosqueira M., Iturriaga R. Carotid body chemosensory excitation induced by nitric oxide: involvement of oxidative metabolism. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 131: 175-187, 2002.
95. Mulligan E., Lahiri S. Separation of carotid body chemoreceptor responses to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by oligomycin and by antimycin A. *Am. J. Physiol.* 242: 200-206, 1982
96. Nickering G., Harrison D. G. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105: 393-396, 2002.
97. Nouhouayi Y., Negulesco I., Coujard R., i wsp. Dependence of carotid body structure on age in male rats. *Z. Mikrosk. Anal. Forch.* 95: 292-303, 1981.
98. Nurse C. A., Zhang M. Acetylcholine contributes to hypoxic chemotransmission in co-cultures of rat type I cells and petrosal neurons. *Respir. Physiol.* 115: 189-199, 1999.
99. Obeso A., Gomez-Niño A., Gonzalez C., i wsp. Inhibition of NADPH oxidase does and not interfere with low PO<sub>2</sub> transduction in chemoreceptor cells. *Am. J. Physiol.* 276: 593-601, 1999.
100. Paky A., Michael J. R., Burke-Wolin T. M., i wsp. Endogenous production of superoxide by rabbit lungs: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J. Appl. Physiol.* 74: 2868-2874, 1993.

101. Perez-Garcia M. T., Obeso T. A., Lopez-Lopez J. R., i wsp. Characterization of chemoreceptor cell in primary culture isolated from adult rabbit carotid body. *Am. J. Physiol.* 32: 1152-1159, 1992.
102. Peterson D. D., Pack A. I., Silage D. A., i wsp. Effects of aging on ventilatory and occlusion pressure responses to hypoxia and hypercapnia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124: 387-391, 1981.
103. Pokorski M., Marczak M. Ventilatory response to hypoxia in elderly women. *Ann. Hum. Biol.* 30: 53-64, 2003.
104. Pokorski M., Walski M., Dymecka A., i wsp. The aging carotid body. *J. Physiol. Pharmacol.* 55: 107-113, 2004.
105. Ponte J., Sadler C. L. Studies on the regenerated carotid sinus nerves of the rabbit. *J. Physiol. Lond.* 410: 411-424, 1989.
106. Poulin M. J., Cunningham D. A., Paterson D. H., i wsp. Ventilatory sensitivity to CO<sub>2</sub> in hyperoxia and hypoxia in older aged humans. *Am. Physiol. Soc.* 2209-2216, 1993.
107. Powell F. L., Milsom W. K., Mitchell G. S. Time domain of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112: 123-134, 1998.
108. Pozzan T., Rizzuto R. High tide of calcium in mitochondria. *Nature Cell Biol.* 2: 25-27, 2000.
109. Prabhakar N. R. NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. *Respir. Physiol.* 115: 161-168, 1999.
110. Prabhakar N. R., Kumar G. K., Chang C. H., i wsp. Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. *Brain Res.* 625: 16-22, 1993.
111. Prabhakar N. R., Overholt J. L. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Respir. Physiol.* 122: 209-221, 2000.

112. Quyyumi A. A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 105: 32-39, 1998.
113. Ramadan A., Dymecka A., Awedan A. Free radicals and carotid body function. *Current Pneumology* 4: 65-69, 2000.
114. Ren Y-J., Xu X-H., Zhong Ch-B., i wsp. Hypercholesterolemia alters vascular functions and gene expression of potassium channels in rat aortic muscle cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* 22: 274-278, 2001.
115. Richter D. W., Schmidt-Garcon P., Pierrefiche O., i wsp. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic response in anaesthetized cats. *J. Physiol. (Lond)* 514: 567-578, 1999.
116. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 9: 926-933, 1995.
117. Robert L. Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor. *Atherosclerosis* 123: 169-179, 1996.
118. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature (Lond.)* 362: 801-809, 1993.
119. Sachais B. S. Interakcja między płytkami krwi a śródbłonkiem w miażdżycy. *Kardiologia po Dyplomie* 1: 34-40, 2002.
120. Schlenker E. H., Goldman M. Ventilatory response of aged male and female rats to hypercapnia and to hypoxia. *Gerontology* 31: 301-308, 1985.
121. Schoonen W. G. E. J., Wanamarta A. H., van der Klei-van Moorsel J. M., i wsp. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 265: 11118-11124, 1990.
122. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 23-37, 1999.

123. Sitzer M., Puac D., Buehler A., i wsp. Internal carotid artery angle of origin: a novel risk factor for early carotid atherosclerosis. *Stroke* 34: 950-955, 2003.
124. Slowing K., Ganado P., Sanz M., i wsp. Study of garlic extracts and fraction on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. *J. Nutr.* 131: 994S-999S, 2001.
125. Smith W. D. F., Cunningham D. A., Paterson P. A., i wsp. Acute isocapnic hypoxia in active elderly men. *Ageing* 21: 1, 1992.
126. Snyder S. H., Brend D. S. Biologiczna rola tlenku azotu. *Świat Nauki* 7: 42-50, 1992.
127. Socha K. Some aspects of endothelial cell physiology and pathology. *Postępy Biologii Komórki* 23: 683-704, 1996.
128. Torbati D., Sherpa A. K., Lahiri S., i wsp. Hyperbaric oxygenation alters carotid body ultrastructure and function. *Respir. Physiol.* 92: 183-196, 1993.
129. Traub O., Berk B. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cell transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 677-685, 1998.
130. Trinder P. Quantitative determination of glucose using the GOP-PAP method. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24-27, 1969.
131. Tschundi M. R., Barton M., Bersinger N. A., i wsp. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J. Clin. Invest* 98: 899-905, 1996.
132. Tsutsumi K., Hagi A., Inoue Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesterol ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 579-581, 2001.

133. Valdés V., Mosqueira M., Rey S., i wsp. Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution on neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L57-L68, 2003.
134. Verma S., Buchanan M. R., Anderson T. J. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 108: 2054-2059, 2003.
135. Verna A., Schamel A., Pequignot J. M. Noradrenergic glomus cells in the carotid body: an autoradiographic and immunocytochemical study in the rabbit and rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* 337: 93-100, 1993.
136. Walski M., Celary-Walska R., Borowicz J. Studies on the hypothalamus and secretory nuclei of rat in the remote period following clinical death. *J. Hirnf.* 32: 687-698, 1991.
137. Wever R. M. F., Lüscher T. F., Cosentino F., i wsp. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 97: 108-112, 1998.
138. Whitelaw W. A., Derenie J. P., Milic-Emili J. Occlusion pressure as a measure of respiratory center output in conscious man. *Respir. Physiol.* 23, 181-199, 1975.
139. Wickens A. P. Ageing and the free radical theory. *Respi. Physiol.* 128: 379-391, 2001.
140. Witzendichler B., Asahara T., Murohara T., i wsp. Vascular endothelial growth factor-c (VEGF-C/ VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am. J. Pathol.* 153: 381-394, 1998.
141. Wójcik C., Gołąb J. From dynamite to viagra- 1998 Nobel prize in medicine and physiology. *Postępy Biologii Komórki* 26: 219-229, 1999.
142. Xu J., Xu F., Tse F. W., i wsp. ATP inhibits the hypoxia response in the type I cells of rat carotid bodies. *J. Neurochem.* 92: 1419-1430, 2005.

143. Yoshida T., Kiuchi K., Nejima J., i wsp. Expression of endothelin-1 after endothelial denudation of thoracic aortes in experimental hypercholesterolemic rats. *J. Nippon. Med. Sch.* 67: 342-351, 2000.
144. Zarins C. K., Giddens D. P., Bharadvaj B. K. i wsp. Quantitative Correlation of Plaque Localization with Flow Velocity Profiles and Wall Shear Stress. *Circ. Res.* 53: 502-514, 1983.
145. Zdzińska B., Kandefer-Szerszeń M. Rola tlenku azotu w prawidłowych i patologicznych reakcjach odpornościowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 52: 621-636, 1998.
146. Zeiher A. M., Drexler H., Saubier B., i wsp. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. *J. Clin. Invest.* 92: 652-662, 1993.