

Kryspin Andrzejewski

WPŁYW JEDNOSTRONNEGO USZKODZENIA
KOMPLEKSU NIGROSTRIATALNEGO
NA NERWOWĄ I CHEMICZNĄ REGULACJĘ
ODDYCHANIA

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Katarzyna Kaczyńska

Pracownia Fizjologii Oddychania

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego

Polskiej Akademii Nauk



Warszawa, 2016

Chciałbym serdecznie podziękować wszystkim,
którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

W szczególności chciałbym podziękować:

Pani Dr Hab. Katarzynie Kaczyńskiej za wszechstronną pomoc,
inspirację oraz nieskończoną cierpliwość i wyrozumiałość.

Dziękuję ***Pani Dr Hab. Krystynie Budzińskiej*** za wskazanie tematu badawczego oraz
cenne porady podczas prowadzenia badań,

Pani Dr Małgorzacie Zarembie za pomoc przy wykonaniu analiz HPLC
oraz

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Fizjologii Oddychania za
pomoc i wspólnie spędzony czas.

Szczególne podziękowania chciałbym złożyć swoim ***Rodzicom*** za motywację, ogromne
wsparcie i wiarę w moje możliwości, dane mi w tym istotnym czasie.

Część wyników niniejszej pracy została opublikowana:

Andrzejewski K, Budzińska K, Zaremba M, Kaczyńska K. Hypoxic ventilatory response after dopamine D₂ receptor blockade in unilateral rat model of Parkinson's disease.

Neuroscience, 2016; 316: 192-200.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----------|
| SPIS TREŚCI..... | 4 |
| WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY..... | 6 |
| 1. WSTĘP..... | 7 |
| 1.1 Nerwowa regulacja oddychania | 7 |
| 1.2 Chemiczna regulacja oddychania..... | 10 |
| 1.2.1 Odpowiedź oddechowa na hipoksję..... | 13 |
| 1.2.2 Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię..... | 15 |
| 1.3 Choroba Parkinsona (ChP)..... | 16 |
| 1.4 Układ oddechowy w Chorobie Parkinsona..... | 17 |
| 1.5 Dopamina i jej rola w oddychaniu..... | 18 |
| 1.6 Rola serotoniny w regulacji oddychania..... | 23 |
| 1.7 Zwierzęcy model choroby Parkinsona | 26 |
| 2. CEL PRACY..... | 28 |
| 3. MATERIAŁY I METODY..... | 29 |
| 3.1 Zwierzęta | 29 |
| 3.2 Iniekcja 6-OHDA do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia | 29 |
| 3.3 Testy oddechowe w komorze pletyzmograficznej..... | 30 |
| 3.3.1 Grupy doświadczalne..... | 33 |
| 3.3.2 Testowanie odpowiedzi oddechowej po iniekcji agonistów lub/i antagonistów..... | 33 |
| 3.4 Badanie aktywności nerwów podjęzykowego i przeponowego. Test hipoksyjny..... | 34 |
| 3.5 Analiza histochemiczna..... | 37 |
| 3.6 Analiza homogenatów prądkowia i pnia mózgu metodą HPLC..... | 38 |
| 3.7 Testy behawioralne i pomiar masy ciała..... | 40 |
| 3.8 Analiza statystyczna..... | 40 |
| 4. WYNIKI..... | 41 |
| 4.1 Oddychanie w grupie zwierząt czuwających, z uszkodzeniem pozorowanym (sham). Odpowiedź oddechowa na hipoksję i hiperkapnię..... | 41 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2 | Wpływ iniekcji 6-OHDA do MFB na oddychanie powietrzem atmosferycznym oraz reakcje na hipoksję i hiperkapnię u szczurów czuwających..... | 42 |
| 4.2.1 | Oddychanie normoksyjne | 42 |
| 4.2.2 | Odpowiedź oddechowa na hipoksję..... | 43 |
| 4.2.3 | Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię..... | 45 |
| 4.2.4 | Wpływ blokady receptorów dopaminergicznych D ₂ na oddychanie normoksyjne i odpowiedź oddechową na hipoksję..... | 47 |
| 4.2.5 | Wpływ pobudzenia i blokady serotonergicznych receptorów 5-HT _{2A} | 53 |
| 4.3 | Wpływ iniekcji 6-OHDA do MFB na aktywność nerwów podjęzykowego (HG) i przeponowego (PHR)..... | 61 |
| 4.4 | Detekcja hydroksylazy tyrozynowej (TH) – analiza immunohistochemiczna | 68 |
| 4.5 | Analiza poziomu amin biogennych i ich metabolitów w prążkowie i pniu mózgu..... | 69 |
| 4.6 | Test behawioralny i masa ciała..... | 72 |
| 5. | DYSKUSJA..... | 74 |
| 5.1 | Odpowiedź oddechowa na hipoksję..... | 74 |
| 5.2 | Odpowiedź oddechowa na hipoksję na tle blokady ośrodkowych i obwodowych receptorów dopaminergicznych D ₂ | 77 |
| 5.3 | Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię..... | 80 |
| 5.4 | Odpowiedź oddechowa na hipoksję po aktywacji i blokadzie receptorów serotonergicznych 5-HT ₂ | 82 |
| 5.5 | Aktywność nerwów podjęzykowego i przeponowego..... | 85 |
| 5.6 | Immunohistochemia oraz poziom amin biogennych w prążkowie i pniu mózgu..... | 90 |
| 6. | PODSUMOWANIE..... | 95 |
| 7. | WNIOSKI..... | 96 |
| 8. | SPIS PIŚMIENNICTWA..... | 97 |
| | STRESZCZENIE..... | 119 |
| | ABSTRACT..... | 123 |

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloocetowy

5-HT – serotonina

6-OHDA – 6-hydroksydopamina

A HG – amplituda zintegrowanej aktywności nerwu podjęzykowego

A PHR – amplituda zintegrowanej aktywności nerwu przeponowego

A pre-I HG – amplituda zintegrowanej aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego

ChP – choroba Parkinsona

DA – dopamina

DOI – 2,5-dimetoksy-4-jodoamfetamina

DOPAC – kwas 3,4-dihydroksyfenyloocetowy

DRG – grupa grzbietowa neuronów oddechowych

f – częstość oddechowa

GABA – kwas γ -aminomasłowy

HG – nerw podjęzykowy

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HRP – peroksydaza chrzanowa

KF – Kolliker fuse

MFB – pęczek przyśrodkowy przodomózgowia

MHPG – kwas 3-metoksy-4-hydroksy fenylloglikol

NA – noradrenalina

NTS – jądro pasma samotnego

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

Pa – ciśnienie parcjalne

PHR – nerw przeponowy

RTN – jądro czworoboczne

RVLM – dogłowy brzusznoboczny obszar rdzenia przedłużonego

SN – substancja czarna

T pre-I HG – czas aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego

T_C – czas całkowity trwania cyklu oddechowego

T_E – czas wydechu

TH – hydroksylaza tyrozynowa

T_I – czas wdechu

V_E – wentylacja minutowa

VRG – grupa brzuszna neuronów oddechowych

V_T – objętość oddechowa

1. WSTĘP

1.1 Nerwowa regulacja oddychania

Rytmiczne oddychanie, niezbędne do wymiany gazowej między organizmem a atmosferą, podlega ścisłej kontroli neuronów mostowo-rdzeniowej części pnia mózgu tworzących sieć neuronów oddechowych. Sieć ta rozciąga się od ogonowej części rdzenia przedłużonego aż po grzbietowo-boczną część mostu, tworząc skupiska neuronów koncentrujące się w trzech strefach (Hilaire i Dutschmann, 2009):

1. Grupa grzbietowa (DRG-dorsal respiratory group), której trzon stanowią wdechowe neurony opuszkowo-rdzeniowe, o projekcji do rdzenia kręgowego, pobudzające motoneurony mięśni oddechowych. Wchodzące w jej skład jądro pasma samotnego (NTS) jest „stacją przekaźnikową”, integrującą sygnały z zakończeń czuciowych nerwu błędnego oraz nerwu zatokowego (Gojny i wsp., 1991; Smatresk i wsp., 1983).
2. Grupa brzuszna (VRG-ventral respiratory group) skupiona w okolicy jądra dwuznacznego i otaczającego je tworzącego siatkowatego, zawiera wydechowe neurony kompleksu Bötzingera oraz komórki rozrusznikowe kompleksu „pre-Bötzingera”, o aktywności wyprzedzającej początek wdechu, generujące rytm oddechowy. Wytworzony rytm oddechowy przekazywany jest do neuronów przedruchowych VRG, które z kolei wysyłają projekcje do motoneuronów czaszkowych oraz rdzenia kręgowego (Smith i wsp., 1991; Dobbins i Feldman, 1994).
3. Grupa neuronów oddechowych mostu (jądro Kolliker-Fuse, jądro przyśrodkowo-okołoramieniowe), odpowiada za przełączanie faz: wdech, wydech (Hilaire i Pasaro, 2003; Alheid i McCrimmon, 2008).

Grupy te pozostają ze sobą w funkcjonalnych połączeniach, a integralność całej mostowo-opuszkowej sieci jest warunkiem wytwarzania prawidłowego wzorca oddychania. Rytm oddechowy powstaje samoistnie w rdzeniu przedłużonym w kompleksie pre-Bötzingera, jego kształt natomiast jest wynikiem synaptycznych interakcji pomiędzy populacjami neuronów oddechowych, które podlegają kontroli ośrodkowej i obwodowej (Abdala i wsp., 2009). Wpływy ośrodkowe pochodzą z chemoreceptorów ośrodkowych, układu limbicznego, podwzgórza oraz kory mózgu, odpowiadającej za kontrolę dowolną (Hilaire i Pasaro, 2003). Sieć neuronów oddechowych otrzymuje również informacje z niższych poziomów, których najistotniejszą składową są chemoreceptory obwodowe znajdujące się w kłębkach szyjnych (Nurse i Piskuric, 2013), oraz mechano- i chemoreceptory zakończeń czuciowych nerwu błędnego unerwiającego drogi oddechowe poniżej nosogardzieli (Widdicombe, 2001).

Oddychanie jest również złożonym, rytmicznym aktem ruchowym, w który zaangażowane są trzy grupy mięśni oddechowych: przepona, mięśnie międzyżebrowe oraz mięśnie górnych dróg oddechowych. Motoneurony kontrolujące skurcz tych mięśni są rytmicznie pobudzane lub hamowane przez monosynaptyczne projekcje z mostowordzeniowych ośrodków oddechowych (Ellenberger i Feldman, 1988; Butler, 2007). Ośrodkowy napęd wdechowy stymuluje motoneurony oddechowe w ściśle określonym porządku, najpierw rekrutowane są motoneurony górnych dróg oddechowych, zawsze przed motoneuronami przepony. Ułatwia to otwarcie głośni zanim nastąpi spadek ciśnienia w tchawicy wywołany skurczem przepony i zapobiega zapadaniu się górnych dróg oddechowych (Hilaire i Pasaro, 2003).

W niniejszej pracy podjęto analizę aktywności dwóch nerwów ruchowych: nerwu przeponowego oraz nerwu podjęzykowego (XII), reprezentującego unerwienie górnych dróg oddechowych.

Nerw przeponowy jest nerwem parzystym, wychodzącym z szyjnego odcinka rdzenia kręgowego, unerwiający główny mięsień oddechowy, przeponę. Jego wyładowania są obecne podczas fazy wdechu, mogą się również pojawiać podczas fazy powdechowej (Lee i Fuller, 2011; Ghali, 2015).

Nerw podjęzykowy, którego jądro ruchowe znajduje się w rdzeniu przedłużonym, unerwia zewnętrzne i wewnętrzne mięśnie języka (Fregosi i Fuller, 1997). Odgrywa on istotną rolę w przygotowaniu do fazy wdechu i kontroli średnicy gardła. Skurcz mięśnia bródkowo-językowego unerwianego przez n. XII powoduje usztywnienie i przesunięcie języka do przodu i rozszerzenie przekroju górnych dróg oddechowych, utrzymujące ich drożność podczas fazy wdechu (McClung i Goldberg, 2000; Fregosi, 2011).

Nerw podjęzykowy wykazuje rytmiczną aktywność oddechową, obecną w fazie wdechu, co odzwierciedla aktywność nerwu przeponowego i mięśnia przepony (Lee i Fuller, 2010). Jest ona jednak wyraźnie odmienna od aktywności n. przeponowego. W aktywności nerwu XII można wyróżnić dodatkową aktywność przedwdechową (pre-I) pojawiającą się przed wystąpieniem aktywności wdechowej nerwu przeponowego (Lee i Fuller, 2010). Początek aktywności nerwu podjęzykowego następuje w późnej fazie powdechowej nerwu przeponowego. Zatem początek aktywności nerwu podjęzykowego wyprzedza początek aktywności nerwu przeponowego i jest związany z przygotowaniem górnych dróg oddechowych do wdechu (Saito i wsp., 2002; Fukuda i Honda, 1982). Aktywność przedwdechowa ulega zmianom w odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Lee i Fuller, 2010) i hiperkapnię (Fukuda i Honda, 1988). Opisano wzrost amplitudy aktywności przedwdechowej nerwu XII, oraz wydłużenie czasu aktywności przedwdechowej tegoż nerwu w odpowiedzi na bodziec hipoksyjny (Lee i Fuller, 2010).

1.2 Chemiczna regulacja oddychania

Chemiczna regulacja oddychania zachodzi na poziomie ośrodkowego oraz obwodowego układu nerwowego i polega na dostosowaniu wentylacji płucnej do zmian ciśnienia parcjalnego tlenu, dwutlenku węgla, oraz stężenia jonów wodorowych we krwi tętniczej (Spyer, 2009).

Ośrodkowa regulacja oddychania opiera się na istnieniu wrażliwej na CO₂ i jony wodorowe strefie znajdującej się na brzuszno-bocznej powierzchni rdzenia przedłużonego (Guyenet i wsp., 2008). Wszystkie chemowrażliwe struktury rdzenia przedłużonego są umiejscowione w obrębie sieci neuronów oddechowych, bądź też z nią połączone (Spyer i Gourine, 2009). Uważa się, że obszary rdzenia przedłużonego takie jak kompleks pre-Bötzingera i Bötzingera, jądro pasma samotnego, jądra szwu oraz miejsce sinawe zawierają obszary chemorecepcyjne (Nattie, 1999; Lahiri i Forster, 2003; Mitchell, 2004; Richerson, 2004). W 2004 roku Mulkey i wsp., oraz rok później Guyenet i wsp. (2005) wskazali jądro tylne czworoboczne (RTN) jako jeden z najważniejszych obszarów chemowrażliwych pobudzany wzrostem PaCO₂/[H⁺].

Neurony znajdujące się w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego (RVLM) są bezpośrednio podatne na zmiany pH i ciśnienia parcjalnego CO₂ w płynie mózgowo-rdzeniowym i zewnątrzkomórkowym mózgu (Richerson, 1995). Zablockowanie tego obszaru u uśpionych zwierząt praktycznie eliminuje pobudzenie oddychania stymulowane wzrostem CO₂ (Cherniack i wsp., 1979; Forster, 1995; Ohtake i wsp., 1995).

Ośrodkowo działający CO₂ jest najsilniejszym bodźcem pobudzającym napęd oddechowy. Wzrost prężności CO₂ we krwi tętniczej wywołuje szybki wzrost wentylacji minutowej celem usunięcia CO₂, pobrania O₂ i zapewnienia stosunkowo stabilnego poziomu CO₂ w powietrzu pęcherzykowym, krwi tętniczej i płynie zewnątrzkomórkowym

mózgu (Spyer i Thomas, 2000). Ośrodkowe chemoreceptory odpowiadają za ok. 70-80% odpowiedzi oddechowej na podwyższenie CO₂ (Lahiri i Forster, 2003).

CO₂ w warunkach fizjologicznych ulega bardzo szybkiej hydratacji, katalizowanej przez enzym - anhidrazę kwasu węglowego, do kwasu węglowego, który dysocjuje do protonu i wodorowęglanu (Nattie, 1999). Wzrost prężności CO₂ natychmiast wiąże się ze wzrostem stężenia jonów H⁺ i obniżeniem pH. Przypuszcza się, że sam CO₂ może być wykrywany przez chemoreceptory, ponieważ łatwo i szybko dyfunduje przez barierę krew-mózg, w przeciwieństwie do jonów H⁺ i HCO₃⁻. Mechanizm czucia CO₂ polega prawdopodobnie na detekcji zmian stężenia H⁺ towarzyszących zmianom prężności CO₂ w płynie mózgowo-rdzeniowym i tkankowym mózgu (Spyer i Thomas, 2000; Feldman i wsp., 2003). Nie został on jak dotąd wyjaśniony. Sklasyfikowano wiele specyficznych kanałów jonowych wrażliwych na zmiany pH (Gestreau i wsp., 2010). W neuronach mózgu odnaleziono pH-wrażliwe kanały K⁺: TASK 1, -2 i -3 które uważano za czujniki protonów (Gestreau i wsp., 2010). TASK 1 i TASK 3 zlokalizowane zostały w wielu obszarach związanych z układem oddechowym w tym w neuronach szwu, RTN, kompleksie pre-Bötzingera i Bötzingera, nerwie podjęzykowym i miejscu sinawym (Sirois i wsp., 2000). Hamowanie przepływu jonów w kanałach TASK wywołane zewnątrzkomórkową kwasicią prowadzi do depolaryzacji, wzrostu pobudliwości komórek i pobudzenia motoneuronów oddechowych (Duprat i wsp., 1997; Gestreau i wsp., 2010). Jednak ich kluczowa rola w chemowrażliwości na CO₂ w ośrodkowym układzie nerwowym została zakwestionowana. Podwójny mutant myszy TASK 1^{-/-} i TASK 3^{-/-} prezentował bowiem zachowaną odpowiedź oddechową na hiperkapnię (Mulkey i wsp., 2007; Bayliss i wsp., 2015).

Wykazano, że chemotransdukcja CO₂ wiąże się z uwalnianiem nukleotydu purynowego - ATP w obszarach chemowrażliwych zlokalizowanych na brzusznej powierzchni opuszki, w pobliżu generatora wzorca i rytmu oddychania (Gourine, 2005).

ATP dyfundujący do neuronów brzusznej kolumny oddechowej mógłby inicjować adaptacyjne zmiany w oddychaniu. W istocie pobudzający efekt ATP na aktywność neuronów oddechowych został potwierdzony w licznych publikacjach (Thomas i Spyer, 2000; Lorier i wsp., 2007; Spyer, 2009; Huckstepp i wsp., 2010). Co więcej blokada receptora purynergicznego P2X₂ zmniejsza odpowiedź oddechową na wzrost prężności tętniczego CO₂ (Spyer, 2009). Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że wpływ purynergicznego przekazywania sygnału na chemorecepcję CO₂/H⁺ ogranicza się tylko do obszaru RTN z wyłączeniem NTS i jąder szwu (Sobrinho i wsp., 2016).

Za obwodową chemiczną regulację oddychania odpowiadają kłębki szyjne i aortalne unerwione odpowiednio przez nerw zatokowy i aortalny, wrażliwe głównie na zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu oraz w znacznie mniejszym stopniu na podwyższenie ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla i spadek pH krwi tętniczej (Nurse i Piskuric, 2013). Najważniejszą rolę pełnią kłębki szyjne, których udział w odpowiedzi na hipoksję stanowi 90%, zaś udział kłębków aortalnych szacuje się jedynie na 5-10% (Honda, 1999). Przyjmuje się, że około 1/3 odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię w normoksji zachodzi za pośrednictwem kłębków szyjnych (Forster i wsp., 2008). Kłębki szyjne umiejscowione w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej są silnie ukrwionymi organami o największym przepływie krwi w całym organizmie – 2000 ml/ 100 g tkanki/min (Clarke i wsp., 1986; Gonzalez i wsp., 1994). Zbudowane są z dwóch rodzajów komórek: komórek chemosensorycznych typu I oraz komórek typu II pełniących funkcje podporowe (Gonzalez i wsp., 1994). Komórki typu I o licznych ziarnistościach sekrecyjnych zawierają neuroprzekazniki takie jak adenozyne, acetylocholina, serotonina (5-HT), GABA i dopamina (Kumar i Prabhakar, 2012; Nurse, 2014). Chemotransdukcja sygnału w kłębkach szyjnych nie jest jak dotąd procesem w pełni wyjaśnionym. Przypuszcza się, że rozpoczyna ją obniżenie ciśnienia parcjalnego O₂ w naczyniach krwionośnych kłębków, co skutkuje

zmniejszonym ciśnieniem tlenu wewnątrz komórek kłębkowych typu I. Odbiór bodźca w obrębie komórek chemoreceptorowych odbywa się poprzez nieznaną jak dotąd mechanizm, który prowadzi do zahamowania przezbłonowego spoczynkowego prądu jonów K^+ przez kanały z rodziny TASK 1/3 (Kim i wsp., 2009; Carroll i Kim., 2013). Przypuszcza się, że same kanały potasowe mogą być strukturami wrażliwymi na zmiany PaO_2 (Lopez-Barneo, 2003). Dodatkowo uważa się, że oksygenaza hemowa 2, ściśle związana z błonowymi kanałami BK, wykorzystuje O_2 jako substrat do wytwarzania tlenku węgla (CO), który wzmacnia prawdopodobieństwo otwarcia kanałów BK podczas normoksji (Kemp, 2005). Kiedy ciśnienie parcjalne tlenu w komórkach kłębkowych jest niskie, spada wytwarzanie CO i aktywacja kanałów BK zostaje zniesiona. Hamowanie kanałów TASK 1/3 inicjuje depolaryzację komórek chemoreceptorowych, wzmocnioną przez hipoksyjne hamowanie kanałów BK (Wasicko, 2006). Depolaryzacja prowadzi do napływu jonów wapnia przez kanały wapniowe bramkowane napięciem do wnętrza komórek i uwolnienie z licznych ziarnistości komórek typu I neuroprzebieżników takich jak: GABA, adenozyne, dopamina, 5-HT i innych do szczeliny synaptycznej (Gonzalez i wsp., 1994; Nurse, 2010; Nurse i Piskucic, 2013). ATP, adenozyne oraz acetylocholina uważane są za najważniejsze pobudzające przebieżniki depolaryzujące zakończenia nerwu zatokowego. Ostatnio kładzie się nacisk na rolę komórek glejowych, które poprzez uwalnianie ATP oraz innych mediatorów mogłyby wzmacniać chemotransdukcję sygnału w kłębkach szyjnych (Butt, 2011).

1.2.1 Odpowiedź oddechowa na hipoksję

Ekspozycja na hipoksję aktywuje odpowiedź oddechową, której zadaniem jest zminimalizowanie skutków niedoboru tlenu w tkankach. Czujnikami niskiego poziomu PaO_2 we krwi tętniczej są wspomniane powyżej komórki chemoreceptorowe typu I

kłębków szyjnych, które przetwarzają chemiczny sygnał jakim jest poziom tlenu we krwi tętniczej na potencjały czynnościowe we włóknach nerwów zatokowych, docierających dalej nerwem językowo-gardłowym do jądra spoidłowego NTS-u, pierwszej synapsy chemoodruchu w OUN oraz następnie do struktur ponadopuszkowych i brzusznej grupy neuronów opuszki (Boscan i wsp., 2002; Stornetta, 2008; Nurse i Piskuric, 2013).

Hipoksja hipoksyczna jest najczęstszym rodzajem hipoksji, jakiej poddawany jest człowiek w trakcie życia. Jest ona również stosowana w badaniach nad chemiczną regulacją oddychania. Wielkość i rodzaj odpowiedzi na hipoksję zależy od stopnia hipoksji oraz długości jej trwania (Kumar i Prabakhar, 2012). Stosowany bodziec hipoksyjny może mieć charakter progresywny tzn. polegać na oddychaniu zwrotnym, czyli wdychaniu powietrza wydychanego, co powoduje narastanie poziomu bodźca, lub może polegać na skokowym podaniu bodźca o stałym natężeniu (steady-state). Progresywna izokapniczna hipoksja zwiększa wentylację do poziomu PaO_2 60 mmHg, a poniżej 40 mmHg hamuje oddychanie (Hayashi i wsp., 1983; Bisgard i Neubauer, 1985). Przyjmuje się, że za pierwszą pobudzeniową fazę odpowiada w głównej mierze stymulacja obwodowych chemoreceptorów kłębków szyjnych, natomiast za późniejszą fazę depresyjną, aktywacja ośrodkowych obszarów chemowrażliwych (Lahiri i wsp., 2006). Wydaje się jednak, że kłębki szyjne również mają swój udział w kształtowaniu fazy hamującej odpowiedzi oddechowej na hipoksję, ponieważ u ludzi z wyciętymi kłębkami szyjnymi odnotowano nie tylko brak odpowiedzi pobudzającej na hipoksję, ale także jej fazy depresyjnej (Honda, 1999).

Odpowiedź oddechowa na bodziec hipoksyjny o typie „steady-state” ma charakter dwufazowy: pierwsza faza pobudzeniowa powoduje wzrost parametrów wentylacji płucnej, następnie obserwuje się spadek w głównej mierze objętości oddychania, utrzymujący się

jednak powyżej wartości charakterystycznych dla oddychania powietrzem atmosferycznym (Bisgard i Neubauer, 1985; Hayashi i Fukuda, 2000).

1.2.2 Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię

Czujnikami odpowiadającymi za wykrywanie wzrostu stężenia CO₂ są opisane powyżej obszary pnia mózgu, w szczególności brzuszno-boczna powierzchnia rdzenia przedłużonego oraz chemoreceptory kłębków szyjnych. Wzrost PaCO₂ podczas hiperkapni jest potężnym bodźcem stymulującym praktycznie wszystkie neurony oddechowe pnia mózgu oraz pobudzającym oddychanie poprzez zwiększenie zarówno częstotliwości oddychania, objętości oddechowej oraz wentylacji minutowej (Cohen, 1968; St. John i Bianchi, 1985). Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię ma charakter liniowy i taka jest zależność między wentylacją minutową a ciśnieniem CO₂ w pęcherzykach płucnych. U ludzi około dwukrotne zwiększenie wentylacji obserwuje się już przy wzroście ciśnienia pęcherzykowego CO₂ o 1,5 mmHg ponad wartość prawidłową (Spyer i Thomas, 2000; Nattie i Li, 2009). W przeciwieństwie do odpowiedzi oddechowej na hipoksję, reakcja na hiperkapnię jest natychmiastowa. Osiąga swoje maximum w ciągu 1 sekundy, a następnie w granicach 10s obserwuje się fazę stabilizacyjną z oddychaniem utrzymującym się na nieznacznie niższym poziomie niż początkowy wzrost (Black i wsp., 1971).

W doświadczeniach oddechowych wykorzystuje się jako bodziec hiperkapnię hiperoksyczną, która jest miarą reaktywności obszarów chemowrażliwych mózgu w odpowiedzi na narastającą prężność CO₂, ponieważ hiperoksja wycisza chemoreceptory kłębków szyjnych (Sinski i wsp., 2014). Wczesne dane literaturowe wskazują na zmniejszenie aktywności nerwu zatokowego przy zastosowaniu hiperoksji, co redukuje odpowiedzi kłębków szyjnych na CO₂ (Fitzgerald i Parks, 1971; Fitzgerald i Dehghani, 1982).

Na odpowiedź oddechową na hiperkapnię ma również wpływ aktywność tworzącego siatkowatego. Jej osłabienie lub zniesienie wywołane snem, narkozą, czy morfiną obniża odpowiedź wentylacyjną na wzrost prężności CO₂ (Angel i Knox, 1970).

Stany hiperkapni obserwuje się podczas bezdechów sennych, w stanach patologicznych płuc z hipowentylacją oraz u osób nurkujących (Delapille i wsp., 2001; Ayappa i wsp., 2002).

1.3 Choroba Parkinsona (ChP)

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęstszych postępujących chorób neurodegeneracyjnych, która dotyka 1% populacji ludzkiej powyżej 60 roku życia (Samii i wsp., 2004). Związana jest z zaburzeniami czynności mitochondriów, stresem oksydacyjnym, agregacją białek, ekscytotoksycznością i zapaleniem, które skutkują selektywnym uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych, głównie istoty czarnej zbitej i zmniejszonym uwalnianiem dopaminy w prążkowie (Hornykiewicz, 1975; Przedborski, 2007). 50% ubytek neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej prowadzi do spadku syntezy dopaminy o 80% w prążkowie, co wywołuje pojawienie się objawów chorobowych (Samii i wsp., 2004). W chorobie Parkinsona obserwuje się w głównej mierze uszkodzenie neuronów szlaku czarnoprążkowiego i w mniejszym stopniu mezo-kortykolimbicznego a także podwzgórzowego (Scatton i wsp., 1983). Zmiany wywołane ChP przybierają często szersze rozmiary, uszkodzenie obejmuje także inne grupy neuronów, takich jak noradrenergiczne czy serotonergiczne (Agid i wsp., 1987). Neurony dopaminergiczne w obrębie rdzenia kręgowego pozostają nieuszkodzone (Shmidt i Bubser, 1989). Wczesniejsze etapy choroby Parkinsona cechuje zwiększony jednostronny ubytek dopaminy, w przeciwieństwie do zaawansowanych stadiów choroby, w których zmiany dotyczą obu półkul mózgu (Gravotta i wsp., 2011).

U osób dotkniętych chorobą Parkinsona stwierdza się dysfunkcje związane z układem ruchu takie jak: drżenie spoczynkowe, niestabilność postawy, spowolnienie ruchowe i sztywność mięśniową (Błaszczak, 1998). Towarzyszą im zaburzenia poznawcze, oraz w najbardziej skrajnych przypadkach, demencja i depresja (Cummings, 1992; Kalia i Lang, 2015).

1.4 Układ oddechowy w Chorobie Parkinsona

Chorzy na ChP manifestują zarówno zaburzenia nieoddechowych funkcji układu oddechowego takich jak: niewyraźna i cicha mowa, trudności w połykaniu (Ramig i wsp., 2008; Sapir i wsp., 2008), jak i zaburzenia samego oddychania.

Do najczęstszych dysfunkcji układu oddechowego należą: duszność, niestabilność rytmu oddechowego i obturacyjny bezdech senny (Hovestadt i wsp., 1989; Guedes i wsp., 2012). Wg Arnulfa i wsp. (2002) częstość występowania bezdechów w czasie snu u chorych wynosi 20% i przekracza tę obserwowaną w populacji zdrowych Amerykanów (2,5- 4,4%). Natomiast zachłystowe zapalenie płuc nierzadko stanowi przyczynę śmierci chorych na ChP (Brown, 1994; Wermuth i wsp., 1995; Fontana i wsp., 1998).

Niewyjaśnionym pozostaje, czy za zaburzenia oddychania w ChP odpowiada osłabienie mięśni oddechowych czy też zmiany w nerwowej regulacji ich napięcia.

Obserwacje kliniczne pacjentów z ChP wykazały anomalie czynności mięśni oddechowych zarówno górnych jak i dolnych dróg oddechowych (Estenne i wsp., 1984; Tzelepis i wsp., 1988; Hovestadt i wsp., 1989; Sabate i wsp., 1996; Izquierdo-Alonso i wsp., 1994).

Z drugiej strony, badania na szczurzym modelu ChP wykazały zmiany w aktywności nerwu podjęzykowego, unerwiającego mięśnie górnych dróg oddechowych, wskazując raczej na zmiany w ośrodkowym neuronalnym napędzie oddechowym (Budzińska i Andrzejewski 2014). Do podobnych wniosków doszli Tuppy i wsp. (2015), którzy opisali znaczący

ubytek liczby neuronów w brzusznej kolumnie oddechowej po obustronnej iniekcji 6-OHDA do prądkowia szczura.

Dysfunkcje oddechowe w ChP stanowią przedmiot nielicznych badań. Istnieje zaledwie kilka prac opisujących reakcje oddechowe na bodziec hipoksyjny i hiperkapniczny u ludzi chorych na tę jednostkę chorobową. Dane literaturowe opisują skrajnie odmienne odpowiedzi oddechowe na hipoksję: od zwiększonej (Feinsilver i wsp., 1986) poprzez niezmienną (Seccombe i wsp., 2011), aż do osłabionej (Serebrovskaya i wsp., 1998; Onodera i wsp., 2000). Podobne zróżnicowanie zanotowano podczas odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię (Seccombe i wsp., 2011; Onodera i wsp., 2000; Feinsilver i wsp., 1986). Zmniejszenie odpowiedzi oddechowej na hipoksję u pacjentów z ChP interpretowane jest jako skutek zmniejszonej wrażliwości chemoreceptorów obwodowych na spadek ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi (Serebrovskaya i wsp., 1998).

Mechanizmy leżące u podstaw zmian w układzie oddechowym w aspekcie ChP są mało poznane i wymagają dalszych badań.

1.5 Dopamina i jej rola w oddychaniu

Dopamina (DA), 3,4-dihydroksyfenloalanina, syntetyzowana w neuronach dopaminergicznych, jest głównym przekaźnikiem katecholowym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), stanowiącym prekursor w biosyntezie noradrenaliny i adrenaliny (Rafouli-Stergiou i wsp., 2012).

Dopamina działa poprzez swoiste receptory dopaminergiczne, zaklasyfikowane do dwóch podrodziny: podrodziny D₁ (D₁-like), do której zalicza się receptory typu D₁ i D₅ oraz podrodziny D₂ (D₂-like), której podporządkowane są receptory typu D₂, D₃, D₄. Obie podrodziny różnią się budową, właściwościami biochemicznymi i farmakologicznymi (Missale i wsp., 1998).

W OUN dopamina jest odpowiedzialna za regulację ciśnienia krwi, funkcje poznawcze, emocje, pobieranie pokarmu, kontrolę napędu ruchowego, koordynację i napięcie mięśniowe oraz za regulację hormonalną (Sawaguchi, 2001; Cools, 2008). Ośrodkowe receptory dopaminergiczne zlokalizowane są głównie w korze mózgu, śródmózgowiu (w istocie czarnej zbitej, polu brzusznej nakrywki), oraz w jądrach podstawy mózgu (jądrze ogoniastym i skorupie) (Deumens i wsp., 2001; Simon i wsp., 2003).

Istnienie układu dopaminergicznego na obwodzie potwierdzono w nerkach, gdzie odpowiada on za zachowanie homeostazy sodu w organizmie (Hussain i Lokhadwala, 2003; Carey, 2013). Dopamina może również oddziaływać auto- lub/i parakrynnie na receptory dopaminergiczne obecne w trzustce, pęcherzykach płucnych, mięśniach dróg oddechowych, oraz naczyniach krwionośnych serca, płuc i nerek (Mezey i wsp., 1996; Cheung i Barrington, 1996; Ricci i wsp., 2006; Mizuta i wsp., 2013).

Ośrodkowe neurony oraz receptory dopaminergiczne mają swój istotny udział w kontroli oddychania ssaków zarówno w normoksji jak i podczas hipoksji (Lalley, 2009; Subramanian i wsp., 2007; Lalley i Mifflin, 2012). U zmienionych genetycznie zwierząt, które nie wykształciły neuronów dopaminergicznych, obserwowano poważne zaburzenia w oddychaniu min. bezdechy, zakłócenia rytmu oddechowego oraz brak odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Nsegbe i wsp., 2004).

W ośrodkowym układzie nerwowym, obecność dopaminy stwierdzono w niemal wszystkich rejonach sieci neuronów oddechowych opuszki (Hsiao i wsp., 1989; Sun i wsp., 1994; Lalley i wsp., 2008), min. w strukturach wrażliwych na zmianę ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla i pH (Li i Nattie, 2006), w jądrze motorycznym nerwu błędnego (Kalia i wsp., 1985) oraz w jądrze pasma samotnego (NTS) (Kitahama i wsp., 2000).

Receptory D₂, wszechobecne w mózgu zlokalizowano w jądrze pasma samotnego oraz jądrach motorycznych rdzenia przedłużonego (Yokoyama i wsp., 1994; Hyde i wsp., 1996; Nobrega i wsp., 1996).

Dane z piśmiennictwa na temat wpływu ośrodkowej dopaminy na regulację oddychania są nierzadko kontrowersyjne. W części prac systemowe podawanie związków dopaminergicznych przekraczających barierę krew-mózg, takich jak apomorfina (agonista receptorów dopaminergicznych D₁ i D₂) podwyższało wentylację (Hedner i wsp., 1982; Hsiao i wsp., 1989; Huey i wsp., 2000). Opisano również działanie depresyjne (Bolme i wsp., 1977; Bonora i Gautier, 1988; Kline i wsp., 2002). Na hamujące ośrodkowe efekty dopaminy wskazują dane, z których wynika, że dokomorowe podanie DA obniża parametry wentylacji podczas oddychania powietrzem atmosferycznym (Guner i wsp., 2002). Znajduje to również potwierdzenie we wzroście objętości oddechowej (Hedner i wsp., 1982; Guner i wsp., 2002) i wentylacji minutowej (Guner i wsp., 2002) w wyniku blokady ośrodkowych receptorów D₂ po dokomorowym podaniu domperidonu lub haloperidolu. Wzrost wentylacji zaobserwowano również po dotętnicznym podaniu królikom haloperidolu, antagonisty receptorów dopaminergicznych D₂, który przenika barierę krew-mózg (Matsumoto i wsp., 1988).

Niemniej, w doświadczeniach *in vitro* na preparatach pnia mózgu noworodków szczurzych opisano pobudzające działanie dopaminy na motoneurony oddechowe (Murakoshi i wsp., 1985). W sprzeczności pozostaje z kolei praca Fallert i wsp. (1979), którzy wykazali bezpośredni hamujący wpływ dopaminy na neurony wdechowe, redukujący częstotliwość potencjału czynnościowego neuronów wdechowych rdzenia przedłużonego królika.

Nieliczne dane z piśmiennictwa dotyczące wpływu ośrodkowej dopaminy na odpowiedź oddechową na hipoksję implikują jej działanie hamujące (Goigny i wsp., 1991).

Systemowe podanie levodopy (prekursora dopaminy przekraczającego barierę krew-mózg) (Olson i Saunders, 1985), a także dokomorowa iniekcja dopaminy wywoływały efekt zmniejszający pobudzenie oddychania podczas hipoksji (Guner i wsp., 2002). Wiadomo, że poziom dopaminy wzrasta pod wpływem chronicznej hipoksji w rdzeniu przedłużonym (Raghuraman i wsp., 2009) i podwzgórzu (Li i wsp., 1996). Jej zwiększone uwalnianie z dośrodkowych włókien chemoreceptyjnych w jądrze pasma samotnego królika pod wpływem bodźca hipoksyjnego, opisano w cytowanej powyżej pracy (Goiny i wsp., 1991) i przypisano udziałowi dopaminy w kontroli depresyjnej fazy odpowiedzi na hipoksję. Według Kline i wsp. (2002) dopamina wydzielana tonicznie z dośrodkowych chemoreceptorowych i wagalnych włókien nerwowych wywołuje stałe hamowanie neurotransmisji w obszarze NTS-u.

Dopamina jest dominującą katecholaminą obecną w ziarnistościach komórek chemoreceptorowych typu I kłębków szyjnych oraz w neuronach nerwu zatokowego przekazującego informacje z obwodowych chemoreceptorów poprzez nerw językowo-gardłowy do NTS-u (Janssen i wsp., 1998; Alheid i McCrimmon, 2008; Monteiro i wsp., 2011; Carroll i wsp., 2013). Receptory dopaminergiczne D₁ oraz D₂ zlokalizowano w komórkach typu I kłębków szyjnych oraz w neuronach zwoju skalistego n. językowo-gardłowego (Czyżyk-Krzeska i wsp., 1992; Bairam i wsp., 1998; Nurse i Piskuric, 2013). Według Iturriaga i wsp., (2009) oraz Kumar i Prabhakar (2012) DA odgrywa kluczową rolę w transdukcji sygnału w chemoreceptorach kłębków szyjnych królików, u pozostałych gatunków zwierząt pełniąc raczej rolę modulującą. Tylko u królików dopamina podana obwodowo powodowała stymulację oddychania (Liados i Zapata 1978; Monti-Bloch i Eyzaguirre, 1980).

Podczas hipoksji obserwuje się zwiększoną aktywność hydroksylazy tyrozynowej, enzymu kluczowego w syntezie dopaminy w kłębkach szyjnych skutkująca zwiększonym

wytwarzaniem tego neuroprzekaźnika u królików (Fidone i wsp., 1982), kotów (Itturiaga i wsp., 1996) i szczurów (Donnelly 1996). Z danych piśmiennictwa wynika, że obwodowa iniekcja dopaminy, nieprzechodzącej bariery krew-mózg, wpływa na oddychanie poprzez aktywację chemoreceptorów kłębków szyjnych (Lahiri i Nishino, 1980; Gonzalez i wsp., 1994; Ciarka i wsp., 2007). Badania przeprowadzone na kotach oddychających powietrzem atmosferycznym wykazały, iż dożylnie podanie dopaminy powodowało depresję oddychania, eliminowaną przecięciem nerwów zatokowych (Wypych i Przystaszewska, 1995). W doświadczeniach przeprowadzanych na ludziach dopamina zmniejszała wentylację minutową zarówno w normoksji (Welsh i wsp., 1978) jak i w hipoksji (Niewinski i wsp., 2014). Co więcej, zastosowanie obwodowo działającego blokera receptorów dopaminergicznych D₂ (domperidon) u zwierząt eksperymentalnych stymulowało oddychanie w normoksji (Hedner i wsp., 1982; Delpierre i wsp., 1985; Bascom i wsp., 1991) oraz w hipoksji (Javaheri i Guerra 1990; Pedersen i wsp., 1999; Gamboa i wsp. 2003). Powyższe dane pokazują, że u większości gatunków zwierząt dopamina wywiera działanie hamujące wentylację, z wyjątkiem wspomnianych wcześniej królików.

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej informacje można przyjąć, że dopamina uznawana za jeden z potencjalnych neurotransmiterów kłębków szyjnych, odgrywa ważną rolę w kontroli i modulacji oddychania w ośrodkowym układzie nerwowym. Zatem jej niedobór, charakterystyczny dla choroby Parkinsona, może prowadzić do anomalii w funkcjonowaniu układu oddechowego.

1.6 Rola serotoniny w regulacji oddychania

Serotonina (5-HT), czyli 5 hydroksytryptamina, syntetyzowana z L-tryptofanu przez enzym hydroksylazę tryptofanową (Hilare i wsp., 2010) jest neuroprzekaźnikiem odkrytym pierwotnie w układzie pokarmowym, później w płytkach krwi i następnie w układzie nerwowym ssaków (Hodges i Richerson, 2008).

Projekcje neuronów serotonergiczných, oraz liczne pre- i post-synaptyczne podtypy receptorów 5-HT są zaangażowane w różnorakie funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym. Serotonina bierze udział w regulacji homeostazy mózgu, neurogenezy, synaptycznej plastyczności, snu i rytmu okołodobowego, apetytu, bólu, emocji, termoregulacji, i oddychania (Veasey i wsp., 1995; Costentin 2000; Azmitia, 2007; Hodges i Richerson, 2008).

W ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, serotonina wytwarzana jest przez stosunkowo niewielką liczbę neuronów serotonergiczných znajdujących się w śródmózgowiu, moście i rdzeniu przedłużonym. Serotonergiczne ciała komórek nerwowych położone są wzdłuż linii środkowej rdzenia przedłużonego w jądrach szwu (Hodges i Richerson, 2008). Unerwiają one cały mózg, w tym substancję czarną i prążkowie (Zhou i wsp., 2005; Hilaire i wsp., 2010; Huot i wsp., 2011). Wysyłają również swoje projekcje do ośrodków oddechowych w moście i rdzeniu przedłużonym, między innymi do jądra okółoramieniowego, jądra Kolliker-Fuse, jądra dwuznacznego, jądra czworobocznego, rejonów Bötzingera i pre-Bötzingera, a także do jądra pasma samotnego, jądra motorycznego n. podjęzykowego, i nerwu przeponowego w szyjnym odcinku rdzenia kręgowego (Pilowsky i wsp., 1990; Voss i wsp., 1990; Manaker i Tischler, 1993; Hilaire i wsp., 2010).

Serotonina jest ważnym modulatorem rytmu i wzorca oddechowego. Jej znaczenie potwierdziły badania na myszach transgeniczných, nieposiadających neuronów

serotonergicznych, których oddychanie charakteryzowało się obniżoną wentylacją i częstymi epizodami bezdechu (Hodges i wsp., 2009). Bezpośrednie mikroelektroforetyczne podanie 5-HT na neurony oddechowe opuszki pobudzało neurony aktywne na granicy wdechu i wydechu oraz hamowało pozostałe neurony wdechowe (Fallert i wsp., 1979).

Badania Manzeke i wsp. (2008, 2009) dowiodły, że hamujące lub pobudzające efekty systemowej serotoniny zależą od profilu receptorów 5-HT obecnych na konkretnej subpopulacji neuronów oddechowych. Z kolei, w doświadczeniach *in vitro* na skrawkach rdzenia przedłużonego i szyjnego odcinka rdzenia kręgowego nowo narodzonych szczurów, 5-HT działała pobudzająco na sieć neuronów generatora wzorca oddechowego oraz na motoneurony n. przeponowego (Morin i wsp., 1992; Lindsay i Feldman, 1993) poprzez aktywację odpowiednio receptorów 5-HT₁ oraz 5-HT₂ (Morin i wsp., 1990).

Jądra oddechowe rdzenia przedłużonego wykazują ekspresję wielu różnych typów receptorów 5-hydroksytryptaminy, z których receptor 5-HT₂ odgrywa zasadniczą rolę w generacji rytmu oddechowego. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na skrawkach rdzenia przedłużonego gryzoni z użyciem agonistów i antagonistów receptora 5-HT₂, udowodniono, że jego aktywacja pobudzała, natomiast blokada hamowała bądź znosiła aktywność komórek rozrusznikowych kompleksu pre-Bötzingera (Pena i Ramirez, 2002; Gunther i wsp., 2006; Tryba i wsp., 2006).

Receptor 5-HT₂ wydaje się być zaangażowany w mechanizm odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Jacono i wsp., 2005). Świadczy o tym zwiększone uwalnianie serotoniny w grzbietowo-przyśrodkowej części rdzenia przedłużonego (NTS, jądro motoryczne n. błędnego i jądro n. podjęzykowego) podczas hipoksji oraz wpływ blokady ośrodkowego receptora 5-HT₂ na dynamikę odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Charakteryzowało ją opóźnione pojawienie się stymulacji oddychania i zniesienie depresyjnej fazy odpowiedzi na hipoksję (Kanamaru i Homma, 2009).

Aktywacja ośrodkowych receptorów 5-HT₂ wpływa modulująco na oddechowe neurony ruchowe, pobudzając tonicznie m.in. motoneurony n. podjęzykowego (Kubin i wsp., 1992; Brandes i wsp., 2006; Gunther i wsp., 2006). Pobudzające działanie serotoniny na aktywność nerwu XII szczura zachodzi najprawdopodobniej poprzez aktywację receptorów: 5-HT_{2A} i 2C (Fenik i Veasey, 2003), a według Gunther i wsp. (2006) 5-HT_{2A} i 2B. Nerw podjęzykowy odgrywa istotną rolę w utrzymaniu drożności górnych dróg oddechowych. Zmiany w nerwowej regulacji napięcia mięśnia bródkowo-językowego mogą mieć znaczenie w patogenezie bezdechu typu obturacyjnego, spowodowanego zablokowaniem dróg oddechowych na poziomie gardła (Deegan i wsp., 1995; Dempsey i wsp., 2010). Udowodniono, że zmniejszone wydzielanie serotoniny w jądrze ruchowym n. podjęzykowego wywołuje spadek aktywności motoneuronów tegoż nerwu w modelu snu paradoksalnego, a pobudzenie receptorów 5-HT₂ może temu skutecznie przeciwdziałać (Kubin i wsp., 1994, 1996).

W przebiegu ChP obserwuje się zmiany w układzie serotonergicznym (Alex i Pehek, 2007; Huot i wsp., 2011). U chorych zaobserwowano dystrofię komórek nerwowych produkujących 5-HT w jądrach szwu, oraz spadek poziomu serotoniny w płynie mózgowo-rdzeniowym i takich obszarach mózgu jak: prążkowie, substancja czarna, wzgórze, podwzgórze, kora mózgowa i hipokamp (Braak i wsp., 2000; Scatton i wsp., 1983; Kish i wsp., 2008; Huot i wsp., 2011).

Wobec powyższych informacji wskazujących, że serotonina jest kluczowym neuroprzekaźnikiem w regulacji oddychania, zmiany jej poziomu pojawiające się w chorobie Parkinsona mogą wpływać na zmiany wzorca oddechowego, odpowiedź oddechową na hipoksję, a także na aktywność motoneuronów oddechowych.

1.7 Zwierzęcy model choroby Parkinsona

Eksperymentalne modele ChP są niezbędne w poznaniu potencjalnych patomechanizmów tej choroby. W modelowaniu ChP ważny postęp przyniosło wprowadzenie neurotoksyny z grupy katecholamin, 6-hydroksydopaminy (6-OHDA), która transportowana zarówno do ciał komórek nerwowych jak i ich włókien powoduje degenerację neuronów dopaminergicznych i noradrenergicznych (Ungerstedt, 1968).

Domózgowe podanie 6-OHDA szczurom wywołuje kliniczne objawy ChP pojawiające się w wyniku uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w układzie nigrostriatalnym. Toksyczność 6-OHDA opiera się na silnym hamowaniu enzymów mitochondrialnych I i IV kompleksu łańcucha oddechowego oraz wywoływaniu stresu oksydacyjnego prowadzącego do utraty aktywności hydroksylazy tyrozynowej, enzymu odpowiedzialnego za syntezę dopaminy (Glinka i wsp, 1997; Deumens i wsp, 2002). Domózgowa iniekcja 6-OHDA pozwala selektywnie uszkadzać rejony mózgu, do których podano neurotoksynę. 6-OHDA wstrzykiwana jest zazwyczaj do istoty czarnej zbitej, pęczka przyśrodkowego przedomózgowia (MFB), lub do prążkowie (kompleks: jądro ogoniaste-skorupa) (Deumens i wsp., 2002). W celu uniknięcia jednoczesnej degeneracji neuronów noradrenergicznych podaje się zwierzętom dezypraminę, bloker transportera noradrenaliny, który zapobiega wychytowi 6-OHDA przez te neurony.

Jednym z częściej stosowanych modeli parkinsonizmu, imitującym zarówno utratę neuronów dopaminergicznych jak i zmiany w behawiorze, jest model wywołany podaniem 6-OHDA do pęczka przyśrodkowego przedomózgowia, czyli do aksonów neuronów dopaminergicznych istoty czarnej zbitej biegnących do prążkowie. Iniekcja 6-OHDA do MFB uruchamia wsteczny transport neurotoksyny do ciał komórek nerwowych powodując ich degenerację oraz nagłe i rozległe wyczerpanie DA w prążkowie (Sun i wsp., 2011). Model z podaniem jednostronnym do MFB jest szeroko stosowany w badaniach nad

mechanizmami neuroprzeobrażania dopaminergicznego oraz patofizjologią neurodegeneracji, zmian poznawczych i emocjonalnych w ChP (Tadaiesky i wsp., 2007; Carvalho i wsp., 2013). Jednostronna iniekcja 6-OHDA do MFB powoduje całkowite zniszczenie komórek grupy A9 (istota czarna) i A10 (pole brzuszne nakrywki), w wyniku czego dochodzi do praktycznie całkowitego ubytku dopaminy w ipsilateralnym prążkowie (Perese i wsp., 1989; Dunnett i wsp., 1981; Torresa i wsp., 2011). Jednostronnie uszkodzone szczury iniekcją do MFB wykazywały bardziej rozległą neurodegenerację od obserwowanej w ludzkim idiopatycznym parkinsonizmie (Perese i wsp., 1989; Deumens i wsp., 2002).

Upośledzenie ruchowe obecne w modelu jednostronnym zostało bardzo precyzyjnie scharakteryzowane (Schwartz i Huston, 1996). W teście RotaRod obserwuje się u zwierząt asymetryczny behavior w odpowiedzi na podanie amfetaminy i apomorfiny (Perese i wsp., 1989) oraz preferencyjne użycie łap ipsilateralnych do półkuli traktowanej neurotoksyną (Barneoud i wsp., 1995; Jeyasingham i wsp., 2001).

Obustronny model, pomimo że lepiej odzwierciedla chorobę Parkinsona (Deumens i wsp., 2002), jest używany rzadziej, ponieważ obustronne wstrzyknięcie 6-OHDA bywa traumatyczne, powoduje afagię, brak pragnienia oraz dużą śmiertelność (Ungerstedt, 1971). Za użyciem jednostronnego modelu przemawiają też obserwacje pacjentów z ChP charakteryzujących się asymetryczną degeneracją neuronów dopaminergicznych oraz lateralizacją objawów klinicznych (Djaldetti i wsp., 2006; Hobson, 2012).

2. CEL PRACY

Mechanizmy leżące u podstaw zmian w regulacji oddychania w aspekcie ChP są w niewielkim stopniu poznane i wymagają dalszych badań. Celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu jednostronnego uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego szczura podaniem 6-OHDA do prawego pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB) na nerwową aktywność oddechową z uwzględnieniem roli układu dopaminergicznego i serotonergicznego.

Szczegółowe cele obejmują:

- Ustalenie zmian wzorca oddechowego w normoksji oraz w reakcji oddechowej na bodziec hipoksyjny i hiperkapniczny
- Zbadanie wpływu pobudzenia/blokady receptorów dopaminergicznych D₂ i serotonergicznych 5-HT₂ na zmiany parametrów wentylacyjnych i odpowiedź oddechową na hipoksję
- Określenie wpływu uszkodzenia neuronów dopaminergicznych na aktywność nerwu podjęzykowego i przeponowego, stanowiących nerwowy napęd oddechowy odpowiednio dla mięśni górnych dróg oddechowych i przepony w normoksji i hipoksji
- Ocena zmian w zawartości amin katecholowych oraz ich metabolitów w prążkowie i pniu mózgu wywołanych prawostronną iniekcją 6-OHDA
- Określenie zmian motoryki zwierząt w zastosowanym modelu doświadczalnym

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Zwierzęta

Procedury doświadczalne zostały przeprowadzone na podstawie zgody nr: 37/2010, wydanej przez IV Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Badania wykonano na młodych dorosłych samcach szczurów stada Cmd: (WI)WU Wistar o masie 230-260 g na początku eksperymentu. Zwierzęta przetrzymywano w standardowych warunkach laboratoryjnych w 12-godzinnym cyklu dzień/noc, ze swobodnym dostępem do pożywienia i wody.

3.2 Iniekcja 6-OHDA do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia

Szczury wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego podając dootrzewnowo tiopental sodu (Sandoz, Austria), w dawce 90 mg/kg rozpuszczony w 0,9% fizjologicznym roztworze soli (NaCl). Uśpione zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym (Stoelting, USA). W celu uniknięcia uszkodzenia nerwów noradrenergicznych przez 6-OHDA, 30 minut przed podaniem neurotoksyny zwierzęta otrzymywały dootrzewnową iniekcję wodnego roztworu chlorowodoru dezypraminy (25 mg/kg, Sigma-Aldrich, Polska).

Przy wykorzystaniu wiertła dentystycznego wykonywano dwa niewielkie otwory w czaszce zgodnie ze współrzędnymi stereotaktycznymi wg. Paxinos i Watson (2007). Iniekcję 6-hydroksydopaminy lub jej rozpuszczalnika do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia wykonywano zgodnie z następującymi koordynatami: I miejsce: AP -2.2, L +1.5, D -7.9, II miejsce: AP -4.4, L +1.5, D -7.9.

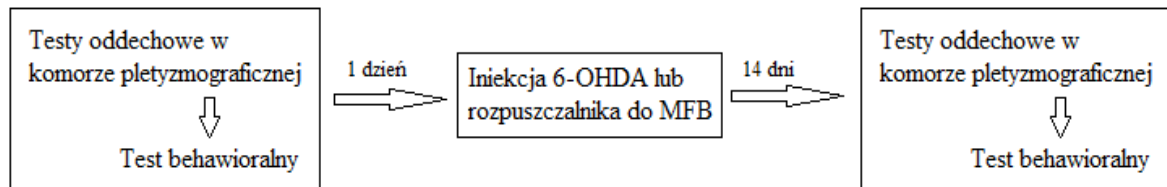
6-hydroksydopaminę (Sigma-Aldrich, Polska) podawano sterylną strzykawką Hamiltona w roztworze 0,9% NaCl z dodatkiem 0,1% kwasu askorbinowego w objętości 5 μ l na miejsce, z prędkością 1 μ l/min (stężenie 6-OHDA wynosiło 4 μ g/ μ l).

Po zakończeniu iniekcji igłę pozostawiano w mózgu na 5 minut aby zapobiec wypływowi roztworu, następnie powoli ją wysuwano. Powstałą ranę zaszywano. Tę samą procedurę stosowano w lezji pozorowanej (sham) z iniekcją fizjologicznego roztworu soli z dodatkiem 0,1% kwasu askorbinowego, bez 6-OHDA. Po operacji zwierzęta przetrzymywano dwa tygodnie w standardowych warunkach laboratoryjnych z dostępem do wody i jedzenia.

3.3 Testy oddechowe w komorze pletyzmograficznej

Pomiary wentylacji przeprowadzono przy użyciu systemu pletyzmograficznego firmy Buxco Electronics (model PLY 3223, Buxco Electronics, USA) dla zwierząt czuwających. W skład systemu wchodzi komora pletyzmograficzna o pojemności 3,7 litra. Komora podzielona jest na część doświadczalną i referencyjną, obie wyposażone w dwa pneumatografy rejestrujące fluktuacje ciśnienia wytworzone przez wdechy i wydechy zwierząt doświadczalnych. Różnica ciśnienia między komorą doświadczalną a referencyjną jest mierzona za pomocą przetwornika analogowo-cyfrowego. Sygnał wysyłany z tego urządzenia jest następnie wzmacniany i integrowany przez oprogramowanie do analizy danych (Biosystem XA dla środowiska Windows, Buxco Electronics, USA). Wentylację minutową (V_E), objętość oddechową (V_T) i częstotliwość oddychania (f) mierzono w czasie rzeczywistym. Część doświadczalna komory podłączona jest do pompy powietrza o przepływie 2,5 L/min. Umożliwia to szybką wymianę powietrza w komorze między testami i usunięcie gromadzącego się CO₂. Do komory podpinano 5 litrowy worek gumowy, przy pomocy którego podawano mieszanki gazowe (bodźce chemiczne). Testowano odpowiedź

na bodziec hipoksyjny (3 minuty, 8% O₂ w 92% azotu) oraz hiperkapniczny (3 minuty, 7% CO₂ w 93% tlenu). Zwierzęta badano dwukrotnie: przed (kontrola) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA według schematu przedstawionego poniżej.



Ryc. 1. Schemat przeprowadzanych testów w komorze pletyzmograficznej (zwierzęta nieuśpione).

Szczura umieszczano w komorze pletyzmograficznej (Ryc. 2) w powietrzu atmosferycznym i pozostawiano na ok. 30 min w celu adaptacji. Po tym czasie testowano przez 3 min odpowiedź oddechową na hipoksję. Bodziec hipoksyjny podawano poprzez wtłoczenie mieszanki gazowej z worka do komory, po wyłączeniu pompy z powietrzem atmosferycznym. Po przeprowadzonym teście włączano pompę wtłaczającą powietrze atmosferyczne do komory. Przez cały czas trwania eksperymentu prowadzono rejestrację czynności oddechowej. W przypadku konieczności powtórzenia testu wykonywano go po 10 minutach od poprzedniej próby.

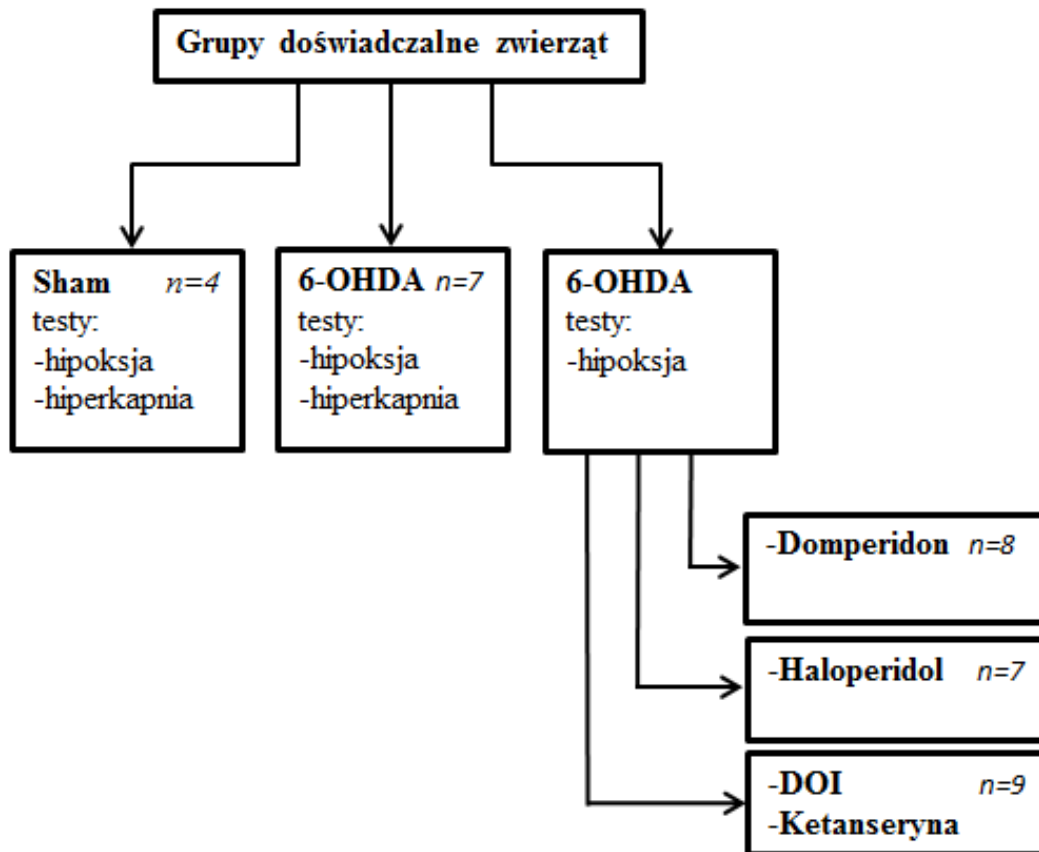
30 min po hipoksji zwierzęta testowano na odpowiedź oddechową na hiperkapnię. Badanie przeprowadzano w identycznym schemacie, jak w przypadku testu hipoksyjnego. Kontrolę poprzedzającą podanie mieszanki gazowej stanowił uśredniony 30 sekundowy odcinek oddychania w normoksji. Trwającą 3 min hipoksję/ hiperkapnię podzielono na 30 sekundowe odcinki czasowe uśredniając ostatnie 10 sekund każdego z odcinków dla poszczególnych analizowanych parametrów. Po teście (5 min po zastosowaniu bodźca) uśredniano 30 sekundowy odcinek rejestrowanej wentylacji w celu określenia powrotu do stanu wyjściowego po hipoksji/ hiperkapni.



Ryc. 2. Fotografia szczura w trakcie eksperymentu w komorze pletyzmograficznej

3.3.1 Grupy doświadczalne

Do doświadczeń w komorze pletyzmograficznej wyłonione zostały następujące grupy zwierząt:



Ryc. 3. Grupy doświadczalne zwierząt: przeprowadzone testy i badane związki w komorze pletyzmograficznej.

3.3.2 Testowanie odpowiedzi oddechowej po iniekcji agonistów lub/i antagonistów

Wszystkie związki testowane w doświadczeniach były podawane zwierzętom w zależności od badanej grupy, w formie dootrzewnowej iniekcji w końcowej objętości 0,3 ml. Po 20 minutach od podania wykonywano test hipoksyjny wg schematu przedstawionego na Ryc. 1. Układ ten stosowano zarówno przed leżą z użyciem 6-OHDA

jak i 14 dni po niej. Zastosowane związki, ich dawki oraz sposób rozpuszczania zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Związki agonistyczne i antagonistyczne zastosowane w doświadczeniach oddechowych.

| Badany związek | Charakterystyka związku | | Dawka (mg/kg) | Rozpuszczalnik | |
|---|---|----------------------------------|---------------|----------------|----------------------|
| | Działanie | Przekraczanie bariery krew- mózg | | | |
| Domperidon | Dopaminergiczne receptory D ₂ | Antagonista | Nie | 1 | NaCl 0,9% + HCl 0,2% |
| Haloperidol | | Antagonista | Tak | 1 | NaCl 0,9% |
| DOI (2,5-dimetoksy-4-jodoamfetamina) | Serotoninergetyczne receptory 5-HT ₂ | Agonista | Tak | 1,5 | H ₂ O |
| Ketanseryna | | Antagonista | Tak | 1 | H ₂ O |

3.4 Badanie aktywności nerwów podjęzykowego i przeponowego. Test hipoksyjny

W celu określenia wpływu lezji na aktywność nerwów podjęzykowego i przeponowego z wykluczeniem komponenty mięśniowej i odruchów płucnych przeprowadzono doświadczenia na szczurach uśpionych, porażonych i poddanych wagotomii.

Na początku eksperymentu zwierzęta wprowadzano w stan uśpienia ogólnego przy użyciu mieszaniny uretanu (800 mg/kg, Sigma Aldrich, Polska) i α -chloralozy (70 mg/kg, Sigma Aldrich, Polska). Szczury ułożone były w pozycji poziomej na grzbiecie, na podgrzewanym stole operacyjnym. Skórę i mięśnie szyi przecinano w linii środkowej, w celu odsłonięcia tchawicy do której wprowadzano rurkę tracheotomijną. W prawym dole pachwinowym wypreparowano żyłę i tętnicę udową, do których wprowadzano kaniule

polietylenowe (o średnicy 0,58/0,965 mm) wypełnione roztworem fizjologicznym soli z dodatkiem 0,1% roztworu heparyny (Polfa, Warszawa). Kaniula umieszczona w żyłę udowej służyła do podawania dodatkowych dawek narkozy i środka zwiotczającego, natomiast znajdująca się w tętnicy udowej, do pomiaru ciśnienia tętniczego krwi (miernik ciśnienia: BP-2 monitor, Columbus Instruments, USA). Następnie izolowano nerwy: przeponowy i podjęzykowy, przecinano na wysokości szyi i ich wyjścia ośrodkowe umieszczano na srebrnych dwubiegunowych elektrodach do rejestracji aktywności bioelektrycznej.

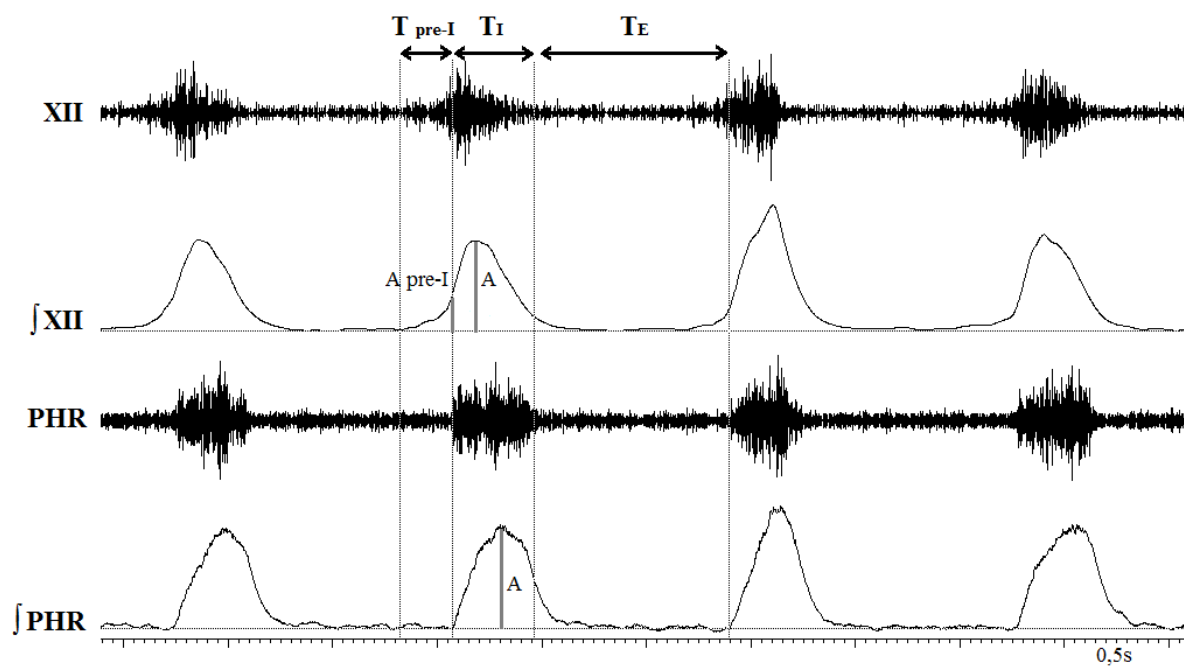
Aktywności obu nerwów były wzmacniane, filtrowane (5-2500 Hz) i integrowane (stała czasowa-70 ms) przy użyciu systemu NeuroLog (Digitimer Ltd., UK). Surowe i zintegrowane aktywności nerwów oraz ciśnienie krwi były digitalizowane z zastosowaniem interfejsu CED Power 1401 oraz analizowane przy użyciu programu Spike 2 (Cambridge Electronic Design, CED, UK).

Nerwy błędne izolowano w odcinku szyjnym i następnie przecinano poniżej krtani w celu wyeliminowania aktywności oddechowej związanej z odruchem inflacyjnym indukowanym przez pompę oddechową. Po zwiotczeniu mięśni bromkiem pipekuronium (Arduan, Gedeon-Richter, Germany) w dawce 80 µg/kg zwierzęta podłączono do respiratora (7025 Rodent Ventilator, Ugo Basile, Italy) i sztucznie wentylowano. Częstość pompy oddechowej dobierano indywidualnie do rytmu oddechowego szczura w oparciu o optymalny sygnał aktywności nerwu przeponowego. Ciepłotę ciała zwierząt utrzymywano na poziomie normotermii (37-38⁰ C).

Podczas eksperymentu rejestrowano aktywność elektryczną nerwów (amplituda i częstotliwość wyładowań) oraz testowano reakcję oddechową na bodziec hipoksyjny (hipoksja 8%). Po ustabilizowaniu sygnału bioelektrycznego z nerwów, do pompy oddechowej podłączano worek z mieszaniną hipoksyjną na okres 1,5 minuty. W przypadku

osiągnięcia bezdechu natychmiast odłączano mieszanę gazową. Kolejny bodziec hipoksyjny podawano po upływie 15 minut.

Na podstawie uzyskanych neurogramów (Ryc. 4.) nerwu przeponowego (PHR) i podjęzykowego (HG) wyliczano czas wdechu (T_I) i wydechu (T_E). Początek wdechu wyznaczał punkt, w którym wzrastała aktywność nerwu przeponowego (sygnał zintegrowany), a jego koniec określano jako 50% spadek maksymalnej amplitudy. Czas wydechu wyliczano między początkiem i końcem wdechu. Czas całkowity trwania cyklu oddechowego (T_C) był sumą T_I i T_E . Amplitudę aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego ($A_{pre-I HG}$) wyliczano z wielkości sygnału zintegrowanej aktywności nerwu podjęzykowego, w punkcie odpowiadającym początkowi aktywności nerwu przeponowego. Wyliczano także czas przedwdechowej aktywności nerwu HG ($T_{pre-I HG}$) jako czas upływający pomiędzy początkiem aktywności nerwu HG, a początkiem aktywności PHR. Obliczano także aktywność minutową obu nerwów, którą stanowi iloczyn amplitudy oraz częstotliwości wyładowań. Do dalszej analizy uśredniano wartości badanych parametrów z 10 s odcinków neurogramów w normoksji, w trakcie hipoksji i po zakończeniu działania bodźca.



Ryc. 4. Przykładowy elektroneurogram aktywności nerwów podjęzykowego (XII) oraz przeponowego (PHR), z przedstawieniem parametrów cyklu oddechowego, wyliczanych w doświadczeniach. Zapisy zintegrowane oznaczono symbolem: ∫. Na rycinie zaznaczono: czas wdechu (T_I), czas przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego (T_{pre-I}), czas wydechu (T_E), amplitudę aktywności (A) nerwu podjęzykowego, przeponowego, amplitudę przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego (A pre-I).

Doświadczenia na zwierzętach uspianych z elektrofizjologiczną rejestracją aktywności nerwów zostały przeprowadzone na dwóch grupach szczurów:

- 6-OHDA (n=10)
- sham (n=8)

3.5 Analiza histochemiczna

Po zakończeniu eksperymentów w celu pobrania tkanki mózgowej szczury uspiano podając dootrzewnowo roztwór uretanu (750 mg/kg) i α -chloralozy (150 mg/kg). Zwierzęta poddawano perfuzji przez serce roztworem fizjologicznym soli zbuforowanej fosforanem (PBS-100 ml), a następnie paraformaldehydem w PBS (4%-100 ml). Całe mózgi utrwalano umieszczając je w 4% paraformaldehydzie na 4 godziny w 4°C , i przechowywano przez 24h w 20% roztworze sacharozy w tej samej temperaturze w celu krioprotekcji. Po tym

etapie mózgi przechowywano w -80°C . Zamrożone mózgi cięto na skrawki grubości 20 mikrometrów stosując kriostat Leica CM1850 UV (Niemcy).

Skrawki sąsiadujące ze śladem po igle, powstałym w wyniku mikroiniekcji 6-OHDA lub rozpuszczalnika, barwiono immunohistochemicznie wykorzystując przeciwciała przeciwko hydroksylazie tyrozynowej (TH). Niespecyficzne wiązania blokowano 3% kozią surowicą (Sigma Chemicals, Australia). Skrawki inkubowano z mysim przeciwciałem monoklonalnym przeciw hydroksylazie tyrozynowej (Sigma Chemicals, Australia). Monoklonalne przeciwciało II rzędowe przeciw-mysie związane było z peroksydazą chrzanową (HRP). Cała procedura przeprowadzona została zgodnie z instrukcją firmy DAKO (USA). Skrawki oglądano pod mikroskopem świetlnym (Nikon, Japonia). W celu określenia ubytku neuronów dopaminergicznych, komórki zliczano z 3 kolejnych skrawków mózgu z obszaru istoty czarnej po stronie kontralateralnej i ipsilateralnej względem miejsca iniekcji 6-OHDA. Następnie uśrednione wartości przeliczono na procentowy ubytek komórek dopaminergicznych. Punkt odniesienia (100%) stanowiła nieuszkodzona lewa istota czarna względem prawej z podaniem 6-OHDA do MFB.

3.6 Analiza homogenatów prążkowiec i pnia mózgu metodą HPLC

W celu pobrania tkanki mózgowej zwierzęta usypiano przez dootrzewnowe podanie mieszanki uretanu (750 mg/kg) i α -chloralozy (150 mg/kg) rozpuszczonej w fizjologicznym roztworze NaCl. Po wyjęciu mózgu na suchym lodzie preparowano prążkowiec i pień mózgu z podziałem na strony lewą i prawą. Zważoną tkankę zamrażano do oznaczeń biochemicznych w -80°C . Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń materiał homogenizowano (przy użyciu sonifikatora Vir Sonic 60; VIR TIS) w 1000 μl roztworu zawierającego: 0,1M kwas nadchlorowy HClO_4 oraz 0,05 mM kwas askorbinowy. Następnie próbki wirowano przez 15 min z prędkością 13000 obrotów/min (Labofuge 400R

Haereus Instruments). Otrzymywany nadsącz filtrowano (filtr strzykawkowy 0,2 μm ; Whatman, USA) i poddano dalszej analizie biochemicznej.

Stężenie amin katecholowych i odpowiednich metabolitów: dopaminy oraz jej metabolitu pośredniego kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), noradrenaliny (NA) oraz jej metabolitu, czyli kwasu 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolowego (MHPG), jak również serotoniny i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA), oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC-ED) (L-3500 detektor; Merck, Niemcy). Analizę biochemiczną przeprowadzono przy użyciu układu chromatografu, na który składał się: detektor elektrochemiczny z elektrodą szklano-węglową (L – 3500A, MERCK), autosampler (Knauer Basic Marathon) oraz pompa (Mini-Star K-500, Knauer). Rozdziału monoamin dokonano przy użyciu kolumny C-18 (250 x 4,6 mm Nucleosil, 5 μm , Macherey–Nagel, Niemcy) przy przepływie 0,8 ml/min w odwróconym układzie faz i przy potencjale 0,8 V. Na kolumnę, na której następował rozdział izokratyczny związków, wprowadzano homogenaty z pobranych struktur w objętości 20 μl . Fazę mobilną w tym układzie stanowił bufor zawierający: 32 mM fosforanu sodu (Sigma-Aldrich, USA), 34 nM kwasu cytrynowego (Sigma-Aldrich, USA), 1mM octanu kwasu sulfonowego (Sigma-Aldrich, USA), 54 μM kwasu etylenodiamiotetraoctowego (EDTA; Sigma-Aldrich, USA), dodawanych do dejonizowanej wody (18 M Ω), zawierającej 12% metanol (MERCK, Niemcy). Frakcje wypłukiwane z kolumny były rejestrowane komputerowo. Dane analizowano przy użyciu programu ClarityChrom software (Knauer, Germany). Stężenie badanych substancji w próbkach obliczano w zestawieniu ze stężeniami standardów: DA, DOPAC, NA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA (Sigma-Aldrich, USA) i wyrażono w pg/mg tkanki.

3.7 Testy behawioralne i pomiar masy ciała

W celu potwierdzenia skuteczności przeprowadzonej lezji wykonano dwukrotnie behawioralny test cylindra, przed i po dwóch tygodniach od podania 6-OHDA. Test ten polegał na umieszczeniu szczura w przezroczystym cylindrze o średnicy 20 cm i wysokości 30 cm na okres 5 min, podczas których rejestrowano ruchy zwierzęcia przy użyciu kamery (iPhone 5). Zliczano następnie dotknięcia do ścian cylindra dla dwóch parametrów wznoszenia i opadania określając przy tym, której kończyny przedniej: lewej czy prawej zwierzę używa.

Przed i po 14 dniach od lezji zwierzęta były ważone w celu określenia wpływu uszkodzenia kompleksu nigrostriatalnego na zmiany masy ciała.

3.8 Analiza statystyczna

Zmiany badanych parametrów analizowano przy użyciu testu t-Studenta i dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Różnice między konkretnymi punktami czasowymi i sytuacjami doświadczalnymi szacowano za pomocą testu post-hoc (test Newmana-Keulsa). Korzystano również z testu U Manna-Whitneya (analiza zawartości amin biogennych we fragmentach tkanki mózgowej). Wyniki uznawano za znamienne, gdy poziom istotności P był mniejszy niż 0,05. Wartości obliczanych parametrów podane zostały jako średnie \pm błąd standardowy średniej (SEM).

4. WYNIKI

4.1.1 Oddychanie w grupie zwierząt czuwających, z uszkodzeniem pozorowanym (sham). Odpowiedź oddechowa na hipoksję i hiperkapnię

W doświadczeniach z uszkodzeniem pozorowanym, tj. z iniekcją samego rozpuszczalnika do MFB, oddychanie zwierząt charakteryzowało się podobnymi wartościami parametrów wentylacji do stanu sprzed lezji zarówno w normoksji jak i hipoksji (Tabela 2). Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła brak efektu lezji pozorowanej oraz pobudzający wpływ hipoksji na wszystkie parametry wentylacji przed i po iniekcji rozpuszczalnika.

Tabela 2. Parametry wentylacji w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt przed (Kontrola) i po iniekcji rozpuszczalnika do MFB (Sham).

| Parametry wentylacji | Grupa | Normoksja | Hipoksja | | | | Powrót |
|--|----------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| | | | 30s | 60s | 90s | 180s | |
| Objętość oddechowa (ml kg ⁻¹) | Kontrola | 8,2 ± 0,5 | 11,7 ± 0,7 *** | 11,0 ± 0,6 *** | 10,0 ± 0,4 ** | 9,6 ± 1,0 | 8,8 ± 0,5 |
| | Sham | 8,2 ± 0,4 | 12,5 ± 0,5 *** | 10,6 ± 0,3 *** | 10,0 ± 0,4 ** | 8,6 ± 0,3 | 8,7 ± 0,3 |
| Częstość oddychania (oddech min ⁻¹) | Kontrola | 119 ± 5,1 | 159 ± 4,8 *** | 162 ± 5,3 *** | 165 ± 4,2 *** | 183 ± 11,0 *** | 118 ± 7,9 |
| | Sham | 103 ± 6,9 | 147 ± 10,2 *** | 151 ± 4,7 *** | 156 ± 10,0 *** | 176 ± 4,7 *** | 106 ± 10,4 |
| Wentylacja minutowa (ml min ⁻¹ kg ⁻¹) | Kontrola | 943 ± 18,3 | 1873 ± 98,5 *** | 1750 ± 93,2 *** | 1647 ± 81,0 *** | 1610 ± 41,7 *** | 1009 ± 42,7 |
| | Sham | 839 ± 49,4 | 1725 ± 60,9 *** | 1586 ± 91,2 *** | 1522 ± 69,2 *** | 1491 ± 61,1 *** | 903 ± 80,8 |

Wszystkie wartości zostały podane jako średnie ± błąd standardowy średniej, n= 4.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji na objętość oddechową ($p < 0,001$), częstość oddychania ($p < 0,001$), wentylację minutową ($p < 0,001$); brak wpływu lezji pozorowanej na objętość oddechową ($p = 0,6$), częstość oddychania ($p = 0,12$), wentylację minutową ($p = 0,06$); oraz brak interakcji między lezją pozorowaną i hipoksją dla V_T ($p = 0,56$), f ($p = 0,95$) oraz V_E ($p = 0,8$).

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ oznacza znamienność statystyczną odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji. ANOVA, test Newman-Keulsa.

W grupie zwierząt sham nie zaobserwowano istotnych różnic w odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię w stosunku do stanu sprzed iniekcji rozpuszczalnika (Tabela 3). Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła stymulujący wpływ bodźca hiperkapnicznego na oddychanie dla wszystkich parametrów wentylacji w obu stanach zwierząt oraz brak wpływu lezji pozorowanej na zmiany badanych parametrów.

Tabela 3. Parametry wentylacji w odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię u zwierząt przed (Kontrola) i po iniekcji rozpuszczalnika do MFB (Sham).

| Parametry wentylacji | Grupa | Normoksja | Hiperkapnia | | | | Powrót |
|--|----------|------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | 30s | 60s | 90s | 180s | |
| Objętość oddechowa (ml kg ⁻¹) | Kontrola | 8,1 ± 0,6 | 11,8 ± 0,9 *** | 12,9 ± 1,4 *** | 13,5 ± 1,2 *** | 12,8 ± 1,0 *** | 10,5 ± 0,7 ** |
| | Sham | 7,9 ± 0,7 | 11,4 ± 0,6 *** | 12,0 ± 1,1 *** | 13,0 ± 1,3 *** | 11,9 ± 1,1 *** | 9,7 ± 0,5 * |
| Częstość oddychania (oddech min ⁻¹) | Kontrola | 109 ± 6,1 | 141 ± 5,3 *** | 151 ± 8,2 *** | 153 ± 8,2 *** | 163 ± 8,8 *** | 115 ± 6,9 |
| | Sham | 102 ± 5,8 | 140 ± 9,6 *** | 152 ± 14,4 *** | 150,3 ± 9,4 *** | 162 ± 16,7 *** | 111 ± 7,0 |
| Wentylacja minutowa (ml min ⁻¹ kg ⁻¹) | Kontrola | 880 ± 53,8 | 1655 ± 103 *** | 1920 ± 110 *** | 2023 ± 57 *** | 2073 ± 71,2 *** | 1166 ± 26,3 *** |
| | Sham | 798 ± 68,5 | 1576 ± 105 *** | 1790 ± 89,0 *** | 1917 ± 140 *** | 1888 ± 61,4 *** | 1071 ± 73,7 *** |

Wszystkie wartości podane zostały jako średnie ± błąd standardowy średniej, n= 4.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hiperkapni ($p < 0,001$), brak wpływu lezji pozorowanej ($p = 0,37$), oraz brak interakcji między lezją pozorowaną i hiperkapnią ($p = 0,87$) dla objętości oddechowej; wpływ hipoksji ($p < 0,001$) oraz brak wpływu lezji pozorowanej ($p = 0,6$) i brak interakcji między lezją pozorowaną i hiperkapnią ($p = 0,91$) dla częstości oddechowej; wpływ hiperkapni ($p < 0,001$) oraz brak wpływu lezji pozorowanej ($p = 0,8$) i brak interakcji między lezją pozorowaną i hiperkapnią ($p = 0,33$) dla wentylacji minutowej.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ oznacza znamienność statystyczną odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię względem kontrolnej normoksji. ANOVA, test Newmana-Keulsa.

4.2 Wpływ iniekcji 6-OHDA do MFB na oddychanie powietrzem atmosferycznym oraz reakcje na hipoksję i hiperkapnię u szczurów czuwających

4.2.1 Oddychanie normoksyjne

Eksperymentalne wywołanie ChP iniekcją 6-OHDA do prawego MFB nie wywołało zmian parametrów wentylacji płucnej podczas spoczynkowego oddychania powietrzem atmosferycznym. Zarówno przed jak i po lezji zwierzęta prezentowały

podobne, zbliżone wartości objętości oddechowej, częstości oddechowej oraz wentylacji minutowej (wartości w punkcie N, Ryc. 5 i 6).

4.2.2 Odpowiedź oddechowa na hipoksję

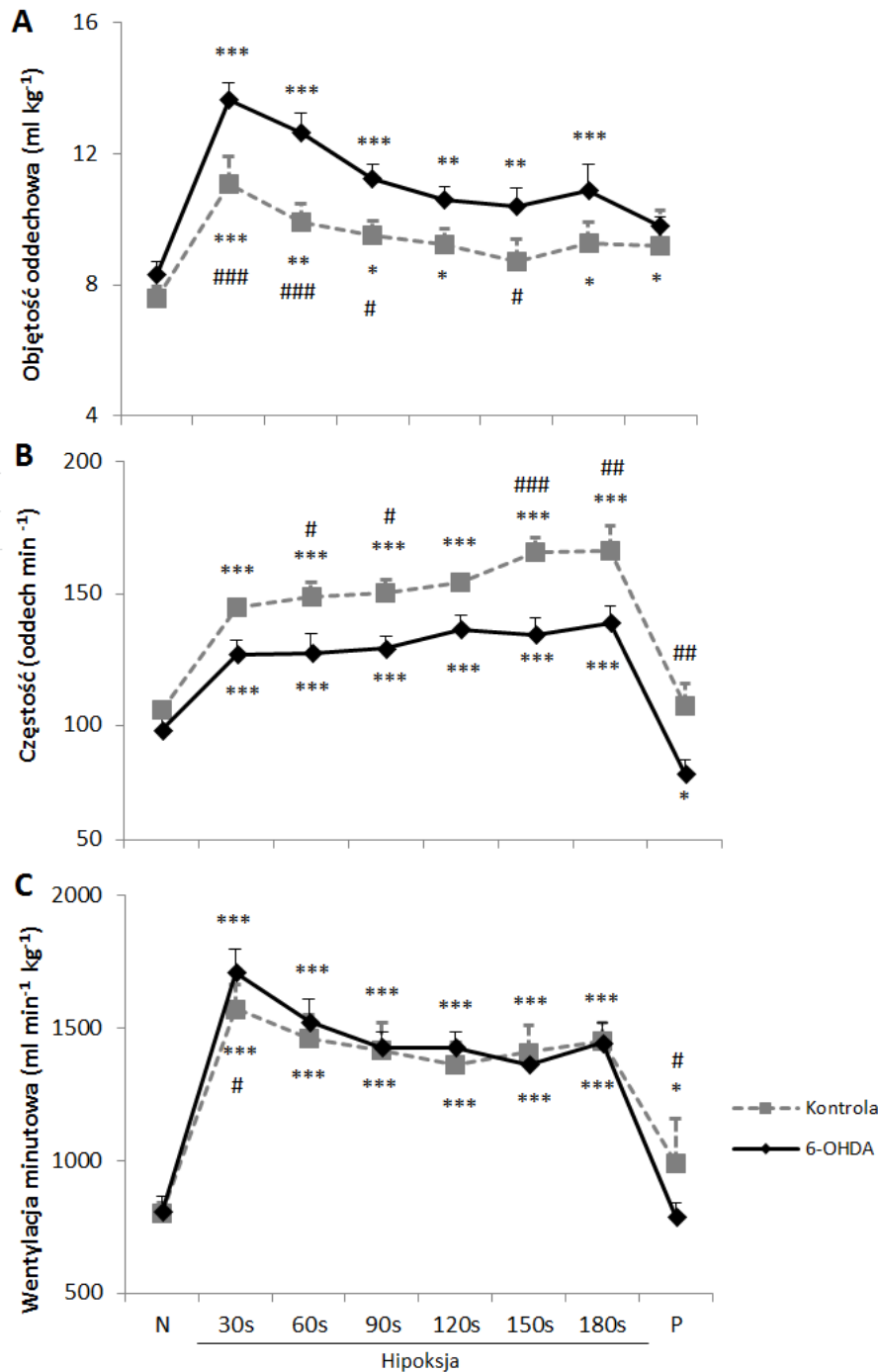
Reakcję oddechową na obniżoną zawartość tlenu (8% O₂ w N₂) w powietrzu wdychanym badano przed i 14 dni po podaniu 6-OHDA do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia.

Zarówno w warunkach kontrolnych jak i po lezji zaobserwowano istotną reakcję na bodziec hipoksyjny dla wszystkich parametrów wentylacji: V_T, V_E i f (Ryc. 5ABC). Uzyskane odpowiedzi oddechowe na hipoksję miały klasyczny dwufazowy przebieg z charakterystyczną szybką fazą wzrostu i następującą po niej wolniejszą fazą powrotu do wartości bazalnych, po ok. 5 minutach od zakończenia hipoksji.

Objętość oddechowa szczurów po lezji była istotnie zwiększona podczas reakcji oddechowej na hipoksję dla następujących punktów pomiaru: 30s (o 18%), 60s (22%), 90s (10%) i 150s (11%) w porównaniu do stanu kontrolnego przed lezją.

Częstość oddychania w odpowiedzi na hipoksję kształtowała się na niższym poziomie u zwierząt po iniekcji 6-OHDA w porównaniu do stanu przed lezją i uległa obniżeniu o 9% dla 60s, o 10% dla 90s, o 18% dla 150s, oraz o 13% dla 180s. Pełny powrót do wartości kontrolnych obserwowano po 5 min, natomiast po lezji utrzymywał się 22% spadek poniżej wartości wyjściowej (Ryc. 5B).

W badanym modelu ChP wentylacja minutowa charakteryzowała się znamienne większym przyrostem w punkcie maksymalnej odpowiedzi oddechowej na hipoksję (30s). Uśredniona odpowiedź V_E na hipoksję była większa w porównaniu do kontrolnej (przed iniekcją 6-OHDA) o 17% (Ryc. 5C).



Ryc. 5. Zmiany objętości oddechowej, częstości oddychania oraz wentylacji minutowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt przed (Kontrola; ■ linia przerywana) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (6-OHDA; ◆ linia ciągła). N – oznacza normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych po 5 minutach. Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między stanem przed i po lezji z użyciem 6-OHDA, $n = 6$. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ 6-OHDA ($p < 0,05$), wpływ hipoksji ($p < 0,001$) na objętość oddechową; efekt interakcji między 6-OHDA i hipoksją ($p < 0,001$) dla częstości oddechowej; wpływ hipoksji ($p < 0,001$) oraz wpływ interakcji między 6-OHDA i hipoksją ($p < 0,05$) na wentylację minutową.

4.2.3 Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię

Odpowiedź oddechowa na bodziec hiperkapniczny (7% CO₂ w O₂) charakteryzowała się wzrostem parametrów wentylacji płucnej bezpośrednio po podaniu bodźca do 180s, bez wyraźnego maximum odpowiedzi. Po 5 minutach od zakończenia działania bodźca obserwowano powrót do wartości kontrolnych.

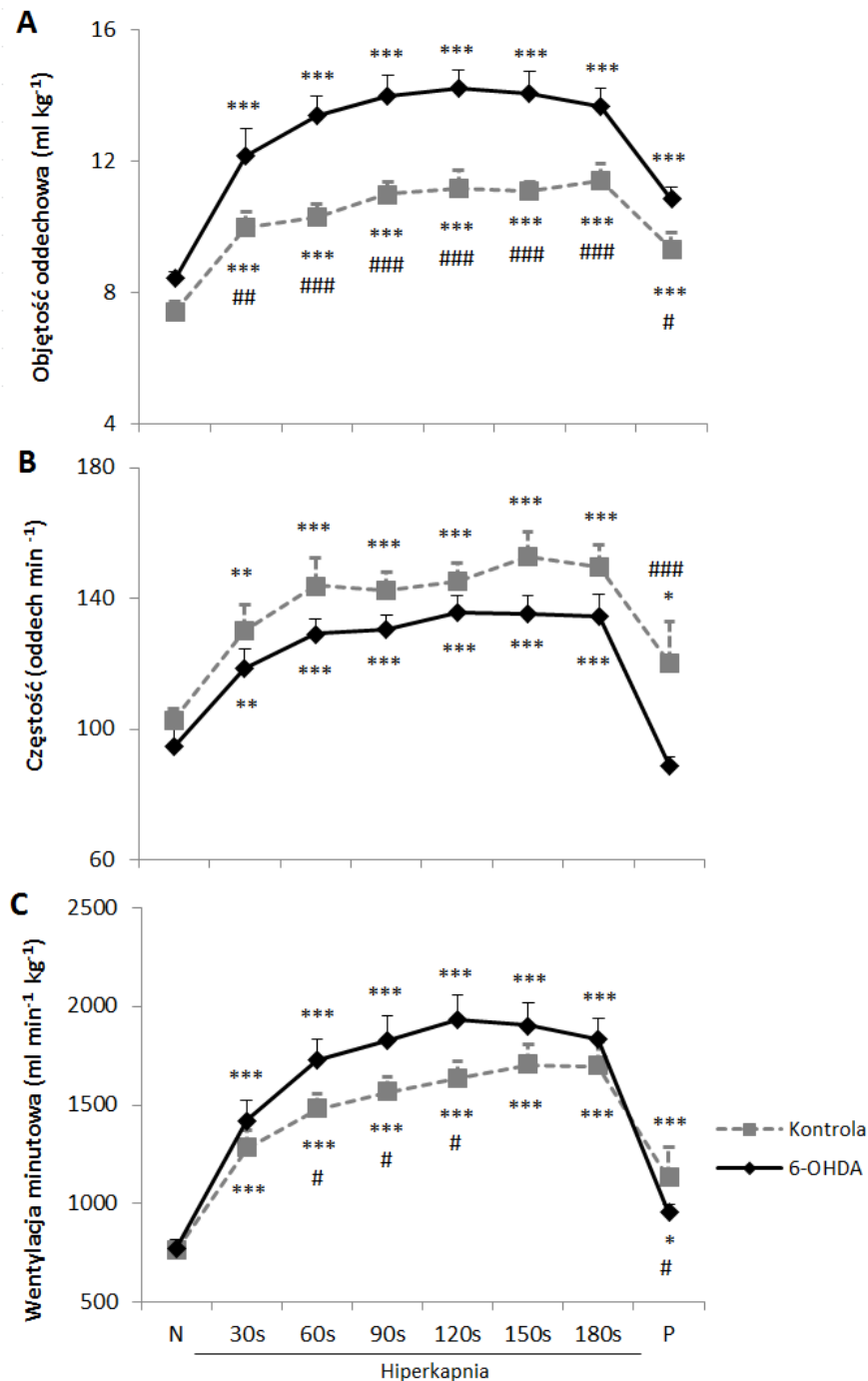
Zarówno przed, jak i po iniekcji 6-OHDA u zwierząt zaobserwowano istotne zwiększenie wszystkich parametrów wentylacji (V_T, V_E i f) w odpowiedzi na hiperkapnię (Ryc.6).

Eksperymentalnie wywołane uszkodzenie neuronów dopaminergicznych powodowało wyższy przyrost V_T i V_E oraz zredukowaną odpowiedź częstości oddychania na bodziec hiperkapniczny, przy jednoczesnym braku różnic parametrów w normoksji (Ryc. 6, punkt N).

Odpowiedź objętości oddechowej była podwyższona po lezji we wszystkich punktach czasowych reakcji na bodziec hiperkapniczny: o 13% dla 30 i 180s, o 26% dla 60s, o 22% dla 90s i 120s, o 23% dla 150s oraz o 7% po 5 minutach od aplikacji bodźca (Ryc. 6A).

Istotna różnica w reakcji częstości oddychania dotyczyła powrotu do wartości wyjściowych (punkt P) po hiperkapni. O ile w stanie kontrolnym utrzymywały się one na poziomie wyższym od wartości normoksyjnych, to po lezji nastąpiło dodatkowe obniżenie f poniżej tych wartości (Ryc. 6B).

Podczas odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię obserwowano znamienne wyższy przyrost V_E po wywołaniu ChP. Ulegał on zwiększeniu o 29% dla 30s, o 30% dla 90s, oraz o 33% dla 120s w porównaniu do stanu przed lezją (Ryc. 6C).



Ryc. 6. Zmiany objętości oddechowej (A), częstości oddychania (B) oraz wentylacji minutowej (C) w odpowiedzi na hiperkapnię u zwierząt przed (Kontrola; \square linia przerywana) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (6-OHDA; \blacklozenge linia ciągła). N – oznacza normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych (5 minut). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie \pm błąd standardowy średniej. ANOVA, test Newmana-Keuls, *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$. * – istotność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hiperkapniczny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między stanem przed i po iniekcji 6-OHDA, $n = 7$. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała: wpływ 6-OHDA ($p < 0,001$) i hiperkapni ($p < 0,001$), interakcję między tymi dwoma czynnikami ($p < 0,05$) dla V_T ; wpływ 6-OHDA ($p < 0,001$) i hiperkapni ($p < 0,001$) na f ; wpływ hiperkapni ($p < 0,001$), oraz interakcję między 6-OHDA i hiperkapnią ($p < 0,01$) we wpływie na V_E .

4.2.4 Wpływ blokady receptorów dopaminergicznych D_2 na oddychanie normoksyjne i odpowiedź oddechową na hipoksję

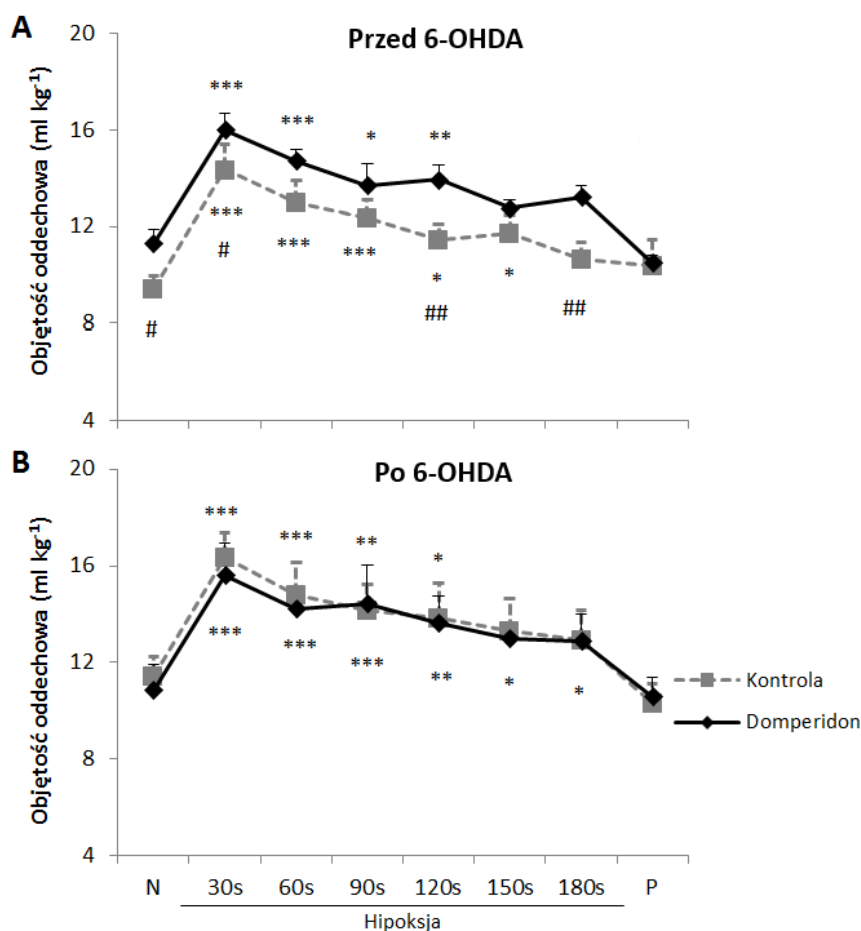
Antagonistę receptorów dopaminergicznych D_2 – domperidon podawano dootrzewnowo w dawce 1 mg/kg, celem blokady obwodowych receptorów D_2 . Bloker ten nie przekracza bariery krew-mózg

Po iniekcji domperidonu stwierdzono u zdrowych, czuwających szczurów stymulację oddychania w normoksji i w konsekwencji podwyższoną odpowiedź oddechową na hipoksję, wyrażoną zwiększonym wzrostem V_T (Ryc. 7A) i V_E (Ryc. 8A).

Objętość oddechowa w normoksji po blokadzie domperidonem wzrosła o 21%. Po bodźcu hipoksyjnym uległa dalszemu istotnemu zwiększeniu w trzech punktach czasowych: w 30s (o 8%), 120s (o 3%), 180s (o 4%).

Wentylacja minutowa zwiększyła się o 30% w czasie normoksji po podaniu domperidonu (Ryc. 8A). Wyższą odpowiedź oddechową V_E na bodziec hipoksyjny zaobserwowano w 30s (o 19%), 60s (o 16%), 90s (o 6%), 120s (o 2%), 150s (o 4%), i 180s (o 9%) w porównaniu do stanu kontrolnego przed iniekcją domperidonu. Nie zaobserwowano natomiast wpływu blokady receptorów D_2 na częstość oddychania.

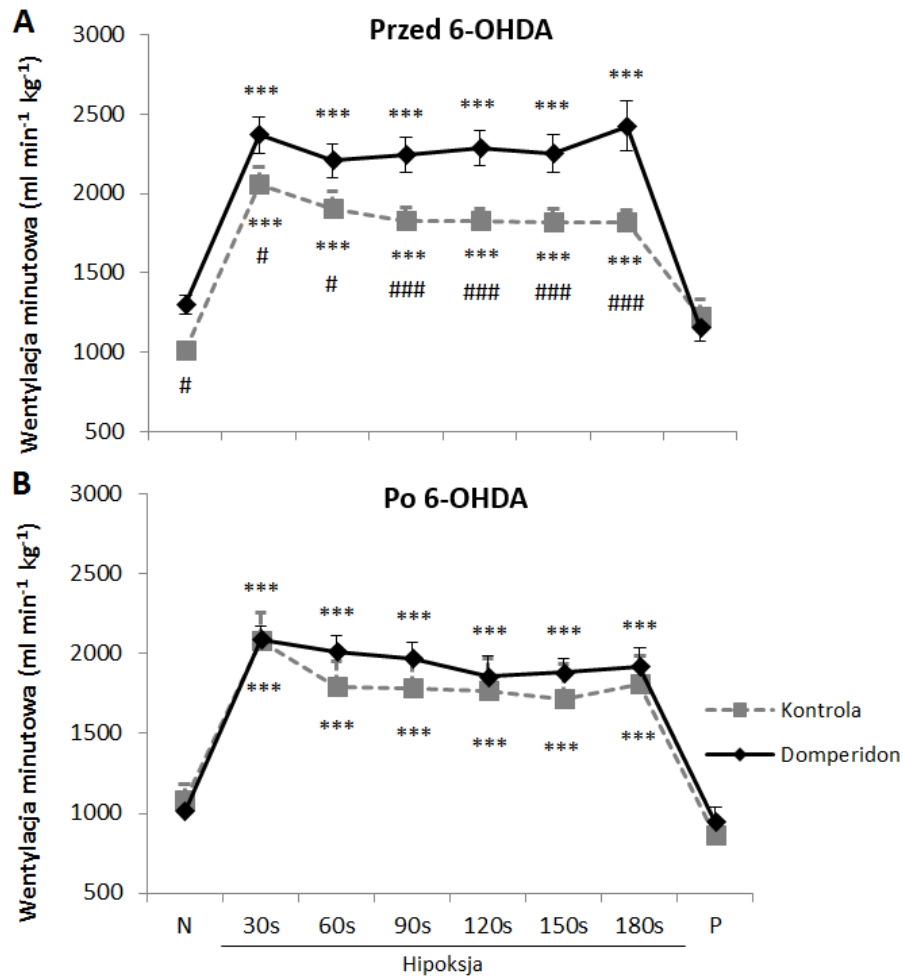
Po lezji z użyciem 6-OHDA zarówno oddychanie w normoksji jak i wielkość reakcji oddechowej na hipoksję nie były modyfikowane przez domperidon (Ryc. 7B, Ryc. 8B.).



Ryc. 7. Zmiany objętości oddechowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana) oraz po zablokowaniu obwodowych receptorów dopaminergicznych D₂ podaniem domperidonu (Domperidon; ◆ linia ciągła) przed (Przed 6-OHDA) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA). Literą N – oznaczono normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych (5 min). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej.

Test Newmana-Keulsa, *, # $p < 0,05$; **, ## ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). * – znamienność statystyczna odpowiedzi V_T na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna pomiędzy grupami kontrolną a domperidonem, $n = 8$.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ hipoksji przed i po lezji na objętość oddechową ($p < 0,001$).



Ryc. 8. Zmiany wentylacji minutowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana) oraz po zablokowaniu receptorów dopaminergicznych D₂ iniekcją domperidonu (Domperidon; ◆ linia ciągła) przed (Przed 6-OHDA) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA). Literą N – oznaczono normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych (5 min). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, # $p < 0,05$; ***, ### $p < 0,001$ * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej V_E na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami kontrolną a domperidonem, $n = 8$.

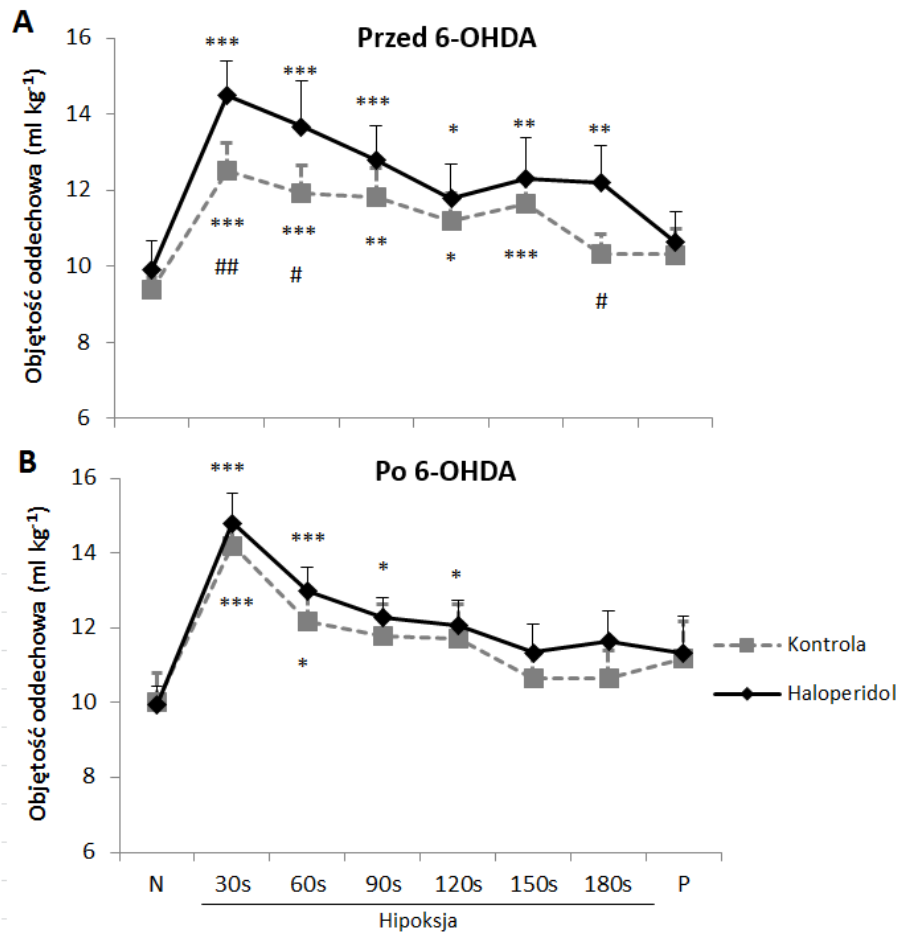
Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ domperidonu ($p < 0,01$), wpływ hipoksji ($p < 0,001$) oraz wpływ interakcji między domperidonem i hipoksją ($p < 0,05$) na wentylację minutową u zdrowych zwierząt oraz tylko wpływ hipoksji ($p < 0,01$) na V_E po leżzi.

W celu zbadania wpływu blokady ośrodkowych receptorów dopaminergicznych D_2 na oddychanie szczurów po lezji z zastosowaniem 6-OHDA podawano dootrzewnowo haloperidol. Antagonista ten przekracza barierę krew mózg, blokując zarówno obwodowe jak i ośrodkowe receptory dopaminergiczne D_2 . Iniekcja haloperidolu u kontrolnych, zdrowych zwierząt nie wpłynęła na wentylację normoksyjną, natomiast zwiększyła stymulację oddychania podczas trwania odpowiedzi oddechowej na hipoksję dla parametrów: V_T (Ryc. 9A) i V_E (Ryc. 10A).

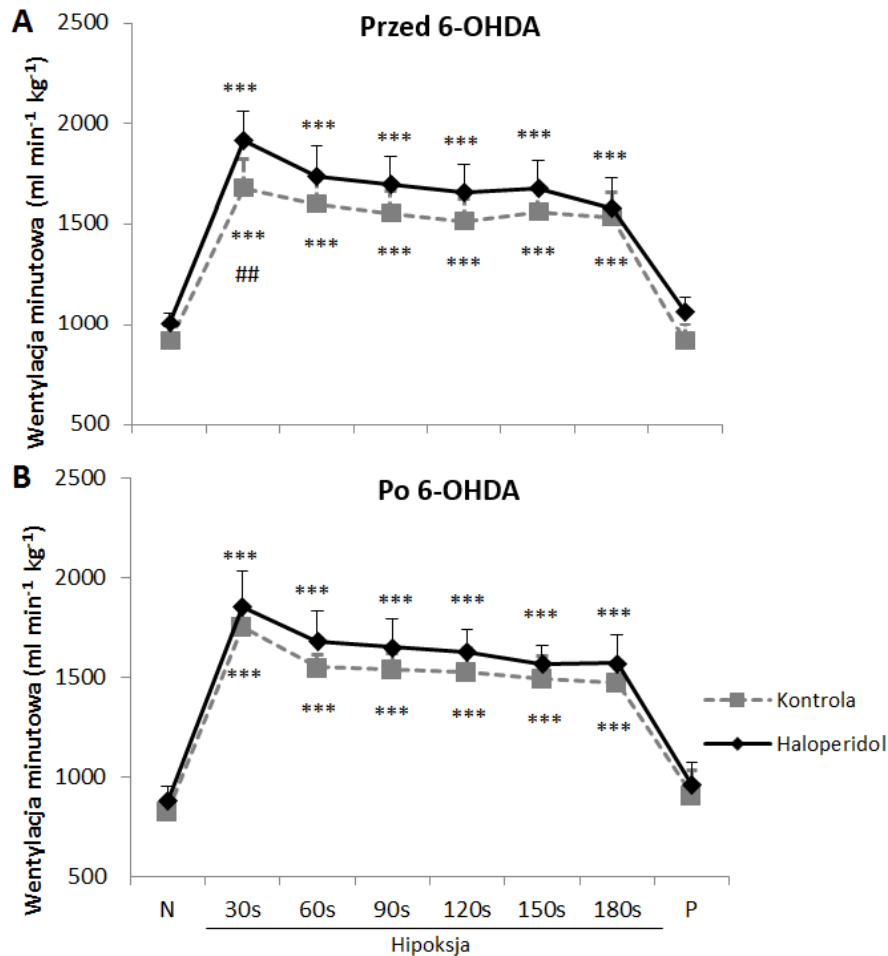
Po podaniu haloperidolu objętość oddechowa w trakcie hipoksji uległa istotnemu zwiększeniu w porównaniu do stanu przed zastosowaniem blokera dla 30s o 17%, oraz 60 i 180s o 13%.

Wzrost objętości przyczynił się do zwiększenia wentylacji minutowej o 8% w 30s hipoksji. Nie zaobserwowano zmian w częstości oddychania po zablokowaniu ośrodkowych i obwodowych receptorów D_2 .

W badanym modelu ChP, haloperidol nie powodował dodatkowego zwiększenia odpowiedzi oddechowej V_T i V_E na hipoksję (Ryc. 9B i 10B).



Ryc. 9. Zmiany objętości oddechowej w odpowiedzi na hipoksję w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana) oraz po zablokowaniu ośrodkowych i obwodowych receptorów dopaminergicznych D₂ haloperidolem (Haloperidol; ◆ linia ciągła) przed (Przed 6-OHDA) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA). N – oznacza normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych (5 min). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej V_T na bodziec hipoksyjny w odniesieniu do normoksji (N), # - istotność statystyczna między stanami przed i po haloperidolu, $n = 7$. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ hipoksji na objętość oddechową przed i po lezji ($p < 0,001$).



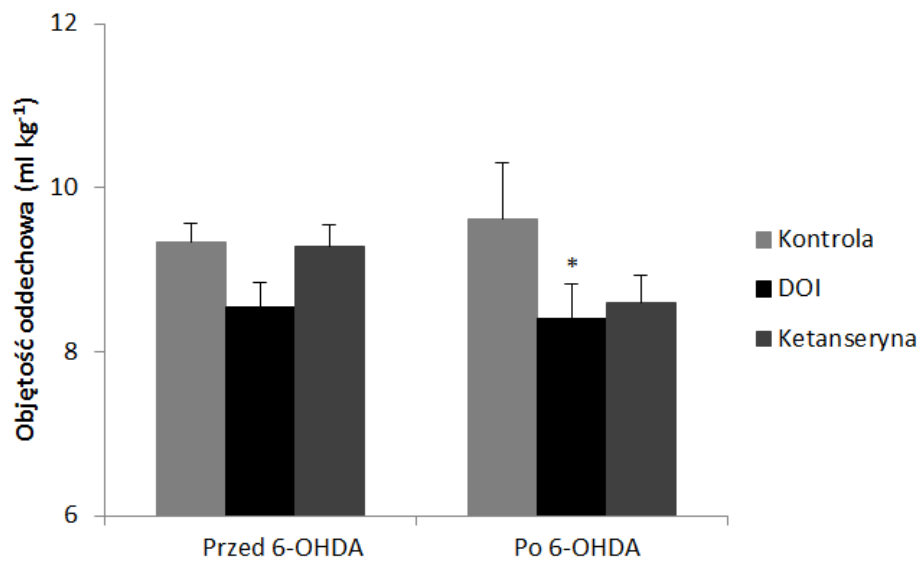
Ryc. 10. Zmiany wentylacji minutowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana) oraz po zablokowaniu receptorów dopaminergicznych D₂ podaniem haloperidolu (Haloperidol; ◆ linia ciągła) przed (Przed 6-OHDA) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA). Literą N – oznaczono normoksję, P – powrót do wartości wyjściowych (5 min). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji (N), ## $p < 0,01$ – znamienność statystyczna między stanem przed i po iniekcji haloperidolu, $n = 7$. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji na V_E ($p < 0,001$) przed i po lezji.

4.2.5 Wpływ pobudzenia i blokady serotonergicznych receptorów 5-HT_{2A}

W prezentowanych poniżej badaniach określano wpływ pobudzenia receptorów serotonergicznych 5-HT_{2A} na odpowiedź oddechową na hipoksję u zwierząt przed i 14 dni po iniekcji 6-OHDA do MFB. W tym celu podawano szczurom dootrzewnowo DOI-agonistę receptora 5-HT_{2A} oraz antagonistycznie działającą ketanserynę.

Przed leżką, w warunkach normoksji iniekcja DOI i ketanseryny nie wpłynęły istotnie na zmiany objętości oddechowej (Ryc. 11).

Po leżki podanie DOI obniżyło o 12,6% objętość oddechową w odniesieniu do kontroli. Natomiast iniekcja ketanseryny nie spowodowała powrotu wartości V_T do normoksyjnych wartości kontrolnych (Ryc. 11).



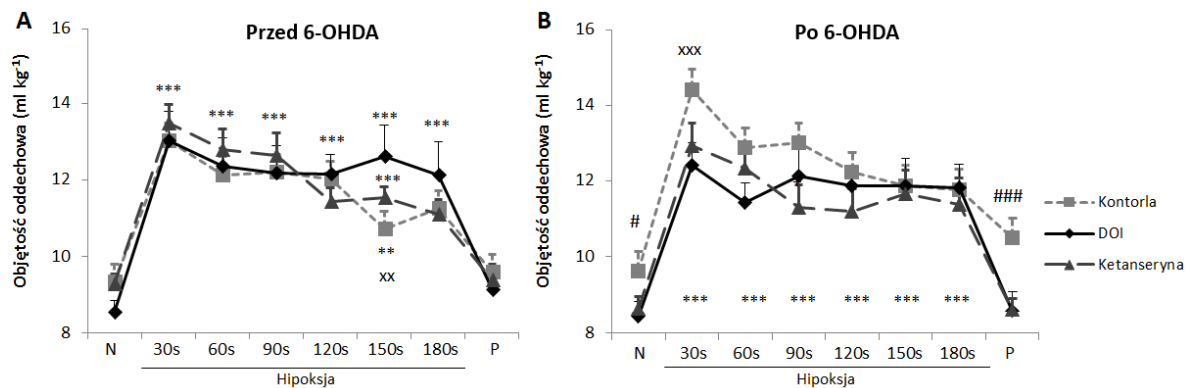
Ryc. 11. Zmiany objętości oddechowej w normoksji u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂-DOI (DOI; ■) oraz antagonisty receptorów serotonergicznych 5-HT₂ ketanseryny (Ketanseryna; ■). Wszystkie wartości zostały przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$ – znamienność statystyczna między kontrolą a DOI, $n = 9$.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ DOI i ketanseryny na V_T ($p < 0,01$).

Dootrzewnowa iniekcja DOI przed leżą nie wpłynęła istotnie na objętość oddechową podczas odpowiedzi oddechowej na hipoksję poza punktem czasowym 150s, w którym V_T była podwyższona o 13% (Ryc. 12). Iniekcja ketanseryny pozostała bez efektu na odpowiedź objętości oddechowej na bodziec hipoksyjny.

Po leżi pod wpływem DOI odpowiedź oddechowa V_T na hipoksję uległa obniżeniu o 13% w czasie 30s w porównaniu do odpowiedzi kontrolnej. Iniekcja ketanseryny nie przywróciła hipoksyjnych wartości objętości oddechowej do obserwowanych przed iniekcją DOI.



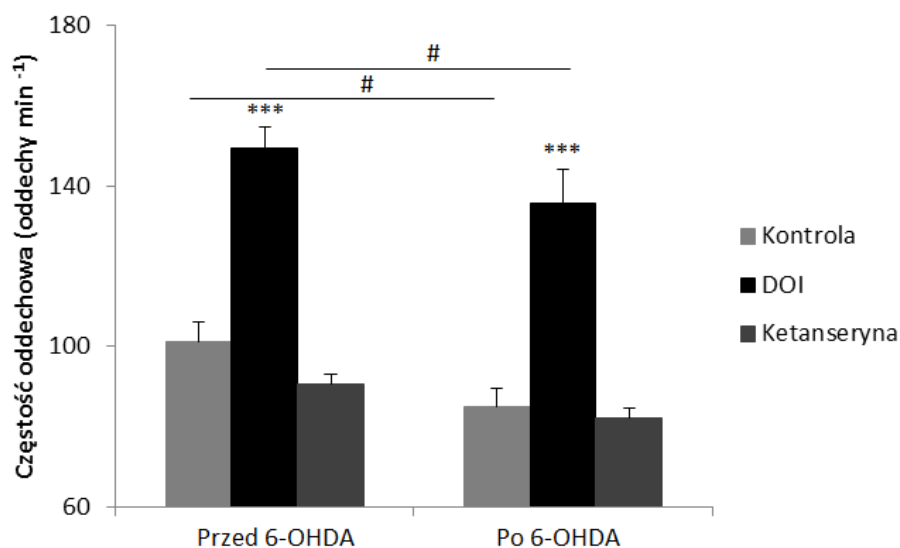
Ryc. 12. Zmiany objętości oddechowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂-DOI (DOI; ◆ linia ciągła) oraz antagonisty receptorów serotonergiczných 5-HT₂-ketanseryny (Ketanseryna; ▲ linia przerywana). Wszystkie wartości podane zostały jako średnie ± błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, P – powrót po aplikacji hipoksji po 5 minutach.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, # $p < 0,05$; **, xx $p < 0,01$; ***, ###, xxx $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), oznaczenie *** przy osi x dotyczy wszystkich przebiegów, # – znamienność statystyczna między grupami DOI a kontrolną, oraz DOI i ketanseryną, x – znamienność statystyczna między grupami DOI a kontrolną, n = 9.

(A) ANOVA wykazała: wpływ hipoksji ($p < 0,001$), interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,01$).

(B) ANOVA wykazała: wpływ hipoksji ($p < 0,001$) oraz interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,05$).

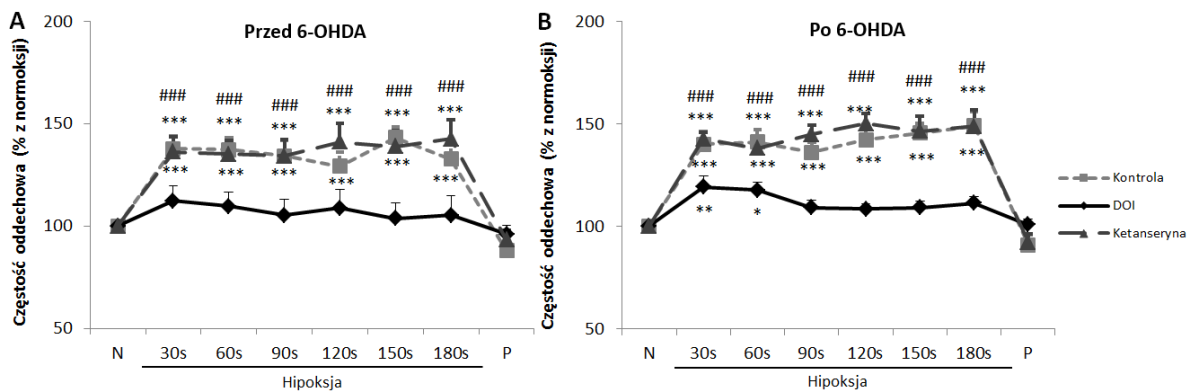
Mikroiniekcja 6-OHDA do MFB skutkowała istotnie obniżoną o 16% normoksyjną częstością oddychania (Ryc. 13). Iniekcja DOI spowodowała wzrost rytmu oddychania podczas normoksji zarówno przed jak i po lezji, odpowiednio o 48% i 59% (Ryc. 13). Wartości f po DOI osiągnęły poziom o 9% niższy po lezji w porównaniu do stanu przed iniekcją 6-OHDA (Ryc. 13). Wpływ agonisty odwracało podanie antagonistycznie działającej ketanseryny, powodując powrót wentylacji do wartości wyjściowych przed podaniem DOI zarówno przed, jak i po lezji.



Ryc. 13. Zmiany częstości oddychania w normoksji u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂ DOI (DOI; ■) oraz antagonisty receptorów serotoninerгіcznych 5-HT₂ ketanseryny (Ketanseryna; ■). Wszystkie wartości podane zostały jako średnie ± błąd standardowy średniej. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, # $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna między kontrolą a DOI oraz ketanseryną a DOI, # – znamienność statystyczna między zwierzętami przed i po lezji, $n = 9$. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ DOI i ketanseryny na f ($p < 0,001$).

Podczas odpowiedzi hipoksyjnej reaktywność częstości oddychania po DOI była istotnie obniżona o średnio 29% dla wszystkich punktów czasowych w porównaniu z hipoksją kontrolną w obu stanach neurologicznych (Ryc. 14 AB).

Po podaniu ketanseryny częstość oddychania wróciła do wartości kontrolnych sprzed iniekcji DOI zarówno przed jak i po lezji (Ryc. 14 AB).

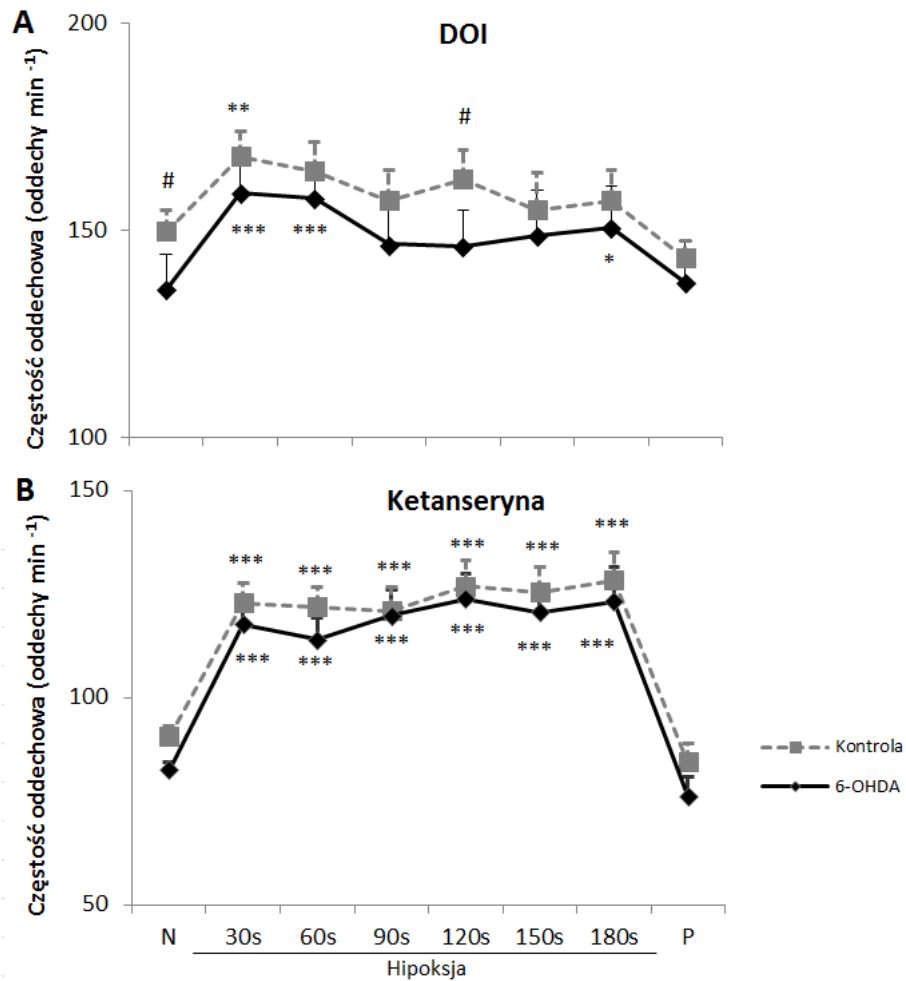


Ryc. 14. Procentowa zmiana częstości oddychania względem normoksji (100%) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂ - DOI (DOI; ◆ linia ciągła) oraz antagonisty receptorów serotonergicznych 5-HT₂-ketanseryny (Ketanseryna; ▲ linia przerywana). Wszystkie wartości podane zostały, jako średnie ± błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, P – powrót po zadaniu bodźca po 5 minutach. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami DOI a kontrolną, oraz DOI i ketanseryną, $n = 9$.

(A) Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p < 0,001$); wpływ DOI ($p < 0,001$); wpływ ketanseryny po podaniu DOI ($p < 0,01$); interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,001$); ketanseryną i hipoksją po DOI ($p < 0,001$).

(B) Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p < 0,001$); wpływ DOI ($p < 0,001$); wpływ ketanseryny po podaniu DOI ($p < 0,001$); interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,001$); ketanseryną i hipoksją po DOI ($p < 0,001$).

Porównanie reakcji na bodziec hipoksyjny dla częstości oddychania między zwierzętami przed i 14 dni po iniekcji 6-OHDA wykazało istotnie niższe wartości f po DOI w badanym modelu ChP (Ryc. 15A) oraz brak różnic po podaniu ketanseryny (Ryc. 15B).



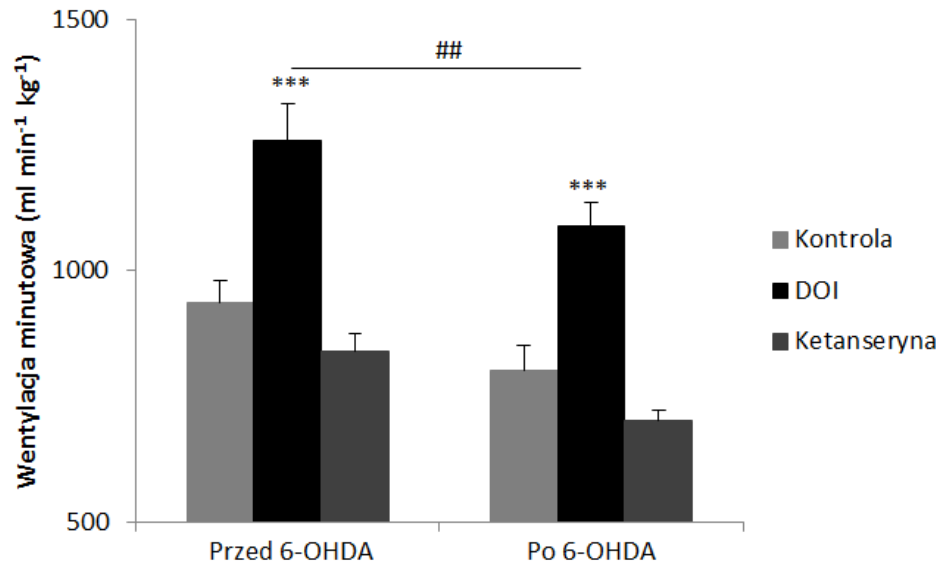
Ryc. 15. Zmiany częstości oddychania w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po podaniu agonisty receptorów serotonergiczných 5-HT_{2A}-DOI (A) oraz antagonisty tych receptorów-ketanseryny (B), przed (Kontrola; ■ linia przerywana) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (6-OHDA; ◆ linia ciągła). Wszystkie wartości podane zostały, jako średnie ± błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, P – powrót po podaniu bodźca po 5 minutach.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, *, # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi f na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami kontrolną a 6-OHDA, $n = 9$.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p < 0,001$) na częstość oddechową po podaniu DOI i ketanseryny.

Dootrzewnowa iniekcja DOI spowodowała istotny wzrost wentylacji minutowej o 34% przed lezją oraz o 36% po iniekcji neurotoksyny podczas oddychania powietrzem atmosferycznym. Same wartości wentylacji minutowej w normoksji po DOI u zwierząt z eksperymentalnie wywołaną ChP były istotnie obniżone o 13% w stosunku do tych przed lezją (Ryc. 16).

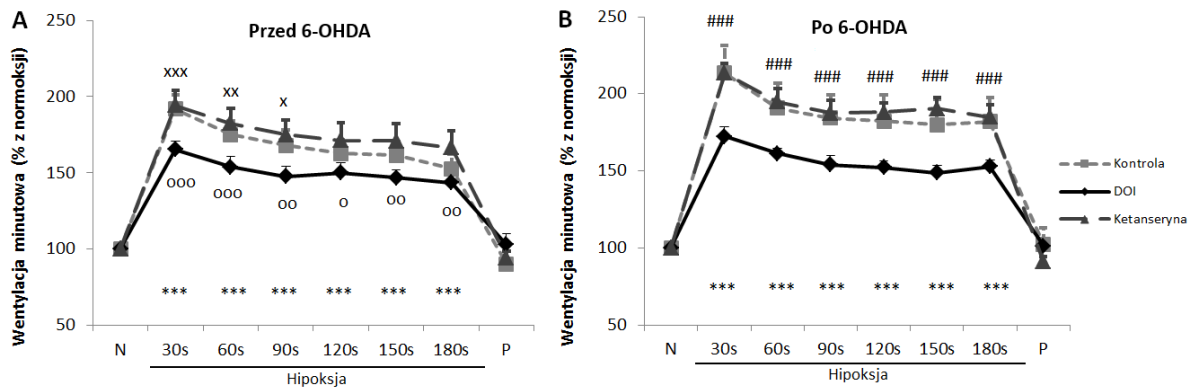
Podanie ketanseryny nieznamiennie obniżało wentylację minutową poniżej wartości bazalnych, zarówno u zwierząt zdrowych jak i po lezji (Ryc. 16).



Ryc. 16. Zmiany wentylacji minutowej w normoksji u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂ -DOI (DOI; ■) oraz antagonisty receptorów serotonergicznym 5-HT₂ -ketanseryny (Ketanseryna; ■). Wszystkie wartości podane zostały jako średnie ± błąd standardowy średniej. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna między kontrolą a DOI oraz ketanseryną a DOI, # – znamienność statystyczna między grupami kontrolną i po lezji, $n = 9$. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ 6-OHDA ($p < 0,01$); wpływ DOI i ketanseryny ($p < 0,001$) na V_E .

W odpowiedzi oddechowej na hipoksję u zwierząt zdrowych po podaniu DOI V_E wykazywała mniejszy wzrost średnio o 17% dla czasów od 30-180s w porównaniu z hipoksją kontrolną (Ryc. 17A).

Natomiast po lezji z użyciem 6-OHDA po podaniu DOI zanotowano istotny spadek reaktywności V_E w całym przebiegu hipoksji o średnio 32% w odniesieniu do hipoksji kontrolnej (Ryc. 17B). Podanie ketanseryny spowodowało powrót hipoksyjnej odpowiedzi wentylacji minutowej do poziomu odpowiedzi kontrolnej zarówno przed jak i po iniekcji 6-OHDA (Ryc. 17B).

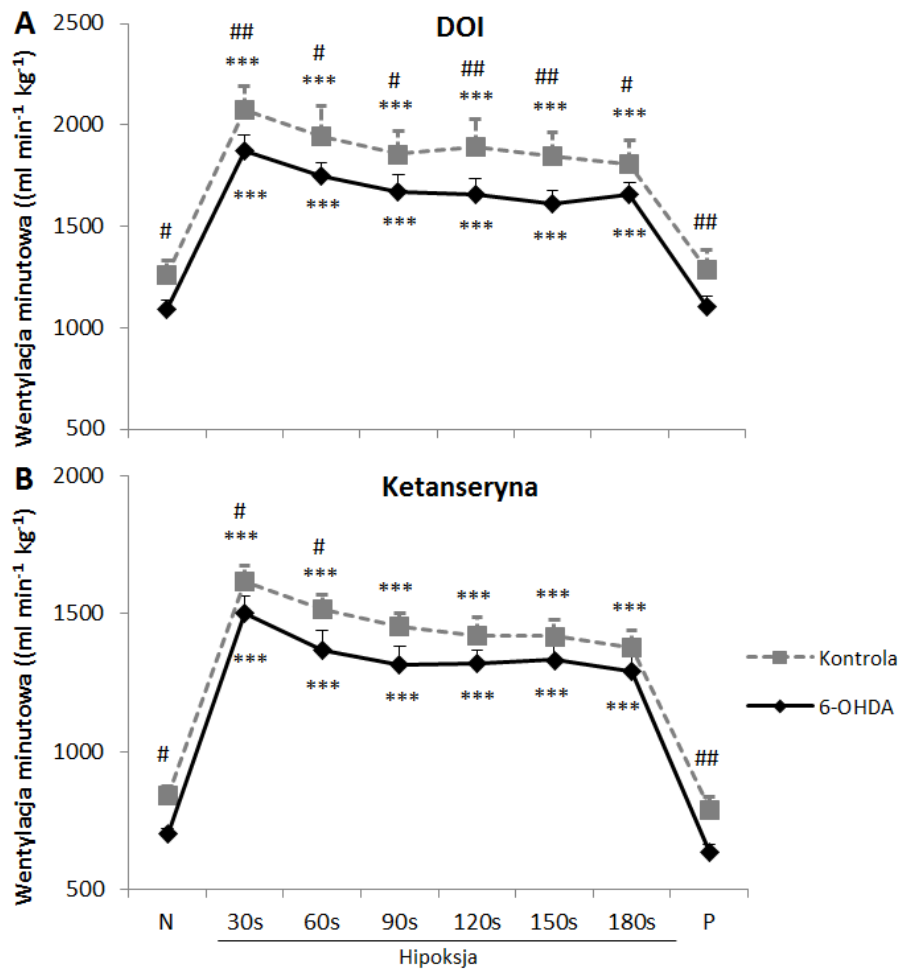


Ryc. 17. Procentowa zmiana wentylacji minutowej względem normoksji (100%) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt przed (Przed 6-OHDA) i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA (Po 6-OHDA), w warunkach kontrolnych (Kontrola; ■ linia przerywana), po podaniu agonisty receptorów 5-HT₂ - DOI (DOI; ◆ linia ciągła) oraz antagonisty receptorów serotonergicznyc 5-HT₂-ketanseryny (Ketanseryna; ▲ linia przerywana). Wszystkie wartości podane zostały, jako średnie ± błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, P – powrót po zadaniu bodźca po 5 minutach. Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, x, o $p < 0,05$; xx, oo $p < 0,01$; ***, ###, xxx, ooo $p < 0,001$. * – zmienność statystyczna odpowiedzi V_E na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami DOI a kontrolną, oraz DOI i ketanseryną, x – znamienność statystyczna między grupami kontrolną a DOI, o – znamienność statystyczna między grupami ketanseryną a DOI, n= 9.

(A) Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p < 0,001$); wpływ ketanseryny po podaniu DOI ($p < 0,05$); interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,001$); wpływem ketanseryny a hipoksją po podaniu DOI ($p < 0,001$).

(B) Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p < 0,001$); wpływ ketanseryny po podaniu DOI ($p < 0,001$); interakcję między DOI i hipoksją ($p < 0,001$); wpływem ketanseryny a hipoksją po podaniu DOI ($p < 0,001$).

Porównanie odpowiedzi oddechowej na hipoksję między stanem przed i 14 dni po iniekcji 6-OHDA wykazało istotnie mniejsze wartości V_E po podaniu DOI i ketanseryny u zwierząt z eksperymentalnie wywołaną ChP, co wynikało również z niższych wartości bazalnych przed podaniem bodźca hipoksyjnego (Ryc. 18).



Ryc. 18. Zmiany wentylacji minutowej w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po podaniu agonisty receptorów serotonergiczných 5-HT_{2A}-DOI (A) oraz antagonisty tych receptorów - ketanseryny (B), przed (Kontrola; ■ linia przerywana) i 14 dni po iniekcji 6-OHDA (6-OHDA; ◆ linia ciągła). Wszystkie wartości podane zostały, jako średnie ± błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, P – powrót po zadaniu bodźca po 5 minutach.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami kontrolną a 6-OHDA, $n = 9$.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ iniekcji 6-OHDA ($p < 0,05$) oraz wpływ hipoksji ($p < 0,001$) na wentylację minutową po podaniu DOI; wpływ hipoksji ($p < 0,001$) na wentylację minutową po podaniu ketanseryny.

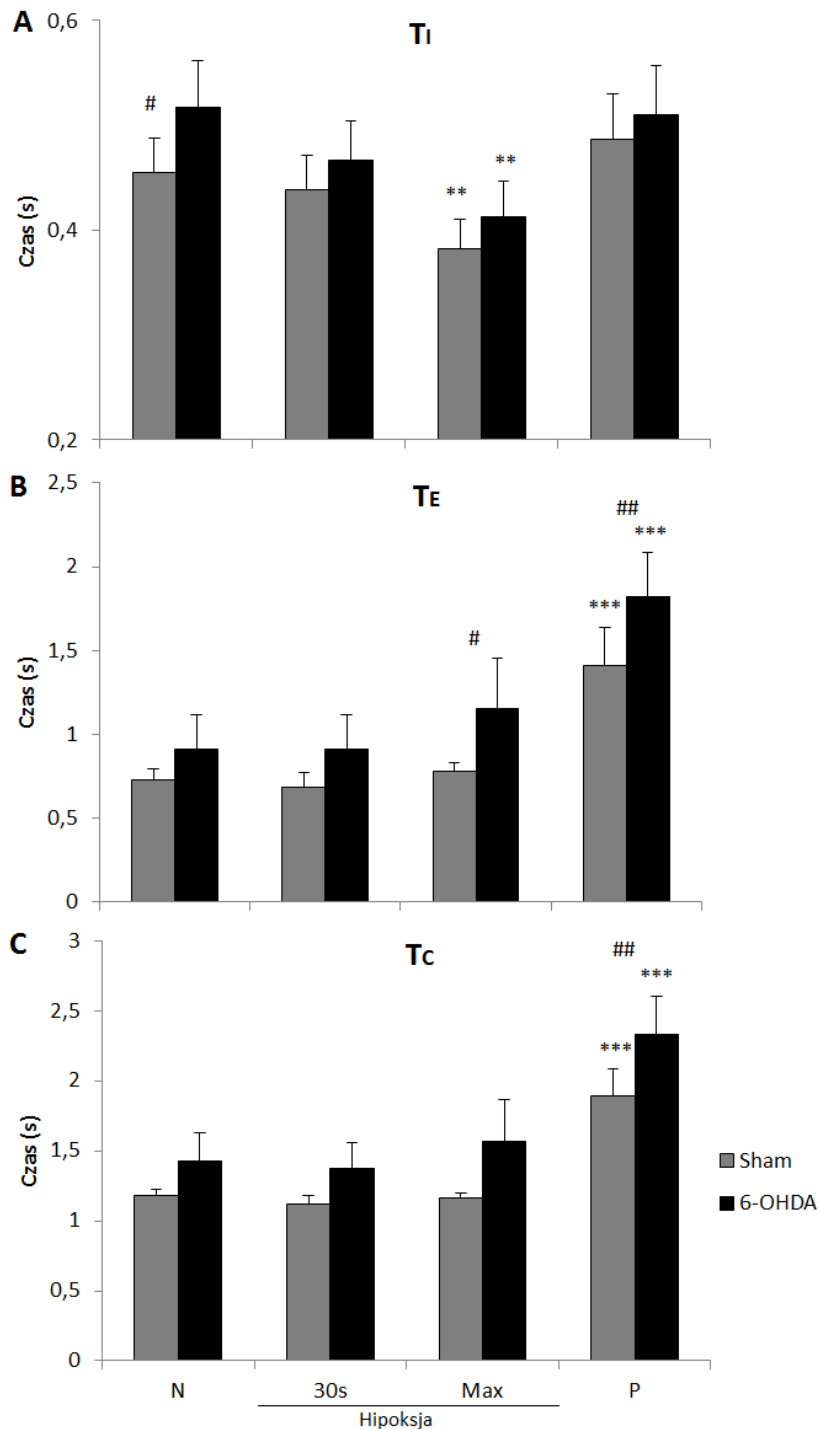
4.3 Wpływ iniekcji 6-OHDA do MFB na aktywność nerwów podjęzykowego (HG) i przeponowego (PHR)

Analiza aktywności elektroneurogramów nerwów przeponowego i podjęzykowego wykazała efekt podania neurotoksyny 6-OHDA do MFB w normoksji i w odpowiedzi oddechowej na hipoksję.

U zwierząt po uszkodzeniu neuronów dopaminergicznych czas wdechu był istotnie dłuższy w porównaniu do zwierząt sham w warunkach normoksyjnych (Ryc. 19A).

Czas wydechu był natomiast istotnie przedłużony w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt traktowanych 6-OHDA zarówno w momencie maksymalnej odpowiedzi jak i podczas powrotu po zakończeniu działania bodźca (Ryc. 19B).

Całkowity czas trwania cyklu oddechowego był znamienne zwiększony po lezji w momencie powrotu po hipoksji w porównaniu do grupy sham (Ryc. 19C).

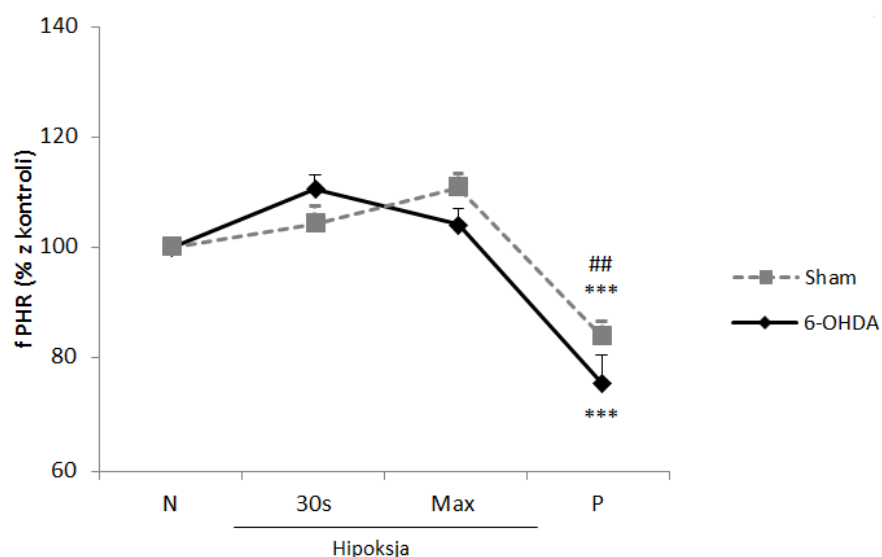


Ryc. 19. Zmiany: (A) czasu wdechu (T_i), (B) wydechu (T_e) i (C) całkowitego trwania cyklu oddechowego (T_c) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ■). Literą N – oznaczono normoksję, max – maksymalna odpowiedź oddechowa na hipoksję, P – powrót po zakończeniu działania bodźca.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna w odpowiedzi na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji (N), # – znamienność statystyczna pomiędzy grupami 6-OHDA a Sham, $n = 6$ w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji na wszystkie badane parametry ($p < 0,001$).

Częstotliwość wyładowań nerwów mierzono na podstawie zapisu elektroneurograficznego nerwu przeponowego. Jest ona taka sama jak częstotliwość nerwu podjęzykowego. Częstotliwość podczas oddychania powietrzem atmosferycznym w grupie szczurów uszkodzonych pozornie wynosiła $49,95 \pm 1,97$ wyładowań na min, natomiast po lezji $42,48 \pm 4,69$; różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0,15$, test t-Studenta). Częstotliwość wyrażona w procentach wartości wyjściowych, po zakończeniu działania bodźca hipoksyjnego (P) osiągnęła istotnie niższe wartości o ok. 10% u zwierząt z ChP w porównaniu z grupą sham (Ryc. 20).

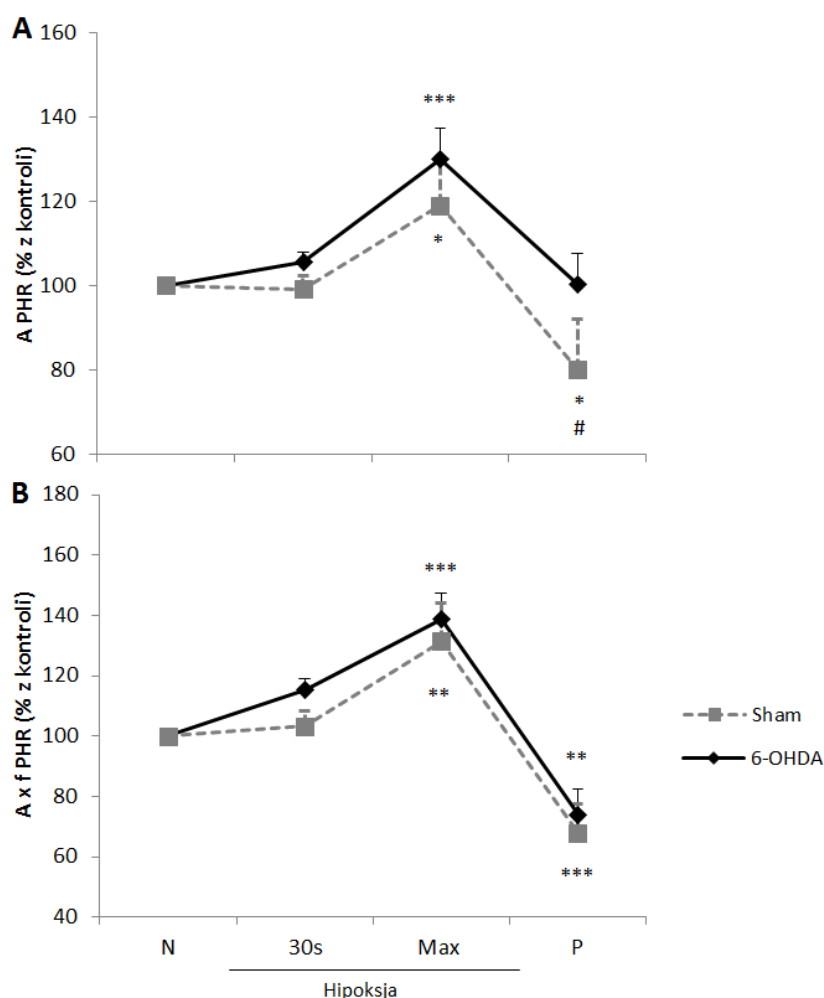


Ryc. 20. Zmiany częstości wyładowań nerwu przeponowego (PHR) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■ linia przerywana) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ◆ linia ciągła). Wyniki są wyrażone w procentach wyjściowej aktywności nerwu przed podaniem hipoksji. Literą N – oznaczono normoksję, max – maksymalna odpowiedź oddechowa, P – powrót po zakończeniu działania bodźca.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, ## $p<0,01$; *** $p<0,001$. * – znamienność statystyczna w odpowiedzi aktywności nerwu na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji (N), # – znamienność statystyczna pomiędzy grupami 6-OHDA a Sham, n= 8- 10 w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji ($p<0,001$) na częstość, oraz interakcję między efektem 6-OHDA a odpowiedzią na bodziec hipoksyjny ($p<0,05$).

Parametry aktywności obu nerwów: amplituda oraz aktywność minutowa charakteryzowały się istotnym statystycznie wzrostem w reakcji na bodziec hipoksyjny, zarówno w grupie zwierząt z pozorowaną lezją jak i w badanym modelu choroby Parkinsona (Ryc. 21 i 22). Powrót amplitudy nerwu przeponowego do wartości wyjściowej obserwowano jedynie po iniekcji 6-OHDA (Ryc. 21A). Nie zanotowano różnic w hipoksyjnej odpowiedzi aktywności minutowej nerwu przeponowego pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 21B).

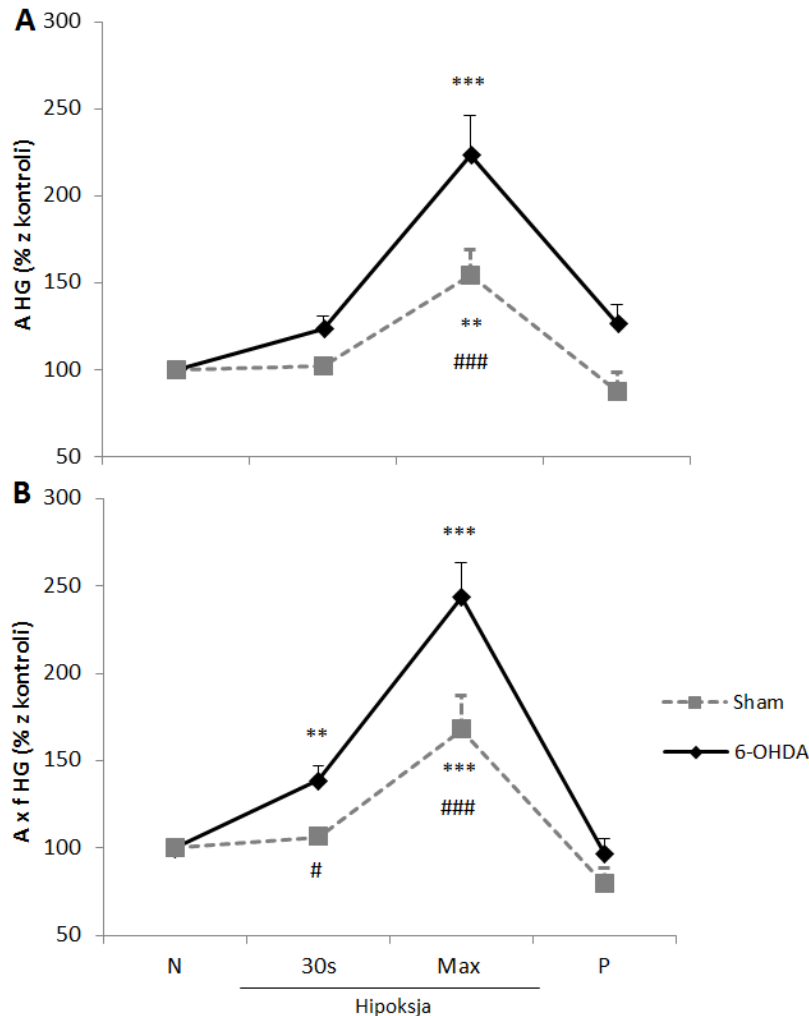


Ryc. 21. Zmiany amplitudy (A) i aktywności minutowej (B) nerwu przeponowego (PHR) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■ linia przerywana) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ◆ linia ciągła). Wyniki są wyrażone w procentach z wyjściowej aktywności nerwu przed podaniem hipoksji. Literą N – oznaczono normoksję, max – maksymalna odpowiedź oddechowa, P – powrót po ustaniu działania bodźca.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keuls, * $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna w odpowiedzi aktywności nerwu na bodziec hipoksyjny w porównaniu do normoksji (N), # – znamienność statystyczna pomiędzy grupami 6-OHDA a Sham, $n = 8-10$ w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ hipoksji na każdy z badanych parametrów ($p < 0,001$).

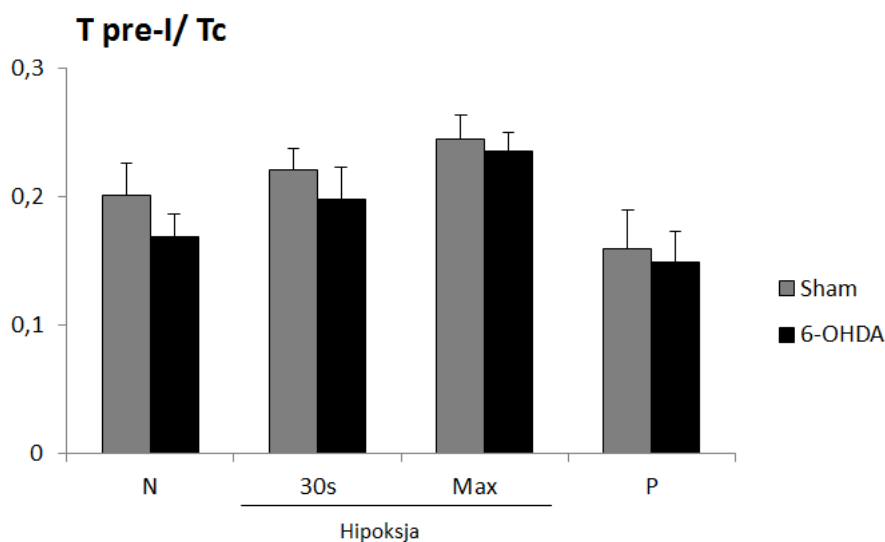
W przypadku aktywności nerwu podjęzykowego iniekcja 6-OHDA do MFB skutkowała istotnie zwiększoną o ok. 69% wdechową amplitudą w punkcie maksymalnej odpowiedzi na bodziec hipoksyjny (Ryc. 22A) oraz podwyższoną aktywnością minutową o 32% w 30s oraz o 76% w maksymalnym punkcie odpowiedzi na hipoksję w porównaniu do zwierząt sham (Ryc. 22B).



Ryc. 22. Zmiany amplitudy (A) oraz aktywności minutowej (B) nerwu podjęzykowego (HG) w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■ linia przerywana) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ◆ linia ciągła). Wyniki są wyrażone jako procent z wyjściowej aktywności nerwu przed podaniem hipoksji. N – oznacza normoksję, max – maksymalną odpowiedź, P – powrót po podaniu bodźca.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keulsa, *, # $p < 0,05$; ***, ### $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna odpowiedzi aktywności nerwu podjęzykowego na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # – znamienność statystyczna między grupami 6-OHDA a Sham, $n = 8-10$ w grupie. Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ iniekcji 6-OHDA ($p < 0,05$), oraz wpływ hipoksji ($p < 0,001$) na amplitudę i aktywność minutową.

Czas przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego (T pre-I) w normoksji w grupie z lezją wynosił $0,23 \pm 0,03$ s i nie różnił się istotnie w porównaniu do grupy sham: $0,24 \pm 0,02$ s ($p=0,89$, test t-Studenta). Uszkodzenie szlaku nigrostriatalnego nie wpłynęło istotnie na stosunek czasu przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego do całkowitego czasu cyklu oddechowego podczas normoksji i w odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Zaobserwowano jedynie nieznamienne spadek tego współczynnika u zwierząt po lezji (Ryc. 23).

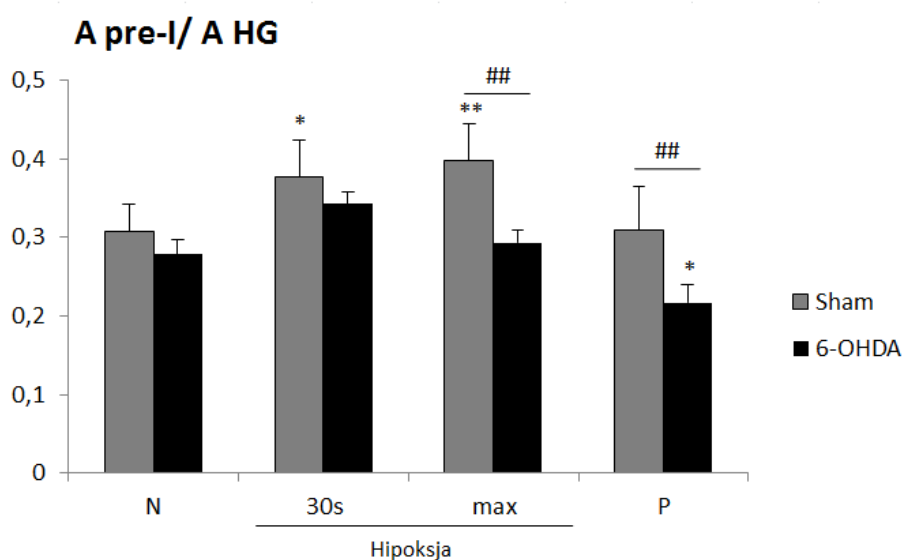


Ryc. 23. Zmiany stosunku czasu przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego do całkowitego czasu cyklu oddechowego w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ■). Wszystkie wartości podane zostały jako średnie \pm błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, max – maksymalną odpowiedź, P – powrót po ustaniu działania bodźca.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ hipoksji na współczynnik T pre-I/Tc ($p<0.001$), n= 6 w grupie.

Średnie wartości amplitudy aktywności przedwdechowej podczas normoksji wynosiły: $0,56 \pm 0,1$ jednostek umownych w grupie sham oraz $0,38 \pm 0,08$ jednostek umownych po lezji i nie różniły się statystycznie ($p=0,16$, test t-Studenta). Na Ryc. 24 przedstawiono zmiany stosunku amplitudy aktywności przedwdechowej do szczytowej amplitudy aktywności wdechowej nerwu podjęzykowego w odpowiedzi oddechowej na hipoksję w grupie doświadczeń z pozorowanym uszkodzeniem i po lezji z użyciem 6-OHDA. Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła pobudzający wpływ hipoksji na współczynnik A pre-I/AHG wyłącznie u zwierząt sham ($p<0,001$).

Zaobserwowano statystycznie niższe wartości współczynnika, o około 23%, w maksymalnym punkcie odpowiedzi na bodziec hipoksyjny oraz podczas powrotu do oddychania spoczynkowego u zwierząt z eksperymentalnie wywołaną ChP w porównaniu z grupą sham.



Ryc. 24. Zmiany stosunku amplitudy przedwdechowej do amplitudy wdechowej nerwu podjęzykowego w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt po iniekcji rozpuszczalnika (Sham; ■) i 6-OHDA do MFB (6-OHDA; ■). Wszystkie wartości podane zostały jako średnie \pm błąd standardowy średniej. N – oznacza normoksję, max – maksymalną odpowiedź, P – powrót do wartości wyjściowych.

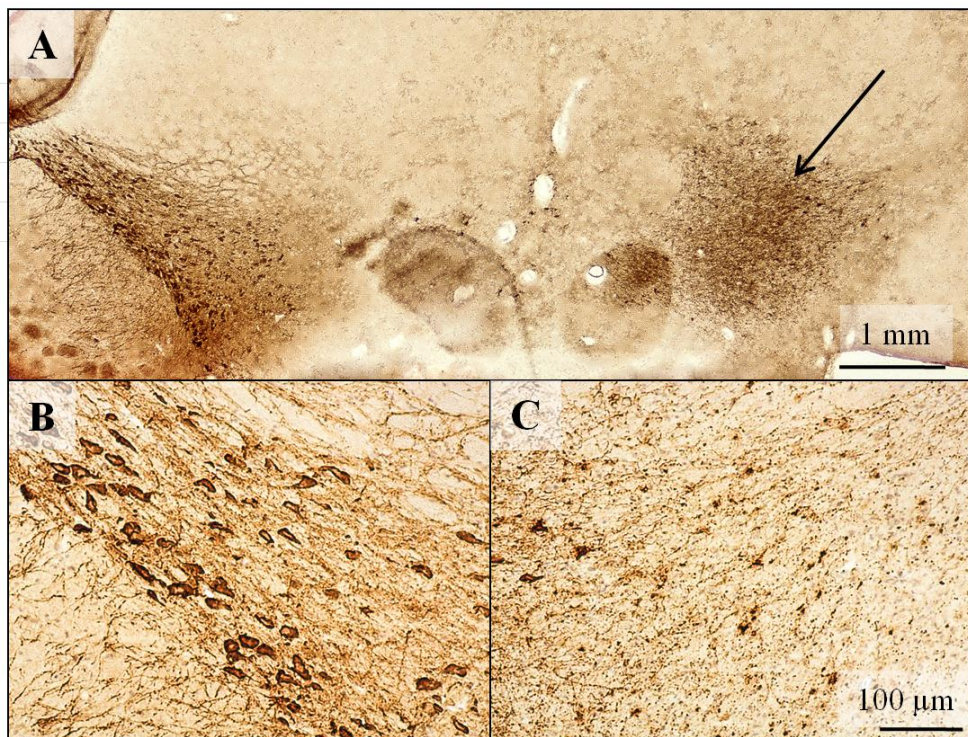
Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, * $p<0,05$; **, ## $p<0,01$. * - statystyczna odpowiedź oddechowa na bodziec hipoksyjny względem normoksji (N), # - statystyczna między grupami 6-OHDA a Sham, $n=6$ w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała wpływ hipoksji na współczynnik A pre-I/AHG ($p<0,001$).

4.4 Detekcja hydroksylazy tyrozynowej (TH) – analiza

immunohistochemiczna

Aby określić skuteczność iniekcji 6-OHDA do prawego MFB wykonano barwienie immunohistochemiczne skrawków mózgow przy wykorzystaniu przeciwciał znakujących neurony TH-pozytywne. Po lewej referencyjnej stronie skrawka zanotowano obecność licznych neuronów wykazujących ekspresję hydroksylazy tyrozynowej – kluczowego enzymu w procesie biosyntezy dopaminy w neuronach dopaminergicznych. Po prawej stronie w obszarze istoty czarnej zaobserwowano znaczący $91 \pm 1,8\%$ ubytek neuronów TH-pozytywnych względem kontralateralnego obszaru istoty czarnej (Ryc. 25). Średnia liczba neuronów dopaminergicznych po nieuszkodzonej stronie w SN wynosząca $230,5 \pm 11,7$ była istotnie zredukowana do $21,4 \pm 2,9$ po stronie podania 6-OHDA (test t-Studenta, $p < 0,001$, $n = 5$).



Ryc. 25. Fotografia preparatu skrawka mózgu szczura po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA do prawego MFB. Barwienie TH pozytywnych komórek. A – fragment skrawka z lewą i prawą istotą czarną (SN), (strzałka wskazuje ipsilateralną istotę czarną, powiększenie 40x), B- fragment lewej referencyjnej SN (powiększenie 100x), C-fragment prawej, uszkodzonej SN (powiększenie 100x).

4.5 Analiza poziomu amin biogennych i ich metabolitów w prążkowi i pniu mózgu

W celu potwierdzenia ubytku dopaminy, serotoniny, noradrenaliny oraz ich metabolitów w badanym jednostronnym modelu ChP wykonano analizy ilości w/w substancji i ich metabolitów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej, z podziałem na lewą i prawą stronę. Analizie poddano prążkowie, strukturę, do której docierają projekcje neuronów dopaminergicznych o ciałach komórkowych zlokalizowanych w istocie czarnej, oraz pień mózgu, w którym zlokalizowane są ośrodki odpowiedzialne za generację i regulację oddychania. Do analiz wykorzystano 10 zwierząt po lezji 6-OHDA i 10 zwierząt z uszkodzeniem pozorowanym. Jednostronna iniekcja 6-OHDA do prawego pęczka przyśrodkowego przodomózgowia spowodowała wyraźne zmniejszenie zawartości DA (>90%), jej metabolitu DOPAC (90%) oraz 5-HT (32%) w prawym prążkowi w porównaniu ze zwierzętami poddanymi pozorowanej lezji (Tab. 4A, 4B).

Spadkowi ilości powyższych substancji w badanym modelu towarzyszył znaczący wzrost ilości metabolitu serotoniny 5-HIAA o około 30% oraz zwiększenie obrotu DOPAC/ DA i 5-HIAA/ 5-HT o odpowiednio, 14,2 i 2,2 razy w porównaniu z prawym prążkiem sham (Tab. 4A, B).

Średnie ilości DA i 5-HT były także zmniejszone w lewym referencyjnym prążkowi (bez 6-OHDA) odpowiednio o 26% i 32% w odniesieniu do lewego prążka sham (Tab. 4A, 4B). Obroty DOPAC/ DA i 5-HIAA/ 5-HT były także zwiększone o około 1,6 razy, ale ilości DOPAC i 5-HIAA nie różniły się istotnie od lewego prążka sham (Tab. 4A, 4B).

Nie wykazano istotnych różnic w zawartości noradrenaliny w prążkowi: lewe (sham $17,04 \pm 1,44$ pg/mg; 6-OHDA $18,00 \pm 2,02$ pg/mg), prawe (sham $26,63 \pm 8,64$ pg/mg; 6-OHDA

16,27 ± 6,99 pg/mg) i pniu mózgu: lewy (sham 623,81 ± 18,35 pg/mg; 6-OHDA 575,52 ± 15,36 pg/mg), prawy (sham 617,09 ± 20,83 pg/mg; 6-OHDA 573,21 ± 21,14 pg/mg).

W pniu mózgu zwierząt po lezji, zaobserwowano obustronną redukcję poziomu serotoniny o ponad 20%, w porównaniu z grupą zwierząt z lezją pozorowaną. Taka zmiana doprowadziła do 1,3-krotnie wyższych obrotów 5-HIAA/ 5-HT po obu stronach pnia (Tab. 4B). Transmisja dopaminergiczna w pniu mózgu została względnie niezmienniona, oprócz 1,4 razy większego obrotu DOPAC/ DA obserwowanego po obu stronach, w porównaniu do grupy z lezją pozorowaną (Tab. 4A).

Tab. 4 Poziom monoamin i ich metabolitów w pg/mg: (A) dopaminy (DA), kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), oraz obrót DOPAC/ DA; (B) serotoniny (5-HT), kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) i obrót 5-HIAA/ 5-HT w prążkowie i pniu mózgu z uwzględnieniem podziału na lewą (L) i prawą (P) stronę u szczurów po iniekcji rozpuszczalnika (Sham) lub neurotoksyny (6-OHDA) do prawego MFB.

| A Struktura mózgu/ grupa | Poziom monoamin i metabolitów (pg/mg) mokrej tkanki | | |
|--------------------------------|---|-----------------------------|------------------------|
| | DA | DOPAC | DOPAC/ DA |
| Prążkowie L | | | |
| Sham | 9619,45 (± 795,80) | 4060,99 (± 166,82) | 0,45 (± 0,05) |
| 6-OHDA | 7103,31 (± 591,06)* | 4843,84 (± 355,27) | 0,72 (± 0,09)* |
| Prążkowie R | | | |
| Sham | 7981,07 (± 827,03) | 3598,40 (± 197,40) | 0,48 (± 0,04) |
| 6-OHDA | 52,97 (± 49,58)*** | 206,26 (± 195,04)*** | 6,83 (± 2,94)** |
| Pień mózgu L | | | |
| Sham | 43,81 (± 3,90) | 32,19 (± 8,81) | 0,77 (± 0,08) |
| 6-OHDA | 38,09 (± 3,34) | 39,11 (± 3,73) | 1,05 (± 0,09)* |
| Pień mózgu R | | | |
| Sham | 42,53 (± 2,62) | 33,91 (± 2,11) | 0,83 (± 0,08) |
| 6-OHDA | 37,39 (± 2,80) | 42,03 (± 4,71) | 1,16 (± 0,10)* |

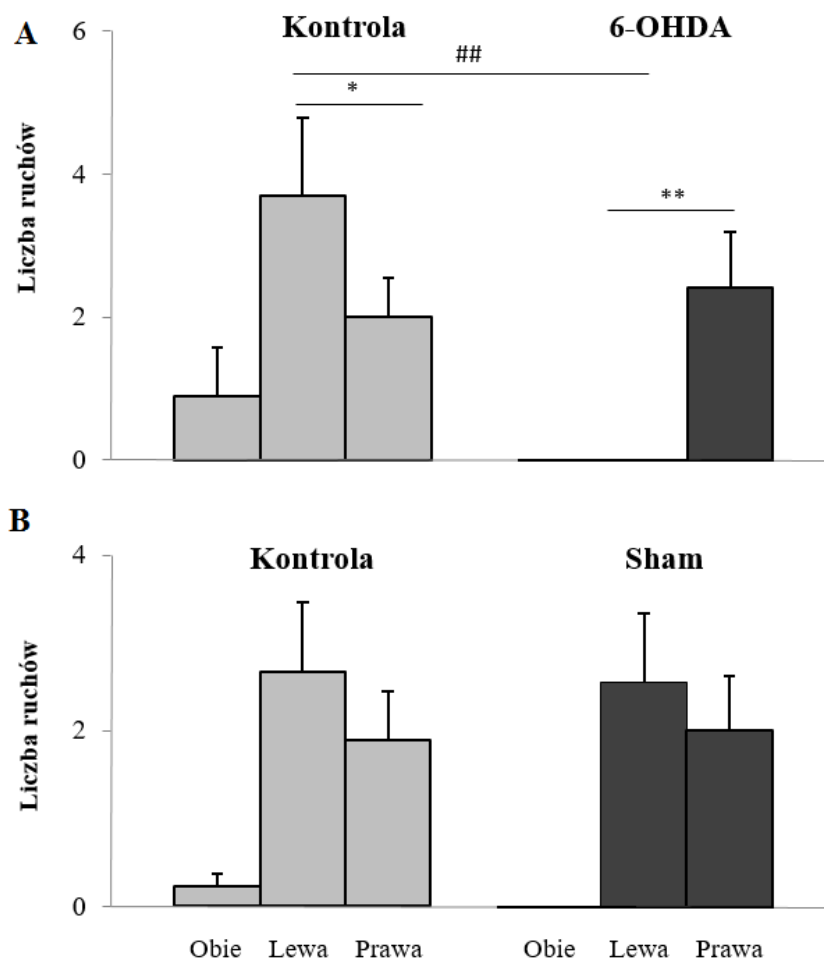
| B Struktura mózgu/ grupa | Poziom monoamin i metabolitów (pg/mg) mokrej tkanki | | |
|--------------------------------|---|--------------------------|-------------------------|
| | 5-HT | 5-HIAA | 5-HIAA/ 5-HT |
| Prążkowie L | | | |
| Sham | 261,51 (± 21,41) | 514,90 (± 30,89) | 2,10 (± 0,15) |
| 6-OHDA | 177,63 (± 16,02)** | 589,97 (± 27,64) | 3,49 (± 0,27)*** |
| Prążkowie R | | | |
| Sham | 209,00 (± 14,83) | 415,77 (± 36,07) | 2,06 (± 0,20) |
| 6-OHDA | 142,95 (± 17,89)* | 599,81 (± 48,68)* | 4,47 (± 0,34)*** |
| Pień mózgu L | | | |
| Sham | 433,20 (± 15,65) | 490,02 (± 27,58) | 1,04 (± 0,04) |
| 6-OHDA | 333,81 (± 12,68)*** | 456,25 (± 20,72) | 1,39 (± 0,09)** |
| Pień mózgu R | | | |
| Sham | 417,30 (± 13,86) | 420,94 (± 18,01) | 0,94 (± 0,02) |
| 6-OHDA | 328,74 (± 7,75)*** | 422,16 (± 17,81) | 1,29 (± 0,05)*** |

Ocena wykonana przy wykorzystaniu metody HPLC *ex vivo*. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ w porównaniu z sham, n= 10 w grupie. Test U Manna-Whitneya.

4.6 Test behawioralny i masa ciała

Wyniki testu behawioralnego w cylindrze potwierdzają skuteczność wykonanych lezji. U zwierząt z iniekcją 6-OHDA występuje spadek ruchliwości oraz ograniczenie używania lewej kończyny przedniej kontralateralnej względem miejsca iniekcji.

Na Ryc. 26 przedstawiono zmiany w używaniu przedniej kończyny prawej i lewej w teście cylindra u zwierząt przed i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA do MFB (Ryc. 26A) lub rozpuszczalnika bez 6-OHDA (Ryc. 26B).

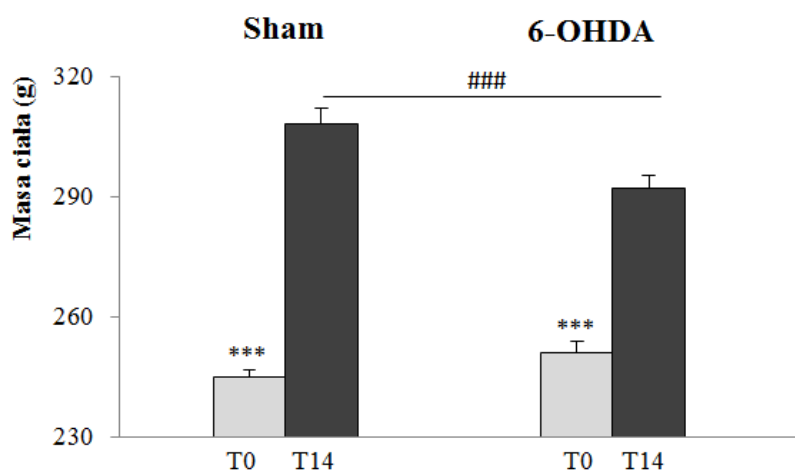


Ryc. 26. Zmiany motoryki szczurów w teście cylindra przed (Kontrola) i po 14 dniach od iniekcji do MFB: (A) 6-OHDA, (B) rozpuszczalnika bez neurotoksyny (Sham). Użycie kończyny przedniej podczas wznoszenia oznaczono: Obie, Lewa, Prawa. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; ## $p < 0,01$. * – znamienność statystyczna wewnątrz grupy, # – znamienność statystyczna między kontrolą a 14 dniami po lezji, $n = 9-10$ w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła wpływ lezji z 6-OHDA na zmiany motoryki ($p < 0,01$) oraz preferencyjne użycie kończyny prawej po lezji z 6-OHDA ($p < 0,001$).

Zwierzęta wykorzystywane do doświadczeń były dwukrotnie ważone, przed i 14 dni po domózgowej iniekcji. Do porównania użyto 10 szczurów z grupy 6-OHDA i 8 zwierząt Sham. W grupie z iniekcją rozpuszczalnika do MFB wykazano większy przyrost masy ciała niż u zwierząt z eksperymentalnie wywołaną ChP. Dwutygodniowy przyrost masy ciała u zwierząt sham (26%) był istotnie większy niż w grupie 6-OHDA (16%) (Ryc. 27).



Ryc. 27. Zmiany masy ciała (g) u zwierząt z iniekcją do MFB: rozpuszczalnika (Sham) i 6-OHDA (6-OHDA). T0 – masa ciała przed leżką, T14 - masa ciała 14 dni po leżki. Wszystkie wartości podane zostały, jako średnie \pm błąd standardowy średniej.

Dwuczynnikowa ANOVA, test Newman-Keuls, ***, ### $p < 0,001$. * – znamienność statystyczna przyrostu masy ciała między T0 i T14, # – znamienność statystyczna między grupami 6-OHDA a Sham, $n = 8-10$ w grupie.

Dwuczynnikowa ANOVA ujawniła: wpływ czasu na masę ciała ($p < 0,001$); interakcję między wpływem 6-OHDA a czasem ($p < 0,001$).

5. DYSKUSJA

W niniejszej pracy wykazano, że u zwierząt czuwających jednostronne uszkodzenie układu czarnoprążkowiowego podaniem neurotoksyny 6-OHDA powoduje zmiany wzorca oddechowego zarówno podczas pobudzenia układu oddechowego mieszaniną gazową o obniżonej zawartości O₂ jak i o podwyższonej zawartości CO₂, nie ma wpływu natomiast na parametry wentylacji normoksyjnej.

5.1 Odpowiedź oddechowa na hipoksję

W przypadku odpowiedzi oddechowej na 8% bodziec hipoksyjny u zwierząt w badanym modelu choroby Parkinsona zaobserwowano wzrost objętości oddechowej i spadek częstości oddychania, co przełożyło się na wzrost wentylacji minutowej podczas maksymalnej fazy reakcji.

Dane literaturowe wskazują na zaangażowanie dopaminy w regulację oddychania zarówno na poziomie obwodowego jak i ośrodkowego układu nerwowego. DA wraz ze swoistymi receptorami dopaminergicznymi obecna jest w większości obszarów rdzenia przedłużonego odpowiedzialnych za regulację oddychania, między innymi w jądrze pasma samotnego (Sun i wsp., 1994; Yokoyama i wsp., 1994; Kitahama i wsp., 2000). Ośrodkowa iniekcja DA lub jej agonistów powodowały przeciwstawne reakcje: zarówno stymulację (Hedner i wsp., 1982; Hsiao i wsp., 1989; Huey i wsp., 2000), jak i depresję oddychania (Güner i wsp., 2002; Bolme i wsp., 1977; Bonora i Gautier, 1988). Za działaniem depresyjnym przemawiają badania Fallerta (1979), które dowiodły hamującego wpływu dopaminy zaaplikowanej bezpośrednio na neurony wdechowe rdzenia przedłużonego królika.

Dane dotyczące hipoksji opisują depresyjny wpływ dopaminy na odpowiedź oddechową stymulowaną obniżonym poziomem tlenu, zarówno w ośrodkowym układzie

nerwowym jak i na poziomie kłębków szyjnych (Hsiao i wsp., 1989; Gojny i wsp., 1991; Guner i wsp., 2002; Niewinski i wsp., 2014).

Zatem uzyskana w niniejszej pracy stymulacja objętości oddechowej i wentylacji minutowej w odpowiedzi oddechowej na hipoksję w stanie niedoboru hamującej oddychanie dopaminy wydaje się korespondować z wyżej wymienionymi badaniami.

Dane dotyczące odpowiedzi oddechowej na hipoksję u ludzi z ChP są nieliczne i niejednoznaczne. Wykazano bardzo rozbieżne reakcje oddechowe organizmu na hipoksję od niezmienionej (Seccombe i wsp., 2011), poprzez zwiększoną (Feinsilver i wsp., 1986), aż do jej hamowania (Serebrovskaja i wsp., 1998; Onodera i wsp., 2000). Różnice te mogą być związane z niejednorodnością badanych grup chorych. Mimo, że wszyscy badani mieli łagodne i umiarkowane stadium choroby Parkinsona, w pracy Serebrovskaya i wsp. (1998) pacjenci prezentowali znacząco niższą wentylację pęcherzykową już podczas oddychania powietrzem atmosferycznym, co mogło być przyczyną zmniejszonej odpowiedzi wentylacyjnej na bodziec hipoksyjny. Zredukowana odpowiedź na hipoksję, jak sugerują Serebrovskaya i wsp. (1998) oraz Onodera i wsp. (2000), mogła wynikać z upośledzenia funkcji chemoreceptorów kłębków szyjnych. Jednak autorzy nie zaprezentowali żadnych danych na poparcie tej tezy. Istnieje również praca, korelująca z naszymi badaniami, dotycząca zwiększonej odpowiedzi oddechowej na hipoksję u pacjentów z ChP (Feinsilver i wsp., 1986). Odniesienie prezentowanych wyników badań na zwierzętach, do tych wykonywanych na ludziach jest niezwykle trudne. Pacjenci z chorobą Parkinsona otrzymują bowiem leki, kompensujące niedobór dopaminy (np. L-dopa). Zauważono, że L-dopa wpływa na ośrodkową kontrolę oddychania i powoduje zaburzenia oddychania takie jak nieregularny rytm oddechowy czy ośrodkowy bezdech (Brown, 1994; Rice i wsp., 2002).

Jedyne badania zmian w funkcjonowaniu układu oddechowego w szczurzym modelu ChP wywołanym iniekcją 6-OHDA wykazały zmniejszenie częstości oddychania w normoksji i brak wpływu na odpowiedź oddechową na hipoksję (Tuppy i wsp., 2015). Odmienne wyniki mogą być związane z wykorzystaniem przez tych autorów obustronnego modelu ChP, trzy razy dłuższego okresu ekspozycji na hipoksję i badaniu po upływie 30-60 dni. Co ciekawe, autorzy nie stwierdzili żadnych zmian w testach behawioralnych w przeciwieństwie do obecnych badań, gdzie uszkodzenie szlaku nigrostriatalnego i ubytek dopaminy potwierdzono badaniem behawioralnym (test cylindra), oraz badaniami immunohistochemicznymi i biochemicznymi (HPLC).

Inne badania prowadzone na szczurach w rezerpinowym modelu parkinsonizmu wykazały obniżenie częstości oddychania i wzrost objętości oddechowej, co przełożyło się na depresję wentylacji minutowej już w normoksji. W reakcji na bodziec hipoksyjny zanotowano głównie redukcję odpowiedzi częstości oddychania oraz lekkie podwyższenie odpowiedzi objętości oddechowej (Białkowska i wsp., 2016). Zmiany f jak i V_T miały podobny charakter do obserwowanego w obecnej pracy, jednakże skutkowały one wyraźnym zmniejszeniem hipoksyjnej stymulacji wentylacji minutowej (Białkowska i wsp., 2016). Wynik ten jest odmienny od uzyskanego w modelu lezji z 6-OHDA, a różnice są prawdopodobnie związane z faktem, że model rezerpinowy charakteryzuje się rozległym wyczerpaniem wszystkich amin biogennych: dopaminy, serotoniny i noradrenaliny zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym (Duty i Jenner, 2011). Zachowany układ noradrenergiczny w naszym modelu doświadczalnym, potwierdzony analizą HPLC, może odpowiadać za różnice we wzorcu oddechowym. Zmniejszoną odpowiedź wentylacji minutowej na hipoksję zaobserwowano po podaniu 6-OHDA do jądra sinawego, gdzie zniszczeniu ulegały neurony noradrenergiczne (Soulage i wsp., 2003).

Stymulujący wpływ ubytku dopaminy na odpowiedź objętości oddechowej na hipoksję uzyskany w niniejszej pracy koreluje z doświadczeniami przeprowadzonymi na myszach pozbawionych genu DAT (brak białka transportera dopaminy) powodujący stan zwiększonej ilości dopaminy w organizmie. Zwierzęta te demonstrowały osłabioną reakcję oddechową na hipoksję w porównaniu do zwierząt typu dzikiego, co potwierdza hamującą rolę dopaminy w odpowiedzi oddechowej na obniżony poziom O_2 (Vincent i wsp., 2007). Analogicznie, zmniejszony poziom DA u szczurów po iniekcji 6-OHDA w naszych badaniach mógł nasilać pohipoksyjny wzrost objętości oddechowej.

5.2 Odpowiedź oddechowa na hipoksję na tle blokady ośrodkowych i obwodowych receptorów dopaminergicznych D_2

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu blokady obwodowych i ośrodkowych receptorów dopaminergicznych D_2 na zmiany parametrów wentylacji w normoksji i hipoksji u szczurów po podaniu 6-OHDA do MFB. Zablockowanie obwodowych i ośrodkowych receptorów D_2 haloperidolem, związkiem przechodzącym barierę krew-mózg, u zdrowych zwierząt pogłębiło wzrost objętości oddechowej w odpowiedzi na bodziec hipoksyjny, co jest zgodne z wynikami wcześniejszych doświadczeń wykonanych na ludziach (Pedersen i wsp., 1997), kotach (Lahiri i Nishino, 1980; Bonora i Gautier, 1988) i myszach (Olson i Saunders, 1985). Stymulujący wpływ haloperidolu na oddychanie nie był obserwowany po lezji, co sugeruje, że blokada receptorów dopaminergicznych D_2 w warunkach niedoboru DA nie ma już istotnego wpływu na intensyfikację odpowiedzi objętości oddechowej w hipoksji. Z drugiej strony, antagonistę wyłącznie obwodowych receptorów dopaminergicznych D_2 - domperidon, stymulował oddychanie u zdrowych zwierząt już w normoksji poprzez zwiększenie wszystkich parametrów oddechowych, wpływając w mniejszym stopniu na zmianę

reaktywności wentylacji w odpowiedzi na hipoksję. Hedner i wsp. (1982) opisali podobny wzrost objętości oddechowej w normoksji po dożylnym podaniu domperidonu szczurom. W badaniach na ludziach domperidon zwiększał wentylację w hipoksji, niemniej u połowy badanych osób zaobserwowano zwiększoną wentylację także w normoksji (Bascom i wsp., 1991). Wydaje się więc, że receptory D₂ kłębków szyjnych odgrywają istotną rolę w regulacji oddychania także w warunkach kontrolnych, a ich zadaniem jest hamowanie wentylacji podczas oddychania normoksyjnego. Jest to zgodne z badaniami przeprowadzonymi na szczurach Sprague-Dawley (Huey i wsp., 2000), które wykazały wzrost objętości i częstości oddychania po iniekcji domperidonu w trakcie 30% hiperoksji, podczas gdy odpowiedź oddechowa na hipoksję pozostała niezmienną. W naszych badaniach po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA nie zanotowano stymulacji objętości oddechowej podczas normoksji po podaniu domperidonu, w przeciwieństwie do odpowiedzi kontrolnej przed leżją. Koresponduje to z brakiem zmian parametrów wentylacji po podaniu domperidonu w szczurzym rezerpinowym modelu parkinsonizmu (Białkowska i wsp., 2016). Przyczyną braku efektu obwodowego antagonisty receptorów D₂ może być ubytek dopaminy w kłębkach szyjnych, gdzie dopamina jest produkowana i wydzielana wprost proporcjonalnie do aktywności aferentnych nerwów zatokowych i w odpowiedzi na hipoksję (Donnelly i Doyle, 1994; Prieto- Lloret i wsp., 2007). Niestety, dotychczas nie ma danych o zawartości dopaminy w kłębkach szyjnych w chorobie Parkinsona i jej modelach. Potencjalny niedobór dopaminy mógłby hipotetycznie prowadzić do braku aktywacji postsynaptycznych receptorów D₂ i dlatego u szczurów z ChP blokada obwodowych receptorów D₂ nie skutkowała żadnymi zmianami oddychania, w przeciwieństwie do zwiększenia objętości oddechowej w normoksji u zdrowych zwierząt.

Z drugiej strony brak efektu haloperidolu i domperidonu u szczurów po lezji może wskazywać na utratę aktywności zarówno ośrodkowych jak i obwodowych receptorów D₂ w kłębkach szyjnych. W piśmiennictwie brak jest danych na temat ekspresji receptorów dopaminergicznych w ośrodkach oddechowych rdzenia przedłużonego w chorobie Parkinsona. Poza tym u myszy pozbawionych receptora D₂ nie wykazano zmian parametrów wentylacji zarówno w normoksji jak i ostrej hipoksji w porównaniu do zwierząt dzikich (Prieto-Lloret i wsp., 2007). W dostępnej literaturze znalazły się wzmianki o zwiększonym wiązaniu do receptorów D₂ w ipsilateralnym prążkowie szczurów po jednostronnej iniekcji 6-OHDA do MFB (Araki i wsp., 2000; Sun i wsp., 2010). Jednakże, nie zaobserwowano zmian w wiązaniu w innych obszarach, takich jak: kora czołowa, ciemieniowa, brzuszno-środkowa część prążkowie i istota czarna (Araki i wsp., 2000). Tak więc zmiany w odpowiedzi oddechowej na hipoksję obserwowane w niniejszej pracy wydają się być raczej konsekwencją wyczerpania dopaminy, co potwierdziły badania prążkowie szczurów po lezji. Chociaż poziom DA nie zmienił się w pniu mózgu, to jej obrót uległ zwiększeniu. Wydaje się to wskazywać na zmiany metabolizmu dopaminy w tym obszarze, co mogło wpłynąć na odpowiedź na hipoksję w badanym modelu ChP. Ogólny obraz wyłaniający się z niniejszej pracy wskazuje, iż dopamina odgrywa hamującą rolę w regulacji oddychania w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Jej niedobór w modelu ChP z iniekcją 6-OHDA do MFB skutkował głównie zwiększoną odpowiedzią objętości oddechowej na bodziec hipoksyjny i brakiem efektów blokady ośrodkowych i obwodowych receptorów dopaminergicznych D₂ na oddychanie w normoksji i podczas odpowiedzi oddechowej na hipoksję.

5.3 Odpowiedź oddechowa na hiperkapnię

Oddychanie powietrzem o podwyższonej zawartości CO₂ (7% hiperkapnia w hiperoksji) po iniekcji 6-OHDA spotęgowało wzrost objętości oddechowej i obniżyło stymulację częstości oddychania, co w rezultacie spowodowało podwyższoną wentylację minutową w reakcji na bodziec, w porównaniu do stanu przed lezją. W nielicznych danych piśmiennictwa opisujących odpowiedź oddechową na hiperkapnię u ludzi z ChP obserwowano zarówno zmniejszoną (Seccombe i wsp., 2011), normalną (Onodera i wsp., 2000) jak i zwiększoną (Feinsilver i wsp., 1986) reakcję. Podobieństwo wyników w ostatniej z cytowanych pracy z niniejszymi może być związane z wyborem do badań pacjentów w łagodnym i umiarkowanym stadium choroby Parkinsona (Feinsilver i wsp., 1986), który imituje zastosowany model z jednostronnym podaniem neurotoksyny do MFB.

W jedynym doniesieniu traktującym o skutkach lezji prążkowania w reakcji na bodziec hiperkapniczny w zwierzęcym modelu ChP, Tuppy i wsp. (2015) zaobserwowali spadek odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię. Autorzy tłumaczą ten efekt zmianami i ubytkiem neuronów brzusznej kolumny oddechowej rdzenia przedłużonego. Za tę różnicę w stosunku do naszych wyników najprawdopodobniej odpowiada odmienna metodyka doświadczeń, a więc obustronna lezja, znacznie dłuższy czas ekspozycji na bodziec, badanie zmian po 3-8 tygodniach, ale przede wszystkim brak zastosowania dezypraminy chroniącej neurony noradrenergiczne. Zatem obniżenie odpowiedzi na hiperkapnię mogło być również związane z uszkodzeniem neuronów noradrenergicznych. Taką możliwość potwierdzają wcześniejsze badania z iniekcją 6-OHDA do jądra sinawego szczura, która niszcząc neurony noradrenergiczne skutkowałą zmniejszoną odpowiedzią oddechową na podwyższony poziom CO₂ w powietrzu wdychanym (Biancardi i wsp., 2008).

W 1982 roku Hedner i wsp. wykazali, że po dokomorowej iniekcji domperidonu lub haloperidolu zmniejsza się reakcja częstości oddychania i wzrasta odpowiedź objętości

oddechowej na bodziec hiperkapniczny. Wyniki te można odnieść do otrzymanych w naszej pracy, gdzie wyczerpanie dopaminy w prążkowie osłabia odpowiedź częstotliwościową na hiperkapnię i zwiększa stymulację objętości oddechowej. Ośrodkowa blokada receptorów dopaminergicznych D₂ podaniem haloperidolu czy też domperidonu powoduje ograniczenie działania dopaminy, a tym samym efekt podobny do tego po iniekcji 6-OHDA. Ponadto podawanie haloperidolu, blokującego przewodnictwo dopaminergiczne uznawane jest za jeden z modeli ChP (Duty i Jenner, 2011). Rola dopaminy w regulacji odpowiedzi na bodziec hiperkapniczny była stosunkowo mało badana i nie została jak dotąd wyjaśniona. Dowiedziono, że dożylna iniekcja dopaminy znacząco obniża reakcję na podwyższony poziom CO₂ w badaniach u ludzi (Sabol i Ward, 1987; Bain i wsp., 2015). Jednakże jej systemowe podanie wskazuje na działanie poprzez kłębki szyjne i wyklucza ośrodkowy efekt ze względu na nieprzepuszczalną dla dopaminy barierę krew-mózg. Z kolei podanie myszom samej L-dopy, prekursora dopaminy przechodzącego barierę krew-mózg, nie wpłynęło na odpowiedź oddechową na hiperkapnię (Olson i Saunders, 1985).

W poszukiwaniu wyjaśnienia zmienionej odpowiedzi oddechowej na hiperkapnię w badanym modelu ChP należałoby rozważyć potwierdzony w prezentowanej pracy, ubytek serotoniny i jej metabolitu 5-HIAA w prążkowie i pniu mózgu po iniekcji 6-OHDA. U transgenicznych myszy pozbawionych neuronów serotoninergicznych mózgu odpowiedź oddechowa na hiperkapnię była zredukowana w porównaniu do zwierząt kontrolnych, przy braku zmian w normoksji i odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Hodges i wsp., 2008). Podobne osłabienie odpowiedzi obserwowano u myszy z delecją genu transportera 5-HT (Li i Nattie, 2008). Badania na szczurach wykazały, że zniszczenie neuronów serotoninergicznych jąder szwu obniżało odpowiedź oddechową na hiperkapnię (Nattie i wsp., 2004), podczas gdy nadmiar endogennej serotoniny, wywołany przez chroniczne

mikrodializy do jąder szwu selektywnego inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny, nasilał wzrost wentylacji w odpowiedzi oddechowej na CO₂ (Taylor i wsp., 2004). Dane te pozostają w sprzeczności z uzyskanymi w obecnej pracy. Należy jednak podkreślić, że za charakter reakcji w niniejszych badaniach odpowiada jednoczesny ubytek dwóch monoamin: znaczący dopaminy i mniejszy serotoniny. Prawdopodobnie przeważał tutaj ponad 90% ubytek dopaminy i stąd wyniki przypominają dyskutowane wcześniej rezultaty Hednera i wsp. (1982), dotyczące odpowiedzi na hiperkapnię po blokadzie ośrodkowych receptorów dopaminergicznych. Niewykluczone również, że u szczurów po lezji, oprócz zmian w układach dopaminergicznym i serotonergicznym, również zmiany indukowane w innych układach mogą odpowiadać za prezentowane zmiany oddechowe. Wiadomo, iż ubytkowi neuronów dopaminergicznych w ChP towarzyszy rosnąca utrata neuronów oreksynergicznych, co jest skorelowane z progresją choroby (Thannickal i wsp., 2007). Układ ten nie był przedmiotem przedstawianych badań ale relacjonowano, że iniekcja 6-OHDA może uszkadzać także wspomniane powyżej neurony (Cui i wsp., 2010). Co więcej wykazano, że przekaźnictwo oreksynergiczne w jądrze czworobocznym oraz jądrach szwu jest zaangażowane w odpowiedź oddechową na hiperkapnię u czuwających zwierząt (Dias i wsp., 2009; Dias i wsp., 2010).

5.4 Odpowiedź oddechowa na hipoksję po aktywacji i blokadzie receptorów serotonergicznych 5-HT₂

Iniekcja 6-OHDA spowodowała nie tylko uszkodzenie neuronów dopaminergicznych, zredukowała także poziom serotoniny w prążkowie i pniu mózgu szczurów poddanych lezji. Wpływ iniekcji neurotoksyny na systemy innych neuroprzekaźników, w tym głównie na układ serotonergiczny w chorobie Parkinsona, jak również w modelach zwierzęcych tej choroby został opisany wcześniej (Hornykiewicz

1975; Blandini i wsp., 1996; Reader i Dewar, 1999; Scholtissen i wsp., 2006). Potwierdzono, że ubytek dopaminy w mózgu wywołany iniekcją 6-OHDA do prądkowia wpływa na poziom serotoniny, na właściwości elektrofizjologiczne neuronów serotonergicznym oraz na funkcje receptorów serotoniny w różnych obszarach mózgu (Di Matteo i wsp., 2008; Huot i wsp., 2011). Zmiany w układzie serotonergicznym mogą zatem odpowiadać za motoryczne i niemotoryczne objawy występujące w parkinsonizmie. Współdziałanie układów serotonergicznego i dopaminergicznego wykazano w ośrodkowym układzie nerwowym, w szczególności modulacyjny wpływ układu serotonergicznego na układ dopaminergiczny (Barnes i Sharp, 1999). Serotonergiczne unerwienie pośredniczy zarówno w pobudzaniu jak i hamowaniu sygnału dopaminergicznego w mózgu szczura. Wykazano doświadczalnie, że serotonina może modulować aktywność neuronów dopaminergicznym poprzez kilka swoistych receptorów w mózgu: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃ i 5-HT₄, których pobudzenie uwalniania dopaminę, oraz poprzez receptor 5-HT_{2C}, który pośredniczy w hamowaniu uwalniania dopaminy (De Deurwaerdere i wsp., 1998; Gervais i Rouillard 2000). Wyniki te wyjaśniają obecność receptorów dla serotoniny w rejonach neuronów dopaminergicznym (Alex i Pehek, 2007) oraz istnienie bezpośrednich synaps pomiędzy zakończeniami neuronów serotonergicznym i aksonami komórek DA w śródmózgowiu (Nedergaard i wsp., 1988).

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu uszkodzenia kompleksu czarnoprądkowioowego na wentylację spoczynkową i odpowiedź oddechową na hipoksję po podaniu agonisty i antagonisty receptorów serotonergicznym 5-HT_{2A} (odpowiednio DOI i ketanseryny). W obu stanach przed i po lezji dootrzewnowa iniekcja DOI w normoksji wywoływała wzrost częstości oddychania i wentylacji minutowej, a w hipoksji wyraźny spadek reaktywności odpowiedzi oddechowej dla obu parametrów. Podanie ketanseryny przywracało parametry oddechowe do wartości wyjściowych. Powyższe wyniki pozostają

w zgodzie z dostępną literaturą. U królików po odnerwieniu kłębków szyjnych dokomorowa iniekcja serotoniny podwyższała V_T i V_E w normoksji, zmniejszała natomiast reakcję oddechową na hipoksję. Autorzy spekulują, że zmniejszona reakcja na hipoksję po podaniu serotoniny mogła być wynikiem nagromadzenia hamującej oddychanie dopaminy (Guner i wsp., 2008).

W niniejszej pracy u zwierząt poddanych lezji reaktywność V_E w odpowiedzi na hipoksję po podaniu DOI była wyraźnie zmniejszona (o 32%) w porównaniu do stanu przed lezją (o 17%). W związku z powyższym nasuwa się pytanie o przyczynę zaobserwowanych zmian. Wykazano uprzednio, iż iniekcja DOI zwiększała uwalnianie dopaminy a efekt ten odwracało podanie antagonisty receptorów 5-HT_{2A} (Pehek i wsp., 2001; Pehek i wsp., 2006). Zatem DOI-agonista tychże receptorów mógłby działać modulująco na układ dopaminergiczny wywołując wzrost poziomu dopaminy, która z kolei hamowałaby odpowiedź oddechową na hipoksję. Nie zostało to jednak potwierdzone, bowiem limitacja endogennej serotoniny w prążkowi przez podanie neurotoksyny do jąder szwu, powodująca jej wyczerpanie w prążkowi, nie miała żadnego wpływu na aktywność neuronów dopaminergicznych. Natomiast infuzja do prążkowie citalopramu i fluoksetyny, hamujących wychwyt zwrotny serotoniny, przy jednoczesnym podaniu systemowym haloperidolu zwiększała uwalnianie dopaminy w większym stopniu niż podczas podania samych inhibitorów (Lucas i wsp., 2000). Badany w obecnej pracy model wykazuje pewną analogię do stanu po podaniu haloperidolu, który jak wspomniano wcześniej, jest stosowany do modelowania choroby Parkinsona.

Obserwowane w niniejszych badaniach zmniejszenie reakcji oddechowej na hipoksję po DOI w stanie jednostronnej degeneracji neuronów dopaminergicznych mogłoby zatem wynikać ze zwiększonego uwalniania hamującej dopaminy po stronie nieuszkodzonej, o zachowanych neuronach dopaminergicznych.

Innym hipotetycznym wyjaśnieniem obserwowanych zmian może być zachwianie równowagi między układem dopaminergicznym a serotonergicznym. W sytuacji gdy istotnemu ubytkowi dopaminy towarzyszy stosunkowo mniejszy ubytek endogennej serotoniny, działanie serotoniny może przeważać. Tym samym u zwierząt po lezji obserwujemy dodatkowo zredukowaną odpowiedź wentylacji na hipoksję po dootrzewnowej iniekcji DOI, co koresponduje z hamującym wpływem egzogennej i endogennej 5-HT na depresyjną fazę odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Guner i wsp, 2008; Kanamaru i Homma, 2009) oraz odwrotnym pobudzającym wpływem antagonisty receptorów 5-HT₂ na hipoksyjną aktywność nerwu przeponowego (Kinkead i Mitchell, 1999).

Serotonina uwalniana w obszarze grzbietowo-przyśrodkowym rdzenia przedłużonego, zawierającym jądro pasma samotnego oraz jądro nerwu podjęzykowego, jest zaangażowana w inicjację odpowiedzi oddechowej na hipoksję oraz w jej fazę depresyjną. Blokada receptorów 5-HT₂ w tym obszarze skutkuje opóźnionym pojawieniem się po-hipoksyjnej hiperwentylacji oraz redukcją fazy depresyjnej (Kanamaru i Homma, 2009).

W świetle tych danych, obserwowane w naszych badaniach obniżenie odpowiedzi V_T podczas wczesnej fazy reakcji na hipoksję u zwierząt po lezji na tle aktywacji receptorów 5-HT₂ można przypisać zmniejszonej o 20% zawartości serotoniny w pniu mózgu zwierząt z ChP.

5.5 Aktywność nerwów podjęzykowego i przeponowego

Analiza neurogramu nerwu przeponowego wykazała znamienne wydłużenie czasu wdechu, oraz nieistotne wydłużenie wydechu oraz długości trwania cyklu oddechowego w normoksji u zwierząt po lezji. Podczas odpowiedzi oddechowej na hipoksję znamienne

różnice pomiędzy grupami dotyczyły czasu wydechu oraz całkowitego czasu cyklu oddechowego, który był dłuższy w grupie z ChP dla punktów maksymalnej odpowiedzi (T_E) oraz powrotu po podaniu bodźca (T_E i T_C). Zmiany te łączyły się ze zmniejszeniem częstotliwości wyładowań nerwu przeponowego podczas powrotu po podaniu hipoksji w porównaniu do grupy sham. Charakter odpowiedzi oddechowej na hipoksję dla częstości oraz T_I , T_E i T_C niezależnie od badanego czynnika jakim była lezja, był zgodny z danymi obserwowanymi przez innych badaczy (Budzińska, 2009; Lee i Fuller, 2010).

Degeneracja neuronów dopaminergicznych po podaniu 6-OHDA do MFB spowodowała istotne zmiany w amplitudzie nerwu podjęzykowego. W odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny zanotowano znamienny wzrost amplitudy nerwu, co przełożyło się także na wzrost aktywności minutowej.

Zmiany amplitudy nerwu przeponowego w odpowiedzi oddechowej na hipoksję nie różniły się między badanymi grupami, jedynie powrót po podanym bodźcu hipoksyjnym osiągnął istotnie większe wartości u zwierząt po lezji. Uzyskane wyniki korespondują z doświadczeniami wykonanymi przez Budzińską i Andrzejewskiego (2014). W badaniach aktywności nerwów po jednostronnej iniekcji 6-OHDA do prążkowiec wykazano wzrost amplitudy i aktywności minutowej nerwu podjęzykowego w odpowiedzi na hipoksję przerywaną oraz tendencję spadkową dla częstotliwości podczas powrotu po podanym bodźcu (Budzińska i Andrzejewski, 2014). Autorzy nie wykazali natomiast żadnych zmian w odpowiedzi oddechowej na hipoksję w aktywności nerwu przeponowego.

Większe spektrum zmian w aktywności nerwów zaobserwowane w niniejszej pracy może wynikać z innego miejsca podania neurotoksyny. Iniekcja 6-OHDA do MFB powoduje wsteczny transport neurotoksyny do ciał komórek neuronów wywołując ich degenerację oraz rozległe i nagłe wyczerpanie DA (Sun i wsp., 2011). Iniekcja do striatum indukuje natomiast powolną atrofię komórek dopaminergicznych, wywołaną uszkodzeniem

ich zakończeń nerwowych (Sauer i wsp., 1995; Deumens i wsp., 2002). Obserwowana w obecnej pracy podwyższona amplituda wyładowań nerwu przeponowego podczas powrotu po hipoksji u zwierząt z leżą może wynikać ze znacznego ubytku dopaminy, obserwowanego w prezentowanych wynikach. Jak sugerują inni badacze, dopamina odpowiada za późniejszą depresyjną fazę odpowiedzi oddechowej na hipoksję (Goigny i wsp., 1991; Guner i wsp., 2002). Jej ubytek mógłby skutkować zatem zwiększeniem amplitudy nerwu przeponowego obecnym podczas fazy depresyjnej. W pracy Budzińskiej i Andrzejewskiego (2014) taka sytuacja nie ma miejsca, prawdopodobnie dlatego, że zastosowany model jest łagodniejszy i powoduje znacząco mniejsze ubytki dopaminy (Yuan i wsp., 2005).

Brak zmian w normoksyjnej aktywności nerwu przeponowego po iniekcji 6-OHDA uzyskany w prezentowanych badaniach jest zgodny z propozycją Estenne i wsp. (1984), wskazującą na brak wpływu ChP na aktywność przepony podczas oddychania powietrzem atmosferycznym u ludzi. Nerwy przeponowy i podjęzykowy różnie reagują na bodźce i z różną intensywnością (Weiner i wsp., 1982). Epizodyczna czy też przerywana hipoksja w większym stopniu pobudza nerw podjęzykowy niż przeponowy (Bradford i wsp., 2005). Egzogenna dopamina u zdrowych zwierząt hamuje aktywność nerwu podjęzykowego oraz powoduje jedynie niewielką depresję aktywności nerwu przeponowego (van Lunteren i wsp., 1984). Odwrotne działanie było obserwowane w badanym modelu z iniekcją 6-OHDA, kiedy to istotny ubytek dopaminy przekładał się głównie na zwiększenie amplitudy i aktywności minutowej n. podjęzykowego w odpowiedzi na hipoksję.

W procesie oddychania mięśnie górnych dróg oddechowych oraz przepona są pobudzane przez określone motoneurony rdzenia przedłużonego i kręgowego. Te z kolei otrzymują impulsy z oddzielnych neuronów przedruchowych (Peever i wsp., 2002; Koizumi i wsp., 2008). Ponadto badane nerwy mają różne wzajemne połączenia z innymi

układami, jak na przykład z wielosynaptyczną projekcją z istoty czarnej wyłącznie z nerwem podjęzykowym (Fay i Norgren, 1997). Odmienne kontrola, anatomiczne i funkcjonalne zróżnicowanie obu nerwów mogą być przyczyną niejednakowego wpływu uszkodzenia szlaku czarnoprążkowego na ich aktywność podczas hipoksji.

Potwierdzone w tej pracy zmiany w układzie serotonergicznym, towarzyszące degeneracji układu dopaminergicznego, mogą wpływać na odpowiedź oddechową nerwu podjęzykowego na hipoksję i wyjaśniać mechanizm zwiększonej stymulacji tego nerwu w odniesieniu do aktywności nerwu przeponowego po iniekcji 6-OHDA. Wydaje się, że znacznie mniejszy ubytek serotoniny w porównaniu z ponad 90% ubytkiem dopaminy powoduje zachwianie równowagi i przewagę aktywności systemu serotonergicznego nad dopaminergicznym. Skądinąd wiadomo, że serotonina wykazuje działanie pobudzające na aktywność nerwu XII poprzez receptory 5-HT₂ (Kubin i wsp., 1992; Fenik i Veasey, 2003). Aktywność nerwu podjęzykowego uczestniczy w utrzymaniu drożności górnych dróg oddechowych. Unerwia on zewnętrzne i wewnętrzne mięśnie języka i ułatwia poszerzenie górnych dróg oddechowych poprzez regulację położenia i sztywności języka (Bailey i Fregosi, 2004). Wcześniejsze badania wykazały, że ubytek dopaminy w prążkowie powoduje upośledzenie motoryki języka, zarówno u ludzi z chorobą Parkinsona jak i w modelach eksperymentalnych, co może sugerować zmiany w nerwowej kontroli mięśni języka (Ciucci i wsp., 2011; Nuckolls i wsp., 2012).

W niniejszej pracy dodatkowa zmiana w aktywności nerwu podjęzykowego u zwierząt po podaniu 6-OHDA została wyrażona przez stosunek amplitudy przedwdechowej do amplitudy wdechowej. Podczas hipoksji amplituda przedwdechowa wzrosła bardziej niż amplituda wdechowa, co przełożyło się na wzrost stosunku amplitudy przedwdechowej do wdechowej nerwu podjęzykowego (A pre-I/A HG). Współczynnik A pre-I/A HG u zwierząt sham w odpowiedzi na hipoksję osiągał istotnie wyższe wartości niż u zwierząt po

lezji dla maksymalnej reakcji na bodziec hipoksyjny oraz podczas powrotu po podaniu bodźca. Ponadto u zwierząt po lezji odnotowano tendencję do zmniejszenia stosunku czasu aktywności przedwdechowej do czasu całkowitego cyklu oddechowego (T_{pre-I}/T_c) w odpowiedzi na bodziec hipoksyjny. W pracy z iniekcją 6-OHDA do striatum wykazano podobne zmiany (Budzińska i Andrzejewski, 2014). Udokumentowano nieistotne zmniejszenie stosunku T_{pre-I}/T_c oraz istotny spadek stosunku A_{pre-I}/A_{HG} dla ostatniego punktu trwania hipoksji przerywanej i dla powrotu po zadanym bodźcu. Lee i Fuller (2010) uważają, że przedwdechowa aktywność nerwu podjęzykowego jest odpowiedzialna za utrzymanie drożności górnych dróg oddechowych. Jeśli tak jest, to zmniejszenie stosunku przedwdechowej do wdechowej aktywności nerwu podjęzykowego podczas hipoksji jak i w czasie powrotu do wentylacji spoczynkowej mogą wskazywać na problemy z utrzymaniem odpowiedniej średnicy dróg oddechowych po iniekcji 6-OHDA. Mechanizm regulacji i kontroli aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego nie jest w pełni poznany. Aktywność ta znajduje się pod wpływem informacji z płuc (Saito i wsp., 2002) i napędu chemicznego (Lee i Fuller, 2010). Zastosowanie wagotomii i podobne parametry wentylacji w grupach sham i 6-OHDA wskazują na zaangażowanie innych czynników w powstawanie różnic w aktywności przedwdechowej. Badania elektrofizjologiczne i neuroanatomiczne wykazały, że przedwdechowa a także wdechowa aktywność nerwu podjęzykowego może być napędzana przez mostowe jądro Kölliker-Fuse (KF) pobudzone hipoksją (Song i wsp., 2011), zawierające grupę neuronów przedruchowych dla tego nerwu (Kuna i Remmers, 1999; Ezure i Tanaka, 2006). Z danych piśmiennictwa wynika, że jądra okołokonarowe w skład których wchodzi KF otrzymują i wysyłają projekcje do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB), gdzie podawana była 6-OHDA, uszkadzająca neurony dopaminergiczne (Nieuwenhuys i wsp., 1982). Zatem zaobserwowane zmiany w przedwdechowej aktywności nerwu podjęzykowego po uszkodzeniu neuronów

dopaminergicznych mogą zachodzić poprzez zmiany w samym jądrze KF. Ostatnie dane literaturowe pokazują, że w rdzeniu przedłużonym osób cierpiących na demencję z ciałami Lewiego, zaobserwowano degenerację neuronów oddechowych (Presti i wsp., 2014). Zostało to potwierdzone w badaniach eksperymentalnych w modelu obustronnym choroby Parkinsona, gdzie podawano 6-OHDA do prążkowiec (Tuppy i wsp., 2015). Ubytek neuronów dotyczył kompleksu pre-Bötzingera oraz jądra czworobocznego. Nie znaleziono natomiast żadnych zmian w kompleksie Bötzingera i dogłowej części brzusznej grupy oddechowej. W niniejszej pracy nie badano ubytku neuronów oddechowych, niewykluczone jednak, że podobne zmiany degeneracyjne mogły pojawić się w zastosowanym przez nas modelu.

5.6 Immunohistochemia oraz poziom amin biogennych w prążkowiec i pniu mózgu

Domózgowa iniekcja 6-OHDA powoduje wyczerpanie dopaminy w mózgu, co jest rezultatem uszkodzenia neuronów dopaminergicznych. Barwienie TH pozytywnych neuronów metodą immunohistochemii w skrawkach mózgow wykazało 91% ubytek neuronów istoty czarnej zbitej po stronie ipsilateralnej do miejsca iniekcji 6-OHDA w porównaniu ze stroną nieuszkodzoną. Średnia liczba neuronów dopaminergicznych po stronie kontralateralnej koreluje z danymi literaturowymi. Podobną liczbę komórek w barwieniu immunohistochemicznym na obecność hydroksylazy tyrozynowej w zdrowej SN uzyskali Ma i wsp. (2014) oraz Sun i wsp. (2010). Ci ostatni po 4 tygodniach od iniekcji 6-OHDA do MFB zaobserwowali 97,7% ubytek neuronów dopaminergicznych w ipsilateralnej SN po podaniu 6-OHDA. W innej pracy po 3 tygodniach od lezji wykazano 82% ubytek neuronów dopaminergicznych, który po 5 tygodniach od lezji zwiększał się do ponad 99% (Yuan i wsp., 2005). Uzyskany w niniejszej pracy wynik nie odbiega zatem od

tych otrzymywanych przez innych badaczy. Nieznaczne różnice w procentowym ubytku neuronów TH pozytywnych mogą wynikać z czasu przeprowadzenia analiz po iniekcji 6-OHDA. Im dłuższy czas od podania neurotoksyny tym ubytek neuronów dopaminergicznych istoty czarnej jest większy.

Dodatkowym narzędziem użytym do zbadania ilościowych zmian w poziomach dopaminy, serotoniny i noradrenaliny, zarówno w prążkowie jak i pniu mózgu, była analiza homogenatów przy wykorzystaniu techniki HPLC. W ipsilateralnym prążkowie wykazano ponad 90% spadek poziomu dopaminy i jej metabolitu DOPAC w porównaniu do grupy z uszkodzeniem pozorowanym, co potwierdza skuteczność wykonanej lezji. Ponad 26% spadek zawartości dopaminy w prążkowie kontralateralnym do miejsca iniekcji 6-OHDA w porównaniu do zwierząt z lezją pozorowaną świadczy o jednoczesnym wpływie iniekcji do prawego MFB na zawartość dopaminy również w lewym prążkowie. Ponadto w lewym i prawym prążkowie zwierząt z modelem ChP stwierdzono zwiększony obrót DOPAC/ DA.

Uzyskane rezultaty pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi. Sadeghian i wsp. (2012) wykazali spadek ilości dopaminy o 65% i spadek poziomu DOPAC o 52% w prążkowie, co przełożyło się na wzrost obrotu DOPAC/ DA. Henderson i wsp. (2003) u zwierząt po jednostronnej lezji do MFB zanotowali 71% spadek poziomu dopaminy, oraz 66% spadek poziomu DOPAC w prążkowie. Znaczny ubytek dopaminy uzyskany w niniejszej pracy przypuszczalnie wynikał z większej dawki 6-OHDA. Henderson i wsp. (2003) podawali 16 µg, natomiast Sadeghian i wsp. (2012) 12µg, a w niniejszej pracy iniekcja dwumiejscowa zamykała się w sumarycznej dawce 40 µg.

Lezja nie wpłynęła bezpośrednio na zawartość dopaminy w pniu mózgu, w którym znajdują się ośrodki kontrolujące oddychanie. Sadakierska-Chudy i wsp. (2010) również wykazali brak zmian ilościowych dopaminy w pniu mózgu po iniekcji dokomorowej 6-OHDA. W obecnej pracy po obu stronach pnia mózgu stwierdzono natomiast zwiększony

obrót DOPAC/ DA, co sygnalizuje pewne zmiany w metabolizmie dopaminy, które mogły wpłynąć na regulację oddychania w zastosowanym modelu ChP. Zmiany te mogą sugerować początek procesu degeneracji neuronów dopaminergicznych w pniu.

Wiadomo, iż układ czarnoprążkowiowy posiada połączenia nerwowe z ośrodkami oddechowymi pnia mózgu, np. projekcja z istoty czarnej do jądra motorycznego nerwu podjęzykowego (Fay i Norgren, 1997). Poza tym sugeruje się wpływ samego prążkowiego na oddychanie dowolne. Analiza MRI wykazała zwiększoną aktywację w obszarze prążkowiego, podczas dowolnego i obciążonego wdechu (Evans i wsp., 1999). Ponadto podczas hipoksji w prążkowie obserwuje się wzrost ilości pozakomórkowej dopaminy (79%) oraz serotoniny (26%), natomiast zastosowanie wielokrotnej ekspozycji na hipoksję powoduje podwyższenie ilości tych neuroprzekaźników także w normoksji (Broderick i Gibson, 1989). Zatem zmiany w poziomie obu amin w samym prążkowie mogłyby mieć związek ze zmienioną regulacją oddychania obserwowaną podczas hipoksji.

Zawartość serotoniny u zwierząt po lezji w odniesieniu do grupy sham była zmniejszona o ok. 30% w prążkowie po obu stronach, czemu towarzyszył zwiększony obrót 5-HIAA/ 5-HT i wzrost poziomu metabolitu 5-HIAA po stronie z iniekcją 6-OHDA. W badaniach z zastosowaniem podobnego modelu nie zanotowano zmian poziomu serotoniny w prążkowie, stwierdzono jedynie nieistotny wzrost metabolitu 5-HIAA (Henderson i wsp., 2003). Prawdopodobnie mniejsza dawka neurotoksyny (16 µg) podana do MFB nie była wystarczająca do wywołania zmian zawartości serotoniny, ale spowodowała zwiększenie ilości jej metabolitu. W 1994 roku Karstaedt i wsp. po 6 tyg. od iniekcji 6-OHDA do MFB szczura wykazali ponad 50% ubytek serotoniny w prążkowie i około 40% ubytek 5-HIAA. Dane te pokazują większy niż uzyskany w niniejszej pracy ubytek samej serotoniny, oraz odwrotny efekt obserwowany w poziomie HIAA. Różnice mogą wynikać z dłuższego okresu czasu po lezji po jakim zostały pobrane mózgi do analiz

jak i odmiennych koordynat dla iniekcji 6-OHDA. U ludzi z chorobą Parkinsona obserwowano zmniejszoną ilość serotoniny i 5-HIAA w prążkowie, przy czym spadek ilości 5-HIAA był obserwowany w bardziej zaawansowanych stadiach ChP (Scatton i wsp., 1983; Kish i wsp., 2008).

W obecnej pracy iniekcja 6-OHDA do MFB obniżyła zawartość serotoniny i zwiększyła obrót 5-HIAA/ 5-HT w pniu mózgu zwierząt po obu stronach. Podobne zmiany opisali Sadakierska-Chudy i wsp. (2010) u zwierząt po dokomorowym podaniu neurotoksyny.

Analiza zawartości noradrenaliny nie wykazała różnic pomiędzy zwierzętami po lezji a grupą z uszkodzeniem pozorowanym zarówno w prążkowie jak i pniu mózgu. Ponadto ilości noradrenaliny w prążkowie były na granicy oznaczalności, co jest zgodne z danymi piśmiennictwa (Nowak i wsp., 2009; Sadakierska-Chudy i wsp., 2010). Uzyskane wyniki potwierdziły prawidłowe podanie dezypraminy zapobiegającej degeneracji neuronów noradrenergicznych.

Brak podania dezypraminy u zwierząt po dokomorowej iniekcji 6-OHDA powodował ubytki noradrenaliny zarówno w prążkowie jak i pniu mózgu (Sadakierska-Chudy i wsp., 2010). Warto nadmienić, że w ChP obserwuje się ubytki neuronów noradrenergicznych, w szczególności w jądrze sinawym znajdującym się w moście (Delaville i wsp., 2011).

W celu potwierdzenia skuteczności wykonanych lezji przeprowadzono test behawioralny cylindra, który u zwierząt traktowanych 6-OHDA wykazał zmniejszone użycie przedniej kończyny lewej kontralateralnej do miejsca iniekcji neurotoksyny. Efekt ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami opisującymi jednostronne podanie 6-OHDA (Deumens 2002; Shi i wsp., 2004; Iderberg i wsp., 2015). Ponadto zaobserwowano spadek ruchliwości zwierząt z ChP, co można odnieść do spowolnienia ruchowego i dysfunkcji układu ruchu ludzi chorych na chorobę Parkinsona (Błaszczyk, 1998).

Pomiar masy ciała przed i po 14 dniach od iniekcji 6-OHDA lub rozpuszczalnika wykazał mniejszy przyrost masy u zwierząt z eksperymentalnie wywołaną ChP. Podobne wyniki, czyli zmniejszony przyrost masy ciała lub jej niewielki ubytek uzyskano w tym samym modelu (Roedter i wsp., 2001). U zwierząt z obustronną iniekcją 6-OHDA do istoty czarnej zaobserwowano znaczny spadek masy ciała w stosunku do kontroli przed leżją (Ferro i wsp., 2005). Model z obustronnym podaniem 6-OHDA jest bardziej traumatyczny dla zwierząt, obserwuje się u nich adipsję i afagię, co skutkuje istotną utratą masy ciała i zwiększoną śmiertelnością (Schwartzing i Huston, 1996; Roedter i wsp., 2001). Warto nadmienić, że u ludzi z ChP również obserwuje się utratę masy ciała (Beyer i wsp., 1995; Kashihara, 2006).

Podobieństwa modelu zwierzęcego do objawów choroby Parkinsona u ludzi wskazuje na użyteczność modelu z podaniem 6-OHDA do MFB w badaniach nad tą chorobą. Co więcej, zastosowany zwierzęcy model doświadczalny choroby Parkinsona wydaje się być skutecznym narzędziem w badaniach nad funkcjonowaniem układu oddechowego.

6. PODSUMOWANIE

- Jednostronne uszkodzenie układu dopaminergicznego w modelu z podaniem 6-OHDA do MFB wpływa na wielkość odpowiedzi oddechowej na bodziec hipoksyjny i hiperkapniczny poprzez zwiększenie objętości oddechowej, zmniejszenie częstości oddychania i w rezultacie zwiększenie wentylacji minutowej
- Blokada obwodowych i ośrodkowych receptorów dopaminergicznych D₂ stymulowała oddychanie w normoksji (domperidon) oraz podczas hipoksji (haloperidol i domperidon), nie wpłynęła natomiast na oddychanie u zwierząt poddanych lezji
- Zarówno u zwierząt zdrowych jak i po lezji aktywacja receptorów 5-HT₂ iniekcją DOI stymulowała oddychanie w normoksji. Zaobserwowano większe obniżenie hipoksyjnej reakcji po podaniu DOI po uszkodzeniu szlaku czarnoprążkowiowego
- Degeneracja neuronów dopaminergicznych wpłynęła na zmienioną aktywność nerwu podjęzykowego podczas hipoksji, manifestowaną wzrostem amplitudy oraz zmniejszonym stosunkiem amplitudy przedwdechowej do wdechowej
- Jednostronna iniekcja 6-OHDA do MFB po 14 dniach istotnie obniżyła poziom dopaminy w ipsilateralnym prążkowie oraz w mniejszym stopniu serotoniny w prążkowie i pniu mózgu zarówno po lewej jak i jego prawej stronie. Obserwowany zmieniony wzorzec oddychania podczas hipoksji i hiperkapni może być wypadkową ubytku obu amin biogennych

7. WNIOSKI

1. Iniekcja 6-OHDA do MFB może stanowić wartościowy model do badań nad zmianami w funkcjonowaniu układu oddechowego w chorobie Parkinsona.
2. Stymulacja oddychania w odpowiedzi na hipoksję u zwierząt z ubytkiem dopaminy oraz po podaniu antagonistów receptorów dopaminergicznych D_2 u zwierząt zdrowych, potwierdza hamujące działanie dopaminy na oddychanie poprzez aktywację receptorów dopaminergicznych D_2 .
3. Dopamina jest hamującym modulatorem oddechowej odpowiedzi na hiperkapnię.
4. Zmniejszenie reakcji na hipoksję po aktywacji receptorów $5-HT_2$ w modelu uszkodzenia szlaku czarnoprążkowiowego potwierdza zmiany w układzie serotoninericznym, odgrywającym istotną rolę w regulacji oddychania.
5. Zmiany w aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego odpowiadającego za utrzymanie drożności górnych dróg oddechowych u zwierząt po lezji mogą stanowić przyczynę zaburzeń oddychania obserwowanych w chorobie Parkinsona.

8. SPIS PIŚMIENICTWA

1. Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Zoccal DB, Machado BH, St-John WM, Paton JF. Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009; 168: 19-25.
2. Agid Y, Javoy-Agid F, Ruberg M. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S, editors. *London. Mov disord.* 1987; 2: pp 166-230.
3. Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther.* 2007; 113: 296-320.
4. Alheid G, McCrimmon D. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 164: 3-11.
5. Angel A, Knox GV. The effect of anaesthesia on units in the thalamic reticular formation. *J Physiol.* 1970; 210: 167P-168P.
6. Araki T, Tanji H, Kato H, Imai Y, Mizugaki M, Itoyama Y. Temporal changes of dopaminergic and glutamatergic receptors in 6-hydroxydopamine-treated rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2000; 10: 365-375.
7. Arnulf I, Konofal E, Merino-Andreu M, Houeto JL, Mesnage V, Welter ML, Lacomblez L, Golmard JL, Derenne JP, Agid Y. Parkinson's disease and sleepiness: an integral part of PD. *Neurology,* 2002; 58: 1019-1024.
8. Ayappa I, Berger KI, Norman RG, Oppenheimer BW, Rapoport DM, Goldring RM. Hypercapnia and ventilatory periodicity in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 1112-1115.
9. Azmitia EC. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 77: 31–56.
10. Bailey EF, Fregosi RF. Coordination of intrinsic and extrinsic tongue muscles during spontaneous breathing in the rat. *J Appl Physiol.* 2004; 96: 440–449.
11. Bain AR, Dujic Z, Hoiland RL, Barak OF, Madden D, Drvis I, Stenbridge M, MacLeod DB, MacLeod DM, Ainslie PN. Peripheral chemoreflex inhibition with low-dose dopamine: New insight into mechanisms of extreme apnea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 309: R1162-R1171.

12. Bairam A, Frenette J, Dauphin C, Carroll JL, Khandjian EW. Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. *Neurosci Res.* 1998; 31: 147-154.
13. Barnéoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquet JM, Boireau A, Dubédat P, Blanchard JC. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*, 1995; 67: 837-848.
14. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 1999; 38: 1083-1152.
15. Bascom DA, Clement ID, Dorrington KL, Robbins PA. Effects of dopamine and domperidone on ventilation during isocapnic hypoxia in humans. *Respir Physiol.* 1991; 85: 319-328.
16. Bayliss DA, Barhanin J, Gestreau C, Guyenet PG. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 917-929.
17. Beyer PL, Palarino MY, Michalek D, Busenbark K, Koller WC. Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. *J Am Diet Assoc.* 1995; 95: 979-983.
18. Białkowska M, Boguszewski P, Pokorski M. Breathing in Parkinsonism in the Rat. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 884: 1-11.
19. Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂-drive to breathing. *Plügers-EJP.* 2008; 455: 1119–1128.
20. Bisgard GE, Neubauer JA: Peripheral and central effects of hypoxia. *Regulation of Breathing*, ed. Dempsey JA and Pack AI, Marcel Dekker Inc. New York. 1995; pp 617–668.
21. Black AM, McCloskey DI, Torrance RW. The responses of carotid body chemoreceptors in the cat to sudden changes of hypercapnic and hypoxic stimuli. *Respir Physiol.* 1971; 13: 36-49.
22. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 1996; 12: 73-94.
23. Blaszczyk JW. Motor deficiency in Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1998; 58: 79-93.

24. Bolme P, Fuxe K, Hökfelt T, Goldstein M. Studies on the role of dopamine in cardiovascular and respiratory control: central versus peripheral mechanisms. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1977; 16: 281-290.
25. Bonora M, Gautier H. Influence of dopamine and norepinephrine on the central ventilatory response to hypoxia in conscious cats. *Respir Physiol.* 1988; 71: 11-24.
26. Boscan P, Pickering AE, Paton JF. The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents. *Exp Physiol.* 2002; 87: 259-266.
27. Braak H, Rüb U, Sandmann-Keil D, Gai WP, de Vos RA, Jansen Steur EN, Arai K, Braak E. Parkinson's disease: affection of brain stem nuclei controlling premotor and motor neurons of the somatomotor system. *Acta Neuropathol.* 2000; 99: 489-495.
28. Bradford A, McGuire M, O'Halloran KD. Does episodic hypoxia affect upper airway dilator muscle function? Implications for the pathophysiology of obstructive sleep apnoea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005; 147: 223-234.
29. Brandes IF, Zuperku EJ, Stucke AG, Jakovcevic D, Hopp FA, Stuth EA. Serotonergic modulation of inspiratory hypoglossal motoneurons in decerebrate dogs. *J Neurophysiol.* 2006; 95: 3449-3459.
30. Broderick PA, Gibson GE. Dopamine and serotonin in rat striatum during *in vivo* hypoxic-hypoxia. *Metabolic Brain Disease,* 1989; 2: 143-153.
31. Brown LK. Respiratory dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Chest Med.* 1994; 15: 715-727.
32. Budzinska K, Andrzejewski K. Respiratory activity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2014; 74: 67-81.
33. Budzinska K. Serotonergic modulation of cortical and respiratory responses to episodic hypoxia. *Eur J Med Res.* 2009; 4: 32-37.
34. Butler JE. Drive to the human respiratory muscles. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007; 159: 115-126.
35. Butt AM. ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22: 205-213.
36. Carey RM. The intrarenal renin-angiotensin and dopaminergic systems: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Hypertension,* 2013; 61: 673-680.

37. Carroll JL, Kim I. Carotid chemoreceptor "resetting" revisited. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013; 185: 30-43.
38. Carvalho MM, Campos FL, Coimbra B, Pêgo JM, Rodrigues C, Lima R, Rodrigues AJ, Sousa N, Salgado AJ. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener.* 2013; 26: 8-14.
39. Cherniack NS, von Euler C, Homma I, Kao FF. Graded changes in central chemoceptor input by local temperature changes on the ventral surface of medulla. *J Physiol.* 1979; 287: 191-211.
40. Cheung PY, Barrington KJ. Renal dopamine receptors: mechanisms of action and developmental aspects. *Cardiovasc Res.* 1996; 31: 2-6.
41. Ciarka A, Vincent JL, van de Borne P. The effects of dopamine on the respiratory system: friend or foe? *Pulm Pharmacol Ther.* 2007; 20: 607-615.
42. Ciucci MR, Russell JA, Schaser AJ, Doll EJ, Vinney LM, Connor NP. Tongue force and timing deficits in a rat model of Parkinson disease. *Behav Brain Res.* 2011; 222: 315–320.
43. Clarke JA, Daly MD, Ead HW. Dimensions and volume of the carotid-body in the adult cat, and their relation to the specific blood-flow through the organ-a histological and morphometric study. *Acta Anatom.* 1986; 126, pp. 84–86
44. Cohen, MI. Discharge patterns of brain-stem respiratory neurons in relation to carbon dioxide tension. *J. Neurophysiol.* 1968; 31, 142-165.
45. Cools R. Role of dopamine in the motivational and cognitive control of behavior. *Neuroscientist*, 2008; 14: 381-395
46. Costentin J. Pain and its main transmitters. *Ann Pharm Fr.* 2000; 58: 77-83.
47. Cui LB, Li BW, Jin XH, Zhao L, Shi J. Progressive changes of orexin system in a rat model of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. *Neurosci Bull.* 2010; 26: 381-387.
48. Cummings JL. Depression and Parkinson's disease: A review. *The American Journal of Psychiatry.* 1992; 149: 443–454.
49. Czyzyk-Krzeska MF, Lawson EE, Millhorn DE. Expression of D₂ dopamine receptor mRNA in the arterial chemoreceptor afferent pathway. *J Auton Nerv Syst.* 1992; 41: 31-39.

50. De Deurwaerdère P, Stinus L, Spampinato U. Opposite change of *in vivo* dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors. *J Neurosci*. 1998; 18: 6528-6538.
51. Deegan PC, Mulloy E, McNicholas WT. Topical oropharyngeal anesthesia in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151: 1108-1112.
52. Delapille P, Verin E, Tourny-Chollet C, Pasquis P. Ventilatory responses to hypercapnia in divers and non-divers: effects of posture and immersion. *Eur J Appl Physiol*. 2001; 86: 97-103.
53. Delaville C, Deurwaerdère PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci*. 2011; 5: 31.
54. Delpierre SM., Peyrot J, Guillot C, Grimaud C. Ventilatory effects of domperidone, a new dopamine antagonist in anaesthetized rabbits. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1985; 275: 47-58.
55. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010; 90: 47-112.
56. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Exp Neurol*. 2002; 175: 303-317.
57. Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E. Serotonin control of central dopaminergic function: focus on *in vivo* microdialysis studies. *Prog Brain Res*. 2008; 172: 7-44.
58. Dias MB, Li A, Nattie E. The orexin receptor 1 (OX₁R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 170: 96-102.
59. Dias MB, Li A, Nattie EE. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J Physiol*. 2009; 587: 2059-2067.
60. Djaldetti R, Ziv I, Melamed E. The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 796-802.
61. Dobbins EG, Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol*. 1994; 347: 64-86.
62. Donnelly DF, Doyle TP. Developmental changes in hypoxia-induced catecholamine release from rat carotid body, *in vitro*. *J Physiol*. 1994; 475: 267-275.

63. Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 1981; 215: 147-161.
64. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 1997; 16: 5464-5471.
65. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 2011; 164: 1357-1391.
66. Ellenberger HH, Feldman JL. Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats. *J Comp Neurol.* 1988; 269: 47-57.
67. Estenne M, Hubert M, De Troyer A. Respiratory muscle involvement in Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine.* 1984; 311: 1516-1517.
68. Evans, KC, Shea SA, Saykin AJ. Functional MRI localisation of central nervous system regions associated with volitional inspiration in humans. *J. Physiol.* 1999; 520: 383-392.
69. Ezure K, Tanaka I. Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat. *Neuroscience*, 2006; 141: 1011-1023.
70. Fallert M, Bohmer G, Dinse HR, Sommer TJ, Bittner A. Microelectrophoretic application of putative neurotransmitters onto various types of bulbar respiratory neurons. *Arch Ital Biol.* 1979; 117: 1-12.
71. Fay RA, Norgren R. Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei using pseudorabies virus. III. Lingual muscle motor systems. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 25: 291-311.
72. Feinsilver SH, Friedman JH, Rosen JM. Respiration and sleep in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1986; 49: 964.
73. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.* 2003; 26: 239-266.
74. Fenik P, Veasey SC. Pharmacological characterization of serotonergic receptor activity in the hypoglossal nucleus. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 563-569.
75. Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of

- the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*. 2005; 148: 78-87.
76. Fidone SJ, Gonzalez C, Yoshizaki K. Effects of hypoxia on catecholamine synthesis in rabbit carotid body *in vitro*. *J Physiol*. 1982; 333: 81-91.
77. Fitzgerald RS, Dehghani GA. Neural responses of the cat carotid and aortic bodies to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol*. 1982; 52: 596-601.
78. Fitzgerald RS, Parks DC. Effect of hypoxia on carotid chemoreceptor response to carbon dioxide in cats. *Respir Physiol*. 1971; 12: 218-229.
79. Fontana GA, Pantaleo T, Lavorini F, Benvenuti F, Gangemi S. Defective Motor Control of Coughing in Parkinson's Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 458-464.
80. Forster HV, Lowry TF, Ohtake PJ, Pan LG, Korducki MJ, Forster AL. Differential effect of ventrolateral medullary cooling on respiratory muscles of goats. *J Appl Physiol (1985)*. 1995; 78: 1859-1867.
81. Forster HV, Martin P, Hodges M, Krause K, Bonis J, Davis S, Pan L. The carotid chemoreceptors are a major determinant of ventilatory CO₂ sensitivity and of PaCO₂ during eupneic breathing. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 605: 322-326.
82. Fregosi RF, Fuller DD. Respiratory-related control of extrinsic tongue muscle activity. *Respir Physiol*. 1997; 110: 295-306.
83. Fregosi RF. Respiratory related control of hypoglossal motoneurons--knowing what we do not know. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 179: 43-47.
84. Fukuda Y, Honda Y. Difference in respiratory neural activities between vagal (superior laryngeal), hypoglossal, and phrenic nerves in the anesthetized rat. *Jpn J Physiol*. 1982; 32: 387-398.
85. Fukuda Y, Honda Y. Modification by chemical stimuli of temporal difference in the onset of inspiratory activity between vagal (superior laryngeal) or hypoglossal and phrenic nerves of the rat. *Jpn J Physiol*. 1988; 38: 309-319.
86. Gamboa J, Macarlupú JL, Rivera-Chira M, Monge-C C, León-Velarde F. Effect of domperidone on ventilation and polycythemia after 5 weeks of chronic hypoxia in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003; 135: 1-8.
87. Gervais J, Rouillard C. Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Synapse*, 2000; 35: 281-291.

88. Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R, Barhanin J. Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 2325-2330.
89. Ghali MG. Vagal modulation of pre-inspiratory activity in hypoglossal discharge in the decerebrate rat. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015; 215: 47-50.
90. Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*. 1997; 50: 55-66.
91. Goiny M, Lagercrantz H, Srinivasan M, Ungerstedt U, Yamamoto Y. Hypoxia-mediated *in vivo* release of dopamine in nucleus tractus solitarii of rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1991; 70: 2395-400.
92. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Pharmacol Rev*. 1994; 74: 829-898.
93. Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol*. 2005; 568: 715-724.
94. Gravotta L, Gavrilina AM, Hood S. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. *J Mol Neurosci*. 2011; 45: 162-171.
95. Guedes LU, Rodrigues JM, Fernandes AA, Cardoso FE, Parreira VF. Respiratory changes in Parkinson's disease may be unrelated to dopaminergic dysfunction. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012; 70: 847-851.
96. Guner I, Sahin G, Yelmen NK, Aksu U, Oruc T, Yildirim Z. Intracerebroventricular serotonin reduces the degree of acute hypoxic ventilatory depression in peripherally chemodenervated rabbits. *Chin J Physiol*. 2008; 51: 136-145.
97. Guner I, Yelmen N, Sahin G, Oruc T. The effect of intracerebroventricular dopamine administration on the respiratory response to hypoxia. *Tohoku J Exp Med*. 2002; 196: 219-230.
98. Günther S, Maroteaux L, Schwarzacher SW. Endogenous 5-HT_{2B} receptor activation regulates neonatal respiratory activity *in vitro*. *J Neurobiol*. 2006; 66: 949-961.

99. Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA, Mulkey DK. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp Physiol*. 2005; 90: 247–253.
100. Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol*. 2008; 586: 2043-2048.
101. Hayashi F, Fukuda Y. Neuronal mechanisms mediating the integration of respiratory responses to hypoxia. *Jpn J Physiol*. 2000; 50: 15-24.
102. Hayashi F, Yoshida A, Fukuda Y, Honda Y. The ventilatory response to hypoxia in the anesthetized rat. *Pflugers Arch*. 1983; 396: 121-127.
103. Hedner J, Hedner T, Jonason J, Lundberg D. Evidence for a dopamine interaction with the central respiratory control system in the rat. *Eur. J. Pharmacol*. 1982; 81: 603–615.
104. Henderson JM, Watson S, Halliday GM, Heinemann T, Gerlach M. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Brain Res*. 2003; 139: 105-113.
105. Hilaire G, Dutschmann M. Foreword: Respiratory rhythmogenesis. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009; 168: 1-3.
106. Hilaire G, Pásaro R. Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci*. 2003; 18: 23-28.
107. Hilaire G, Voituron N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH, Dutschmann M. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 174: 76-88.
108. Hobson DE, Lix LM, Azimae M, Leslie WD, Burchill C, Hobson S. Healthcare utilization in patients with Parkinson's disease: a population-based analysis. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18: 930-935.
109. Hodges MR, Richerson GB. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; 164: 222-232.
110. Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci*. 2008; 28: 2495-2505.

111. Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB. Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci.* 2009; 29: 10341-10349.
112. Honda Y. Chemical control of breathing. In: *Control of Breathing in Health and Disease.* Inc New York. 1999; pp. 41-87.
113. Hornykiewicz O. Brain monoamines and parkinsonism. National Institute on Drug Abuse Research Monograph Series. 1975; 3: 13–21.
114. Hovestadt A, Bogaard J. M, Meerwaldt JD, van der Meché FG, Stigt J. Pulmonary function in Parkinson's disease. *J Neural Neurosurg Psychiatry,* 1989; 52: 329–333.
115. Hsiao C, Lahiri S, Mokashi A. Peripheral and central dopamine receptors in respiratory control. *Respir Physiol.* 1989; 76: 327-336.
116. Huckstepp RT, id Bihi R, Eason R, Spyer KM, Dicke N, Willecke K, Marina N, Gourine AV, Dale N. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol.* 2010; 588: 3901-3920.
117. Huey KA, Brown IP, Jordan MC, Powell FL. Changes in dopamine D₂-receptor modulation of the hypoxic ventilatory response with chronic hypoxia. *Respir Physiol.* 2000; 123: 177-187.
118. Huot P, Fox SH, Brotchie JM. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2011; 95: 163-212.
119. Hussain T, Lokhandwala MF. Renal dopamine receptors and hypertension. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228: 134-42.
120. Hyde, TM, Knable MB, Murray AM. Distribution of dopamine D₁–D₄ receptor subtypes in human dorsal vagal complex. *Synapse,* 1996; 24: 224–232.
121. Iderberg H, McCreary AC, Varney MA, Cenci MA, Newman-Tancredi A. Activity of serotonin 5-HT_{1A} receptor 'biased agonists' in rat models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuropharmacology,* 2015; 93: 52-67.
122. Itturiaga R, Alcayaga J, Zapata P. Dissociation of hypoxia-induced chemosensory responses and catecholamine efflux in rat carotid body superfused *in vitro.* *J Physiol.* 1996; 497: 551-564.
123. Iturriaga R, Alcayaga J, Gonzalez C. Neurotransmitters in carotid body function: the case of dopamine – invited article. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 648: 137–143.

124. Izquierdo-Alonso JL, Jiménez-Jiménez FJ, Cabrera-Valdivia F, Mansilla-Lesmes M. Airway dysfunction in patients with Parkinson's disease. *Lung*, 1994; 172: 47–55.
125. Jacono FJ, Peng YJ, Kumar GK, Prabhakar NR. Modulation of the hypoxic sensory response of the carotid body by 5-hydroxytryptamine: role of the 5-HT₂ receptor. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005, 145: 135-142.
126. Janssen PL, O'Halloran KD, Pizarro J, Dwinell MR, Bisgard GE. Carotid body dopaminergic mechanisms are functional after acclimatization to hypoxia in goats. *Respir Physiol*. 1998; 111: 25-32.
127. Javaheri S, Guerra LF. Effects of domperidone and medroxyprogesterone acetate on ventilation in man. *Respir Physiol*. 1990; 81: 359-370.
128. Jeyasingham RA, Baird AL, Meldrum A, Dunnett SB. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Res Bull*. 2001; 55: 541-548.
129. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*, 2015; 386: 896-912.
130. Kalia M, Fuxe K, Goldstein M. Rat medulla oblongata. II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol*. 1985; 233: 308-332.
131. Kanamaru M, Homma I. Dorsomedial medullary 5-HT₂ receptors mediate immediate onset of initial hyperventilation, airway dilation, and ventilatory decline during hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297: R34-R41.
132. Karstaedt PJ, Kerasidis H, Pincus JH, Meloni R, Graham J, Gale K. Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. *Exp Neurol*. 1994; 126: 25-30.
133. Kashihara K. Weight loss in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2006; 253: VII38-41.
134. Kemp PJ. Hemeoxygenase-2 as an O₂ sensor in K⁺ channel-dependent chemotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338: 648-652.
135. Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I, Carroll JL. Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol*. 2009; 587: 2963–2975.
136. Kinkead R, Mitchell GS. Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. *Am J Physiol*. 1999; 277: R658-R666.

137. Kish SJ, Tong J, Hornykiewicz O, Rajput A, Chang LJ, Guttman M, Furukawa Y. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*. 2008; 131: 120-131.
138. Kitahama K, Nagatsu I, Geffard M, Maeda T. Distribution of dopamine-immunoreactive fibers in the rat brainstem. *J Chem Neuroanat*. 2000; 18: 1-9.
139. Kline DD, Takacs KN, Ficker E, Kunze DL. Dopamine modulates synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol*. 2002; 88: 2736-2744.
140. Koizumi H, Wilson CG, Wong S, Yamanishi T, Koshiya N, Smith JC. Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated *in vitro*. *J Neurosci*. 2008; 28: 2353–2365.
141. Kubin L, Reignier C, Tojima H, Taguchi O, Pack AI, Davies RO. Changes in serotonin level in the hypoglossal nucleus region during carbachol-induced atonia. *Brain Res*. 1994; 645: 291-302.
142. Kubin L, Tojima H, Davies RO, Pack AI. Serotonergic excitatory drive to hypoglossal motoneurons in the decerebrate cat. *Neurosci Lett*. 1992; 139: 243–248.
143. Kubin L, Tojima H, Reignier C, Pack AI, Davies RO. Interaction of serotonergic excitatory drive to hypoglossal motoneurons with carbachol-induced, REM sleep-like atonia. *Sleep*. 1996; 19: 187-195.
144. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Comp Physiol*. 2012; 2: 141-219.
145. Kuna ST, Remmers JE. Premotor input to hypoglossal motoneurons from Kölliker-Fuse neurons in decerebrate cats. *Respir Physiol*. 1999; 117: 85–95.
146. Lahiri S, Forster RE 2nd. CO₂/H⁽⁺⁾ sensing: peripheral and central chemoreception. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 1413-1435.
147. Lahiri S, Nishino T. Inhibitory and excitatory effects of dopamine on carotid chemoreceptors. *Neurosci Lett*. 1980; 20: 313-318.
148. Lahiri S, Roy A, Baby S, Hoshi T, Semenza G, Prabhakar N. Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biochem*. 2006; 91: 249-286.
149. Lalley PM, Mifflin SW. Opposing effects on the phrenic motor pathway attributed to dopamine-D₁ and -D₃/D₂ receptor activation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012; 181: 183-193.

150. Lalley PM. D₁/D₂-dopamine receptor agonist dihydrexidine stimulates inspiratory motor output and depresses medullary expiratory neurons Department of Physiology, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009; 296: R1829–R1836.
151. Lalley PM. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. Respir Physiol Neurobiol. 2008; 164: 160-167.
152. Lee KZ, Fuller DD. Neural control of phrenic motoneuron discharge. Respir Physiol Neurobiol. 2011; 179: 71-79.
153. Lee KZ, Fuller DD. Preinspiratory and inspiratory hypoglossal motor output during hypoxia-induced plasticity in the rat. J Appl Physiol (1985). 2010; 108: 1187–1198.
154. Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rat modulate Steep, breathing, central chemoreception and breathing variability. J Physiol. 2006; 570: 385-396.
155. Li A, Nattie E. Serotonin transporter knockout mice have a reduced ventilatory response to hypercapnia (predominantly in males) but not to hypoxia. J Physiol. 2008; 586: 2321-2329.
156. Li R, Bao G, el-Mallakh RS, Fletcher EC. Effects of chronic episodic hypoxia on monoamine metabolism and motor activity. Physiol Behav. 1996; 60: 1071-1076.
157. Liados F, Zapata P. Effects of dopamine analogues and antagonists on carotid body chemosensory in situ. J Physiol. 1978; 274: 487-499.
158. Lindsay AD, Feldman JL. Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin. J Physiol. 1993; 461: 213-233.
159. Lopez-Barneo J. Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. Curr. Opin Neurobiol. 2003; 13: 493-499.
160. Lorier AR, Huxtable AG, Robinson DM, Lipski J, Housley GD, Funk GD. P2Y₁ receptor modulation of the pre-Bötzinger complex inspiratory rhythm generating network *in vitro*. J Neurosci. 2007; 27: 993-1005.
161. Lucas G, De Deurwaerdère P, Porras G, Spampinato U. Endogenous serotonin enhances the release of dopamine in the striatum only when nigro-striatal dopaminergic transmission is activated. Neuropharmacology, 2000; 39: 1984-1995.
162. Ma Y, Zhan M, OuYang L, Li Y, Chen S, Wu J, Chen J, Luo C, Lei W. The effects of unilateral 6-OHDA lesion in medial forebrain bundle on the motor, cognitive dysfunctions and vulnerability of different striatal interneuron types in rats. Behav Brain Res. 2014; 266: 37-45.
163. Manaker S, Tischler LJ. Origin of serotonergic afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. J Comp Neurol. 1993; 334: 466-476.

164. Manzke T, Dutschmann M, Schlaf G, Mörschel M, Koch UR, Ponimaskin E, Bidon O, Lalley PM, Richter DW. Serotonin targets inhibitory synapses to induce modulation of network functions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364: 2589-2602.
165. Manzke T, Preusse S, Hülsmann S, Richter DW. Developmental changes of serotonin 4(a) receptor expression in the rat pre-Bötzinger complex. *J Comp Neurol.* 2008; 506: 775-790.
166. Matsumoto S, Nishimura Y, Kohno M, Nakajima T. Effects of haloperidol on chemoreceptor reflex ventilatory response in the rabbit. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1980; 247: 234-242.
167. McClung JR, Goldberg SJ. Functional anatomy of the hypoglossal innervated muscles of the rat tongue: a model for elongation and protrusion of the mammalian tongue. *Anat Rec.* 2000; 260: 378–386.
168. Mezey E, Eisenhofer G, Harta G, Hansson S, Gould L, Hunyady B, Hoffman BJ. A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 1996; 93: 10377–10382.
169. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78: 189-225.
170. Mitchell GS. Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. *Nat Neurosci.* 2004; 7: 1288–1290.
171. Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F, FDO, Masaki E, Emala CW. The dopamine D₁ receptor is expressed and facilitates relaxation in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2013; 14: 89.
172. Monteiro TC, Batuca JR, Obeso A, González C, Monteiro EC. Carotid body function in aged rats: responses to hypoxia, ischemia, dopamine, and adenosine. *Age.* 2011; 33: 337-350.
173. Monti-Bloch L, Eyzaguirre C. A comparative physiological and pharmacological study of cat and rabbit carotid body chemoreceptors. *Brain Res.* 1980; 193: 449-470.
174. Morin D, Hennequin S, Monteau R, Hilaire G. Serotonergic influences on central respiratory activity: an *in vitro* study in the newborn rat. *Brain Res.* 1990; 535: 281-287.

175. Morin D, Monteau R, Hilaire G. Compared effects of serotonin on cervical and hypoglossal inspiratory activities: an *in vitro* study in the newborn rat. *J Physiol.* 1992; 451: 605-629.
176. Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.* 2004; 7: 1360–1369.
177. Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA. TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci.* 2007; 27: 14049-14058.
178. Murakoshi T, Suzue T, Tamai S. A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Br J Pharmacol.* 1985; 86: 95-104.
179. Nattie E, Li A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem. *J Appl Physiol.* 2009; 106: 1464–1466.
180. Nattie EE, Li A, Richerson GB, Lappi DA. Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception *in vivo*. *J Physiol.* 2004; 556: 235-253.
181. Nattie EE. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progr Neurobiol.* 1999; 59: 299–331.
182. Nedergaard S, Bolam JP, Greenfield SA. Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature*, 1988; 333: 174-177.
183. Nieuwenhuys R, Geeraedts LM, Veening JG. The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *J Comp Neurol.* 1982; 206: 49-81.
184. Niewinski P, Tubek S, Banasiak W, Paton JF, Ponikowski P. J Consequences of peripheral chemoreflex inhibition with low-dose dopamine in humans. *Physiol.* 2014; 592: 1295-308.
185. Nobrega, JN, Richter, A, Tozman, N, Jiwa, D, Loscher, W. Quantitative autoradiography reveals regionally selective changes in dopamine D₁ and D₂ receptorbinding in the genetically dystonic hamster. *Neuroscience*, 1996; 71: 927–936.

186. Nowak P, Noras L, Jochem J, Szkilnik R, Brus H, Körossy E, Drab J, Kostrzewa RM, Brus R. Histaminergic activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2009; 15: 246-251.
187. Nsegbe E, Wallén-Mackenzie A, Dauger S, Roux JC, Shvarev Y, Lagercrantz H, Perlmann T, Herlenius E. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in *Nurr1* mutant mice. *J Physiol.* 2004; 556: 43-59.
188. Nuckolls AL, Worley C, Leto C, Zhang H, Morris JK, Stanford JA. Tongue force and tongue motility are differently affected by unilateral vs bilateral nigrostriatal dopamine depletion in rats. *Behav Brain Res.* 2012; 234: 343-348.
189. Nurse C. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *J Physiol.* 2014; 592: 3419–3426.
190. Nurse CA, Piskuric NA. Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin Cell Dev Biol.* 2013; 24: 22-30.
191. Nurse CA. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiology*, 2010; 95: 657–667.
192. Ohtake PJ, Forster HV, Pan LG, Lowry TF, Korducki MJ, Aaron EA, Weiss EM. Ventilatory responses to cooling the ventrolateral medullary surface of awake and anesthetized goats. *J Appl Physiol (1985).* 1995; 78: 247-257.
193. Olson LG, Saunders NA. The effect of central and peripheral dopamine-agonists on ventilation in the mouse. *Respir Physiol.* 1985; 61: 335-345.
194. Onodera H, Okabe S, Kikuchi Y, Tsuda T, Itoyama Y. Impaired chemosensitivity and perception of dyspnoea in Parkinson's disease. *Lancet.* 2000; 356: 739–740.
195. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press. Sydney 2007.
196. Pedersen ME, Dorrington KL, Robbins PA. Effects of haloperidol on ventilation during isocapnic hypoxia in humans. *J Appl Physiol (1985).* 1997; 83: 1110-1115.
197. Pedersen MEF, Dorrington KL, Robbins PA. Effects of dopamine and domperidone on ventilatory sensitivity to hypoxia after 8 h of isocapnic hypoxia. *J Appl Physiol.* 1999; 1: 222-229.
198. Peever JH, Shen L, Duffin J. Respiratory pre-motor control of hypoglossal motoneurons in the rat. *Neuroscience*, 2002; 110: 711–722.
199. Pehek EA, McFarlane HG, Maguschak K, Price B, Pluto CP. M100,907, a selective 5-HT_{2A} antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 2001; 888: 51-59.

200. Pehek EA, Nocjar C, Roth BL, Byrd TA, Mabrouk OS. Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 265-77.
201. Peña F, Ramirez JM. Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation *in vitro*. *J Neurosci*. 2002; 22: 11055-11064.
202. Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res*. 1989; 494: 285-293.
203. Pilowsky PM, Jiang C, Lipski J. An intracellular study of respiratory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat and their relationship to catecholamine-containing neurons. *J Comp Neurol*. 1990; 301: 604-617.
204. Presti MF, Schmeichel AM, Low PA, Parisi JE, Benarroch EE. Degeneration of brainstem respiratory neurons in dementia with Lewy bodies. *Sleep*. 2014; 37: 373-378.
205. Prieto-Lloret J, Donnelly DF, Rico AJ, Moratalla R, González C, Rigual RJ. Hypoxia transduction by carotid body chemoreceptors in mice lacking dopamine D₂ receptors. *J Appl Physiol*. 2007; 103: 1269–1275.
206. Przedborski S. Neuroinflammation and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol*. 2007; 83: 535-551.
207. Rafouli-Stergiou P, Parissis JT, Anastasiou-Nana M. Inotropes for the management of acute heart failure patients with renal dysfunction. Still an option? *Expert Opin Pharmacother*. 2012; 13: 2637-2647.
208. Raghuraman G, Rai V, Peng YJ, Prabhakar NR, Kumar GK. Pattern-specific sustained activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: role of reactive oxygen species-dependent downregulation of protein phosphatase 2A and upregulation of protein kinases. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 1777-1789.
209. Ramig LO, Fox C, Sapis S. Speech treatment for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2008; 8: 297-309.
210. Reader TA, Dewar KM. Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum: implications for human Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 1999; 34: 1-21.
211. Ricci A, Mignini F, Tomassoni D, Amenta F. Dopamine receptor subtypes in the human pulmonary arterial tree. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006; 26: 361-369.

212. Rice JE, Antic R, Thompson PD. Disordered respiration as a levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2002; 17: 524-527.
213. Richerson GB. Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla *in vitro*. *J Neurophysiol.* 1995; 73: 933-944.
214. Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5: 449-461.
215. Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkhah G. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol.* 2001; 432: 217-229.
216. Sabaté M, González I, Ruperez F, Rodríguez M. Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1996; 138: 114-119.
217. Sabol SJ, Ward DS. Effect of dopamine on hypoxic-hypercapnic interaction in humans. *Anesth Analg.* 1987; 66: 619-624.
218. Sadakierska-Chudy A, Haduch A, Gołombiowska K, Daniel WA. Effects of low doses of intracerebroventricular 6-OHDA on the levels of monoaminergic neurotransmitters in rat brain structures. *Pharmacol Rep.* 2010; 62: 1225-1230.
219. Sadeghian M, Marinova-Mutafchieva L, Broom L, Davis JB, Virley D, Medhurst AD, Dexter DT. Full and partial peroxisome proliferation-activated receptor- γ agonists, but not δ agonist, rescue of dopaminergic neurons in the 6-OHDA parkinsonian model is associated with inhibition of microglial activation and MMP expression. *J Neuroimmunol.* 2012; 246: 69-77.
220. Saito Y, Ezure K, Tanaka I. Difference between hypoglossal and phrenic activities during lung inflation and swallowing in the rat. *J Physiol.* 2002; 544: 183-193.
221. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet.* 2004; 363: 1783-1793.
222. Sapir S, Ramig L, Fox C. Speech and swallowing disorders in Parkinson disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 16: 205-210.
223. Sauer H, Rosenblad C, Björklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 8935-8939.
224. Sawaguchi T. The effects of dopamine and its antagonists on directional delay-period activity of prefrontal neurons in monkeys during an oculomotor delayed-response task. *Neurosci Res.* 2001; 41: 115-128.

225. Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 1983; 275: 321–328.
226. Schmidt WJ, Bubser M. *Pharmacol Biochem. Behav.* 1989; 32: 621–623
227. Scholtissen B, Verhey FR, Steinbusch HW, Leentjens AF. Serotonergic mechanisms in Parkinson's disease: opposing results from preclinical and clinical data. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006; 113: 59–73.
228. Schwarting RK, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol.* 1996; 50: 275–331.
229. Seccombe LM, Giddings HL, Rogers PG, Corbett AJ, Hayes MW, Peters MJ, Veitch EM. Abnormal ventilatory control in Parkinson's disease--further evidence for non-motor dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011; 179: 300–304.
230. Serebrovskaya T, Karaban I, Mankovskaya I, Bernardi L, Passino C, Appenzeller O. Hypoxic ventilatory responses and gas exchange in patients with Parkinson's disease. *Respiration.* 1998; 65: 28–33.
231. Shi LH, Woodward DJ, Luo F, Anstrom K, Schallert T, Chang JY. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res.* 2004; 1013: 98–106.
232. Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, Sgadó P, Alberí L. Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 991: 36–47.
233. Sinski M, Lewandowski J, Przybylski J, Zalewski P, Symonides B, Abramczyk P, Gaciong Z. Deactivation of carotid body chemoreceptors by hyperoxia decreases blood pressure in hypertensive patients. *Hypertens Res.* 2014; 37: 858–862.
234. Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, Bayliss DA. The TASK-1 two-pore domain K^+ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci.* 2000; 20: 6347–6354.
235. Smatresk N, Pokorski M, Lahiri S. Opposing effects of dopamine receptor blockade on ventilation and chemoreceptor activity. *J Appl Physiol Respirat Environ Physiol.* 1983; 54: 1567–1573.
236. 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: 726–729.

237. Sobrinho CR, Kuo FS, Barna BF, Moreira TS, Mulkey DK. Cholinergic control of ventral surface chemoreceptors involves Gq/IP3-mediated inhibition of KCNQ channels. *J Physiol*. 2016; 594: 407-419.
238. Song G, Xu H, Wang H, Macdonald SM, Poon CS. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kölliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. *Neuroscience*, 2011; 175: 145–153.
239. Soulage C, Perrin D, Cottet-Emard JM, Pequignot JM. A6 noradrenergic cell group modulates the hypoxic ventilatory response. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 536: 481–487.
240. Spyer KM, Gourine AV. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364: 2603-2610.
241. Spyer KM, Thomas T. Sensing arterial CO₂ levels: a role for medullary P2X receptors. *J Aut Nerv Sys*. 2000; 81: 228–235.
242. Spyer KM. To breathe or not to breathe? That is the question. *Exp Physiol*. 2009; 94: 1-10.
243. St. John WM, Bianchi AL. Responses of bulbospinal and laryngeal respiratory neurons to hypercapnia and hypoxia. *J Appl Physiol*. 1985; 59: 1201-1207.
244. Stornetta RL. Identification of neurotransmitters and co-localization of transmitters in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; 164: 18-27.
245. Subramanian S, Dostal J, Erokwu B, Han F, Dick TE, Strohl KP. Domperidone and ventilatory behavior: Sprague-Dawley versus Brown Norway rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007; 155: 22-28.
246. Sun QJ, Pilowsky P, Minson J, Arnolda L, Chalmers J, Llewellyn-Smith IJ. Close appositions between tyrosine hydroxylase immunoreactive boutons and respiratory neurons in the rat ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*. 1994; 340: 1-10.
247. Sun W, Sugiyama K, Asakawa T, Yamaguchi H, Akamine S, Ouchi Y, Magata Y, Namba H. Dynamic changes of striatal dopamine D₂ receptor binding at later stages after unilateral lesions of the medial forebrain bundle in Parkinsonian rat models. *Neurosci Lett*. 2011; 496: 157–162.
248. Sun W, Sugiyama K, Fang X, Yamaguchi H, Akamine S, Magata Y, Namba H. Different striatal D₂-like receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats. *Brain Res*. 2010; 1317: 227-235.

249. Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2008; 156: 830-40.
250. Taylor NC, Li A, Green A, Kinney HC, Nattie EE. Chronic fluoxetine microdialysis into the medullary raphe nuclei of the rat, but not systemic administration, increases the ventilatory response to CO₂. *J Appl Physiol* (1985). 2004; 97: 1763-1773.
251. Thannickal TC, Lai YY, Siegel JM. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain*, 2007; 130: 1586-1595.
252. Thomas T, Spyer KM. ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception. *J Physiol*. 2000; 523: 441-447.
253. Torres EM, Laneb EL, Heuera A, Smitha GA, Murphya E, Dunnetta SB. Increased efficacy of the 6-hydroxydopamine lesion of the median forebrain bundle in small rats, by modification of the stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*. 2011; 200: 29-35.
254. Tryba AK, Peña F, Ramirez JM. Gasping activity *in vitro*: a rhythm dependent on 5-HT_{2A} receptors. *J Neurosci*. 2006; 26: 2623-2634.
255. Tuppy M, Barna BF, Alves-Dos-Santos L, Britto LRG, Chiavegatto S, Moreira TS, Takakura AC. Respiratory deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2015; 164: 1357–1391.
256. Tzelepis GE, McCool FD, Friedman JH, Hoppin FG Jr. Respiratory muscle dysfunction in Parkinson's disease. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138: 266-271.
257. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968; 5: 107-110.
258. Ungerstedt U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1971; 367: 95-122.
259. van Lunteren E, Haxhiu MA, Mitra J, Cherniack NS. Effects of dopamine, isoproterenol, and lobeline on cranial and phrenic motoneurons. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984; 56: 737-745.
260. Veasey SC, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. Response of serotonergic caudal raphe neurons in relation to specific motor activities in freely moving cats. *J Neurosci*. 1995; 15: 5346-5359.

261. Vincent SG, Waddell AE, Caron MG, Walker JK, Fisher JT. A murine model of hyperdopaminergic state displays altered respiratory control. *FASEB J.* 2007; 21: 1463-1471.
262. Voss MD, De Castro D, Lipski J, Pilowsky PM, Jiang C. Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. *J Comp Neurol.* 1990; 295: 208-218.
263. Wasicko MJ, Breitwieser GE, Kim I, Carroll JL. Postnatal development of carotid body glomus cell response to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006; 154: 356-371.
264. Weiner D, Mitra J, Salamone J, Cherniack NS. Effect of chemical stimuli on nerves supplying upper airway muscles. *J Appl Physiol.* 1982; 52: 530-536.
265. Welsh MJ, Heistad DD, Abboud FM. Depression of Ventilation by Dopamine in Man. Evidence for an effect on the chemoreceptor reflex. *J Clin Invest.* 1978; 61: 708-713.
266. Wermuth L, Stenager EN, Stenager E, Boldsen J. Mortality in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995; 92: 55-58.
267. Widdicombe J. Airway receptors. *Respir Physiol.* 2001; 125: 3-15.
268. Wypych B, Szereda-Przestaszewska M. Depression of ventilation by dopamine in cats: effects of bilateral cervical sympathetic and vagal trunk section. *Exp Physiol.* 1995; 80: 255-263.
269. Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J, Iyata Y. Autoradiographic distribution of (3H)YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D₂ receptor group, in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1994; 344: 121-136.
270. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.* 2005; 144: 35-45.
271. Zhou FM, Liang Y, Salas R, Zhang L, De Biasi M, Dani JA. Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron.* 2005; 46: 65-74.

STRESZCZENIE

Choroba Parkinsona (ChP) jest jedną z najczęstszych postępujących chorób neurodegeneracyjnych, dotykającą ludzi powyżej 60 roku życia. Przyczyną objawów klinicznych jest uszkodzenie neuronów dopaminergicznych szlaku czarnoprążkowiowego. Zmiany wywołane ChP przybierają często szersze rozmiary i dotyczą także neuronów noradrenergicznych czy serotonergicznych. Wcześniejsze etapy choroby Parkinsona cechuje zwiększony jednostronny ubytek dopaminy, w przeciwieństwie do zaawansowanych stadiów choroby, w których zmiany dotyczą obu półkul mózgu. Oprócz objawów związanych z układem ruchu choroby manifestują zaburzenia nieoddechowych funkcji układu oddechowego takie jak: niewyraźna i cicha mowa, trudności w połykaniu, jak również zaburzenia oddychania w tym zwiększoną częstość bezdechów. Zachłystowe zapalenie płuc często stanowi przyczynę śmierci cierpiących na chorobę Parkinsona.

Jednym z najlepiej opisanych i powtarzalnych modeli ChP jest model z domózgową iniekcją 6-hydroksydopaminy (6-OHDA), która wywołuje u zwierząt kliniczne objawy ChP, wynikające z selektywnego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w układzie nigrostriatalnym. W celu uniknięcia jednoczesnej degeneracji neuronów noradrenergicznych zwierzętom podaje się dezypraminę, bloker transportera noradrenaliny.

Mechanizmy leżące u podstaw zmian w układzie oddechowym w aspekcie ChP są mało poznane i wymagają dalszych badań.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jednostronnego uszkodzenia układu czarnoprążkowiowego szczura podaniem 6-OHDA do prawego pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB) na nerwową aktywność oddechową, z uwzględnieniem roli układu dopaminergicznego i serotonergicznego.

Doświadczenia oddechowe u zwierząt czuwających przeprowadzono w komorze pletyzmograficznej, rejestrując parametry wentylacji płucnej. Aktywność oddechową

badano w normoksji i podczas odpowiedzi oddechowej na hipoksję (8% O₂ w N₂) oraz hiperkapnię (7% CO₂ w O₂) zarówno przed jak i w 14 dni po iniekcji 6-OHDA.

U szczurów uśpionych rejestrowano aktywność nerwów przeponowego i podjęzykowego podczas normoksji i hipoksji. W skrawkach mózgow zwierząt zliczano neurony dopaminergiczne. Oznaczano także poziomy amin biogennych oraz ich metabolitów w homogenatch z prążkowie i pnia mózgu. Dodatkowym narzędziem potwierdzającym skuteczność iniekcji 6-OHDA był test behawioralny cylindra.

Po lezji, u czuwających zwierząt wykazano przy niezmiennych parametrach oddychania w normoksji, wzrost objętości oddechowej i spadek częstości oddychania w odpowiedzi na hipoksję, co przełożyło się na wzrost wentylacji minutowej w maksimum reakcji. W reakcji na hiperkapnię u zwierząt traktowanych 6-OHDA zaobserwowano wzrost stymulacji objętości oddechowej oraz wentylacji minutowej. Odpowiedź częstości oddychania uległa natomiast nieistotnemu zmniejszeniu.

U zdrowych zwierząt po zablokowaniu obwodowych receptorów dopaminergicznych przez domperidon stwierdzono wzrost normoksyjnej objętości oddechowej i wentylacji minutowej przy nieznacznie zwiększonej reaktywności oddechowej na hipoksję. Z kolei zablokowanie obwodowych i ośrodkowych receptorów dopaminergicznych D₂ przez haloperidol spowodowało u zwierząt przed lezją wzrost objętości oddechowej i wentylacji minutowej w odpowiedzi oddechowej na hipoksję. Efekt domperidonu i haloperidolu nie był obserwowany u zwierząt po lezji.

Kolejnym aspektem niniejszej pracy było testowanie odpowiedzi oddechowej na hipoksję po podaniu agonisty i antagonisty receptorów serotoninericznych 5-HT_{2A}, odpowiednio: DOI i ketanseryny. U wszystkich zwierząt podanie DOI wywoływało wzrost parametrów wentylacji w normoksji oraz osłabienie reakcji oddechowej na hipoksję, co było odwracane przez podanie antagonistycznie działającej ketanseryny. Reaktywność

wentylacji minutowej na hipoksję po DOI 14 dni od iniekcji 6-OHDA była zmniejszona w porównaniu do stanu przed lezją.

Analiza neurogramu nerwu przeponowego wykazała znamienne wydłużenie normoksyjnego czasu wdechu oraz czasu wydechu i całkowitego czasu cyklu oddechowego podczas hipoksji w grupie z ChP. Amplituda nerwu podjęzykowego uległa zwiększeniu u zwierząt uśpionych z modelem ChP w porównaniu do zwierząt sham w reakcji na hipoksję. Ponadto uszkodzenie neuronów dopaminergicznych wpłynęło na zmniejszenie stosunku amplitudy przedwdechowej do wdechowej nerwu podjęzykowego, zarówno w normoksji jak i w hipoksji.

Analiza immunohistochemiczna skrawków mózgow szczurzych potwierdziła ubytek neuronów dopaminergicznych w obszarze ipsilateralnej istoty czarnej. Zmiany w układzie dopaminergicznym w badanym modelu zostały potwierdzone istotnym ubytkiem dopaminy w prążkowie po stronie ipsilateralnej oraz niewielkim po stronie kontralateralnej względem miejsca iniekcji. W pniu mózgu nie zanotowano zmian w poziomie dopaminy natomiast jej obrót uległ zwiększeniu. W obu badanych strukturach mózgu wykazano także istotny ubytek serotoniny oraz wzrost jej obrotu, co potwierdza także zmiany w układzie serotonergicznym w badanym modelu.

W celu potwierdzenia skuteczności lezji wykonany został test behawioralny w cylindrze. U zwierząt po iniekcji 6-OHDA do MFB wykazano zmniejszoną aktywność kończyny przedniej kontrateralnej względem miejsca iniekcji, spadek ruchliwości oraz mniejsze przybieranie masy ciała w odniesieniu do grupy pozorowanej.

Eksperymentalnie uzyskane dane w zastosowanym zwierzęcym modelu choroby Parkinsona z jednostronną iniekcją 6-OHDA do MFB, pokazujące ubytek dopaminy i serotoniny w prążkowie i pniu mózgu oraz zmiany behawioralne, naśladują objawy obserwowane u ludzi chorych na ChP. Iniekcja 6-OHDA do MFB może stanowić zatem

wartościowy model do badań nad zmianami w funkcjonowaniu układu oddechowego w chorobie Parkinsona.

Podsumowanie i wnioski:

- Dopamina jest hamującym modulatorem oddychania poprzez swoiste oddziaływanie na receptory D_2 . Jej ubytek stymulował wentylację w hipoksji w badanym modelu ChP oraz po podaniu antagonistów receptorów dopaminergicznych D_2 w warunkach normoksji i hipoksji u zwierząt zdrowych
- Zwiększona wentylacja w reakcji na podwyższony poziom CO_2 we wdychanym powietrzu w modelu ChP wskazuje na hamującą rolę dopaminy w odpowiedzi na bodziec hiperkapniczny
- Uszkodzenie szlaku czarnoprążkowiowego powoduje zmiany w układzie serotoninerpicznym, co zostało potwierdzone zmniejszonym poziomem serotoniny w prążkowie i pniu mózgu oraz obniżoną reakcją na hipoksję po aktywacji receptorów $5-HT_2$
- Zmiany w aktywności przedwdechowej nerwu podjęzykowego (odpowiadającego za utrzymanie drożności górnych dróg oddechowych) u zwierząt po lezji wskazują na modyfikacje w ośrodkowych mechanizmach kontrolujących aktywność nerwu XII i mogą stanowić przyczynę zaburzeń oddychania obserwowanych w chorobie Parkinsona

ABSTRACT

EFFECT OF UNILATERAL NIGROSTRIATAL COMPLEX DAMAGE ON THE CHEMICAL AND NEURAL REGULATION OF BREATHING

Parkinson's disease (PD) is one of the most common progressive neurodegenerative disorder observed in people over the age of 60. Clinical symptoms arise from the damage of nigrostriatal dopaminergic neurons. Changes induced by PD often take a broader scale and apply also to noradrenergic and serotonergic neurons. Earlier stages of Parkinson's disease are characterized by unilateral loss of dopamine, unlike the advanced stages, where the changes are observed in both brain hemispheres. The symptoms are associated mainly with the motor disturbances. Nevertheless patients exhibit also slurred and quiet speech, difficulties in swallowing and breathing disorders including increased incidence of apnea. The most common cause of death in parkinsonian patients is aspiration pneumonia. Intracerebral administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is one of the most often described, reproducible model of PD. This model mimics clinical symptoms of PD resulting from selective damage of the dopaminergic nigrostriatal neurons.

The mechanism that underlies ventilatory impairment in PD is unclear. Thus the aim of the present research was to investigate the effect of the unilateral damage of the rat nigrostriatal pathway evoked by 6-OHDA administration into the right medial forebrain bundle (MFB) on neural respiratory activity including the role of dopaminergic and serotonergic system. The respiratory experiments in conscious animals were carried out in the plethysmographic chamber, where the parameters of pulmonary ventilation were recorded. Respiratory activity was studied in normoxia, acute hypoxia (8% O₂ in N₂) and hypercapnia (7% CO₂ in O₂) before and 14 days after the neurotoxin injection. In anesthetized rats phrenic and hypoglossal nerve activities were registered during normoxic

and hypoxic conditions. Dopaminergic neurons of substantia nigra were counted in brain slices. Levels of the biogenic amines and their metabolites in striatum and brainstem homogenates were determined. To confirm the efficacy of 6-OHDA injection we used an additional tool, which was the behavioral cylinder test.

Conscious, lesioned animals demonstrated no changes in normoxic breathing parameters. Increased tidal volume and decreased respiratory rate resulting in an increase in the maximum hypoxic reaction of minute ventilation were present in response to hypoxia. 6-OHDA administration magnified the respiratory response to hypercapnia consisting of increased tidal volume and minute ventilation. Blockade of peripheral dopaminergic receptors by domperidone increased tidal volume and minute ventilation in normoxia, and to smaller extent in hypoxia in healthy animals. Peripheral and central dopaminergic D₂ receptors blockade with haloperidol in control non-lesioned animals evoked an increase in tidal volume and minute ventilation in respiratory response to hypoxia. The effect of domperidone and haloperidol was abrogated after 6-OHDA lesion.

A further aspect of this study was to test the respiratory response to hypoxia after administration of an agonist (DOI) and antagonist (ketanserin) of the serotonergic receptors 5-HT_{2A}. In all animals, administration of DOI caused a significant increase in normoxic ventilatory parameters and weakening of the respiratory response to hypoxia. It was reversed by administration of the antagonistically acting ketanserin. Hypoxic reactivity of minute ventilation after DOI in lesioned rats was reduced as compared to the controls before lesion.

Analysis of phrenic nerve activity showed a significant increase in normoxic inspiratory and hypoxic expiratory and total time of the respiratory cycle in animals with PD. The amplitude of the hypoglossal nerve was significantly increased in response to hypoxia in lesioned rats in comparison to sham animals. Degeneration of dopaminergic

neurons shortened the ratio of pre-inspiratory/ inspiratory amplitude of hypoglossal nerve in both normoxic and hypoxic conditions. Immunohistochemical analysis of the rat brain sections confirmed the loss of dopaminergic neurons in the ipsilateral substantia nigra. Changes in dopaminergic system in this model, were confirmed by substantial loss of dopamine in the ipsilateral striatum and smaller one in the contralateral to the injection site. There was no change in dopamine level in the brainstem, while its turnover had increased. In both brain structures: striatum and brainstem, a significant loss of serotonin and an increase in its turnover was shown.

After 6-OHDA injection into the right MFB, animals showed reduced activity of the forelimb contralateral to the injection site. PD animals had also reduced weight gain in contrast to the sham group.

Experimentally obtained data from animal model of Parkinson's disease with unilateral injection of 6-OHDA to the MFB showed the decline of dopamine and serotonin contents in the striatum and brainstem, and behavioral changes imitating symptoms seen in human PD patients. Therefore, administration of 6-OHDA to the MFB seems to be a valuable tool for the study of changes in the functioning of the respiratory system in Parkinson's disease.

Conclusions:

- Dopamine is an inhibiting modulator of respiratory response to hypoxia acting by its D₂ receptors. The decrease of DA level in brains of lesioned rats and blockade of dopamine D₂ receptors in healthy animals stimulated respiratory response to hypoxia consisting of the increased tidal volume and minute ventilation
- Increased ventilation in respiratory response to hypercapnia in conditions of lowered level of dopamine shows its inhibitory role in mediating respiratory reaction to hypercapnic stimulus

- Damage of the nigrostriatal system initiates changes in the serotonergic system, which has been corroborated by reduced levels of serotonin in the striatum and brainstem and decreased respiratory response to hypoxia after activation of 5-HT₂ receptors.
- Changes in pre-inspiratory hypoglossal nerve activity responsible for maintaining patency of the upper airway in lesioned animals suggest modifications in the central mechanisms controlling the activity of hypoglossal nerve and may explain the respiratory disorders seen in Parkinson's patients.