

lek. Michał Proczka

**Wpływ wazopresyny i receptora V1a na odpowiedź krążeniową
i oddechową u szczurów normo- i hipertensyjnych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

Słowa kluczowe w języku polskim

wazopresyna (AVP), hormon antydiuretyczny, odruch z chemoreceptorów tętniczych, receptor dla wazopresyny V1a, nadciśnienie tętnicze, regulacja oddychania, SHR

Słowa kluczowe w języku angielskim

Vasopressin (AVP), antidiuretic hormone, peripheral chemoreflex, vasopressin V1a receptor, arterial hypertension, respiratory regulation, SHR

Nazwa i numer projektu badawczego

Badania do pracy doktorskiej wykonano w ramach realizacji Diamentowego Grantu (grant numer: DI2018 020648) przyznanego w ramach VIII edycji konkursu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Część uzyskanych wyników prezentowana była podczas konferencji naukowych:

- Experimental Biology 2021; Intravenous vasopressin leads to greater haemodynamic and respiratory responses in spontaneously hypertensive SHR rats than in normotensive controls; FASEB J. 2021;35:S1
- XXVIII Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego; Vasopressin and V1a receptors in hemodynamic and respiratory regulation in normotensive and hypertensive rats. J Physiol Pharmacol. 2021;72 Sup.1:72.
- XXV Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego; Wpływ systemowego i lokalnego podania wazopresyny na parametry krążeniowo- oddechowe u szczurów normo- i hipertensyjnych; Folia Med Cracov. 2021,61(4) Sup.1:21.
- Experimental Biology 2022; Systemic and local administration of vasopressin differently affect hemodynamic and respiratory parameters in normotensive and hypertensive rats. FASEB J. 2022;36:S1

Rozważenia teoretyczne dotyczące udziału wazopresyny w regulacji układu oddechowego zostały opublikowane w pracy poglądowej (Aneks, str. 136):

- Proczka M, Przybylski J, Cudnoch-Jędrzejewska A, Szczepańska-Sadowska E, Żera T. Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone. Front Physiol. 2021;12:744177.

*Dziękuję Promotorowi mojej pracy
Panu dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteuszowi Żera
za zaangażowanie, cenne uwagi i cierpliwość
w trakcie przygotowania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również mojej Rodzinie, a w szczególności mojej Żonie,
za ogromne wsparcie, motywację i zrozumienie.*

Spis treści

Spis tabel	8
Spis rycin	9
Wykaz skrótów	10
Streszczenie w języku polskim	12
Streszczenie w języku angielskim	17
1. Wstęp	22
1.1. Wprowadzenie.....	22
1.2. Wazopresyna i układ wazopresynergiczny	23
1.2.1. Synteza wazopresyny.....	23
1.2.2. Regulacja wydzielania wazopresyny	24
1.2.3. Wazopresyna jako neuroprzekaźnik	25
1.2.4. Receptory dla wazopresyny	26
1.2.5. Udział wazopresyny w regulacji układu krążenia	26
1.2.6. Udział wazopresyny w regulacji układu oddechowego.....	29
1.3. Wydzielanie wazopresyny w stanach chorobowych.....	31
1.4. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych	32
1.4.1. Chemoreceptory tętniczne	32
1.4.1.1. Budowa histologiczna i neuroprzekaźniki.....	33
1.4.1.2. Bodźce	34
1.4.2. Organizacja odruchu z chemoreceptorów tętnicznych:	35
1.4.3. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych.....	36
1.4.3.1. Składowa krążeniowo-oddechowa	36
1.4.3.2. Inne składowe odpowiedzi	37
1.5. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych w stanach chorobowych	38
1.6. Nadciśnienie tętniczne.....	39
1.6.1. Nadciśnienie tętniczne – epidemiologia	39
1.6.2. Nadciśnienie tętniczne – etiopatogeneza	39
1.6.3. Udział układu wazopresynergicznego w patofizjologii nadciśnienia tętniczego	41
1.6.4. Udział chemoreceptorów tętnicznych w patofizjologii nadciśnienia tętniczego	42
1.6.5. Związek regulacji układu oddechowego z patofizjologią nadciśnienia tętniczego	44

1.7.	Pierwotne nadciśnienie tętnicze w doświadczalnym modelu zwierzęcym – szczury Spontaneously Hypertensive.....	45
2.	Założenia i cel pracy.....	46
2.1.	Założenia pracy	46
2.2.	Cele pracy.....	46
3.	Material i metody	47
3.1.	Zwierzęta.....	48
3.2.	Warunki utrzymania zwierząt	48
3.3.	Opieka okołozabiegowa i znieczulenie	48
3.4.	Część I badania – pomiary ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej u zwierząt czuwających	49
3.5.	Część II badania – pomiary parametrów krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych.....	49
3.5.1.	Procedury chirurgiczne	50
3.5.1.1.	Cewniki naczyniowe.....	50
3.5.1.2.	Sonda dopplerowska.....	51
3.5.1.3.	Elektrody EKG	51
3.5.1.4.	Rurka tchawicza	51
3.5.1.5.	Cewniki do podań miejscowych w okolicy kłębka szyjnego	52
3.5.1.6.	Odnierwienie kłębków szyjnych.....	53
3.5.1.7.	Uśmiercenie zwierząt	53
3.5.2.	Pomiary hemodynamiczne i oddechowe	54
3.5.3.	Serie doświadczeń pomiarów krążeniowo-oddechowych	56
3.5.3.1.	Seria 1 – ocena odruchu z chemoreceptorów tętniczych.....	56
3.5.3.2.	Seria 2 - ocena odruchu z chemoreceptorów tętniczych po odnerwieniu kłębków szyjnych	57
3.5.3.3.	Seria 3 - dożylnie podanie wazopresyny	58
3.5.3.4.	Seria 4 - dożylnie podanie wazopresyny po odnerwieniu kłębków szyjnych	59
3.5.3.5.	Seria 5 - dożylnie podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a.....	59
3.5.3.6.	Seria 6 - dotętnicze podanie wazopresyny przed i po podaniu antagonisty receptora V1a	60
3.5.4.	Związki stosowane w pomiarach krążeniowo-oddechowych w części II	61
3.6.	Część III badania - ocena występowania receptora V1a dla wazopresyny w kłębkach szyjnych z wykorzystaniem immunobarwien i obrazowania w mikroskopii konfokalnej.....	62

3.6.1.	Pobranie i przygotowanie tkanek do immunobarwienia.....	62
3.6.2.	Barwienia immunofluorescencyjne	63
3.6.3.	Obrazowanie w mikroskopii konfokalnej.....	64
3.7.	Metody statystyczne.....	64
4.	Wyniki	66
4.1.	Część I badania – pomiary ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej u zwierząt czuwających	66
4.2.	Część II badania – pomiary parametrów krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych.....	66
4.2.1.	Wyjściowe parametry krążeniowo-oddechowe dla poddanych pomiarom zwierząt znieczulonych uretanem z protokołów (serii) 1-6.....	66
4.2.2.	Odruch z chemoreceptorów tętnicznych.....	67
4.2.3.	Wpływ obustronnego odnerwienia kłębków szyjnych na odruch z chemoreceptorów tętnicznych.....	70
4.2.4.	Dożylne podanie wazopresyny	72
4.2.5.	Dożylne podanie wazopresyny po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych	72
4.2.6.	Podanie antagonisty receptora V1a.....	74
4.2.7.	Dożylne podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a	74
4.2.8.	Dotętnicze podanie wazopresyny	76
4.2.9.	Dotętnicze podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a.....	76
4.3.	Część III badania- obrazowanie w mikroskopii konfokalnej (ekspresja receptora V1a).....	78
5.	Dyskusja	80
5.1.	Szczury hipertensyjne jako doświadczalny model pierwotnego nadciśnienia tętniczego	81
5.2.	Odruch z chemoreceptorów tętnicznych	82
5.3.	Układ wazopresynergiczny	87
5.4.	Ograniczenia pracy.....	94
5.5.	Podsumowanie	95
5.6.	Wnioski	96
6.	Piśmiennictwo	98
7.	Zgoda Komisji Etycznej.....	134
8.	Aneks – praca pogładowa	136

Spis tabel

Tabela 1. Ciśnienie tętnicze u czuwających szczurów SHR i WKY	66
Tabela 2. Parametry spoczynkowe krążeniowo-oddechowe u znieczulonych szczurów SHR i WKY	67

Spis rycin

Rycina 1. Udział wazopresyny w regulacji układu oddechowego	30
Rycina 2. Najważniejsze bodźce oraz składowe odpowiedzi krążeniowo-oddechowej odruchu z chemoreceptorów tętnicznych wraz z postulowanym wpływem wazopresyny na odruch.....	37
Rycina 3. Przykładowe zdjęcie cewnika naczyniowego wszczepionego do tętnicy szyjnej zewnętrznej, który służy do podań miejscowych w okolicę kłębka szyjnego.....	53
Rycina 4. Układ pomiarowy dla podań dożylnych AVP	55
Rycina 5. Układ pomiarowy do podań AVP w okolicę kłębka szyjnego	56
Rycina 6. Schemat pomiarów w serii 1	57
Rycina 7. Schemat pomiarów w serii 2	58
Rycina 8. Schemat pomiarów w serii 3	58
Rycina 9. Schemat pomiarów w serii 4	59
Rycina 10. Schemat pomiarów w serii 5	60
Rycina 11. Schemat pomiarów w serii 6	60
Rycina 12. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych	68
Rycina 13. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych w odpowiedzi na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych oraz 1 minutę po wystąpieniu odruchu	69
Rycina 14. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych i farmakologicznym wywołaniu odruchu.....	71
Rycina 15. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu AVP po pozorowanym odnerwieniu oraz po dożylnym podaniu AVP po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych.....	73
Rycina 16. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu antagonisty receptora V1a oraz podaniu dożylnym AVP po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a.....	75
Rycina 17. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dotętnicznym podaniu wazopresyny, dożylnym podaniu antagonisty receptora V1a oraz po podaniu dotętnicznym wazopresyny po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a.....	77
Rycina 18. Immunobarwienie skrawków kłębka szyjnego szczura SHR.....	78
Rycina 19. Immunobarwienie skrawków kłębka szyjnego szczura WKY	79

Wykaz skrótów

AP- pole najdalsze (*area postrema*)

ASIC3- kanał jonowy wrażliwy na kwasy typu 3 (*acid-sensing ion channel 3*)

AVP- wazopresyna (*arginine vasopressin*)

CBX- odnerwienie kłębka szyjnego

CO – tlenek węgla

CO₂- dwutlenek węgla

DBH- beta hydroksylaza dopaminowa (*dopamine beta hydroxylase*)

DBP- rozkurczowe ciśnienie tętnicze (*diastolic blood pressure*)

DMN- jądro grzbietowe nerwu błędnego (*dorsal motor nucleus*)

ESC- Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (*European Society for Cardiology*)

ESH- Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (*European Society of Hypertension*)

ETCO₂- końcowo wydechowe stężenie dwutlenku węgla (*end tidal CO₂*)

FABF- przepływ przez tętnicę udową (*femoral artery blood flow*)

H₂S - siarkowodór

HR- częstość serca (*heart rate*)

IML- istota pośrednio boczna (*intermediolateral nucleus*)

MABP- średnie ciśnienie tętnicze (*mean arterial blood pressure*)

MV- wentylacja minutowa (*minute ventilation*)

NO- tlenek azotu (*nitric oxide*)

NS- nieistotne statystycznie (*non significant*)

NT- nadciśnienie tętnicze

NTS- jądro pasma samotnego (*nucleus tractus solitarius*)

O₂- tlen

OVLТ- narząd naczyniowy blaszki krańcowej (*organum vasculosum of the lamina terminalis*)

PVN- jądro przykomorowe (*paraventricular nucleus*)

RR- częstotliwość oddechów (*respiratory rate*)

RTN- jądro czworoboczne (*retrotrapezoid nucleus*)

RVLM- dogłowy brzuszo-boczny obszar rdzenia przedłużonego (*rostral ventrolateral medulla*)

SBP- skurczowe ciśnienie tętnicze (*systolic blood pressure*)

SCN- jądro nadskrzyżowaniowe (*suprachiasmatic nucleus*)

SFO- narząd nadsklepieniowy (*subfornical organ*)

SHR- szczur z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (*Spontaneously Hypertensive Rat*)

SON- jądro nadwzrokowe (*supraoptic nucleus*)

TH- hydroksylaza tyrozynowa (*tyrosine hydroxylase*),

VRC- brzuszna kolumna oddechowa (*ventral lateral column*)

WKY – szczur Wistar-Kyoto

Streszczenie w języku polskim

Tytuł: Wpływ wazopresyny i receptora V1a na odpowiedź krążeniową i oddechową u szczurów normo- i hipertensyjnych.

Wstęp: Wazopresyna (AVP), określana również jako hormon antydiuretyczny, poza swoim działaniem nerkowym związanym z utrzymaniem równowagi wodno-elektrolitowej, jest ważnym neurohormonem zaangażowanym w adaptację do zaburzeń homeostazy organizmu. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych jest kluczowym odruchem biorącym udział w odpowiedzi krążeniowej i oddechowej na hipoksję. Najważniejsza grupa chemoreceptorów tętnicznych znajduje się w kłębkach szyjnych umiejscowionych w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej. Nadciśnienie tętnicze (NT) jest jednym z głównych czynników ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Ma ono najczęściej postać nadciśnienia pierwotnego o wieloczynnikowym i nie w pełni poznanym podłożu. W nadciśnieniu tętniczym wykazano obecność nasilonego odruchu z chemoreceptorów tętnicznych, a także zmiany w regulacji układu wazopresynergicznego. Powszechnie stosowanym w badaniach przedklinicznych modelem zwierzęcym nadciśnienia tętniczego pierwotnego są szczury SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) z genetycznie uwarunkowanym NT, dla których najczęściej stosowaną kontrolą są normotensyjne szczury WKY (*Wistar-Kyoto*).

Cele: Badanie miało na celu ocenę, jaki jest udział AVP, jej receptora typu 1a (V1a) oraz kłębków szyjnych w regulacji krążeniowo-oddechowej w warunkach nadciśnienia tętniczego pierwotnego. Do szczegółowych celów pracy należała odpowiedzenie na następujące pytania badawcze: (1) Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych są nasilone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY? (2) Czy kłębki szyjne i toniczna aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych biorą udział w utrzymaniu spoczynkowych wartości parametrów krążeniowych i oddechowych u szczurów SHR i szczurów WKY? (3) Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na obwodowo podaną AVP różnią się pomiędzy hipertensyjnymi szczurami SHR a normotensyjnymi szczurami WKY? (4) Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na AVP podaną w okolicę kłębków szyjnych różnią się pomiędzy hipertensyjnymi szczurami SHR a normotensyjnymi szczurami WKY? (5) Czy kłębki szyjne biorą udział w odpowiedziach krążeniowej i oddechowej na obwodowo podaną AVP u szczurów SHR i szczurów WKY? (6) Czy receptor V1a dla AVP

bierze udział w utrzymaniu spoczynkowych wartości parametrów krążeniowych i oddechowych u szczurów SHR i szczurów WKY? (7) Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na podanie AVP obwodowe i miejscowe w okolicę kłębka szyjnego zależą od receptora V1a u szczurów SHR i szczurów WKY? (8) Czy receptory V1a dla AVP występują na komórkach chemowrażliwych (typu I) kłębków szyjnych u szczurów SHR i szczurów WKY?

Material i metody: Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z przepisami krajowymi oraz Dyrektywą Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, po uzyskaniu zgody wydanej przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie [nr zgody WAW2/096/2019]. Badanie przeprowadzono na dorosłych samcach hipertensyjnych szczurów SHR i kontrolnych normotensyjnych szczurów WKY, w wieku 12- 14 tygodni. W doświadczeniach użyto: n = 36 szczurów SHR i n = 36 szczurów WKY. W pierwszej części doświadczeń wykonano pomiar ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej metodą nieinwazyjną u czuwających zwierząt. W drugiej części doświadczeń wykonano pomiary zmiennych krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych uretanem, w ramach których rejestrowano parametry hemodynamiczne (średnie ciśnienie tętnicze - MABP, częstość serca - HR, przepływ przez tętnicę udową - FABF) i oddechowe (wentylacja minutowa - MV, częstotliwość oddechów - RR oraz końcowo-wydechowe stężenie dwutlenku węgla - ETCO₂). W celu przeprowadzenia pomiarów, szczurom wszczepiano cewniki do tętnicy i żyły udowej, które służyły odpowiednio do pomiarów hemodynamicznych i podań dożylnych. Zakładano także sondę dopplerowską na tętnicę udową celem oceny przepływu obwodowego. Następnie wykonywano tracheostomię z założeniem rurki tchawiczej oraz dołączeniem do niej sondy kapnografu w celu rejestracji pomiarów oddechowych. U części zwierząt wykonywano implantację cewnika do tętnicy szyjnej zewnętrznej, który umożliwiał miejscowe podawanie AVP w okolicę kłębka szyjnego. U wybranych szczurów wykonywano także obustronne odnerwienie kłębka szyjnego lub zabieg pozorowany. Zwierzęta podzielono na następujące 6 serii doświadczalnych: (1) wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych poprzez dożylne podanie cyjanku potasu (KCN) (30 µg/100 µL); (2) wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych poprzez dożylne podanie KCN (30 µg/100 µL) po odnerwieniu kłębków szyjnych; (3) dożylne podanie AVP (10 ng/100 µL) po pozorowanym odnerwieniu kłębków szyjnych; (4) podanie dożylne AVP (10 ng/100 µL) po odnerwieniu kłębków

szyjnych; (5) dożylne podanie selektywnego antagonisty receptora V1a (d(CH₂)₅₁,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (5 µg/100 µL) i podanie dożylne AVP (10 ng/100 µL); (6) podanie dotętnicze w okolicę kłębka szyjnego AVP (4 ng/50 µL), przed i po dożylnym podaniu selektywnego antagonisty receptora V1a (d(CH₂)₅₁,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (5 µg/100 µL). Po przeprowadzeniu pomiarów krążeniowo-oddechowych zwierzęta poddano eutanazji. Od szczurów pobrano rozwidlenia tętnic szyjnych z kłębkami szyjnymi i oceniono ekspresję receptora V1a w komórkach chemoreceptorowych z wykorzystaniem barwień immunofluorescencyjnych z użyciem pierwszorzędowych przeciwciał przeciw receptorowi V1a i przeciwciał przeciw hydroksylazie tyrozynowej (markerowi komórek chemoreceptorowych typu I). Preparaty obrazowano następnie w mikroskopii konfokalnej.

Wyniki: Szczury hipertensyjne SHR miały istotnie wyższe spoczynkowe wartości skurczowego, rozkurczowego i średniego ciśnienia tętniczego. Także u znieczulonych zwierząt wartości średniego ciśnienia tętniczego i wentylacji minutowej były istotnie wyższe niż u normotensyjnych szczurów WKY. Odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych były także istotnie większe u zwierząt hipertensyjnych niż u normotensyjnej kontroli. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych nie spowodowało istotnej zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych u szczurów SHR i szczurów WKY, a także u obu grup wiązało się ono z zahamowaniem odpowiedzi na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. Odpowiedź presyjna na podanie dożylne AVP wystąpiła w obu grupach, była jednak istotnie wyższa u szczurów SHR. Tylko u szczurów hipertensyjnych w odpowiedzi na podaną AVP wystąpiło zmniejszenie wentylacji płuc. Dożylne podanie antagonisty receptora V1a obniżyło ciśnienie tętnicze w obu grupach, a spadek ten był istotnie bardziej zaznaczony u szczurów hipertensyjnych. Zablokowanie receptora V1a prowadziło też do zwiększenia wentylacji płuc, który obserwowane było jedynie u zwierząt z NT. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych zmniejszyło odpowiedź presyjną na AVP u normotensyjnych szczurów WKY, lecz nie miało istotnego wpływu na zależny od AVP wzrost ciśnienia u szczurów SHR. Natomiast u szczurów hipertensyjnych SHR odnerwienie kłębków szyjnych znosiło zahamowanie wentylacji płuc w odpowiedzi na podanie AVP, które było obserwowane u zwierząt bez odnerwienia. Podanie AVP w okolicę kłębka szyjnego powodowało niewielki wzrost ciśnienia tętniczego podobny w obu grupach, jednak prowadziło do istotnego zmniejszenia wentylacji płuc jedynie u szczurów SHR. Zablokowanie receptora V1a znosiło odpowiedzi

krążeniową i oddechową zarówno na dożylnie jak i dotętnicze podanie AVP. Barwienia immunofluorescencyjne potwierdziły obecność receptora V1a dla wazopresyny na komórkach chemowrażliwych (typu I) kłębków szyjnych zarówno u szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych WKY.

Wnioski:

1. Składowa krążeniowa i oddechowa odruchu z chemoreceptorów tętnicznych są wzmożone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, co potwierdza zwiększoną czułość tego odruchu w warunkach nadciśnienia tętniczego.
2. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych nie wykazuje tonicznej spoczynkowej aktywności u hipertensyjnych szczurów SHR i normotensyjnych szczurów WKY w badanym układzie doświadczalnym w warunkach znieczulenia ogólnego.
3. Odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na dożylnie podanie AVP są nasilone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, co wskazuje na zwiększoną aktywność układu wazopresynergicznego w regulacji krążeniowo-oddechowej w warunkach nadciśnienia tętniczego.
4. Odpowiedź presyjna na miejscowo podaną AVP w okolicę kłębka szyjnego jest podobna zarówno u szczurów hipertensyjnych SHR jak i normotensyjnych szczurów WKY, co wskazuje na brak nasilenia mechanizmów presyjnych zależnych od AVP na poziomie kłębków szyjnych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
5. Odpowiedź oddechowa na miejscowo podaną AVP w okolicę kłębka szyjnego jest obecna jedynie u szczurów hipertensyjnych SHR, co wskazuje na udział AVP w regulacji składowej oddechowej zależnej od kłębków szyjnych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
6. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych hamuje odpowiedź presyjną na dożylnie podaną AVP jedynie u szczurów normotensyjnych WKY, co wskazuje na udział kłębków szyjnych w regulacji układu krążenia przez AVP w warunkach normotensji i silnie wyrażone mechanizmy presyjne niezależne od kłębków szyjnych u zwierząt hipertensyjnych.
7. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych zapobiega wywoływanemu przez dożylnie podaną AVP zahamowaniu wentylacji płuc u szczurów hipertensyjnych SHR,

co wskazuje na udział kłębków szyjnych w regulacji składowej oddechowej odpowiedzi na AVP w warunkach nadciśnienia tętniczego.

8. Odpowiedzi krążeniowo-oddechowe na zablokowanie receptora V1a są obecne jedynie u hipertensyjnych szczurów SHR, co wskazuje na udział tego receptora i AVP w utrzymywaniu spoczynkowych wartości parametrów hemodynamicznych i oddechowych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
9. Odpowiedzi krążeniowo-oddechowe na AVP zależą od receptora V1a, gdyż jego zablokowanie zapobiegało zmianom wywołanym przez dożylny (systemowy) i dotętniczy (miejscowy) podanie AVP.
10. Receptor V1a znajduje się na komórkach chemowrażliwych (typu I) w kłębkach szyjnych normotensyjnych szczurów WKY i hipertensyjnych szczurów SHR, co wskazuje na możliwość oddziaływania AVP na chemoreceptory tętnicze.

Podsumowanie: Wyniki przedstawionych doświadczeń dostarczają nowej wiedzy dotyczącej odruchu z chemoreceptorów tętniczych, w szczególności zlokalizowanych w kłębkach szyjnych oraz udziału wazopresyny w regulacji krążeniowo-oddechowej w nadciśnieniu tętniczym pierwotnym. Obserwowane zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych pod wpływem dożylnego oraz miejscowego podania wazopresyny sugerują, że hormon ten oddziałuje na czynność układu krążenia i układu oddechowego również poprzez kłębki szyjne, wpływ ten jest bardziej nasilony u zwierząt hipertensyjnych i zależy od receptorów V1a dla wazopresyny. Wyniki te wskazują na zwiększone zaangażowanie układu wazopresynergicznego w regulację krążeniowo-oddechową u szczurów hipertensyjnych SHR, co potencjalnie może stanowić punkt wyjścia dla poszukiwania nowych sposobów leczenia nadciśnienia tętniczego.

Streszczenie w języku angielskim

Title: The impact of vasopressin and V1a receptor on cardiorespiratory response in normotensive and hypertensive rats.

Introduction: Vasopressin (AVP), also referred to as an antidiuretic hormone, in addition to its renal effects related to the maintenance of water-electrolyte balance, is an important neurohormone involved in adaptation to disturbances in body homeostasis. The arterial chemoreflex is a key cardiovascular reflex associated with the circulatory and respiratory response to hypoxia. The most important group of arterial chemoreceptors are located in the carotid bodies which are found in the bifurcation of the common carotid artery. Hypertension is one of the major risk factors associated with death from cardiovascular related causes. Most encountered is primary hypertension with a multifactorial and incompletely understood origin. Hypertension has been shown to be associated with an increased peripheral chemoreflex, as well as alteration in the regulation of the vasopressinergic system. A common animal model of primary hypertension used in preclinical studies are the SHR rats (*Spontaneously Hypertensive*) with genetically determined hypertension, for which normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats are the most used control.

Aim: The aim of the study was to assess what is the contribution of vasopressin, its type 1a receptor (V1a) and carotid body in cardiopulmonary regulation under conditions of primary hypertension. The specific objectives of the study included answering the following research questions: (1) Are cardiovascular and respiratory responses to pharmacological induction of the arterial chemoreflex enhanced in hypertensive SHR rats compared to normotensive WKY rats? (2) Are carotid bodies and tonic arterial chemoreflex activity involved in maintaining resting circulatory and respiratory parameters in SHR rats and WKY rats? (3) Do circulatory and respiratory responses to peripherally administered AVP differ between hypertensive SHR rats and normotensive WKY rats? (4) Do circulatory and respiratory responses to AVP administered to close to the carotid body differ between hypertensive SHR rats and normotensive WKY rats? (5) Are carotid bodies involved in the circulatory and respiratory responses to peripherally administered AVP in SHR rats and WKY rats? (6) Is the vasopressin V1a receptor involved in maintaining resting circulatory and respiratory parameters in SHR rats and WKY rats? (7) Do the circulatory and respiratory responses to peripheral and local administration of AVP into the carotid body depend on the

V1a receptor in SHR rats and WKY rats? (8) Are V1a receptors present on chemosensitive (type I) cells of the carotid body in SHR rats and WKY rats?

Materials and methods: The experiments were conducted in accordance with national regulations and Council Directive 2010/63/EU of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, after approval by the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments at the Warsaw University of Life Sciences [approval number WAW2/096/2019]. The study was conducted on adult male hypertensive SHR rats and control normotensive WKY rats, aged 12- 14 weeks. The following number of animals were used in the experiments: n = 36 SHR rats and n = 36 WKY rats. In the first part of the study, blood pressure measurements were made on the tail artery using a non-invasive method in the awake animals. In the second part of the experiments, cardiorespiratory variables were measured in urethane-anesthetized animals, in which haemodynamic parameters (mean arterial pressure - MABP, heart rate - HR, femoral artery flow - FABF) and respiratory parameters (minute ventilation - MV, respiratory rate - RR and end-expiratory carbon dioxide concentration - ETCO₂) were recorded. For measurements, rats were implanted with arterial and femoral vein catheters for hemodynamic measurements and intravenous administration, respectively. A Doppler probe was also placed on the femoral artery to assess peripheral flow. A tracheostomy was then performed with the insertion of a tracheal tube and the attachment of a capnograph probe to record respiratory measurements. In some animals, catheter was implanted into external carotid artery to allow local administration of AVP to the carotid region. In selected rats, bilateral denervation of the carotid body or a sham procedure was also performed. The animals were divided into the following 6 experimental series: (1) trigger of arterial chemoreceptor reflex by intravenous administration of potassium cyanide (KCN) (30 µg/100 µL); (2) trigger of arterial chemoreceptor reflex by intravenous administration of KCN (30 µg/100 µL) after carotid body denervation; (3) intravenous administration of AVP (10 ng/100 µL) after sham carotid body denervation; (4) intravenous administration of AVP (10 ng/100 µL) after denervation of carotid body; (5) intravenous administration of the selective V1a receptor antagonist (d(CH₂)₅,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (5 µg/100 µL) and intravenous administration of AVP (10 ng/100 µL); (6) intra-arterial administration of AVP (4 ng/50 µL), before and after intravenous administration of the selective V1a receptor antagonist (d(CH₂)₅,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (5 µg/100 µL). After cardiorespiratory measurements, the animals were euthanized. Carotid artery bifurcations with carotid bodies were harvested from rats and V1a receptor expression in chemoreceptor cells was assessed

using immunofluorescence staining with primary antibodies against the V1a receptor and antibodies against tyrosine hydroxylase (a type I chemoreceptor cell marker). The preparations were then imaged by confocal microscopy.

Results: Hypertensive SHR rats had significantly higher resting systolic, diastolic and mean arterial blood pressure. Also, in anesthetized hypertensive animals, the values of mean arterial pressure and minute ventilation were significantly higher than in normotensive WKY rats. Circulatory and respiratory responses to arterial chemoreflex were also significantly greater in hypertensive animals than in normotensive controls. Bilateral carotid body denervation did not significantly alter haemodynamic and respiratory parameters in SHR and WKY rats, and it was also associated with an inhibition of the response to pharmacological trigger of the peripheral chemoreflex in both groups. The pressor response to intravenous administration of AVP occurred in both strains but was significantly higher in SHR rats. Only in hypertensive rats there was a significant reduction in lung ventilation after vasopressin administration. Intravenous administration of a V1a receptor antagonist lowered blood pressure in both groups, and the decrease was significantly more marked in hypertensive rats. Blockade of the V1a receptor also led to an increase in lung ventilation, which was observed only in hypertensive animals. Bilateral carotid body denervation reduced the pressor response to vasopressin in normotensive WKY rats but had no significant effect on the vasopressin-dependent increase in pressure in SHR rats. In contrast, in hypertensive SHR rats, denervation of the carotid bodies abolished the inhibition of lung ventilation in response to vasopressin administration that was observed in animals without denervation. Administration of vasopressin to the carotid body region caused a slight increase in arterial pressure similar in both groups but led to a decrease in lung ventilation only in SHR rats. Blockade of the V1a receptor abolished the haemodynamic and respiratory responses to both intravenous and intraarterial administration of vasopressin. Immunofluorescence staining confirmed the presence of the V1a receptor for vasopressin on chemosensitive (type I) cells of the carotid bodies in both normotensive WKY and hypertensive SHR rats.

Conclusions:

1. The haemodynamic and respiratory responses to the arterial chemoreflex are increased in hypertensive SHR compared to WKY rats, confirming the increased sensitivity of the reflex under hypertensive conditions.

2. The arterial chemoreflex does not show tonic resting activity in anesthetized SHR and WKY rats.
3. The haemodynamic and respiratory responses to intravenous vasopressin are enhanced in hypertensive SHR compared to normotensive WKY rats, indicating increased activity of the vasopressinergic system under hypertensive conditions.
4. The pressor response to locally administered AVP into the carotid body region is similar in both hypertensive SHR rats and normotensive WKY rats, indicating that AVP-dependent pressor mechanisms are not enhanced at the carotid body level under hypertensive conditions.
5. The respiratory response to locally administered AVP into the carotid body region is present only in hypertensive SHR rats, indicating that AVP is involved in the regulation of the carotid body-dependent respiratory component under hypertensive conditions.
6. Bilateral carotid body denervation inhibits the pressor response to intravenously administered AVP only in normotensive WKY rats, indicating the involvement of the carotid body in cardiovascular regulation by AVP under normotensive conditions and strongly expressed pressor mechanisms independent of the carotid body in hypertensive animals.
7. Bilateral carotid body denervation inhibits the respiratory response to intravenously administered AVP in hypertensive SHR rats, indicating involvement of the carotid body in respiratory regulation by AVP under hypertensive conditions.
8. Cardiorespiratory responses to V1a receptor blockade are present only in hypertensive SHR rats, indicating the involvement of this receptor and AVP in maintaining resting values of haemodynamic and respiratory parameters under hypertensive conditions.
9. Circulatory and respiratory responses to AVP depend on the V1a receptor, as its blockade prevented changes induced by intravenous (systemic) and intraarterial (local) administration of AVP.
10. The V1a receptors are found in chemosensitive (type I) cells in the carotid bodies of hypertensive SHR and normotensive WKY rats.

Summary: The results of the presented study provide new knowledge regarding the arterial chemoreflex, particularly for the peripheral chemoreceptors located in the carotid body, and the involvement of vasopressin in cardiorespiratory regulation in primary hypertension. The observed changes in circulatory and respiratory parameters after intravenous and local administration of vasopressin suggest that the hormone also affects cardiovascular

and respiratory function through the carotid body, that this effect is more pronounced in hypertensive animals and depends on V1a receptors for vasopressin. These results indicate an increased involvement of the vasopressinergic system in cardiorespiratory regulation in hypertensive SHR rats, potentially providing a possibility of further research for new treatment methods for hypertension.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Wazopresyna (AVP, *arginine vasopressin*), określana również jako hormon antydiuretyczny, jest kluczowym neurohormonem związanym z utrzymaniem równowagi wodnej organizmu poprzez wywieranie efektu antydiuretycznego i zagęszczenie moczu. Wazopresyna jest także ważnym neurohormonem zaangażowanym w adaptację organizmu do zaburzeń homeostazy. Oprócz nerkowego działania antydiuretycznego, AVP bierze udział w regulacji szeregu procesów fizjologicznych, w tym ciśnienia tętniczego krwi, aktywności współczulnej, wrażliwości baroreceptorów tętniczych, metabolizmu glukozy, uwalniania hormonu adrenokortykotropowego, glukokortykosteroidów i katecholamin, a także reakcji na stres oraz termoregulacji. Postulowany jest także udział AVP w regulacji układu oddechowego.

Odruch z chemoreceptorów tętniczych jest wywoływany przede wszystkim przez spadek prężności tlenu, wzrost prężności dwutlenku węgla i spadek kwasowości krwi. Jego pobudzenie związane jest z odpowiedzią zarówno krążeniową jak i oddechową. Najważniejszą grupę chemoreceptorów tętniczych stanowią kłębki szyjne strategicznie umiejscowione w rozwidleniu tętnicy szyjnej i monitorujące skład krwi docierającej do ośrodkowego układu nerwowego. Nadmierna aktywność odruchu z chemoreceptorów tętniczych jest jednym z istotnych mechanizmów aktywacji współczulnej w chorobach sercowo-naczyniowych.

Pomiędzy układem sercowo-naczyniowym a układem oddechowym istnieje silny związek czynnościowy wynikający z potrzeby optymalizacji wymiany gazowej w płucach z dostarczaniem tlenu do tkanek przez układ krążenia. Często nieprawidłowościom jednego układu towarzyszą zmiany pracy drugiego. Mimo tego układy te często badane są niezależnie od siebie. Czynność układu oddechowego ma istotny wpływ na odruchową regulację ciśnienia tętniczego.

Nadciśnienie tętnicze (NT) jest wiodącą przyczyną chorobowości i umieralności w krajach rozwiniętych. Nadciśnienie pierwotne (określane też jako samoistne) odpowiada za około 85-95% przypadków NT. Cechuje je wieloczynnikowa etiologia i nie w pełni poznane patomechanizmy rozwoju. Pomimo, że dostępnych jest wiele farmakologicznych sposobów leczenia tej choroby, osoby z lekooporną formą NT wciąż stanowią istotne

wyzwanie kliniczne. Szacuje się, że nawet 10-20% populacji pacjentów z NT jest opornych na standardową farmakoterapię i nie osiąga prawidłowych wartości ciśnienia tętniczego.

W dotychczasowych badaniach udokumentowano udział AVP w rozwoju NT w modelach eksperymentalnych, a także wykazano związek AVP z NT u ludzi. W patogenezie NT bierze także udział nieprawidłowa nerwowa regulacja ciśnienia tętniczego, co objawia się między innymi zaburzeniem działania odruchów sercowo-naczyniowych. Wykazano udział nadmiernej wrażliwości i tonicznego pobudzenia odruchu z chemoreceptorów tętniczych prowadzących do nadmiernej aktywności współczulnej w przebiegu NT. Jednocześnie w modelach doświadczalnych NT oraz u części pacjentów obserwuje się wzmocnione sprzężenie między czynnością oddechową, a aktywnością współczulną i wzrostem ciśnienia tętniczego. Badania w modelach doświadczalnych oraz u ludzi potwierdziły także udział AVP w regulacji ciśnienia tętniczego, jednak rola tego neurohormonu w regulacji krążeniowo-oddechowej w warunkach NT nie została dotychczas dobrze poznana.

1.2. Wazopresyna i układ wazopresynergiczny

1.2.1. Synteza wazopresyny

Wazopresyna jest cyklicznym nonapeptydem powstającym z prekursorowego peptydu pre-prowazopresyny (pre-pro-AVP), z którego oprócz AVP odłączana jest neurofizyna II oraz C-końcowy fragment pre-pro-AVP określany jako kopeptyna [1]. Kopeptyna jest biomarkerem uwalniania AVP, gdyż jest produkowana razem z AVP w równomolowych ilościach, a w odróżnieniu od samej AVP, oznaczenie jej stężenia w próbkach biologicznych cechuje się wysoką stabilnością i powtarzalnością [2,3]. Wazopresyna jest wytwarzana głównie w jądrze przykomorowym (PVN, *paraventricular nucleus*), w jądrze nadwzrokowym (SON, *supraoptic nucleus*), a także w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN, *suprachiasmatic nucleus*) podwzgórza [4,5]. Neurony wazopresynergiczne można zaklasyfikować do dwóch histologicznie i funkcjonalnie różnych populacji komórek – neuronów wielkokomórkowych oraz neuronów drobnokomórkowych. Aksony neuronów wielkokomórkowych tworzą projekcje do tylnego płata przysadki mózgowej, skąd AVP jest uwalniana do krążenia [6,7]. Neurony drobnokomórkowe oddają projekcje do wyniosłości pośrodkowej podwzgórza i do pozapodwzgórzowych struktur mózgowia w tym do pnia mózgu [8–10], układu limbicznego [8,11], kory mózgowej i wzgórza [12], gdzie AVP jest uwalniana w synapsach nerwowych.

Oprócz syntezy podwzgórzowej, AVP lub mRNA AVP ulega także miejscowej ekspresji w narządach obwodowych, takich jak rdzeń nadnerczy i serce [13–15]. Wazopresyna wydzielana jest do krwiobiegu i działa wówczas jako neurohormon na narządy obwodowe oraz na obszary ośrodkowego układu nerwowego pozbawione bariery krew-mózg. Może być także wydzielana w obrębie synaps nerwowych jako neuroprzekaźnik.

1.2.2. Regulacja wydzielania wazopresyny

Uwalnianie AVP do krążenia następuje w odpowiedzi na bodźce osmotyczne i nieosmotyczne. Zmiana osmolalności jest głównym czynnikiem, który wpływa na uwalnianie AVP w warunkach fizjologicznych. Wykazano, że stężenie AVP rośnie wprost proporcjonalnie do wzrostu osmolalności osocza i stężenia jonów sodowych w płynie zewnątrzkomórkowym [6,16–19]. Zmiany osmolalności osocza wykrywane są przez osmoreceptory ośrodkowe będące wyspecjalizowanymi neuronami w obszarach mózgu pozbawionych bariery krew-mózg, szczególnie w narządzie nadsklepieniowym (SFO, *subfornical organ*) i narządzie naczyniowym blaszki krańcowej (OVLT, *organum vasculosum of the lamina terminalis*), a także przez wielkokomórkowe neurony wazopresynergiczne PVN i SON [1,3,6,20]. Badania ostatnich dwóch dekad wskazują na istotny udział bodźców osmotycznych wykrywanych w przewodzie pokarmowym po spożyciu pokarmu o dużym ładunku osmotycznym, które prowadzą do zwiększonego wydzielania AVP wyprzedzającego wzrost osmolalności osocza [3,21].

Niezależnie od regulacji zależnej od osmolalności, AVP wydzielana jest pod wpływem działania bodźców nieosmotycznych, do których należą przede wszystkim hipowolemia, hipotensja, hipoksja, wysiłek fizyczny, hipoglikemia [3,22–25]. Bodźce te zwykle pojawiają się w przebiegu zaburzeń homeostazy i prowadzą do zwiększenia stężenia AVP nawet w warunkach prawidłowej lub obniżonej osmolalności osocza [1,3].

Hipowolemia i hipotonia wykrywane są odpowiednio przez mechanoreceptory obszaru sercowo-płucnego oraz baroreceptory tętnicze [1,19,23,26,27], a odbarczenie tych receptorów prowadzi do odpowiedzi kompensacyjnej ze strony układu krążenia i układu oddechowego przeciwdziałającej zmniejszeniu objętości krwi krążącej i obniżeniu ciśnienia tętniczego. Kluczowymi składowymi takiej odpowiedzi kompensacyjnej jest silne pobudzenie współczulne, zwiększone wydzielanie AVP, a także wzrost wentylacji płuc [22,28,29]. W pracach doświadczalnych wykazano, że hipowolemia, hipotensja, a w szczególności krwotok, powodują masywne uwalnianie AVP do krwiobiegu [3,24,25,30–33].

Wykazano także, że hipoksja powoduje podwyższenie stężenia osoczowego AVP u zwierząt [34–36] i ludzi [37]. Doświadczenia w modelach zwierzęcych wskazują na istotny udział kłębków szyjnych w zwiększaniu przepływu krwi w krążeniu podwzgórzowo-przysadkowym oraz w wydzielaniu AVP w odpowiedzi na hipoksję [36,38–41], jednak wyniki badań u ludzi są sprzeczne i nie wskazują jednoznacznie na udział chemoreceptorów tętniczych w regulacji wydzielania AVP [42–44].

Uwalnianie AVP w trakcie intensywnego wysiłku może wynikać z hiperoosmolalności osocza [44]. Jednak wzrost AVP w osoczu w trakcie wysiłku fizycznego był także obserwowany pomimo hiponatremii lub braku zmian osmolalności osocza [45–47], co wskazuje również na nieosmotyczne uwalnianie AVP podczas intensywnych ćwiczeń. Wywołana insuliną hipoglikemia także powoduje uwalnianie AVP do krążenia zarówno u zwierząt [48–50] jak i ludzi [51,52]. Różnorodności bodźców prowadzących do pobudzenia układu wazopresynergicznego i zwiększonego wydzielania AVP, odpowiada zróżnicowana wrażliwość neuronów wazopresynergicznych podwzgórza na poszczególne bodźce [5].

1.2.3. Wazopresyna jako neuroprzekaznik

Oprócz ogólnoustrojowego działania w krwiobiegu, AVP służy także jako neuroprzekaznik peptydowy biorący udział w przekaźnictwie synaptycznym. Wazopresyna jest uwalniana w ośrodkowym układzie nerwowym z zakończeń nerwowych neuronów wazopresynergicznych, których ciała komórkowe znajdują się w drobnokomórkowym przedziale podwzgórzowych jąder PVN oraz SON [5,53,54]. Drobnokomórkowe neurony wazopresynergiczne znajdujące się w PVN odgrywają kluczową rolę w regulacji układu krążenia [55]. Szacuje się, że około 40% neuronów wazopresynergicznych oddaje projekcje do pnia mózgu, w szczególności do dogłowego brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego (RVLM, *rostral ventrolateral medulla*), gdzie tworzą synapsy z ciałami przedmotorycznych neuronów współczulnych [56,57]. Neurony wazopresynergiczne wywierają zależną od receptorów V1a stymulację, która skutkuje pobudzeniem współczulnym i w efekcie wzrostem ciśnienia tętniczego krwi [58,59]. Oddają także projekcje do neuronów oddechowych obszaru brzuszno-bocznego rdzenia przedłużonego, gdzie za pośrednictwem receptora V1a wpływają na aktywność oddechową [10,60,61]. Neurony wazopresynergiczne obszaru PVN unerwiają także jądra ruchowe nerwu błędnego, dzięki czemu mogą zwiększać napięcie części przywspółczulnej autonomicznego

układu nerwowego i przyczyniać się do zwiększenia czułości odruchu z baroreceptorów tętniczych [1,62].

1.2.4. Receptory dla wazopresyny

Receptory dla AVP należą do rodziny metabotropowych receptorów związanych z białkami G. Wyróżnia się trzy podtypy receptorów dla wazopresyny: V1a, V1b i V2 [1,63].

W regulacji układu sercowo-naczyniowego i ciśnienia tętniczego najlepiej poznana jest rola receptora V1a [63–65]. W układzie krążenia receptory V1a ulegają ekspresji w ścianach tętnic, tętniczek i żył, gdzie odpowiadają za skurcz naczyń spowodowany przez AVP [66,67] oraz w sercu, gdzie regulują kurczliwość i uczestniczą w różnicowaniu i wzroście kardiomiocytów [68–70]. Obecność receptorów V1a stwierdzana jest też w takich narządach jak rdzeń nadnerczy, trzustka, wątroba, nerka i tkanka tłuszczowa, gdzie biorą udział w regulacji metabolizmu i regulacji wydzielania wewnętrznego [1]. Receptory V1a obecne są też na trombocytach i płytkach krwi, a ich pobudzenie zwiększa aktywność płytek krwi [71,72].

Receptory V1b znajdują się w ośrodkowym układzie nerwowym, przede wszystkim w przysadce mózgowej, a także trzustce i nerkach [73,74]. Działając w przednim płacie przysadki pośredniczą w uwolnieniu adrenokortykotropiny (ACTH) [75], w podwzgórzcu w pobudzeniu neuronów przedwspółczulnych [76,77], a w wysepkach trzustkowych w zwiększeniu wydzielania insuliny [78]. W nerkach postulowana jest rola receptora V1b w równoważeniu efektu antydiuretycznego stymulowanego przez receptor V2 [79].

Receptory V2 w nerkach odgrywają kluczową rolę w regulacji równowagi wodno-elektrolitowej. Ich stymulacja prowadzi do wbudowywania akwaporyny 2 w błonę głównych komórek kanalików zbiorczych i zwiększeniu resorpcji zwrotnej wody [80]. Receptory V2 ulegają ekspresji również w śródbłonku naczyniowym, a ich pobudzenie prowadzi do uwalniania czynnika von Willebranda, co przyczynia się do zwiększenia aktywności płytek i procesów hemostazy [81–84].

1.2.5. Udział wazopresyny w regulacji układu krążenia

Wazopresyna uczestniczy w utrzymaniu homeostazy w układzie sercowo-naczyniowym poprzez regulację ciśnienia tętniczego i „tonusu” naczyniowego, regulację pobudzenia współczulnego w ośrodkowym układzie nerwowym, wpływ na odruch

z baroreceptorów tętniczych, regulację czynności serca i oddziaływanie na równowagę wodno-elektrolitową poprzez nerki [1,63,85].

W pracach doświadczalnych wykazano, że obwodowe podanie AVP do układu krwionośnego prowadzi do skurczu naczyń i podwyższenia ciśnienia tętniczego [86–88]. Za pośrednictwem receptora V1a [89], AVP powoduje nasilenie odpowiedzi skurczowej w naczyniach, w tym także wieńcowych i nerkowych, ze stopniem skurczu zależnym jest od docelowego łożyska naczyniowego [90–94].

Wpływ AVP i receptora V1a na homeostazę ciśnienia tętniczego w warunkach fizjologicznych wydaje się być drugorzędny dla utrzymania spoczynkowych wartości ciśnienia. Podanie antagonisty receptora V1a u normotensyjnych szczurów nie wywoływało istotnych zmian ciśnienia tętniczego [88,95]. Jednak w trakcie normalnej aktywności ruchowej u myszy z delecją receptora V1a wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego były wyraźnie niższe, co sugeruje, że AVP uczestniczy w utrzymaniu ciśnienia tętniczego przy aktywności fizycznej [89]. Z kolei podanie antagonisty receptora V1a prawidłowo nawodnionym pacjentom w spoczynku nie prowadziło do istotnej zmiany ciśnienia tętniczego [96]. Z drugiej jednak strony, AVP najprawdopodobniej za pośrednictwem receptora V2 może powodować rozkurcz tętnic oraz żył nerkowych i centralnych zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi [97–100], co będzie przyczyniać się do zmniejszenia powrotu żylnego i hamowania odpowiedzi presyjnej.

Znaczenie AVP w regulacji ciśnienia tętniczego uwidacznia się szczególnie przy zaburzeniach homeostazy. W warunkach patofizjologicznych takich jak hipowolemia, hipotensja i krwotok, podczas których stężenia osoczowej AVP wyraźnie zwiększają się, naczynioskurczowy efekt istotnie przyczynia się do ograniczenia spadku ciśnienia tętniczego [101–104].

Jednocześnie AVP działając poprzez receptory V1a powoduje rozszerzenie tętnic płucnych u zwierząt [105–108] i u ludzi [109,110], a efekt ten jest szczególnie wyraźny w warunkach niedotlenienia naczyń płucnych [108,110]. Zmniejszenie oporów płucnych pod wpływem działania AVP poprawia warunki hemodynamiczne pracy prawej komory i ułatwia utrzymanie powrotu żylnego do lewej komory [111,112].

Ośrodkowo działająca AVP pełni kluczową rolę w regulacji układu sercowo-naczyniowego. Neurony wazopresynergiczne za pośrednictwem receptorów V1a odpowiadają za pobudzenie współczulne poprzez projekcje do obszaru RVLM rdzenia przedłużonego oraz przedzwojowych neuronów współczulnych istoty pośrednio bocznej (IML,

intermediolateral nucleus) rdzenia kręgowego i zwiększenie aktywności przedmotorycznych i przedzwojowych neuronów współczulnych [113–115].

Wazopresyna obecna we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym lub egzogenna AVP podana do układu komorowego mózgu może także zwiększać aktywność współczulną i wpływać na układ krążenia poprzez oddziaływanie na obszary pozbawione bariery krew-mózg w komorze trzeciej mózgu - SFO i obszarze przednio-brzusznym trzeciej komory (AV3V, *anteroventral third ventricle*). Wazopresyna podana do układu komorowego mózgu wywołuje wzrost ciśnienia tętniczego u zwierząt laboratoryjnych używanych w badaniach przedklinicznych, w tym u szczurów, myszy, królików, kóz, owiec i psów [116–122]. Z drugiej strony AVP działając ośrodkowo istotnie wpływa także na regulację odruchu z baroreceptorów. Oddziałując poprzez pole najdalsze (AP, *area postrema*), które jest narządem okołokomorowym pozbawionym bariery krew-mózg zlokalizowanym w dnie komory czwartej, powoduje uwrażliwienie odruchu z baroreceptorów tętniczych zatoki szyjnej i w efekcie obniża wartość ciśnienia tętniczego [123–125]. W działaniu tym współuczestniczą również projekcje wazopresynergiczne z PVN do jąder ruchowych nerwu błędnego, które zwiększają dosercową aktywność nerwu błędnego [1,62]. Podsumowując, ośrodkowo działająca AVP z jednej strony wywiera efekt presyjny zależny od zwiększenia aktywności współczulnej, z drugiej może ograniczać wzrosty ciśnienia tętniczego poprzez swoje działanie uwrażliwiające względem odruchu z baroreceptorów tętniczych [62,126].

Badania ostatnich dwóch dekad wskazują na udział AVP w czynności mięśnia sercowego oraz jego przebudowie [68–70]. W warunkach doświadczalnych wykazano, że AVP może zwiększać kurczliwość kardiomiocytów za pośrednictwem receptora V1a [127] i V2 [128]. Pozostaje to jednak w sprzeczności z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali, że obwodowo podana AVP poprzez bezpośrednie oddziaływanie na serce powodowała zmniejszenie objętości wyrzutowej i częstości skurczów serca [129,130], co najpewniej związane jest z interakcjami AVP z innymi układami hormonalnymi, szczególnie peptydami natriuretycznymi oraz przekaźnictwem purynergicznym [68]. Niezależnie od efektów krótkoterminowych, AVP może brać udział w hipertroficzej przebudowie mięśnia sercowego [131]. Nadekspresja receptorów V1a w sercu w warunkach doświadczalnych wywoływała hipertrofię lewej komory, co wskazuje na udział AVP i receptora V1a w przebudowie mięśnia sercowego [132].

Wazopresyna działając jako hormon antydiuretyczny w nerkach wpływa na resorpcję wody, czym pełni kluczową rolę w utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej i długoterminowej kontroli ciśnienia tętniczego. Stymulacja receptorów V2 w nerkach

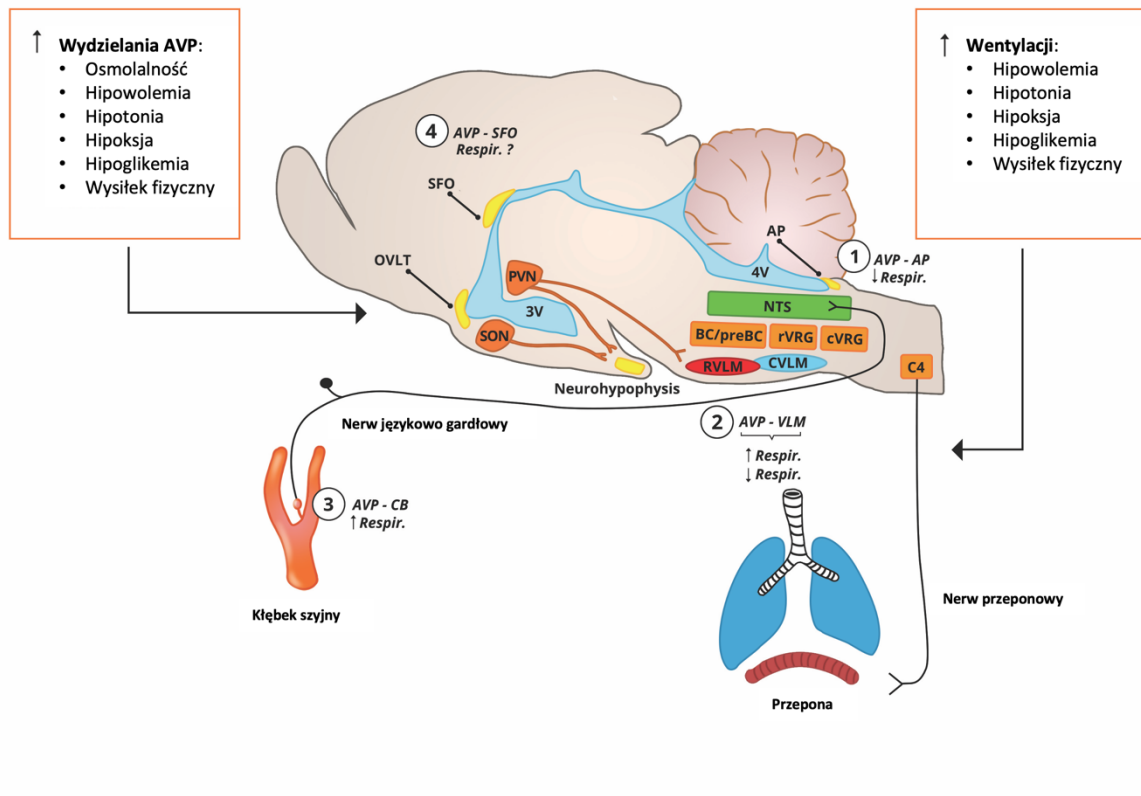
proceeds to the construction of aquaporin 2 [80] and sodium channels ENaC in the membrane of collecting duct cells [133–135].

Aldosterone also influences the regulation of the cardiovascular system through interactions with other hormonal systems. Among others, it stimulates the release of catecholamines from the adrenal medulla [136,137], and also stimulates the production of renin in the kidney [138], which leads to the response to pressure and an increase in blood pressure [1,63].

1.2.6. Role of AVP in the regulation of the respiratory system

The role of AVP in the regulation of the circulatory system is quite well known. Much less is known about the role of AVP in the regulation of the respiratory system. Stimuli that activate neurons with vasopressinergic properties and increase the release of AVP into the bloodstream, also lead to changes in respiratory parameters, which is summarized in Figure 1. This leads to the question, whether there is a functional link between AVP and the regulation of the respiratory system [22].

Numerous studies indicate the influence of AVP circulating in the bloodstream on lung ventilation. It has been shown that AVP administered intravenously reduces lung ventilation and vagal activity in awake dogs [139], anesthetized and awake mice [88,140–142] and fetuses of sheep [143]. The inhibitory effect of intravenously administered AVP on lung ventilation depends on V1a receptors, because the blockade of these receptors with selective antagonists completely prevented changes in lung ventilation caused by systemic administration of AVP in anesthetized mice [88,140,141]. The results of the blockade of V1a receptors for vagal-mediated lung ventilation are less clear. Walker and Jennigs showed that the administration of V1a antagonists led to an increase in lung ventilation in awake dogs [144], but had no significant effect on lung ventilation in awake normotensive mice [142]. In addition, the intravenous administration of V1a antagonists has no effect on the increase in lung ventilation caused by hypoxia in awake dogs [145]. This suggests that V1a receptors do not play a role in the increase in lung ventilation caused by activation of chemoreceptors in this species. Blockade of V1a receptors prevents the stimulatory effect of substances such as angiotensin II and oxytocin on the respiratory system, which additionally points to the role of endogenous AVP and V1a receptors in the regulation of the respiratory system [140].



Rycina 1. Udział wazopresyny w regulacji układu oddechowego

Bodźce, które powodują uwalnianie AVP do krwiobiegu i aktywację wazopresynergicznych neuronów PVN, zwiększają również wentylację płuc. AVP w krwiobiegu dociera do narządów okołokomorowych (SFO, AP i OVLT), które nie mają bariery krew-mózg i kłębka szyjnego znajdującego się w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej. Wazopresynergiczne neurony PVN oddają projekcje do ośrodków sercowo-naczyniowych (RVLM) i oddechowych (preBC / BC, rVRG i jądro przeponowe C4), co sugeruje ich udział w kontroli oddychania [9,60]. (1) AVP w AP hamuje aktywność nerwu przeponowego [139]; (2) projekcje wazopresynergiczne do rVRG tonicznie stymulują aktywność oddechową [9], a AVP podany do rVRG lub kompleksu pre-Bötzingera stymuluje aktywność przepony [9,60], czemu towarzyszy wzrost ciśnienia tętniczego krwi; jest to sprzeczne z ustaleniami wskazującymi, że AVP podawany do rVRG hamuje aktywność nerwu przeponowego i nie powoduje zmian w ciśnieniu tętniczym krwi [61,140,141]; (3) AVP podawana miejscowo w okolice rozwidlenia tętnicy szyjnej nieznacznie zwiększa wentylację [88]; oraz (4) receptory wazopresyny ulegają ekspresji w SFO [142], a elektryczna stymulacja SFO zwiększa aktywność oddechową [143], ale efekty oddechowe AVP działającej na SFO nie zostały zbadane.

AP (area postrema)- pole najdalsze; AVP - wazopresyna; BC - kompleks Bötzingera; C4 - jądra przeponowe; CVLM (caudal ventro-lateral medulla) - doogonowy brzuszno-boczny obszar rdzenia przedłużonego; cVRG - doogonowa brzuszna grupa oddechowa; NTS (nucleus tractus solitarius) - jądro pasma samotnego; OVLT (organum vasculosum lamina terminalis) - narząd naczyniowy blaszki krańcowej; preBC - kompleks pre-Bötzingera; PVN (paraventricular nucleus) - jądro przykomorowe; RVLM (rostral ventrolateral medulla)- dogłowy brzuszno-boczny obszar rdzenia przedłużonego; rVRG (rostral ventral respiratory group) dogłowa brzuszna grupa oddechowa- SFO (subfornical organ) - narząd nadsklepieniowy; SON (supraoptic nucleus) - jądro nadwzrokowe; VLM (ventral lateral medulla) – brzuszno-boczny obszar rdzenia przedłużonego; neurohypophysis – przysadka nerwowa.

Rycina zmodyfikowana z Proczka et al. [22] zgodnie z licencją CC BY.

Hamujące działanie obecnej w krwiobiegu AVP względem układu oddechowego można tłumaczyć pobudzeniem odruchu z baroreceptorów tętnicznych, wpływem AVP na kłębek szyjny lub wpływem AVP na narządy okołokomorowe. Pobudzenie odruchu z baroreceptorów tętnicznych nie tylko zwiększa napięcie nerwu błędnego i hamuje aktywność współczulną, ale też hamuje aktywność neuronów oddechowych rdzenia przedłużonego [146–149], co może tłumaczyć hamujący wpływ AVP na wentylację wtórnie do presyjnego działania tego hormonu. Wpływ krążącej AVP na kontrolę układu oddechowego może również wynikać z jej oddziaływania na chemoreceptory tętnicze, w szczególności na kłębek szyjny. W pracy z Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM wykazano, że u szczurów normotensyjnych Sprague-Dawley AVP podawana miejscowo do kłębka szyjnego przez tętnicę szyjną wewnętrzną powodowała niewielki wzrost wentylacji płuc bez znaczących zmian ciśnienia tętniczego krwi [88]. Efekt ten może być bezpośrednio zależny od aktywacji chemowrażliwych komórek typu I, które mają na swojej powierzchni receptor V1a [88]. Oprócz bezpośredniego działania na komórki chemowrażliwe kłębka szyjnego, istnieje możliwość, że AVP prowadzi do zwiększenia aktywności komórek chemoreceptorowych w mechanizmie skurczu naczyń zaopatrujących kłębek szyjny i spadku przepływu krwi przez ten organ [150,151], co wymaga potwierdzenia eksperymentalnego. Wazopresyna obecna we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym może też oddziaływać na narządy komorowe, w tym AP i SFO. Nieliczne prace wskazują, że AVP, szczególnie poprzez oddziaływanie na AP, może hamować aktywność nerwu przeponowego i zmniejszać wentylację płuc u szczurów w sposób zależny od receptora V1a [152,153].

W podsumowaniu, dostępna literatura naukowa wskazuje na hamujący wpływ AVP względem układu oddechowego i udział receptora V1a w tej odpowiedzi. Należy podkreślić, że dotychczasowe badania dotyczyły zwierząt z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, natomiast udział AVP i jej receptora V1a w regulacji układu oddechowego nie był badany w warunkach nadciśnienia tętniczego.

1.3. Wydzielanie wazopresyny w stanach chorobowych

Wzrost stężenia AVP lub jej biomarkera kopetyny stwierdzany jest w szeregu chorób układu sercowo-naczyniowego, którym często towarzyszą zmiany wentylacji płuc i wzorca oddychania, a także obserwowany jest w wielu chorobach układu oddechowego. Z kolei pogorszenie czynności wentylacyjnej płuc często wiąże się z nasileniem procesów

patologicznych prowadzących do zaburzeń regulacji układu krążenia i zwiększenia chorobowości sercowo-naczyniowej [154–156].

Wzrost stężenia osocznego AVP i jej markera kopeptyny jako wyraz aktywacji neuro-hormonalnej stwierdzany jest u pacjentów z niewydolnością serca [157,158], a także poprzedza rozwinięcie się niewydolności tego narządu [159]. Zarazem wysokie wartości AVP są dodatkowo czynnikiem predykcyjnym złego rokowania w tej grupie chorych [157,160]. Jednocześnie u chorych z niewydolnością serca często obserwuje się zaburzenia wzorca oddychania, m.in. w postaci oddechu Cheyne-Stokes'a, bezdechów obturacyjnych i ośrodkowych, a także przyspieszenia częstości oddychania [161–165]. Wzrost stężenia osocznego AVP lub kopeptyny występuje także u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego [166–168], osób po nagłym zatrzymaniu krążenia [169,170], a także u pacjentów z wadami zastawkowymi serca [171,172]. Podwyższone poziomy AVP obserwowane są także u pacjentów z NT [173], co szczegółowo jest przedstawione w rozdziale 1.6.2.

Zwiększone stężenie AVP i jej markera kopeptyny w osoczu obserwuje się również w schorzeniach układu oddechowego. Wzrost stężenia AVP w osoczu obecny jest w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc [174,175] oraz w infekcjach dolnych dróg oddechowych [24,176]. Podwyższone poziomy AVP obserwowane są także w ostrej niewydolności oddechowej [177], nadciśnieniu płucnym [178] oraz zatorowości płucnej [179]. W ostatnich latach wykazano także, że podwyższony poziom kopeptyny stwierdzany jest w przebiegu zakażenia wirusem SARS-CoV-2 u pacjentów z objawowym przebiegiem COVID-19 [180,181].

Powyższe obserwacje kliniczne wskazują, że zwiększone wydzielanie AVP może występować w chorobach związanych ze zmienioną regulacją zarówno układu sercowo-naczyniowego, jak i układu oddechowego, co rodzi to pytanie, czy AVP jest jedynie biomarkerem zaburzeń homeostazy organizmu, czy też działając jako hormon wpływa na dostosowanie regulacji tych układów do aktualnych zaburzeń [22].

1.4. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych

1.4.1. Chemoreceptory tętniczne

Największe skupiska chemowrażliwych komórek w układzie krążenia znajdują się w kłębkach szyjnych oraz kłębkach aortalnych, które są wyspecjalizowanymi narządami określanymi jako chemoreceptory tętniczne [182]. Kłębki szyjne są parzystymi niewielkimi

strukturami zlokalizowanymi obustronnie w rozwidleniu tętnicy szyjnej. Cechuje je najwyższy przepływ krwi w organizmie w przeliczeniu na masę tkanki wynoszący od 1 do 2 L/min/100g [183–185]. Sucha masa kłębka szyjnego wynosi około 60 µg u szczura i około 13 mg u człowieka [186]. Długa oś kłębka szyjnego ma z kolei wymiary około 750 µm u szczura i od 2 do 3 mm u człowieka [186–188]. Kłębek szyjny u ludzi i szczurów unaczyniony jest zwykle przez krótką boczną odchodzącą od tętnicy szyjnej zewnętrznej określaną jako "tętniczka kłębkowa" (*glomeric artery*), jednak u różnych gatunków stwierdzano dużą zmienność pochodzenia tego naczynia [151,189]. Kłębki aortalne są wyraźnie mniejszymi od szyjnych strukturami znajdującymi się na ścianie tętnicy w obrębie łuku aorty [190–192]. Mniej licznie chemoreceptory obwodowe znajdują się także w sercu, płucach i nerkach [193–195]. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych zależy przede wszystkim od chemoreceptorów zlokalizowanych w kłębkach szyjnych, gdyż ich obustronne usunięcie lub odnerwienie znosi odpowiedź oddechową na hipoksję [196,197].

1.4.1.1. Budowa histologiczna i neuroprzekazniki

Kłębki szyjne zawierają właściwe komórki chemoreceptorowe (typu I) oraz komórki podporowe (typu II), które są przestrzennie ułożone w odrębne klastry lub „gronka” (*glomera*) oddzielone od siebie cienkimi przegrodami łącznotkankowymi, z bogatą siecią naczyń kapilarnych, zakończeniami aferentnych włókien nerwowych oraz nielicznych włókien eferentnych [189,198]. Większe, mające kulisty kształt komórki typu I mają pochodzenie nerwowe, natomiast komórki typu II są pochodzenia glejowego. Komórki typu I w oparciu o wielkość ziarnistości w obrazie mikroskopii elektronowej można podzielić na typ A i typ B [199]. Obserwowane jest też zróżnicowanie komórek chemoreceptorowych typu I pod względem ekspresji enzymów, receptorów oraz kanałów jonowych, w tym m.in. hydroksylazy tyrozynowej (TH, *tyrosine hydroxylase*), beta hydroksylazy dopaminowej (DBH, *dopamine beta hydroxylase*), kanałów jonowych wrażliwych na kwasy typu 3 (ASIC3, *acid-sensing ion channel 3*), receptorów dopaminowych typu 2 i purynergicznym typu P2X2/3 [41,186].

Chemoreceptorowe komórki łączą się z aferentnymi włóknami nerwu zatokowego, który jest odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego (IX) [40,41]. Do kłębka dociera też unerwienie eferentne współczulne ze zwoju szyjnego górnego (gałąź zwojowo-kłębkowa, *gangliomelular*) [40,41]. W kłębkach szyjnych znajduje się także rozbudowana sieć mikrokrążenia składająca się z tętniczek, fenestrowanych naczyń włosowatych, żyłek oraz anastomoz pomiędzy tętniczkami a żyłkami. Umożliwia ona wysoki przepływ krwi oraz

kontakt komórek chemowrażliwych z osoczem krwi i wykrywanie prężności tlenu [151]. Naczynia kłębuszka szyjnego, w szczególności tętniczki, są unerwione przez część współczulną autonomicznego układu nerwowego, co wskazuje na możliwość lokalnej regulacji przepływu kłębkowego i czułości odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w tym mechanizmie [151,200].

Kluczowymi pobudzającymi neuroprzebieżnikami komórek chemoreceptorowych kłębka szyjnego zaangażowanymi w przekazywanie aferentnej informacji do pnia mózgu są: acetylocholina, ATP oraz gazotransmitery, takie jak tlenek azotu (NO), tlenek węgla (CO) i siarkowodór (H_2S), natomiast kluczowym przebieżnikiem hamującym uwalnianym w kłębku szyjnym jest dopamina [41]. Stwierdzany jest wpływ szeregu hormonów i mediatorów na regulację czułości kłębków szyjnych, m.in. angiotensyny II, leptyny, glukagonopodobnego peptydu typu 1 (GLP-1) [201]. Postulowany jest też wpływ AVP na aktywność kłębka szyjnego [22].

1.4.1.2. Bodźce

Odruch z chemoreceptorów tętnicznych zależy od pobudzenia właściwych komórek chemoreceptorowych (typu I) [186,202]. Są one przede wszystkim wrażliwe na spadek prężności tlenu (O_2), a także na wzrost prężności dwutlenku węgla (CO_2), wzrost kwasowości (obniżenie pH) krwi, i zmniejszenie przepływu krwi przez kłębek szyjny [41,203–206]. Wraz ze zmniejszaniem się prężności O_2 we krwi tętniczej stopniowo rośnie liczba pobudzeń w chemowrażliwych włóknach nerwu zatokowego. Odpowiedź ta ulega wykładniczemu nasileniu, gdy prężność O_2 spada poniżej 50-60 mm Hg [207,208]. Przy wartości tej dochodzi do gwałtownego zmniejszenia wysycenia hemoglobiny tlenem i niedotlenienia najbardziej wrażliwych na hipoksję narządów - mózgowia i serca. Wykazano także, że poszczególne komórki chemoreceptorowe cechują się zróżnicowaną wrażliwością względem różnych bodźców. Lu i współpracownicy opisali w izolowanych kłębkach szyjnych obecność komórek typu I wrażliwych jedynie na zmianę prężności O_2 , wyłącznie na obniżenie pH oraz wrażliwych na niedotlenienie i kwasowość, odpowiednio dla 19%, 13% oraz 68% populacji badanych komórek chemowrażliwych i ich klastrów [209], co wskazuje na możliwość generowania różnych wzorców odpowiedzi na pobudzenie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w zależności od działających bodźców i ich natężenia [40,210]. Silne działanie pobudzające odruch z chemoreceptorów tętnicznych wywierają cyjanki, które hamują oddychanie komórkowe poprzez blokowanie mitochondrialnej oksydazy cytochromowej (kompleks IV) [40,41,208].

1.4.2. Organizacja odruchu z chemoreceptorów tętnicznych:

Informacja odebrana przez chemoreceptory tętniczne przekazywana jest do ośrodków krążeniowych oraz neuronów oddechowych w pniu mózgu, skąd wychodzi pobudzenie do układu współczulnego i nerwu błędnego zaopatrujących układ sercowo-naczyniowy oraz do nerwu przeponowego [40,211].

Pobudzenie z kłębka szyjnego biegnie włóknami aferentnymi nerwu zatokowego (zwanego także nerwem Heringa) do zwoju skalistego, w którym znajdują się ciała neuronów. Następnie nerwem językowo-gardłowym (nerw czaszkowy IX) informacja dociera do znajdującego się w grzbietowej części rdzenia przedłużonego jądra pasma samotnego (NTS, *nucleus tractus solitarius*). NTS jest głównym ośrodkiem, który integruje bodźce pochodzące z receptorów układu sercowo-naczyniowego, a jego neurony pośredniczą także w odruchu z chemoreceptorów tętnicznych [212–214]. Niezależnie od kluczowych projekcji z kłębków szyjnych do obszaru NTS, nieliczne badania wskazują na obecność bezpośrednich połączeń nerwowych omijających NTS pomiędzy kłębkami szyjnymi a ruchowym jądrem grzbietowym nerwu błędnego (DMN, *dorsal motor nucleus*), jądrem dwuznacznym oraz AP [215–217].

Bezpośrednie projekcje z NTS pobudzają neurony przedmotoryczne układu współczulnego znajdujące się w RVLM [218,219]. W efekcie dochodzi do wzrostu aktywności współczulnej do układu sercowo-naczyniowego [220–222]. Informacja z NTS przekazywana jest także do jądra dwuznacznego (*nucleus ambiguus*), które jest głównym jądrem ruchowym nerwu błędnego związanym z unerwieniem przywspółczulnym serca. Projekcje te odpowiadają za aktywację komponenty przywspółczulnej odpowiedzi w pierwotnym odruchu z chemoreceptorów tętnicznych i pojawieniu się bradykardii [223–225]. Neurony jądra dwuznacznego hamowane są w trakcie wdechu przez neurony oddechowe brzusznej kolumny oddechowej (VRC, *ventral lateral column*), co umożliwia pojawienie się tachykardii wtórnie do hiperwentylacji [211,226].

Poprzez połączenia NTS z jądrem czworobocznym (RTN, *retrotrapezoid nucleus*), chemoreceptory kłębka szyjnego współpracują także z ośrodkowymi chemoreceptorami wrażliwymi na wzrost stężenia CO₂ i zmiany pH [211,227–229]. Obecne są także wielosynaptyczne projekcje z NTS do PVN w podwzgórzcu, które są kluczowe dla wydzielania AVP w odpowiedzi na hipoksję będącą najsilniejszym bodźcem wywołującym odruch z chemoreceptorów obwodowych [230–232].

Pobudzenie z kłębka szyjnego jest także przekazywane do neuronów oddechowych znajdujących się w kompleksie pre-Bötzingera w VRC [233–235]. Skutkuje to przede wszystkim pobudzeniem nerwu przeponowego unerwiającego przeponę, a także nasileniem aktywności mięśni wydechowych [236–239].

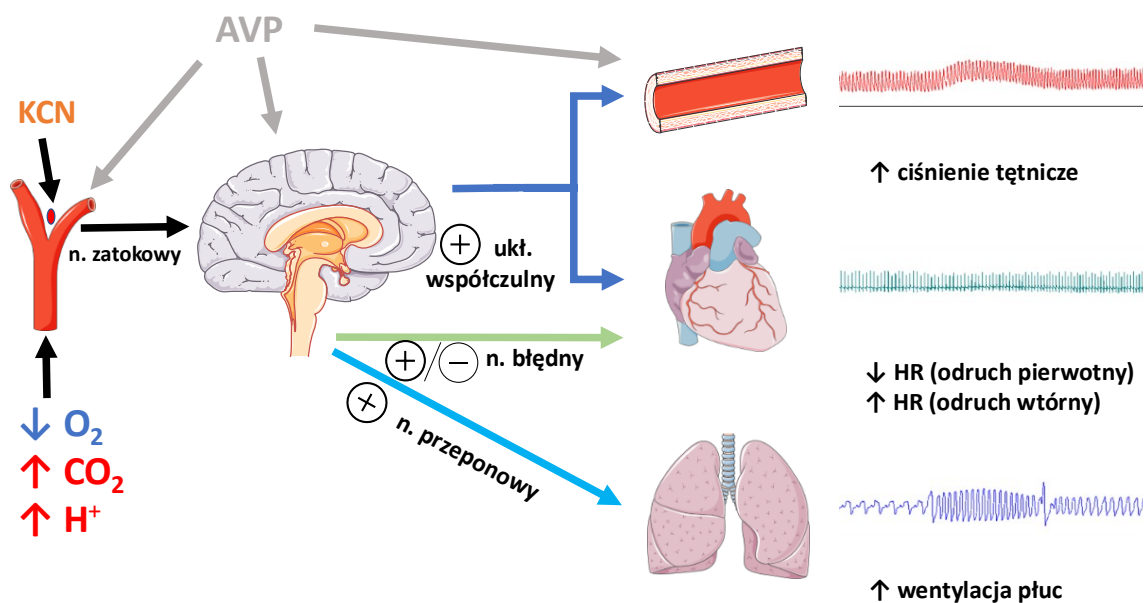
1.4.3. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych

1.4.3.1. Składowa krążeniowo-oddechowa

Wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych prowadzi przede wszystkim do pobudzenia ośrodka oddechowego, pobudzenia współczulnego oraz zmian aktywności nerwu błędnego skutkującymi odpowiednią oddechową i krążeniową [115,240]. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych może mieć charakter pierwotny lub wtórny ze wzorcem odpowiedzi krążeniowej zależnym od możliwości utrzymania wentylacji płuc [241,242].

Odruch pierwotny obecny jest, gdy pomimo pobudzenia ośrodka oddechowego nie zachodzą ruchy oddechowe i płuca nie są wentylowane, co ma miejsce na przykład przy niedrożności dróg oddechowych [243,244]. Dochodzi wówczas do silnej aktywacji układu współczulnego do układu naczyniowego i do serca, co skutkuje wzrostem oporu obwodowego, zmniejszeniem podatności układu żylnego oraz wzrostem kurczliwości serca [245]. W przypadku odruchu wywołanego przez hipoksję odpowiedzi te przeciwdziałają spadkowi ciśnienia wywołanego przez rozszerzenie łożyska naczyniowego spowodowanego niską prężnością tlenu [203]. Pobudzenie komórek chemoreceptorowych kłębków szyjnych, któremu towarzyszy brak pobudzenia aferentnego z mechanoreceptorów płucnych, prowadzi do aktywacji jąder ruchowych nerwu błędnego, które przy braku ruchów oddechowych klatki piersiowej i przepony nie są hamowane przez neurony obszaru VRC. Dochodzi wówczas do silnego pobudzenia gałęzi dosercowych nerwu błędnego i rozwoju bradykardii [223,246]. Jeżeli możliwe jest zwiększenie wentylacji, neurony VRC hamują przywspółczulne neurony ruchowe nerwu błędnego w rdzeniu przedłużonym. Dochodzi wtedy do odruchu wtórnego z chemoreceptorów tętnicznych [224,245]. W jego trakcie także występuje pobudzenie współczulne, jednak towarzyszy mu zahamowanie nerwu błędnego i tachykardia [224,246].

Najważniejsze bodźce i składowe odpowiedzi krążeniowo-oddechowej odruchu z chemoreceptorów tętnicznych kłębka szyjnego podsumowano na Rycinie 2.



Rycina 2. Najważniejsze bodźce oraz składowe odpowiedzi krążeniowo-oddechowej odruchu z chemoreceptorów tętnicznych wraz z postulowanym wpływem wazopresyny na odruch.

Spadek prężności O_2 , wzrost prężności CO_2 , wzrost kwasowości krwi oraz farmakologiczne wywołanie odruchu (KCN) z chemoreceptorów kłębków szyjnych, poprzez struktury znajdujące się w ośrodkowym układzie nerwowym skutkuje wzrostem wentylacji, pobudzeniem układu współczulnego i hamowaniem nerwu błędnego, które przekłada się na zwiększenie częstotliwości skurczu serca (oddech wtórny). W sytuacji braku zwiększenia wentylacji obserwowane jest pobudzenie nerwu błędnego, które skutkuje spadkiem częstotliwości skurczu serca (oddech pierwotny). AVP oddziałuje na regulację krążeniowo-oddechową w ośrodkowym układzie nerwowym, powoduje skurcz naczyń oporowych, postulowane jest także jej działanie regulacyjne na kłębek szyjny i odruch z chemoreceptorów tętnicznych.

KCN- cyjanek potasu, AVP- wazopresyna. W przygotowaniu ryciny użyto grafiki Servier Medical Art (licencja CC BY 4.0).

1.4.3.2. Inne składowe odpowiedzi

Szereg obserwacji wskazuje, że oprócz odpowiedzi krążeniowo-oddechowej wywołanej w ramach odruchu z chemoreceptorów tętnicznych, pobudzenie odruchu związane jest ze zmianami czynności licznych układów organizmu [40]. Pobudzenie odruchu z chemoreceptorów uczestniczy w zwiększeniu kurczliwości kardiomiocytów [247] oraz powoduje poszerzenie tętnic i zwiększenie przepływu wieńcowego [248,249]. Dodatkowo pobudzenie odruchu zmniejsza podatność układu żylnego, prowadzi do skurczu torebki śledziony i zwiększa hematokryt krwi [249–251]. Łącznie ze wzrostem wentylacji płuc i wzrostem ciśnienia tętniczego, zmiany te przyczyniają się do poprawy możliwości utrzymania pojemności minutowej serca i zawartości tlenu we krwi [40]. Zmiany wywołane odruchem z chemoreceptorów obejmują także złożoną odpowiedź endokrynną,

na którą składają się: zwiększony przepływ krwi przez przysadkę mózgową [36], nasilone uwalnianie AVP [252], wzrost osoczowego stężenia adrenaliny, noradrenaliny [253], ACTH [250] i kortyzolu [254]. Pobudzenie kłębków szyjnych wpływa także na regulację metabolizmu, gdyż zmniejsza aktywność współczulną do brunatnej tkanki tłuszczowej i ogranicza termogenezę [255], a także pobudza wydzielanie glukagonu podczas wysiłku [256]. Modyfikuje także czynność nerki powodując zmniejszenie filtracji kłębuszkowej i wydalania jonów potasu [257,258]. Obronny charakter odruchu z chemoreceptorów tętnicznych objawia się też poprzez skurcz oskrzeli [259,260] oraz zmniejszenie przepływu trzewnego i perystaltyki jelit [261,262]. W końcu odruch ten wpływa także na reakcje behawioralne, powodując pobudzenie i czuwanie [263,264], przyczyniając się do odczuwania duszności [265,266] oraz aktywując reakcję walki i ucieczki [203,257,267].

1.5. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych w stanach chorobowych

Wykazano istotny udział zwiększonej wrażliwości i tonicznego pobudzenia odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w patomechanizmie nadmiernej aktywności współczulnej w przebiegu nadciśnienia tętniczego, niewydolności mięśnia sercowego, obturacyjnego bezdechu sennego, niewydolności nerek oraz w cukrzycy [183,268–273]. Usunięcie kłębków szyjnych lub ich odnerwienie w modelach zwierzęcych nadciśnienia tętniczego, niewydolności serca i cukrzycy wiązało się ze zmniejszeniem aktywności współczulnej, obniżeniem ciśnienia tętniczego, zmniejszeniem reakcji presyjnej na wysiłek fizyczny oraz zmniejszeniem insulinooporności [274–277]. W przeszłości wykonywano jedno i obustronną chirurgiczną resekcję kłębka szyjnego celem łagodzenia duszności w przebiegu astmy oskrzelowej oraz przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [266,278]. Leczenie to zostało zarzucone ze względu na efekty uboczne w postaci zaburzeń oddychania i równowagi kwasowo-zasadowej, a także z powodu pojawienia się i dynamicznego rozwoju wziewnych leków rozszerzających oskrzela [279,280]. Z powodu wykazania ich istotnej roli w generowaniu nadmiernej aktywności współczulnej, kłębki szyjne stały się potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, co zostało przedstawione w dalszej części pt. *Udział chemoreceptorów tętnicznych w patofizjologii nadciśnienia tętniczego 1.6.4.*

1.6. Nadciśnienie tętnicze

1.6.1. Nadciśnienie tętnicze – epidemiologia

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z wiodących przyczyn chorobowości i umieralności. Zwiększa ono istotnie ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, w szczególności choroby niedokrwiennej serca, niewydolności serca, udaru, chorób tętnic obwodowych oraz niewydolności nerek [281–284]. Wykazano, że podwyższenie wartości skurczowego ciśnienia tętniczego o 10 mmHg związane jest z 45% większym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca i 65% większym ryzykiem udaru [285]. Z kolei obniżenie wartości ciśnienia tętniczego wiąże się z redukcją ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych i przedwczesnego zgonu [286].

Z danych WHO wynika, że NT występuje u 1,28 miliarda osób w przedziale wiekowym 30-79 lat, a nieprawidłowo wysokie wartości ciśnienia tętniczego stwierdza się u 34% dorosłych mężczyzn i u 32% dorosłych kobiet [285]. Polskie dane wskazują nawet na wyższy odsetek osób dorosłych z NT, gdyż podają standaryzowany współczynnik chorobowości w badaniach krajowej populacji wynoszący 42,7% dla mężczyzn i 35,3% dla kobiet [287,288].

Pomimo, że nefarmakologiczne metody leczenia NT nacelowane na redukcję masy ciała i zmianę „stylu życia” związane są z redukcją ciśnienia tętniczego i ryzyka sercowo-naczyniowego oraz pomimo, że w farmakoterapii NT dostępnych jest pięć grup leków o udowodnionej skuteczności, osoby z NT opornym wciąż stanowią istotne wyzwanie kliniczne [289–291]. Według aktualnych wytycznych Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC, *European Society for Cardiology*) oraz najnowszych wytycznych Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH, *European Society of Hypertension*) 10 do 20% pacjentów z NT spełnia kryteria nadciśnienia opornego, do których należy brak normalizacji ciśnienia tętniczego pomimo leczenie przynajmniej trzema lekami hipertensyjnymi, w tym diuretykiem, oraz pomimo wdrożenia interwencji nefarmakologicznych [281,284]. Wśród postulowanych przyczyn NT opornego wymienia się czynniki endokrynne, w tym AVP, oraz nadmierną aktywność układu współczulnego [281,292,293].

1.6.2. Nadciśnienie tętnicze – etiopatogeneza

Nadciśnienie tętnicze w około 85-95% przypadków ma złożoną oraz niejednorodną etiopatogenezę i określane jest jako NT pierwotne, natomiast w pozostałych 5-15%

ma ono charakter wtórny do jednoznacznie zdefiniowanego procesu patologicznego [281]. Do najczęstszych przyczyn wtórnego nadciśnienia tętniczego należą choroby mięszu nerki i naczyń nerkowych, hiperaldosteronizm oraz obturacyjny bezdech senny [281,294–296]. W przeciwieństwie do NT wtórnego, etiopatogeneza pierwotnego NT jest wieloczynnikowa i nie w pełni wyjaśniona [281,297,298]. Badania eksperymentalne i kliniczne na przestrzeni lat wykazują, że rozwój pierwotnego NT zależy między innymi od złożonych interakcji pomiędzy predyspozycjami genetycznymi a czynnikami środowiskowymi, zmian w układzie renina-angiotensyna-aldosteron, układzie endotelin, w wydzielaniu peptydów natriuretycznych, w aktywności układu wazopresynergicznego, w ośrodkowej i obwodowej regulacji nerwowej układu sercowo-naczyniowego, a także od procesu starzenia i przewlekłego stanu zapalnego [281,297–301].

Klasyczne modele regulacji ciśnienia tętniczego i rozwoju nadciśnienia tętniczego zostały przedstawione przez Arthura Guyton'a i Björna Folkow'a w drugiej połowie XX wieku. Model Guytona zakłada, że podstawowym czynnikiem prowadzącym do rozwoju NT są zaburzenia nerkowej regulacji ciśnienia tętniczego prowadzące do przesunięcia natriurezy i diurezy ciśnieniowej w kierunku wyższych wartości ciśnienia tętniczego [302].

Zgodnie z tą koncepcją w przebiegu rozwoju nadciśnienia tętniczego stan równowagi między zwiększaniem wydalania jonów sodowych w wyniku natriurezy presyjnej a wrodzoną tendencją nerek do zatrzymywania sodu i wody w warunkach aktywacji nerkowych mechanizmów presyjnych osiągany jest poprzez wzrost ciśnienia tętniczego [302,303]. W kolejnych pracach podkreślano niedoskonałość tego modelu, ponieważ nie uwzględniał on wpływu układu współczulnego i regulacji oporu naczyniowego na utrzymanie ciśnienia tętniczego [304], a także przeszacowywał rolę ciśnienia perfuzyjnego w nerkach w regulacji natriurezy i wolemii [305]. Ponadto w badaniach jako czynniki działające na nerki i sprzyjające rozwinięciu nadciśnienia tętniczego wykazano aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron, zmiany w budowie lub funkcji transporterów jonów sodowych i potasowych w kanalikach nerkowych, przewlekły proces zapalny toczący się w mięszu nerki, a także upośledzenie perfuzji mięszu nerki wynikające z nieprawidłowej budowy i funkcji naczyń mikrokrążenia [306].

Z kolei model Folkowa zakłada, że rozwój NT wynika z nieprawidłowości budowy i czynności naczyń makro- i mikrokrążenia objawiających się wrodzoną skłonnością naczyń oporowych do strukturalnej przebudowy charakteryzującej się zwiększeniem grubości ściany naczynia i ograniczeniem jego zdolności do rozkurczu, co w efekcie prowadzi do wzrostu oporu obwodowego skutkującego wzrostem ciśnienia tętniczego [307]. Do przyczyn

przebudowy i pogrubienia ściany naczyniowej oraz obniżonej reaktywności naczyń należy upośledzenie zależnego od śródbłonka mechanizmu rozkurczu naczyń, wynikający ze spadku wytwarzania tlenku azotu (NO, *nitric oxide*), przewlekły proces zapalny, jak również zaburzenia autoregulacji napięcia ściany oraz nasiloną odpowiedź naczynioskurczową na takie czynniki, jak AVP, katecholaminy, czy endoteliny [306]. Model ten uwzględniał również udział aktywacji układu współczulnego w regulacji oporu naczyniowego i rozwoju NT [307].

W etiologii NT stwierdza się istotną rolę zaburzeń równowagi autonomicznego układu nerwowego [212,270,308,309], w ramach których dochodzi do przesunięcia równowagi w kierunku układu współczulnego, i które stwierdzone jest zarówno we wczesnym stadium jak i długotrwałym NT [212,299]. Towarzyszy temu także zaburzenie odruchów sercowo-naczyniowych objawiające się zmniejszeniem czułości odruchu z baroreceptorów tętniczych [310] oraz zwiększoną czułością i toniczną aktywnością odruchu z chemoreceptorów tętniczych [200,277,311,312].

1.6.3. Udział układu wazopresynergicznego w patofizjologii nadciśnienia tętniczego

Zarówno badania z udziałem ludzi, jak i w modelach doświadczalnych wskazują, że nadmierna aktywność układu wazopresynergicznego i zwiększone wydzielanie wazopresyny związane są z rozwojem NT. Wykazano, że u szczurów z pierwotnym NT (SHR, *Spontaneously Hypertensive Rat*) osoczowe stężenie AVP jest skorelowane ze wzrostem ciśnienia tętniczego [313]. Jednocześnie szczury te mają silniejszą odpowiedź presyjną na obwodowo podaną AVP w porównaniu do szczurów normotensyjnych [313,314], a odpowiedź ta zależna jest od receptora V1a [315]. Na istotny udział receptorów V1 dla AVP w rozwoju NT wskazują doświadczenia, w ramach których szczurom SHR w okresie przednadciśnieniowym włączono leczenie selektywnym antagonistą receptorów V1, co skutkowało zahamowaniem rozwoju NT [316]. Jednak nieliczne prace nie potwierdzają nasilonego efektu presyjnego AVP u szczurów hipertensyjnych SHR [317], co może zależeć od układu eksperymentalnego oraz pochodzenia zwierząt z różnych hodowli.

W badaniach z udziałem ludzi stwierdzono zwiększone wydzielanie wazopresyny i jej biomarkera kopeptyny u nastolatków z pierwotnym NT [318], otyłych dzieci z NT [319] a także u pacjentów z NT nocnym [320]. Podwyższone wydzielanie AVP opisano również wśród pacjentów z opornym NT, u których osoczowe stężenia kopeptyny były istotnie wyższe niż u pacjentów z prawidłowo kontrolowanym ciśnieniem tętniczym

[293]. Podwyższone wartości AVP i kopeptyny były stwierdzane także w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym [321–323].

W NT obserwowane są także zmiany w układzie wazopresynergicznym w ośrodkowym układzie nerwowym. Wyniki badań wskazują, że ośrodkowo działająca AVP nie pełni istotnej roli w utrzymaniu spoczynkowej wartości ciśnienia tętniczego krwi w warunkach normotensji. Farmakologiczne blokowanie ośrodkowych receptorów V1a u zwierząt normotensyjnych nie powodowało istotnych zmian ciśnienia tętniczego [324,325]. Przeciwny efekt obserwowany jest u szczurów nadciśnieniowych SHR, u których blokowanie ośrodkowych receptorów V1a doprowadziło do obniżenia ciśnienia tętniczego [62,326,327]. Także u szczurów z NT uwarunkowanym zwiększoną ekspresją reniny (szczury szczepu TGR) zablokowanie mózgowych receptorów V1a obniżało istotnie ciśnienie tętnicze [324,328]. Jednocześnie szczury hipertensyjne SHR wykazują większą odpowiedź presyjną na domózgowe podanie AVP [329]. Ponadto szereg badań wskazuje, że aktywacja układu wazopresynergicznego i pobudzenie receptorów V1a pniu mózgu ma znaczącą rolę w rozwoju NT indukowanym hipoksją [9,60,183,212].

1.6.4. Udział chemoreceptorów tętniczych w patofizjologii nadciśnienia tętniczego

Odruch z chemoreceptorów tętniczych wykazuje fizjologiczną toniczną aktywność w warunkach normoksji u ludzi [330]. Deaktywacja odruchu u zdrowych osobników poprzez oddychanie 100% tlenem powoduje zmniejszenie aktywności współczulnej mierzonej metodami mikroneurografii [331], jednak badania zarówno u ludzi, jak i u normotensyjnych szczurów wskazują, że udział odruchu dla utrzymywania spoczynkowych wartości ciśnienia tętniczego i wentylacji płuc w warunkach normotensji jest słabo wyrażony [277,332–334]. Zwiększoną wrażliwość oraz toniczną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętniczych stwierdza się w stanach patologicznych, w szczególności w NT i niewydolności serca.

Nadmierna aktywność chemoreceptorów tętniczych jest istotnym patomechanizmem związanym z rozwojem NT z tłem neurogennym, a modulowanie aktywności kłębków szyjnych i odruchu z chemoreceptorów stanowi potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu NT. W badaniach morfologicznych i histologicznych stwierdzono, że kłębki szyjne szczurów SHR z NT są także istotnie większe niż u normotensyjnych szczurów WKY (Wistar-Kyoto) [335,336]. Towarzyszy temu remodeling sieci naczyniowej ze zmniejszeniem składnika naczyniowego oraz pogrubieniem tętniczki kłębkowej u szczurów SHR [337]. W oparciu o badanie histologiczne powiększenie kłębków szyjnych opisano również u pacjentów z NT

[338]. Potwierdziły to także analizy badań obrazowych z wykorzystaniem naczyniowej tomografii komputerowej, które pokazały, że kłębkki szyjne są istotnie większe u pacjentów z NT w porównaniu do osób normotensyjnych [339,340].

Praca doświadczalna przeprowadzona na szczurach hipertensyjnych SHR, która jako pierwsza zwróciła uwagę na związek odruchu z chemoreceptorów tętniczych z NT, została opublikowana przez profesora Jacka Przybylskiego pracującego wówczas w Zakładzie Fizjologii Akademii Medycznej Akademii Medycznej w Warszawie [341]. W kolejnych badaniach w tym modelu zwierzęcym wykazano zwiększoną wrażliwość i toniczną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętniczych w NT [276,277,311,312,342]. Zwiększoną czułość odruchu z chemoreceptorów tętniczych stwierdzono u młodych szczurów SHR jeszcze przed rozwinięciem nadciśnienia [342], co wskazuje na przyczynowy związek pomiędzy zwiększoną aktywnością odruchu a rozwojem NT. Potwierdzają to badania, w których odnerwienie kłębków szyjnych u młodych szczurów SHR w okresie przednadciśnieniowym zapobiegało rozwinięciu NT, a odnerwienie kłębków szyjnych u dorosłych szczurów hipertensyjnych SHR powodowało spadek ciśnienia tętniczego średnio o 17 mmHg ocenianego w rejestracjach telemetrycznych [343].

We wczesnych latach 80-tych XX wieku, profesor Andrzej Trzebski ze współpracownikami z Zakładu Fizjologii Akademii Medycznej w Warszawie wykazali, że zwiększona wrażliwość odruchu z chemoreceptorów tętniczych na hipoksję przy utrzymanej stałej wartości prężności dwutlenku węgla we krwi i wyrażająca się zwiększoną składową krążeniową i oddechową, obecna jest u młodych mężczyzn z pierwotnym NT [273]. W kolejnych badaniach, u pacjentów przejściowa hiperoksja w celu odwracalnej ostrej inaktywacji chemoreceptorów tętniczych skutkowałą obniżeniem aktywności współczulnej i spadkiem ciśnienia tętniczego krwi u osób z NT [273,334,344–346]. Wykazanie w badaniach doświadczalnych i klinicznych istotnej roli kłębków szyjnych w patogenezie NT doprowadziło do prób klinicznych z obustronnym i z jednostronnym usunięciem kłębków szyjnych w celu zmniejszenia nadmiernej aktywności współczulnej odpowiednio w niewydolności serca oraz w NT [347–350]. W pierwszym badaniu pilotażowym oceniającym wykonalność i bezpieczeństwo jednostronnej resekcji kłębka szyjnego u osób z opornym NT, u 8 z 15 pacjentów uzyskano obniżenie ciśnienia tętniczego średnio o 26 mmHg, a także zmniejszenie aktywności nerwów współczulnych zaopatrujących mięśnie szkieletowe [347]. Niedawno przedstawiono również wyniki jednostronnej ablacji ultradźwiękowej kłębków szyjnych u pacjentów z NT wskazujące na efekt hipotensyjny takiej interwencji [351]. Jednak w obserwacji 5-letniej obustronna resekcja kłębków szyjnych u pacjentów z niewydolnością

serca wiązała się z pogorszeniem odpowiedzi na hipoksję i prowadziła do nasilonych epizodów desaturacji hemoglobiny [352], co wskazuje na ograniczenia takiego podejścia zabiegowego celowanego na zmniejszenie aktywności odruchu z chemoreceptorów tętnicznych.

1.6.5. Związek regulacji układu oddechowego z patofizjologią nadciśnienia tętniczego

Czynność układu oddechowego jest nierozzerwalnie związana z czynnością układu sercowo-naczyniowego i wpływa na jego regulację, co umożliwia optymalizację dostarczania tlenu do tkanek [353]. Cykliczne zmiany objętości płuc związane z ich wentylacją, poprzez sprzężenia między ośrodkami oddechowymi i krążeniowymi rdzenia przedłużonego i mostu, odpowiadają za występowanie oddechowej niemiarowości zatokowej oraz modulowanie aktywności współczulnej w przebiegu cyklu oddechowego [226,353]. Ponadto podczas wdechu wzrasta objętość późnorozkuczowa oraz objętość wyrzutowa prawej komory, a parametry te ulegają zmniejszeniu w komorze lewej [354]. Również odruch z chemoreceptorów tętnicznych i odruch z baroreceptorów tętnicznych wzajemnie hamują się [245], co w przypadku zwiększonej aktywności odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w NT może przyczynić się do jednoczesnego osłabienia działania odruchu z baroreceptorów tętnicznych. Oddziaływanie układu oddechowego na regulację ciśnienia tętniczego przejawia się obecnością w zapisie ciągłym ciśnienia tętniczego fal Traubego – Heringa charakteryzujących się oscylacjami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego sprzężonymi z cyklem oddechowym [353,355]. Fale te są wynikiem zależnych od oddechu zmianami napięcia współczulnego, aktywności nerwu błędnego oraz interakcji odruchów z chemoreceptorów i baroreceptorów tętnicznych [353,355]. Zmienności ciśnienia tętniczego zależna od wentylacji płuc jest nasiloną w warunkach NT, zarówno u szczurów SHR [356] jak i u osób z NT [357]. Wykazano, że nasilenie zmienności ciśnienia tętniczego związane z wentylacją płuc przyczynia się do jego wyższych wartości u pacjentów z NT [353,356,357].

Z kolei zmiana wzorca oddychania polegająca na zwiększeniu objętości oddechowej i zwolnieniu częstości oddychania nasila aktywność nerwu błędnego i zwiększa czułość odruchu z baroreceptorów tętnicznych, co może przyczynić się do zmniejszenia napięcia współczulnego [353,358]. Wykazano, że ćwiczenia oddechowe polegające na spowolnieniu i pogłębieniu oddechu mogą być stosowane jako niefarmakologiczna metoda obniżania ciśnienia tętniczego [358,359]. Powtarzane ćwiczenia oddechowe na przestrzeni tygodni

więzały się z długoterminowym obniżeniem skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego [360,361].

Powyższe obserwacje wskazują, że układ oddechowy ma istotny wpływ na mechanizmy regulacyjne ciśnienia tętniczego zależne od aktywności autonomicznego układu nerwowego. W tym kontekście wydaje się zasadnym, aby zarówno w badaniach klinicznych jak i eksperymentalnych dotyczących mechanizmów NT oceniane były nie tylko parametry hemodynamiczne, ale również parametrów oddechowe.

1.7. Pierwotne nadciśnienie tętnicze w doświadczalnym modelu zwierzęcym – szczury Spontaneously Hypertensive

Szczury SHR mają genetycznie uwarunkowane NT i są powszechnie stosowanym zwierzęcym modelem tej choroby u ludzi [362]. Hipertensyjne szczury SHR wywodzą się od normotensyjnych szczurów Wistar, z których także pochodzą normotensyjne szczury Wistar-Kyoto (WKY) będące najczęściej stosowaną normotensyjną kontrolą dla szczurów SHR [363]. Szczury SHR mają stan przednadciśnieniowy przez pierwsze 6-8 tygodni życia ze skurczowym ciśnieniem krwi wynoszącym około 100 - 120 mm Hg, a NT z wartościami ciśnienia skurczowego dochodzącymi do 170-200 mm Hg rozwija się natomiast po osiągnięciu wieku 12-14 tygodni [364,365]. Podobnie jak u ludzi, NT rozwija się szybciej u samców niż samic SHR [366].

Wykazano, że hipertensyjne szczury SHR mają zmniejszoną czułość odruchu z baroreceptorów tętniczych, a także tonicznie nasiloną aktywność i zwiększoną czułość odruchu z chemoreceptorów tętniczych [343,367–369]. Zarówno zmiany w obrębie odruchów sercowo-naczyniowych, jak i zwiększenie oporów naczyniowych w łożysku tętniczym wyprzedzają rozwój NT [342,364,365,370].

2. Założenia i cel pracy

2.1. Założenia pracy

Wazopresyna jest jednym z kluczowych neuropeptydów biorących udział w utrzymaniu homeostazy w układzie sercowo-naczyniowym. Wykazano, że w warunkach nadciśnienia tętniczego dochodzi do zmian w układzie wazopresynergicznym. Wyniki badań opisane w literaturze wskazują ponadto, że w nadciśnieniu tętniczym obserwowana jest zwiększona aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. Wykazano obecność receptora V1a dla wazopresyny w kłębkach szyjnych u szczurów normotensyjnych Sprague-Dawley, a jej podanie w okolicę kłębka szyjnego skutkowało zmianą parametrów krążeniowych i oddechowych.

Analiza dostępnych badań wskazuje, że AVP wywiera efekt presyjny i istotnie wpływa na regulację parametrów hemodynamicznych, a zjawiska te są nasilone w nadciśnieniu tętniczym. Jednocześnie nie jest dobrze poznany wpływ AVP na regulację krążeniowo-oddechową zależną od kłębków szyjnych, jak również wpływ AVP na regulację czynności oddechowej w warunkach nadciśnienia tętniczego.

W oparciu o opublikowane dotychczas wyniki badań można przypuszczać, że AVP nasila aktywność kłębków szyjnych, co powinno wpływać na zmiany w odpowiedzi krążeniowej i oddechowej. Ze względu na zwiększone działanie presyjne układu wazopresynergicznego w nadciśnieniu tętniczym z należy przypuszczać, że wpływ AVP na regulację krążeniowo-oddechową jest silniej wyrażony w warunkach hipertensji.

2.2. Cele pracy

Celem pracy było zbadanie udziału AVP i kłębków szyjnych w regulacji krążeniowo-oddechowej u szczurów SHR z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym i porównanie z odpowiedzią u zwierząt normotensyjnych WKY.

Do szczegółowych celów pracy należała odpowiedzenie na następujące pytania badawcze:

1. Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych są nasilone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY?

2. Czy kłębki szyjne i toniczna aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych biorą udział w utrzymaniu spoczynkowych wartości parametrów krążeniowych i oddechowych u szczurów SHR i szczurów WKY?
3. Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na obwodowo podaną AVP różnią się pomiędzy hipertensyjnymi szczurami SHR a normotensyjnymi szczurami WKY?.
4. Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na AVP podaną w okolicę kłębków szyjnych różnią się pomiędzy hipertensyjnymi szczurami SHR a normotensyjnymi szczurami WKY?
5. Czy kłębki szyjne biorą udział w odpowiedziach krążeniowej i oddechowej na obwodowo podaną AVP u szczurów SHR i szczurów WKY?.
6. Czy receptor V1a dla AVP bierze udział w utrzymaniu spoczynkowych wartości parametrów krążeniowych i oddechowych u szczurów SHR i szczurów WKY?
7. Czy odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na podanie AVP obwodowe i miejscowe w okolicę kłębka szyjnego zależą od receptora V1a u szczurów SHR i szczurów WKY?
8. Czy receptory V1a dla AVP występują na komórkach chemowrażliwych (typu I) kłębków szyjnych u szczurów SHR i szczurów WKY?

3. Materiał i metody

Doświadczenia przeprowadzono w Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej. Badanie zostało zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie [WAW2/096/2019]. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z przepisami krajowymi oraz Dyrektywą Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Badania były finansowane w ramach 8 edycji programu Diamentowy Grant (numer DI2018 020648).

Badanie składało się z trzech części:

- I. Pomiary ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej u zwierząt czuwających.
- II. Pomiary parametrów krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych, z oceną zmian ciśnienia tętniczego, częstości serca, przepływów tętnicznych, wentylacji płuc,

częstotliwości oddechów i końcowo-wydechowego stężenie dwutlenku węgla w odpowiedzi na: farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych, odnerwienie kłębków szyjnych, wazopresynę podaną ogólnoustrojowo i miejscowo w okolicę kłębka szyjnego, blokadę receptora V1a.

III. Ocena występowania receptora V1a dla wazopresyny w kłębkach szyjnych z wykorzystaniem immunobarwień i obrazowania w mikroskopii konfokalnej.

3.1. Zwierzęta

W badaniu zostały użyte dorosłe samce szczurów Spontaneously Hypertensive Rat (SHR, szczury hipertensyjne) oraz jako kontrola szczury Wistar Kyoto (WKY, szczury normotensyjne) w wieku 12-14 tygodni i ważące 310-360g. Zwierzęta pozyskano z hodowli w Centralnym Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

3.2. Warunki utrzymania zwierząt

Zwierzęta przebywały po 2 osobniki w standardowych klatkach bytowych z regulowaną dobą świetlną (cykl światło-ciemność, 12h/12h), kontrolowaną temperaturą (20-24⁰C) i wilgotnością względną (50%). Środowisko życia zwierząt urozmaicone było tekturowymi domkami, a zwierzęta żywiono paszą bytową dostosowaną do wieku zwierząt. Karma i woda dostępne były *ad libitum*. Przed rozpoczęciem badań inwazyjnych zwierzęta przechodziły co najmniej 2-tygodniowy okres aklimatyzacji.

3.3. Opieka okołozabiegowa i znieczulenie

Wszystkie procedury inwazyjne wykonywano w znieczuleniu terminalnym przy użyciu uretanu podawanego dootrzewnowo (1,5 g/kg m.c., Sigma-Aldrich, Europa). Głębokość znieczulenia oceniano poprzez monitorowanie czynności życiowych: częstości pracy serca, częstości i wzorca oddychania, odruchów powiekowego i rogówkowego, prób bólowych (szczypanie palcami skóry i końcówki ogona), oraz ocenę stopnia zwiotczenia mięśni. Czynności zabiegowe rozpoczynano dopiero po całkowitym ustąpieniu odruchów obronnych.

Doświadczenia przeprowadzano w pracowni eksperymentalnej wentylowanej mechanicznie z regulowaną temperaturą pomieszczenia (temperaturę utrzymywano w zakresie około 21- 24°C).

3.4. Część I badania – pomiary ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej u zwierząt czuwających

Siedem dni przed rozpoczęciem pomiarów krążeniowo-oddechowych w warunkach znieczulenia ogólnego, szczury SHR i szczury kontrolne WKY poddano pomiarowi ciśnienia tętniczego w celu potwierdzenia występowania wysokich wartości ciśnienia tętniczego u zwierząt hipertensyjnych SHR i prawidłowego ciśnienia tętniczego u zwierząt normotensyjnych WKY. Pomiar ciśnienia wykonywano nieinwazyjną metodą wolumetryczną z użyciem mankietów zakładanych na ogon szczura i podłączonych do urządzenia CODA® High Throughput System (Kent Scientific, Stany Zjednoczone). Przed wykonaniem pomiarów szczury umieszczano w poskramiaczach z plexi w kształcie cylindra o wymiarach 21 x 7 cm (Kent Scientific, Stany Zjednoczone), które były kładzione na platformie grzewczej na okres około 10 minut w celu uzyskania temperatury 34-35°C u nasady ogona zapewniającej optymalne rozszerzenie naczyń krwionośnych w ogonie i prawidłową rejestrację ciśnienia tętniczego. U podstawy ogona umieszczano mankiet służący do zamknięcia tętnicy ogonowej, a dystalnie od niego mankiet do pomiaru zmian objętości ogona zależnych od przepływu krwi [371,372]. U każdego szczura wykonywano 15 pomiarów, z których pierwsze 5 stanowiły cykle aklimatyzacyjne, a kolejnych 10 było poddawane dalszej ocenie pod kątem poprawności technicznej wykonanego pomiaru. W ramach przeprowadzonych pomiarów otrzymywano wartości skurczowego ciśnienia tętniczego (SBP, *systolic blood pressure*), rozkurczowego ciśnienia tętniczego (DBP, *diastolic blood pressure*) oraz średniego ciśnienia tętniczego (MABP, *mean arterial blood pressure*). Następnie wyliczano średnią wartość SBP, DBP oraz MABP ze wszystkich technicznie poprawnych cykli pomiarowych zmierzonych u danego osobnika. Wartości średnie były następnie analizowane statystycznie.

3.5. Część II badania – pomiary parametrów krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych

Badania przeprowadzono na szczurach SHR i WKY w znieczuleniu ogólnym, u których rejestrowano w sposób ciągły ciśnienie tętnicze, elektrokardiogram (EKG), przepływ krwi w tętnicy udowej, przepływy powietrza w drogach oddechowych, stężenie

dwutlenku węgla w powietrzu oddechowym. W oparciu o uzyskane rejestracje analizowano następujące parametry: I) hemodynamiczne - średnie ciśnienie tętnicze (MABP), częstość serca (HR, *heart rate*), przepływ przez tętnicę udową (FABF, *femoral artery blood flow*); II) oddechowe - wentylację minutową płuc (MV, *minute ventilation*), częstotliwość oddechów (RR, *respiratory rate*) oraz końcowo-wydechowe stężenie dwutlenku węgla (ETCO₂, *end-tidal CO₂*). W celu przeprowadzenia pomiarów szczurom wszczepiano cewniki do tętnicy i żyły udowej, które służyły odpowiednio do pomiarów ciśnienia tętniczego i do podań dożylnych., zakładano sondę dopplerowską na tętnicę udową celem oceny przepływu krwi oraz wkładano elektrody igłowe w celu rejestracji EKG. Następnie wykonywano tracheostomię z założeniem rurki tchawiczej oraz podłączeniem do niej sondy kapnografu w celu rejestracji pomiarów oddechowych. U części zwierząt wykonywano implantację cewnika do tętnicy szyjnej zewnętrznej, który umożliwiał miejscowe podawanie AVP w okolicę kłębka szyjnego. U części szczurów wykonywano także obustronne przecięcie nerwu zatokowego będącego odgałęzieniem nerwu językowo-gardłowego w celu odnerwienia kłębka szyjnego lub pozorowane odnerwienie. Procedury zabiegowe wykonywano w znieczuleniu ogólnym z wykorzystaniem uretanu, a szczur umieszczany był na grzbiecie na stoliku operacyjnym z matą grzewczą. Przez cały okres trwania doświadczenia monitorowano komfort cieplny zwierzęcia poprzez powtarzanie pomiarów temperatury mierzonej w odbytnicy.

3.5.1. Procedury chirurgiczne

3.5.1.1. Cewniki naczyniowe

Po nacięciu skóry w lewej okolicy pachwinowej szczura odsłaniano pęczek naczyniowo-nerwowy, a następnie odpreparowywano tętnicę udową i żyłę udową od otaczających tkanek. Poliuretanowe cewniki naczyniowe (część wewnątrznaczyniowa: średnica wewnętrzna 0,30 mm, średnica zewnętrzna 0,64 mm, długość 30-35 mm; numer katalogowy BB520-25; część zewnątrznaczyniowa: średnica wewnętrzna 0,64 mm, średnica zewnętrzna 1,02 mm, długość 60 mm, numer katalogowy BB520-40; Scientific Commodities, Inc., Lake Havasu City, AZ, Stany Zjednoczone) wypełniano heparynizowanym roztworem 0,9% NaCl (niefrakcjonowana heparyna 500 IU/ml; Polfa Warszawa SA, Polska). Po nacięciu tętnicy i żyły cewniki wprowadzano do naczyń. Końcówkę cewnika tętniczego umieszczono na głębokości 3 – 3,5 cm w aorcie brzusznej poniżej rozgałęzienia tętnic nerkowych, a końcówkę cewnika żylnego w żyłę główną dolną tuż powyżej jej rozwidlenia. Cewniki

dodatkowo mocowano podwiązką naczyniową by zapobiec ich przemieszczeniu w trakcie doświadczenia i ewentualnemu krwawieniu. Dystalny odcinek naczyń podwiązywano. Cewnik tętniczy był połączony z układem pomiarowym i służył do rejestracji pulsacyjnego ciśnienia krwi, a cewnik żylny służył do systemowego podawania badanych substancji i dodatkowych dawek znieczulenia. Procedura implantacji cewników naczyniowych oparta była na technice stosowanej w Katedrze Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88].

3.5.1.2. Sonda dopplerowska

Po nacięciu skóry w prawej pachwinie odsłaniano udowy pęczek naczyniowo-nerwowy. Prawą tętnicę udową ostrożnie oddzielano od otaczających tkanek i żyły, a na tętnicy umieszczano sondę dopplerowską. Pomiary przepływu tętniczego oceniano metodą dopplerowską przy użyciu akustycznej sondy przepływowej połączonej z dedykowanym przepływomierzem (typ T106, Transonic System Inc., Ithaca, N.Y., Stany Zjednoczone). Procedura pomiaru przepływu krwi oparta była na technice stosowanej w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym [373].

3.5.1.3. Elektrody EKG

Trzy elektrody igłowe ze stali nierdzewnej umieszczano podskórnice w prawej i lewej okolicy podobojczykowej oraz w prawym dolnym kwadrancie brzucha w celu uzyskania odprowadzenia dwubiegunowego i zapisu EKG oraz HR.

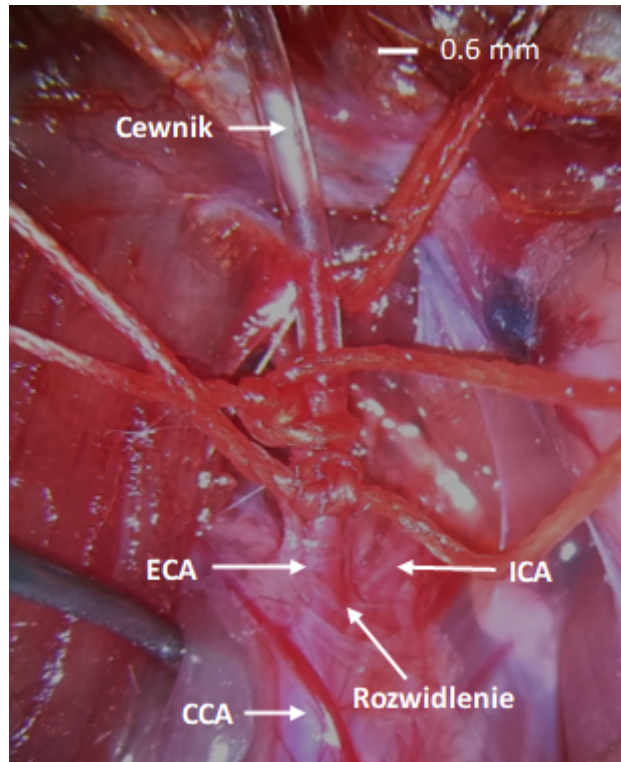
3.5.1.4. Rurka tchawicza

W celu wprowadzenia rurki tchawiczej do dróg oddechowych przecinano skórę powyżej mostka i po odpreparowaniu tkanki podskórnej oraz odsunięcia mięśni mostkowo-gnykowych odsłaniano tchawicę. Wykonywano 2-3 mm poziome nacięcie więzadła pierścieniowego na środkowym poziomie między mostkiem a krtanią. Rurkę polietylenową (średnica wewnętrzna - 2 mm; średnica zewnętrzna - 2,5 mm; długość - 15 mm) wprowadzano do tchawicy i zabezpieczano dodatkowo podwiązką chirurgiczną. Następnie ściśle przyłączano głowicę przepływową dedykowaną małym zwierzętom laboratoryjnym (RX237B, Biopac Systems, Goleta, CA, Stany Zjednoczone) do rurki tchawiczej przy użyciu łącznika silikonowego w celu rejestracji przepływu powietrza i częstości oddechów. W kolejnym etapie do rurki podłączano kapnograf dedykowany do gryzoni (CapnoScan, Kent Scientific, Torrington, CT, Stany Zjednoczone) w celu rejestracji ETCO₂. Procedura pomiaru

wentylacji i ETCO₂ oparta była na technice stosowanej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88,374].

3.5.1.5. Cewniki do podań miejscowych w okolicy kłębka szyjnego

Po wszczepieniu rurki tchawiczej u części zwierząt odsłaniano pod mikroskopem operacyjnym rozwidlenie tętnicy szyjnej wspólnej i izolowano tętnicę szyjną zewnętrzną w jej proksymalnej części. Tętnicę szyjną zewnętrzną podwiązywano dystalnie od rozwidlenia tętnicy szyjnej wspólnej, a cewnik tętniczy (część wewnątrznaczyniowa: średnica wewnętrzna 0,30 mm, średnica zewnętrzna 0,64 mm, długość 6 mm; numer katalogowy BB520-25; część zewnątrznaczyniowa: średnica wewnętrzna 0,64 mm, średnica zewnętrzna 1,02 mm, długość 60 mm, numer katalogowy BB520-40; Scientific Commodities, Inc., Lake Havasu City, AZ, Stany Zjednoczone) wypełniano heparynizowanym roztworem 0,9% chlorku sodu (niefrakcjonowana heparyna 500 IU/ml; Polfa Warszawa SA, Polska), a następnie implantowano 6 mm powyżej rozwidlenia, jego końcówkę umieszczając bezpośrednio w okolicy rozwidlenia. Cewnik dodatkowo mocowano podwiązką naczyniową by zapobiec jego przemieszczeniu w trakcie doświadczenia i ewentualnemu krwawieniu. Cewnik służył do podawania AVP miejscowo w okolicę kłębka szyjnego. Prezentowany sposób założenia cewnika był modyfikacją techniki opisaną i stosowaną w badaniach w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88].



Rycina 3. Przykładowe zdjęcie cewnika naczyniowego wszczepionego do tętnicy szyjnej zewnętrznej, który służy do podań miejscowych w okolicę kłębka szyjnego

ECA (*external carotid artery*) - tętnica szyjna zewnętrzna, ICA (*internal carotid artery*) - tętnica szyjna wewnętrzna, CCA (*common carotid artery*) - tętnica szyjna wspólna.

3.5.1.6. Odnerwienie kłębków szyjnych

Z dostępu przez uprzednio wykonane nacięcia powłok w okolicy szyi w celu wprowadzenia rurki tchawiczej, u wybranych zwierząt pod mikroskopem operacyjnym ostrożnie wypreparowywano oba rozwidlenia tętnic szyjnych. U części z nich po ostrożnym atraumatycznym oddzieleniu nerwu zatokowego od sąsiadujących tkanek wykonano obustronnie selektywne przecięcie nerwu w celu trwałego zniesienia odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. Technika odnerwienia kłębków szyjnych (CBX) oparta była o wcześniejsze doniesienia w literaturze [262,343,375]. Skuteczne odnerwienie kłębka potwierdzano przez brak odpowiedzi na dożylne podanie cyjanku potasu (KCN) (30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) [343]. U zwierząt poddawanych operacji pozorowanej po odpreparowaniu okolicy rozwidlenia tętnic szyjnych nie przerywano ciągłości nerwów zatokowych.

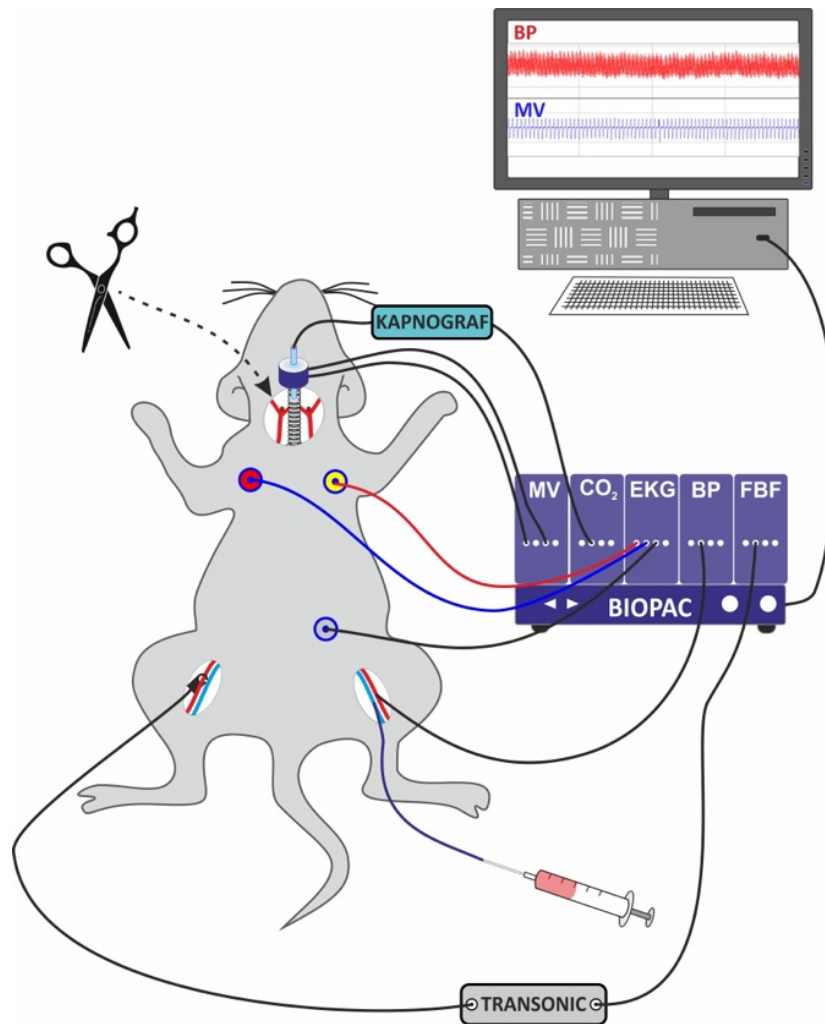
3.5.1.7. Uśmiercenie zwierząt

Bezpośrednio po zakończeniu badania parametrów hemodynamicznych, oddechowych i podaniu badanych substancji, znieczulone szczury uśmiercano poprzez dyslokację kręgów

szyjnych. Przed uśmierceniem zwierząt potwierdzano głębokość znieczulenia i podawano dodatkową dawkę uretanu dożylnie. Po uśmierceniu zwierząt pobierane były rozwidlenia tętnic szyjnych z kłębkami szyjnymi w celu wykonania barwień immunofluorescencyjnych.

3.5.2. Pomiary hemodynamiczne i oddechowe

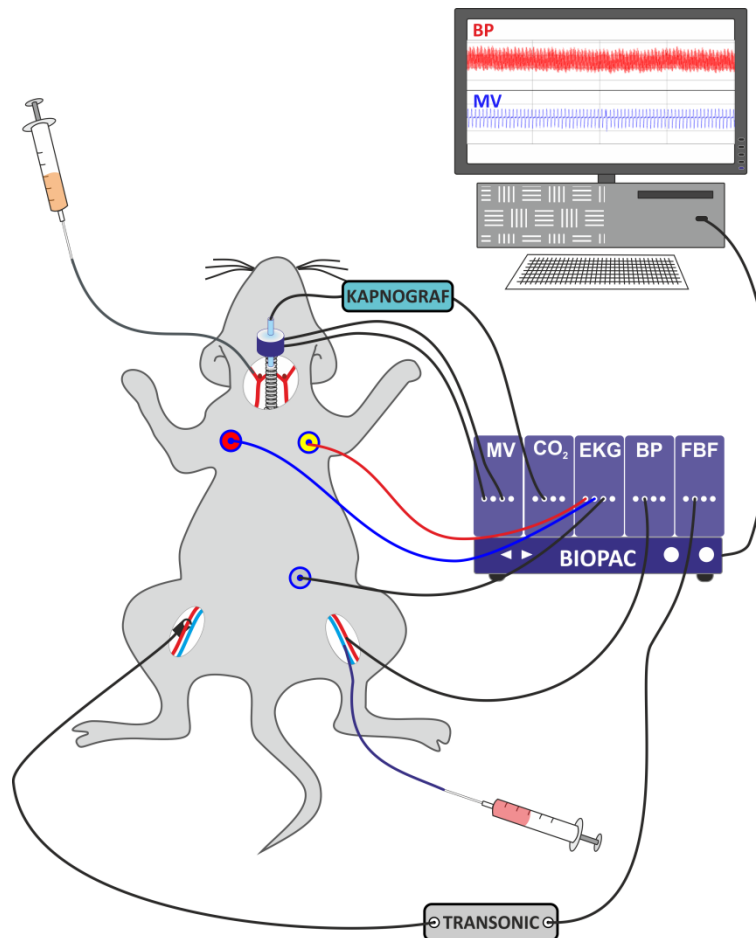
Po kalibracji układu rejestrującego, przetwornik ciśnienia był podłączany do cewnika tętniczego, a przetwornik różnicy ciśnień do głowicy przepływu powietrza. Sygnały ciśnienia krwi, przepływu powietrza i EKG były wzmacniane i podawane do przetwornika analogowo-cyfrowego, digitalizowane i rejestrowane w sposób ciągły w stacji PC (system MP100, Biopac Systems, Goleta, CA, Stany Zjednoczone). Sygnały z przepływomierza dopplerowskiego przepływu krwi w tętnicy udowej oraz z kapnografu były podawane do aparatury pomiarowej (system MP100) i rejestrowane w sposób ciągły jednocześnie z ciśnieniem tętniczym i przepływem powietrza. Wszystkie sygnały były próbkowane z częstotliwością 1 kHz. Korzystając z oprogramowania AcqKnowledge 3.7 (Biopac Systems, Goleta, CA, Stany Zjednoczone), uzyskane surowe rejestracje przekształcano w celu uzyskania następujących parametrów: średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) z pulsacyjnego ciśnienia krwi, częstość serca (HR) z EKG, średni przepływ przez tętnicę udową (FABF) z przepływu tętniczego, wentylacja minutowa (MV) i częstotliwość oddechów (RR) z przepływu powietrza oraz końcowo wydechowe stężenie dwutlenku węgla (ETCO₂) z kapnografii. Układy pomiarowe zwierząt przygotowanych do pomiarów krążeniowo-oddechowych podsumowano na Rycinie 4 dla podań dożylnych oraz Rycinie 5 dla podań do tętnicy szyjnej zewnętrznej.



Rycina 4. Układ pomiarowy dla podań dożylnych AVP

Szczur przygotowany do rejestracji parametrów krążeniowo-oddechowych w systemie Biopac (podłączone: cewnik tętniczy do przetwornika ciśnienia (BP); cewnik żylny do mikrostrzykawki do podań dożylnych; sonda dopplerowska do przepływomierza (Transonic/FBF); elektrody do EKG; rurka tchawicza do przetwornika różnicy ciśnień (MV); linia do kapnografu/ETCO₂). Zaznaczono miejsce (nożyce) obustronnego odnerwienia kłębka szyjnego/zabiegu pozorowanego.

BP - ciśnienie tętnicze, MV - wentylacja minutowa, EKG - elektrokardiogram, FBF - przepływ przez tętnicę udową.



Rycina 5. Układ pomiarowy do podań AVP w okolicę kłębka szyjnego

Szczur przygotowany do rejestracji parametrów krążeniowo-oddechowych w systemie Biopac (podłączone: cewnik tętniczy do przetwornika ciśnienia (BP); cewnik żylny do mikrostrzykawki; cewnik w tętnicy szyjnej zewnętrznej do mikrostrzykawki (podania AVP w okolicę kłębka szyjnego); sonda dopplerowska do przepływomierza (Transonic/BBF); elektrody do EKG; rurka tchawicza do przetwornika różnicy ciśnienia (MV); linia do kapnografu/ETCO2)..

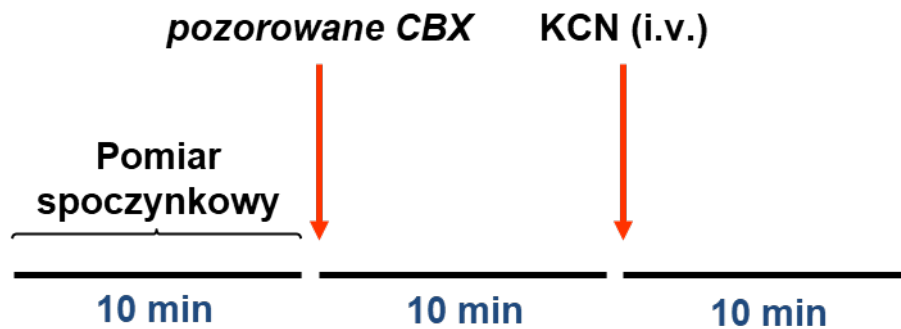
BP- ciśnienie tętnicze, MV- wentylacja minutowa, EKG- elektrokardiogram, FBF- przepływ przez tętnicę udową.

3.5.3. Serie doświadczeń pomiarów krążeniowo-oddechowych

3.5.3.1. Seria 1 – ocena odruchu z chemoreceptorów tętniczych

U hipertensyjnych szczurów SHR (n=6) i normotensyjnych szczurów WKY (n=6) z pozorowanym odnerwieniem kłębków szyjnych badano odruch z chemoreceptorów tętniczych metodą farmakologiczną. Po podłączeniu zwierzęcia do układu pomiarowego i stabilizacji parametrów krążeniowo-oddechowych przez okres 10 minut rejestrowano spoczynkowe parametry hemodynamiczne i oddechowe. Następnie wykonywano pozorowane odnerwienie kłębków szyjnych i u badanych zwierząt wywoływano odruch z

chemoreceptorów tętniczych poprzez dożylnie podanie bolusu cyjanku potasu (KCN) (30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) i kontynuowano rejestrację badanych parametrów przez kolejne 10 minut. Schemat podań przedstawia Rycina 6.

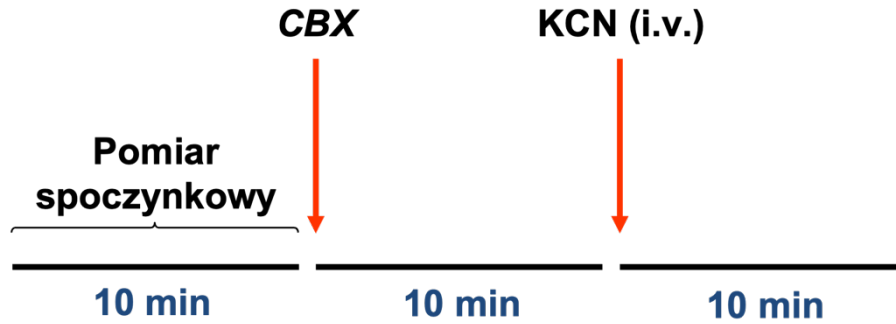


Rycina 6. Schemat pomiarów w serii 1

Pozorowane CBX- pozorowane obustronne odnerwienie kłębków szyjnych; KCN- cyjanek potasu; i.v. (intravenous) - infuzja dożylna.

3.5.3.2. Seria 2 - ocena odruchu z chemoreceptorów tętniczych po odnerwieniu kłębków szyjnych

U hipertensyjnych szczurów SHR (n=6) i normotensyjnych szczurów WKY (n=6) badano odruch z chemoreceptorów tętniczych metodą farmakologiczną po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych. Po podłączeniu zwierzęcia do układu pomiarowego i stabilizacji parametrów krążeniowo-oddechowych przez okres 10 minut rejestrowano spoczynkowe parametry hemodynamiczne i oddechowe. Następnie odnerwiono obustronnie kłębki szyjne i wywołano odruch z chemoreceptorów poprzez dożylnie podanie cyjanku potasu (KCN) (30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$). Schemat podań przedstawia Rycina 7.

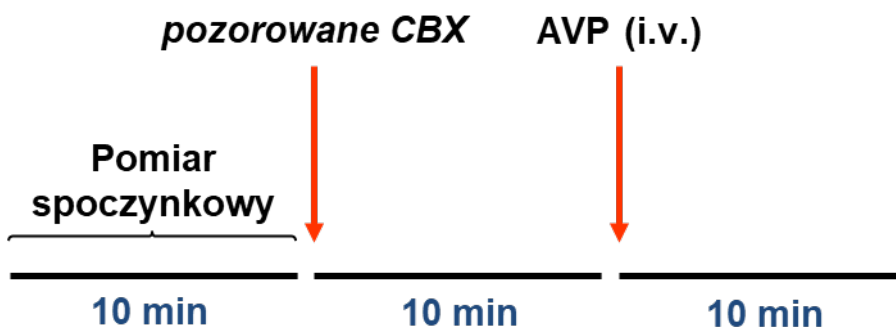


Rycina 7. Schemat pomiarów w serii 2

CBX- obustronne odnerwienie kłębków szyjnych; KCN- cyjanek potasu; i.v. (intravenous) – infuzja dożylna.

3.5.3.3. Seria 3 - dożylna podanie wazopresyny

U hipertensyjnych szczurów SHR (n=6) i normotensyjnych szczurów WKY (n=6) z pozorowanym odnerwieniem oceniano odpowiedź na dożylna podanie AVP. Po podłączeniu szczura do układu pomiarowego i stabilizacji parametrów krążeniowo-oddechowych przez okres 10 minut rejestrowano spoczynkowe parametry hemodynamiczne i oddechowe. Następnie wykonywano pozorowane odnerwienie kłębków szyjnych i podawano dożylnie AVP (10 ng/100 μ L i.v.; Sigma-Aldrich, Europa). Schemat podań przedstawia Rycina 8.

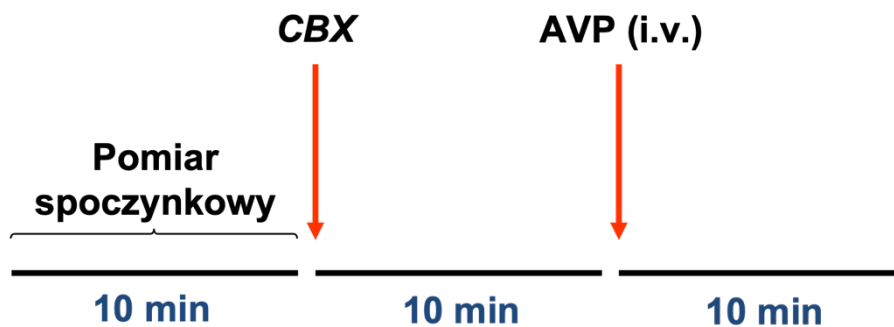


Rycina 8. Schemat pomiarów w serii 3

Pozorowane CBX- pozorowane obustronne odnerwienie kłębków szyjnych; AVP – wazopresyna; i.v. (intravenous) - infuzja dożylna

3.5.3.4. Seria 4 - dożylne podanie wazopresyny po odnerwieniu kłębków szyjnych

U hipertensyjnych szczurów SHR (n=6) i normotensyjnych szczurów WKY (n=6) z pozorowanym odnerwieniem oceniano odpowiedź na dożylne podanie AVP. Po podłączeniu zwierzęcia do układu pomiarowego i stabilizacji parametrów krążeniowo-oddechowych przez okres 10 minut rejestrowano spoczynkowe parametry hemodynamiczne i oddechowe. Następnie odnerwiano obustronnie kłębki szyjne i podano dożylnie AVP (10 ng/100 µL i.v.; Sigma-Aldrich, Europa). Schemat podań przedstawia Rycina 9.

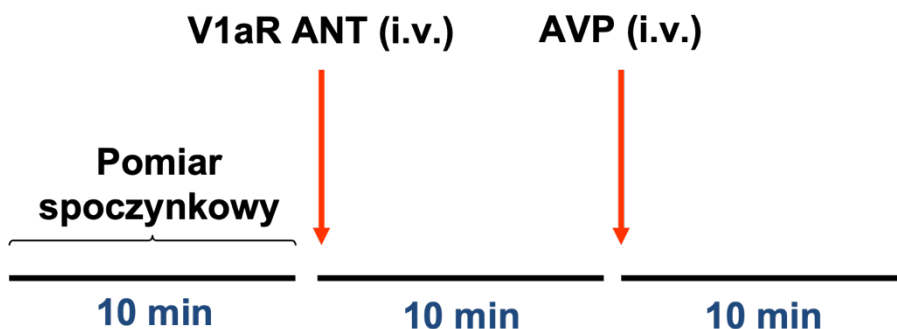


Rycina 9. Schemat pomiarów w serii 4

CBX- obustronne mechaniczne odnerwienie kłębków szyjnych; AVP – wazopresyna; i.v. (intravenous) - infuzja dożylna.

3.5.3.5. Seria 5 - dożylne podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a

Poddane doświadczeniu zostało 12 szczurów (SHR: n=6, WKY: n=6). Po podłączeniu układów pomiarowych dziesięć minut przeznaczono na stabilizację parametrów krążeniowo-oddechowych. Selektywny antagonistą receptora V1a - (d(CH₂)₅1,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (Tocris, Europe) - został podany dożylnie (5 µg/100 µL). Po ustabilizowaniu się parametrów hemodynamicznych i oddechowych (10 minut) podano dożylnie AVP (10 ng/100 µL i.v.; Sigma-Aldrich, Europa). Schemat podań przedstawia Rycina 10.

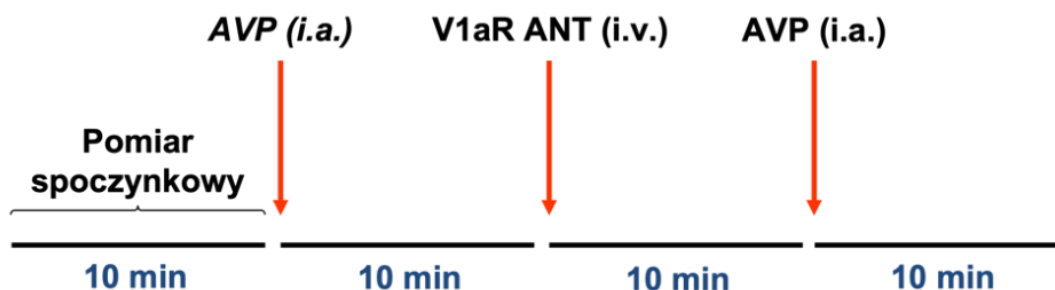


Rycina 10. Schemat pomiarów w serii 5

V1aR ANT- antagonista receptora V1a, AVP- wazopresyna, i.v. (intravenous)- infuzja dożylna

3.5.3.6. Seria 6 - dotętnicze podanie wazopresyny przed i po podaniu antagonisty receptora V1a

Poddane doświadczeniu zostało 12 szczurów (SHR: n=6, WKY: n=6). Po podłączeniu układów pomiarowych dziesięć minut przeznaczono na stabilizację parametrów krążeniowo-oddechowych. Zarejestrowano spoczynkowe parametry hemodynamiczne i oddechowe. Podano miejscowo AVP (4 ng/50 μ L i.a.; Sigma-Aldrich, Europa). Dziesięć minut przeznaczono na stabilizację parametrów krążeniowo-oddechowych. Następnie podano dożylnie selektywnego antagonistę receptora V1a (d(CH₂)₅₁,Tyr(Me)₂,Arg₈) Vasopressin (Tocris, Europe) (5 μ g/100 μ L). Po ustabilizowaniu się parametrów hemodynamicznych i oddechowych (10 minut) powtórzono drugie, miejscowe podanie AVP. Schemat podań przedstawia Rycina 11.



Rycina 11. Schemat pomiarów w serii 6

AVP – wazopresyna; V1aR ANT - antagonista receptora V1a; i.a. (intraarterial) - infuzja dotętnicza; i.v. (intravenous) - infuzja dożylna.

3.5.4. Związki stosowane w pomiarach krążeniowo-oddechowych w części II

Uretan (Sigma-Aldrich, Europa; numer katalogowy- U2500)

Substancją stosowaną do znieczulenia ogólnego szczurów poddanych doświadczeniu był uretan podawany dootrzewnowo w dawce 1,5g/kg masy ciała. Środek ten wykazuje ograniczony wpływ na parametry oddechowe i odruchy sercowo-naczyniowe, w związku z czym jest często stosowany w doświadczeniach terminalnych na zwierzętach w badaniach układu sercowo-naczyniowego oraz badaniach układu oddechowego [376–380]. Uretan wykazuje wielogodzinne działanie, co daje możliwości wykonywania długotrwałych pomiarów oraz ogranicza konieczność śródoperacyjnego stosowania dodatkowych analgetyków [381]. Dawka oraz droga podania były oparte na doniesieniach z literatury [382] oraz wcześniej prowadzonych doświadczeniach w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88,369].

Cyjank potasu (KCN) (Sigma-Aldrich, Europa; numer katalogowy- 60178)

Cyjank potasu (KCN) podawany w dawce (30 µg/100 µL) był używany w przeprowadzonych badaniach w celu farmakologicznego wywołania odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. KCN jest inhibitorem oksydazy cytochromu C i blokuje szlak fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, a tym samym hamuje proces oddychania komórkowego, co prowadzi do hipoksji komórkowej. Podanie dożylnie KCN aktywuje odruch z chemoreceptorów tętnicznych w mechanizmie hipoksji komórek chemowrażliwych kłębków szyjnych. Podawana w doświadczeniach dawka była opisywana w literaturze jako odpowiednia do wywołania odruchu z chemoreceptorów tętnicznych bez ogólnoustrojowego działania toksycznego i była z powodzeniem stosowana w trakcie wcześniejszych doświadczeń [200,383,384].

Wazopresyna (AVP) (Sigma-Aldrich, Europa; numer katalogowy- V9879)

Argininową wazopresynę (AVP) podawano dożylnie w formie bolusa w dawce 10 ng/100 µL oraz miejscowo (dotętniczo) w dawce 4 ng/50 µL. Dożylną i dotętniczną dawkę AVP ustalono na podstawie wcześniejszych badań, w tym badań prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88]. Przyjmując, że objętość osocza u szczura o masie 310-360 g wynosi około 18 ml, maksymalne możliwe stężenie AVP

w osoczu powinno wynosić około 500-600 pg/ml. Są to wartości porównywalne do stężeń AVP stwierdzanych w osoczu w szczurzych modelach ciężkiego niedotlenienia, krwotoku, niewydolności serca po zawale mięśnia sercowego lub udarze [31,88,385,386]. Okres półtrwania egzogennie podanej AVP w krążeniu szczurów wynosi poniżej jednej minuty, w związku z tym należy założyć, że zastosowanym modelem doświadczalnym jej oddziaływanie było jedynie krótkotrwałe [387].

Antanista receptora V1a

(d(CH₂)₅₁,Tyr(Me)₂,Arg₈)-Vasopressin (Tocris, Europe; numer katalogowy- 3377) jest selektywnym peptydowym antagonistą receptora V1a. Hamuje on powodowany przez AVP i oksytocynę wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia oraz hamuje działanie presyjne AVP [1,388]. Antagonista ten podany dożylnie w bolusie w dawce 5 µg/100 µL skutecznie znosił działanie presyjne AVP w trakcie wcześniejszych doświadczeń w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej [88].

Pozostałe związki

- jałowy roztwór izotoniczny 0,9% NaCl (Polpharma, Polska);
- izotoniczny roztwór NaCl i KCl buforowany fosforanami, PBS (140 mmol/l NaCl, 10 mmol/l buforu fosforanowego, 3 mmol/l KCl; pH w 25°C 7.4) (Sigma-Aldrich, Europa);
- heparyna niefrakcjonowana 5000 j.m./ml (Polfa Warszawa SA, Polska)

3.6. Część III badania - ocena występowania receptora V1a dla wazopresyny w kłębkach szyjnych z wykorzystaniem immunobarwień i obrazowania w mikroskopii konfokalnej

W kolejnym etapie doświadczenia przy użyciu mikroskopii konfokalnej i barwień immunofluorescencyjnych skrawków rozwidlenia tętnicy szyjnej i kłębków szyjnych oceniono ekspresję receptora V1a oraz jego lokalizację w komórkach chemoreceptorowych kłębka szyjnego u szczurów hipertensyjnych SHR oraz normotensyjnej kontroli WKY.

3.6.1. Pobranie i przygotowanie tkanek do immunobarwienia

Po przeprowadzeniu pomiarów krążeniowo-oddechowych i uśmierceniu zwierząt delikatnie odpreparowywano rozwidlenie tętnicy szyjnej z kłębkami szyjnymi oraz

zaopatrującym go nerwem zatokowym od otaczających tkanek, przecinano tętnicę szyjną wspólną, tętnicę szyjną zewnętrzną oraz tętnicę szyjną wewnętrzną. Następnie pobierano tkanki do barwień immunofluorescencyjnych. Pobrane rozwidlenia tętnicy szyjnej płukano lodowatym roztworem PBS, a następnie umieszczano w 4% buforowanym roztworze formaldehydu (4% PFA) na okres 24 godzin w temperaturze 4-6°C. Następnie rozwidlenia tętnic szyjnych z kłębkami szyjnymi umieszczano w roztworach procentowych masowych sacharozy o rosnącym stężeniu 10-20-30% w celu krioprotekcji uzyskanych tkanek. Do czasu barwienia pobrane rozwidlenia tętnicy szyjnej z kłębkami szyjnymi przechowywano w temperaturze -20°C.

Pobrane rozwidlenia tętnicy szyjnej cięto w kriostacie (Leica CM1850, Leica, Niemcy) na skrawki o grubości 20-30 µm. Skrawki umieszczano na silinizowanych szkiełkach mikroskopowych (Microscope slides 631-1163, VWR Europe) i przeprowadzano immunobarwienia.

3.6.2. Barwienia immunofluorescencyjne

Utrwalone skrawki pochodzące z rozwidleń tętnicy szyjnej szczurów SHR i WKY barwiono immunofluorescencyjnie z użyciem pierwszorzędowych przeciwciał przeciw receptorowi V1a dla AVP oraz pierwszorzędowych przeciwciał przeciw hydroksylazie tyrozynowej (TH, *tyrosine hydroxylase*), która jest markerem komórek chemoreceptorowym typu I. Barwienie przeprowadzano w następujący sposób: skrawki trzykrotnie po 10 minut płukano w 1% roztworze Triton X-100 (Sigma Aldrich, Europa) w PBS w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano je dodatkowo przez 30 minut w temperaturze pokojowej w 10% surowicy koziej w PBS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) by zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał. W kolejnym etapie skrawki inkubowano przez 24-godzinny z przeciwciałami pierwszorzędowymi w temperaturze 4°C w komorze wilgotnej. W kolejnym kroku skrawki trzykrotnie płukano w roztworze PBS po 10 minut. Następnie inkubowano je przez 2 godziny z II-rzędowymi przeciwciałami w temperaturze pokojowej (24°C) w komorze wilgotnej chronionej przed światłem oraz trzykrotnie po 10 minut płukano w roztworze PBS. Przed zamknięciem preparatów przeprowadzano barwienie jąder komórkowych przy użyciu barwnika Hoechst 33342 rozpuszczonego w PBS (stężenie 1 µg/ml; nr katalogowy 14533 Sigma Aldrich, Europa), inkubacja trwała 20 minut i była prowadzona w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu barwienia skrawki były ponownie płukane w roztworze PBS przez 10 minut. Na zakończenie skrawki zostały utrwalone

preparatem ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym.

W barwieniach wykorzystano następujące przeciwciała pierwszorzędowe: poliklonalne królicze przeciwciała przeciwko receptorowi V1a (1:200; nr katalogowy AVR-010, Alomone Labs, Jeruzalem, Izrael) oraz mysie przeciwciała przeciwko hydroksylazie tyrozynowej (1:200; nr katalogowy MAB318, Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy). Użyto kozie przeciwciała drugorzędowe IgG (H+L) adsorbowane krzyżowo, antymysie znakowane fluorochromem Alexa Fluor 488 (rozcieńczenie 1:1000; nr katalogowy A11001, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) i anty-królicze znakowane fluorochromem Alexa Fluor 546 (rozcieńczenie 1:1000; nr katalogowy A11010, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone).

3.6.3. Obrazowanie w mikroskopii konfokalnej

Po zakończeniu barwienia immunofluorescencyjnego skrawki obrazowano w mikroskopii konfokalnej. Wykorzystano mikroskop konfokalny Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss, Niemcy) wraz z dedykowanym oprogramowaniem ZEN Black. Do wzbudzenia sygnału od poszczególnych fluorochromów związanych z przeciwciałami drugorzędowymi oraz z barwnika jądrowego użyto laserów o następujących parametrach:

- Alexa Fluor 488 – laser argonowy niebieski, długość fali 488 nm;
- Alexa Fluor 546 – laser helowo-neonowy, długość fali 561 nm;
- Hoechst 33342 – laser dwufotonowy Chameleon Ultra Coherent 760 nm/380 nm.

3.7. Metody statystyczne

Wartości ciśnień SBP, DBP i MABP mierzonych na tętnicy ogonowej u szczurów SHR i szczurów WKY porównano testem t-studenta dla pomiarów niezależnych. Do analizy odpowiedzi krążeniowo-oddechowej w drugiej części badania wartości MABP, HR, FABF MV, RR, i ETCO₂ zostały uśrednione w 30-sekundowych okresach dla wartości wyjściowych. Po podaniu KCN do analizy wykorzystano 3-sekundowe okresy maksymalnych odpowiedzi hemodynamicznych i oddechowych, natomiast uśrednione wartości z 30-sekundowych zapisów analizowano dla oceny parametrów po minucie od podania KCN. Również uśrednione wartości 30-sekundowych rejestracji analizowano dla zmian parametrów krążeniowych i oddechowych po podaniu AVP, po podaniu antagonisty V1aR oraz po odnerwieniu kłębków szyjnych. FABF i MV zostały porównane i przeanalizowane jako

procentowa wartość wielkości parametru zapisanego przed daną interwencją w celu uwzględnienia ewentualnego dryftu w rejestrowanych parametrach i przedstawione są jako %FABF i %MV. Wartości parametrów krążeniowo-oddechowych przed i po interwencjach oceniano w danych grupach za pomocą testu t-Studenta dla prób zależnych. Wielkość zmian MABP, HR, %FABF, %MV, RR, i ETCO₂ pomiędzy szczurami hipertensyjnymi SHR i kontrolnymi WKY porównano za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych. Do oceny normalności rozkładu zastosowano test Shapiro-Wilksa. Jeżeli był istotny, stosowano test Wilcoxon dla prób zależnych i nieparametryczny test U Manna-Whitneya dla porównań pomiędzy grupami. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną.

Wszystkie dane przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. Jeśli dane nie spełniały kryteriów rozkładu normalnego, podano medianę z rozstępem międzykwartylowym (IQR). Wykresy pudełkowe zostały wygenerowane za pomocą narzędzia internetowego BoxPlotR [389]. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, Stany Zjednoczone).

4. Wyniki

4.1. Część I badania – pomiary ciśnienia tętniczego na tętnicy ogonowej u zwierząt czuwających

W porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, u szczurów hipertensyjnych SHR stwierdzono istotnie wyższe wartości zarówno dla skurczowego ($196,4 \pm 9,9$, vs $106,9 \pm 7,6$; $p < 0,001$, test t-studenta), rozkurczowego ($159,5 \pm 25,8$, vs $79,8 \pm 8,5$; $p < 0,001$, test t-studenta) i średniego ($171,6 \pm 17,7$, vs $87,7 \pm 8,2$; $p < 0,001$, test t-studenta,) ciśnienia tętniczego mierzonego na ogonie. Wyniki podsumowano w Tabeli 1.

Tabela 1. Ciśnienie tętnicze u czuwających szczurów SHR i WKY

Parametr	SHR	WKY	wartość p
SBP (mm Hg)	$196,44 \pm 9,9$	$106,9 \pm 7,6$	$<0,001$
DBP (mm Hg)	$159,5 \pm 25,8$	$79,8 \pm 8,5$	$<0,001$
MABP (mm Hg)	$171,6 \pm 17,7$	$87,7 \pm 8,2$	$<0,001$

SBP - ciśnienie skurczowe, DBP - ciśnienie rozkurczowe, MABP - średnie ciśnienie tętnicze.

4.2. Część II badania – pomiary parametrów krążeniowo-oddechowych u zwierząt znieczulonych

4.2.1. Wyjściowe parametry krążeniowo-oddechowe dla poddanych pomiarom zwierząt znieczulonych uretanem z protokołów (serii) 1-6

Spoczynkowe MABP i HR były istotnie wyższe u hipertensyjnych szczurów SHR niż u normotensyjnych szczurów WKY. W spoczynku nie było istotnej różnicy w FABF. Spoczynkowe MV i RR były odpowiednio wyższe i niższe u szczurów SHR z NT w porównaniu z grupą kontrolną WKY. Nie stwierdzono jednak istotnych różnic w ETCO₂. Wszystkie parametry podsumowano w Tabeli 2.

Tabela 2. Parametry spoczynkowe krążeniowo-oddechowe u znieczulonych szczurów SHR i WKY

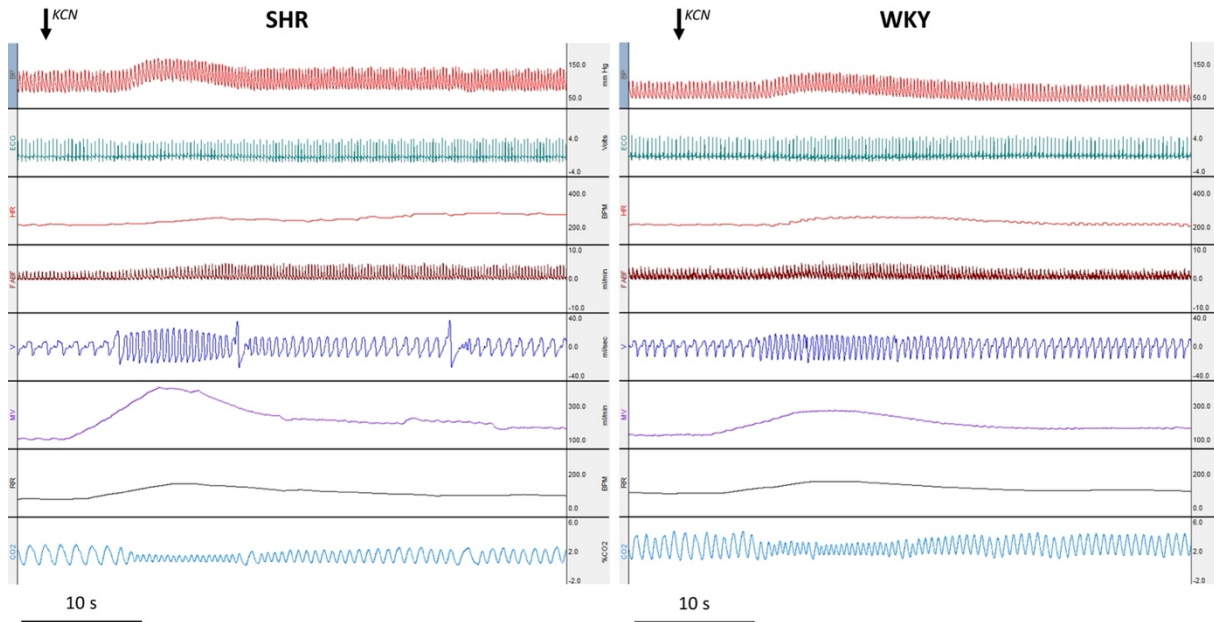
Parametr	SHR	WKY	wartość p
MABP (mm Hg)	90,3 ± 14,2	63,6 ± 5,0	<0,001
HR (uderzeń/min)	297 ± 31	236 ± 44	<0,001
FABF (ml/min)	1,2 ± 0,7	1,6 (1, 2,2)	0,180
MV (ml/ min)	289 ± 45	203 ± 38	0,007
RR (oddechy/min)	59 ± 14	89, (67, 113)	0,002
ETCO2 (%)	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,5	0,373

MABP - średnie ciśnienie tętnicze, HR – częstość serca, FABF- przepływ przez tętnicę udową, MV - wentylacja minutowa, RR - częstotliwość oddechów, ETCO2 - końcowo wydechowe stężenie dwutlenku węgla.

4.2.2. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych

Surowe zapisy odpowiedzi hemodynamicznej i oddechowej na farmakologiczną aktywację odruchu z chemoreceptorów tętnicznych u szczurów SHR i WKY przedstawiono na Rycinie 12. U obu szczepów z pozorowanym odnerwieniem kłębków szyjnych wystąpił istotny wzrost MABP w stosunku do wartości wyjściowych w odpowiedzi na farmakologicznie wywołany odruch z chemoreceptorów tętnicznych ($p < 0,0001$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR; $p < 0,001$, test t-Studenta dla prób zależnych, WKY). Jednak zmiana MABP była istotnie większa u szczurów SHR w porównaniu z grupą kontrolną WKY ($p < 0,05$, test t-studenta). Minutę po wywołaniu odruchu MABP powróciło do wartości wyjściowych w obu grupach. Istotny wzrost HR w odpowiedzi na KCN wystąpił w obu grupach ($p < 0,01$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych, SHR; $p < 0,001$, test t-studenta dla prób zależnych, WKY). Nie było znaczącej różnicy w zmianach HR między obiema grupami. Minutę po wywołaniu odruchu HR pozostało znacząco zwiększone u szczurów SHR w porównaniu do wartości spoczynkowej ($p < 0,05$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR) i powróciło do wartości wyjściowych u szczurów WKY z normotensją. Stwierdzono istotnie wyższą wartość HR w stosunku do wartości wyjściowej między szczurami SHR i WKY ($p < 0,01$, test t-studenta). Wywołany farmakologicznie odruch z chemoreceptorów tętnicznych spowodował również istotny wzrost FABF tylko u szczurów SHR ($p < 0,05$, test t-studenta dla grup zależnych, SHR; $p = \text{NS}$, test t-studenta dla grup zależnych, WKY), jednak nie było

znaczących różnic w zmianach FABF między hipertensyjnymi szczurami SHR i normotensyjnymi szczurami WKY.



Rycina 12. Odruch z chemoreceptorów tętniczych

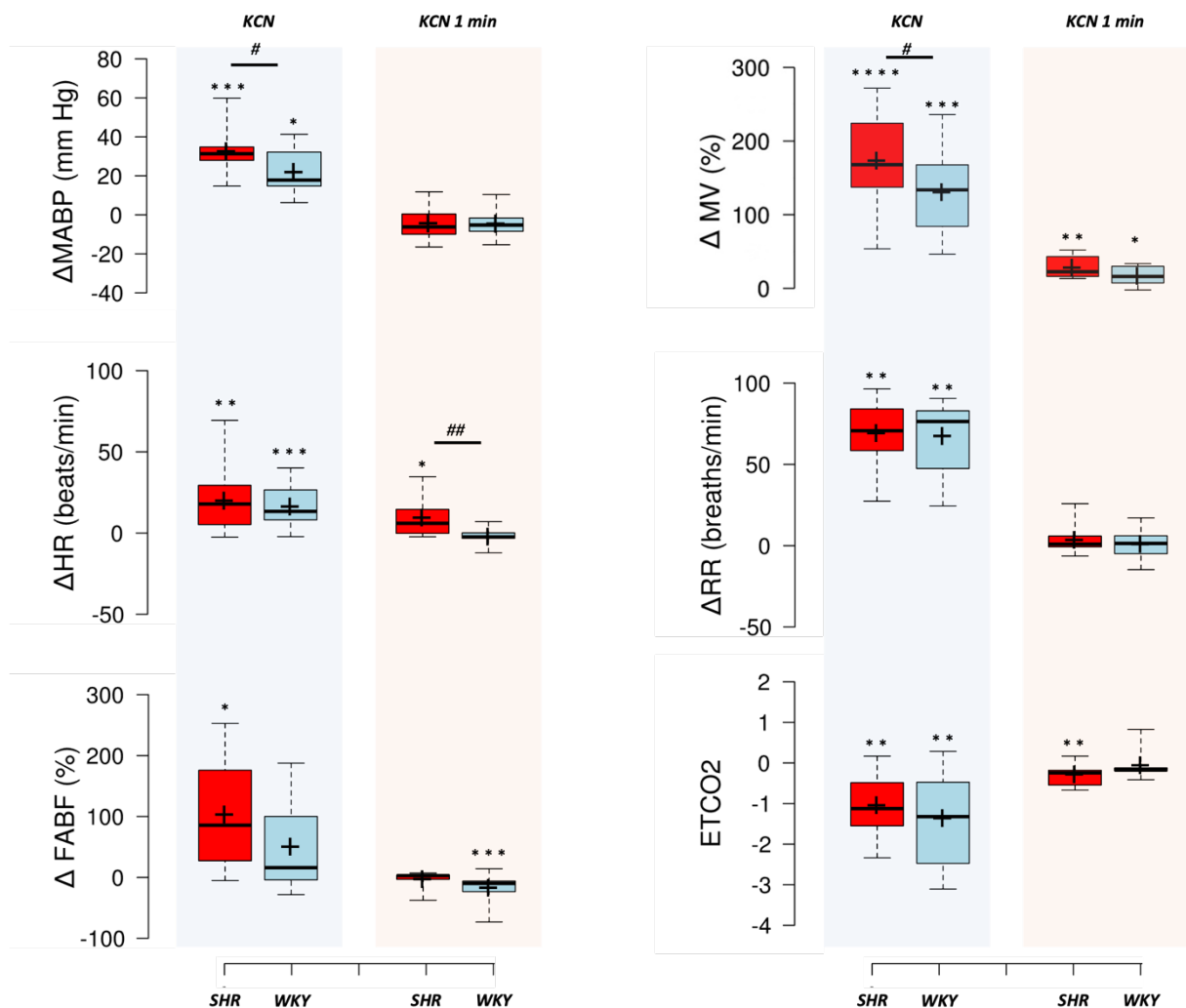
Przykładowe surowe zapisy odpowiedzi hemodynamicznej i oddechowej na farmakologiczną aktywację odruchu z chemoreceptorów tętniczych u szczurów SHR i WKY.

Rejestracje w kolejności od góry do dołu: BP - ciśnienie tętnicze; ECG – elektrokardiogram; HR - częstość serca; FABF- przepływ przez tętnicę udową; V – wentylacja; MV - wentylacja minutowa; RR - częstotliwość oddechów; CO₂ - wydechowe stężenie dwutlenku węgla. KCN- cyjanek potasu.

Wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętniczych spowodowało istotny wzrost MV ($p < 0,0001$, test t-studenta dla grup zależnych, SHR; $p < 0,001$, test t-studenta dla prób zależnych, WKY) i istotny wzrost RR ($p < 0,01$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych, SHR; $p < 0,01$, Manna-Whitneya dla prób zależnych WKY), przy czym zmiana MV była istotnie większa u szczurów SHR niż u szczurów WKY ($p < 0,05$, test t-studenta). Podwyższona wartość MV utrzymywała się również w obu grupach po minucie od wywołania odruchu z chemoreceptorów tętniczych ($p < 0,01$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych, SHR; $p < 0,05$, test t-Studenta dla prób zależnych, WKY), jednak zmiany MV po minucie od wywołania odruchu były podobne u szczurów SHR i WKY. Dodatkowo, minutę po farmakologicznie wywołanym odruchu, zmiany RR były nieistotne statystycznie. Zwiększonemu MV podczas odruchu towarzyszył znaczny spadek ETCO₂ w obu grupach ($p < 0,01$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych; $p < 0,01$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych, WKY), a istotnie niższe ETCO₂ występowało również minutę po farmakologicznie wywołanym odruchu u szczurów SHR ($p < 0,01$, test Manna-Whitneya).

Nie było jednak znaczących różnic w zmianie ETCO_2 w stosunku do wartości wyjściowej w minutę po wywołaniu odruchu między szczurami SHR i WKY. Podsumowując, wyniki te wskazują na zwiększoną odpowiedź krążeniowo-oddechową na farmakologiczną aktywację odruchu z chemoreceptorów tętniczych u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu z normotensyjnymi szczurami WKY.

Zmiany w parametrach krążeniowo-oddechowych w odpowiedzi na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętniczych oraz 1 minutę po wywołaniu odruchu przedstawiono na Rycinie 13.

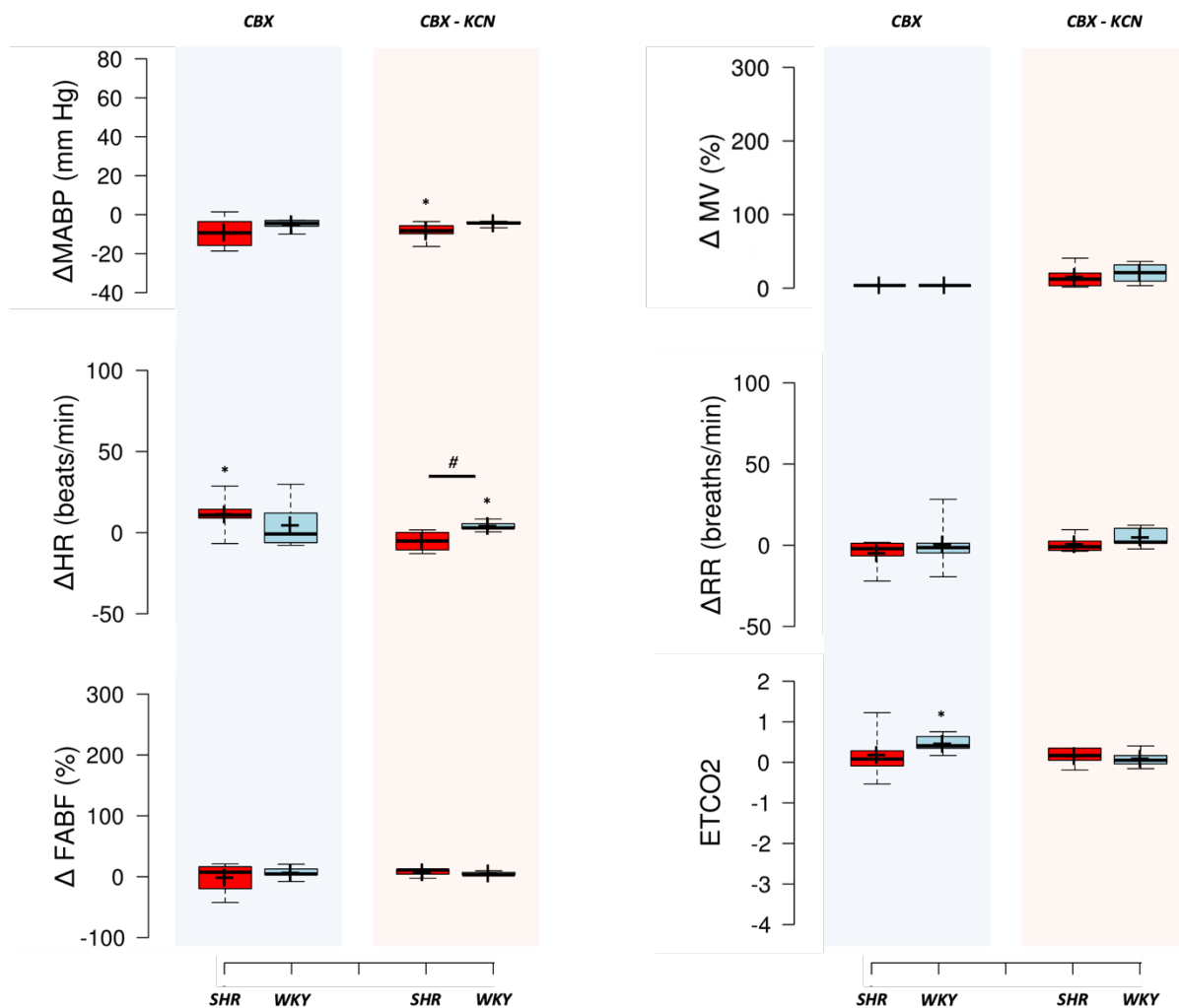


Rycina 13. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych w odpowiedzi na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętniczych oraz 1 minutę po wystąpieniu odruchu

KCN - cyjanek potasu; ΔMABP – zmiana średniego ciśnienie tętniczego; ΔHR – zmiana częstotliwości skurczu serca; ΔFABF - zmiana przepływu przez tętnicę udową, ΔMV – zmiana wentylacji minutowej, ΔRR – zmiana częstotliwości oddechów, ΔETCO_2 – zmiana końcowo wydechowego stężenia dwutlenku węgla.

4.2.3. Wpływ obustronnego odnerwienia kłębków szyjnych na odruch z chemoreceptorów tętniczych

Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych (CBX) obniżyło MABP u szczurów SHR, jednak w analizie statystycznie zmiana ta nie osiągnęła istotności. Ponadto CBX nie miało wpływu na FABF, jednak spowodowało niewielki wzrost HR, który był znaczący tylko u szczurów SHR. Wpływ CBX na parametry wentylacyjne był nieistotny, z wyjątkiem niewielkiego wzrostu ETCO₂ u szczurów WKY (ryc. 3F). Podanie KCN po CBX zmniejszyło MABP tylko u szczurów SHR ($p < 0,05$, test t-studenta dla grup zależnych) i zwiększyło HR tylko u szczurów WKY ($p < 0,05$, test t-studenta dla grup zależnych). Zmiana HR w odpowiedzi na KCN po CBX była istotnie wyższa u szczurów WKY niż u szczurów SHR ($p < 0,05$, test t-studenta). Ponadto podawanie KCN po CBX nie miało znaczącego wpływu na inne parametry krążeniowo-oddechowe. Sumarycznie przedstawione wyniki wskazują na skuteczne odnerwienie kłębków szyjnych. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych i po próbie farmakologicznego wywołania odruchu przedstawiono na Rycinie 14.



Rycina 14. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych i farmakologicznym wywołaniu odruchu

CBX - odnerwienie kłębków szyjnych; KCN - cyjanek potasu; Δ MABP – zmiana średniego ciśnienie tętniczego; Δ HR – zmiana częstości serca; Δ FABF - zmiana przepływu przez tętnicę udową; Δ MV – zmiana wentylacji minutowej; Δ RR – zmiana częstotliwości oddechów, Δ ETCO₂ – zmiana końcowo wydechowego stężenia dwutlenku węgla.

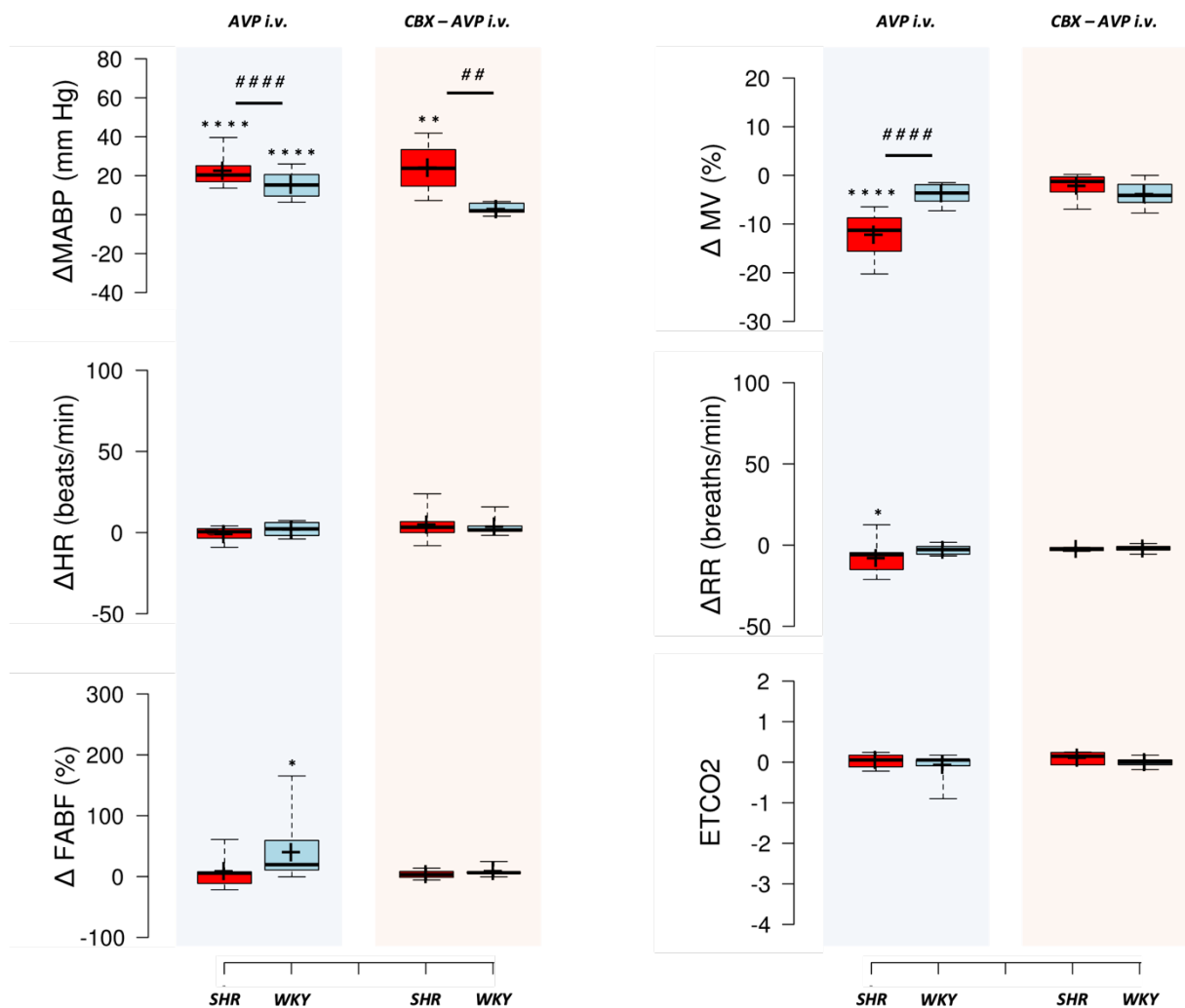
4.2.4. Dożylne podanie wazopresyny

Dożylne podanie AVP u zwierząt z pozorowanym odnerwieniem kłębków szyjnych wywołało istotny wzrost MABP zarówno u szczurów SHR, jak i WKY ($p < 0,0001$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR; $p < 0,0001$, test t-studenta dla prób zależnych, WKY). Zmiana MABP była istotnie większa u nadciśnieniowych szczurów SHR niż u normotensyjnych szczurów kontrolnych ($p < 0,0001$, test t-studenta, szczury SHR vs szczury WKY). Podanie AVP nie miało istotnego wpływu na HR u obu szczepów szczurów. AVP spowodował niewielki, ale znaczący wzrost FABP tylko u szczurów WKY z normotensją ($p < 0,05$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych), jednak zmiany FABP po podaniu AVP nie różniły się istotnie między szczurami SHR i WKY. Dożylne podanie AVP spowodowało znaczny spadek MV u szczurów SHR ($p < 0,0001$, test t-studenta dla grup zależnych, SHR), ale nie miało istotnego wpływu na MV u szczurów WKY. Ponadto zmiany MV wywołane przez AVP u szczurów SHR były istotnie większe u szczurów SHR i niż u WKY ($p < 0,0001$, test t-studenta, szczury SHR vs szczury WKY). Zmniejszeniu MV u szczurów SHR towarzyszył znaczący spadek RR ($p < 0,05$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR), jednak nie było znaczących różnic w zmianach RR między szczurami SHR i WKY. Ponadto zmiany $ETCO_2$ były również nieistotne. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu AVP u szczurów z pozorowanym CBX przedstawiono na Rycinie 15.

4.2.5. Dożylne podanie wazopresyny po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych

Podanie dożylne AVP po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych (CBX) spowodowało istotny wzrost MABP u szczurów SHR ($p < 0,01$, test t-studenta dla prób zależnych), który był porównywalny ze szczurami SHR, które nie zostały poddane odnerwieniu ($p = NS$, test t-studenta dla zmiany MABP po AVP u szczurów SHR z pozorowanym CBX vs SHR z CBX). Podanie AVP po CBX spowodowało wzrost MABP u szczurów normotensyjnych WKY, który był jednak nieistotny w analizie statystycznej. Co więcej, zmiana MABP była znacznie mniejsza u szczurów WKY z CBX niż zwierząt z pozorowanym CBX ($p < 0,001$, test t-studenta dla zmiany MABP po AVP u szczurów WKY z pozorowanym CBX vs WKY z CBX). Podanie AVP po CBX nie miało znaczącego wpływu na HR, FABP i wszystkie parametry oddechowe zarówno u szczurów SHR, jak i WKY. Ponadto stwierdzono istotną różnicę w zmianach MV indukowanych przez AVP w zależności od wykonania CBX u szczurów SHR. Obserwowano zmniejszenie MV u szczurów SHR z pozorowanym CBX i brak zmian MV u szczurów SHR z CBX ($p < 0,01$, test t-studenta dla

zmiany MABP po AVP u szczurów SHR z pozorowanym CBX vs SHR z CBX). Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu wazopresyny po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych przedstawiono na Rycinie 15.



Rycina 15. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu AVP po pozorowanym odnerwieniu oraz po dożylnym podaniu AVP po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych

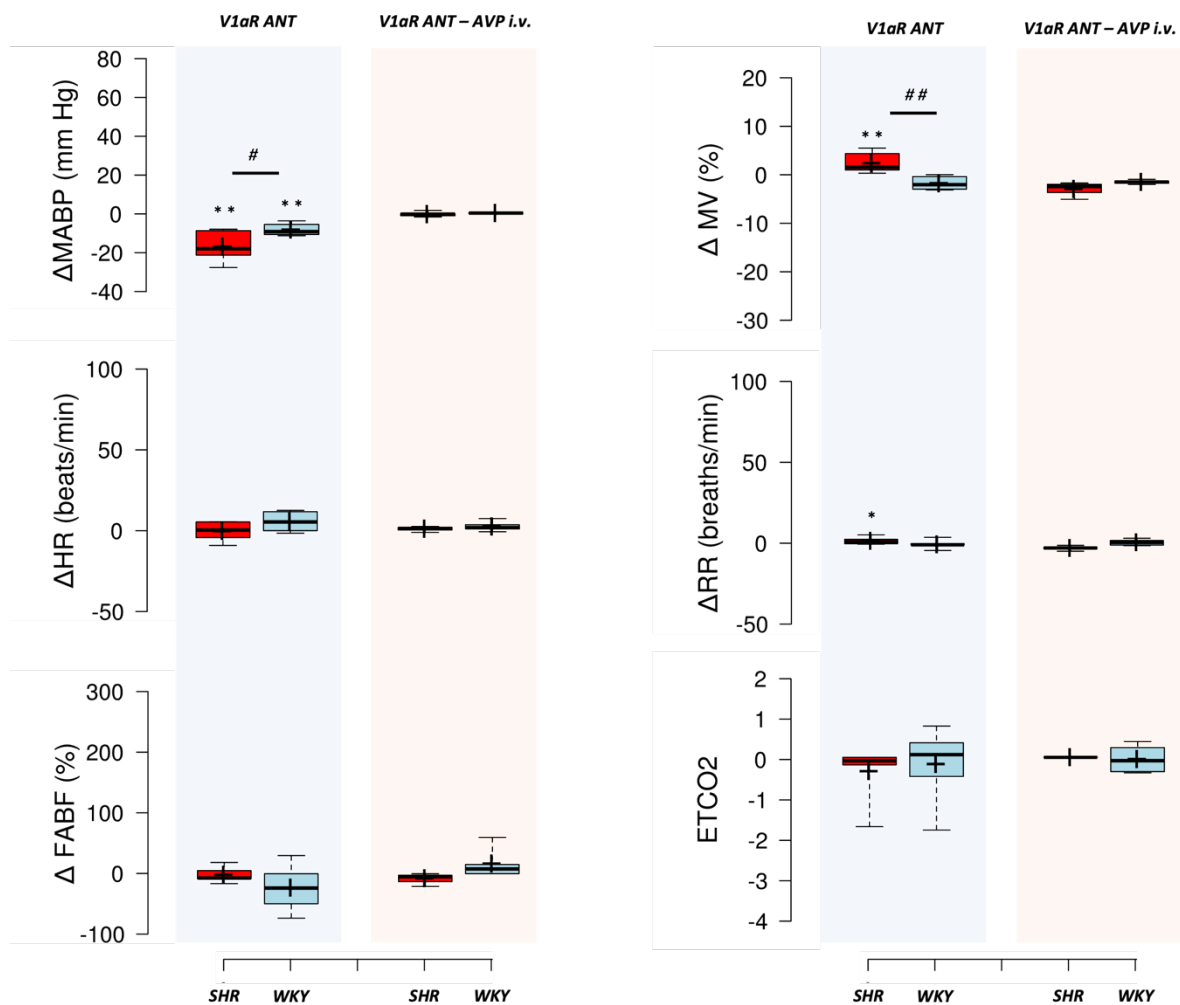
AVP – wazopresyna; CBX- odnerwienie kłębków szyjnych; ΔMABP – zmiana średniego ciśnienia tętniczego; ΔHR – zmiana częstości serca; ΔFABF- zmiana przepływu przez tętnicę udową; ΔMV – zmiana wentylacji minutowej; ΔRR – zmiana częstotliwości oddechów; ΔETCO2 – zmiana końcowo wydechowego stężenia dwutlenku węgla.

4.2.6. Podanie antagonisty receptora V1a

Zablokowanie receptora V1a spowodowało istotne zmniejszenie MABP zarówno u szczurów SHR z nadciśnieniem, jak i normotensyjnych szczurów WKY ($p < 0,01$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR; $p < 0,01$, test t-studenta dla prób zależnych, WKY). Zmiany MABP różniły się istotnie między szczurami SHR a WKY, przy czym szczury SHR wykazywały większy spadek MABP niż zwierzęta kontrolne ($p < 0,05$, test t-studenta). Podanie antagonisty receptora V1a nie miało znaczącego wpływu na HR i FABF zarówno u szczurów SHR, jak i WKY. Blokada receptora V1a spowodowała znaczący wzrost MV tylko u szczurów SHR ($p < 0,01$, test t-studenta dla prób zależnych), a zmiany MV były istotnie większe u szczurów SHR niż u kontrolnych szczurów WKY ($p < 0,01$, test t-Studenta). Nie stwierdzono istotnych zmian w RR i ETCO₂ u obu szczepów szczurów. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu antagonisty receptora V1a przedstawiono na Rycinie 16.

4.2.7. Dożylne podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a

Dożylne podanie AVP po wcześniejszej infuzji antagonisty receptora V1a miało nieistotny wpływ na parametry hemodynamiczne u obu szczepów szczurów. Nie obserwowano także istotnej zmiany w parametrach oddechowych. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu AVP po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a przedstawiono na Rycinie 16.



Rycina 16. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dożylnym podaniu antagonisty receptora V1a oraz podaniu dożylnym AVP po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a

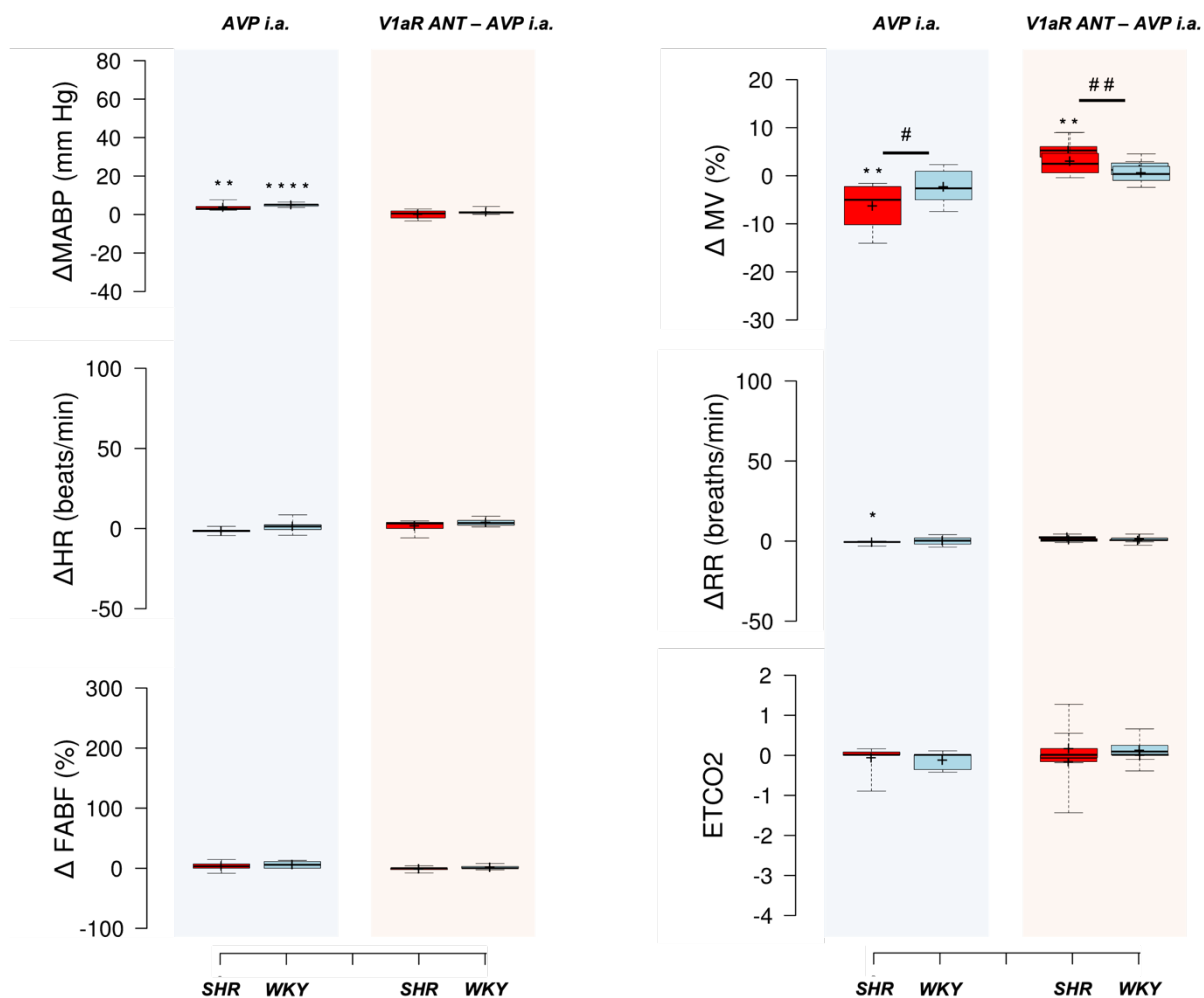
V1aR ANT - antagonist receptoru V1a; AVP – wazopresyna; Δ MABP – zmiana średniego ciśnienie tętniczego; Δ HR – zmiana częstości serca; Δ FABF- zmiana przepływu przez tętnicę udową; Δ MV – zmiana wentylacji minutowej; Δ RR – zmiana częstości oddechania; Δ ETCO₂ – zmiana końcowo wydechowego stężenia dwutlenku węgla.

4.2.8. Dotętnicze podanie wazopresyny

Dotętnicze (miejscowe) podanie AVP w okolicę kłębka szyjnego wywołało istotny wzrost MABP zarówno u szczurów SHR, jak i WKY ($p < 0,05$, test Manna-Whitneya dla prób zależnych, SHR; $p < 0,0001$, test t-studenta dla prób zależnych, WKY). Zmiany MABP nie różniły się istotnie pomiędzy szczurami SHR i WKY. Podanie dotętnicze AVP nie miało znaczącego wpływu na HR i FABF zarówno u szczurów SHR, jak i WKY. Dotętnicze podanie AVP spowodowało istotny spadek MV u szczurów SHR ($p < 0,01$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR), ale nie miało istotnego wpływu na MV u szczurów WKY. Spadek MV był istotnie większy u szczurów SHR niż u szczurów WKY ($p < 0,05$, test t-studenta). Zmniejszeniu MV u szczurów SHR towarzyszył także istotny spadek RR ($p < 0,05$, test t-studenta dla prób zależnych, SHR), który nie wystąpił u szczurów WKY. Nie stwierdzono istotnych zmian w ETCO₂ u obu szczepów. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dotętnicznym podaniu wazopresyny przedstawiono na Rycinie 17.

4.2.9. Dotętnicze podanie wazopresyny po podaniu antagonisty receptora V1a

Dotętnicze podanie AVP u szczurów hipertensyjnych SHR i szczurów kontrolnych WKY po wcześniejszym podaniu antagonisty receptora V1a nie miało istotnego wpływu na parametry hemodynamiczne oraz na parametry oddechowych. Zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych po dotętnicznym podaniu AVP po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a przedstawiono na Rycinie 17.

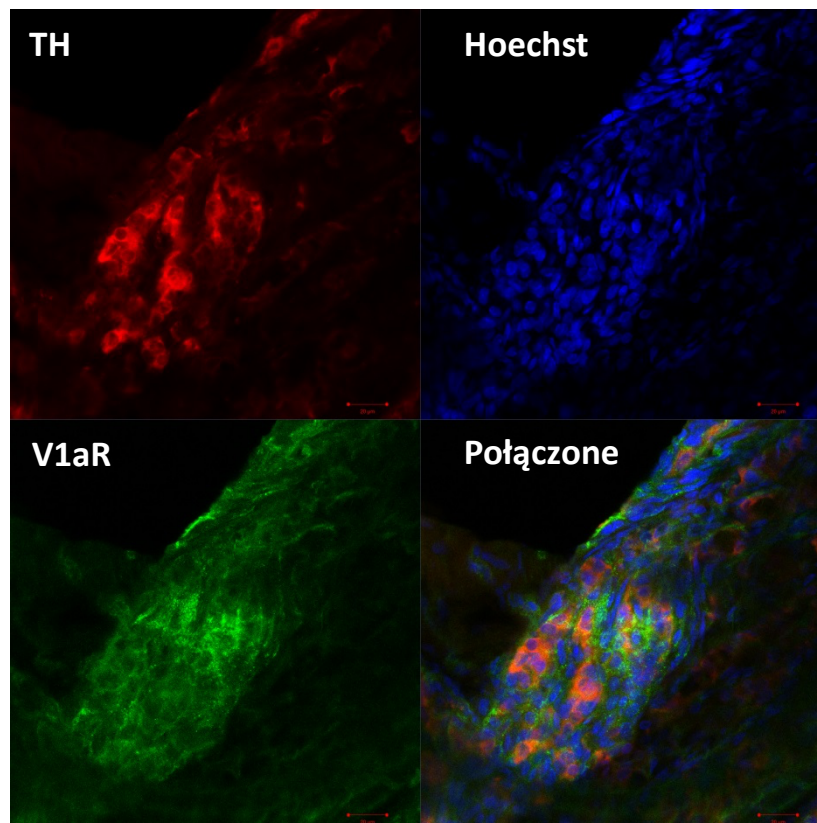


Rycina 17. Zmiana parametrów krążeniowych i oddechowych po dotętniczym podaniu wazopresyny, dożylnym podaniu antagonisty receptora V1a oraz po podaniu dotętniczym wazopresyny po wcześniejszym zablokowaniu receptora V1a

AVP – wazopresyna; V1aR ANT - antagonist receptor V1a; Δ MABP – zmiana średniego ciśnienie tętniczego, Δ HR – zmiana częstotliwości skurczu serca, Δ FABF- zmiana przepływu przez tętnicę udową, Δ MV – zmiana wentylacji minutowej, Δ RR – zmiana częstotliwości oddechów, Δ ETCO2 – zmiana końcowo wydechowego stężenia dwutlenku węgla.

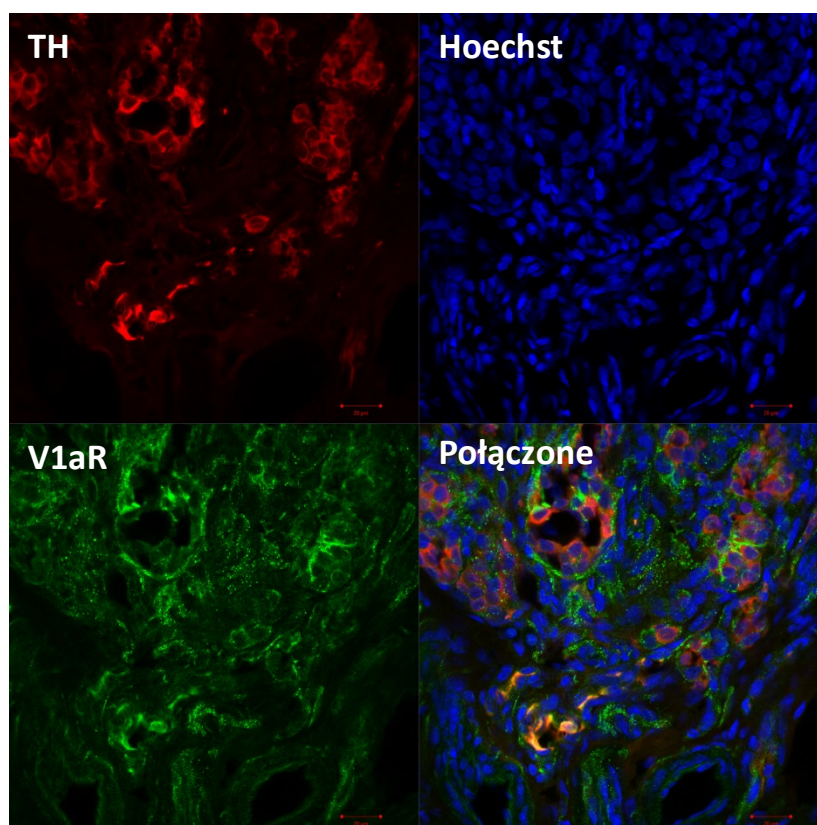
4.3. Część III badania- obrazowanie w mikroskopii konfokalnej (ekspresja receptora V1a)

W obrazowaniu w mikroskopii konfokalnej skrawków kłębków szyjnych szczurów SHR i WKY barwionych immunofluorescencyjnie obserwowano wiązanie przeciwciał przeciwko receptorowi V1a. Dodatkowo immunobarwienia przeciw hydroksylazie tyrozynowej (TH) wykazały kolokalizację receptora V1a i z markerem komórek chemowrażliwych typu I. Analiza jakościowa nie wykazała istotnych różnic w wynikach immunobarwień pomiędzy szczurami SHR i WKY. W negatywnej kontroli dla przeciwciał drugorzędowych nie stwierdzono niespecyficznego wiązania do struktur komórkowych. Wyniki immunobarwień dla kłębków szyjnych szczurów SHR i WKY przedstawiono odpowiednio na Rycinie 18 i 19.



Rycina 18. Immunobarwienie skrawków kłębka szyjnego szczura SHR

Komórki chemoreceptorowe typu I (czerwony), receptor V1a (zielony), jądra komórkowe (niebieski; Hoechst). Obecna jest kolokalizacja receptora V1a z TH (hydroksylaza tyrozynowa) - markerem komórek chemoreceptorowych typu I w kłębku szyjnym szczurów SHR.



Rycina 19. Immunobarwienie skrawków kłębka szyjnego szczura WKY

Komórki chemoreceptorowe typu I (czerwony), receptor V1a (zielony), jądra komórkowe (niebieski; Hoechst). Obecna jest kolokalizacja receptora V1a z TH (hydroksylaza tyrozynowa) - markerem komórek chemoreceptorowych typu I w kłębku szyjnym szczurów WKY.

5. Dyskusja

Wazopresyna odgrywa istotną rolę w regulacji układu sercowo-naczyniowego. Postulowany jest także wpływ AVP na regulację układu oddechowego. Najważniejsze nowe wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych doświadczeń wskazują na istotny udział AVP i jej receptora V1a w regulacji wentylacji płuc, które są nasilone u szczurów SHR z genetycznie uwarunkowanym NT w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY. Wyniki doświadczeń potwierdziły również opisywaną przez innych autorów zwiększoną wrażliwość odruchu z chemoreceptorów tętniczych objawiającą się nasiloną odpowiedzią krążeniową i oddechową u szczurów hipertensyjnych SHR w porównaniu do zwierząt normotensyjnych. Uzyskane wyniki wskazują też, że hipertensyjne szczury SHR charakteryzowały się większą odpowiedzią presyjną na systemowe (dożylnie) podanie AVP w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, której towarzyszył spadek wentylacji płucnej tylko u szczurów hipertensyjnych SHR. Miejscowe (dotętnicze) podanie AVP w okolicę kłębka szyjnego u obu szczepów wywołało niewielki, ale istotny wzrost ciśnienia tętniczego. Jednak tylko u szczurów hipertensyjnych SHR obserwowano zahamowanie wentylacji płuc. Odnerwienie kłębków szyjnych miało nieistotny wpływ na presyjny efekt dożylnie podanej AVP u szczurów SHR, jednak zmniejszało ono wywoływany przez AVP wzrost ciśnienia tętniczego u normotensyjnych szczurów WKY. Pomimo braku wpływu odnerwienia kłębków szyjnych na presyjne działanie AVP u szczurów SHR, odnerwienie zapobiegło indukowanemu przez dożylnie podanie AVP spadkowi wentylacji płuc w warunkach NT, co wskazuje na różny udział kłębków szyjnych w regulacji krążeniowo-oddechowej u szczurów hipertensyjnych (odpowieź oddechowa) i u szczurów normotensyjnych (odpowieź krążeniowa). Badania wskazują również, że obserwowane efekty krążeniowe oraz oddechowe na systemowe i miejscowe podanie AVP są zależne od receptora V1a, gdyż jego zablokowanie znosiło efekty hemodynamiczne i wentylacyjne wywoływane przez AVP. Ponadto przy wykorzystaniu barwień immunofluorescencyjnych stwierdzono obecność receptora V1a na komórkach chemowrażliwych kłębków szyjnych szczurów SHR i oraz szczurów WKY, co wskazuje na możliwy udział receptorów V1a w kłębkach szyjnych w pośredniczeniu części efektów krążeniowo-oddechowych wywoływanych przez AVP. Łącznie, uzyskane wyniki wskazują na udział AVP, receptorów V1a oraz kłębków szyjnych w odpowiedzi krążeniowo-oddechowej, która jest silniej wyrażona u hipertensyjnych szczurów SHR.

5.1. Szczury hipertensyjne jako doświadczalny model pierwotnego nadciśnienia tętniczego

Szczury szczepu SHR charakteryzują się genetycznie uwarunkowanymi wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego krwi, zmianami regulacji nerwowej, humoralnej i naczyniowej układu krążenia, które odpowiadają wielu cechom pierwotnego nadciśnienia tętniczego u ludzi [362]. Z tego powodu szczury hipertensyjne SHR są powszechnie stosowanym zwierzęcym modelem pierwotnego NT w badaniach przedklinicznych [362,363]. Do istotnych cech NT w tym modelu doświadczalnym należy zwiększona aktywność współczulna wynikają m.in. ze zwiększonej aktywności odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. Wykazano zwiększoną wrażliwość i toniczną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych u szczurów SHR [276,277,311,312,342]. Odnerwienie kłębków szyjnych u młodych osobników w okresie przednadcisnieniowym zapobiegało rozwinięciu nadciśnienia tętniczego, a u dorosłych szczurów spowodowało istotne obniżenie się wartości ciśnienia tętniczego [343]. U szczurów nadciśnieniowych SHR stwierdza się też zwiększoną aktywność układu wazopresynergicznego. Występuje u nich podwyższone osoczowe stężenie AVP, które jest skorelowane ze wzrostem ciśnienia tętniczego [313]. Zwierzęta te mają silniejszą odpowiedź presyjną na obwodowo podaną AVP w porównaniu do szczurów normotensyjnych [313,314], jednak także blokowanie u nich ośrodkowych receptorów V1a prowadziło do obniżenia ciśnienia tętniczego [85,326,327]. Obserwacje te wskazują na nasilenie ośrodkowej i obwodowej aktywności układu wazopresynergicznego u szczurów SHR będących modelem zwierzęcym nadciśnienia tętniczego pierwotnego.

W przeprowadzonym badaniu potwierdzono, że dorosłe szczury SHR wykazywały fenotyp nadciśnieniowy z wysokim, typowymi dla hipertensji, wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego mierzonymi u zwierząt czuwających oraz istotnie wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego mierzonego w warunkach znieczulenia ogólnego w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY. Analizowane wartości ciśnienia tętniczego były porównywalne z wcześniejszymi doniesieniami zarówno dla czuwających, jak i znieczulonych uretanem szczurów SHR oraz dla normotensyjnej kontroli [343,369,390,391].

Uzyskane wyniki wskazują także na zwiększoną wentylację minutową płuc w spoczynku u szczurów SHR, co jest zjawiskiem już opisanym w dostępnej literaturze [312,392]. Wykazano, że szczury SHR charakteryzują się wyższym tempem metabolizmu niż zwierzęta normotensyjne [393,394], oraz że wykazują tendencję do kwasicy metabolicznej już w okresie przednadcisnieniowym [395]. Zwiększoną wentylację płuc należy analizować

wraz z stężeniem końcowo-wydechowego dwutlenku węgla. W przeprowadzonych doświadczeniach wartości $ETCO_2$ były podobne zarówno u nadciśnieniowych szczurów SHR, jak i normotensyjnych szczurów WKY. Wskazuje to, że wyższa wentylacja płuc u szczurów SHR powinna być interpretowana nie jako hiperwentylacja, czemu powinno wówczas towarzyszyć obniżenie $ETCO_2$, ale raczej jako wtórna odpowiedź do przyspieszonego metabolizmu i zwiększonej produkcji CO_2 u szczurów nadciśnieniowych SHR [396,397]. Przeprowadzenie pomiarów kalorymetrycznych w zastosowanym układzie doświadczalnym mogłoby w pełni potwierdzić taką interpretację zwiększonej wentylacji płuc bez obniżenia $ETCO_2$ u hipertensyjnych szczurów SHR.

5.2. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych

Odpowiedzi krążeniowa i oddechowa odruchu z chemoreceptorów tętnicznych są dobrze zbadane i opisane [40,203]. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, w przeprowadzonym badaniu hipertensyjne szczury SHR cechowały się bardziej nasiloną odpowiedzią ciśnieniową i oddechową na farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych niż normotensyjne szczury WKY. Szereg prac doświadczalnych wskazuje, że nerw zatokowy i chemowrażliwe neurony zwoju skalistego, które zapewniają unerwienie aferentne kłębka szyjnego, wykazują zwiększoną aktywność i częstotliwość potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na niedotlenienie lub farmakologiczne wywołanie odruchu u szczurów SHR w porównaniu do szczurów normotensyjnych [200,311,398]. Wskazuje to na zwiększoną sygnalizację aferentną z kłębka szyjnego do ośrodków sercowo-naczyniowych i oddechowych pnia mózgu u zwierząt z NT.

W przeprowadzonym badaniu obserwowana była większa odpowiedź presyjna na farmakologicznie wywołany odruch z chemoreceptorów tętnicznych u hipertensyjnych szczurów SHR. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na nasiloną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych charakteryzującymi się zwiększoną aktywnością współczulną i zwiększoną odpowiedzią presyjną w warunkach NT, co zostało potwierdzone w licznych badaniach na hipertensyjnych szczurach SHR z genetycznie uwarunkowanym wysokim ciśnieniem tętniczym [277,343,368,369,399], u szczurów z NT naczyniowo-nerkowym [398,400] oraz u ludzi z NT pierwotnym [273,347,401]. Nasiloną odpowiedź krążeniową obserwowaną u szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY wskazuje na zwiększenie czułości odruchu u zwierząt z nadciśnieniem.

Z drugiej jednak strony w przeprowadzonym badaniu odnerwienie kłębków szyjnych nie miało istotnego wpływu na parametry krążeniowo-oddechowe u szczurów nadciśnieniowych w warunkach znieczulenia ogólnego. Sugeruje to, że u znieczulonych uretanem zwierząt włączonych do doświadczeń, odruch z chemoreceptorów tętnicznych nie był tonicznie aktywny. Wyniki te kontrastują z doniesieniami innych autorów, w których wykazano spadek aktywności współczulnej i ciśnienia tętniczego po odnerwieniu lub obliteracji kłębków szyjnych u czuwających szczurów SHR przy braku wpływu odnerwienia kłębków szyjnych na te parametry u szczurów normotensyjnych [277,343,398]. Także u ludzi z NT inaktywacja odruchu z chemoreceptorów tętnicznych poprzez oddychanie 100% tlenem powodowała obniżenie ciśnienia tętniczego [332,334], co wskazuje u tych chorych na toniczną aktywność odruchu. W powyższych pracach ocena odruchu z chemoreceptorów tętnicznych była przeprowadzana u osobników czuwających. Prawdopodobnym wytłumaczeniem braku tonicznej aktywności odruchu obserwowanego w obecnej pracy jest przeprowadzenie pomiarów w warunkach znieczulenia ogólnego uretanem [380]. Przeprowadzenie badań z odnerwieniem kłębków szyjnych na czuwających szczurach SHR z hodowli Centralnego Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych WUM mogłoby potwierdzić, czy u zwierząt tych obecny jest tonicznie aktywny odruch z chemoreceptorów tętnicznych.

Zarówno u szczurów nadciśnieniowych jak i normotensyjnych farmakologiczne wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych prowadziło do tachykardii. Liczne doniesienia, w szczególności z badań na preparatach *in situ*, opisywały bradykardię powodowaną przez wywołanie odruchu [402–404]. Odmienne profile zmian częstości serca w doświadczeniach w preparatach *in situ* może wynikać z faktu, że aferentna impulsacja z mechanoreceptorów płucnych była w nich nieobecna, a zatem badano pierwotny odruch z chemoreceptorów tętnicznych. W przeprowadzonym badaniu drogi aferentne z mechanoreceptorów płuc były aktywne z powodu obecności samoistnych ruchów oddechowych u znieczulonego zwierzęcia. W związku z powyższym uzasadnione wydaje się wystąpienie tachykardii jako dominująca odpowiedź chronotropowej serca, a badany był wtórny odruch z chemoreceptorów tętnicznych [40,203,243,405]. Podobny wzorzec odpowiedzi hemodynamicznej u znieczulonych szczurów hipertensyjnych SHR i szczurów normotensyjnych z zachowanym spontanicznym oddechem obserwowany był przez innych badaczy u zwierząt normotensyjnych [369,406] oraz u czuwających szczurów SHR i WKY, u których odruch wywoływany był ekspozycją na krótkotrwałą hipoksję [399]. Otrzymane w doświadczeniu wyniki są jednak w sprzeczności z doniesieniami, w których opisywano bradykardię obecną wtórnie do farmakologicznie wywołanego odruchu u szczurów

czuwających [383,384]. Należy jednak podkreślić, że w powyższych pracach stwierdzone były wzrosty MABP przekraczające 50 mm Hg, co mogło doprowadzić do silnego pobudzenia odruchu z baroreceptorów tętniczych i wtórnie wystąpienia bradykardii mimo aktywacji odruchu z chemoreceptorów tętniczych. Dodatkowo Hayward i wsp. analizowali HR jedynie w początkowym etapie odruchu przed osiągnięciem maksymalnych wartości ciśnienia tętniczego, natomiast HR w okresie pełnej odpowiedzi presyjnej charakteryzowała się zwiększoną częstością [407].

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że farmakologicznie wywołany odruch z chemoreceptorów tętniczych prowadził do prawie dwukrotnego zwiększenia przepływu krwi w tętnicy udowej u szczurów hipertensyjnych SHR w stosunku do wartości spoczynkowej, natomiast nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu na przepływ w tętnicy udowej u szczurów normotensyjnych WKY. Dostępna literatura naukowa przedstawiająca zagadnienia dotyczące indukowanej przez odruch z chemoreceptorów tętniczych regulacji przepływu w poszczególnych narządach jest nieliczna i w przypadku modeli zwierzęcych dotyczy przede wszystkim warunków normotensji. W badaniach na zwierzętach w zależności od warunków doświadczalnych odruch ten był związany ze skurczem lub rozkurczem tętnic wieńcowych u zwierząt normotensyjnych [248,408]. Wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętniczych u znieczulonych szczurów prowadziło do skurczu tętnic trzewnych i spadku przepływu w łożysku trzewnym [409]. Z kolei wyniki badań na małych populacjach osób zdrowych i pacjentów z NT są niejednoznaczne. U normotensyjnych osób w trakcie wysiłku fizycznego, pobudzenie odruchu z chemoreceptorów tętniczych ograniczało przepływ przez tętnicę udową w warunkach normoksji, a hamowanie odruchu przez hiperoksję lub dopaminę zwiększało przepływ przez tętnicę udową [410], wskazując na naczyniozężające działanie odruchu w warunkach normotensji. Odmienne wyniki uzyskano u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, u których odruch z chemoreceptorów tętniczych pobudzany był poprzez ekspozycję na normokapniczną hipoksję, co zwiększało przepływ przez tętnicę udową, natomiast u pacjentów z NT pobudzenie odruchu nie miało wpływu na przepływ w tętnicy udowej [411]. Odmienne wyniki przedstawiono też dla pacjentów z bezdechem obturacyjnym i NT, u których pobudzenie odruchu poprzez ekspozycję na hipoksję prowadziło do zwiększenia przepływu w tętnicy ramieniowej [412]. Należy podkreślić, że w powyższych pracach ocena przepływu przez tętnice obwodowe nie jest łatwa do interpretacji ze względu na naczyniorozszerzające działanie hipoksji, co będzie przeciwstawnie działać względem wzrostu pobudzenia współczulnego wynikającego z pobudzenia odruchu z chemoreceptorów tętniczych.

Aktywacja odruchu z chemoreceptorów tętniczych prowadzi do silnego pobudzenia współczulnego skutkującego wzrostem oporu naczyniowego, zwiększeniem powrotu żylnego do serca i w efekcie zwiększeniem rzutu serca [40,203]. Przepływ krwi w danym łożysku naczyniowym/narządzie zależy wprost proporcjonalnie od gradientu ciśnienia utrzymującego perfuzję i odwrotnie proporcjonalnie od oporu naczyniowego [413,414]. W związku z powyższym obserwowany u szczurów SHR przejściowo zwiększony przepływ krwi w tętnicy udowej można interpretować raczej jako wynik większego wzrostu ciśnienia tętniczego niż obniżenia oporu naczyniowego. Natomiast u normotensyjnych szczurów WKY brak zmian w przepływie krwi w tętnicy udowej może wynikać z porównywalnych zmian we wzroście ciśnienia krwi i wzroście oporu naczyniowego.

W przeprowadzonym badaniu w trakcie odruchu z chemoreceptorów tętniczych rejestrowano także parametry oddechowe. Dostępne piśmiennictwo dotyczące odpowiedzi oddechowej na pobudzenie odruchu u szczurów hipertensyjnych SHR jest ubogie. Pierwsza praca, która powiązała aktywność kłębków szyjnych z NT opublikowana została przez profesora Jacka Przybylskiego w 1978, który wykorzystując hipertensyjne szczury SHR wykazał obecność hiperwentylacji u młodych szczurów SHR w okresie rozwoju nadciśnienia tętniczego [341]. W kolejnej pracy wykazał też, że u znieczulonych uretanem szczurów SHR dezaktywacja odruchu z chemoreceptorów kłębków szyjnych poprzez oddychanie 100% tlenem prowadziła do zmniejszenia wentylacji minutowej [312], co świadczyło o zwiększonym napędzie oddechowym zależnym od chemoreceptorów tętniczych u szczurów hipertensyjnych. W pewnej sprzeczności z tym doniesieniem są obecne wyniki, gdyż obustronne odnerwienie kłębków szyjnych nie prowadziło do istotnych zmian w parametrach krążeniowo-oddechowych. Brak obniżenia wentylacji płuc po odnerwieniu kłębków szyjnych, podobnie jak w przypadku opisanych wcześniej parametrów krążeniowych, sugeruje, że odruch z chemoreceptorów tętniczych nie był tonicznie aktywny w spoczynku u hipertensyjnych zwierząt w zastosowanym w pracy układzie doświadczalnym. Prawdopodobną przyczyną nieobecności tonicznej aktywności odruchu z chemoreceptorów tętniczych u hipertensyjnych szczurów SHR jest przeprowadzenie pomiarów w warunkach znieczulenia ogólnego z użyciem uretanu. Pomimo niewielkiego wpływu tej formy znieczulenia na parametry hemodynamiczne i oddechowe, aktywność i amplituda odruchów krążeniowo-oddechowych w warunkach znieczulenia jest zmniejszona [415], co może tłumaczyć obserwowany brak spoczynkowej tonicznej aktywności odruchu, przy jednocześnie zachowanej większej czułości odruchu przejawiającej się większą zakresem

odpowiedzi presyjnej i hiperwentylacyjnej na farmakologiczne pobudzenie chemoreceptorów tętnicznych u szczurów SHR w porównaniu do kontrolnych szczurów WKY..

Wywołanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych wywołało wzrost częstotliwości oddechów (RR), który był porównywalny pomiędzy szczurami hipertensyjnymi SHR i normotensyjną kontrolą WKY. Podobne wyniki w odniesieniu do częstotliwości oddechów przedstawił Hayward i wsp., którzy nie stwierdzili istotnych różnic we wzroście RR pomiędzy znieczulonych uretanem szczurami SHR i szczurami WKY pod wpływem pobudzenia odruchu z chemoreceptorów tętnicznych [407]. Niedawno Aitken i wsp. również potwierdzili porównywalny między szczurami SHR i WKY wzrost częstotliwości oddechów pod wpływem farmakologicznego wywołania odruchu [416]. Jednak w żadnej z powyższych prac autorzy nie rejestrowali wentylacji płuc.

Odpowiedź oddechowa na odruch z chemoreceptorów jest często oceniana w preparatach *in situ* poprzez rejestrowanie aktywności nerwu przeponowego lub częstotliwości oddechów [417]. Niewielka liczba badań opisuje jednak wywołane przez odruch zmiany w wentylacji u zwierząt bez rozległego urazu zabiegowego jaki jest konieczny przy preparowaniu nerwów przeponowych [88,312,418]. W przedstawionym badaniu oceniano odpowiedź oddechową poprzez rejestrację wentylacji minutowej, częstości oddechów i końcowo-wydechowego dwutlenku węgla. Zarówno u nadciśnieniowych szczurów SHR, jak i normotensyjnych szczurów WKY wystąpiła zwiększona wentylacja płuc i częstotliwość oddechów z towarzyszącym istotnym spadkiem $ETCO_2$, co wskazuje na hiperwentylację podczas odruchu z chemoreceptorów tętnicznych. Co więcej, u szczurów SHR z NT wystąpił większy wzrost wentylacji niż u kontrolnych szczurów WKY, co wskazuje na zwiększoną czułość odpowiedzi oddechowej na aktywację odruchu z chemoreceptorów obwodowym w NT. We wcześniejszych badaniach opisano wyraźnie większą odpowiedź na hipoksję u szczurów SHR niż WKY ocenianą za pomocą pomiarów aktywności nerwu zatokowego [311]. Obserwowany istotnie większy wzrost wentylacji płuc u szczurów hipertensyjnych SHR niż u normotensyjnej kontroli jest też zgodny z doniesieniami wskazującymi na istotnie większy przyrost wentylacji po pobudzeniu odruch z chemoreceptorów tętnicznych niską prężnością tlenu w powietrzu oddechowym u czuwających szczurów SHR w porównaniu do szczurów WKY [399]. Jest to zgodne także z doniesieniami z badań na ludziach, w których opisano zwiększoną odpowiedź wentylacyjną na aktywację odruchu z chemoreceptorów tętnicznych u pacjentów z NT [273,347].

Wartym odnotowania jest także fakt, że po jednej minucie od wywołania odruchu część parametrów nadal była podwyższona w stosunku do wartości wyjściowych. Efekt ten

był szczególnie wyraźny u szczurów SHR, u których utrzymywała się zwiększona wentylacja minutowa, obniżone ETCO₂ i podwyższona częstość serca. U szczurów normotensyjnych WKY obserwowano jedynie nieznaczne podwyższenie wentylacji minutowej i niewielkie zmniejszenie przepływu krwi w tętnicy udowej. Zmiany te utrzymywały się minutę po farmakologicznym wywołaniu odruchu, co wraz z większą odpowiedzią presyjną i hiperwentylacyjną, wskazuje na zwiększoną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętnicznych przejawiającą się dłużej trwającą odpowiedzią krążeniowo-oddechową u szczurów SHR z NT.

5.3. Układ wazopresynergiczny

Przeprowadzone badania potwierdziły, że szczury SHR z NT wykazują większą odpowiedź krążeniową i odpowiedź oddechową na dożylnie podanie AVP niż normotensyjne szczury WKY.

Oprócz działania nerkowego, dobrze poznany jest presyjny efekt AVP w regulacji układu sercowo-naczyniowego [68,85]. W przeprowadzonych doświadczeniach wzrost ciśnienia tętniczego w odpowiedzi na dożylnie podanie AVP był istotnie większy u szczurów z NT niż u szczurów normotensyjnych, przy czym w obu grupach wzrost ciśnienia tętniczego w porównaniu do wartości wyjściowych był istotny. Nasilony efekt presyjny AVP został po raz pierwszy opisany przez Mohring'a i wsp., którzy pokazali, że u czuwających szczurów SHR obwodowe podanie AVP prowadziło do większych wzrostów ciśnienia tętniczego, a wielkość odpowiedzi presyjnej u szczurów SHR była silniej wyrażona dla danych stężeń osoczowych AVP w porównaniu do kontrolnych szczurów WKY [313,419]. Również nasilony efekt presyjny AVP obserwowany był u szczurów SHR w porównaniu do szczurów WKY w modelu perfundowanego łożyska trzewnego [420]. Część autorów nie stwierdzała jednak istotnych różnic w działaniu presyjnym AVP pomiędzy czuwającymi szczurami SHR i WKY [329,421]. Może to wynikać z efektu naczynio-rozszerzającego AVP zależnego od receptora V₂, gdyż podanie selektywnego antagonisty receptora V₂ wyraźnie nasila odpowiedź presyjną na AVP u szczurów SHR [314,422]. Niezależnie od działania obwodowego, u szczurów SHR stwierdzono również zwiększoną aktywność presyjną mózgowego układu wazopresynergicznego, która zależy od pobudzenia receptorów V_{1a} [329,423].

W przeprowadzonych badaniach zablokowanie receptora V_{1a} za pomocą selektywnego antagonisty obniżyło ciśnienie tętnicze krwi tylko u szczurów SHR, co także

jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami z badań na szczurach SHR [314,324] oraz u pacjentów z NT [424]. Sugeruje to, że u szczurów nadciśnieniowych SHR układ wazopresynergiczny wykazuje toniczną aktywność w utrzymaniu spoczynkowych wartości ciśnienia tętniczego. Przemawiają za tym również badania, w których przez okres od 4 do 10 tygodni w sposób przewlekły podawano hipertensyjnym szczurom SHR selektywnego antagonistę receptora V1a uzyskując istotne obniżenie ciśnienia tętniczego [425,426].

Odpowiedzi presyjnej na AVP towarzyszyły też zmiany przepływu w tętnicy udowej. Istotny wzrost przepływu przez tętnicę udową po dożylnym podaniu AVP obserwowany był jedynie u normotensyjnych szczurów WKY, natomiast u hipertensyjnych szczurów SHR nie stwierdzono zmian tego parametru. Przepływ w danym łożysku naczyniowym zależy od zmian ciśnienia perfuzyjnego, które jest pochodną średniego ciśnienia tętniczego oraz zmian oporu naczyniowego. Wykazano istotne działanie naczynioskurczowe AVP względem tętnic trzewnych, nerkowych oraz tętniczek oporowych mięśni szkieletowych, które nasilone jest u szczurów SHR [427–431]. Jednocześnie AVP poprzez wzrost ciśnienia tętniczego prowadzącego do wzrostu przepływu krwi może wywoływać efekty naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego uwalniania NO i prostaglandyn w obrębie tętnicy udowej, co zostało stwierdzone u normotensyjnych szczurów znieczulonych uretanem [432,433]. Również u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym stwierdzano naczyniorozkurczowe działanie AVP i wzrost przepływu w naczyniach przedramienia [434]. Zarazem rozkurcz tętnicy udowej zależny od czynników śródbłonkowych [422,433] oraz zależny od receptorów beta-adrenergicznych [435] jest ograniczony u hipertensyjnych szczurów SHR. Obserwowany wzrost przepływu w tętnicy udowej u normotensyjnych szczurów WKY oraz brak zmian przepływu u hipertensyjnych szczurów SHR są więc prawdopodobnie wypadkową odpowiednio wzrostu ciśnienia tętniczego i odpowiedzi naczyniorozkurczowej u szczurów WKY oraz wzrostu ciśnienia tętniczego i odpowiedzi naczynioskurczkowej u szczurów SHR. Badania *in vitro* z izolowanymi naczyniami tętniczymi od szczurów SHR i WKY użytych w obecnym badaniu mogłyby potwierdzić taką interpretację uzyskanych wyników.

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych zmian częstości serca w odpowiedzi na dożylnie podanie AVP, pomimo że można by oczekiwać, iż wzrost ciśnienia tętniczego spowoduje spowolnienie częstości serca z powodu pobudzenia odruchu z baroreceptorów tętniczych. Ponadto odpowiedź taka powinna być lepiej wyrażona u normotensyjnych szczurów WKY ze względu na uwrażliwiające działanie AVP względem odruchu z baroreceptorów tętniczych oraz większą czułość tego odruchu u zwierząt normotensyjnych w porównaniu do hipertensyjnych szczurów SHR [419,421]. Uzyskane w

pracy wyniki wskazują jednak na słabą odpowiedź chronotropową serca po podaniu AVP, co może wynikać z przeprowadzenia pomiarów w warunkach znieczulenia uretanem, który preferencyjnie zmniejsza komponentę sercową odruchu z baroreceptorów tętniczych, co w efekcie ogranicza odpowiedź chronotropową serca na zmiany ciśnienia tętniczego krwi [436].

Podania selektywnego antagonisty receptora V1a zniosło wszystkie efekty hemodynamiczne dożylnie podanej AVP, co wskazuje, że odpowiedź presyjna u szczurów hipertensyjnych SHR oraz u szczurów normotensyjnych WKY, a także wzrost przepływu w tętnicy udowej u szczurów WKY, są zależne od receptora V1a dla AVP. Obserwacja ta potwierdza liczne wcześniejsze doniesienia wskazujące na dominujący udział receptora V1a w odpowiedzi hemodynamicznej na AVP.

Zmianom parametrów hemodynamicznych towarzyszyło zmniejszenie wartości parametrów oddechowych pod wpływem działania egzogennej AVP. W przeszłości hamujący wpływ dożylnie podanej AVP na wentylację płuc stwierdzono u przytomnych i znieczulonych szczurów [88,140–142], czuwających psów [139] oraz u płodów jagnięcych [143], jednak nie badano wpływu AVP na wentylację w warunkach NT. Odpowiedź hamującą AVP względem wentylacji płuc można tłumaczyć aktywacją baroreceptorów tętniczych, oddziaływaniem AVP obecnej we krwi na narządy okołokomorowe mózgu lub wpływem AVP na kłębki szyjne i odruch z chemoreceptorów tętniczych.

Wzrost ciśnienia tętniczego wywołany podaniem AVP pobudza odruch z baroreceptorów tętniczych [437]. Z kolei pobudzenie baroreceptorów tętniczych prowadzi do hamowania aktywności neuronów oddechowych, co skutkuje zmniejszeniem wentylacji płuc [146–149]. W związku z tym pobudzenie odruchu z baroreceptorów tętniczych wtórnie do wzrostu ciśnienia tętniczego jest możliwym wyjaśnieniem efektu hamującego aktywność układu oddechowego po dożylnym podawaniu AVP, który był obserwowany u szczurów hipertensyjnych SHR. W przeciwieństwie do szczurów SHR z NT, wzrostowi ciśnienia tętniczego u szczurów normotensyjnych WKY, choć mniejszemu niż u szczurów hipertensyjnych, nie towarzyszyło istotne zahamowanie wentylacji. W badaniach przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, podanie AVP u normotensyjnych szczurów Sprague-Dawley spowodowało zmniejszenie wentylacji minutowej, jednak wzrost ciśnienia tętniczego u tych szczurów był znacznie wyższy, niż w obecnie analizowanym doświadczeniu (~ 40 mm Hg vs ~ 20 mm Hg) [88]. Odruch z baroreceptorów tętniczych u szczurów SHR charakteryzuje się niższą czułością w porównaniu ze zwierzętami normotensyjnymi [277,369,398], a tym samym powinien mieć

również mniejszy wpływ na regulację wentylacji płuc niż u zwierząt normotensyjnych. Dodatkowo zarówno u szczurów SHR jak i u szczurów WKY wzrostowi ciśnienia tętniczego po podaniu AVP nie towarzyszyło istotne obniżenie częstości serca, co wskazuje na brak istotnego pobudzenia odruchu z baroreceptorów tętnicznych. Argumenty te przemawiają za ograniczonym udziałem odruchu z baroreceptorów tętnicznych w obserwowanym zmniejszeniu wentylacji płuc pod wpływem egzogennej AVP u hipertensyjnych szczurów SHR. Dlatego możliwe jest również, że AVP wywiera swoje działanie na układ oddechowy przez wpływ na chemoreceptory tętnicze, w tym kłębki szyjne.

Miejscowe podanie AVP w okolicę kłębka szyjnego powodowało obniżenie wentylacji i częstotliwości oddechu jedynie u szczurów SHR przy braku zmian w czynności oddechowej u szczurów normotensyjnych WKY. Dotętnicze podanie AVP w okolicę kłębka szyjnego powodowało istotny statystycznie wzrost ciśnienia tętniczego u obu szczepów szczurów, jednak jego amplituda była mała (~3 mm Hg) i w związku z tym nie mogła mieć istotnego wpływu na odruch z baroreceptorów tętnicznych, a tym samym na zmiany wentylacji wynikające z pobudzenia baroreceptorów tętnicznych. Wyniki te przemawiają za tym, że efekty oddechowe AVP u szczurów hipertensyjnych SHR zależą od pobudzenia kłębków szyjnych. Brak zmian w wentylacji po miejscowym podaniu AVP u szczurów normotensyjnych WKY pozostaje jednak w pewnej sprzeczności z wcześniejszym doniesieniem, w którym u szczurów normotensyjnych Sprague-Dawley zaobserwowano wzrost parametrów oddechowych [88]. Należy jednak zauważyć, że w pracy tej cewnik do podań dotętnicznych znajdował się w tętnicy szyjnej wspólnej, w związku z czym całkowicie był zamknięty napływ krwi do mózgu przez to naczynie. W tym kontekście należy uwzględnić potencjalny wpływ AVP na parametry oddechowe poprzez jej oddziaływanie z narządami okołokomorowymi. W wykonanych w obecnej pracy doświadczeniach umieszczenie cewnika w tętnicy szyjnej zewnętrznej w dużo mniejszym stopniu ograniczało fizjologiczny domózgowy przepływ krwi. Różnice w umiejscowieniu cewników mogły mieć jednak wpływ na dostęp AVP do narządów okołokomorowych mózgu (CVOs), które pozbawione są bariery krew-mózg i w związku z tym są dostępne dla substancji krążących we krwi oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym [374]. Wyniki opublikowanych badań wskazują, że w CVOs, w tym narządzie naczyniowym blaszki krańcowej (OVLT), narządzie podsklepieniowym (SFO) i polu najdalszym (AP) ekspresji ulega głównie receptor V1a [9,438–442]. Wiadomo, że AVP oddziałując na receptory V1a w obrębie AP wywierała działanie hamujące względem układu oddechowego [153]. Natomiast elektryczna stymulacja SFO prowadziła do zwiększenia objętości oddechowej i wydłużenia odstępu pomiędzy

kolejnymi wdechami u normotensyjnych szczurów w znieczuleniu uretanem [443]. Również podanie AVP do komory bocznej mózgu, co umożliwia oddziaływanie tego hormonu na swoje receptory w obszarze SFO, zwalniało częstotliwość oddechów [152]. Ze względu na zachowany domózgowy przepływ krwi przy umiejscowieniu cewnika w tętnicy szyjnej zewnętrznej do podań w okolicę kłębka szyjnego, nie można wykluczyć, że część obserwowanej odpowiedzi w obecnych badaniach wynikała z oddziaływania AVP na CVOs.

Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizmy regulujących układ oddechowy zależne od AVP są silniej wyrażone u szczurów hipertensyjnych SHR i mogą wynikać z oddziaływania AVP na kłębki szyjne. Potencjalne efekty AVP poprzez mechanizmy nerwowe zależne od oddziaływania AVP na mózgowo receptory, szczególnie zlokalizowane CVOs, wymaga potwierdzenia w badaniach z celowanym blokowaniem lub pobudzeniem mózgowych receptorów dla AVP.

Udział chemoreceptorów tętnicznych i AVP w regulacji układu sercowo-naczyniowego i układu oddechowego jest dodatkowo potwierdzony przez zmieniony wzór odpowiedzi krążeniowo-oddechowej na AVP po obustronnym odnerwieniu kłębków szyjnych. Odnerwienie kłębków szyjnych miało nieistotny wpływ na presyjne działanie AVP u szczurów SHR z NT, ale wzrost ciśnienia tętniczego były znacznie obniżony u szczurów WKY. Dodatkowo, pomimo podobnego wzrostu ciśnienia tętniczego krwi u szczurów SHR z odnerwionymi kłębkami szyjnymi i szczurów SHR bez odnerwienia, AVP miała nieistotny wpływ na wentylację minutową u hipertensyjnych szczurów SHR z odnerwionymi kłębkami szyjnymi. Obserwacje te w połączeniu z oddechową reakcją na miejscowo podaną AVP sugerują, że kłębki szyjne biorą udział w odpowiedzi presyjnej na AVP u zwierząt normotensyjnych, natomiast efekty oddechowe AVP zależne od kłębków szyjnych występują głównie u szczurów SHR z NT. Zrozumienie przyczyny różnic w efektach oddechowych AVP między hipertensyjnymi szczurami SHR i normotensyjnymi szczurami WKY wymaga dalszych badań. Przeprowadzenie badań z bezpośrednimi podaniami AVP do kłębków szyjnych w modelu *in situ* działającego serca i pnia mózgu (*working heart-brainstem preparation*), w którym wyeliminowany jest wpływ znieczulenia, natomiast zachowane są drogi aferentne z kłębków szyjnych i baroreceptorów tętnicznych oraz możliwy jest pomiar aktywności nerwu zatokowego, nerwów współczulnych i nerwu przeponowego [417], umożliwiłoby potwierdzenie uzyskanych w pracy wyników u znieczulonych uretanem szczurów.

Szczury SHR wykazywały większą odpowiedź hipotensyjną i oddechową związaną ze wzrostem wentylacji płuc na podanie antagonisty receptora V1a niż normotensyjne szczury

WKY. Podobny przejściowy wpływ blokady receptora V1a na wentylację płuc stwierdzono u czuwających psów [144]. Hamujące działanie receptora V1a na oddychanie potwierdzają również badania, w których podanie antagonisty receptora V1a uwidacznia stymulujący wpływ oksytocyny na aktywność oddechową u szczurów [140] i Ang II u psów [444]. Obniżenie wentylacji płuc po zablokowaniu receptora V1a sugeruje, że endogenna AVP i receptor V1a biorą udział w pobudzaniu wentylacji płuc w spoczynku u szczurów SHR. W przeciwieństwie do szczurów SHR, wpływ podania antagonisty receptora V1a na parametry oddechowe był nieistotny u normotensyjnych szczurów WKY, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami opisanymi przez zespół z Katedry i Zakładu Fizjologii u znieczulonych uretanem normotensyjnych szczurów Sprague-Dawley [88] oraz przez Walkera i Jennings, którzy stwierdzili nieistotny wpływ blokady receptora V1a na wentylację płuc u czuwających szczurów normotensyjnych [142]. Optymalną metodą do pełnej weryfikacji powyższych obserwacji dotyczących AVP i jej receptora wydaje się być celowana regulacja w dół receptorów V1a w kłębkach szyjnych z wykorzystaniem interferujących mikroRNA, zarówno u szczurów hipertensyjnych jak i normotensyjnych, jednak doświadczenia z miejscowym modyfikowaniem ekspresji receptorów w kłębkach szyjnych opisano dotychczas jedynie dla receptora purynergicznego P2X3 w dużym modelu zwierzęcym u psów [445].

W opublikowanej przez nasz zespół pracy postulujemy, że AVP może działać jako neurohormon, który poza regulacją układu krążenia, przyczynia się także istotnie do regulacji układu oddechowego w warunkach zaburzeń homeostazy lub stresu [22]. Jednym z potencjalnych celów dla AVP krążącej w krwioobiegu może być kłębek szyjny. We wcześniejszych pracach z Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej potwierdzono w barwieniach immunofluorescencyjnych, że chemowrażliwe komórki kłębka szyjnego u normotensyjnych szczurów Sprague-Dawley wykazują obecność zarówno N-końcowego, jak i C-końcowego fragmentu receptora V1a [88]. Ponadto białko G q/11, będące wewnątrzkomórkowy składnikiem sygnalizacji receptora V1a, zostało także stwierdzone w chemowrażliwych komórkach kłębka szyjnego u myszy [446]. Kolejnym etapem w badaniach nad rolą tego receptora jest potwierdzenie w pracy doktorskiej obecności receptora V1a w kłębkach szyjnych hipertensyjnych szczurów SHR, jak również w kłębkach szyjnych normotensyjnych szczurów WKY. Jednak zastosowane w doświadczeniu metody nie pozwoliły na ocenę ilościową występowania tego receptora u obu badanych szczepów. W niedawno opublikowanej pracy dotyczącej roli receptora dla glukagonopodobnego peptydu typu 1 (GLP1R) w kłębkach szyjnych, Pauza i wsp. wykorzystali narzędzia transkryptomiki

do oceny ekspresji mRNA receptorów związanych z białkami G w kłębku szyjnym u szczurów hipertensyjnych SHR i normotensyjnych szczurów WKY [447]. Analiza załączonej do publikacji bazy wyników wskazuje na istotnie większą ekspresję mRNA receptora V1a w kłębkach szczurów SHR niż normotensyjnych szczurów WKY, jednak obecność białka receptora V1a u szczurów hipertensyjnych SHR nie została dotychczas opisana w dostępnej literaturze. Uzyskane immunobarwienia w kierunku receptora V1a u szczurów SHR i szczurów WKY wskazuje na obecność białka receptora na komórkach chemoreceptorowych kłębka szyjnego, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami u szczurów normotensyjnych Sprague-Dawley [88]. W związku z powyższym można przypuszczać, że krążąca AVP może wpływać na aktywność kłębka szyjnego poprzez wiązanie się ze swoim receptorem V1a w komórkach chemoreceptorowych kłębka szyjnego. Warto zwrócić w tym miejscu uwagę, że oprócz bezpośredniego wpływu na komórki chemoreceptorowe kłębka szyjnego poprzez receptory V1a, efekt krążącej AVP może wynikać również z działania zwężającego naczynia krwionośne i wtórne zmiany i spadek przepływu krwi przez kłębek szyjny. Koncepcję spadku przepływu przez chemoreceptory tętnicze jako mechanizm związany z występowaniem NT jako pierwszy przedstawił pracujący w Zakładzie Fizjologii Akademii Medycznej w Warszawie profesor Jacek Przybylski [150]. Późniejsze prace eksperymentalne potwierdziły, że zmniejszony przepływ krwi przez kłębek szyjny może prowadzić do uwrażliwienia chemoreceptorów tętniczych i nasilenia tonicznej aktywności i amplitudy odpowiedzi na pobudzenie kłębków szyjnych [150,151,200,448,449]. Jednak zrozumienie regulacyjnego wpływu AVP poprzez zmiany oporu naczyniowego i redukcję przepływu krwi w kłębkach szyjnych wymaga dalszych badań.

Przeprowadzone badanie wykazało, że zarówno oddechowe, jak i hemodynamiczne efekty AVP zależą od receptora V1a, ponieważ selektywny antagonist receptor skutecznie znosił odpowiedzi na dożylny i dotętniczny podanie AVP. Wyniki te są zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami, które pokazują, że blokada receptora V1a za pomocą selektywnych antagonistów zapobiega zmianom wentylacji płuc i ciśnienia tętniczego krwi wywołanym dożylnym podaniem AVP u znieczulonych szczurów normotensyjnych [88,140,141]. Uzyskane wyniki dodatkowo potwierdzają doniesienia w literaturze naukowej wskazujące, że wpływ AVP na regulację układu oddechowego i sercowo-naczyniowego zależy głównie od receptora V1a [22,62,450].

5.4. Ograniczenia pracy

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej mają pewne istotne ograniczenie, które powinny być brane pod uwagę przy interpretacji wyników. Przede wszystkim pomiary krążeniowo-oddechowe przeprowadzono w znieczuleniu terminalnym z wykorzystaniem uretanu. Warunki hemodynamiczne i wentylacyjne i ich regulacja odruchowa w trakcie znieczulenia odbiegają od tych obserwowanych u szczurów czuwających. Doniesienia w literaturze opisują jednak ograniczony wpływ znieczulenia uretanem na parametry krążeniowo-oddechowe i odruchy sercowo-naczyniowe w porównaniu do innych form znieczulenia [376,378–380], a znieczulenie to jest szeroko stosowane w podobnych doświadczeniach.

Również chirurgiczne przygotowanie zwierząt oraz uraz około zabiegowy mogą istotnie wpływać na funkcje regulacyjne układu krążenia i oddechowego. W celu zmniejszenia wpływu procedur chirurgicznych, w trakcie doświadczeń starano się możliwie ograniczyć uszkodzenia tkanek i przeprowadzać czynności zabiegowe w możliwie atraumatyczny sposób. W szczególności wszystkie kaniulacje naczyń przeprowadzono w przestrzeni podskórnej, bez otwierania jam ciała tak, aby nie zmieniać warunków ciśnieniowych w jamie brzusznej i klatce piersiowej związanych z cyklem oddechowym. Cewniki wprowadzano do naczyń poprzez pojedyncze nakłucia, po rozpreparowaniu pęczka naczyniowo-nerwowego na możliwie krótkim odcinku. Przeprowadzenie badań u zwierząt czuwających z wszczepionymi przetwornikami do rejestracji telemetrycznych parametrów sercowo-naczyniowych [451] oraz wykorzystanie komory do pletyzmografii całego ciała do rejestracji parametrów oddechowych [452] ograniczyłoby zarówno wpływ znieczulenia jak i przeprowadzenia pomiarów fizjologicznych w warunkach okołozabiegowych.

Podania w okolicę kłębka szyjnego poprzez iniekcję AVP do tętnicy szyjnej zewnętrznej nie są tożsame z podaniem do samego kłębka szyjnego. Mimo ograniczenia działania ogólnoustrojowego, tak podawana AVP mogła wywierać też efekty zależne od pobudzenia jej receptorów w CVOs. Przeprowadzenie badań z blokadą ośrodkowych receptorów V1a [122] lub uszkodzeniem CVOs [377] umożliwiłoby ocenę udziału mózgowych receptorów V1a w obserwowanych efektach. Natomiast wykorzystanie preparatów *in situ* działającego serca i pnia mózgu umożliwiłoby precyzyjne podanie AVP do kłębka szyjnego [417].

W analizie wyników pomiarów krążeniowo-oddechowych nie byliśmy w stanie w pełni oddzielić udziału AVP w efektach oddechowych od wpływu aktywacji

baroreceptorów tętnicznych na wentylację płuc. Wykorzystanie innych modeli doświadczalnych, w tym pomiarów *in situ* oraz celowanych na kłębki szyjne zahamowania ekspresji receptorów V1a mogłoby lepiej wyodrębnić efekty AVP związane z samymi kłębkami szyjnymi. Należy zwrócić uwagę, że celowane zmiany ekspresji receptorów w kłębkach szyjnych opisano dotychczas jedynie w doświadczeniach na psach, u których zahamowano ekspresję receptora purynergicznego P2X3 z wykorzystaniem mikroRNA dostarczanego w plazmidach uwalnianych z mikropęcherzyków aktywowanych punktowo w kłębkach przy zastosowaniu wiązki ultradźwiękowej [445].

W trakcie doświadczeń występowała duża zmienność pomiaru bezwzględnych wartości przepływu krwi w tętnicy udowej pomiędzy poszczególnymi szczurami oraz pewna zmienność wynikająca z trudności technicznych w uzyskaniu stabilnego położenia głowicy dopplerowskiej przez cały okres doświadczenia, szczególnie w trakcie manipulacji w obrębie szyi. Z tego względu odstąpiono od obliczania oporu naczyniowego kończyny tylnej podczas odruchu z chemoreceptorów tętnicznych oraz w odpowiedzi na dożylne i miejscowe podanie AVP, a analizę oparto na samym przepływie naczyniowym.

W barwieniach immunofluorescencyjnych udało nam się potwierdzić obecność receptora V1a w kłębkach szyjnych. Metody przez nas stosowane pozwoliły jednak na jedynie jakościową ocenę występowania tego receptora. W celu pełnego poznania potrzebna jest ilościowa ocena jego występowania, a także potwierdzenia przedstawionej przez Pauza i wsp. ekspresji mRNA dla receptora V1a dla AVP w kłębkach szyjnych [447]. Ponadto zastosowanie technik hybrydyzacji *in situ* dla mRNA receptora V1a pozwoliłoby dodatkowo do wykonanych barwień potwierdzić jego lokalizację komórkową w kłębkach szyjnych [453].

5.5. Podsumowanie

Otrzymane wyniki dostarczają nowej wiedzy dotyczącej odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w kłębkach szyjnych i udziału wazopresyny w regulacji krążeniowo-oddechowej w pierwotnym nadciśnieniu tętnicznym. Potwierdzono wygórowanie odruchu z chemoreceptorów tętnicznych w warunkach nadciśnienia tętniczego. Obserwowane zmiany parametrów krążeniowych i oddechowych pod wpływem dożylnego oraz miejscowego podania wazopresyny sugerują, że wazopresyna oddziałuje na czynność układu krążenia i układu oddechowego również poprzez kłębki szyjne, a wpływ ten jest bardziej nasilony u zwierząt hipertensyjnych i zależy od receptorów V1a dla wazopresyny. W barwieniach immunohistochemicznych potwierdzono obecność w kłębkach szyjnych szczurów

hipertensyjnych SHR. Łącznie wyniki te wskazują na zwiększone zaangażowanie układu wazopresynergicznego oraz receptora V1a dla wazopresyny w regulację krążeniowo-oddechową u szczurów hipertensyjnych SHR, co potencjalnie może stanowić punkt wyjścia dla poszukiwania nowych sposobów leczenia nadciśnienia tętniczego.

5.6. Wnioski

Wyniki otrzymane z przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej doświadczeń pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Składowa krążeniowa i oddechowa odruchu z chemoreceptorów tętnicznych są wzmożone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, co potwierdza zwiększoną czułość tego odruchu w warunkach nadciśnienia tętniczego.
2. Odruch z chemoreceptorów tętnicznych nie wykazuje tonicznej spoczynkowej aktywności u hipertensyjnych szczurów SHR i normotensyjnych szczurów WKY w badanym układzie doświadczalnym w warunkach znieczulenia ogólnego.
3. Odpowiedzi krążeniowa i oddechowa na dożylnie podanie AVP są nasilone u hipertensyjnych szczurów SHR w porównaniu do normotensyjnych szczurów WKY, co wskazuje na zwiększoną aktywność układu wazopresynergicznego w regulacji krążeniowo-oddechowej w warunkach nadciśnienia tętniczego.
4. Odpowiedź presyjna na miejscowo podaną AVP w okolicę kłębka szyjnego jest podobna zarówno u szczurów hipertensyjnych SHR jak i normotensyjnych szczurów WKY, co wskazuje na brak nasilenia mechanizmów presyjnych zależnych od AVP na poziomie kłębków szyjnych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
5. Odpowiedź oddechowa na miejscowo podaną AVP w okolicę kłębka szyjnego jest obecna jedynie u szczurów hipertensyjnych SHR, co wskazuje na udział AVP w regulacji składowej oddechowej zależnej od kłębków szyjnych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
6. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych hamuje odpowiedź presyjną na dożylnie podaną AVP jedynie u szczurów normotensyjnych WKY, co wskazuje na udział kłębków szyjnych w regulacji układu krążenia przez AVP w warunkach normotensji i silnie wyrażone mechanizmy presyjne niezależne od kłębków szyjnych u zwierząt hipertensyjnych.

7. Obustronne odnerwienie kłębków szyjnych zapobiega wywoływanemu przez dożylnie podaną AVP zahamowaniu wentylacji płuc u szczurów hipertensyjnych SHR, co wskazuje na udział kłębków szyjnych w regulacji składowej oddechowej odpowiedzi na AVP w warunkach nadciśnienia tętniczego.
8. Odpowiedzi krążeniowo-oddechowe na zablokowanie receptora V1a są obecne jedynie u hipertensyjnych szczurów SHR, co wskazuje na udział tego receptora i AVP w utrzymywaniu spoczynkowych wartości parametrów hemodynamicznych i oddechowych w warunkach nadciśnienia tętniczego.
9. Odpowiedzi krążeniowo-oddechowe na AVP zależą od receptora V1a, gdyż jego zablokowanie zapobiegało zmianom wywołanym przez dożylnie (systemowe) i dotętnicze (miejscowe) podanie AVP.
10. Receptor V1a znajduje się na komórkach chemowrażliwych (typu I) w kłębkach szyjnych normotensyjnych szczurów WKY i hipertensyjnych szczurów SHR, co wskazuje na możliwość oddziaływania AVP na chemoreceptory tętnicze.

6. Piśmiennictwo

1. Szczepanska-Sadowska E, Zera T, Sosnowski P, Cudnoch-Jedrzejewska A, Puszko A, Misicka A. Vasopressin and Related Peptides; Potential Value in Diagnosis, Prognosis and Treatment of Clinical Disorders. *Curr Drug Metab.* 2017;18:306–45.
2. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem.* 2006;52:112–9.
3. Bankir L, Bichet DG, Morgenthaler NG. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *J Intern Med.* 2017;282:284–97.
4. Swaab DF, Pool CW, Nijveldt F. Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Neural Transm.* 1975;36:195–215.
5. Ueta Y, Dayanithi G, Fujihara H. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm Behav.* 2011;59:221–6.
6. Verbalis JG. How does the brain sense osmolality? *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:3056–9.
7. Bichet DG. Central vasopressin: dendritic and axonal secretion and renal actions. *Clin Kidney J.* 2014;7:242–7.
8. Buijs RM. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 1978;192:423–35.
9. Kc P, Balan K V, Tjoe SS, Martin RJ, Lamanna JC, Haxhiu MA, et al. Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J Physiol.* 2010;588:725–40.
11. Kc P, Dick TE. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174:55–64.
12. Dumais KM, Veenema AH. Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2016;40:1–23.
13. Rigney N, de Vries GJ, Petrulis A, Young LJ. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology.* 2022;163(9):111.
14. Nussey SS, Prysor-Jones RA, Taylor A, Ang VT, Jenkins JS. Arginine vasopressin and

- oxytocin in the bovine adrenal gland. *J Endocrinol.* 1987;115:141–9.
15. Hupf H, Grimm D, Riegger GA, Schunkert H. Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ Res.* 1999;84:365–70.
 16. Takeda M, Dubey R, Phillips JK, Matsumoto S, Lipski J. Effects of vasopressin on isolated rat adrenal chromaffin cells. *Regul Pept.* 2002;106:55–65.
 17. Verney EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1947;135:25–106.
 18. Quillen EWJ, Cowley AWJ. Influence of volume changes on osmolality-vasopressin relationships in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1983;244:H73-9.
 19. Thornton SN, Leng G, Bicknell RJ, Chapman C, Purdew T. Vasopressin, but not oxytocin, is released in response to water deprivation in conscious goats. *J Endocrinol.* 1986;110:335–40.
 20. Baylis PH. Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. *Am J Physiol.* 1987;253:R671-8.
 21. Gizowski C, Bourque CW. The neural basis of homeostatic and anticipatory thirst. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14:11–25.
 22. Bichet DG. Regulation of Thirst and Vasopressin Release. *Annu Rev Physiol.* 2019;81:359–73.
 22. Proczka M, Przybylski J, Cudnoch-Jędrzejewska A, Szczepańska-Sadowska E, Żera T. Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone. *Front Physiol.* 2021;12:744177.
 23. Schrier RW, Berl T, Anderson RJ. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am J Physiol.* 1979;236:F321-32.
 24. Muller B, Morgenthaler N, Stolz D, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:145–52.
 25. Johnson BD, van Helmond N, Curry TB, van Buskirk CM, Convertino VA, Joyner MJ. Reductions in central venous pressure by lower body negative pressure or blood loss elicit similar hemodynamic responses. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117:131–41.
 26. Gupta P, Henry J, Sinclair R, Von Baumgarten R. Responses of atrial and aortic baroreceptors to nonhypotensive hemorrhage and to transfusion. *Am J Physiol.* 1966;211:1429–37.
 27. Norsk P. Influence of low- and high-pressure baroreflexes on vasopressin release in humans. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;121 Suppl:3–27.

28. Salman IM, Hildreth CM, Ameer OZ, Phillips JK. Differential Contribution of Afferent and Central Pathways to the Development of Baroreflex Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Hypertension*. 2014;63:804–10.
29. Ryan KL, Rickards CA, Hinojosa-Laborde C, Cooke WH, Convertino VA. Sympathetic Responses to Central Hypovolemia: New Insights from Microneurographic Recordings. *Front Physiol*. 2012;3.
30. Arnauld E, Czernichow P, Fumoux F, Vincent JD. The effects of hypotension and hypovolaemia on the liberation of vasopressin during haemorrhage in the unanaesthetized monkey (*Macaca mulatta*). *Pflugers Arch*. 1977;371:193–200.
31. Fyhrquist F, Tikkanen I, Linkola J. Plasma vasopressin concentration and renin in the rat: effect of hydration and hemorrhage. *Acta Physiol Scand*. 1981;113:507–10.
32. Wehberg KE, Gala GJ, Brunner MJ. Comparison of carotid baroreflex control of plasma AVP concentration in conscious and anesthetized dogs. *Am J Physiol*. 1991;261:R950-6.
33. Scott CS, Sharp-Kehl J, Redekopp CA, Ledsome JR. Regulation of plasma vasopressin by plasma osmolality and carotid sinus pressure in anesthetized rabbits. *Am J Physiol*. 1994;266:R796-801.
34. Wang BC, Sundet WD, Goetz KL. Vasopressin in plasma and cerebrospinal fluid of dogs during hypoxia or acidosis. *Am J Physiol*. 1984;247:E449-55.
35. Hanley DF, Wilson DA, Feldman MA, Traystman RJ. Peripheral chemoreceptor control of neurohypophysial blood flow. *Am J Physiol*. 1988;254:H742-50.
36. Wilson DA, Hanley DF, Feldman MA, Traystman RJ. Influence of chemoreceptors on neurohypophyseal blood flow during hypoxic hypoxia. *Circ Res*. 1987;61:II94-101.
37. Koller EA, Bühner A, Felder L, Schopen M, Vallotton MB. Altitude diuresis: endocrine and renal responses to acute hypoxia of acclimatized and non-acclimatized subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1991;62:228–34.
38. Iovino M, Guastamacchia E, Giagulli VA, Fiore G, Licchelli B, Iovino E, et al. Role of central and peripheral chemoreceptors in vasopressin secretion control. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2013;13:250–5.
39. Heistad DD, Marcus ML, Ehrhardt JC, Abboud FM. Effect of stimulation of carotid chemoreceptors on total and regional cerebral blood flow. *Circ Res*. 1976;38:20–5.
40. Zera T, Moraes DJA, da Silva MP, Fisher JP, Paton JFR. The Logic of Carotid Body Connectivity to the Brain. *Physiology (Bethesda)*. 2019;34:264–82.
41. Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW, Somers VK. Carotid body chemoreceptors:

- physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2021;101:1177–235.
42. Honig A, Landgraf R, Ledderhos C, Quies W. Plasma vasopressin levels in healthy young men in response to stimulation of the peripheral arterial chemoreceptors by almitrine bismesylate. *Biomed Biochim Acta.* 1987;46:1043–9.
 43. Rostrup M. Catecholamines, hypoxia and high altitude. *Acta Physiol Scand.* 1998;162:389–99.
 44. Takamata A, Nose H, Kinoshita T, Hirose M, Itoh T, Morimoto T. Effect of acute hypoxia on vasopressin release and intravascular fluid during dynamic exercise in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R161-8.
 45. Wade CE, Claybaugh JR. Plasma renin activity, vasopressin concentration, and urinary excretory responses to exercise in men. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1980;49:930–6.
 46. Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA. Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J Appl Physiol* (1985). 1998;85:835–41.
 47. Hew-Butler T, Hoffman MD, Stuempfle KJ, Rogers IR, Morgenthaler NG, Verbalis JG. Changes in copeptin and bioactive vasopressin in runners with and without hyponatremia. *Clin J Sport Med.* 2011;21:211–7.
 48. Plotsky PM, Bruhn TO, Vale W. Hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion in response to insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology.* 1985;117:323–9.
 49. Berkenbosch F, De Goeij DC, Tilders FJ. Hypoglycemia enhances turnover of corticotropin-releasing factor and of vasopressin in the zona externa of the rat median eminence. *Endocrinology.* 1989;125:28–34.
 50. Caraty A, Grino M, Locatelli A, Guillaume V, Boudouresque F, Conte-Devolx B, et al. Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *J Clin Invest.* 1990;85:1716–21.
 51. Baylis PH, Zerbe RL, Robertson GL. Arginine vasopressin response to insulin-induced hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:935–40.
 52. Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Speroni G, Marcato A, Rossi G, et al. Hypoglycemia-induced arginine vasopressin and oxytocin release is mediated by glucoreceptors located inside the blood-brain barrier. *Neuroendocrinology.* 1992;55:655–9.
 53. Ohbuchi T, Haam J, Tasker JG. Regulation of Neuronal Activity in Hypothalamic

- Vasopressin Neurons. *Interdiscip Inf Sci*. 2015;21:225–34.
54. Antoni FA. Vasopressinergic Control of Pituitary Adrenocorticotropin Secretion Comes of Age. *Front Neuroendocrinol*. 1993;14:76–122.
 55. Savić B, Murphy D, Japundžić-Žigon N. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in Control of Blood Pressure and Blood Pressure Variability. *Front Physiol*. 2022;13:858941.
 56. Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat*. 2009;38:197–208.
 57. Nunn N, Womack M, Dart C, Barrett-Jolley R. Function and pharmacology of spinally-projecting sympathetic pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9:262–77.
 58. Goncharuk VD, Buijs RM, Jhamandas JH, Swaab DF. Vasopressin (VP) and neuropeptide FF (NPFF) systems in the normal and hypertensive human brainstem. *Journal of Comparative Neurology*. 2011;519:93–124.
 59. Fliers E, Guldenaar SEF, Wal N v. d., Swaab DF. Extrahypothalamic vasopressin and oxytocin in the human brain; presence of vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res*. 1986;375:363–7.
 60. Kc P, Haxhiu MA, Tolentino-Silva FP, Wu M, Trouth CO, Mack SO. Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites. *Respir Physiol Neurobiol*. 2002;133:75–88.
 61. Chuang C-W, Cheng M-T, Yang S-J, Hwang J-C. Activation of ventrolateral medulla neurons by arginine vasopressin via V1A receptors produces inhibition on respiratory-related hypoglossal nerve discharge in the rat. *Chin J Physiol*. 2005;48:144–54.
 62. Japundžić-Žigon N, Lozić M, Šarenac O, Murphy D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18:14–33.
 63. Koshimizu T, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b Receptors: From Molecules to Physiological Systems. *Physiol Rev*. 2012;92:1813–64.
 64. Sparapani S, Millet-Boureima C, Oliver J, Mu K, Hadavi P, Kalostian T, et al. The Biology of Vasopressin. *Biomedicines*. 2021;9:89.
 65. Szczepanska-Sadowska E, Wsol A, Cudnoch-Jedrzejewska A, Żera T. Complementary role of oxytocin and vasopressin in cardiovascular regulation. *Int J Mol Sci*. 2021;24(21):11465.

66. Morel A, O'Carroll A-M, Brownstein MJ, Lolait SJ. Molecular cloning and expression of a rat V_{1a} arginine vasopressin receptor. *Nature*. 1992;356:523–6.
67. Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev*. 1988;68:1248–84.
68. Pelletier J-S, Dicken B, Bigam D, Cheung P-Y. Cardiac effects of vasopressin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64:100–7.
69. Nakamura Y, Haneda T, Osaki J, Miyata S, Kikuchi K. Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by vasopressin V_{1A} receptor. *Eur J Pharmacol*. 2000;391:39–48.
70. Brostrom MA, Reilly BA, Wilson FJ, Brostrom CO. Vasopressin-induced hypertrophy in H9c2 heart-derived myocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32:993–1006.
71. Thibonnier M, Goraya T, Berti-Mattera L. G protein coupling of human platelet V₁ vascular vasopressin receptors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993;264:C1336–44.
72. Launay JM, Vittet D, Vidaud M, Rondot A, Mathieu MN, Lalau-Keraly C, et al. V_{1a}-vasopressin specific receptors on human platelets: potentiation by ADP and epinephrine and evidence for homologous down-regulation. *Thromb Res*. 1987;45:323–31.
73. Pena A, Murat B, Trueba M, Ventura MA, Bertrand G, Cheng LL, et al. Pharmacological and Physiological Characterization of d[Leu⁴, Lys⁸]Vasopressin, the First V_{1b}-Selective Agonist for Rat Vasopressin/Oxytocin Receptors. *Endocrinology*. 2007;148:4136–46.
74. Saito M, Tahara A, Sugimoto T, Abe K, Furuichi K. Evidence that atypical vasopressin V₂ receptor in inner medulla of kidney is V_{1B} receptor. *Eur J Pharmacol*. 2000;401:289–96.
75. Aguilera G, Rabadan-Diehl C. Regulation of vasopressin V_{1B} receptors in the anterior pituitary gland of the rat. *Exp Physiol*. 2000;85:19S-26S.
76. Komnenov D, Quaal H, Rossi NF. V_{1a} and V_{1b} vasopressin receptors within the paraventricular nucleus contribute to hypertension in male rats exposed to chronic mild unpredictable stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2021;320:R213–25.
77. El-Werfali W, Toomasian C, Maliszewska-Scislo M, Li C, Rossi NF. Haemodynamic and renal sympathetic responses to V_{1b} vasopressin receptor activation within the paraventricular nucleus. *Exp Physiol*. 2015;100:553–65.
78. Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, Tsujimoto G. Vasopressin Stimulates Insulin Release from Islet Cells through V_{1b} Receptors: a Combined Pharmacological/Knockout Approach. *Mol Pharmacol*. 2004;65:623–9.

79. Hus-Citharel A, Bouby N, Corbani M, Mion J, Mendre C, Darusi J, et al. Characterization of a functional V_{1B} vasopressin receptor in the male rat kidney: evidence for cross talk between V_{1B} and V₂ receptor signaling pathways. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021;321:F305–21.
80. Lolait SJ, O'Carroll A-M, McBride OW, König M, Morel A, Brownstein MJ. Cloning and characterization of a vasopressin V₂ receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature*. 1992;357:336–9.
81. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Günther G, Rosenthal W, Vischer UM. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V₂ receptors and cAMP. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106:107–16.
82. Horstman LL, Valle-Riestra BJ, Jy W, Wang F, Mao W, Ahn YS. Desmopressin (DDAVP) acts on platelets to generate platelet microparticles and enhanced procoagulant activity. *Thromb Res*. 1995;79:163–74.
83. Andersen LK, Hvas A-M, Hvas CL. Effect of Desmopressin on Platelet Dysfunction During Antiplatelet Therapy: A Systematic Review. *Neurocrit Care*. 2021;34:1026–46.
84. Yang X, Disa J, Rao AK. Effect of 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) on human platelets. *Thromb Res*. 1990;59:809–18.
85. Japundžić-Žigon N, Lozić M, Šarenac O, Murphy D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Curr Neuropharmacol*. 2019;18:14–33.
86. Cowley AW, Liard JF. Vasopressin and arterial pressure regulation. Special lecture. *Hypertension*. 1988;11(2):I25-32.
87. Nakano J. Cardiovascular actions of vasopressin. *Jpn Circ J*. 1973;37:363–81.
88. Żera T, Przybylski J, Grygorowicz T, Kasarełło K, Podobińska M, Mirowska-Guzel D, et al. Vasopressin V_{1a} receptors are present in the carotid body and contribute to the control of breathing in male Sprague-Dawley rats. *Peptides (NY)*. 2018;102:68–74.
89. Koshimizu T, Nasa Y, Tanoue A, Oikawa R, Kawahara Y, Kiyono Y, et al. V_{1a} vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:7807–12.
90. Gal CS, Villanova G, Boutin M, Maffrand J, Fur G Le. Effects of SR 49059, a non-peptide antagonist of vasopressin V_{1a} receptors, on vasopressin-induced coronary vasoconstriction in conscious rabbits. *Fundam Clin Pharmacol*. 1995;9:17–24.
91. Sellke N, Kuczmarski A, Lawandy I, Cole VL, Ehsan A, Singh AK, et al. Enhanced

- coronary arteriolar contraction to vasopressin in patients with diabetes after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;156:2098–107.
92. Lankhuizen IM, van Veghel R, Saxena PR, Schoemaker RG. [Arg⁸]-Vasopressin-Induced Responses on Coronary and Mesenteric Arteries of Rats with Myocardial Infarction: The Effects of V1a-and V2-Receptor Antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:38–44.
 93. Henderson KK, Byron KL. Vasopressin-induced vasoconstriction: two concentration-dependent signaling pathways. *J Appl Physiol.* 2007;102:1402–9.
 94. Altura BM. Dose-response relationships for arginine vasopressin and synthetic analogs on three types of rat blood vessels: possible evidence for regional differences in vasopressin receptor sites within a mammal. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975;193:413–23.
 95. Veitenheimer B, Osborn JW. Role of spinal V1a receptors in regulation of arterial pressure during acute and chronic osmotic stress. *Am J Physiol.* 2011;300:R460–9.
 96. Bussien JP, Waeber B, Nussberger J, Schaller MD, Gavras H, Hofbauer K, et al. Does vasopressin sustain blood pressure of normally hydrated healthy volunteers? *Am J Physiol.* 1984;246:H143–7.
 97. Walker BR. Evidence for a vasodilatory effect of vasopressin in the conscious rat. *Am J Physiol.* 1986;251:H34–9.
 98. Hirsch AT, Dzau VJ, Majzoub JA, Creager MA. Vasopressin-mediated forearm vasodilation in normal humans. Evidence for a vascular vasopressin V2 receptor. *J Clin Invest.* 1989;84:418–26.
 99. Suzuki S, Takeshita A, Imaizumi T, Hirooka Y, Yoshida M, Ando S, et al. Biphasic forearm vascular responses to intraarterial arginine vasopressin. *J Clin Invest.* 1989;84:427–34.
 100. Liard JF. L-NAME antagonizes vasopressin V2-induced vasodilatation in dogs. *Am J Physiol.* 1994;266:H99–106.
 101. Wagner HN, Braunwald E. The pressor effect of the antidiuretic principle of the posterior pituitary in orthostatic hypotension. *J Clin Invest.* 1956;35:1412–8.
 102. Jordan J, Tank J, Diedrich A, Robertson D, Shannon JR. Vasopressin and Blood Pressure in Humans. *Hypertension.* 2000;36.
 103. Tran LD, Montrastruc J, Montrastruc P. Effects of Lysine-Vasopressin and Oxytocin on central cardiovascular control. *Br J Pharmacol.* 1982;77:69–73.
 104. Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH. A Comparison of Vasopressin and Epinephrine for Out-of-Hospital Cardiopulmonary Resuscitation.

- N Engl J Med. 2004;350:105–13.
105. Walker BR, Haynes JJ, Wang HL, Voelkel NF. Vasopressin-induced pulmonary vasodilation in rats. *Am J Physiol.* 1989;257:H415-22.
 106. Wallace AW, Tunin CM, Shoukas AA. Effects of vasopressin on pulmonary and systemic vascular mechanics. *Am J Physiol.* 1989;257:H1228-34.
 107. Enomoto M, Pan J, Shifrin Y, Belik J. Age dependency of vasopressin pulmonary vasodilatory effect in rats. *Pediatr Res.* 2014;75:315–21.
 108. Sugawara Y, Mizuno Y, Oku S, Goto T. Effects of vasopressin during a pulmonary hypertensive crisis induced by acute hypoxia in a rat model of pulmonary hypertension. *Br J Anaesth.* 2019;122:437–47.
 109. Jeon Y, Ryu JH, Lim YJ, Kim CS, Bahk J-H, Yoon SZ, et al. Comparative hemodynamic effects of vasopressin and norepinephrine after milrinone-induced hypotension in off-pump coronary artery bypass surgical patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;29:952–6.
 110. Currigan DA, Hughes RJA, Wright CE, Angus JA, Soeding PF. Vasoconstrictor responses to vasopressor agents in human pulmonary and radial arteries: an in vitro study. *Anesthesiology.* 2014;121:930–6.
 111. Adamson GT, Yu J, Ramamoorthy C, Peng LF, Taylor A, Lennig M, et al. Acute Hemodynamics in the Fontan Circulation: Open-Label Study of Vasopressin. *Pediatr Critic Care Med.* 2023;24:952–60.
 112. Jiang C, Qian H, Luo S, Lin J, Yu J, Li Y, et al. Vasopressors induce passive pulmonary hypertension by blood redistribution from systemic to pulmonary circulation. *Basic Res Cardiol.* 2017;112:21.
 113. Pyner S, Coote JH. Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. *Neuroscience.* 1999;88:949–57.
 114. Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res.* 1998;801:239–43.
 115. Ding Y, Li Y-L, Schultz HD. Role of blood flow in carotid body chemoreflex function in heart failure. *J Physiol.* 2011;589:245–58.
 116. Berecek KH, Mah SC, Baum P, Hofbauer KG. Cardiovascular effects of intracerebroventricular injection of vasopressin in unanaesthetized normotensive and DOCA-salt hypertensive rats. *J Hypertens Suppl.* 1984;2:S29-31.

117. King KA, Mackie G, Pang CCY, Wall RA. Central vasopressin in the modulation of catecholamine release in conscious rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1985;63:1501–5.
118. Martin SM, Malkinson TJ, Veale WL, Pittman QJ. The action of centrally administered arginine vasopressin on blood pressure in the conscious rabbit. *Brain Res.* 1985;348:137–45.
119. Noszczyk B, Łon S, Szczepańska-Sadowska E. Central cardiovascular effects of AVP and AVP analogs with V1, V2 and ‘V3’ agonistic or antaggonistic properties in conscious dog. *Brain Res.* 1993;610:115–26.
120. Pittman QJ, Lawrence D, McLean L. Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats. *Endocrinology.* 1982;110:1058–60.
121. Unger T, Rohmeiss P, Becker H, Ganten D, Lang RE, Petty M. Sympathetic activation following central vasopressin receptor stimulation in conscious rats. *J Hypertens Suppl.* 1984;2:S25-7.
122. Żera T, Ufnal M. Enhanced pressor response to centrally administered vasopressin in WKY rats on high sodium diet. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2005;65:145–50.
123. Cox BF, Hay M, Bishop VS. Neurons in area postrema mediate vasopressin-induced enhancement of the baroreflex. *Am J Physiol.* 1990;258:H1943–6.
124. Hasser EM, Bishop VS. Reflex effect of vasopressin after blockade of V1 receptors in the area postrema. *Circ Res.* 1990;67:265–71.
125. Scheuer DA, Bishop VS. Effect of vasopressin on baroreflex control of lumbar sympathetic nerve activity and hindquarter resistance. *Am J Physiol.* 1996;270:H196371.
126. Lozić M, Šarenac O, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Vasopressin, Central Autonomic Control and Blood Pressure Regulation. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20:11.
127. Yamaguchi H, Uemura H, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Vasopressin V1-Receptor Stimulation Produces a Positive Inotropic Response without Affecting pHi in Guinea Pig Papillary Muscles. *Jpn J Pharmacol.* 1995;68:217–21.
128. Weig H-J, Laugwitz K-L, Moretti A, Kronsbein K, Städele C, Brüning S, et al. Enhanced Cardiac Contractility After Gene Transfer of V2 Vasopressin Receptors In Vivo by Ultrasound-Guided Injection or Transcoronary Delivery. *Circulation.* 2000;101:1578–85.
129. Osborn JW, Skelton MM, Cowley AW. Hemodynamic effects of vasopressin compared with angiotensin II in conscious rats. *Am J Physiol.* 1987;252:H628–37.
130. Veelken R, Danckwart L, Rohmeiss P, Unger T. Effects of intravenous AVP on cardiac output, mesenteric hemodynamics, and splanchnic nerve activity. *Am J Physiol.* 1989;257:H658–64.

131. Szczepanska-Sadowska E. The Heart as a Target of Vasopressin and Other Cardiovascular Peptides in Health and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23:14414.
132. Li X, Chan TO, Myers V, Chowdhury I, Zhang X-Q, Song J, et al. Controlled and Cardiac-Restricted Overexpression of the Arginine Vasopressin V1A Receptor Causes Reversible Left Ventricular Dysfunction Through Gαq-Mediated Cell Signaling. *Circulation.* 2011;124:572–81.
133. Gonzalez AA, Cifuentes-Araneda F, Ibaceta-Gonzalez C, Gonzalez-Vergara A, Zamora L, Henriquez R, et al. Vasopressin/V2 receptor stimulates renin synthesis in the collecting duct. *American J Physiol.* 2016;310:F284–93.
134. Qian Q. Salt, water and nephron: Mechanisms of action and link to hypertension and chronic kidney disease. *Nephrology.* 2018;23:44–9.
135. Robertson GL. The Regulation of Vasopressin Function in Health and Disease. *Proceedings of the 1976 Laurentian Hormone Conference.* Elsevier; 1977. p. 333–85.
136. Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Gal CS-L, et al. Vasopressin: A potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res.* 1998;24:703–10.
137. Grazzini E, Breton C, Derick S, Andres M, Raufaste D, Rickwaert F, et al. Vasopressin Receptors in Human Adrenal Medulla and Pheochromocytoma ¹. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2195–203.
138. Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, et al. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol.* 2008;295:F100–7.
139. Ohtake PJ, Jennings DB. Angiotensin II stimulates respiration in awake dogs and antagonizes baroreceptor inhibition. *Respir Physiol.* 1993;91:335–51.
140. Brackley A, Toney G. Oxytocin receptor activation rescues opioid-induced respiratory depression by systemic fentanyl in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2021;378(2):96-107.
141. Louwse AM, Marshall JM. The role of vasopressin in the regional vascular responses evoked in the spontaneously breathing rat by systemic hypoxia. *J Physiol.* 1993;470:463–72.
142. Walker JK, Jennings DB. Ventilatory and metabolic effects of hypercapnia in conscious rats: AVP V1 receptor block. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76:361–6.
143. Bessho T, Murata Y, Ninomiya Y, Ibara S, Yamamoto T, Miyake Y, et al. Effect of arginine vasopressin on breathing movements of chronically instrumented fetal lambs.

- Acta Obstet Gynecol Scand. 1997;76:107–11.
144. Walker JK, Jennings DB. Angiotensin mediates stimulation of ventilation after vasopressin V1 receptor blockade. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76:2517–26.
 145. Overgaard CB, Walker JK, Jennings DB. Respiration during acute hypoxia: angiotensin- and vasopressin-receptor blocks. *J Appl Physiol* (1985). 1996;80:810–7.
 146. Baekey DM, Molkov YI, Paton JFR, Rybak IA, Dick TE. Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174:135–45.
 147. Brunner MJ, Sussman MS, Greene AS, Kallman CH, Shoukas AA. Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. *Circ Res*. 1982;51:624–36.
 148. McMullan S, Pilowsky PM. The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;174:37–42.
 149. Richter DW, Seller H. Baroreceptor effects on medullary respiratory neurones of the cat. *Brain Res*. 1975;86:168–71.
 150. Przybylski J. Do arterial chemoreceptors play a role in the pathogenesis of hypertension? *Med Hypotheses*. 1981;7:127–31.
 151. Brognara F, Felipe ISA, Salgado HC, Paton JFR. Autonomic innervation of the carotid body as a determinant of its sensitivity: implications for cardiovascular physiology and pathology. *Cardiovasc Res*. 2021;117:1015–32.
 152. Zerbe RL, Feuerstein G. Cardiovascular effects of centrally administered vasopressin in conscious and anesthetized rats. *Neuropeptides*. 1985;6:471–83.
 153. Yang S-J, Lee K-Z, Wu C-H, Lu K-T, Hwang J-C. Vasopressin produces inhibition on phrenic nerve activity and apnea through V(1A) receptors in the area postrema in rats. *Chin J Physiol*. 2006;49:313–25.
 154. Imaizumi Y, Eguchi K, Kario K. Lung Disease and Hypertension. *Pulse*. 2014;2:103–12.
 155. Han MK, McLaughlin V V., Criner GJ, Martinez FJ. Pulmonary Diseases and the Heart. *Circulation*. 2007;116:2992–3005.
 156. Ramalho SHR, Shah AM. Lung function and cardiovascular disease: A link. *Trends Cardiovasc Med*. 2021;31:93–8.
 157. Balling L, Kistorp C, Schou M, Egstrup M, Gustafsson I, Goetze JP, et al. Plasma Copeptin Levels and Prediction of Outcome in Heart Failure Outpatients: Relation to Hyponatremia and Loop Diuretic Doses. *J Card Fail*. 2012;18:351–8.
 158. Kelly D, Squire IB, Khan SQ, Quinn P, Struck J, Morgenthaler NG, et al. C-Terminal Provasopressin (Copeptin) is Associated With Left Ventricular Dysfunction,

- Remodeling,
and Clinical Heart Failure in Survivors of Myocardial Infarction. *J Card Fail.* 2008;14:739–45.
159. Schill F, Timpka S, Nilsson PM, Melander O, Enhörning S. Copeptin as a predictive marker of incident heart failure. *ESC Heart Fail.* 2021;8:3180–8.
160. Maisel A, Xue Y, Shah K, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, et al. Increased 90-Day Mortality in Patients With Acute Heart Failure With Elevated Copeptin. *Circ Heart Fail.* 2011;4:613–20.
161. Zhang X, Zhao C, Zhang H, Liu W, Zhang J, Chen Z, et al. Dyspnea Measurement in Acute Heart Failure: A Systematic Review and Evidence Map of Randomized Controlled Trials. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:728772.
162. Ponikowski P, Chua TP, Anker SD, Francis DP, Doehner W, Banasiak W, et al. Peripheral Chemoreceptor Hypersensitivity. *Circulation.* 2001;104:544–9.
163. Chua TP, Clark AI, Amadi AA, Coats AJS. Relation between chemosensitivity and the ventilatory response to exercise in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:650–7.
164. Cross TJ, Kim C-H, Johnson BD, Lalande S. The interactions between respiratory and cardiovascular systems in systolic heart failure. *J Appl Physiol.* 2020;128:214–24.
165. Lanfranchi PA, Braghiroli A, Bosimini E, Mazzuero G, Colombo R, Donner CF, et al. Prognostic Value of Nocturnal Cheyne-Stokes Respiration in Chronic Heart Failure. *Circulation.* 1999;99:1435–40.
166. Marston NA, Shah KS, Mueller C, Neath SX, Christenson RH, McCord J, et al. Serial sampling of copeptin levels improves diagnosis and risk stratification in patients presenting with chest pain: Results from the CHOPIN trial. *Emergency Medicine Journal.* 2016;33(1):23-9.
167. Ricci F, Di Scala R, Massacesi C, Di Nicola M, Cremonese G, De Pace D, et al. Ultra-Sensitive Copeptin and Cardiac Troponin in Diagnosing Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes—The COPACS Study. *Am J Med.* 2016;129:105–14.
168. Reichlin T, Hochholzer W, Stelzig C, Laule K, Freidank H, Morgenthaler NG, et al. Incremental Value of Copeptin for Rapid Rule Out of Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:60–8.
169. Broessner G, Hasslacher J, Beer R, Lackner P, Lehner GF, Harler U, et al. Outcome prediction and temperature dependency of MR-proANP and Copeptin in comatose resuscitated patients. *Resuscitation.* 2015;89:75–80.

170. Ostadal P, Kruger A, Zdrahalova V, Janotka M, Vondrakova D, Neuzil P, et al. Blood levels of copeptin on admission predict outcomes in out-of-hospital cardiac arrest survivors treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care*. 2012;16:R187.
171. Günebakmaz Ö, Celik A, Inanc MT, Duran M, Karakaya E, Tulmac M, et al. Copeptin Level and Copeptin Response to Percutaneous Balloon Mitral Valvuloplasty in Mitral Stenosis. *Cardiology*. 2011;120:221–6.
172. Mizia-Stec K, Lasota B, Mizia M, Chmiel A, Adamczyk T, Chudek J, et al. Copeptin constitutes a novel biomarker of degenerative aortic stenosis. *Heart Vessels*. 2013;28:613–9.
173. Schoen T, Hohmann EM, Van Der Lely S, Aeschbacher S, Reusser A, Risch M, et al. Plasma copeptin levels and ambulatory blood pressure characteristics in healthy adults. *J Hypertens*. 2015;33(8):1571-9.
174. Kolditz M, Halank M, Schulte-Hubbert B, Bergmann S, Albrecht S, Hoffken G. Copeptin predicts clinical deterioration and persistent instability in community-acquired pneumonia. *Respir Med*. 2012;106:1320–8.
175. Zhao Y, Jiang Y, Zhou L, Wu X. The value of assessment tests in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med Sci*. 2014;347:393–9.
176. Kruger S, Ewig S, Giersdorf S, Hartmann O, Suttorp N, Welte T. Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: Results from the German Competence Network, CAPNETZ. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1426–34.
177. Lin Q, Fu F, Chen H, Zhu B. Copeptin in the assessment of acute lung injury and cardiogenic pulmonary edema. *Respir Med*. 2012;106:1268–77.
178. Nickel N, Lichtinghagen R, Golpon H, Olsson KM, Brand K, Welte T, et al. Circulating levels of copeptin predict outcome in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*. 2013;14:130.
179. Hellenkamp K, Pruszczyk P, Jiménez D, Wyzgał A, Barrios D, Czurzyński M, et al. Prognostic impact of copeptin in pulmonary embolism: a multicentre validation study. *Eur Respir J*. 2018;51(4):1702037.
180. Kuluöztürk M, İn E, Telo S, Karabulut E, Geçkil AA. Efficacy of copeptin in distinguishing COVID-19 pneumonia from community-acquired pneumonia. *J Med Virol*. 2021;93:3113–21.
181. Gregoriano C, Molitor A, Haag E, Kutz A, Koch D, Haubitz S, et al. Activation of Vasopressin System During COVID-19 is Associated With Adverse Clinical Outcomes:

- An Observational Study. *J Endocr Soc.* 2021;5:bvab045.
182. Prabhakar NR, Peng Y-J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J Appl Physiol.* 2004;96:359–66.
183. Paton JFR, Sobotka PA, Fudim M, Engelman ZJ, Hart ECJ, McBryde FD, et al. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension.* 2013;61:5–13.
184. Clarke JA, Daly de B, Ead HW. Dimensions and Volume of the Carotid Body in the Adult Cat, and Their Relation to the Specific Blood Flow Through the Organ. *Acta Anat (Basel).* 1986;126:84–6.
185. Daly MDB, Lambertsen CJ, Schweitzer A. Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *J Physiol.* 1954;125:67–89.
186. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol.* 2012;2:141–219.
187. Atanasova DY, Lazarov NE. Morphological changes in the rat carotid body following acute sodium nitrite treatment. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016;221:11–8.
188. Ortega-Sáenz P, Pardal R, Levitsky K, Villadiego J, Muñoz-Manchado AB, Durán R, et al. Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol.* 2013;591:6157–73.
189. Verna A. Ultrastructure of the Carotid Body in the Mammals. *Int Rev Cytol.* 1979;60:271–330.
190. Coleridge H, Coleridge J, Howe A. Thoracic Chemoreceptors in the Dog. *Circ Res.* 1970;26:235–47.
191. Pen D, Shanks J, Barrett C, Abukar Y, Paton JFR, Ramchandra R. Aortic Body Chemoreceptors Regulate Coronary Blood Flow in Conscious Control and Hypertensive Sheep. *Hypertension.* 2022;79:1275–85.
192. Piskuric NA, Vollmer C, Nurse CA. Confocal immunofluorescence study of rat aortic body chemoreceptors and associated neurons in situ and in vitro. *J Comp Neurol.* 2011;519:856–73.
193. Recordati G, Moss NG, Genovesi S, Rogenes P. Renal chemoreceptors. *J Auton Nerv Syst.* 1981;3:237–51.
194. Coleridge H, Coleridge JCG, Howe A. A search for pulmonary arterial chemoreceptors in the cat, with a comparison of the blood supply of the aortic bodies in the new-born and adult animal. *J Physiol.* 1967;191:353–74.
195. James TN, Urthaler F, Hageman GR. Chemoreceptors of the heart. *Trans Am Clin*

- Climatol Assoc. 1977;88:18–31.
196. Limberg JK, Taylor JL, Mozer MT, Dube S, Basu A, Basu R, et al. Effect of Bilateral Carotid Body Resection on Cardiac Baroreflex Control of Blood Pressure During Hypoglycemia. *Hypertension*. 2015;65:1365–71.
197. Timmers HJ, Karemaker JM, Wieling W, Marres HA, Folgering HT, Lenders JW. Baroreflex and chemoreflex function after bilateral carotid body tumor resection. *J Hypertension*. 2003;21:591–9.
198. Lazarov NE, Atanasova DY. General Morphology of the Mammalian Carotid Body. *Adv Anat Embyol*. 2023;237:13–35.
199. Chen I-L, Yates RD. Two types of glomus cell in the rat carotid body as revealed by-bungarotoxin binding. *J Neurocytol*. 1984;13:281–302.
200. Felipe ISA, Zera T, da Silva MP, Moraes DJA, McBryde F, Paton JFR. The sympathetic nervous system exacerbates carotid body sensitivity in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2023;119:316–31.
201. Felipe ISA, Río R Del, Schultz H, Machado BH, Paton JFR. Commonalities and differences in carotid body dysfunction in hypertension and heart failure. *J Physiol*. 2023;601:5527–51.
202. Molnár Z, Petheo GL, Fülöp C, Spät A. Effects of osmotic changes on the chemoreceptor cell of rat carotid body. *J Physiol*. 2003;546:471–81.
203. Marshall JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev*. 1994;74:543–94.
204. Prabhakar NR, Joyner MJ. Tasting arterial blood: what do the carotid chemoreceptors sense? *Front Physiol*. 2014;5:524.
205. Schultz HD, Marcus NJ. Heart Failure and Carotid Body Chemoreception. *Adv Exp Med Biol*. 2012;758:387-95.
206. Waldman SD, Waldman SD. Functional Anatomy of the Chemoreceptors. *Pain Review*. 2017;1:194-5.
207. Lahiri S, Mokashi A, Mulligan E, Nishino T. Comparison of aortic and carotid chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1981;51:55–61.
208. Martin-Body RL, Robson GJ, Sinclair JD. Restoration of hypoxic respiratory responses in the awake rat after carotid body denervation by sinus nerve section. *J Physiol*. 1986;380:61–73.
209. Lu Y, Whiteis CA, Sluka KA, Chapleau MW, Abboud FM. Responses of glomus cells to

- hypoxia and acidosis are uncoupled, reciprocal and linked to ASIC3 expression: selectivity of chemosensory transduction. *J Physiol.* 2013;591:919–32.
210. Gold OMS, Bardsley EN, Ponnampalam AP, Pauza AG, Paton JFR. Cellular basis of learning and memory in the carotid body. *Front Synaptic Neurosci.* 2022;14:902319.
211. Lindsey BG, Nuding SC, Segers LS, Morris KF. Carotid Bodies and the Integrated Cardiorespiratory Response to Hypoxia. *Physiology.* 2018;33:281–97.
212. Salman IM. Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18:18.
213. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:335–46.
214. Charkoudian N, Rabbitts JA. Sympathetic Neural Mechanisms in Human Cardiovascular Health and Disease. *Mayo Clin Proc.* 2009;84:822–30.
215. Erickson JT, Millhorn DE. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Compar Neurol.* 1994;348:161–82.
216. Erickson JT, Millhorn DE. Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. *Brain Res.* 1991;567:11–24.
217. Finley JC, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 1992;572:108–16.
218. Kline DD, King TL, Austgen JR, Heesch CM, Hasser EM. Sensory afferent and hypoxia-mediated activation of nucleus tractus solitarius neurons that project to the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience.* 2010;167:510–27.
219. Koshiya N, Guyenet PG. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 1996;270:R1273–8.
220. Oshima N, Kumagai H, Onimaru H, Kawai A, Pilowsky PM, Iigaya K, et al. Monosynaptic Excitatory Connection from the Rostral Ventrolateral Medulla to Sympathetic Preganglionic Neurons Revealed by Simultaneous Recordings. *Hypertension Research.* 2008;31:1445–54.
221. McAllen RM. Actions of carotid chemoreceptors on subretrofacial bulbospinal neurons in the cat. *J Auton Nerv Syst.* 1992;40:181–8.
222. Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, DePuy SD, Burke PGR, Abbott SBG. C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol.* 2013;305:R187–204.

223. Braga VA, Burmeister MA, Sharma R V., Davisson RL. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. *Am J Physiol.* 2008;295:R1168–74.
224. Mansukhani MP, Wang S, Somers VK. Chemoreflex physiology and implications for sleep apnoea: insights from studies in humans. *Exp Physiol.* 2015;100:130–5.
225. Marshall JM. Chemoreceptors and cardiovascular control in acute and chronic systemic hypoxia. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:863–88.
226. Spyer KM, Gourine A V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Biol Sciences.* 2009;364:2603–10.
227. Turovsky E, Theparambil SM, Kasymov V, Deitmer JW, del Arroyo AG, Ackland GL, et al. Mechanisms of CO₂/H⁺ Sensitivity of Astrocytes. *J Neurosci.* 2016;36:10750–8.
228. Guyenet PG. Regulation of Breathing and Autonomic Outflows by Chemoreceptors. *Compr Physiol.* 2014;4(4):1511–62.
229. Beltrán-Castillo S, Olivares MJ, Contreras RA, Zúñiga G, Llona I, von Bernhardi R, et al. D-serine released by astrocytes in brainstem regulates breathing response to CO₂ levels. *Nat Commun.* 2017;8:838.
230. Affleck VS, Coote JH, Pyner S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience.* 2012;219:48–61.
231. Fawley J, Hegarty D, Aicher S, Doyle M, Beaumont E, Andresen M. PVN-projecting NTS neurons receive both direct and indirect inputs from solitary tract afferents. *The FASEB J.* 2020;34:1–1.
232. King TL, Heesch CM, Clark CG, Kline DD, Hasser EM. Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol.* 2012;302:R1219–32.
233. Lindsey BG, Segers LS, Shannon R. Functional associations among simultaneously monitored lateral medullary respiratory neurons in the cat. II. Evidence for inhibitory actions of expiratory neurons. *J Neurophysiol.* 1987;57:1101–17.
234. Molkov YI, Rubin JE, Rybak IA, Smith JC. Computational models of the neural control of breathing. *Rev Syst Biol Med.* 2017;9(2):10.1002.
235. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger Complex: a Brainstem Region that May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. *Science.* 1991;254:726–9.
236. Bartlett D. Effects of hypercapnia and hypoxia on laryngeal resistance to airflow. *Respir*

- Physiol. 1979;37:293–302.
237. Fogarty MJ, Mantilla CB, Sieck GC. Breathing: Motor Control of Diaphragm Muscle. *Physiology*. 2018;33:113–26.
238. Feldman J, Loewy A, Speck D. Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*. 1985;5:1993–2000.
239. St John WM, Bianchi AL. Responses of bulbospinal and laryngeal respiratory neurons to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol*. 1985;59:1201–7.
240. Kumar P. Systemic effects resulting from carotid body stimulation-invited article. *Adv Exp Med Biol*. 2009;648:223–33.
241. Daly M de B, Scott MJ. The cardiovascular responses to stimulation of the carotid body chemoreceptors in the dog. *J Physiol*. 1963;165:179–97.
242. Daly M de B, Scott MJ. An analysis of the primary cardiovascular reflex effects of stimulation of the carotid body chemoreceptors in the dog. *J Physiol*. 1962;162:555–73.
243. Daly MB, Kirkman E. Differential modulation by pulmonary stretch afferents of some reflex cardioinhibitory responses in the cat. *J Physiol*. 1989;417:323–41.
244. Daly MB. Carotid Chemoreceptor Reflex Cardioinhibitory Responses: Comparison of Their Modulation by Central Inspiratory Neuronal activity and Activity of Pulmonary Stretch Afferents. *Adv Exp Med Biol*. 1993;337:333–43.
245. Somers VK, Mark AL, Abboud FM. Interaction of baroreceptor and chemoreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in normal humans. *J Clin Investig*. 1991;87:1953-7.
246. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes – physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand*. 2003;177:377–84.
247. Kahler RL, Goldblatt A, Braunwald E. The effects of acute hypoxia on the systemic venous and arterial systems and on myocardial contractile force. *J Clin Investig*. 1962;41:1553–63.
248. Ito BR, Feigl EO. Carotid chemoreceptor reflex parasympathetic coronary vasodilation in the dog. *Am J Physiol*. 1985;249:H1167–75.
249. Hoka S, Bosnjak ZJ, Arimura H, Kampine JP. Regional venous outflow, blood volume, and sympathetic nerve activity during severe hypoxia. *Am J Physiol*. 1989;256:H162–70.
250. Raff H, Shinsako J, Dallman MF. Renin and ACTH responses to hypercapnia and hypoxia after chronic carotid chemodenervation. *Am J Physiol*. 1984;247:R412–7.
251. Arce-Álvarez A, Salazar-Ardiles C, Cornejo C, Paez V, Vásquez-Muñoz M, Stillner-

- Vilches K, et al. Chemoreflex Control as the Cornerstone in Immersion Water Sports: Possible Role on Breath-Hold. *Front Physiol.* 2022;13.
252. Share L, Levy MN. Effect of carotid chemoreceptor stimulation on plasma antidiuretic hormone titer. *Am J Physiol.* 1966;210:157–61.
253. Critchley JA, Ellis P, Henderson CG, Ungar A. The role of the pituitary-adrenocortical axis in reflex responses of the adrenal medulla of the dog. *J Physiol.* 1982;323:533–41.
254. Marotta SF. Roles of Aortic and Carotid Chemoreceptors in Activating the Hypothalamo-Hypophyseal-Adrenocortical System During Hypoxia. *Exp Biol Med.* 1972;141:915–22.
255. Madden CJ, Morrison SF. Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. *J Physiol.* 2005;566:559–73.
256. Koyama Y, Coker RH, Denny JC, Lacy DB, Jabbour K, Williams PE, et al. Role of carotid bodies in control of the neuroendocrine response to exercise. *Am J Physiol.* 2001;281:E742–8.
257. Hilton SM, Marshall JM. The pattern of cardiovascular response to carotid chemoreceptor stimulation in the cat. *J Physiol.* 1982;326:495–513.
258. Karim F, Poucher SM, Summerill RA. The effects of stimulating carotid chemoreceptors on renal haemodynamics and function in dogs. *J Physiol.* 1987;392:451–62.
259. Jendzjowsky NG, Roy A, Barioni NO, Kelly MM, Green FHY, Wyatt CN, et al. Preventing acute asthmatic symptoms by targeting a neuronal mechanism involving carotid body lysophosphatidic acid receptors. *Nat Commun.* 2018;9:4030.
260. Widdicombe JG. Chemoreceptor control of the airways. *Respir Physiol.* 1992;87:373–81.
261. Kimura A, Sato A, Sato Y, Trzebski A. Role of the central and arterial chemoreceptors in the response of gastric tone and motility to hypoxia, hypercapnia and hypocapnia in rats. *J Auton Nerv Syst.* 1993;45:77–85.
262. Sinski M, Kowalczyk P, Stolarczyk A, Sawionek L, Przybylski J. Influence of the stimulation of carotid body chemoreceptors on the gastric mucosal blood flow in artificially ventilated and spontaneously breathing rats. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(3):359-69.
263. Yu Y-H, Blessing WW. Carotid and cardiopulmonary chemoreceptor activity increases hippocampal theta rhythm in conscious rabbits. *Am J Physiol.* 2000;278:R973–9.
264. Bowes G, Townsend ER, Kozar LF, Bromley SM, Phillipson EA. Effect of carotid body denervation on arousal response to hypoxia in sleeping dogs. *J Appl Physiol.*

- 1981;51:40–5.
265. Davidson JT, Whipp BJ, Wasserman K, Koyal SN, Lugliani R. Role of the Carotid Bodies in Breath-Holding. *N Engl J Med*. 1974;290:819–22.
266. Stulbarg MS, Winn WR. Bilateral Carotid Body Resection for the Relief of Dyspnea in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest*. 1989;95:1123–8.
267. Bizzi E, Libretti A, Malliani A, Zanchetti A. Reflex chemoceptive excitation of diencephalic sham rage behavior. *Am J Physiol*. 1961;200:923–6.
268. Conde S V., Sacramento JF, Guarino MP. Carotid body: a metabolic sensor implicated in insulin resistance. *Physiol Genomics*. 2018;50:208–14.
269. Anderson EA, Balon TW, Hoffman RP, Sinkey CA, Mark AL. Insulin increases sympathetic activity but not blood pressure in borderline hypertensive humans. *Hypertension*. 1992;19:621–7.
270. Grassi G. Sympathetic and Baroreflex Function in Hypertension: Implications for Current and New Drugs. *Curr Pharm Des*. 2004;10:3579–89.
271. Hering D, Zdrojewski Z, Krol E, Kara T, Kucharska W, Somers VK, et al. Tonic chemoreflex activation contributes to the elevated muscle sympathetic nerve activity in patients with chronic renal failure. *J Hypertens*. 2007;25:157–61.
272. Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, Dyken ME, Montano N, Somers VK. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 1999;99:1183–9.
273. Trzebski A, Tafil M, Zoltowski M, Przybylski J. Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension. *Cardiovasc Res*. 1982;16:163–72.
274. Del Rio R, Marcus NJ, Schultz HD. Carotid Chemoreceptor Ablation Improves Survival in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:2422–30.
275. Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde S V. Carotid Body Denervation Prevents the Development of Insulin Resistance and Hypertension Induced by Hypercaloric Diets. *Diabetes*. 2013;62:2905–16.
276. Pijacka W, Katayama PL, Salgado HC, Lincevicius GS, Campos RR, McBryde FD, et al. Variable role of carotid bodies in cardiovascular responses to exercise, hypoxia and hypercapnia in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol*. 2018;596:3201–16.
277. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJA, et al. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun*. 2013;4:2395.

278. Nakayama K. Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. 1962;31:214–21.
279. Cazzola M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Med*. 2007;101:1049–65.
280. Tubek S, Niewiński P, Paleczny B, Langner A, Banasiak W, Ponikowski P. Human carotid bodies as a therapeutic target: new insights from a clinician’s perspective. *Kardiol Pol*. 2018;76:1426–33.
281. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2023;41:1874–2071.
282. Mensah GA, Fuster V, Murray CJL, Roth GA, Mensah GA, Abate YH, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82:2350–473.
283. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396:1223–49.
284. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39:3021–104.
285. Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, Riley LM, Paciorek CJ, Stevens GA, et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*. 2021;398:957–80.
286. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, Anderson SG, Callender T, Emberson J, et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2016;387:957–67.
287. Niklas A, Flotyńska A, Puch-Walczak A, Polakowska M, Topór-Madry R, Polak M, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the adult Polish population – Multi-center National Population Health Examination Surveys – WOBASZ studies. *Arch Med Sci*. 2018;14:951–61.
288. Małyszko J, Mastej M, Banach M, Tykarski A, Narkiewicz K, Hoffman P, et al. Do we know more about hypertension in Poland after the May Measurement Month 2017?— Europe. *Eur Heart J Suppl*. 2019;21:D97–100.

289. Makris A, Seferou M, Papadopoulos DP. Resistant hypertension workup and approach to treatment. *Int J Hypertens*. 2010;2011:598694.
290. Pio-Abreu A, Drager LF. Resistant Hypertension: Time to Consider the Best Fifth Anti-Hypertensive Treatment. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20:67.
291. Prejbisz A, Klocek M, Gąsowski J, Topór-Mądry R, Leśniak W, Kabat M, et al. Factors associated with resistant hypertension in a large cohort of hypertensive patients: the Pol-Fokus study. *Pol Arch Intern Med*. 2015;125:249–59.
292. Grassi G, Seravalle G, Brambilla G, Pini C, Alimento M, Facchetti R, et al. Marked sympathetic activation and baroreflex dysfunction in true resistant hypertension. *Int J Cardiol*. 2014;177:1020–5.
293. Mendes M, Dubourg J, Blanchard A, Bergerot D, Courand P-Y, Forni V, et al. Copeptin is increased in resistant hypertension. *J Hypertens*. 2016;34:2458–64.
294. Januszewicz A, Mulatero P, Dobrowolski P, Monticone S, Van der Niepen P, Sarafidis P, et al. Cardiac Phenotypes in Secondary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2022;80:1480–97.
295. Kario K. Obstructive sleep apnea syndrome and hypertension: mechanism of the linkage and 24-h blood pressure control. *Hypertens Res*. 2009;32:537–41.
296. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. *Hypertension*. 2020;75:1334–57.
297. Padmanabhan S, Dominiczak AF. Genomics of hypertension: the road to precision medicine. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18:235–50.
298. Kelly TN, Sun X, He KY, Brown MR, Taliun SAG, Hellwege JN, et al. Insights From a Large-Scale Whole-Genome Sequencing Study of Systolic Blood Pressure, Diastolic Blood Pressure, and Hypertension. *Hypertension*. 2022;79:1656–67.
299. Mancia G, Grassi G. The Autonomic Nervous System and Hypertension. *Circ Res*. 2014;114:1804–14.
300. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18014.
301. Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993;87:1475–81.
302. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA. Arterial

- pressure regulation. *Am J Med.* 1972;52:584–94.
303. Montani J, Van Vliet BN. Understanding the contribution of Guyton’s large circulatory model to long-term control of arterial pressure. *Exp Physiol.* 2009;94:382–8.
 304. Osborn JW, Averina VA, Fink GD. Current computational models do not reveal the importance of the nervous system in long-term control of arterial pressure. *Exp Physiol.* 2009;94:389–96.
 305. Evans RG, Bie P. Role of the kidney in the pathogenesis of hypertension: time for a neo-Guytonian paradigm or a paradigm shift? *Am J Physiol.* 2016;310:R217–29.
 306. Taddei S, Bruno RM, Masi S, Solini A. Epidemiology and pathophysiology of hypertension. In: Williams B, editor. *ESC CardioMed.* Oxford University Press; 2018; p. 2377–88.
 307. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982;62:347–504.
 308. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DASG. Sympathetic neural mechanisms in white-coat hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:126–32.
 309. Esler M, Kaye D. Sympathetic Nervous System Activation in Essential Hypertension, Cardiac Failure and Psychosomatic Heart Disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:S1-7.
 310. Radaelli A, Bernardi L, Valle F, Leuzzi S, Salvucci F, Pedrotti L, et al. Cardiovascular autonomic modulation in essential hypertension. Effect of tilting. *Hypertension.* 1994;24:556–63.
 311. Fukuda Y, Sato A, Trzebski A. Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst.* 1987;19:1–11.
 312. Przybylski J, Trzebski A, Czyzewski T, Jodkowski J. Responses to hyperoxia, hypoxia, hypercapnia and almitrine in spontaneously hypertensive rats. *Bull Eur Physiopathol Resp.* 1982;18:145–54.
 313. Mohring J, Kintz J, Schoun J. Studies on the role of vasopressin in blood pressure control of spontaneously hypertensive rats with established hypertension (SHR, stroke-prone strain). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1979;1:593–608.
 314. Yamauchi T, Ogura T, Oishi T, Harada K, Hashimoto M, Mimura Y, et al. Enhanced pressor response in spontaneously hypertensive rats induced by stimulation of vasopressin-V1 receptors. *Acta Med Okayama.* 1995;49:53–9.
 315. Stepniakowski K, Lapiński M, Noszczyk B, Januszewicz A, Szczepańska-Sadowska E.

- Effects of vasopressin and V1 receptors blockade on blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive rats. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1991;43:487–93.
316. Sladek CD, Blair ML, Sterling C, Mangiapane ML. Attenuation of spontaneous hypertension in rats by a vasopressin antagonist. *Hypertension.* 1988;12:506–12.
317. Filep J, Fejes-Tóth G. Does vasopressin sustain blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats? *Hypertension.* 1986;8:514–9.
318. Tenderenda-Banasiuk E, Wasilewska A, Filonowicz R, Jakubowska U, Waszkiewicz-Stojda M. Serum copeptin levels in adolescents with primary hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2014;29:423–9.
319. Gor Z, Bezen D, Turkmenoglu Y, Vurgun E, Irdem A, Dursun H. Serum copeptin as a biomarker of hypertension in children with obesity. *Pediatrics International.* 2022;64(1):e15355.
320. Uzun F, Biyik I, Akturk IF, Yalcin AA, Erturk M, Oner E, et al. Serum copeptin levels in predicting nondippers in newly diagnosed hypertension. *Blood Press Monit.* 2015;20:199–203.
321. Jadli A, Sharma N, Damania K, Satoskar P, Bansal V, Ghosh K, et al. Promising prognostic markers of Preeclampsia: New avenues in waiting. *Thromb Res.* 2015;136:189–95.
322. Yeung EH, Liu A, Mills JL, Zhang C, Männistö T, Lu Z, et al. Increased Levels of Copeptin Before Clinical Diagnosis of Preeclampsia. *Hypertension.* 2014;64:1362–7.
323. Zulfikaroglu E, Islimye M, Tonguc EA, Payasli A, Isman F, Var T, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37:1198–202.
324. Paczwa P, Szczepańska-Sadowska E, Loń S, L Ganten S, Ganten D. Role of central AT1 and V1 receptors in cardiovascular adaptation to hemorrhage in SD and renin TGR rats. *Am J Physiol.* 1999;276(6):H1918-26.
325. Yang Z, Bertram D, Coote JH. The role of glutamate and vasopressin in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones. *Brain Res.* 2001;908:99–103.
326. Stępniaowski K, Budzikowski A, Loń S, Szczepańska-Sadowska E. Central cardiovascular effects of AVP and ANP in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst.* 1994;47:33–43.
327. Wsol A, Szczepanska-Sadowska E, Kowalewski S, Puchalska L, Cudnoch-Jedrzejewska A. Oxytocin differently regulates pressor responses to stress in WKY and SHR rats: the role of central oxytocin and V1a receptors. *Stress.* 2014;17:117–25.

328. Szczepańska-Sadowska E, Paczwa P, L-óń S, Ganten D. Increased pressor function of central vasopressinergic system in hypertensive renin transgenic rats. *J Hypertens.* 1998;16:1505–14.
329. Paczwa P, Budzikowski AS, Szczepanska-Sadowska E. Enhancement of central pressor effect of AVP in SHR and WKY rats by intracranial N(G)-nitro-L-arginine. *Brain Res.* 1997;748:51–61.
330. Binet L, Dejours P. [The role of arterial chemoreceptors in the control of pulmonary respiration in man]. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1962;139:328–35.
331. Seals DR, Johnson DG, Fregosi RF. Hyperoxia lowers sympathetic activity at rest but not during exercise in humans. *Am J Physiol.* 1991;260:R873–8.
332. Siński M, Lewandowski J, Przybylski J, Bidiuk J, Abramczyk P, Ciarka A, et al. Tonic activity of carotid body chemoreceptors contributes to the increased sympathetic drive in essential hypertension. *Hypertension Research.* 2012;35:487–91.
333. Siński M, Lewandowski J, Dobosiewicz A, Przybylski J, Abramczyk P, Gaciong Z. The effect of hyperoxia on central blood pressure in healthy subjects. *Archives of Medical Science.* 2016;5:992–9.
334. Sinski M, Lewandowski J, Przybylski J, Zalewski P, Symonides B, Abramczyk P, et al. Deactivation of carotid body chemoreceptors by hyperoxia decreases blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension Research.* 2014;37:858–62.
335. Habeck JO, Tafil-Klawe M, Klawe J. The carotid bodies of hypertensive/normotensive hybrid rats. *Biomed Biochim Acta.* 1987;46:903–6.
336. Habeck JO, Przybylski J, Szepek A, Huckstorf C. The aortic bodies of spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive rats--a study concerning location and size. *Anat Anz.* 1991;172:281–5.
337. Clarke JA, de Daly MB, Ead HW. Vascular Analysis of the Carotid Body in the Spontaneously Hypertensive Rat. 1993;337:3–8.
338. Heath D, Smith P, Fitch R, Harris P. Comparative pathology of the enlarged carotid body. *J Comp Pathol.* 1985;95:259–71.
339. Jaźwiec P, Gać P, Poręba M, Sobieszczkańska M, Mazur G, Poręba R. The cardiovascular health score and the volume of carotid body in computed tomography angiography in patients with arterial hypertension. *J Am Societ Hyperten.* 2018;12:551–60.
340. Nair S, Gupta A, Fudim M, Robinson C, Ravi V, Hurtado-Rua S, et al. CT angiography in the detection of carotid body enlargement in patients with hypertension and heart failure. *Neuroradiology.* 2013;55:1319–22.

341. Przybylski J. Alveolar hyperventilation in young spontaneously hypertensive rats. *IRCS Med Sci* . 1978;6:315.
342. Tan Z-Y, Lu Y, Whiteis CA, Simms AE, Paton JFR, Chapleau MW, et al. Chemoreceptor Hypersensitivity, Sympathetic Excitation, and Overexpression of ASIC and TASK Channels Before the Onset of Hypertension in SHR. *Circ Res*. 2010;106:536–45.
343. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol*. 2012;590:4269–77.
344. Sinski M, Lewandowski J, Przybylski J, Bidiuk J, Abramczyk P, Ciarka A, et al. Tonic activity of carotid body chemoreceptors contributes to the increased sympathetic drive in essential hypertension. *Hypertens Res*. 2012;35:487–91.
345. Izdebska E, Cybulska I, Sawicki M, Izdebski J, Trzebski A. Postexercise decrease in arterial blood pressure, total peripheral resistance and in circulatory responses to brief hyperoxia in subjects with mild essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 1998;12:855–60.
346. Tafil-Klawe M, Trzebski A, Klawe J, Pałko T. Augmented chemoreceptor reflex tonic drive in early human hypertension and in normotensive subjects with family background of hypertension. *Acta Physiol Pol*. 1985;36:51–8.
347. Narkiewicz K, Ratcliffe LEK, Hart EC, Briant LJB, Chrostowska M, Wolf J, et al. Unilateral Carotid Body Resection in Resistant Hypertension: A Safety and Feasibility Trial. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:313–24.
348. Niewiński P, Janczak D, Rucinski A, Jazwiec P, Sobotka PA, Engelman ZJ, et al. Carotid body removal for treatment of chronic systolic heart failure. *Int J Cardiol*. 2013;168:2506–9.
349. Niewinski P, Janczak D, Rucinski A, Tubek S, Engelman ZJ, Jazwiec P, et al. Dissociation between blood pressure and heart rate response to hypoxia after bilateral carotid body removal in men with systolic heart failure. *Exp Physiol*. 2014;99:552–61.
350. Niewinski P, Janczak D, Rucinski A, Tubek S, Engelman ZJ, Piesiak P, et al. Carotid body resection for sympathetic modulation in systolic heart failure: results from first-in-man study. *Eur J Heart Fail*. 2017;
351. Lobo MD. Transcatheter Carotid Body Denervation: First-in-Man Results and Future Directions. *Renal Denervation*. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 193–8.
352. Niewinski P, Tubek S, Paton JFR, Banasiak W, Ponikowski P. Oxygenation pattern and

- compensatory responses to hypoxia and hypercapnia following bilateral carotid body resection in humans. *J Physiol*. 2021;599:2323–40.
353. Fisher JP, Zera T, Paton JFR. Respiratory–cardiovascular interactions. *Handb Clin Neurol*. 2022;188:279–308.
354. Claessen G, Claus P, Delcroix M, Bogaert J, Gerche A La, Heidbuchel H. Interaction between respiration and right versus left ventricular volumes at rest and during exercise: a real-time cardiac magnetic resonance study. *American J Physiol*. 2014;306:H816–24.
355. Barnett WH, Latash EM, Capps RA, Dick TE, Wehrwein EA, Molkov YI. Traube–Hering waves are formed by interaction of respiratory sinus arrhythmia and pulse pressure modulation in healthy men. *J Appl Physiol*. 2020;129:1193–202.
356. Simms AE, Paton JFR, Pickering AE, Allen AM. Amplified respiratory–sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol*. 2009;587:597–610.
357. Xie L, Di X, Zhao F, Yao J, Liu Z, Li C, et al. Increased Respiratory Modulation of Blood Pressure in Hypertensive Patients. *Front Physiol*. 2019;10:1111.
358. Joseph CN, Porta C, Casucci G, Casiraghi N, Maffei M, Rossi M, et al. Slow Breathing Improves Arterial Baroreflex Sensitivity and Decreases Blood Pressure in Essential Hypertension. *Hypertension*. 2005;46:714–8.
359. Herawati I, Mat Ludin AF, M M, Ishak I, Farah NMF. Breathing exercise for hypertensive patients: A scoping review. *Front Physiol*. 2023;14:1048338.
360. Elliott WJ, Izzo JL, White WB, Rosing DR, Snyder CS, Alter A, et al. Graded Blood Pressure Reduction in Hypertensive Outpatients Associated With Use of a Device to Assist With Slow Breathing. *J Clin Hypert*. 2004;6:553–9.
361. Mourya M, Mahajan AS, Singh NP, Jain AK. Effect of Slow- and Fast-Breathing Exercises on Autonomic Functions in Patients with Essential Hypertension. *J Altern and Complement Med*. 2009;15:711–7.
362. Pravenec M, Kren V, Landa V, Mlejnek P, Musilova A, Silhavy J, et al. Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 1:S1-8.
363. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2019;73(6):e87-120.
364. Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension*. 1989;14:191–202.

365. McGuire PG, Twietmeyer TA. Aortic endothelial junctions in developing hypertension. *Hypertension*. 1985;7:483–90.
366. Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med*. 1979;94:608–16.
367. Gomes MFP, Borges ME, Rossi V de A, Moura E de OC de, Medeiros A. The Effect of Physical Resistance Training on Baroreflex Sensitivity of Hypertensive Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2017;108:539–45.
368. Przybylski J, Trzebski A, Przybyszewski A. Circulatory responses to acute hypoxia in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Acta Physiol Pol*. 1980;31:463–8.
369. Segiet A, Smykiewicz P, Kwiatkowski P, Zera T. Tumour necrosis factor and interleukin 10 in blood pressure regulation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Cytokine*. 2019;113:185–94.
370. Cabassi A, Vinci S, Calzolari M, Bruschi G, Borghetti A. Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1998;62:1111–8.
371. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, Alecy LD, DiPetrillo K. Validation of Volume-Pressure Recording Tail-Cuff Blood Pressure Measurements. *Am J Hypertens*. 2008;21:1288–91.
372. Daugherty A, Rateri D, Hong L, Balakrishnan A. Measuring Blood Pressure in Mice using Volume Pressure Recording, a Tail-cuff Method. *J Vis Exp*. 2009;27:1291.
373. Bojakowski K, Abramczyk P, Bojakowska M, Zwolińska A, Przybylski J, Gaciong Z. Fucoidan improves the renal blood flow in the early stage of renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Physiol Pharmacol*. 2001;52(1):137-43.
374. Skrzypecki J, Żera T, Ufnal M. Butyrate, a Gut Bacterial Metabolite, Lowers Intraocular Pressure in Normotensive But Not in Hypertensive Rats. *J Glaucoma*. 2018;27:823–7.
375. Sheikhabaei S, Gourine A V., Smith JC. Respiratory rhythm irregularity after carotid body denervation in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2017;246.
376. Boon JA, Garnett NBL, Bentley JM, Milsom WK. Respiratory chemoreflexes and effects of cortical activation state in urethane anesthetized rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004;140:243–56.
377. Kim SJ, Fong AY, Pilowsky PM, Abbott SBG. Sympathoexcitation following intermittent hypoxia in rat is mediated by circulating angiotensin II acting at the carotid body and subfornical organ. *J Physiol*. 2018;596:3217–32.
378. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experientia*.

- 1986;42:292–7.
379. Severs WB, Keil LC, Klase PA, Deen KC. Urethane Anesthesia in Rats. *Pharmacology*. 1981;22:209–26.
380. Silver NRG, Ward-Flanagan R, Dickson CT. Long-term stability of physiological signals within fluctuations of brain state under urethane anesthesia. *PLoS One*. 2021;16:e0258939.
381. Field KJ, White WJ, Lang CM. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Lab Anim*. 1993;27:258–69.
382. Wei S-G, Yu Y, Zhang Z-H, Felder RB. Proinflammatory Cytokines Upregulate Sympathoexcitatory Mechanisms in the Subfornical Organ of the Rat. *Hypertension*. 2015;65:1126–33.
383. Haibara AS, Bonagamba LGH, Machado BH. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am J Physiol*. 1999;276:R69–80.
384. Barros RCH, Bonagamba LGH, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LGS, Machado BH. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci*. 2002;97:110–5.
385. Chang Y, Chen T-Y, Chen C-H, Crain BJ, Toung TJK, Bhardwaj A. Plasma arginine-vasopressin following experimental stroke: effect of osmotherapy. *J Appl Physiol*. 2006;100:1445–51.
386. Ufnal M, Drapala A, Sikora M, Zera T. Early high-sodium solid diet does not affect sodium intake, sodium preference, blood volume and blood pressure in adult Wistar-Kyoto rats. *Br J Nutr*. 2011;106:292–6.
387. Leng G, Sabatier N. Measuring Oxytocin and Vasopressin: Bioassays, Immunoassays and Random Numbers. *J Neuroendocrinol*. 2016;28:101111.
388. Kruszynski M, Lammek B, Manning M, Seto J, Haldar J, Sawyer WH. [1-(β -mercapto- β -cyclopentamethylenepropionic acid),2-(O-methyl)tyrosine]arginine-vasopressin and [1-(β -mercapto- β -cyclopentamethylenepropionic acid)]arginine-vasopressin, two highly potent antagonists of the vasopressor response to arginine-vasopressin. *J Med Chem*. 1980;23:364–8.
389. Spitzer M, Wildenhain J, Rappsilber J, Tyers M. BoxPlotR: A web tool for generation of box plots. *Nat Methods*. 2014;11(2):121–2.
390. Abramczyk P, Zwolińska A, Oficjalski P, Przybylski J. Kidney denervation combined with elimination of adrenal-renal portal circulation prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.

- 1999;26(1):32-34.
391. Anishchenko AM, Aliev OI, Sidekhmenova A V., Shamanaev AYU, Plotnikov MB. Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension. *Bull Exp Biol Med.* 2015;159:591–3.
392. Jennings DB, Lockett HJ. Angiotensin stimulates respiration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1125-33.
393. Li J, Kemp BA, Howell NL, Massey J, Mińczuk K, Huang Q, et al. Metabolic changes in spontaneously hypertensive rat hearts precede cardiac dysfunction and left ventricular hypertrophy. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e010926.
394. Ye JM, Colquhoun EQ. Altered muscle metabolism associated with vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1998;275.
395. Lucas PA, Lacour B, McCarron DA, Druke T. Disturbance of acid-base balance in the young spontaneously hypertensive rat. *Clin Sci.* 1987;73.
396. Donald MJ. End tidal carbon dioxide monitoring in prehospital and retrieval medicine: a review. *Emerg Med J.* 2006;23:728–30.
397. Senior RM, Fishman AP. Disturbances of Alveolar Ventilation. *Med Clin North Am.* 1967;51:403–25.
398. Pijacka W, McBryde FD, Marvar PJ, Lincevicius GS, Abdala APL, Woodward L, et al. Carotid sinus denervation ameliorates renovascular hypertension in adult Wistar rats. *J Physiol.* 2016;594:6255–66.
399. Tian Y-M, Ma L, Geng D-Y, Yuan F, Zhang Y, Wang S. Amplified cardiorespiratory activity by hypoxia in conscious spontaneously hypertensive rats. *Sheng Li Xue Bao.* 2019;71:505–13.
400. Oliveira-Sales EB, Colombari E, Abdala AP, Campos RR, Paton JFR. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. *Exp Physiol.* 2016;101:67–80.
401. Siński M, Lewandowski J, Przybylski J, Bidiuk J, Abramczyk P, Ciarka A, et al. Tonic activity of carotid body chemoreceptors contributes to the increased sympathetic drive in essential hypertension. *Hypertension Research.* 2012;35:487–91.
402. Braga VA, Soriano Renato N., Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LGH, Paton JFR, et al. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol.* 2007;581.

403. Haibara AS, Colombari E, Chianca DA, Bonagamba LGH, Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995;269.
404. Braga VA, Machado BH. Chemoreflex sympathoexcitation was not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural nucleus tractus solitarii in the working heart-brainstem preparation of rats. *Exp Physiol.* 2006;91:551-9.
405. Daly M de B, Hazzledine JL. The effects of artificially induced hyperventilation on the primary cardiac reflex response to stimulation of the carotid bodies in the dog. *J Physiol.* 1963;168:872–89.
406. Simpson PJ, Adams L, Versey CJ, Cole P. Some physiological and metabolic effects of sodium nitroprusside and cyanide in the dog. *Br J Anaesth.* 1979;51:81–7.
407. Hayward LF, Johnson AK, Felder RB. Arterial chemoreflex in conscious normotensive and hypertensive adult rats. *Am J Physiol.* 1999;276:H1215–22.
408. Murray PA, Lavallee M, Vatner SF. Alpha-adrenergic-mediated reduction in coronary blood flow secondary to carotid chemoreceptor reflex activation in conscious dogs. *Circ Res.* 1984;54:96–106.
409. Siński M, Kowalczyk P, Stolarczyk A, Sawionek L, Przybylski J. Influence of the stimulation of carotid body chemoreceptors on the gastric mucosal blood flow in artificially ventilated and spontaneously breathing rats. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53:359–69.
410. Stickland MK, Fuhr DP, Haykowsky MJ, Jones KE, Paterson DI, Ezekowitz JA, et al. Carotid chemoreceptor modulation of blood flow during exercise in healthy humans. *J Physiol.* 2011;589:6219–30.
411. Fernandes IA, Rocha MP, Campos MO, Mattos JD, Mansur DE, Rocha HNM, et al. Reduced arterial vasodilatation in response to hypoxia impairs cerebral and peripheral oxygen delivery in hypertensive men. *J Physiol.* 2018;596:1167–79.
412. Morgan BJ, Teodorescu M, Pegelow DF, Jackson ER, Schneider DL, Plante DT, et al. Effects of losartan and allopurinol on cardiorespiratory regulation in obstructive sleep apnoea. *Exp Physiol.* 2018;103:941–55.
413. Armstrong GG, Guyton AC, Lindsey AW. Relationship of total peripheral resistance to the pressure gradient from the arteries to the veins. *Am J Physiol.* 1956;186:294-8.
414. Wolff C, Green D, Paton J, Collier D. A New Radically Improved Model of the Circulation With Important Clinical Implications. *Am J Surg Clin Case Reports.* 2020;2(1):1-24

415. DeLalio LJ, Stocker SD. Impact of anesthesia and sex on sympathetic efferent and hemodynamic responses to renal chemo- and mechanosensitive stimuli. *J Neurophysiol.* 2021;126:668–79.
416. Aitken AV, Minassa VS, Batista TJ, Oliveira JK da S, Sant’Anna K de O, Felipe ISA, et al. Acute poisoning by chlorpyrifos differentially impacts survival and cardiorespiratory function in normotensive and hypertensive rats. *Chem Biol Interact.* 2024;387:110821.
417. Paton JFR, Machado BH, Moraes DJA, Zoccal DB, Abdala AP, Smith JC, et al. Advancing respiratory–cardiovascular physiology with the working heart–brainstem preparation over 25 years. *J Physiol.* 2022;600(9):2049-2075.
418. Monteiro TC, Batuca JR, Obeso A, González C, Monteiro EC. Carotid body function in aged rats: Responses to hypoxia, ischemia, dopamine, and adenosine. *Age (Omaha).* 2011;33(3):337-50.
419. Mohring J, Kintz J, Schoun J, McNeill JR. Pressor Responsiveness and Cardiovascular Reflex Activity in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats During Vasopressin Infusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1981;3:948–57.
420. Larivière R, Baribeau J, St-Louis J, Schiffrin EL. Vasopressin receptors and inositol trisphosphate production in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67:232–9.
421. Stepniakowski K, Lapiński M, Januszewicz A, Noszczyk B, Szczepańska-Sadowska E. Pressor responsiveness to vasopressin in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Pol.* 1989;40:171–82.
422. Taka T, Ohta Y, Seki J, Giddings JC, Yamamoto J. Impaired Flow-Mediated Vasodilation in vivo and Reduced Shear-Induced Platelet Reactivity in vitro in Response to Nitric Oxide in Prothrombotic, Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:184–9.
423. Kowalewski S, Czarzasta K, Puchalska L, Szczepańska-Sadowska E, Wsol A, Cudnoch-Jędrzejewska A. Interaction of Orexin A and Vasopressin in the Brain Plays a Role in Blood Pressure Regulation in WKY and SHR Rats. *Med Sci Monit.* 2020;26.
424. Bakris G, Bursztyń M, Gavras I, Bresnahan M, Gavras H. Role of vasopressin in essential hypertension. *J Hypertens.* 1997;15:545–50.
425. Naitoh M, Burrell LM, Risvanis J, Aldred KL, Rockell MD, Johnston CI, et al. Modulation of genetic hypertension by short-term AVP V1A or V2 receptor antagonism in young SHR. *Am J Physiol.* 1997;272:F229–34.

426. Burrell LM, Phillips PA, Risvanis J, Aldred KL, Hutchins A-M, Johnston CI. Attenuation of Genetic Hypertension After Short-term Vasopressin V1A Receptor Antagonism. *Hypertension*. 1995;26:828–34.
427. Sueta CA, Hutchins PM, Dusseau JW. Norepinephrine-induced potentiation of arginine vasopressin reactivity in arterioles of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1983;5:321–7.
428. Yang X-P, Touyz RM, Nguyen P V., Li YD, Li J-S, Schiffrin EL. Endothelin-1 and Vasopressin Signalling in Blood Vessels of Young SHR in Comparison to Adult SHR. *Hyperten Res*. 1996;19:121–32.
429. Feng JJ, Arendshorst WJ. Enhanced renal vasoconstriction induced by vasopressin in SHR is mediated by V1 receptors. *Am J Physiol*. 1996;271:F304–13.
430. Feng JJ, Arendshorst WJ. Calcium Signaling Mechanisms in Renal Vascular Responses to Vasopressin in Genetic Hypertension. *Hypertension*. 1997;30:1223–31.
431. Touyz RM, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Differential effects of vasopressin and endothelin-1 on vascular contractile and calcium responses in pressurized small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1996;14:983–91.
432. Heinemann A, Wachter CH, Peskar BA, Holzer P. Dilatation by angiotensin II of the rat femoral arterial bed *in vivo* via pressure/flow-induced release of nitric oxide and prostaglandins. *Br J Pharmacol*. 1997;122:975–84.
433. Heinemann A, Wachter CH, Holzer P. Differential regulation of mesenteric and femoral blood flow in the rat as revealed by computerized data acquisition and evaluation. *J Auton Pharmacol*. 1998;18:39–48.
434. Aylward PE, Floras JS, Leimbach WN, Abboud FM. Effects of vasopressin on the circulation and its baroreflex control in healthy men. *Circulation*. 1986;73:1145–54.
435. Valovič P, Behuliak M, Vaněčková I, Zicha J. Impaired vascular β -adrenergic relaxation in spontaneously hypertensive rats: The differences between conduit and resistance arteries. *Eur J Pharmacol*. 2023;958:176045.
436. Shimokawa A, Kunitake T, Takasaki M, Kannan H. Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. *J Auton Nerv Syst*. 1998;72(1):46-54.
437. Sharabi FM, Guo GB, Abboud FM. Contrasting effects of vasopressin on baroreflex inhibition of lumbar sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1985;18:H922-18.
438. Hindmarch CCT, Fry M, Smith PM, Yao ST, Hazell GGJ, Lolait SJ, et al. The

- transcriptome of the medullary area postrema: the thirsty rat, the hungry rat and the hypertensive rat. *Exp Physiol*. 2011;96:495–504.
439. Jurzak M, Schmid HA. Vasopressin and sensory circumventricular organs. *Prog Brain Res*. 1998;119:221–45.
440. McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci*. 1999;6:289–301.
441. Raggenbass M, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ. Vasopressin receptors of the vasopressor (V1) type in the nucleus of the solitary tract of the rat mediate direct neuronal excitation. *J Neurosci*. 1989;9:3929–36.
442. Tribollet E, Raufaste D, Maffrand J, Serradeil-Le Gal C. Binding of the non-peptide vasopressin V1a receptor antagonist SR-49059 in the rat brain: an in vitro and in vivo autoradiographic study. *Neuroendocrinology*. 1999;69:113–20.
443. Ferguson A V., Beckmann LM, Fisher JT. Effects of subfornical organ stimulation on respiration in the anesthetized rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1989;67:1097–101.
444. Walker JK, Jennings DB. During acute hypercapnia vasopressin inhibits an angiotensin drive to ventilation in conscious dogs. *J Appl Physiol (1985)*. 1995;79:786–94.
445. Xue Q, Wang R, Wang L, Xiong B, Li L, Qian J, et al. Downregulating the P2X3 receptor in the carotid body to reduce blood pressure via acoustic gene delivery in canines. *Translational Research*. 2021;227:30–41.
446. Zhou T, Chien MS, Kaleem S, Matsunami H. Single cell transcriptome analysis of mouse carotid body glomus cells. *J Physiol*. 2016;594:4225–51.
447. Pauza AG, Thakkar P, Tasic T, Felipe I, Bishop P, Greenwood MP, et al. GLP1R Attenuates Sympathetic Response to High Glucose via Carotid Body Inhibition. *Circ Res*. 2022;130:694–707.
448. Schultz HD, Marcus NJ, Del Rio R. Role of the Carotid Body Chemoreflex in the Pathophysiology of Heart Failure: A Perspective from Animal Studies. 2015;860:167–85.
449. Andrade DC, Lucero C, Toledo C, Madrid C, Marcus NJ, Schultz HD, et al. Relevance of the Carotid Body Chemoreflex in the Progression of Heart Failure. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–7.
450. Szczepanska-Sadowska E, Czarzasta K, Cudnoch-Jedrzejewska A. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20:19.
451. Niemeier JE. Telemetry for small animal physiology. *Lab Anim (NY)*. 2016;45:255–7.

452. Delaunois A, Dedoncker P, Hanon E, Guyaux M. Repeated assessment of cardiovascular and respiratory functions using combined telemetry and whole-body plethysmography in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009;60:117–29.
453. Lam S, Liu Y, Ng K, Liong EC, Tipoe GL, Leung PS, et al. Upregulation of a local renin–angiotensin system in the rat carotid body during chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2014;99:220–31.

7. Zgoda Komisji Etycznej

UCHWAŁA NR WAW2/096/2019

z dnia 28 czerwca 2019 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Wpływ receptora V1a dla wazopresyny na regulację krążeniowo-oddechową u szczurów normo- i hipertensyjnych” z dnia 05 czerwca 2019 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski, adres: ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Tymoteusza Żera²

przy udziale³ -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, kategoria obejmująca wiele układów.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: umiarkowana.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
szczur wędrowny WKY	12-14 tygodni	66
szczur wędrowny SHR	12-14 tygodni	66

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Żera Tymoteusz, Proczka Michał, Trzciński Adam, Partyka Piotr.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 01.09.2019 do 31.08.2023r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: Centrum Badań Przedklinicznych, Banacha 1B, 02-097 Warszawa.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie/nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

~~dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[Faint, illegible text, likely a stamp or header]
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA
ds. Doświadczania Zwierząt przy SGGW
[Signature]
(Podpis Przewodniczącej komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

8. Aneks – praca poglądowa



Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone

Michał Proczka¹, Jacek Przybylski², Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska³,
Ewa Szczepańska-Sadowska³ and Tymoteusz Żera^{3*}

¹Department of Experimental and Clinical Physiology, Doctoral School, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland, ²Department of Biophysics, Physiology, and Pathophysiology, Laboratory of Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland, ³Department of Experimental and Clinical Physiology, Laboratory of Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

James Todd Pearson,
National Cerebral and Cardiovascular
Center, Japan

Reviewed by:

Rohit Ramchandra,
The University of Auckland,
New Zealand
Débora Simões A. Colombari,
São Paulo State University, Brazil
Steven Allen Crone,
Cincinnati Children's Hospital Medical
Center, United States

*Correspondence:

Tymoteusz Żera
tżera@wum.edu.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 19 July 2021

Accepted: 27 September 2021

Published: 26 October 2021

Citation:

Proczka M, Przybylski J,
Cudnoch-Jędrzejewska A,
Szczepańska-Sadowska E and
Żera T (2021) Vasopressin and
Breathing: Review of Evidence for
Respiratory Effects of the
Antidiuretic Hormone.
Front. Physiol. 12:744177.
doi: 10.3389/fphys.2021.744177

Vasopressin (AVP) is a key neurohormone involved in the regulation of body functions. Due to its urine-concentrating effect in the kidneys, it is often referred to as antidiuretic hormone. Besides its antidiuretic renal effects, AVP is a potent neurohormone involved in the regulation of arterial blood pressure, sympathetic activity, baroreflex sensitivity, glucose homeostasis, release of glucocorticoids and catecholamines, stress response, anxiety, memory, and behavior. Vasopressin is synthesized in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of the hypothalamus and released into the circulation from the posterior lobe of the pituitary gland together with a C-terminal fragment of pro-vasopressin, known as copeptin. Additionally, vasopressinergic neurons project from the hypothalamus to the brainstem nuclei. Increased release of AVP into the circulation and elevated levels of its surrogate marker copeptin are found in pulmonary diseases, arterial hypertension, heart failure, obstructive sleep apnoea, severe infections, COVID-19 due to SARS-CoV-2 infection, and brain injuries. All these conditions are usually accompanied by respiratory disturbances. The main stimuli that trigger AVP release include hyperosmolality, hypovolemia, hypotension, hypoxia, hypoglycemia, strenuous exercise, and angiotensin II (Ang II) and the same stimuli are known to affect pulmonary ventilation. In this light, we hypothesize that increased AVP release and changes in ventilation are not coincidental, but that the neurohormone contributes to the regulation of the respiratory system by fine-tuning of breathing in order to restore homeostasis. We discuss evidence in support of this presumption. Specifically, vasopressinergic neurons innervate the brainstem nuclei involved in the control of respiration. Moreover, vasopressin V1a receptors (V1aRs) are expressed on neurons in the respiratory centers of the brainstem, in the circumventricular organs (CVOs) that lack a blood-brain barrier, and on the chemosensitive type I cells in the carotid bodies. Finally, peripheral and central administrations of AVP or antagonists of V1aRs increase/decrease phrenic nerve activity and pulmonary ventilation in a site-specific manner. Altogether, the findings discussed in this review strongly argue for the hypothesis that vasopressin affects ventilation both as a blood-borne neurohormone and as a neurotransmitter within the central nervous system.

Keywords: antidiuretic hormone, respiration, cardiovascular system, carotid body, sympathetic nervous system, circumventricular organs, brainstem, paraventricular nucleus of the hypothalamus

INTRODUCTION

Vasopressin (AVP), also known as antidiuretic hormone, is a neurohormone critically involved in maintaining body homeostasis. It is synthesized in discrete nuclei of the hypothalamus and transported to the posterior lobe of the pituitary gland, from where it is released into the circulation in response to increase of extracellular fluid osmolality. In the bloodstream, AVP is paramount for maintaining water balance thanks to its renal action resulting in water reabsorption and urine concentration. The other stimuli for AVP release include hypovolemia, hypotension, hypoxia, hypoglycemia, strenuous exercise, and angiotensin II (Ang II; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). The same stimuli also promote increases in pulmonary ventilation and are often associated with life-threatening conditions (Doerschug et al., 2010; Frier, 2014; Thompson et al., 2016; Convertino et al., 2019; Lüning et al., 2019).

In addition to its effects in the kidney, AVP exerts numerous extra-renal effects, including circulatory, nervous, endocrine, metabolic, and behavioral ones, which are discussed in detail in recent reviews (Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Japundžić-Žigon et al., 2020). Together, these AVP-mediated responses counteract disturbances of the body homeostasis and help in adjusting body function to internal and environmental stressors. Along with the control of circulatory and nervous system, the precise regulation of the respiratory system is also critical for the homeostatic adjustments. It is important to realize that changes in pulmonary ventilation fulfil their adaptive role only when they are matched with parallel changes in cardiac output and body metabolism. In this review, we summarize the most important studies analyzing regulation of AVP release and discuss the effects of this neuropeptide on the respiration under physiological and pathophysiological conditions, acting both as a blood-borne neurohormone and as a neurotransmitter within the central nervous system.

PHYSIOLOGY OF VASOPRESSIN

Vasopressin: Synthesis, Receptors, and Release

Vasopressin is synthesized in the form of pre-pro-AVP, which is processed into AVP, neurophysin II and C-terminal fragment of pre-pro-AVP known as copeptin. The neurohormone is produced predominantly in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of the hypothalamus in two histologically and functionally distinct pools of neurons – magnocellular cells projecting to the posterior pituitary and parvocellular cells projecting to the median eminence and extrahypothalamic brain structures, especially to the limbic system (Buijs, 1978; Dumais and Veenema, 2016) and the brainstem (Buijs, 1978; Kc and Dick, 2010; Kc et al., 2010). Vasopressin is released into the circulation together with copeptin from the axonal terminals of the magnocellular neurons located in the posterior lobe of the pituitary gland (neurohypophysis; Schrier et al., 1979; Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Bichet, 2019). Vasopressin is also released from

the nerve terminals of the PVN parvocellular cells in the median eminence into the hypothalamic-pituitary circulation, through which AVP reaches anterior lobe of the pituitary gland and promotes ACTH release (Gonzalez-Luque et al., 1970; Lee et al., 2015). Besides hypothalamic synthesis in the PVN and the SON, AVP, or AVP mRNA is locally expressed in peripheral organs, such as the adrenal medulla and the heart (Nussey et al., 1987; Hupf et al., 1999; Takeda et al., 2002). Measurements of plasma concentrations of AVP are highly variable due to binding of the neurohormone to platelets and its short biological half-life (Nickel et al., 2012; Bankir et al., 2017). Copeptin, co-released with AVP in equimolar quantities, is very stable and may serve as a biomarker of AVP release (Morgenthaler et al., 2006; Bankir et al., 2017).

Vasopressin acts *via* three subtypes of receptors, which belong to the G-protein coupled receptors: V1aR, V1bR, and V2R. Vasopressin released into the circulation exerts its cardiovascular effects mainly through V1aRs, which mediate vasoconstriction and increase in vascular resistance in most of the vascular beds (Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Japundžić-Žigon et al., 2020), and complex effects in the coronary circulation and cardiac hemodynamics (Pelletier et al., 2014). Binding of AVP to V1aRs expressed on thrombocytes stimulates procoagulant activity of platelets (Launay et al., 1987; Horstman et al., 1995; Colucci et al., 2014).

Vasopressin also exerts numerous endocrine effects mediated by V1aRs and V1bRs that include regulation of insulin and glucagon release from the pancreatic islets, release of catecholamines in the adrenal medulla and glucocorticoids in the adrenal cortex, and stimulation of corticotropin release from the pituitary gland (Nussey et al., 1987; Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Takeda et al., 2002; Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Mohan et al., 2019). In addition, AVP released into the circulation promotes gluconeogenesis and glycogenolysis in the liver and lipid metabolism in the fat tissue (Nakamura et al., 2017).

Vasopressin plays a critical role in the regulation of water-electrolyte balance *via* its V2Rs in the kidney, which depends on upregulation of the aquaporin 2 with resultant water trafficking in the apical membrane of the principal cells of the collecting duct (Wade et al., 1981; Schrier, 2008; Bankir et al., 2017).

Besides the systemic effects of AVP in the bloodstream, the neurohormone serves as a peptidergic neurotransmitter with both synaptic and “volume” mode of neurotransmission (Landgraf and Neumann, 2004). Vasopressin is released in the central nervous system from the nerve terminals of vasopressinergic neurons, whose cell bodies are located in the parvocellular division of the PVN. Up to 40% of the parvocellular cells of the PVN synthesize AVP and project to the brainstem and the spinal cord, where they terminate on sympathetic neurons (Pyner, 2009; Nunn et al., 2011). Vasopressinergic neurons exert either V1aR-dependent sympathoexcitatory effects accompanied by a rise in arterial blood pressure, or sympathoinhibition with activation of the parasympathetic system and sensitization of the arterial baroreflex (Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Japundžić-Žigon et al., 2020).

In addition to the central cardiovascular effects, both V1aRs and V1bRs participate in the regulation of mood, anxiety, aggression, pain, cognitive processes and memory, and adaptation to stress (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). Emerging evidence indicates that V1bRs may serve as autoreceptors on the vasopressinergic neurons in the hypothalamus (Corbani et al., 2018). Recently, it has been shown that V1bRs may be involved in SARS-CoV-2 infection by participating in the endocytosis of the virus' particles (Yeung et al., 2021). The tissue distribution of AVP receptors, their diverse biological functions, as well as agonists and antagonists are discussed in detail elsewhere (Koshimizu et al., 2012; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). The respiratory actions of AVP are discussed in detail in the following sections.

Vasopressin Release and Respiration: Coincidence or Relationship?

The evidence discussed below indicates that stimuli that activate vasopressinergic neurons and increase AVP levels also affect respiratory activity (Figure 1). This raises a question whether release of AVP and changes in respiration in response to these stimuli are coincidental, or if there is a functional relationship between AVP and the regulation of the respiratory system. Next, we discuss studies showing increased release of AVP and its surrogate marker copeptin under medical conditions accompanied by respiratory disturbances. Then, we analyze the evidence for AVP involvement in the regulation of respiratory system.

Regulation of Vasopressin Release

Activation of the vasopressinergic neurons and release of AVP into the circulation occurs in response to osmotic and non-osmotic stimuli. The magno- and parvocellular vasopressinergic cells of the hypothalamus are distinctly activated by various stimuli, with magnocellular cells being mostly activated by increase in sodium ion concentration and osmolality, hypovolemia, hypotonia, and hypoxia, while the parvocellular cells are more sensitive to various stressors, such as pain, injury, and psychological stress (Aguilera et al., 2008; Ueta et al., 2011; Bankir et al., 2017; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). Next, we discuss main stimuli for AVP release and how they affect the respiratory system.

Osmotic - Dependent AVP Release

Vasopressin is released into the circulation in response to increase in plasma osmolality and sodium ion concentration in directly proportional manner (Verney, 1947; Quillen and Cowley, 1983; Thornton et al., 1986; Baylis, 1987; Verbalis, 2007). In young healthy men, plasma AVP concentration starts to increase at plasma osmolality of 285 mOsm/kg, and continues to rise till values of osmolality exceed 310 mOsm/kg (Baylis and Robertson, 1980; Baylis, 1987). The changes in osmolality are detected in the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), in the subfornical organ (SFO), and in the magnocellular neurons of the PVN and the SON (Anderson et al., 2000, 2001;

Verbalis, 2007; Bankir et al., 2017; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). The changes of extracellular fluid osmolality are mostly affected by changes in sodium ion concentration; however, other osmotically active substances (e.g., mannitol) that affect cell volume also trigger AVP release (Verbalis, 2007). On the other hand, osmotically active solutes freely passing through the cell membrane (e.g., urea), have much weaker effect on cell volume and AVP release (Verbalis, 2007). In addition, changes in activity of AVP neurons and subsequent release of AVP in the posterior pituitary lobe are regulated by availability of water and sensation of thirst and may precede actual changes in the extracellular fluid osmolality (Bankir et al., 2017).

Several studies indicate that plasma osmolality and concentration of sodium ions may contribute to the control of respiration. Specifically, hyperosmolality was shown to inhibit respiration and to reduce increase in pulmonary ventilation evoked by thermoregulatory panting or adjustments to acid-base balance disturbances in animals (Baker and Dawson, 1985; Kasserra et al., 1991; Kasserra and Jones, 1993) and humans (Senay, 1969; Moen et al., 2014). However, it should be noted that experiments in the *in situ* preparations revealed direct excitatory effects of hyperosmolality on the carotid sinus nerve and the phrenic nerve activity (Trzebski et al., 1978; Kasserra et al., 1991; O'Connor and Jennings, 2001; da Silva et al., 2019).

In contrast to hyperosmolality, acute hypoosmolality has been shown to stimulate breathing in conscious dogs (Anderson et al., 1990) and transiently in rats (O'Connor and Jennings, 2001). In women and men, hypoosmolality induced by ingestion of water also increases ventilation, although, this may be in part compensatory response to metabolic acidosis induced by ingestion of tap water (Moen et al., 2014).

Earlier experiments *in vivo* on cats have shown that perfusion of the carotid bodies with hypoosmotic solutions increases activity of the carotid sinus nerve (Gallego and Belmonte, 1979) that is associated with increase in breathing. This stimulatory effect of hypoosmolality, at least in part, may be attributed to activation of calcium currents and depolarization of chemoreceptors in the carotid body directly induced by hypoosmotic stimulus, as shown in a rat (Molnár et al., 2003). Another potential mechanism may depend on vasoconstriction of vessels supplying the carotid body, leading to decrease in the carotid body blood flow and activation of the chemosensitive glomus cells (Brognara et al., 2021). It has been shown that hypoosmolality causes constriction of the vascular smooth muscles in various vascular beds (Lang et al., 1995; Aoki et al., 2014), and this mechanism was postulated to be involved in the activation of carotid bodies and increased activity of the carotid sinus nerve (Gallego and Belmonte, 1979).

Non-osmotic - Dependent AVP Release

Vasopressinergic neurons can be activated and AVP secreted into the circulation in response to numerous non-osmotic stimuli. The most critical ones are hypovolemia and hypotension, physical exercise, hypoglycemia, hypoxia, and Ang II. Of note, these stimuli also affect the pulmonary ventilation and/or activate the carotid body and arterial chemoreflex.

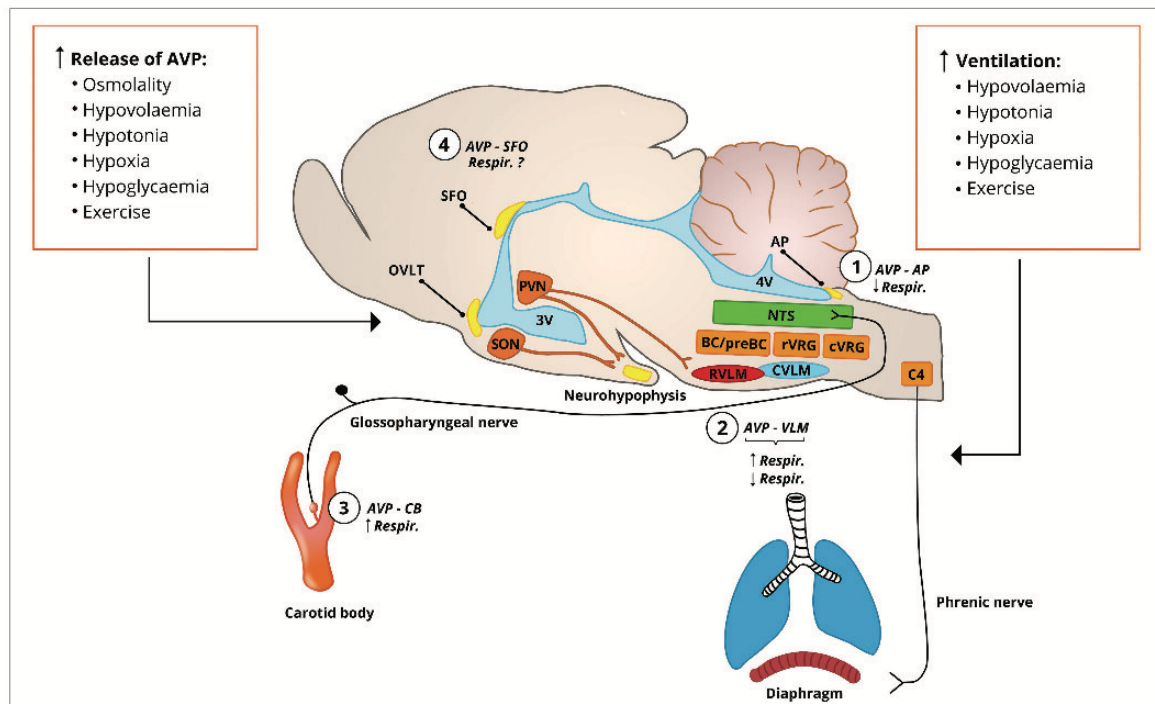


FIGURE 1 | Stimuli that cause AVP release into the bloodstream and activation of the vasopressinergic PVN neurons also increase the pulmonary ventilation. AVP in the bloodstream accesses the circumventricular organs (SFO, AP, and OVLT) that lack the blood-brain barrier and the carotid body at the carotid bifurcation. Vasopressinergic PVN neurons project to cardiovascular (RVLM) and respiratory (preBC/BC, rVRG, and C4 phrenic nucleus) centers, suggesting their involvement in the respiratory control (Kc et al., 2002a, 2010). (1) AVP at the AP inhibits phrenic nerve activity (Yang et al., 2006); (2) vasopressinergic projections to the rVRG tonically stimulate respiratory activity (Kc et al., 2010) and AVP applied into the rVRG or pre-Bötzing complex stimulates activity of diaphragm (Kc et al., 2002a, 2010), which is accompanied by increase in arterial blood pressure; this is in contrast to findings indicating that AVP administered into the rVRG inhibits phrenic nerve activity with and without changes in arterial blood pressure (Chuang et al., 2003, 2005; Cheng et al., 2004); (3) AVP locally administered into the carotid bifurcation slightly increases ventilation (Zera et al., 2018); and (4) vasopressin receptors are expressed in the SFO (Ostrowski et al., 1994), and electric stimulation of SFO increases respiratory activity (Ferguson et al., 1989), but the respiratory effects of AVP acting at SFO have not been determined. AP, area postrema; AVP, vasopressin; BC, Bötzing complex; C4, phrenic nuclei; CVLM, caudal ventrolateral medulla; cVRG, caudal ventral respiratory group; NTS, nucleus of the solitary tract; OVLT, organum vasculosum of the lamina terminalis; preBC, pre-Bötzing complex; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; RVLM, rostral ventrolateral medulla; rVRG, rostral ventral respiratory group; SFO, subfornical organ; SON, supraoptic nucleus; and VLM, ventral lateral medulla.

Hypovolemia and Hypotension

Vasopressinergic neurons are tonically inhibited by sensory input from cardiopulmonary low-pressure mechanoreceptors and high-pressure arterial baroreceptors located in the cardiac atria and large systemic veins and the walls of the aortic arch and the carotid sinus, respectively (Schrier et al., 1979; Baylis, 1987; Norsk, 1989). Decrease in the central blood volume and arterial blood pressure leads to unloading of these two groups of cardiovascular mechanoreceptors, which in turn results in activation of the hypothalamic vasopressinergic neurons (Baylis, 1987; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). Consequently, hypovolemia, hypotension, or hemorrhage lead to massive release of AVP and its surrogate marker copeptin into the circulation (Arnauld et al., 1977; Fyhrquist et al., 1981; Wehberg et al., 1991; Scott et al., 1994; Muller et al., 2007; Johnson et al., 2014; Bankir et al., 2017). It has been shown that in humans the arterial baroreceptors of the carotid sinus play a

critical role in AVP release induced by decrease in arterial blood pressure (Norsk, 1989).

Hypovolemia and hypotension, caused by hemorrhage or pharmacologically induced vasodilation, lead to the increase in pulmonary ventilation (D’Silva et al., 1966; Ohtake and Jennings, 1992; Matsuoka et al., 1994; Walker and Jennings, 1998). Progressive reduction of the central blood volume raises ventilation in men (Convertino et al., 2009) and even small decreases in arterial pressure exert stimulatory effects on breathing in dogs (Ohtake and Jennings, 1992). Of note, under conditions of reduced cardiac output, this increase in pulmonary ventilation may serve as a pulmonary pump that by increasing the amplitude of changes in intrathoracic and intraabdominal pressures promotes venous return to the right cardiac ventricle and limits the decrease in stroke volume (Skytjoti et al., 2018). The changes in respiratory activity are dependent on the intrasinus pressure sensed by the arterial baroreceptors

(Brunner et al., 1982). As the carotid baroreceptors are unloaded, the pulmonary ventilation increases, and vice versa, stimulation of the baroreceptors inhibits ventilation (Brunner et al., 1982). This inhibitory effect of the baroreflex on the respiratory system is particularly prominent during expiration in the *in situ* preparation in rat (Baekey et al., 2010) and is dependent on the respiratory drive in anesthetized rats (McMullan et al., 2009).

Physical Exercise

Physical activity is an acute stressor for the body homeostasis that robustly triggers release of AVP into the circulation proportionally to the intensity of exercise (Wade and Claybaugh, 1980; Popovic et al., 2019). Although exercise-induced hyperosmolality may be involved in the release of AVP (Takamata et al., 2000), during high-intensity physical activity the increase in plasma AVP (or its surrogate marker copeptin) may be present despite hyponatremia or lack of changes in plasma osmolality (Wade and Claybaugh, 1980; Inder et al., 1998; Hew-Butler et al., 2011), which indicates a non-osmotic release of AVP during intense physical exercise. Furthermore, it appears that prominent release of AVP in response to strenuous exercise may lead to exercise-induced hyponatremia (Hew-Butler et al., 2017).

Physical activity is also the main physiological stimulus for the increase in pulmonary ventilation. In humans, both the high intensity dynamic exercise and the isometric muscle contractions may cause hyperventilation, especially at the end of exercise or during recovery phase, respectively (Imms and Mehta, 1989; Johnson et al., 1992). Thus, it is attractive to conjecture that AVP released during physical exercise may fine-tune respiratory responses and prevent excessive pulmonary ventilation, however, this requires further investigations.

Hypoglycemia

Insulin-induced hypoglycemia causes AVP release into the circulation both in animals (Plotsky et al., 1985; Berkenbosch et al., 1989; Caraty et al., 1990) and in human subjects (Baylis et al., 1981; Chiodera et al., 1992). The increased release of AVP in response to hypoglycemia appears to be independent of insulin (Chiodera et al., 1992).

The hypoglycemia-induced AVP release counteracts low plasma concentrations of glucose by gluconeogenic and glycogenolytic effects of AVP in the liver and on the AVP-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal cortex axis resulting in glucocorticoid release (Nakamura et al., 2017; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). Both experimental studies in animals and clinical observations in humans suggest that carotid bodies may be involved in mediating the counter-regulatory response to decreased blood glucose (Koyama et al., 2000; Wehrwein et al., 2015; Kakall et al., 2019). Both in men and rats, hypoglycemia also induces pronounced hyperventilation, which depends on the release of humoral factors, such as adrenaline acting at the carotid bodies (Bin-Jalil et al., 2004; Ward et al., 2007; Thompson et al., 2016).

Hypoxia

Hypoxia is a key trigger for the peripheral chemoreflex elicited from the carotid bodies, which results in increase of the

pulmonary ventilation, sympathoexcitation, and arousal (Marshall, 1994; Kumar and Prabhakar, 2012; Zera et al., 2019).

Hypoxia is also an important chemical stimulus for AVP release (Iovino et al., 2013; Szczepanska-Sadowska et al., 2017). It increases neurohypophyseal blood flow and increases plasma concentration of AVP both in animals (Wang et al., 1984; Wilson et al., 1987; Hanley et al., 1988; Raff, 2011), and humans (Koller et al., 1991). The effect of hypoxia on AVP release depends on the sensory input from the carotid bodies (Levy, 1966; Wilson et al., 1987; Iovino et al., 2013). The rise of plasma AVP counteracts the hypoxia-induced vasodilation and helps in maintaining the peripheral vascular resistance (Walker, 1986; Louwerse and Marshall, 1993), the action that complements the hypoxia-evoked sympathoexcitation.

Angiotensin II

Angiotensin II is a potent hormone that causes vasoconstriction and activates the sympathetic nervous system, promotes renal reabsorption of sodium ions directly by acting on the renal tubules and indirectly through the aldosterone pathway (Sztechman et al., 2018). It is also the key hormonal factor causing AVP release (Fyhrquist et al., 1979; Flör et al., 2018; Szczepanska-Sadowska et al., 2018). This allows for integration of water-electrolyte balance and regulation of osmolality and volume of extracellular fluid (Szczepanska-Sadowska, 1996).

Besides its cardiovascular, renal and sympathetic effects, Ang II also increases ventilation in dogs (Potter and McCloskey, 1979) and rats (Melo et al., 2020), however acute studies in humans show insignificant effect of Ang II on pulmonary ventilation (Bristow et al., 1971; Solaiman et al., 2014). In animals, the stimulatory effect of Ang II on the respiratory system may be reciprocally inhibited by AVP in a V1aR-dependent manner (Anderson et al., 1990; Walker and Jennings, 1994, 1995), which may involve inhibition of the renin release (Bunag et al., 1967).

VASOPRESSIN/COPEPTIN RELEASE UNDER PATHOLOGICAL CONDITIONS

Next, we briefly summarize clinical observations indicating that AVP is released in excess under conditions of pulmonary dysfunction and medical conditions associated with abnormal breathing patterns. This raises a possibility that AVP is not only a biomarker of respiratory disturbances and hypoxia, but that it may also contribute to the regulation of the respiratory system.

Respiratory Disorders

Increased plasma concentration of copeptin, which reflects the increase in AVP release, is observed in several respiratory disturbances (Szczepanska-Sadowska et al., 2017). It is present in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in which copeptin level is predictive for the recurrence of exacerbation and all-cause mortality (Muller et al., 2007; Zhao et al., 2014). Increased plasma copeptin level is also present in patients with lower respiratory tract infection, especially in

patients with community acquired pneumonia, in whom it has a predictive value for all-cause mortality, clinical instability, and deterioration (Muller et al., 2007; Kruger et al., 2010; Kolditz et al., 2012). High copeptin concentration is also present in acute respiratory distress syndrome, acute lung injury, and cardiopulmonary oedema, where elevated copeptin has a better predictive value for short-term mortality than NT-proBNP, a marker of cardiac ventricles' overload (Lin et al., 2012). Finally, some studies also indicate the potential role of copeptin in the diagnosis and risk stratification of patients with pulmonary hypertension (Nickel et al., 2013) and pulmonary embolisms (Hellenkamp et al., 2018). Recently, it has been shown that elevated concentrations of copeptin are associated with worse outcome in COVID-19 patients with SARS-CoV-2 infection (Gregoriano et al., 2021) and may discriminate between patients with COVID-19 and patients with community-acquired pneumonia (Kuluöztürk et al., 2021).

Non-respiratory Disorders

Besides disturbances of the respiratory system, elevated plasma concentrations of AVP or copeptin are found in several non-respiratory disorders that are often accompanied by abnormal respiratory patterns and increased ventilation. Specifically, elevated copeptin concentration is predictive of worse outcome in patients with traumatic brain injury (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2014; Choi et al., 2017), a condition associated with increased expression of V1aRs in the brain (Szymdynger-Chodobska et al., 2004) and abnormal respiratory patterns (Racca et al., 2020). They are also seen in children with febrile and epileptic seizures (Evers et al., 2020). Furthermore, increased plasma concentration of copeptin has been found in patients with acute and chronic heart failure (Maisel et al., 2011; Düngen et al., 2018; Schill et al., 2021), a condition usually accompanied by abnormal respiratory patterns, such as Cheyne-Stokes breathing and sleep apnoea (Cowie et al., 2021). Increase copeptin levels are also found in patients admitted to intensive care unit or emergency department with acute severe dyspnoea due to non-respiratory causes and accompanied by hypoxia and increased respiratory rate (Ara-Somohano et al., 2017).

THE RESPIRATORY EFFECTS OF VASOPRESSIN

Vasopressin affects the respiratory system both as a neurohormone and as a neurotransmitter. Available evidence indicates that its respiratory effects are mainly mediated by V1aRs. Vasopressin present in the bloodstream may affect the respiratory system by interacting with V1aRs expressed in the lungs (Tahara et al., 1998), the circumventricular organs (CVOs; Raggenbass et al., 1989; Ostrowski et al., 1994; Tribollet et al., 1999; Hindmarch et al., 2011), and in the carotid bodies (Žera et al., 2018). In addition to circulating AVP, vasopressinergic neurons projecting to the brainstem respiratory centers affect respiratory activity *via* V1aRs (Kc et al., 2002a, 2010; Chuang et al., 2005; Kc and Dick, 2010). It appears that the effects of AVP on the

respiratory function is site-specific and may result in opposing effects, as discussed below.

Vasopressin Receptors in the Respiratory System, Chemoreceptors and Respiratory Centers of the Brain

Lungs and Pulmonary Circulation

It has been shown that V1aRs are predominantly expressed in the lung (Hirasawa et al., 1994; Tahara et al., 1998) and in the pulmonary arteries (Enomoto et al., 2014). Contrary to arteries in the systemic circulation, AVP does not cause vasoconstriction of the pulmonary arteries, but rather it causes vasodilation, especially under conditions of hypoxic vasoconstriction of pulmonary vessels in animals (Walker et al., 1989; Wallace et al., 1989; Enomoto et al., 2014; Sugawara et al., 2019) and humans (Jeon et al., 2006; Currihan et al., 2014). Thus, AVP does not increase pulmonary vascular resistance and the right ventricle's afterload, but it only selectively increases the vascular resistance in systemic circulation (Walker et al., 1989; Jeon et al., 2006).

Retrograde transneuronal labeling indicates that the airway-related vagal preganglionic neurons receive innervation from vasopressinergic neurons of the PVN (Kc et al., 2006, 2010). Furthermore, AVP acting on V1aRs depolarizes and increases firing rate of these preganglionic neurons (Yan et al., 2017), which is suggestive of the broncho-constrictive and secretory effect of AVP. Nonetheless, available evidence points to limited effects of AVP on bronchoconstriction in laboratory animals (Bhoola et al., 1962; Zheng et al., 2017) and humans (Knox et al., 1989).

Arterial Chemoreceptors

Recently, we showed presence of immunostaining for both C-terminal and N-terminal fragments of the V1aR in the chemosensitive glomus cells of the carotid bodies collected from the normotensive Sprague-Dawley rats (Žera et al., 2018). Furthermore, expression of G protein q/11 and phosphokinase C, key intracellular components of the V1aR signaling, has been detected in the chemosensitive glomus cells with the single-cell transcriptomics in mouse (Zhou et al., 2016). These findings indicate that circulating AVP may affect the glomus cells expressing V1aRs and presumably modulate the activity of the carotid body.

Circumventricular Organs

Circumventricular organs (CVOs) include the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) and the SFO that are located close to the third cerebral ventricle, and the area postrema (AP), which is situated in the dorsal surface of the medulla oblongata. They express numerous receptors, lack the blood-brain barrier and are accessible for hormones and mediators circulating in the bloodstream (Ufnal and Skrzypecki, 2014). All CVOs express receptors for AVP, predominantly V1aRs (Raggenbass et al., 1989; Jurzak and Schmid, 1998; McKinley et al., 1999; Tribollet et al., 1999; Kc and Dick, 2010; Hindmarch et al., 2011). Upon binding to V1aRs in the CVOs

of the third ventricle, AVP exerts sympathoexcitatory and pressor effects (Ufnal and Skrzypecki, 2014; Szczepanska-Sadowska et al., 2017; Japundžić-Žigon et al., 2020). In contrast, stimulation of V1aRs in the AP sensitizes the arterial baroreflex and results in hypotension (Hasser and Bishop, 1990; Japundžić-Žigon et al., 2020), which indicates opposite effects of AVP depending on the place of its action. A limited number of studies indicates that administration of AVP into the cerebral ventricles or directly into the AP decreases respiratory rate and phrenic nerve activity (Zerbe and Feuerstein, 1985; Yang et al., 2006).

Respiratory Centers of the Brain

In rats, V1aRs are expressed on the sympathetic neurons of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and the respiratory neurons located in the rostral ventral respiratory column (rVRC; Kc and Dick, 2010) and pre-Bötzinger complex (Kc et al., 2002a). Retrograde labeling studies show that in addition to these nuclei, the phrenic nuclei receive vasopressinergic innervation from the PVN (Kc et al., 2002a,b). The expression of V1aRs in these brainstem structures is augmented by exposure of the animals to hypoxia (Kc and Dick, 2010; Kc et al., 2010). Furthermore, a significant subpopulation of the vasopressinergic PVN neurons are activated by hypercapnia (Kc et al., 2002b). Importantly, binding of AVP to V1 receptors was found in neurons across the nucleus of the solitary tract (NTS), including its caudal part (Raggenbass et al., 1989) that receives sensory input from the arterial chemoreceptors (Lipski et al., 1976, 1977; Finley and Katz, 1992; Zera et al., 2019).

Respiratory Effects of Vasopressin Acting as a Hormone

Circulating AVP may affect the neural control of the respiratory system either by binding to its receptors in the CVOs or receptors located in other peripheral tissues, especially the arterial chemoreceptors (Figure 1). Overall, prevailing evidence indicates that AVP as a hormone present in the bloodstream suppresses ventilation. We hypothesize that under conditions of hypoxia, oligo/hypovolemia, hypotonia, hypoglycemia, exercise, activation of renin-angiotensin system, the increase in AVP plasma concentration may help in limiting excessive increase in ventilation and prevent development of hypocapnia. Thus, it is likely that inhibition of ventilation by AVP may provide a fine-tuning mechanism that maintains respiratory activity at the most efficient level.

Vasopressin Circulating in the Bloodstream

Intravenous infusions of AVP transiently decrease pulmonary ventilation and phrenic nerve activity in conscious dogs (Ohtake and Jennings, 1993), anesthetized and awake rats (Louwerse and Marshall, 1993; Walker and Jennings, 1998; Zera et al., 2018; Brackley and Toney, 2021) and fetal lambs (Bessho et al., 1997). Recently published pilot study in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease showed that upon initiation of treatment with tolvaptan, a selective V2R antagonist, plasma copeptin level increased 6-fold and this was associated with

a modest but significant increase in arterial carbon-dioxide and plasma acidity (Heida et al., 2021), suggestive of ventilatory inhibition by increased AVP levels in the bloodstream and enhanced stimulation of V1 receptors, which were not blocked by tolvaptan.

The inhibitory effects of AVP on the respiratory activity depend on V1aRs, as blockade of these receptors with selective antagonists completely prevents changes in pulmonary ventilation induced by systemic administration of AVP in anesthetized rats (Louwerse and Marshall, 1993; Zera et al., 2018; Brackley and Toney, 2021). Furthermore, administration of V1aR antagonists may result in the increase in pulmonary ventilation in awake dogs (Walker and Jennings, 1994). However, it should be noted that insignificant effect of V1aR blockade on pulmonary ventilation was seen in conscious rats (Walker and Jennings, 1998). Furthermore, intravenous administration of V1aR peptidergic antagonist, that does not cross the blood-brain barrier, has insignificant effects on hypoxia-induced increase in the pulmonary ventilation in conscious dogs (Overgaard et al., 1996), suggesting lack of involvement of V1aRs located in the peripheral organs or CVOs in the increase in ventilation evoked by activation of the arterial chemoreflex in this species. However, systemic administration of V1aR antagonist unmasks stimulatory effects of Ang II on the respiration in dogs (Walker and Jennings, 1995). Interestingly, oxytocin, which is structurally related to AVP and acts as a weak agonist of the V1aRs (Szczepanska-Sadowska et al., 2017), is capable of reversing the opioid-induced respiratory depression and this effect is fully unmasked by blockade of V1aRs (Brackley and Toney, 2021).

One of the plausible explanations of the inhibitory action of systemic administration of AVP on ventilation is a baroreflex-mediated inhibition of the medullary respiratory neurons (Richter and Seller, 1975; Brunner et al., 1982; Baekey et al., 2010; McMullan and Pilowsky, 2010) due to the AVP-mediated rise in arterial blood pressure. However, as mentioned above the arterial baroreflex-mediated inhibition of the pulmonary ventilation in the conscious rat is vaguely pronounced (Walker and Jennings, 1996). Thus, another mechanism is presumably at play.

Vasopressin and the Circumventricular Organs

Based on the experimental work, Jennings (1994) suggested that angiotensin II and AVP present in the bloodstream may affect ventilation *via* interaction with the CVOs. Thus, one of such mechanisms may involve stimulation of the V1aRs in the CVOs, specifically in the AP. In addition to the AP neurons responding to both AVP and the rise in blood pressure, indicating their pressure-sensitivity, there are at least two pools of neurons in the AP that respond to circulating AVP independently from the changes in arterial blood pressure, indicating their AVP-sensitivity. One pool increases and another one decreases the firing rate in response to intravenous AVP (Smith et al., 1994). Both types of responses are dependent on vasopressin V1 receptors, as their inhibition abolishes AVP-induced changes in the discharge frequency (Smith et al., 1994). Furthermore, in the medial regions of the NTS there are neurons that respond with increased or decreased firing

in response to AVP microinjections into the AP (Cai et al., 1994), indicating that the circulating neurohormone may affect activity of the NTS involved in the baro- and chemoreflexes *via* the neuronal pathway including the AP. In fact, application of AVP into the AP significantly reduces the phrenic nerve activity in mechanically ventilated, urethane anesthetized rats, and the inhibitory effect is prevented by local administration of V1aR antagonist into the AP or by pharmacological inhibition of the NTS (Yang et al., 2006). This is further supported by observations that AVP administered into the cerebral ventricles, thus allowing for interaction of the neurohormone with the CVOs, decreases respiratory rate in the anesthetized rat (Zerbe and Feuerstein, 1985). However, it should be noted that intracerebroventricular infusion of AVP in conscious macaque monkey had no effect on ventilatory parameters (Lee et al., 1985). This is contrary to the studies with electrical and pharmacological stimulation of the AP neurons in rabbits, which results in increased phrenic nerve activity (Srinivasan et al., 1993; Bongianini et al., 1994). It should be noted that electrical stimulation of the AP may trigger both excitation or inhibition of the NTS neurons in rodents (Chrobok et al., 2021). Similarly, electric stimulation of the SFO increases ventilation in rats (Ferguson et al., 1989). Although, the V1aRs are expressed in the SFO (Ostrowski et al., 1994), thus far it has not been determined how their stimulation affects the respiratory system. Available evidence and anatomical proximity to the respiratory neurons of the brainstem point to the AP as a putative CVO involved in mediating the respiratory effects of circulating AVP. However, given the limited number of studies that evaluated respiratory responses to AVP directly administered into the CVO, the role of CVOs in neural control of respiration by AVP awaits further corroboration from experiments specifically targeting AVP and the AP and/or the SFO, especially under conditions associated with activation of vasopressinergic system and in awake animals.

Vasopressin and the Carotid Bodies

Circulating AVP may also affect control of the respiratory system by binding to its receptors within the carotid body. We showed that in normotensive rats, AVP administered locally into the carotid body *via* the internal carotid artery causes a modest increase in the pulmonary ventilation without significant changes in the blood pressure (Žera et al., 2018). Further studies are needed to determine whether these effects are directly dependent on activation of the chemosensitive glomus cells that express V1aRs (Žera et al., 2018) or rather on AVP-mediated decrease in the carotid body blood flow that may sensitize the chemoreceptors (Przybylski, 1981; Brognara et al., 2021).

Respiratory Effects of Vasopressin Acting as a Neurotransmitter in the Central Nervous System

The paraventricular nucleus of the hypothalamus is the main source of the vasopressinergic innervation of the brainstem and provides projections to the discrete nuclei of the brainstem

and the spinal cord (Coote, 1995; Pyner, 2009; Coote and Spyer, 2018). Available evidence indicates that these vasopressinergic pathways may participate in the regulation of breathing.

Vasopressin and the Paraventricular Nucleus

Retrograde labeling and functional studies show neural pathways between the PVN and the NTS, the RVLM, and the presympathetic neurons of the spinal cord (Yang and Coote, 1998; Yang et al., 2002; Ferguson et al., 2008; Affleck et al., 2012). The PVN is involved in the peripheral chemoreflex, as the inhibition or disinhibition of the PVN neurons result in the respective attenuation or augmentation of the peripheral chemoreflex-evoked sympathetic and respiratory responses (Reddy et al., 2005). Furthermore, retrograde labeling studies combined with immunostaining for V1aRs show that the PVN vasopressinergic fibers terminate on neurons in the RVLM, the rVRC, the pre-Bötzinger complex, the NTS, and the phrenic nuclei (Kc et al., 2002a, 2010; Jackson et al., 2005; **Figure 1**). In a series of experiments, Kc et al. (2002b) showed that hypercapnia activates vasopressinergic neurons in the PVN and hypoxia upregulates V1aRs in the RVLM, the ventral respiratory group and in the phrenic nuclei in the spinal cord (Kc et al., 2010). They also showed that in anesthetized mechanically ventilated and vagotomized rats, disinhibition of the PVN leads to increase in respiratory activity, as estimated by means of electromyography of the diaphragm and genioglossal muscle and that this increase can be prevented by a pre-treatment of the RVLM and the rVRC with selective V1aR antagonist (Kc et al., 2010). Along with the upregulation of V1aRs, the respiratory responses were augmented by chronic intermittent hypoxia (Kc et al., 2010). The increases in respiratory activity evoked by disinhibition of the PVN were accompanied by pressor response and dependent on V1aRs (Kc and Dick, 2010; Kc et al., 2010). Together, these studies indicate that activation of the vasopressinergic PVN projections to the RVLM/rVRC increases the respiratory activity *via* V1aRs.

Vasopressin and the Ventral Lateral Medulla

In addition, microinjections of AVP into the pre-Bötzinger complex or RVLM/rVRC also increased the diaphragm's muscle activity in a V1aR-dependent manner (Kc et al., 2002a, 2010). The increases in respiratory activity evoked by local application of AVP was accompanied by pressor response (Kc et al., 2002a). Furthermore, microinjection of the V1aR antagonist into the RVLM/rVRC resulted in a decrease in respiratory activity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia (Kc et al., 2010), suggestive of tonic vasopressinergic input to the respiratory neurons. Together, these studies indicate that AVP and V1aRs in the RVLM and rVRC are involved in stimulation of the respiratory activity.

Contrary effects were reported in a series of experiments, in which AVP was microinjected into various sites of the ventrolateral medulla (VLM) caudal from the RVLM determined as a pressor region of the VLM in urethane anesthetized and vagotomized rats that were paralyzed and mechanically ventilated.

In these experiments, microinjections of AVP applied into the VLM and the rostral ventral respiratory group (rVRG) caudal from the RVLm resulted in apnoea with subsequent inhibition of the phrenic nerve discharges (Chuang et al., 2003, 2005). Although, the inhibitory effect of AVP on the respiratory activity was consistent, the pressor response was dependent on the site of injection. Applications of AVP into the lateral part of the VLM decreased the phrenic nerve activity and concomitantly elevated arterial blood pressure, whereas AVP application into the medial part of the VLM attenuated only the phrenic nerve activity, without significant effect on the arterial blood pressure (Chuang et al., 2003, 2005; Cheng et al., 2004). Microinjections of AVP into the VLM and the rVRG were also shown to inhibit activity of the hypoglossal nerve (Chuang et al., 2005). Of note, these inhibitory effects of AVP on phrenic nerve activity were diminished by hypercapnia (Chuang et al., 2003; Cheng et al., 2004) and were completely abolished by pre-treatment with a selective V1aR antagonist (Chuang et al., 2003, 2005; Cheng et al., 2004). Administration of the V1aR antagonist under resting conditions had insignificant effect on blood pressure and phrenic nerve activity in these experiments (Chuang et al., 2003, 2005; Cheng et al., 2004), suggesting lack of significant impact of vasopressinergic efferents innervating these structures on ventilation at rest. Together, these findings suggest inhibitory action of AVP on the respiratory neurons of the rVRG located caudally from the RVLm.

These two series of reports provide apparently conflicting results that may be caused by the several differences in the experimental paradigms, including use of neuromuscular blockade and atropine. In addition, mechanical ventilation with continuous positive end-expiratory pressure potentially increases plasma concentration of AVP (Annat et al., 1983; Venus et al., 1985) and this activation of AVP release depends on the hydration status of the ventilated animal (Venus et al., 1985). Thus, various levels of baseline activity of vasopressinergic system could have been present across the above studies. It should be also noted that acute experiments under anesthesia investigating the autonomic responses related to the function of the brainstem and the hypothalamus may yield conflicting results to physiological responses observed in conscious animals (Kannan et al., 1989). Nonetheless, it seems that in the more rostral part of the VLM/rVRC AVP promotes respiratory activity, whereas in the more caudal area, it inhibits respiration.

Vasopressin and the Nucleus of the Solitary Tract

The carotid body-evoked hyperglycemic response has been recognized as a contributing factor in the pathophysiology of metabolic syndrome (Conde et al., 2017) and blockade of V1aRs in the NTS was shown to attenuate increase in the plasma concentration of glucose induced by activation of the peripheral chemoreflex (Montero et al., 2006). Moreover, inhibition of the V1aRs in the NTS substantially reduces pressor and tachycardic effects of electrical stimulation of the PVN (Pittman and Franklin, 1985). Thus, it is probable that AVP in the NTS also modulates respiratory reflexes, especially those originating from the peripheral chemoreceptors. This assumption

is further substantiated by evidence indicating that almost half of the NTS neurons respond with excitation to local application of AVP in the coronal sections of the rat's brainstem (Raggenbass et al., 1989). Furthermore, in anesthetized cat, iontophoretic applications of AVP into the NTS revealed excitatory effects of the neuropeptide on the inspiratory neurons of the NTS (Henry and Sessle, 1989). However, microinjections of AVP into a discrete region of the NTS rostral to the calamus scriptorius also produced inhibition of the phrenic nerve activity in rats (Yang et al., 2006). Further investigations are required to elucidate the significance of AVP action in the NTS for regulation of respiration.

The role of endogenous AVP and vasopressinergic neurons in the regulation of the respiratory system is also indirectly supported by spectral analysis of the blood pressure variability, the heart rate variability, and selective pharmacological inhibition of AVP receptors in the central nervous system in awake rats, which suggests that vasopressin and V1aR/V1bRs are involved in enhancing ventilation and respiratory-induced blood pressure oscillations (Japundzic-Zigon, 2001; Milutinović et al., 2006). Furthermore, experiments in the Brattleboro rats lacking AVP indicate that although under resting conditions their breathing is normal, under challenging conditions of septic shock their respiratory adaptation, i.e., increase in respiration, is absent (Brackett et al., 1983), which suggests the important role of the neuropeptide in respiratory adaptation to disturbed homeostasis. This is further supported by known respiratory problems, including sleep apnoea, decreased ventilation and spells in patients with Wolfram syndrome characterized by diabetes insipidus and a lack of AVP (Thompson et al., 1989; Liciś et al., 2019).

FUTURE PERSPECTIVES

Evidence pointing to the involvement of AVP in the regulation of respiration mainly emerges from experimental studies in anesthetized animals, in which either local or systemic injections of the neuropeptide or its selective antagonists were performed. Given the complexity of AVP-induced responses including water-electrolyte, cardiovascular, metabolic and behavioral ones, novel approaches are needed to decipher the integrative role of AVP in the regulation of breathing in conscious and intact animals under physiological conditions and in disturbed homeostasis.

Targeted control and modification of the vasopressinergic neurons with optogenetics and chemogenetics have been proposed for determining the role of AVP in the regulation of physiological functions and behavior (Murphy et al., 2012; Yoshimura and Ueta, 2019). These novel techniques open prospects for dissecting vasopressinergic pathways and functional role of AVP in the regulation of the respiratory system. Recently, chemogenetic activation of endogenous AVP has been applied in figuring out the anorexigenic effects of AVP (Yoshimura et al., 2017; Sanada et al., 2021). Targeted optogenetic stimulation/inhibition of vasopressinergic neurons in the hypothalamus and extra-hypothalamic regions or

vasopressinergic efferents innervating specific brain structures have been used in various experimental models (Ishii et al., 2016; Smith et al., 2016; Hume et al., 2019; Yoshimura and Ueta, 2019; Tabarean, 2021). Moreover, successful optogenetic stimulation or inhibition of the SFO or the OVLN neurons revealed novel information on the regulation of thirst and drinking, vasopressinergic neurons and control of blood pressure (Oka et al., 2015; Zimmerman et al., 2016; Pool et al., 2020; Frazier et al., 2021). The optogenetic approach has been also proposed (Abdala et al., 2015) and successfully applied in delineating respiratory networks of the brainstem (Alsahafi et al., 2015; Basting et al., 2015; Koizumi et al., 2016; Cregg et al., 2017; Malheiros-Lima et al., 2018; Fortuna et al., 2019; Ikeda et al., 2019; Souza et al., 2020). These new technologies may help in dissecting the role of AVP in regulation of breathing by precise chemogenetic or optogenetic activation of vasopressinergic neurons projecting to the brainstem, optogenetic inhibition or stimulation of specific pools of respiratory neurons within the brainstem and CVOs, especially ones with V1aR phenotype, and targeted modulation of vasopressinergic fibers supplying them. Such experimental manipulations carried out in awake animals in physiological state and under conditions of hypo/hyperosmolality, hypovolemia, hypotension, hypoglycemia, hypoxia, exercise, or activation of renin-angiotensin system will bring to light the integrative role of AVP acting both as a neurohormone and a neurotransmitter in adjusting the respiratory system to disturbed homeostasis.

CONCLUSION

Vasopressin is one of the key hormones involved in maintaining body homeostasis and plays critical role in adjusting various body systems to changing internal and external environments. A great attention has been dedicated the role of AVP in maintaining renal water-electrolyte balance and regulation of the circulatory system. Recently, the central effects of AVP related to cognition, mood, memory, and pain have been recognized. Available evidence indicates that AVP also plays a complex role in the regulation of the respiratory

REFERENCES

- Abdala, A. P., Paton, J. F. R., and Smith, J. C. (2015). Defining inhibitory neurone function in respiratory circuits: opportunities with optogenetics? *J. Physiol.* 593, 3033–3046. doi: 10.1113/jphysiol.2014.280610
- Affleck, V. S., Coote, J. H., and Pyner, S. (2012). The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 219, 48–61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.070
- Aguilera, G., and Rabadan-Diehl, C. (2000). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul. Pept.* 96, 23–29. doi: 10.1016/S0167-0115(00)00196-8
- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., and Chen, J. (2008). The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog. Brain Res.* 170, 29–39. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00403-2
- Alsahafi, Z., Dickson, C. T., and Pagliardini, S. (2015). Optogenetic excitation of preBötzing complex neurons potently drives inspiratory activity in vivo. *J. Physiol.* 593, 3673–3692. doi: 10.1113/JP270471
- Anderson, J. W., Sarda, I. R., and Jennings, D. B. (1990). Acute changes in osmolality and renin and respiratory control of arterial PCO₂ and [H⁺]. *Respir. Physiol.* 80, 1–16. doi: 10.1016/0034-5687(90)90002-G
- Anderson, J. W., Smith, P. M., and Ferguson, A. V. (2001). Subformal organ neurons projecting to paraventricular nucleus: whole-cell properties. *Brain Res.* 921, 78–85. doi: 10.1016/S0006-8993(01)03093-1
- Anderson, J. W., Washburn, D. L., and Ferguson, A. V. (2000). Intrinsic osmosensitivity of subformal organ neurons. *Neuroscience* 100, 539–547. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00313-4
- Annat, G., Viale, J. P., Bui Xuan, B., Hadj Aissa, O., Benzoni, D., Vincent, M., et al. (1983). Effect of PEEP ventilation on renal function, plasma renin, aldosterone, neurophysins and urinary ADH, and prostaglandins. *Anesthesiology* 58, 136–141. doi: 10.1097/0000542-198302000-00006

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP designed the study, prepared the figure, and drafted the initial version of the manuscript. JP designed the study and revised the manuscript. AC-J and ES-S revised the manuscript. TŻ conceived the idea of the review, designed the study, prepared the figure, and revised and edited the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The study was funded by Diamond Grant from the Polish Ministry of Education and Science, grant number DI2018 020648, awarded to MP. The study was carried out with the use of CePT infrastructure financed by the European Union – the European Regional Development Fund within the Operational Programme “Innovative economy” for 2007–2013.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aleksandra Pelc for help with graphical preparation of the figure.

- Aoki, R., Yokoyama, U., Ichikawa, Y., Taguri, M., Kumagaya, S., Ishiwata, R., et al. (2014). Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. *Cardiovasc. Res.* 104, 326–336. doi: 10.1093/cvr/cvu199
- Ara-Somohano, C., Bonadona, A., Carpentier, F., Pavese, P., Vesin, A., Hamidfar-Roy, R., et al. (2017). Evaluation of eight biomarkers to predict short-term mortality in patients with acute severe dyspnea. *Minerva Anestesiol.* 83, 824–835. doi: 10.23736/S0375-9393.17.10882-5
- Arnauld, E., Czernichow, P., Fumoux, F., and Vincent, J. D. (1977). The effects of hypotension and hypovolaemia on the liberation of vasopressin during haemorrhage in the unanaesthetized monkey (*Macaca mulatta*). *Pflugers Arch.* 371, 193–200. doi: 10.1007/BF00586258
- Backey, D. M., Molkov, Y. I., Paton, J. F. R., Rybak, I. A., and Dick, T. E. (2010). Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 135–145. doi: 10.1016/j.resp.2010.09.006
- Baker, M. A., and Dawson, D. D. (1985). Inhibition of thermal panting by intracarotid infusion of hypertonic saline in dogs. *Am. J. Physiol.* 249, R787–R791. doi: 10.1152/ajpregu.1985.249.6.R787
- Bankir, L., Bichet, D. G., and Morgenthaler, N. G. (2017). Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *J. Intern. Med.* 282, 284–297. doi: 10.1111/joim.12645
- Basting, T. M., Burke, P. G. R., Kanbar, R., Viar, K. E., Stornetta, D. S., Stornetta, R. L., et al. (2015). Hypoxia silences retrotrapezoid nucleus respiratory chemoreceptors via alkalosis. *J. Neurosci.* 35, 527–543. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2923-14.2015
- Baylis, P. H. (1987). Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 253, R671–R678. doi: 10.1152/ajpregu.1987.253.5.R671
- Baylis, P. H., and Robertson, G. L. (1980). Plasma vasopressin response to hypertonic saline infusion to assess posterior pituitary function. *J. R. Soc. Med.* 73, 255–260. doi: 10.1177/014107688007300408
- Baylis, P. H., Zerbe, R. L., and Robertson, G. L. (1981). Arginine vasopressin response to insulin-induced hypoglycemia in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 935–940. doi: 10.1210/jcem-53-5-935
- Berkenbosch, F., De Goeij, D. C., and Tilders, F. J. (1989). Hypoglycemia enhances turnover of corticotropin-releasing factor and of vasopressin in the zona externa of the rat median eminence. *Endocrinology* 125, 28–34. doi: 10.1210/endo-125-1-28
- Bessho, T., Murata, Y., Ninomiya, Y., Ibara, S., Yamamoto, T., Miyake, Y., et al. (1997). Effect of arginine vasopressin on breathing movements of chronically instrumented fetal lambs. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 76, 107–111. doi: 10.3109/00016349709050063
- Bhoola, K. D., Collier, H. O., Schachter, M., and Shorley, P. G. (1962). Actions of some peptides on bronchial muscle. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 19, 190–197. doi: 10.1111/j.1476-5381.1962.tb01439.x
- Bichet, D. G. (2019). Regulation of thirst and vasopressin release. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 359–373. doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114556
- Bin-Jalil, I., Maskell, P. D., and Kumar, P. (2004). Indirect sensing of insulin-induced hypoglycemia by the carotid body in the rat. *J. Physiol.* 556, 255–266. doi: 10.1113/jphysiol.2003.058321
- Bongianni, F., Mutolo, D., Srinivasan, M., Staderini, G., Baccari, M. C., Calamai, F., et al. (1994). Gastric relaxation in response to chemical stimulation of the area postrema in the rabbit. *Brain Res.* 646, 307–311. doi: 10.1016/0006-8993(94)90095-7
- Brackett, D. J., Schaefer, C. F., and Wilson, M. F. (1983). The role of vasopressin in the maintenance of cardiovascular function during early endotoxin shock. *Adv. Shock Res.* 9, 147–156.
- Brackley, A. D., and Toney, G. M. (2021). Oxytocin receptor activation rescues opioid-induced respiratory depression by systemic fentanyl in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 378, 96–107. doi: 10.1124/jpet.121.000535
- Bristow, J. D., Brown, E. B. J., Cunningham, D. J., Goode, R. C., Howson, M. G., and Sleight, P. (1971). The effects of hypercapnia, hypoxia and ventilation on the baroreflex regulation of the pulse interval. *J. Physiol.* 216, 281–302. doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009525
- Brogna, F., Felippe, I. S. A., Salgado, H. C., and Paton, J. F. R. (2021). Autonomic innervation of the carotid body as a determinant of its sensitivity: implications for cardiovascular physiology and pathology. *Cardiovasc. Res.* 117, 1015–1032. doi: 10.1093/cvr/cvaa250
- Brunner, M. J., Sussman, M. S., Greene, A. S., Kallman, C. H., and Shoukas, A. A. (1982). Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration. *Circ. Res.* 51, 624–636. doi: 10.1161/01.RES.51.5.624
- Buijs, R. M. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192, 423–435. doi: 10.1007/BF00212323
- Bunag, R. D., Page, I. H., and McCubbin, J. W. (1967). Inhibition of renin release by vasopressin and angiotensin*. *Cardiovasc. Res.* 1, 67–73. doi: 10.1093/cvr/1.1.67
- Cai, Y., Hay, M., and Bishop, V. S. (1994). Stimulation of area postrema by vasopressin and angiotensin II modulates neuronal activity in the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 647, 242–248. doi: 10.1016/0006-8993(94)91323-4
- Caraty, A., Grino, M., Locatelli, A., Guillaume, V., Boudouresque, F., Conte-Devolx, B., et al. (1990). Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *J. Clin. Invest.* 85, 1716–1721. doi: 10.1172/JCI14626
- Cheng, M.-T., Chuang, C.-W., Lin, J.-T., and Hwang, J.-C. (2004). Cardiopulmonary response to vasopressin-induced activation on V1A receptors in the lateral ventrolateral medulla in the rat. *Chin. J. Phys.* 47, 31–42.
- Chiodera, P., Volpi, R., Capretti, L., Speroni, G., Marcato, A., Rossi, G., et al. (1992). Hypoglycemia-induced arginine vasopressin and oxytocin release is mediated by glucoreceptors located inside the blood-brain barrier. *Neuroendocrinology* 55, 655–659. doi: 10.1159/000126185
- Choi, K.-S., Cho, Y., Jang, B.-H., Kim, W., Ahn, C., Lim, T. H., et al. (2017). Prognostic role of copeptin after traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Am. J. Emerg. Med.* 35, 1444–1450. doi: 10.1016/j.ajem.2017.04.038
- Chrobok, L., Wojcik, M., Klich, J. D., Pradel, K., Lewandowski, M. H., and Piggins, H. D. (2021). Phasic neuronal firing in the rodent nucleus of the solitary tract ex vivo. *Front. Physiol.* 12:638695. doi: 10.3389/fphys.2021.638695
- Chuang, C.-W., Cheng, M.-T., Lin, J.-T., Hsien, H.-Y., Hung, H.-Y., and Hwang, J.-C. (2003). Arginine vasopressin produces inhibition upon respiration without pressor effect in the rat. *Chin. J. Phys.* 46, 71–81.
- Chuang, C.-W., Cheng, M.-T., Yang, S.-J., and Hwang, J.-C. (2005). Activation of ventrolateral medulla neurons by arginine vasopressin via V1A receptors produces inhibition on respiratory-related hypoglossal nerve discharge in the rat. *Chin. J. Phys.* 48, 144–154.
- Colucci, G., Stutz, M., Rochat, S., Conte, T., Pavicic, M., Reusser, M., et al. (2014). The effect of desmopressin on platelet function: a selective enhancement of procoagulant COAT platelets in patients with primary platelet function defects. *Blood* 123, 1905–1916. doi: 10.1182/blood-2013-04-497123
- Conde, S. V., Ribeiro, M. J., Melo, B. E., Guarino, M. P., and Sacramento, J. F. (2017). Insulin resistance: a new consequence of altered carotid body chemoreflex? *J. Physiol.* 595, 31–41. doi: 10.1113/JP271684
- Convertino, V. A., Iye, K. R., Koons, N. J., and Joyner, M. J. (2019). Physiological comparison of hemorrhagic shock and VO(2)max: a conceptual framework for defining the limitation of oxygen delivery. *Exp. Biol. Med.* 244, 690–701. doi: 10.1177/1535370219846425
- Convertino, V. A., Rickards, C. A., Lurie, K. G., and Ryan, K. L. (2009). Hyperventilation in response to progressive reduction in central blood volume to near syncope. *Aviat. Space Environ. Med.* 80, 1012–1017. doi: 10.3357/ASEM.2598.2009
- Coote, J. H. (1995). Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol. Signals* 4, 142–149. doi: 10.1159/000109434
- Coote, J. H., and Spyer, K. M. (2018). Central control of autonomic function. *Brain Neurosci. Adv.* 2:2398212818812012. doi: 10.1177/2398212818812012
- Corbani, M., Marir, R., Trueba, M., Chafai, M., Vincent, A., Borie, A. M., et al. (2018). Neuroanatomical distribution and function of the vasopressin V(1B) receptor in the rat brain deciphered using specific fluorescent ligands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258, 15–32. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.10.011
- Cowie, M. R., Linz, D., Redline, S., Somers, V. K., and Simonds, A. K. (2021). Sleep disordered breathing and cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 78, 608–624. doi: 10.1016/j.jacc.2021.05.048
- Cregg, J. M., Chu, K. A., Dick, T. E., Landmesser, L. T., and Silver, J. (2017). Phasic inhibition as a mechanism for generation of rapid respiratory rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 12815–12820. doi: 10.1073/pnas.1711536114

- Currigan, D. A., Hughes, R. J. A., Wright, C. E., Angus, J. A., and Soeding, P. F. (2014). Vasoconstrictor responses to vasopressor agents in human pulmonary and radial arteries: an in vitro study. *Anesthesiology* 121, 930–936. doi: 10.1097/ALN.0000000000000430
- da Silva, E. F., Bassi, M., Menani, J. V., Colombari, D. S. A., Zoccal, D. B., Pedrino, G. R., et al. (2019). Carotid bodies contribute to sympathoexcitation induced by acute salt overload. *Exp. Physiol.* 104, 15–27. doi: 10.1113/EP087110
- Doerschug, K. C., Delsing, A. S., Schmidt, G. A., and Ashare, A. (2010). Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Crit. Care* 14:R24. doi: 10.1186/cc8887
- D'Silva, J. L., Gill, D., and Mendel, D. (1966). The effects of acute haemorrhage on respiration in the cat. *J. Physiol.* 187, 369–377. doi: 10.1113/jphysiol.1966.sp008096
- Dumais, K. M., and Veinema, A. H. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 40, 1–23. doi: 10.1016/j.yfrne.2015.04.003
- Düngen, H.-D., Tscholl, V., Obradovic, D., Radenovic, S., Matic, D., Musial Bright, L., et al. (2018). Prognostic performance of serial in-hospital measurements of copeptin and multiple novel biomarkers among patients with worsening heart failure: results from the MOLITOR study. *ESC Hear. Fail.* 5, 288–296. doi: 10.1002/ehf2.12231
- Enomoto, M., Pan, J., Shifrin, Y., and Belik, J. (2014). Age dependency of vasopressin pulmonary vasodilatory effect in rats. *Pediatr. Res.* 75, 315–321. doi: 10.1038/pr.2013.221
- Evers, K. S., Hügli, M., Fouzas, S., Kasser, S., Pohl, C., Stoecklin, B., et al. (2020). Serum neurofilament levels in children with febrile seizures and in controls. *Front. Neurosci.* 14:579958. doi: 10.3389/fnins.2020.579958
- Ferguson, A. V., Beckmann, L. M., and Fisher, J. T. (1989). Effects of subfornical organ stimulation on respiration in the anesthetized rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1097–1101. doi: 10.1139/y89-173
- Ferguson, A. V., Latchford, K. J., and Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus—a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 717–727. doi: 10.1517/14728222.12.6.717
- Finley, J. C., and Katz, D. M. (1992). The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572, 108–116. doi: 10.1016/0006-8993(92)90458-L
- Flór, A. F. L., de Brito Alves, J. L., França-Silva, M. S., Balarini, C. M., Elias, L. L. K., Ruginsk, S. G., et al. (2018). Glial cells are involved in ANG-II-induced vasopressin release and sodium intake in awake rats. *Front. Physiol.* 9:430. doi: 10.3389/fphys.2018.00430
- Fortuna, M. G., Kügler, S., and Hülsmann, S. (2019). Probing the function of glycinergic neurons in the mouse respiratory network using optogenetics. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265, 141–152. doi: 10.1016/j.resp.2018.10.008
- Frazier, C. J., Harden, S. W., Alleyne, A. R., Mohammed, M., Sheng, W., Smith, J. A., et al. (2021). An angiotensin-responsive connection from the lamina terminalis to the paraventricular nucleus of the hypothalamus evokes vasopressin secretion to increase blood pressure in mice. *J. Neurosci.* 41, 1429–1442. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1600-20.2020
- Frier, B. M. (2014). Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 711–722. doi: 10.1038/nrendo.2014.170
- Fyhrquist, F., Eriksson, L., and Wallenius, M. (1979). Plasma vasopressin in conscious goats after cerebroventricular infusions of angiotensins, sodium chloride, and fructose. *Endocrinology* 104, 1091–1095. doi: 10.1210/endo-104-4-1091
- Fyhrquist, F., Tikkanen, I., and Linkola, J. (1981). Plasma vasopressin concentration and renin in the rat: effect of hydration and hemorrhage. *Acta Physiol. Scand.* 113, 507–510. doi: 10.1111/j.1748-1716.1981.tb06929.x
- Gallego, R., and Belmonte, C. (1979). The effects of blood osmolality changes on cat carotid body chemoreceptors in vivo. *Pflugers Arch.* 380, 53–58. doi: 10.1007/BF00582612
- Gonzalez-Luque, A., Lage, M., Dhariwal, A. P., and Yates, F. E. (1970). Stimulation of corticotropin release by corticotropin-releasing factor (CRF) or by vasopressin following intrapituitary infusions in unanesthetized dogs: inhibition of the responses by dexamethasone. *Endocrinology* 86, 1134–1142. doi: 10.1210/endo-86-5-1134
- Gregoriano, C., Molitor, A., Haag, E., Kutz, A., Koch, D., Haubitz, S., et al. (2021). Activation of vasopressin system during COVID-19 is associated with adverse clinical outcomes: an observational study. *J. Endocr. Soc.* 5:bvab045. doi: 10.1210/jendso/bvab045
- Hanley, D. F., Wilson, D. A., Feldman, M. A., and Traystman, R. J. (1988). Peripheral chemoreceptor control of neurohypophysial blood flow. *Am. J. Physiol.* 254, H742–H750. doi: 10.1152/ajpheart.1988.254.4.H742
- Hasser, E. M., and Bishop, V. S. (1990). Reflex effect of vasopressin after blockade of V1 receptors in the area postrema. *Circ. Res.* 67, 265–271. doi: 10.1161/01.RES.67.2.265
- Heida, J. E., Gansevoort, R. T., and Meijer, E. (2021). Acid-base homeostasis during vasopressin V2 receptor antagonist treatment in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Kidney Int. Rep.* 6, 839–841. doi: 10.1016/j.ekir.2020.12.021
- Hellenkamp, K., Pruszczyk, P., Jiménez, D., Wyzga, A., Barrios, D., Czurzyński, M., et al. (2018). Prognostic impact of copeptin in pulmonary embolism: a multicentre validation study. *Eur. Respir. J.* 51:1702037. doi: 10.1183/13993003.02037-2017
- Henry, J. L., and Sessle, B. J. (1989). Vasopressin and oxytocin express excitatory effects on respiratory and respiration-related neurones in the nuclei of the tractus solitarius in the cat. *Brain Res.* 491, 150–155. doi: 10.1016/0006-8993(89)90097-8
- Hew-Butler, T., Hoffman, M. D., Stuempfle, K. J., Rogers, I. R., Morgenthaler, N. G., and Verbalis, J. G. (2011). Changes in copeptin and bioactive vasopressin in runners with and without hyponatremia. *Clin. J. Sport Med.* 21, 211–217. doi: 10.1097/JSM.0b013e31821a62c2
- Hew-Butler, T., Loi, V., Pani, A., and Rosner, M. H. (2017). Exercise-associated hyponatremia: 2017 update. *Front. Med.* 4:21. doi: 10.3389/fmed.2017.00021
- Hindmarch, C. C. T., Fry, M., Smith, P. M., Yao, S. T., Hazell, G. G. J., Lolait, S. J., et al. (2011). The transcriptome of the medullary area postrema: the thirsty rat, the hungry rat and the hypertensive rat. *Exp. Physiol.* 96, 495–504. doi: 10.1113/expphysiol.2010.056515
- Hirasawa, A., Hashimoto, K., and Tsujimoto, G. (1994). Distribution and developmental change of vasopressin V1A and V2 receptor mRNA in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 267, 71–75. doi: 10.1016/0922-4106(94)90226-7
- Horstman, L. L., Valle-Riestra, B. J., Jy, W., Wang, F., Mao, W., and Ahn, Y. S. (1995). Desmopressin (DDAVP) acts on platelets to generate platelet microparticles and enhanced procoagulant activity. *Thromb. Res.* 79, 163–174. doi: 10.1016/0049-3848(95)00102-W
- Hume, C., Allchorne, A., Grinevich, V., Leng, G., and Ludwig, M. (2019). Effects of optogenetic stimulation of vasopressinergic retinal afferents on suprachiasmatic neurones. *J. Neuroendocrinol.* 31:e12806. doi: 10.1111/jne.12806
- Hupf, H., Grimm, D., Riegger, G. A., and Schunkert, H. (1999). Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ. Res.* 84, 365–370. doi: 10.1161/01.RES.84.3.365
- Ikedo, K., Igarashi, H., Yawo, H., Kobayashi, K., Arata, S., Kawakami, K., et al. (2019). Optogenetic analysis of respiratory neuronal networks in the ventral medulla of neonatal rats producing channelrhodopsin in Phox2b-positive cells. *Pflugers Arch.* 471, 1419–1439. doi: 10.1007/s00424-019-02317-9
- Imms, F. J., and Mehta, D. (1989). Respiratory responses to sustained isometric muscle contractions in man: the effect of muscle mass. *J. Physiol.* 419, 1–14. doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017857
- Inder, W. J., Hellemans, J., Swanney, M. P., Prickett, T. C., and Donald, R. A. (1998). Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J. Appl. Physiol.* 85, 835–841. doi: 10.1152/jappl.1998.85.3.835
- Iovino, M., Guastamacchia, E., Giagulli, V. A., Fiore, G., Licchelli, B., Iovino, E., et al. (2013). Role of central and peripheral chemoreceptors in vasopressin secretion control. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 13, 250–255. doi: 10.2174/18715303113136660042
- Ishii, M., Hashimoto, H., Ohkubo, J.-I., Ohbuchi, T., Saito, T., Maruyama, T., et al. (2016). Transgenic approach to express the channelrhodopsin 2 gene in arginine vasopressin neurons of rats. *Neurosci. Lett.* 630, 194–198. doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.001
- Jackson, K., Silva, H. M. V., Zhang, W., Michelini, L. C., and Stern, J. E. (2005). Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurophysiol.* 94, 3211–3220. doi: 10.1152/jn.00277.2005
- Japundzic-Zigon, N. (2001). Effects of nonpeptide V1a and V2 antagonists on blood pressure fast oscillations in conscious rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 23, 277–292. doi: 10.1081/CEH-100102667

- Japundžić-Žigon, N., Lozić, M., Šarenac, O., and Murphy, D. (2020). Vasopressin & oxytocin in control of the cardiovascular system: an updated review. *Curr. Neuropharmacol.* 18, 14–33. doi: 10.2174/1570159X17666190717150501
- Jennings, D. B. (1994). The physicochemistry of [H+] and respiratory control: roles of PCO₂, strong ions, and their hormonal regulators. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72, 1499–1512. doi: 10.1139/y94-216
- Jeon, Y., Ryu, J. H., Lim, Y. J., Kim, C. S., Bahk, J.-H., Yoon, S. Z., et al. (2006). Comparative hemodynamic effects of vasopressin and norepinephrine after milrinone-induced hypotension in off-pump coronary artery bypass surgical patients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 29, 952–956. doi: 10.1016/j.ejcts.2006.02.032
- Johnson, B. D., Saupe, K. W., and Dempsey, J. A. (1992). Mechanical constraints on exercise hyperpnea in endurance athletes. *J. Appl. Physiol.* 73, 874–886. doi: 10.1152/jappl.1992.73.3.874
- Johnson, B. D., van Helmond, N., Curry, T. B., van Buskirk, C. M., Convertino, V. A., and Joyner, M. J. (2014). Reductions in central venous pressure by lower body negative pressure or blood loss elicit similar hemodynamic responses. *J. Appl. Physiol.* 117, 131–141. doi: 10.1152/japplphysiol.00070.2014
- Jurzak, M., and Schmid, H. A. (1998). Vasopressin and sensory circumventricular organs. *Prog. Brain Res.* 119, 221–245. doi: 10.1016/s0079-6123(08)61572-1
- Kakall, Z. M., Cohen, E. M., Farnham, M. M. J., Kim, S. J., Nedoboy, P. E., and Pilowsky, P. M. (2019). Integration of hindbrain and carotid body mechanisms that control the autonomic response to cardiorespiratory and glucoprivic insults. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265, 83–91. doi: 10.1016/j.resp.2018.08.008
- Kannan, H., Hayashida, Y., and Yamashita, H. (1989). Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am. J. Physiol.* 256, R1325–R1330. doi: 10.1152/ajpregu.1989.256.6.R1325
- Kasserra, C. E., and Jones, D. R. (1993). Hyperosmolality alters the ventilatory response to acute hypercapnia and hypoxia. *Respir. Physiol.* 94, 189–203. doi: 10.1016/0034-5687(93)90047-E
- Kasserra, C. E., Jones, D. R., and Hughes, M. R. (1991). Acid-base disturbance and ventilatory response to changes in plasma osmolality in Pekin ducks. *Respir. Physiol.* 85, 383–393. doi: 10.1016/0034-5687(91)90076-U
- Kc, P., Balan, K. V., Tjoe, S. S., Martin, R. J., Lamanna, J. C., Haxhiu, M. A., et al. (2010). Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J. Physiol.* 588, 725–740. doi: 10.1113/jphysiol.2009.184580
- Kc, P., and Dick, T. E. (2010). Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 55–64. doi: 10.1016/j.resp.2010.08.001
- Kc, P., Haxhiu, M. A., Tolentino-Silva, F. P., Wu, M., Trouth, C. O., and Mack, S. O. (2002a). Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 133, 75–88. doi: 10.1016/s1569-9048(02)00131-3
- Kc, P., Haxhiu, M. A., Trouth, C. O., Balan, K. V., Anderson, W. A., and Mack, S. O. (2002b). CO₂-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin-containing neurons. *Respir. Physiol.* 129, 289–296. doi: 10.1016/s0034-5687(01)00321-8
- Kc, P., Karibi-Ikiriko, A., Rust, C. F., Jayam-Trouth, A., and Haxhiu, M. A. (2006). Phenotypic traits of the hypothalamic PVN cells innervating airway-related vagal preganglionic neurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 319–330. doi: 10.1016/j.resp.2006.01.006
- Knox, A. J., Britton, J. R., and Tattersfield, A. E. (1989). Effect of vasopressin on bronchial reactivity to histamine. *Clin. Sci.* 77, 467–471. doi: 10.1042/cs0770467
- Koizumi, H., Mosher, B., Tariq, M. F., Zhang, R., Koshiya, N., and Smith, J. C. (2016). Voltage-dependent rhythmogenic property of respiratory pre-bötzing complex glutamatergic, Dbx1-derived, and somatostatin-expressing neuron populations revealed by graded optogenetic inhibition. *eNeuro* 3:ENEURO.0081–16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0081-16.2016
- Kolditz, M., Halank, M., Schulte-Hubbert, B., Bergmann, S., Albrecht, S., and Hoffken, G. (2012). Copeptin predicts clinical deterioration and persistent instability in community-acquired pneumonia. *Respir. Med.* 106, 1320–1328. doi: 10.1016/j.rmed.2012.06.008
- Koller, E. A., Bührer, A., Felder, L., Schopen, M., and Vallotton, M. B. (1991). Altitude diuresis: endocrine and renal responses to acute hypoxia of acclimatized and non-acclimatized subjects. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 62, 228–234. doi: 10.1007/BF00643747
- Koshimizu, T., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroshima, M., Nonoguchi, H., and Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* 92, 1813–1864. doi: 10.1152/physrev.00035.2011
- Koyama, Y., Coker, R. H., Stone, E. E., Lacy, D. B., Jabbour, K., Williams, P. E., et al. (2000). Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* 49, 1434–1442. doi: 10.2337/diabetes.49.9.1434
- Kruger, S., Ewig, S., Giersdorf, S., Hartmann, O., Suttorp, N., and Welte, T. (2010). Cardiovascular and inflammatory biomarkers to predict short- and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German competence network, CAPNETZ. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1426–1434. doi: 10.1164/rccm.201003-0415OC
- Kuluöztürk, M., İn, E., Telo, S., Karabulut, E., and Geçkil, A. A. (2021). Efficacy of copeptin in distinguishing COVID-19 pneumonia from community-acquired pneumonia. *J. Med. Virol.* 93, 3113–3121. doi: 10.1002/jmv.26870
- Kumar, P., and Prabhakar, N. R. (2012). Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr. Physiol.* 2, 141–219. doi: 10.1002/cphy.c100069
- Landgraf, R., and Neumann, I. D. (2004). Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 150–176. doi: 10.1016/j.yfrne.2004.05.001
- Lang, F., Busch, G. L., Zempel, G., Ditlevsen, J., Hoch, M., Emerich, U., et al. (1995). Ca²⁺ entry and vasoconstriction during osmotic swelling of vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 431, 253–258. doi: 10.1007/BF00410198
- Launay, J. M., Vittet, D., Vidaud, M., Rondot, A., Mathieu, M. N., Lalau-Keraly, C., et al. (1987). V1a-vasopressin specific receptors on human platelets: potentiation by ADP and epinephrine and evidence for homologous down-regulation. *Thromb. Res.* 45, 323–331. doi: 10.1016/0049-3848(87)90221-0
- Lee, T. E., Mora, F., and Myers, R. D. (1985). Effect of intracerebroventricular vasopressin on body temperature and endotoxin fever of macaque monkey. *Am. J. Physiol.* 248, R674–R678. doi: 10.1152/ajpregu.1985.248.6.R674
- Lee, A. K., Tse, F. W., and Tse, A. (2015). Arginine vasopressin potentiates the stimulatory action of CRH on pituitary corticotropes via a protein kinase C-dependent reduction of the background TREK-1 current. *Endocrinology* 156, 3661–3672. doi: 10.1210/en.2015-1293
- Levy, M. N. (1966). Effect of carotid chemoreceptor stimulation on plasma antidiuretic hormone titer. *Am. J. Physiol.* 210, 157–161. doi: 10.1152/ajplegacy.1966.210.1.157
- Licis, A., Davis, G., Eisenstein, S. A., Lugar, H. M., and Hershey, T. (2019). Sleep disturbances in Wolfman syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 14:188. doi: 10.1186/s13023-019-1160-z
- Lin, Q., Fu, F., Chen, H., and Zhu, B. (2012). Copeptin in the assessment of acute lung injury and cardiogenic pulmonary edema. *Respir. Med.* 106, 1268–1277. doi: 10.1016/j.rmed.2012.05.010
- Lipski, J., McAllen, R. M., and Spyer, K. M. (1977). The carotid chemoreceptor input to the respiratory neurones of the nucleus of tractus solitarius. *J. Physiol.* 269, 797–810. doi: 10.1113/jphysiol.1977.sp011930
- Lipski, J., McAllen, R. M., and Trzebski, A. (1976). Carotid baroreceptor and chemoreceptor inputs onto single medullary neurones. *Brain Res.* 107, 132–136. doi: 10.1016/0006-8993(76)90101-3
- Louwerse, A. M., and Marshall, J. M. (1993). The role of vasopressin in the regional vascular responses evoked in the spontaneously breathing rat by systemic hypoxia. *J. Physiol.* 470, 463–472. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019869
- Lüning, H., Mangelus, C., Carlström, E., Nilson, F., and Börjesson, M. (2019). Incidence and characteristics of severe exercise-associated collapse at the world's largest half-marathon. *PLoS One* 14:e0217465. doi: 10.1371/journal.pone.0217465
- Maisel, A., Xue, Y., Shah, K., Mueller, C., Nowak, R., Peacock, W. F., et al. (2011). Increased 90-day mortality in patients with acute heart failure with elevated copeptin: secondary results from the biomarkers in acute heart failure (BACH) study. *Circ. Heart Fail.* 4, 613–620. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.960096
- Malheiros-Lima, M. R., Totola, L. T., Lana, M. V. G., Strauss, B. E., Takakura, A. C., and Moreira, T. S. (2018). Breathing responses produced by optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons are dependent on the connection

- with preBötzing complex in rats. *Pflugers Arch.* 470, 1659–1672. doi: 10.1007/s00424-018-2186-0
- Marshall, J. M. (1994). Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.* 74, 543–594. doi: 10.1152/physrev.1994.74.3.543
- Matsuoka, T., Saiki, C., and Mortola, J. P. (1994). Metabolic and ventilatory responses to anemic hypoxia in conscious rats. *J. Appl. Physiol.* 77, 1067–1072. doi: 10.1152/jappl.1994.77.3.1067
- McKinley, M. J., Gerstberger, R., Mathai, M. L., Oldfield, B. J., and Schmid, H. (1999). The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J. Clin. Neurosci.* 6, 289–301. doi: 10.1054/jocn.1998.0056
- McMullan, S., Dick, T. E., Farnham, M. M. J., and Pilowsky, P. M. (2009). Effects of baroreceptor activation on respiratory variability in rat. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 166, 80–86. doi: 10.1016/j.resp.2009.02.006
- McMullan, S., and Pilowsky, P. M. (2010). The effects of baroreceptor stimulation on central respiratory drive: a review. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 37–42. doi: 10.1016/j.resp.2010.07.009
- Melo, M. R., Gasparini, S., Silva, E. F., Karlen-Amarante, M., Speretta, G. F., Lauer, M. R., et al. (2020). Renovascular hypertension elevates pulmonary ventilation in rats by carotid body-dependent mechanisms. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 318, R730–R742. doi: 10.1152/ajpregu.00134.2019
- Milutinović, S., Murphy, D., and Japundžić-Zigon, N. (2006). The role of central vasopressin receptors in the modulation of autonomic cardiovascular controls: a spectral analysis study. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 291, R1579–R1591. doi: 10.1152/ajpregu.00764.2005
- Moen, V., Brudin, L., Rundgren, M., and Irestedt, L. (2014). Osmolality and respiratory regulation in humans: respiratory compensation for hyperchloremic metabolic acidosis is absent after infusion of hypertonic saline in healthy volunteers. *Anesth. Analg.* 119, 956–964. doi: 10.1213/ANE.0000000000000404
- Mohan, S., Moffett, R. C., Thomas, K. G., Irwin, N., and Flatt, P. R. (2019). Vasopressin receptors in islets enhance glucose tolerance, pancreatic beta-cell secretory function, proliferation and survival. *Biochimie* 158, 191–198. doi: 10.1016/j.biochi.2019.01.008
- Molnár, Z., Petheo, G. L., Fülöp, C., and Spät, A. (2003). Effects of osmotic changes on the chemoreceptor cell of rat carotid body. *J. Physiol.* 546, 471–481. doi: 10.1113/jphysiol.2002.024125
- Montero, S. A., Yarkov, A., Lemus, M., de Alvarez-Buylla, E. R., and Alvarez-Buylla, R. (2006). Carotid chemoreceptor reflex modulation by arginine-vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius in rats. *Arch. Med. Res.* 37, 709–716. doi: 10.1016/j.arcmed.2006.03.001
- Morgenthaler, N. G., Struck, J., Alonso, C., and Bergmann, A. (2006). Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin. Chem.* 52, 112–119. doi: 10.1373/clinchem.2005.060038
- Muller, B., Morgenthaler, N., Stolz, D., Schuetz, P., Muller, C., Bingisser, R., et al. (2007). Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Invest.* 37, 145–152. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01762.x
- Murphy, D., Konopacka, A., Hindmarch, C., Paton, J. F. R., Sweedler, J. V., Gillette, M. U., et al. (2012). The hypothalamic-neurohypophyseal system: from genome to physiology. *J. Neuroendocrinol.* 24, 539–553. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02241.x
- Nakamura, K., Velho, G., and Bouby, N. (2017). Vasopressin and metabolic disorders: translation from experimental models to clinical use. *J. Intern. Med.* 282, 298–309. doi: 10.1111/joim.12649
- Nickel, C. H., Bingisser, R., and Morgenthaler, N. G. (2012). The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department. *BMC Med.* 10:7. doi: 10.1186/1741-7015-10-7
- Nickel, N., Lichtinghagen, R., Golpon, H., Olsson, K. M., Brand, K., Welte, T., et al. (2013). Circulating levels of copeptin predict outcome in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 14:130. doi: 10.1186/1465-9921-14-130
- Norsk, P. (1989). Influence of low- and high-pressure baroreflexes on vasopressin release in humans. *Acta Endocrinol.* 121, 3–27. doi: 10.1530/acta.0.1210003-a
- Nunn, N., Womack, M., Dart, C., and Barrett-Jolley, R. (2011). Function and pharmacology of spinally-projecting sympathetic pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 262–277. doi: 10.2174/157015911795596531
- Nussey, S. S., Prysor-Jones, R. A., Taylor, A., Ang, V. T., and Jenkins, J. S. (1987). Arginine vasopressin and oxytocin in the bovine adrenal gland. *J. Endocrinol.* 115, 141–149. doi: 10.1677/joe.0.1150141
- O'Connor, M. D., and Jennings, D. B. (2001). Respiratory and metabolic effects of decreased osmolality in conscious rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 768–778. doi: 10.1139/y01-056
- Ohtake, P. J., and Jennings, D. B. (1992). Ventilation is stimulated by small reductions in arterial pressure in the awake dog. *J. Appl. Physiol.* 73, 1549–1557. doi: 10.1152/jappl.1992.73.4.1549
- Ohtake, P. J., and Jennings, D. B. (1993). Angiotensin II stimulates respiration in awake dogs and antagonizes baroreceptor inhibition. *Respir. Physiol.* 91, 335–351. doi: 10.1016/0034-5687(93)90110-V
- Oka, Y., Ye, M., and Zuker, C. S. (2015). Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain. *Nature* 520, 349–352. doi: 10.1038/nature14108
- Ostrowski, N. L., Lolait, S. J., and Young, W. S. (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* 135, 1511–1528. doi: 10.1210/endo.135.4.7925112
- Overgaard, C. B., Walker, J. K., and Jennings, D. B. (1996). Respiration during acute hypoxia: angiotensin- and vasopressin-receptor blocks. *J. Appl. Physiol.* 80, 810–817. doi: 10.1152/jappl.1996.80.3.810
- Pelletier, J.-S., Dicken, B., Bigam, D., and Cheung, P.-Y. (2014). Cardiac effects of vasopressin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64, 100–107. doi: 10.1097/FJC.0000000000000092
- Pittman, Q. J., and Franklin, L. G. (1985). Vasopressin antagonist in nucleus tractus solitarius/vagal area reduces pressor and tachycardia responses to paraventricular nucleus stimulation in rats. *Neurosci. Lett.* 56, 155–160. doi: 10.1016/0304-3940(85)90122-3
- Plotsky, P. M., Bruhn, T. O., and Vale, W. (1985). Hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropic secretion in response to insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology* 117, 323–329. doi: 10.1210/endo-117-1-323
- Pool, A.-H., Wang, T., Stafford, D. A., Chance, R. K., Lee, S., Ngai, J., et al. (2020). The cellular basis of distinct thirst modalities. *Nature* 588, 112–117. doi: 10.1038/s41586-020-2821-8
- Popovic, M., Timper, K., Seelig, E., Nordmann, T., Erlanger, T. E., Donath, M. Y., et al. (2019). Exercise upregulates copeptin levels which is not regulated by interleukin-1. *PLoS One* 14:e0217800. doi: 10.1371/journal.pone.0217800
- Potter, E. K., and McCloskey, D. I. (1979). Respiratory stimulation by angiotensin II. *Respir. Physiol.* 36, 367–373. doi: 10.1016/0034-5687(79)90048-3
- Przybylski, J. (1981). Do arterial chemoreceptors play a role in the pathogenesis of hypertension? *Med. Hypotheses* 7, 127–131. doi: 10.1016/0306-9877(81)90109-2
- Pyner, S. (2009). Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J. Chem. Neuroanat.* 38, 197–208. doi: 10.1016/j.jchemneu.2009.03.005
- Quillen, E. W. J., and Cowley, A. W. J. (1983). Influence of volume changes on osmolality-vasopressin relationships in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 244, H73–H79. doi: 10.1152/ajpheart.1983.244.1.H73
- Racca, F., Vianello, A., Mongini, T., Ruggeri, P., Versaci, A., Vita, G. L., et al. (2020). Practical approach to respiratory emergencies in neurological diseases. *Neurol. Sci.* 41, 497–508. doi: 10.1007/s10072-019-04163-0
- Raff, H. (2011). Endocrine Adaptation to Hypoxia. *Compr. Physiol.* 1259–1275. doi: 10.1002/cphy.cp040254
- Raggenbass, M., Tribollet, E., Dubois-Dauphin, M., and Dreifuss, J. J. (1989). Vasopressin receptors of the vasopressor (V1) type in the nucleus of the solitary tract of the rat mediate direct neuronal excitation. *J. Neurosci.* 9, 3929–3936. doi: 10.1523/JNEUROSCI.09-11-03929.1989
- Reddy, M. K., Patel, K. P., and Schultz, H. D. (2005). Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 289, R789–R797. doi: 10.1152/ajpregu.00222.2005
- Richter, D. W., and Seller, H. (1975). Baroreceptor effects on medullary respiratory neurones of the cat. *Brain Res.* 86, 168–171. doi: 10.1016/0006-8993(75)90651-4
- Sanada, K., Yoshimura, M., Ikeda, N., Baba, K., Nishimura, H., Nishimura, K., et al. (2021). Chemogenetic activation of endogenous arginine vasopressin exerts anorexigenic effects via central nesfatin-1/NucB2 pathway. *J. Physiol. Sci.* 71:18. doi: 10.1186/s12576-021-00802-4
- Schill, F., Timpka, S., Nilsson, P. M., Melander, O., and Enhörning, S. (2021). Copeptin as a predictive marker of incident heart failure. *ESC Hear. Fail.* 8, 3180–3188. doi: 10.1002/ehf2.13439

- Schrier, R. W. (2008). Vasopressin and aquaporin 2 in clinical disorders of water homeostasis. *Semin. Nephrol.* 28, 289–296. doi: 10.1016/j.semnephrol.2008.03.009
- Schrier, R. W., Berl, T., and Anderson, R. J. (1979). Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am. J. Physiol.* 236, F321–F332. doi: 10.1152/ajprenal.1979.236.4.F321
- Scott, C. S., Sharp-Kehl, J., Redekopp, C. A., and Ledson, J. R. (1994). Regulation of plasma vasopressin by plasma osmolality and carotid sinus pressure in anesthetized rabbits. *Am. J. Physiol.* 266, R796–R801. doi: 10.1152/ajpregu.1994.266.3.R796
- Senay, L. C. J. (1969). Increased blood osmolarity and its effect on respiration of dehydrating men. *Pflügers Arch.* 309, 165–175. doi: 10.1007/BF00586966
- Skytioti, M., Sovik, S., and Elstad, M. (2018). Respiratory pump maintains cardiac stroke volume during hypovolemia in young, healthy volunteers. *J. Appl. Physiol.* 124, 1319–1325. doi: 10.1152/jappphysiol.01009.2017
- Smith, P. M., Lowes, V. L., and Ferguson, A. V. (1994). Circulating vasopressin influences area postrema neurons. *Neuroscience* 59, 185–194. doi: 10.1016/0306-4522(94)90109-0
- Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., and Young, W. S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol. Psychiatry* 21, 1137–1144. doi: 10.1038/mp.2015.189
- Solaiman, A. Z., Feehan, R. P., Chabintoy, A. M., Leuenberger, U. A., and Monahan, K. D. (2014). Ventilatory responses to chemoreflex stimulation are not enhanced by angiotensin II in healthy humans. *Auton. Neurosci.* 183, 72–79. doi: 10.1016/j.autneu.2014.01.010
- Souza, G. M. P. R., Stornetta, R. L., Stornetta, D. S., Abbott, S. B. G., and Guyenet, P. G. (2020). Differential contribution of the retrotrapezoid nucleus and CI neurons to active expiration and arousal in rats. *J. Neurosci.* 40, 8683–8697. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1006-20.2020
- Srinivasan, M., Bongiani, F., Fontana, G. A., and Pantaleo, T. (1993). Respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the area postrema in the rabbit. *J. Physiol.* 463, 409–420. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019601
- Sugawara, Y., Mizuno, Y., Oku, S., and Goto, T. (2019). Effects of vasopressin during a pulmonary hypertension crisis induced by acute hypoxia in a rat model of pulmonary hypertension. *Br. J. Anaesth.* 122, 437–447. doi: 10.1016/j.bja.2019.01.014
- Szczepańska-Sadowska, E. (1996). Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. *Regul. Pept.* 66, 65–71. doi: 10.1016/0167-0115(96)00053-5
- Szczepańska-Sadowska, E., Czarzasta, K., and Cudnoch-Jedrzejewska, A. (2018). Dysregulation of the renin-angiotensin system and the vasopressinergic system interactions in cardiovascular disorders. *Curr. Hypertens. Rep.* 20:19. doi: 10.1007/s11906-018-0823-9
- Szczepańska-Sadowska, E., Zera, T., Sosnowski, P., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Puzko, A., and Misicka, A. (2017). Vasopressin and related peptides: potential value in diagnosis, prognosis and treatment of clinical disorders. *Curr. Drug Metab.* 18, 306–345. doi: 10.2174/1389200218666170119145900
- Szmydynger-Chodobska, J., Chung, I., Kozniowska, E., Tran, B., Harrington, F. J., Duncan, J. A., et al. (2004). Increased expression of vasopressin v1a receptors after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 21, 1090–1102. doi: 10.1089/0897715041651033
- Sztechman, D., Czarzasta, K., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Szczepańska-Sadowska, E., and Zera, T. (2018). Aldosterone and mineralocorticoid receptors in regulation of the cardiovascular system and pathological remodeling of the heart and arteries. *J. Physiol. Pharmacol.* 69, 829–845. doi: 10.26402/jpp.2018.6.01
- Tabarean, I. V. (2021). Activation of preoptic arginine vasopressin neurons induces hyperthermia in male mice. *Endocrinology* 162:bqaa217. doi: 10.1210/endo/bqaa217
- Tahara, A., Tomura, Y., Wada, K., Kusayama, T., Tsukada, J., Ishii, N., et al. (1998). Characterization of vasopressin receptor in rat lung. *Neuropeptides* 32, 281–286. doi: 10.1016/S0143-4179(98)90049-X
- Takamata, A., Nose, H., Kinoshita, T., Hirose, M., Itoh, T., and Morimoto, T. (2000). Effect of acute hypoxia on vasopressin release and intravascular fluid during dynamic exercise in humans. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 279, R161–R168. doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.1.R161
- Takeda, M., Dubey, R., Phillips, J. K., Matsumoto, S., and Lipski, J. (2002). Effects of vasopressin on isolated rat adrenal chromaffin cells. *Regul. Pept.* 106, 55–65. doi: 10.1016/S0167-0115(02)00036-8
- Thompson, C. J., Charlton, J., Walford, S., Baird, J., Hearnshaw, J., McCulloch, A., et al. (1989). Vasopressin secretion in the DIDMOAD (Wolfram) syndrome. *Q. J. Med.* 71, 333–345.
- Thompson, E. L., Ray, C. J., Holmes, A. P., Pye, R. L., Wyatt, C. N., Coney, A. M., et al. (2016). Adrenaline release evokes hyperpnoea and an increase in ventilatory CO₂ sensitivity during hypoglycaemia: a role for the carotid body. *J. Physiol.* 594, 4439–4452. doi: 10.1113/JP272191
- Thornton, S. N., Leng, G., Bicknell, R. J., Chapman, C., and Purdew, T. (1986). Vasopressin, but not oxytocin, is released in response to water deprivation in conscious goats. *J. Endocrinol.* 110, 335–340. doi: 10.1677/joe.0.1100335
- Tribollet, E., Raufaste, D., Maffrand, J., and Serradeil-Le Gal, C. (1999). Binding of the non-peptide vasopressin V1a receptor antagonist SR-49059 in the rat brain: an in vitro and in vivo autoradiographic study. *Neuroendocrinology* 69, 113–120. doi: 10.1159/000054409
- Trzebski, A., Chruścielewski, L., and Majcherczyk, S. (1978). Effect of osmotic stimuli on the carotid baroreceptor and chemoreceptor discharges in cats. *Acta Phys. Pol. A* 29, 373–377.
- Ueta, Y., Dayanithi, G., and Fujihara, H. (2011). Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm. Behav.* 59, 221–226. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.12.007
- Ufnal, M., and Skrzypecki, J. (2014). Blood borne hormones in a cross-talk between peripheral and brain mechanisms regulating blood pressure, the role of circumventricular organs. *Neuropeptides* 48, 65–73. doi: 10.1016/j.npep.2014.01.003
- Venus, B., Mathru, M., Smith, R. A., Pham, C. G., Shirakawa, Y., and Sugiura, A. (1985). Renal function during application of positive end-expiratory pressure in swine: effects of hydration. *Anesthesiology* 62, 765–769. doi: 10.1097/0000542-198506000-00011
- Verbalis, J. G. (2007). How does the brain sense osmolality? *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 3056–3059. doi: 10.1681/ASN.2007070825
- Verney, E. B. (1947). The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 135, 25–106.
- Wade, C. E., and Claybaugh, J. R. (1980). Plasma renin activity, vasopressin concentration, and urinary excretory responses to exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 49, 930–936. doi: 10.1152/jappl.1980.49.6.930
- Wade, J. B., Stetson, D. L., and Lewis, S. A. (1981). ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 372, 106–117. doi: 10.1111/j.1749-6632.1981.tb15464.x
- Walker, B. R. (1986). Role of vasopressin in the cardiovascular response to hypoxia in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* 251, H1316–H1323. doi: 10.1152/ajpheart.1986.251.6.H1316
- Walker, B. R., Haynes, J. J., Wang, H. L., and Voelkel, N. F. (1989). Vasopressin-induced pulmonary vasodilation in rats. *Am. J. Physiol.* 257, H415–H422. doi: 10.1152/ajpheart.1989.257.2.H415
- Walker, J. K., and Jennings, D. B. (1994). Angiotensin mediates stimulation of ventilation after vasopressin V1 receptor blockade. *J. Appl. Physiol.* 76, 2517–2526. doi: 10.1152/jappl.1994.76.6.2517
- Walker, J. K., and Jennings, D. B. (1995). During acute hypercapnia vasopressin inhibits an angiotensin drive to ventilation in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* 79, 786–794. doi: 10.1152/jappl.1995.79.3.786
- Walker, J. K., and Jennings, D. B. (1996). Ventilatory effects of angiotensin and vasopressin in conscious rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1258–1264. doi: 10.1139/y96-140
- Walker, J. K., and Jennings, D. B. (1998). Respiratory effects of pressor and depressor agents in conscious rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 707–714. doi: 10.1139/y98-081
- Wallace, A. W., Tunin, C. M., and Shoukas, A. A. (1989). Effects of vasopressin on pulmonary and systemic vascular mechanics. *Am. J. Physiol.* 257, H1228–H1234. doi: 10.1152/ajpheart.1989.257.4.H1228
- Wang, B. C., Sundet, W. D., and Goetz, K. L. (1984). Vasopressin in plasma and cerebrospinal fluid of dogs during hypoxia or acidosis. *Am. J. Physiol.* 247, E449–E455. doi: 10.1152/ajpendo.1984.247.4.E449
- Ward, D. S., Voter, W. A., and Karan, S. (2007). The effects of hypo- and hyperglycaemia on the hypoxic ventilatory response in humans. *J. Physiol.* 582, 859–869. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130112
- Wehberg, K. E., Gala, G. J., and Brunner, M. J. (1991). Comparison of carotid baroreflex control of plasma AVP concentration in conscious and anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 261, R950–R956. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261.4.R950

- Wehrwein, E. A., Limberg, J. K., Taylor, J. L., Dube, S., Basu, A., Basu, R., et al. (2015). Effect of bilateral carotid body resection on the counterregulatory response to hypoglycaemia in humans. *Exp. Physiol.* 100, 69–78. doi: 10.1113/expphysiol.2014.083154
- Wilson, D. A., Hanley, D. F., Feldman, M. A., and Traystman, R. J. (1987). Influence of chemoreceptors on neurohypophyseal blood flow during hypoxic hypoxia. *Circ. Res.* 61, 194–201.
- Yan, X., Chen, X., Guo, Y., He, D., Chen, Y., Xia, C., et al. (2017). Arginine vasopressin alters both spontaneous and phase-locked synaptic inputs to airway vagal preganglionic neuron via activation of V(1a) receptor: insights into stress-related airway vagal excitation. *Front. Cell. Neurosci.* 11:12. doi: 10.3389/fncel.2017.00012
- Yang, Z., and Coote, J. H. (1998). Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *J. Physiol.* 513, 521–530. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.521bb.x
- Yang, S.-J., Lee, K.-Z., Wu, C.-H., Lu, K.-T., and Hwang, J.-C. (2006). Vasopressin produces inhibition on phrenic nerve activity and apnea through V(1A) receptors in the area postrema in rats. *Chin. J. Phys.* 49, 313–325.
- Yang, Z., Wheatley, M., and Coote, J. H. (2002). Neuropeptides, amines and amino acids as mediators of the sympathetic effects of paraventricular nucleus activation in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 663–674. doi: 10.1113/eph8702439
- Yang, D.-B., Yu, W.-H., Dong, X.-Q., Du, Q., Shen, Y.-F., Zhang, Z.-Y., et al. (2014). Plasma copeptin level predicts acute traumatic coagulopathy and progressive hemorrhagic injury after traumatic brain injury. *Peptides* 58, 26–29. doi: 10.1016/j.peptides.2014.05.015
- Yeung, M. L., Teng, J. L., Jia, L., Zhang, C., Huang, C., Cai, J.-P., et al. (2021). Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin-angiotensin system. *Cell* 184, 2212.e12–2228.e12. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.053
- Yoshimura, M., Nishimura, K., Nishimura, H., Sonoda, S., Ueno, H., Motojima, Y., et al. (2017). Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: by using a novel transgenic rat line with DREADDs system. *Sci. Rep.* 7:15728. doi: 10.1038/s41598-017-16049-2
- Yoshimura, M., and Ueta, Y. (2019). Advanced genetic and viral methods for labelling and manipulation of oxytocin and vasopressin neurones in rats. *Cell Tissue Res.* 375, 311–327. doi: 10.1007/s00441-018-2932-9
- Zera, T., Moraes, D. J. A., da Silva, M. P., Fisher, J. P., and Paton, J. F. R. (2019). The logic of carotid body connectivity to the brain. *Physiology* 34, 264–282. doi: 10.1152/physiol.00057.2018
- Żera, T., Przybylski, J., Grygorowicz, T., Kasarello, K., Podobińska, M., Mirowska-Guzel, D., et al. (2018). Vasopressin V1a receptors are present in the carotid body and contribute to the control of breathing in male Sprague-Dawley rats. *Peptides* 102, 68–74. doi: 10.1016/j.peptides.2018.03.004
- Zerbe, R. L., and Feuerstein, G. (1985). Cardiovascular effects of centrally administered vasopressin in conscious and anesthetized rats. *Neuropeptides* 6, 471–483. doi: 10.1016/0143-4179(85)90146-5
- Zhang, Z.-Y., Zhang, L.-X., Dong, X.-Q., Yu, W.-H., Du, Q., Yang, D.-B., et al. (2014). Comparison of the performances of copeptin and multiple biomarkers in long-term prognosis of severe traumatic brain injury. *Peptides* 60, 13–17. doi: 10.1016/j.peptides.2014.07.016
- Zhao, Y., Jiang, Y., Zhou, L., and Wu, X. (2014). The value of assessment tests in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med. Sci.* 347, 393–399. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31829a63b1
- Zheng, F., Copotou, R., Tacquard, C., Demoulin, B., Malinovsky, J. M., Levy, B., et al. (2017). Epinephrine but not vasopressin attenuates the airway response to anaphylactic shock in rats. *Exp. Lung Res.* 43, 158–166. doi: 10.1080/01902148.2017.1323981
- Zhou, T., Chien, M.-S., Kaleem, S., and Matsunami, H. (2016). Single cell transcriptome analysis of mouse carotid body glomus cells. *J. Physiol.* 594, 4225–4251. doi: 10.1113/JP271936
- Zimmerman, C. A., Lin, Y.-C., Leib, D. E., Guo, L., Huey, E. L., Daly, G. E., et al. (2016). Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature* 537, 680–684. doi: 10.1038/nature18950

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Proczka, Przybylski, Cudnoch-Jędrzejewska, Szczepańska-Sadowska and Żera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Warszawa, 11.04.2024
(miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Jacek Przybylski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wkład merytoryczny w zawartość pracy, naniesienie poprawek i uwag krytycznych do manuskryptu, akceptacja ostatecznej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3 %.

Wkład Michała Proczki w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: zaprojektowanie badania, przygotowanie rycin, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek/mgr Michała Proczki

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 11.04.2024
(miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wkład merytoryczny w zawartość pracy, naniesienie poprawek i uwag krytycznych do manuskryptu, akceptacja ostatecznej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3 %.

Wkład Michała Proczki w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

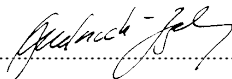
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: zaprojektowanie badania, przygotowanie rycin, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek/mgr Michała Proczki

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 11.04.2024
(miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Ewa Szczepańska-Sadowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wkład merytoryczny w zawartość pracy, naniesienie poprawek i uwag krytycznych do manuskryptu, akceptacja ostatecznej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3 %.

Wkład Michała Proczki w powstawanie publikacji określam jako 60 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: zaprojektowanie badania, przygotowanie rycin, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek/mgr Michała Proczki

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Ewa Szczepańska-Sadowska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 11.04.2024^[1]_{SEP}
(miejscowość, data)

dr hab. n. med. i n. o zdr. Tymoteusz Żera
(imię i nazwisko)^[1]_{SEP}

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Vasopressin and Breathing: Review of Evidence for Respiratory Effects of the Antidiuretic Hormone” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zaproponowanie tematyki pracy pogładowej, zaprojektowanie badania, przygotowanie rycin, sprawdzenie i akceptacja ostatecznej wersji artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 31 %.

Wkład Michała Proczki w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: zaprojektowanie badania, przygotowanie rycin, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek/mgr **Michała Proczki**

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....^[1]_{SEP}

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników