

# **A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag szerepének vizsgálata a Parkinson-kórhoz kapcsolódó hangulatzavarok patkány modelljeiben**

Doktori (PhD) értekezés

**dr. Ujvári Balázs**

**EN1LY9**

**Témavezető: dr. Gaszner Balázs, egyetemi docens**

Doktori iskola: Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola (D95)

Az iskola vezetője: dr. Reglódi Dóra, egyetemi tanár

Program: Neuroendokrinológia és neurohisztológia (B-134/1993)

Programvezető: dr. Reglódi Dóra



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Anatómiai Intézet**

**Pécs, 2022**

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>5.</b>
<b>1.1 A Parkinson-kór epidemiológiája</b>	<b>5.</b>
<b>1.2 A Parkinson-kór leírása és tünettana</b>	<b>6.</b>
1.2.1 Motoros tünetek	7.
1.2.2 Nem-motoros tünetek	8.
1.2.2.1 Neuropszichiátriai zavarok	8.
1.2.2.2 Vegetatív változások	9.
<b>1.3 A Parkinson-kór diagnosztikai alappillérei</b>	<b>9.</b>
<b>1.4 A Parkinson-kór klinikai formái és stádiumai</b>	<b>10.</b>
1.4.1 Preklinikai szakasz	11.
1.4.2 Prodromális szakasz	11.
1.4.3 Klinikai szakasz	11.
<b>1.5 A Parkinson-kór kezelési lehetőségei</b>	<b>12.</b>
<b>1.6 Neuroanatómiai változások Parkinson-kórban</b>	<b>13.</b>
1.6.1 Microgliák és szerepük a neurodegenerációban	15.
1.6.2 Az astrocyták és szerepük reaktív gliózis során	16.
1.6.3 A dopamin szerepe a neurodegenerációban	18.
1.6.4 A substantia nigra és a cortico-subcorticalis pályák érintettsége	19.
1.6.5 A vegetatív funkciók és a hangulat szabályozásában résztvevő területek érintettsége	20.
1.6.5.1 A noradrenerg rendszer – locus coeruleus és A5 area	21.
1.6.5.2 A szerotoninerger rendszer – raphe magok	22.
1.6.5.3 A non-striatalis dopaminerg rendszerek érintettsége – ventralis tegmentalis area	23.
1.6.5.4 A nervus vagus és az enterális idegrendszer	24.
1.6.5.5 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag	25.
<b>1.7 A Parkinson-kór előidézésére használható állatkísérleti modellek</b>	<b>28.</b>
1.7.1 Szisztémás toxikus állatkísérleti modellek	29.
1.7.1.1 MPTP	29.
1.7.1.2 Peszticidek, herbicidek	30.
1.7.1.2.1 Paraquat	30.
1.7.1.2.2 Rotenon	31.
1.7.2 Intracerebrális neuronablációs technikák	32.
1.7.2.1 6-hidroxidopamin	32.
1.7.2.2 Leptin-konjugált saporin	32.
<b>2. Célkitűzések és hipotézisek</b>	<b>34.</b>
<b>3. Módszerek és felhasznált anyagok</b>	<b>35.</b>
<b>3.1 Kísérleti állatok</b>	<b>35.</b>

<b>3.2 A rotenon indukálta Parkinson-kór modell</b>	<b>35.</b>
<b>3.3 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtjeinek szelektív ablációja leptin-konjugált saporin segítségével</b>	<b>37.</b>
<b>3.4 Viselkedési tesztek</b>	<b>40.</b>
3.4.1 Rotarod performance teszt	40.
3.4.2 Open field teszt	41.
3.4.3 Cukorpreferencia teszt	41.
<b>3.5 Mintaelőkészítés</b>	<b>42.</b>
<b>3.6 Szövetteni módszerek</b>	<b>43.</b>
3.6.1 Dopaminerg sejtek diamino-benzidin jelölése	43.
3.6.2 Immunfluoreszcens jelölések	44.
3.6.3 Immunfluoreszcens jelölés RNAscope® in situ hibridizációval kombinálva	46.
<b>3.7 Metszetek digitalizálása és morфомetria</b>	<b>47.</b>
<b>3.8 Statisztikai analízis</b>	<b>48.</b>
<b><u>4. Eredmények</u></b>	<b><u>49.</u></b>
<b>4.1 A szisztémás rotenon kezelés a Parkinson-kórhoz hasonló állapotot okozó patkányban, mely motoros és nem-motoros tünetekben is megnyilvánul</b>	<b>49.</b>
4.1.1 A viselkedési tesztek eredményei a rotenon modellben	49.
4.1.2 Szervtömegmérések eredményei a rotenon modellben	50.
<b>4.2 A szisztémás rotenon kezelés hatására a substantia nigra dopaminerg sejtjei mellett az Edinger-Westphal mag peptiderg neuronjai is károsodnak</b>	<b>51.</b>
4.2.1 A substantia nigra és a striatum változásai a rotenon modellben	51.
4.2.2 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtjeinek változásai a rotenon modellben	56.
4.2.3 A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb agyterületek változásai a rotenon modellben	62.
<b>4.3 Saporin indukált szelektív lokális neuron abláció az Edinger-Westphal magban kiváltja a Parkinson-kór nem motoros tüneteit, mozgászavar nélkül</b>	<b>66.</b>
4.3.1 Viselkedési tesztek eredményei a leptin-saporin modellben	66.
4.3.2 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag változásai a leptin-saporin modellben	67.
4.3.3 A substantia nigra változásai a leptin-saporin modellben	70.
<b><u>5. Diskusszió</u></b>	<b><u>72.</u></b>
<b>5.1 A modell validitásának kritériumai</b>	<b>72.</b>
<b>5.2 Patkányokban rotenon hatására a Parkinson-kórban megfigyelhető motoros és nem-motoros tünetek jelentkeznek</b>	<b>73.</b>
<b>5.3 A rotenon hatására a substantia nigra területén a dopaminerg sejtek Parkinson-kórra jellemző morfológiai változásokon mentek keresztül</b>	<b>74.</b>
<b>5.4 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 neuronjai neurodegenerációt szenvednek, és a túlélő sejtek is funkcionális károsodást mutatnak a rotenon modellben</b>	<b>75.</b>

<b>5.5 Az egyéb stresszválaszban résztvevő magok nem játszanak szerepet a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarok kialakításában a rotenon modellben</b>	<b>78.</b>
<b>5.6 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 sejtjeinek lokális, részleges ablációja a rotenon modellben találtakhoz hasonló hangulati státuszt idézett elő motoros deficit nélkül</b>	<b>79.</b>
<b>6. Konklúzió</b>	<b>82.</b>
<b>7. Folyamatban lévő és jövőbeli humán vizsgálatok</b>	<b>83.</b>
<b>8. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>84.</b>
<b>9. Alkalmazott rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke</b>	<b>86.</b>
<b>10. Függelék</b>	<b>90.</b>
<b>11. Irodalomjegyzék</b>	<b>94.</b>
<b>12. Publikációk és fontosabb eredmények listája</b>	<b>107.</b>
<b>13. A disszertáció alapját képező tudományos folyóiratban publikált cikk</b>	<b>108.</b>

# 1. Bevezetés

## 1.1 A Parkinson-kór epidemiológiája

A Parkinson-kór (PD) világszerte az Alzheimer-kór után a második leggyakoribb progresszív neurodegeneratív kórkép, azonban a mozgást érintő neurológiai betegségek között vezető helyen áll. A Föld lakosságának megközelítőleg 0,1-0,2%-át érinti a betegség. Európában a PD becsült prevalenciája és incidenciája hozzávetőlegesen 108–257/100000 fő, illetve 11–19/100000 eset évente. A rizikótényezők közé az előrehaladott életkor, a férfi nem, környezeti hatások és egyes genetikai variációk sorolhatók. Bár a betegség etiológiája a legtöbb páciensben nem egyértelműen azonosítható, a PD öröklődő formái becslések szerint az esetek 5-15%-át teszik ki. A motoros tünetek okait közel fél évszázada kutatják, azonban a hangulati életet érintő elváltozások eredetével és a kórkép progressziójával kapcsolatos kérdésekkel csak az 1990-es években kezdtek foglalkozni (*Becher et al., 1997*). Megjelenése hazánkban és globálisan egyaránt lassú, de folyamatos növekedést mutat (*Balestrino et al., 2020*). Magyarországon 20-40 ezer főre tehető a Parkinson-kórban szenvedők száma (*Szatmári et al., 2019*). A betegség gyakorisága az életkor előrehaladásával meredek növekedést mutat. A tünetek fiatalkori manifesztációja igen ritka, a 40 év alatti megjelenés a PD esetek között mindössze 5%-ban fordul elő. Az 50-59 éves korosztályban prevalenciája 17/100 000 fő, mely a 70-79 éves korcsoportban több mint 90/100 000 főre emelkedik (*Komoly, 2018*). A betegséghez kapcsolódó globális terheket egy 2019-ben a Lancet-ben publikált összefoglaló tanulmány (*GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2019*) szerint a PD előfordulása 118%-os növekedést mutatott a csökkent munkaképességük körében 1990 és 2015 között, ezzel megjelenési aránya az egyik leggyorsabb ütemben nő a neurológiai kórképek közül. Ennek hátterében több tényező állhat, melyek közül a legjelentősebb a népesség elöregedése lehet. Indirekt módon szerepet játszhat még az egyre korszerűbb terápiás lehetőségek miatt megnövekedett betegségidő és a modern diagnosztika által lehetővé tett korai betegség felismerés (*GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2019*).

A PD egészségügyi, pszichológiai és szociális aspektusán túl nagy gazdasági terhet is ró a társadalomra. Az európai gazdasági károkat összefoglaló, 2011-ben megjelent tanulmány szerint a Parkinson-kórral összefüggésben 13,9 milliárd eurós direkt egészségügyi és indirekt nem-egészségügyi költség keletkezett (*Gustavsson et al., 2011*),

ami az elmúlt 10 évben tovább növekedett. Az Egyesült Államokban 2017 év végéig 51,9 milliárd dollárra becsülték a kezelések miatti kiadások és a bevételkiesés miatt létrejövő anyagi veszteség összértékét (Yang et al., 2020).

## 1.2 A Parkinson-kór leírása és tünettana

A kór négy kardinális tünetének ismerete már igen korai időkre visszanyúlik. A tremor, bradykinesia, rigor és tartási instabilitás első, rendszerezett leírása és összefoglaló tünettana James Parkinson „Egy tanulmány a remegő bénulásról” című munkája révén került be az orvosi köztudatba 1817-ben. Az akkor még paralysis agitans-nak hívott állapotot később Jean-Martin Charcot nevezte át Parkinson-kórra (Wilkins, 1997). A betegség leírásának van egy régebbre visszanyúló magyar vonatkozása. James Parkinson közismertté vált tanulmánya előtt 127 évvel az akkori magyar orvosi szaknyelv „reszketeg hűdés” néven írta le ezeket tüneteket. 1690-ben Pápai Páriz Ferenc jegyezte le magyar nyelven „Pax corporis” című könyvében (Berezki, 2010) (1. ábra).



1. ábra - A Pax corporis előlapja, és a Parkinson-kórt leíró idézet olvasható. (forrás: Berezki: The description of all four cardinal signs of Parkinson's disease in a Hungarian medical text published in 1690.)

A tüneteket két csoportra tudjuk osztani. Ennek értelmében beszélhetünk a mozgási rendszert érintő *motoros*, illetve a vegetatív funkciókat és a hangulati életet befolyásoló *nem-motoros* tünetekről.

### 1.2.1 Motoros tünetek

A külső szemlélők számára a kór lefolyása a motoros funkciók látható romlásával jár együtt. Vezető tünetei közé tartoznak a rigor, a nyugalmi tremor és a bradykinesia (Komoly, 2018).

A rigor a vázizmok merevségét jelenti, ekkor az izmok ellenállnak a passzív mozgatásnak, annak irányától és sebességétől függetlenül, melynek következtében a végtag egy adott helyzetben rögzül.

A tremor nagy amplitúdójú és frekvenciájú remegést jelent, amit az agonista és az antagonist izomcsoportok ritmusos oszcilláló mozgása hoz létre, mely főleg a végtagok distalis részét érinti. A tremor nyugalomban fokozott, a mozgás indítására, előkészítésére vagy tervezésére viszont csökken, esetenként teljesen megszűnik.

A bradykinesia a vázizmok érintettsége miatti lelassult mozgást, mozgásszegénységet jelent. Apróléptű, csoszogó járás („*marche á petit pas*”) és a kifejezéstelenné váló „kenőcsös”, vagy „lárva” arc is jellemző a mimikai izmok érintettsége miatt. Jellegzetes társtünet a gége izmainak elgyengülése, ami monotonná és nehezen érthetővé, gyakran elhalkulóvá teszi a beszédet. A Parkinson-kórban megjelenő mozgászavarok általában aszimmetrikusak és a betegség kialakulásának kezdetén gyakrabban érintik a felső végtagot.

Hypokinesisnek nevezzük a mozgás elindítási és megállítási nehézségét: a betegek képesek egyenes vonalban egyenletesen mozogni, de elindulási és fordulási nehézségeik vannak. Akinesisként az akaratlagos mozgások szabályozásának megszűnését értjük. A felső végtagok összehangolt mozgása csökken, vagy teljesen kiesik. Jellemző még az egyes testhelyzetekben történő rögzülés is, amit lefagyásnak nevezünk.

Előrehaladott, súlyos Parkinson-kórban a tartási és az egyensúlyozásért felelős reflexek is sérülnek, ezért jellemző a testtartásban bekövetkező és járási instabilitás, ami miatt a beteg egyre többször veszi el az egyensúlyát és mind gyakrabban esik el. Emiatt nem mer kimozdulni otthonról és egyre zárkózottabbá válik. A testtartásában jellegzetes változások mennek végbe: a háti és az ágyéki gerincszakasz flexiója megnő, a paravertebralis izmok deszkakeménnyé és fájdalmassá válnak, a nyak anteflexióban rögzül. A derék oldal irányban meghajlik, ami gyakran a gerinc nyílirányú rotációjával jár együtt, ez a Pisa-szindróma. A könyök, valamint a metacarpophalangealis ízületek

flexióban, míg a proximális és a distális interphalangealis ízületek extenzióban rögzülnek, melyet „striátum kézként” ismerünk (Szirmai, 2017).

### **1.2.2 Nem-motoros tünetek**

A Parkinson-kórban szenvedő betegekben a motoros rendszer érintettsége mellett az úgynevezett nem-motoros tünetek is megjelennek. E tünetek felfedezésének hatására, a Parkinson-kórról alkotott kép nagymértékben megváltozott. Míg korábban tisztán motoros kórképként gondoltunk rá, addig ma már multisztémás betegségként tekintünk a Parkinson-kórra (Obeso et al., 2017). A hangulati életet befolyásoló tényezők fordulnak elő leggyakrabban, melyek akár évekkal a motoros tünetek kialakulása előtt is megjelenhetnek és a betegség progressziójával arányosan súlyosbodhatnak. Ezek igen eltérő súlyosságot mutatnak, azonban a betegeken végzett önértékelési tesztek eredményei alapján nagyobb mértékben rontják az életminőségüket, mint a motoros rendszer érintettsége. Gyakori bevezető tünet a szaglás csökkenése, ami azonban Alzheimer-kórban szintén előfordul, így nem specifikus. További nem-motoros tünetek közé tartoznak az alvászavarok, kóros mértékű fáradékonyság és az emésztő rendszert érintő változások (Chaudhuri et al., 2006).

#### **1.2.2.1 Neuropszichiátriai zavarok**

A vezető, hangulati életet érintő, nem-motoros tünetek közé sorolható a szorongás és a depresszió. Ezekkel egy időben, vagy akár izoláltan is megjelenhetnek impulzuskontroll zavarok, apathia és alvászavar (Garcia et al., 2019).

A betegek közel felében a nem-motoros tünetek olykor évtizedekkel előbb manifesztálódhatnak, mint a motoros panaszok. A Parkinson-kór az élet minőségének nagyfokú romlásával jár, amely nem csak a betegek, hanem hozzátartozóik, gondozóik életét is megnehezítheti. Az elmúlt években bekövetkezett szemléletváltás ellenére - miszerint a betegség inkább szisztémás betegségként fogható fel - sem tisztázott a Parkinson-kórhoz társuló depresszió pontos neuropatológiai háttere (Rodríguez et al., 2017), bár több kutatás is bizonyította, hogy számos, részben vagy indirekt módon a hangulatszabályozásban is szerepet játszó régió is, mint a locus coeruleus (LC) (Gesi et al., 2000), a nucleus dorsalis nervi vagi (Beach et al., 2010), vagy az Edinger-Westphal mag (EW) (Goedert et al., 2001) érintettek. A vegetatív idegrendszer sem kivétel, mert az enterális idegrendszer neuronjai és enteroendokrin sejtjei is károsodnak Parkinson-



kórbán, valamint a nervus vagus atrófiáját is megfigyelték, mely e tünetekhez hozzájárulhat (Liddle, 2018).

### **1.2.2.2 Vegetatív változások**

Az alvászavar jellegzetes tünete a betegségnek, amelyet a terápiában alkalmazott gyógyszerek jelentősen súlyosbíthatnak. A tünetek megnyilvánulhatnak nappali álmoságban, akár narkolepsziára emlékeztető hirtelen alvási rohamokban, REM-alvászavarokban, vagy álmatlanságban. A REM viselkedési zavarok - amelyekben a betegek az álmaikat valóságként élik meg és akár meg is sebesíthetik magukat vagy hálótársukat - már évekkel azelőtt megjelenhetnek, hogy a Parkinson-kórra jellemző klasszikus motoros és kognitív diszfunkciók kialakulnának (Kim, 2014).

A betegség későbbi szakaszában az autonóm idegrendszer is érintetté válhat, így a gastrointestinalis tractus (GIT) vegetatív beidegzési zavara miatt székletartási nehézségek, az urogenitalis tractus zavara miatt vizeletartási nehézségek, éjszakai ágybavizelés és szexuális diszfunkció, míg a cardiovascularis rendszer elégtelensége miatt ortostaticus hypotensio jöhet létre (Jankovic, 2008). A székrekedés és a lassult gyomorürülés akár komolyabb belgyógyászati panaszokat is okozhat, mely a hospitalizáció gyakoriságát tovább növeli (Barichella et al., 2009). A központi idegrendszer egyéb területeinek érintettsége miatt a dementia, kognitív zavarok és hallucináció is megjelenhetnek, mint késői kísérő tünetek (Witjas et al., 2002). Bár a betegség késői szakaszában a nem-motoros tünetek dominálnak a klinikai képen, összevetve a motoros tünetekkel, ritkábban kerülnek felismerésre és sok esetben nincsenek is megfelelőképpen kezelve (Chaudhuri et al., 2006).

### **1.3 A Parkinson-kór diagnosztikai alappillérei**

Máig nincs olyan célzottan ajánlott és definitív laboratóriumi vizsgálat vagy modern képalkotó technika (MRI, PET, SPECT), amely segítségével képesek lennénk a Parkinson-kór diagnózisát *in vivo* teljes bizonyossággal felállítani.

Ugyanakkor a betegség (feltételezett) diagnózisát jelenleg a klinikai tünetek pontos vizsgálata és elemzése alapján is nagy biztonsággal kimondhatjuk. A Parkinson-kór legfőbb alapvető kritériuma, hogy a három alap motoros tünet közül a bradykinesianak és emellett vagy a 4-6 Hz-es nyugalmi tremornak, vagy a rigiditásnak meg kell jelennie. Ezenkívül elkülönítünk támogató kritériumokat, így a tünetek

aszimmetrikus megjelenését, mely a betegség hátralévő részében folyamatosan fennmarad, a progresszív lefolyást és a 4-6 Hz-es frekvenciától eltérő nyugalmi tremort, tartási instabilitást, csoszogó járást, mimika szegény arcot és a monotonná váló beszédet (*Postuma et al., 2015*). A klinikai tünetek megfigyelésén kívül végezhetünk a betegen *levodopa* (L-DOPA) *tesztet*, mely akkor pozitív, ha a gyógyszer adását követően a beteg motoros tüneteiben nagymértékű javulást tapasztalunk (*Daniel et al., 1993*).

Az FDA 2011-ben jóváhagyta a dopamin-transzporter (DAT) single photon emission computed tomography (SPECT) (röviden: DaTSCAN) képalkotó eljárást mely részletes képet adhat az agy dopaminerg rendszerének állapotáról. A vizsgálat során <sup>123</sup>I-jód izotóphoz konjugált isoflupánt adnak intravénásan. A radiofarmakon dopamin-transzporterekhez kapcsolódik a striatumban és a SPECT képes detektálni az izotóp gamma-sugárzását. Ha ennek a sugárzásnak a mértéke csökkent, az a dopaminerg pályák elhalására enged következtetni. A DaTSCAN alkalmazása azon páciensek esetében indikált, akiknél a tremornak, mint tünetnek az eredete etiológiailag nem egyértelmű. Bár a vizsgálat nem képes megmutatni, hogy a tremort Parkinson-kór, multiszipstémás atrofia vagy progresszív supranuclearis paraesis okozza, az esszenciális tremort mégis képes az előbb említett kórképektől elkülöníteni. A DaTSCAN legnagyobb előnye az, hogy klinikai tüneteken alapuló feltételezett Parkinson-kór diagnózist képes megerősíteni azzal, hogy a dopaminerg agyi régiókban már 30% körüli sejtesökkenést tud detektálni (*Djang et al., 2012*).

Mindazonáltal, a definitív diagnózis felállításához máig is hisztopatológiai vizsgálat szükséges, amelyre így csak a beteg halála után kerülhet sor. Akkor mondható ki, hogy az elhunyt bizonyítottan Parkinson-kóros volt, ha a substantia nigra pars compacta (SNpc) szövettani vizsgálatakor a dopamin (DA) tartalmú neuronok 70%-os mennyiségű csökkenése mellett a még nem degenerálódott neuronokban alpha-synuclein ( $\alpha$ -Syn) tartalmú eosinophil zárványokat, úgynevezett Lewy-testeket (LB) is találunk (*Schneider et al., 2015*).

#### **1.4 A Parkinson-kór klinikai formái és stádiumai**

A legmeghatározóbb motoros tünet alapján a Parkinson-kór három fő típusát lehet elkülöníteni. Ha a beteg fő panasza a nyugalmi remegés, akkor tremor-domináns típusról beszélünk, mely általában korán diagnosztizálható, valamint jobb prognózisú a többi formához képest (*Berg et al., 2014*). Ha a vizsgálat során az izommerevség és a mozgások

meglassultsága a vezető tünet, akkor a páciens rigid-akinetikus formában szenved. Az is lehetséges, hogy a nyugalmi tremor és a bradykinesia hasonló mértékben jelenik meg a betegségben, ebben az esetben a Parkinson-kór kevert típusával állunk szemben (*Postuma et al., 2015*).

A tünetek progressziója alapján 2014 óta három klinikai stádiumot különítünk el (*Berg et al., 2014*).

#### **1.4.1 Preklinikai szakasz**

Az első szakasz, melyben már megkezdődött a kórra jellemző neurondegeneráció, viszont a szervezet kompenzációs mechanizmusai miatt a klinikai tünetek még nem jelentek meg.

#### **1.4.2 Prodromális szakasz**

A második stádium, ahol már megjelennek bizonyos Parkinson-kórra jellemző nem-motoros tünetek, így a szaglás csökkenése, a depresszió, alvászavarok és a székrekedés. Ezek alapján végleges diagnózis nem állítható fel, mivel az annak alapjául szolgáló motoros tünetek csak a preklinikai és a prodromális szakasz után kb. 5-20 évvel jelennek meg.

#### **1.4.3 Klinikai szakasz**

Ez a harmadik és egyben utolsó stádium, melyben megjelennek a diagnózis felállításához szükséges motoros rendszert érintő, jellemző elváltozások. Ezen tünetek és a tüneti terápiaként alkalmazott anti-parkinson gyógyszerek adása során megjelenő mellékhatások alapján a klinikai szakaszt két további alszakaszra tudjuk bontani.

A klinikai szakasz korai, nem komplikált fázisa az első 3-5 évre jellemző. Ebben az időszakban gyógyszeres terápia mellett nagymértékű javulás érhető el a motoros teljesítményben, esetenként teljes tünetmentesség jelenhet meg a „mézeshetek” periódus alatt.

A késői, előrehaladott fázisban a gyógyszeres kezelés fluktuáló eredményességet mutat és nagyobb mértékben jelennek meg a terápia hatására különböző motoros és nem-motoros mellékhatások (*Postuma et al., 2015*).

A Parkinson-kórtól elkülönítünk úgynevezett Parkinson-szindrómákat vagy parkinsonizmust, melyek olyan tünetegyütteseket és betegségeket foglalnak össze,

amelyek esetében a Parkinson-kórra jellemző motoros tünetek figyelhetők meg, de etiológiájukat tekintve nem egyeznek meg a betegségre jellemző okokkal (*Bensimon et al., 2009*).

### 1.5 A Parkinson-kór kezelési lehetőségei

A Parkinson-kór elsődlegesen választandó terápiájának legfőbb komponense a L-DOPA, mely egy közvetlen dopamin prekursor. Képes a vér-agy gáton (BBB) átjutni és a központi idegrendszerben (KIR), dekarboxiláció révén hatásos metabolittá alakul, így fejtve ki hatását. Per os alkalmazása során csak 1-3%-a jut be a KIR-be, mert nagyrésze már a periférián átalakul, ezáltal kis terápiás hatást, de kifejezett perifériás mellékhatást okoz. Ennek elkerülése érdekében kombinált terápiában, carbidopa vagy benserazid hatóanyagú komponenssel, dopa-dekarboxiláz (DDC) gátlókkal egészítik ki a kezelést. Ilyen kombinációban a használt L-DOPA dózist akár 75%-kal lehet csökkenteni. A terápia hatására a betegek többségében a rigor és a nyugalmi tremor javulnak, az esetek kisebb részében pedig szinte teljesen tünetmentes állapot érhető el (*Lee et al., 2021*). Gyakran előforduló jelenség, hogy a kezelés hatásossága 3-5 év után nagymértékű csökkenést mutat. Ennek oka, hogy az elhaló neuronok gyengült dopamin felszabadítása és a dopamin receptorok downregulációja miatt a terápiás dózis nem növelhető a súlyos mellékhatások megjelenése miatt, így a terápiás szélesség szűkülésével a terápiás hatás is csökken. Ilyen mellékhatások lehetnek a gastrointestinalis hatások, mint az étvágytalanság, hányinger, hányás, valamint cardiovascularis következmények. A megjelenő viselkedési zavarok közül az izgatottság, alvászavar és hallucináció jelentkezhetnek. A L-DOPA/DDC kezelt betegeknél speciális tünet a terápiás hatás fluktuációja, amit *end of dose* és *on-off* jelenségként nevezünk. További problémát jelent az is, hogy a megnövekedett dopamin bevitel nagyobb mértékű lebontással és oxidatív stresszel jár, mely elősegíti a neuronok elhalását és gyorsítja a betegség progresszióját.

Korai Parkinson-kór esetén, fiatal betegeknél lehetőség van monoamino-oxidáz B (MAO-B) inhibitor (rasagilin), illetve dopamin D<sub>2</sub>-receptor agonisták (pramipexol, ropinirol) monoterápiában történő alkalmazására. A levodopához képest a dopamin agonisták esetén nagyobb a neuropszichológiai mellékhatások, így a szerencsejáték-függőség, alvászavar kialakulási esélye. Késői PD esetén szükségessé válik a L-DOPA fokozatos bevezetése DDC gátlókkal együtt, mely kombináció kiegészíthető katekol-o-metiltranszferáz (COMT) inhibitorral (entacapon), ami csökkenti a dopa-dekarboxiláz

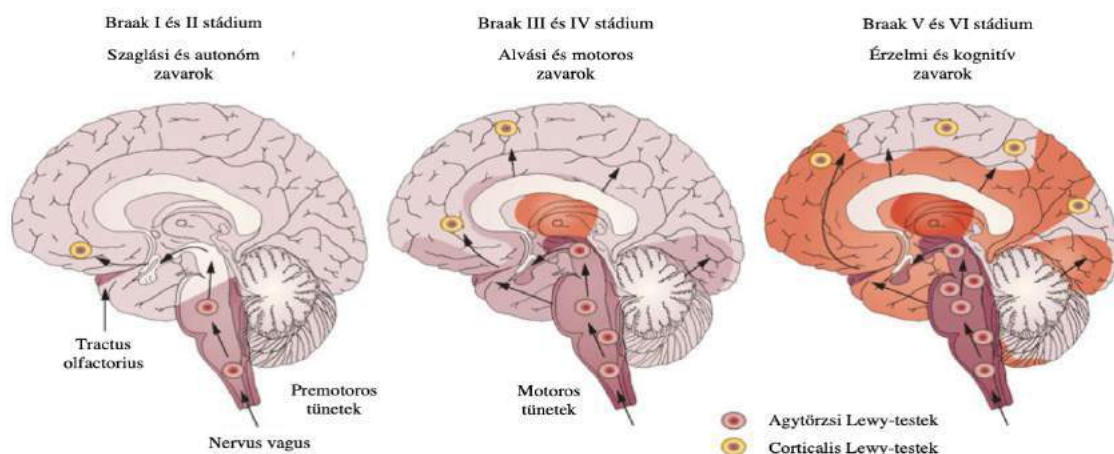
gátlás miatt fokozódó COMT enzimaktivitást és ezáltal fokozza a levodopa hasznosulását (Gyires *et al.*, 2017).

A gyógyszeresen érdemben már nem befolyásolható PD terápiájában a mély agyi stimuláció (deep brain stimulation (DBS)/ neuropacemaker) alkalmazása hozhat látványos eredményeket. A DBS által a gátló központok stimulációja révén a plusz tünetek gátolhatók, a mínusz tünetek viszont a serkentő központok stimulációja útján javíthatók. A thalamus ventralis anterior magjába vezetett elektród a tremort, a subthalamicus magba, illetve a globus pallidus internusba ültetett fémszál pedig a bradykinesiát és a rigort mérsékeli, így javítva a beteg motoros funkcióit (Perlmutter *et al.*, 2006).

### **1.6 Neuroanatómiai változások Parkinson-kórban**

A Parkinson-kórban legjellemzőbb hisztopatológiai elváltozás a substantia nigra pars compacta dopaminerg sejtjeinek 70%-ot meghaladó sejtpusztulása, valamint az itt található még nem apoptotizált sejtekben alpha-synuclein tartalmú eosinophil cytoplasmazárványok megjelenése, melyeket leírójuk, Friedrich H. Lewy után Lewy-testeknek neveztek el (Schneider, 2014). Parkinson-kórban elhunyt személyek agyának vizsgálata során az idegszövetben zajló gyulladós folyamat kimutatható, mely a betegség tüneteinek kialakulásában részt vehet.

A Braak-féle leírás szerint az alpha-synuclein zárványok először a központi idegrendszerben a bulbus olfactoriusban, valamint a nucleus dorsalis nervi vagiban jelennek meg. Ezt követően, a második stádiumban az agytörzsi szerotonin (5-HT) rendszerek közül a caudalisan elhelyezkedő raphe magokban és a noradrenerg magok közül a locus coeruleusban rakódnak le az eosinophil aggregátumok. Csak ezután kezdődik a zárványok megjelenése a substantia nigra pars compacta területén, amit harmadik stádiumként írtak le. Ebben az állapotban az amygdala és az agytörzsben rostralisán elhelyezkedő raphe magok is érintetté válnak. A negyedik stádium alatt a substantia nigra már biztosan tartalmaz alpha-synuclein zárványokat, illetve megjelenik a hippocampusban és egyes corticalis régiókban, míg nem az ötödik és hatodik stádiumokban már szinte az egész cortex is károsodást mutat (Braak *et al.*, 2004) (2. ábra). Az első három stádium a klinikai prodromális szakasszal egy időben zajlik, míg a negyedik stádiumtól már a klasszikus motoros tünetek, illetve a kognitív funkcióromlás dominálnak (Braak *et al.*, 2003).



**2. ábra – Az *alpha*-synuclein zárványok terjedésének folyamata Prof. Heiko Braak leírása alapján.**  
(forrás: *Nature – Olfactory dysfunction in Parkinson's disease*) (Doty, review, 2012)

Az itt említett stádiumokban érintett agyterületek közül az általunk vizsgáltakat alább részletezem (ld. 1.6.1 és 1.6.2).

A központi idegrendszert hosszú ideig egyfajta „immun-privilegizált” szövetnek tekintették: úgy tartották, hogy az szeparálva van az immunrendszertől a vér-agy gát által. Ez az elmélet azonban azóta megdőlt, amikor bebizonyosodott, hogy a veleszületett immunválasz kiváltható a központi idegrendszerben a kórokozó-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) és a károsodással összefüggő molekuláris mintázatok (damage-associated molecular pattern, DAMP) kísérletes átvitele útján. Normál élettani körülmények között az agyállományban egyensúlyi állapotot tartanak fenn a nem-reaktív microgliák és astrogliák. Annak érdekében, hogy fennmaradjon a központi idegrendszeri homeosztázis, a neurotrófikus faktorok felszabadítását, a szinaptikus glutamát eltávolítását, szinapszisok modulációját és remodellálását ezek a sejtek szabályozzák. Amennyiben az agyállomány integritása valamilyen belső vagy külső ok – kóros fehérje-aggregátumok vagy sérült neuronok – miatt megbomlik, a PAMP és DAMP ezeket a gliasejteket képes aktiválni, ami tartós gyulladáshoz vezethet. Míg a gyulladás a progresszív neuronpusztulás következménye, feltehetően a hibásan felcsavarodott *alpha*-synuclein közvetlen szerepet játszhat az aktivációs folyamatokban. A központi idegrendszerben lejátszódó microgliózis és astrogliosis, a perifériás idegrendszerben zajló gyulladáshoz vezető folyamatok (így a vagust érintő változások és a GIT enteroendokrin sejtjeinek Lewy-testes degenerációja), valamint a Parkinson-kór kockázatát fokozó gének jelenléte nem feltétlenül a betegség

kiváltó tényezői, azonban mint kofaktorok, mind hozzájárulhatnak a neurodegeneratív kórkép progressziójához (*Chen et al., 2015*).

### 1.6.1 Microgliák és szerepük a neurodegenerációban

A microgliák (mesogliák) Pio del Rio-Hortega által leírt, a központi idegrendszerben előforduló rezidens makrofágok, melyek az agy sejtjes alkotóinak közel 10-15%-át teszik ki. Ezek a sejtek a veleszületett immunrendszer frontvonalába tartoznak, illetve a homeosztatisz funkciókat látják el a KIR-en belül. Alapvető feladataik közé tartoznak a neurotróf faktorok kiválasztása, a toxikus anyagok eltávolítása, valamint részt vesznek a neuronális kapcsolatok szabályozásában, remodellingjében és a szinapszisok ritkításában (*pruning*) (*Le et al., 2016*). Szöveti készítményben a microglia sejtek jelölése immunfestéssel rutinszerűen elvégezhető. Gyakran egy, ebben a sejtben kifejeződő kalciumkötő fehérje, az ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) jelölést használják markerként, több egyéb lehetőség mellett. A microgliák rendkívül plasztikus sejtek: a lokális szükségletektől függően különféle szerkezeti és fenotípusváltozásokon mennek keresztül, hogy a folyamatosan változó körülmények között adekvát választ adjanak az általuk észlelt kémiai jelekre.

Emberben, a gyulladásos folyamatok függvényében a microgliák képesek funkcionálisan polarizálódni: vagy a klasszikus proinflammatorikus M1 alakot, vagy az alternatív immunszuppresszív és cytoprotektív („sebgyógyító”) M2 alakot veszik fel (*Tang, 2018*). A M1 fenotípus kialakulásához az apoptotizáló neuronok által kibocsájtott DAMP (ATP, neuromelanin, matrix metalloproteáz-3) vagy astrocyák által szekretált proinflammatorikus mediátorok [misfolded vagy aggregált fehérjék (pl.  $\alpha$ -Syn), illetve bizonyos Toll-like receptorok (TLR)] szükségesek (*von Bernhardi et al., 2015*). Erre a fenotípusra a nagy sejttest és az amöboid morfológia, valamint az MHC I és II molekulák upregulációja jellemző (*McGeer et al., 1988*). Az M1 microgliák számos proinflammatorikus citokint termelnek, mint például az IL-1 $\beta$ -t, IL-6-ot, TNF $\alpha$ -t, továbbá kemokineket és bioaktív lipideket is kibocsájtanak környezetükbe. A proinflammatorikus citokin receptorok expressziójának upregulációját is megfigyelték, az antiinflammatorikus molekulák (pl. IL-10) egyidejű csökkenése mellett (*Na et al., 2010*). A fellépő gyulladás következtében végül megváltozik a vér-agy gát átteresztő képessége, mely elősegíti a leukocita infiltrációt így erősítve a helyi gyulladásos választ (*Wang et al., 2015*). Habár a neurodegeneráció szempontjából a phagocytáló M1

fenotípus játszik fontos szerepet, *in vivo* kísérletek kimutatták, hogy az M1-M2 alakváltás is létrejöhet, és így neuroprotekció kerül előtérbe. M2 fenotípus gyulladáscsökkentő faktorok kiválasztásával (e.g. IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) deaktiválja a gyulladást elősegítő kemokineket és segít a neuronális homeosztázis visszaállításában (*Italiani et al., 2014*).

Összességében elmondható, hogy a krónikus microgliaaktiváció során nagy mennyiségű proinflammatorikus mediátor szabadul fel, amelyek egyrészt károsítják a neuronokat, másrészt további microgliaaktivációt indítanak be, és így egy ördögi kört hoznak létre. Ez az állapot hozzájárul a gyulladás fenntartásához és a neurodegeneráció progresszív folyamatához. Ezeket az emberi idegrendszerben tett megfigyeléseket különböző Parkinson-kór állatmodelleken végzett preklinikai vizsgálatok során sikerült reprodukálni, ezért az állatkísérletes megközelítés transzlációs értékkel bíró adatokat szolgáltat a humán neuroinflammatorikus folyamatok jobb megértéséhez.

### **1.6.2 Az astrocyták és szerepük reaktív gliózis során**

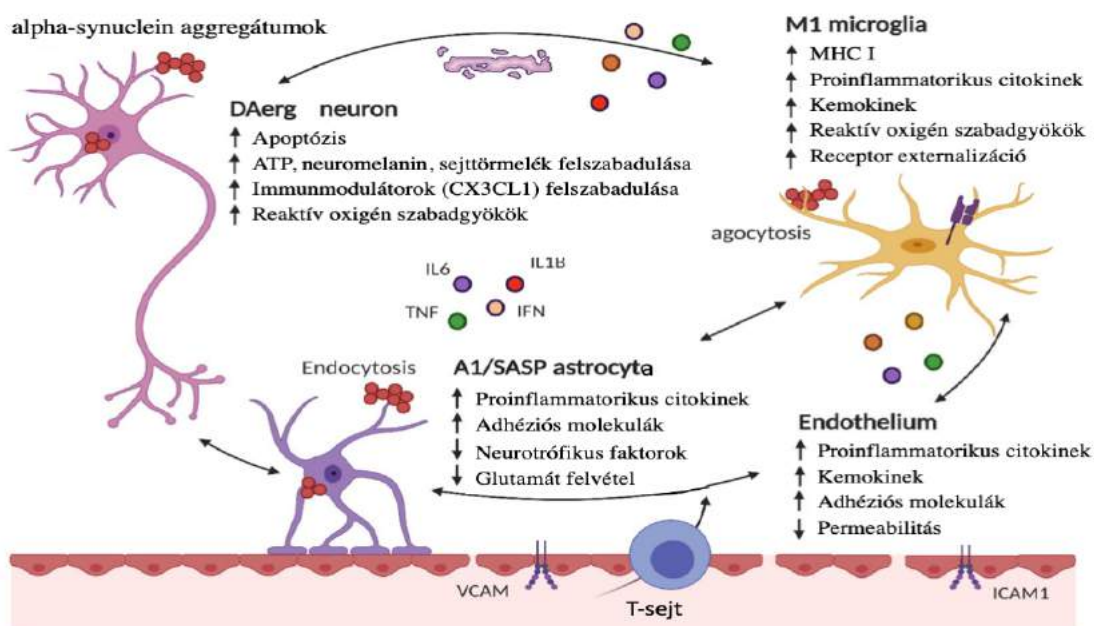
Az astrocyták a központi idegrendszerben igen szerteágazó szerepet betöltő gliasejtek, melyeknek két megjelenési formája van. A rostos astrocytákat főként a fehérállományban találjuk, ahol hosszú, vékony, sima felszínű és kevésbé elágazó nyúlványaik az idegrostok között helyezkednek el. A plazmás astrocyták főként a szürkeállományban fordulnak elő, ahol rövidebb, vastagabb és jobban elágazódó nyúlványaik a neuronok perikaryonjai közötti térben található meg. Az astrocyták kimutatására rutinszerűen alkalmazott szövettani módszer a glial fibrillary acidic protein [(GFAP), egy citoskeletális 3-as típusú intermedier filamentum] immunfestéssel történő jelölése.

Az astrocyták funkcióit illetően kiemelendő passzív, de mégis dinamikusan változó szerepük: egy támasztó hálózat képzése az idegsejtek és az idegrostok számára. Az embrionális fejlődés során az astrocyták irányt mutatnak az éretlen idegsejtek vándorlásához. Emellett a szinapszisok befedésével elektromos szigetelőként megakadályozzák, hogy az axonok végződése befolyásolhassák a szomszédos, de funkcionálisan eltérő neuronokat. Ugyanakkor azt is meggátolják, hogy a felszabadult neurotranszmitterek szétterjedjenek a szinapszisokból. Az astrocyták metabolikusan támogatják az idegsejteket azáltal, hogy laktátot biztosítanak a mitochondriális légzési láncban. Az astrocyták a szövetek helyreállításában is részt vesznek. Gliózis révén kitöltik az elhalt neuronok által hagyott réseket, és kiválasztják a neuronok túléléséhez és



szinaptikus működéséhez szükséges trófikus faktorokat. A neuronokon túl direkt kapcsolatot hoznak létre erekkel: a neurovascularis egység részeként perivascularis hüvelyt hoznak létre. Ilyen módon hozzájárulnak a vér-agy gát alkotásához és annak permeabilitását is szabályozzák (*Bolanos et al., 2016*).

Astrocytopátiára utaló jeleket találtak a SN és a striatum területén Parkinson-kórban elhunytak agyában, valamint kísérletes körülmények között állatmodellekben is (*Miklossy et al., 2006; Braak et al., 2007; Lastres et al., 2012*). A reaktív astrocyták génextpressziós változásokat, valamint morfológiai átrendeződést mutatnak. A microgliával analóg módon, az A1 kifejezés olyan astrocytákat jelöl, amelyek hasonlítanak az M1 proinflammatorikus microgliára, és IL-1 $\alpha$ -t, C1q-t és TNF $\alpha$ -t szekretálnak. Ezek az A1 sejtek elveszítik normális funkciójukat, beleértve a neuronok táplálását, a szinapszissal összefüggő funkciókat. Eddig nem tisztázott módon olyan neurotoxikus faktorokat is képesek elválasztani, amelyek elindíthatják az idegsejtek és az oligodendrocyták pusztulását. Fontos megjegyezni, hogy A1 astrocyták nagy számban fordulnak elő PD-ben, és úgy tűnik, hogy legalább részben aktiválódnak a microgliával kölcsönhatásba kerülve. Parkinson-kórban elhunytak agyában nem csak a neuronokban, hanem az astrocytáknál is kimutatható volt az alpha-synuclein (*Sorrentino et al., 2019*). Az is ismert, hogy az aktivált astrocyták által kibocsátott TNF $\alpha$  a dopaminerg neuronok által expresszált specifikus TNFR-1 és -2 receptorokhoz kötődik, ami képes aktiválni a proapoptotikus folyamatokat. A másik fenotípus, a sérülések vagy ischaemia után létrejövő A2 astrocyták számos neurotróf faktor szabályozását végzik és ezért neuroprotektív sejteknek tekintik őket (*Hirsch et al., 2003*) (3. ábra).



3. ábra – Az agy különböző sejtjei közötti kommunikáció és a következményes neuroinflammatio sematikus ábrázolása, Parkinson-kórban.

A neuronok, astrocyták, microgliák és az endothel sejtek is érzékenyek az alpha-synuclein aggregátumokra, ami a homeosztatikus funkciókat károsítja. Az alpha-synuclein depozíció proinflammatorikus citokinek, kemokinek termelődéséhez, valamint fokozott receptor kifejeződéshez vezet. Továbbiakban a perifériás immunsejtek vándorlása is megindul az agy parenchymája irányába (forrás: Hirsch et al., 2003).

### 1.6.3 A dopamin szerepe a neurodegenerációban

Három fő dopaminerg rendszert különítünk el egymástól: a meso-cortico-limbikust, a tuberoinfundibularist és a nigrostriatalist. A neurotranszmitterek - különös tekintettel a dopaminra – nemcsak az idegsejtek közötti ingerületátvitelben vesznek részt, hanem egyfajta kommunikációt is közvetítenek az idegrendszer és az immunrendszer között (Franco et al., 2007). Érdekes eredmény, hogy a dopaminerg neuronok képesek szabályozni nyirokszövetet és az immunsejtek jelentős része (T és B lymphocyták, dendriticus sejtek, NK sejtek) speciális receptorokon keresztül reagál a dopaminra (Sarkar et al., 2021). Ezek a receptorok eltérő dopamin affinitást mutatnak, következésképpen ez a neurotranszmitter komplex immunmoduláló szerepet tölt be koncentrációjától, a receptor altípusától és a cél immunsejttől függően (Cosentino et al., 2018).

Centrális dopaminerg hypoaktivitás megnövekedett kockázati tényezőként összefüggésbe hozható a neuroinflammációval (Engler et al., 2009).

#### 1.6.4 A substantia nigra és a cortico-subcorticalis pályák érintettsége

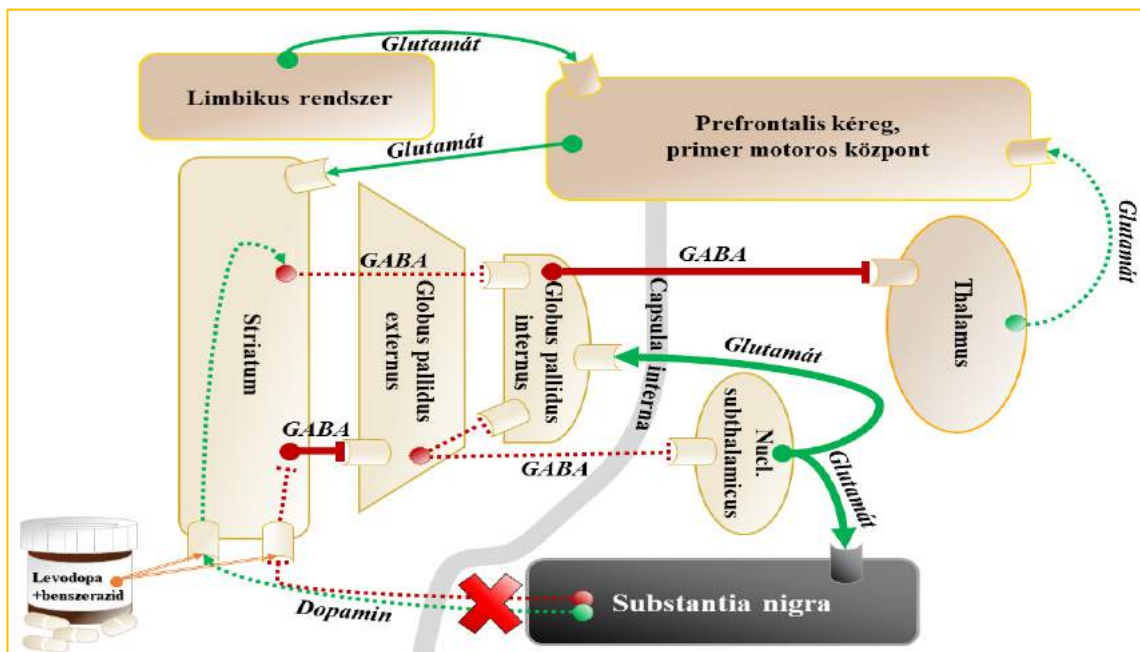
A betegséget jellemző progresszív neurodegeneráció következtében sérül a dopaminerg nigrostrialis pálya, melynek hatására fokozatos, mozgást érintő funkcióvesztés alakul ki. A motoros tünetek klinikai manifesztációja azonban csak a striatum dopamintartalmának 70%-ot meghaladó csökkenése esetén jelenik meg. Ennek oka a kialakuló kompenzáló mechanizmusok, így a túlélő neuronok fokozott működése, a dopamin receptorok számának, valamint érzékenységének növekedése és a sejtek dopamin újrafelvételének csökkenése (*Schneider et al., 2015*) (4. ábra).



**4. ábra – A substantia nigra normál (bal) és Parkinson-kóros (jobb) egyének mesencephalonjából.**  
*A dopaminerg sejtek a neurotranszmitterek előállításánál során egy barna pigmentet, neuromelanint termelnek, melynek köszönhetően a SNpc makroszkóposan egy sötét területként látható a mesencephalon metszlapjain. A Parkinson-kórosok agyában ez a terület halványabbá válhat a sejtpusztulás következtében. (forrás: Edward G. Miner Library: Inttitute for Innovative Education)*

A striatum és a substantia nigra közti dopaminerg kapcsolat megszakadásának következménye az akaratlagos mozgás indításának nehezítettsége. A rigor hátterében a mozgást szabályzó cortico-subcorticalis kör sérülése áll. A SNpc dopamin termelése csökken, ezért az indirekt pályán, a striatumban a D<sub>2</sub>-receptorok ligand kötése hiányában felfüggesztésre kerül a nucl. subthalamicus GABA által létrehozott gátlása, így a globus pallidus internus (GPi) fokozott GABA-erg gátlás alatt tartja a thalamust. Hasonló hatást közvetít a D<sub>1</sub>-receptorok aktivitásának csökkenése a direkt úton keresztül. A striatum nem képes a továbbiakban gátolni a GPi-t, így a thalamus nem szabadul fel a gátlás alól (*Szirmai, 2017*). A tremor pontos patomechanizmusa jelenleg is kutatások tárgya. A jelenség fő oka a SNpc degenerációja miatt fokozódó GABA-erg gátlás a substantia nigra pars reticularison (SNpr), a GPi-n, és a thalamus ventrolateralis magcsoportján. A nucleus subthalamicus fiziológiás gátlása gyengül, ami serkenti a GPi és a SNpr által kifejtett

gátlást. A GPi ritmikus aktivitását a thalamus VL magcsoportja transzformálja 3-6 Hz-es kisülésekké, melyeket a motoros kéreg közvetít a motoneuronok útján a végtag izomzata irányába (5. ábra).



5. ábra - A Parkinson-kórban végbemenő neuroanatómiai változások sémás ábrázolása. (forrás: Márton Zsombor Sándor, TDK hallgató illusztrációja, leírás 1.6.4)

### 1.6.5 A vegetatív funkciók és a hangulat szabályozásában résztvevő területek érintettsége

Habár a Parkinson-kór eredeti leírása szerint a motoros rendszert érintő betegség demencia nélkül, mára mégis bebizonyosodott, hogy a progresszió során egyéb extranigralis dopaminerg, cholinerg és szerotoninergerg pályák sérülése is hozzájárulhat a betegséghez társult nem-motoros tünetek kialakulásához. A szerteágazó vizsgálatok ellenére a nem-motoros tünetek neurobiológiai háttere nagyrészt még mindig felfedezetlen (Surmeier et al., 2017). Korábbi kutatások kimutatták már, hogy nem csak az agytörzsi magokban vannak jelen Lewy-testek [a locus coeruleusban (Gesi et al., 2000), nucleus Edinger-Westphalban (Goedert et al., 2001) vagy a nucleus dorsalis nervi vagiban (Walter et al., 2018)], hanem az enterális neuronokban és az enteroendokrin sejtekben is (Beach et al., 2009). Ugyanakkor bebizonyosodott az is, hogy Parkinson-kóros betegekben a nervus vagus is atrófiássá válik, ami magyarázatot jelenthet a vegetatív tünetekre (Fedtke et al., 2018).

### 1.6.5.1 A noradrenerg rendszer – locus coeruleus és A5 area

A noradrenerg agytörzsi rendszer számos idegsejtcsoportból áll, amelyeket A1-től A6-ig terjedő klasszifikációval írtak le. Ezen klaszterek rostrocaudalisán húzódnak a híd lateralis részétől a caudalis ventrolateralis medulláig (VLM) (*Dalström et al., 1964*). Agytörzsi helyzetüket a noradrenalin (NA) szintéziséért felelős dopamin- $\beta$ -hidroxiláz enzim immunfestési és vírusvektorral történő retrográd pályajelölési technikák kombinálása útján határozták meg.

A noradrenerg központok a KIR számos területével kapcsolatban vannak és összetett, homeosztázisért felelős folyamatok szabályozásában vesznek részt, beleértve a stresszre és fájdalomingerekre adott választ is. A memória, tanulási, autonóm és viselkedési funkciókat is modulálják a noradrenerg rendszerek (*Petrovaara, 2006*).

A hídi A6 sejtcsoport, más néven locus coeruleus a legmélyrehatóbban tanulmányozott legfőbb noradrenerg mag az agyban, mely a híd dorsolateralis tegmentumában foglal helyet. Az innen kiinduló rostrendszer kiterjedt beidegzést biztosít az egész agyban, és alapvető neuromodulátor szerepet játszik (*Amaral et al., 1977*). A LC részt vesz a stresszreakciókban, az érzelmi memóriában, valamint a fel- és leszálló pályákkal kapcsolatban állva a motoros, szenzoros és autonóm funkciók szabályozásában. Braak leírása alapján tudjuk, hogy a locus coeruleus az egyik központ, mely korai stádiumban Lewy-testes degenerációt mutat Parkinson-kórban. A centrális noradrenalin antiinflammatorikus és neuroprotektív hatással is rendelkezik a dopaminerg degeneráció folyamatában, ezáltal a noradrenerg károsodás befolyásolhatja a betegség progresszióját (*Paredes-Rodriguez et al., 2020*). A noradrenerg rendszer központi idegrendszeri és perifériás degenerációja Parkinson-kórban a nem-motoros tünetek széles spektrumához járulhat hozzá, azonban fontos megjegyezni, hogy ezek megjelenése nem csupán a noradrenerg rendszer működésének megváltozására vezethető vissza, hanem egyéb, kolinerg, szerotoninerg, GABAerg vagy glutamáterg rendszerek deficitjeivel is társulnak (*Schapira et al., 2017*).

Az A5 area szintén a híd tegmentumának része, a felső oliva magkomplex tagja, funkcióját tekintve nem különül el jelentősen a locus coeruleustól. Az A5 neuronok biztosítják a gerincvelő szimpatikus preganglionaris intermediolateralis sejteinek fő noradrenerg bemenetét, mely végső soron a vegetatív idegrendszer modulálása útján

befolyásolhatja az autonóm funkciókat, beleértve azokat is, melyek Parkinson-kórban sérülhetnek (*Paredes-Rodriguez et al., 2020*).

### **1.6.5.2 A szerotoninerg rendszer – raphe magok**

Az agytörzs raphe magjaiból kiinduló szerotoninerg rendszer szintén károsodik Parkinson-kórban, ami hozzájárulhat a nem-motoros tünetek és a tremor kialakulásához. SPECT és PET módszerekkel Parkinson-kórban szenvedő betegekben a raphe magokban alacsony szerotonin-transzporter (SERT) szinteket találtak, ami a szerotoninerg neuronális integritás indikátora (*Loane et al., 2013*). Post mortem vizsgálatok során a raphe magokban Lewy-test felhalmozódással is járó szerotoninerg neuronpusztulást figyeltek meg (*Halliday et al., 1990*), valamint corticalis és subcorticalis struktúrákban a szerotoninerg markerek (SERT, triptofán-hidroxiláz (TPH), 5-hidroxiindolacetát) globális hiányát (*Kish et al., 2008*). Ezenkívül Braak és munkatársai kimutatták, hogy a Parkinson-kór Lewy-patológiája a dorsalis raphe területén korábban jelenik meg, mint a substantia nigrában (*Braak et al., 2003*).

A nucleus raphe dorsalis (DR) a periaqueductalis szürkeállomány (PAG) ventromediális részén található. Sejtjeinek kiemelt szerepe van a hangulat szabályozásában és a stresszadaptációban. Stressz hatására a mag szerotonin tartalmú sejtjeiben a c-Fos termelése szignifikáns mértékben megemelkedik (*Bouwknicht et al., 2007*). A c-Fos egy neuronális aktivációs marker, ami stresszben is megjelenhet, és a sejt génexpressziós szintű adaptációját mutatja. Öngyilkos, depressziós egyének DR mintáiban a TPH enzim mennyiségének emelkedését detektálták, mely fehérje a szerotonin képzésének kulcsenzime (*Lowry et al., 2008*). A szerotoninerg sejtek mellett dopaminerg neuronok is találhatóak a DR területén, melyek szerepe felmerült a szociális izoláció, szeparáció folyamatában lejátszódó viselkedési minták kialakításában (*Matthews et al., 2016*). A cirkadián ritmusban, ezen belül is az alvás különböző fázisaiban, mind a szerotoninerg, mind a dopaminerg sejtek aktiválódnak, melyek az ébredés és REM fázis regulálásában kulcsfontosságúak (*Cho et al., 2017*). A DR számos agyterülettel összeköttetésben áll. Efferenseket küld a limbikus rendszerhez, melyen belül az amygdala a fő célterület, de a paraventricularis maghoz (PVN) és a prefrontális kéreghez is futnak rostjai. Ezek alapján elmondható, hogy a DR és az előbb említett

agyterületek egymással kommunikálva, a hangulat szabályozásában fontos szerepet töltenek be (*Zhang et al., 2012; Lee et Lee., 2014*).

A nucleus raphe medianus (MNR) a nucleus raphe dorsalishez képest basalisán helyezkedik el a caudalis mesencephalon és a pons rostralis részének tegmentumában. Hangulatzavarokban betöltött szerepe kevésbé ismert a DR-al összevetve, mégis számos neurológiai, valamint pszichiátriai kórképben leírták a mag funkcionális eltérését. Szerotoninerg sejtjeinek megváltozott működése áll a szorongásos zavarok patomechanizmusa mögött, kiváltképp a generalizált szorongásos zavarban (*Lazenberger et al., 2012; Lazarini-Lopes et al., 2020; Abela et al., 2020*).

### **1.6.5.3 A non-striatalis dopaminerg rendszerek érintettsége – ventralis tegmentalis area**

A ventralis tegmentalis area (VTA) funkcionálisan a meso-cortico-limbikus rendszerhez sorolható dopaminerg agyterület, melynek fontos szerepe van kognitív folyamatok szabályozásában, a motivációban és önjutalmazásban (*Bariselli et al., 2016*). Korábbi kutatások összefüggésbe hozták a területet a drogaddikció kialakulásával is (*Bourdy et al., 2012*). A VTA a mesencephalonban található terület, ami a substantia nigrától medialisán, a nervus oculomotorius rostjaitól mediobasalisán, valamint a nucleus rubertől ventrálisán található négy kisebb szubdivízióból álló terület (*Oades, 1987*). A VTA az agy számos limbikus területe felé küld dopaminerg rostokat, mint például az amygdalához, a gyrus cingulihoz, a hippocampushoz, a bulbus olfactoriusához, a prefrontális kéreghez, valamint a nucleus accumbenshez (*Peris et al., 2016*). Ahogyan korábban említésre került, a Parkinson-kór motoros tünetei 60-70%-ot meghaladó SNpc dopaminerg neuronvesztéssel járnak együtt (*Schneider, 2014*). Ezzel szemben, Hirsch és Damier megfigyelései alapján, az előrehaladott Parkinson-kórban szenvedő betegeknél átlagosan mindössze 50% a VTA dopaminerg neuronvesztés annak ellenére, hogy a SNpc és a VTA neuronok ugyanazt a neurotranszmittert szintetizálják, tárolják és szabadítják fel. Ráadásul a középagyban egymás közelében helyezkednek el, továbbá jelentős átfedések vannak azokban az agyterületekben, amelyekkel kapcsolatban állnak. Az eltérő vulnerabilitásért génexpressziós és fehérjefunkciós különbségek sejtípus-specifikus kombinációja felelős. Újabb kísérletek alapján a mitochondriumokkal és az energiaigénnyel összefüggő tényezők, a dopaminerg neuronok altípusai közötti

elektrofiziológiai különbségek molekuláris háttere és a proteomot érintő fejlődésbiológiai különbségek is magyarázhatják a két terület eltérő vulnerabilitását (*Brichta, 2014*).

#### **1.6.5.4 A nervus vagus és az enterális idegrendszer**

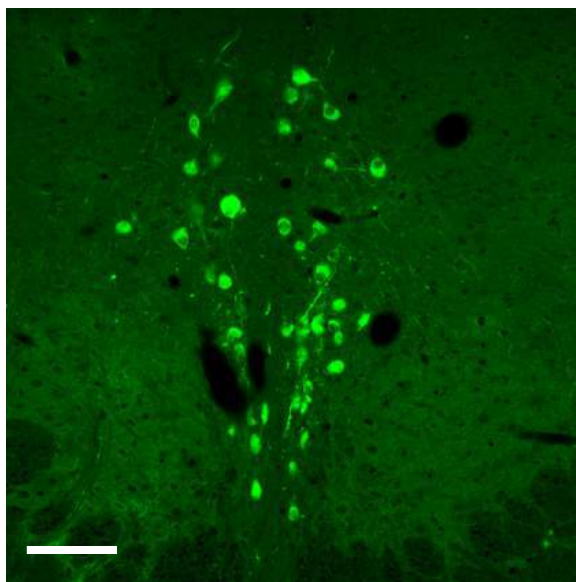
A kevert rostösszetételű bolygóideg visceromotoros és visceroszenzoros rostjai révén a belső szervek, köztük a GIT jelentős részének felsőbb szintű vegetatív szabályozásában játszik szerepet. A Parkinson-kórban jelentkező GI tünetek hátterében a bélfalban és a GI-asszociált idegi struktúrákban bekövetkező funkcionális és szerkezeti változások állnak. A vagus ideget gyakran a Parkinson-kór progressziójának egyik fő útvonalaként említik, mivel az enterális idegrendszerből származó alpha-synuclein aktív, retrográd transzportjával hozzájárul annak agytörzsi felhalmozódásához. Braak leírása (*2003*) szerint a nucleus dorsalis nervi vagi, mint a parasympathicus idegrendszer legjelentősebb központjának Lewy-testes degenerációja a Parkinson-kór egészen korai stádiumában megjelenik, ami összefüggésbe hozható a vegetatív funkciók romlásával (*Braak et al., 2003*). Ezt a megfigyelést támasztja alá annak a vizsgálatnak az eredménye, melyben közel 15000 gyomorfekély miatt teljes truncalis vagotómián átesett beteget követtek. Az eljárás nem várt következménye a későbbi Parkinson-kór kialakulásának csökkenése volt, ami arra utal, hogy a bolygóideg szerepet játszhat a PD patogenezisében (*Svensson et al., 2015*). Ezzel összhangban, a nervus vagus nyaki szakaszának *in vivo* vizsgálata során a visceromotoros és visceroszenzoros vagus rostok atrófiáját írták le Parkinson-kórban a nervus accessorius és nervus phrenicus érintettsége nélkül (*Walter et al., 2018*).

Az enterális diszbiózis, a bélpermeabilitás megváltozása és az intestinalis gyulladás közötti kölcsönös kapcsolat is kóroki tényezőként szerepelhet a Parkinson-kórban (*Mulak et al., 2015*). Az enterális idegrendszer kulcsszerepet játszik ezekben a kölcsönhatásokban. A bélfal permeabilitásában bekövetkező változások elősegíthetik a baktériumok és endotoxinok transzlokációját az epiteliális gáton keresztül, így immunológiai választ indukálva, mely a gyulladást elősegítő citokinek termelését indítja el. Mind az enterális neuronok, mind a gliasejtek aktivációja neurológiai diszfunkciót eredményezhet, amely az agy-bél tengely mentén terjed (*Mulak et al., 2015*).



### 1.6.5.5 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag

Az Edinger-Westphal mag, azaz a nucleus accessorius nervi oculomotorii a harmadik agyideg paraszimpatikus magja. Preganglionáris, kolinerg neuronjai a ganglion ciliare felé küldenek axonokat, majd átkapcsolódás után a szem két belső simaizmét szabályozzák. A musculus sphincter pupillae-nek szerepe a pupilla összehúzásában van, míg a musculus ciliaris a szemlencse akkomodációjáért felelős. Ismert az EW egy szubdivíziója, amely dorsomedialisan helyezkedik el és jellemzően nem mutat kolinerg immunreaktivitást, valamint rostokat sem küld a ganglion ciliare felé (*Weitemier et al., 2005; Kozicz, 2007*). Az innen eredő axonok nem hagyják el a KIR-t, hanem számos központi összeköttetést létesítenek (ld. 7-8. ábra), ezért ezt a részt centrális-projekciójú Edinger-Westphal magnak nevezzük (EWcp; *Kozicz et al., 2011*) (6. ábra).



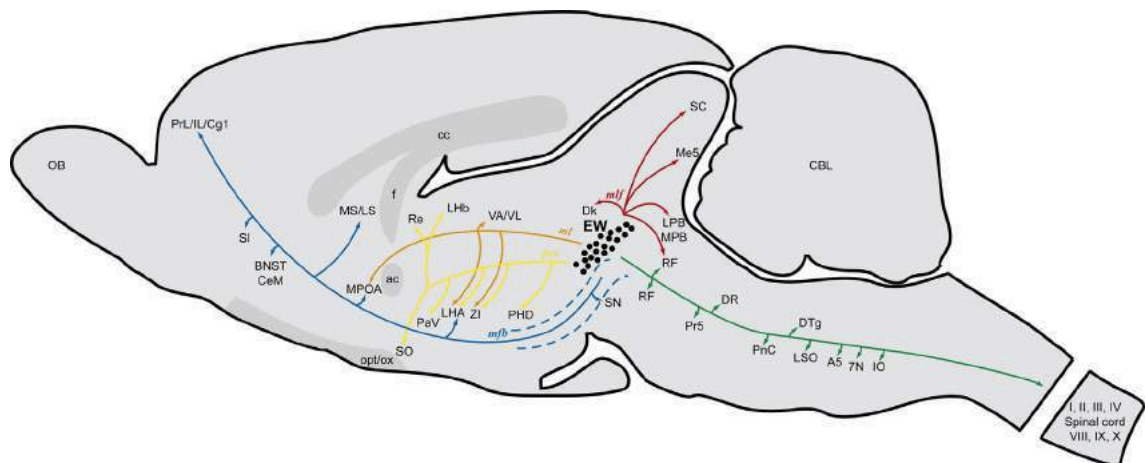
**6. ábra – Urocortin 1 tartalmú neuronok fluoreszcens immunjelöléssel.**

*Reprezentatív fluoreszcens konfokális mikroszkóppal készített felvétel a EWcp mag urocortinerg neuronjairól, az UCN1 zöld színnel jelölve. Patkányból származó saját minta. Lépték: 100µm.*

Az itt található idegsejtek többsége urocortin 1 (UCN1) peptidet termel. Az UCN1 neuropeptid, amely a corticotropin-releasing hormon (CRH) család tagja. Hatását a CRH<sub>1</sub>, illetve CRH<sub>2</sub> receptorokon fejti ki, nagyobb affinitást mutatva az utóbbi iránt (*Vaughan et al., 1995*). Az első kutatási eredmények szerint a CRH-nal 45% szekvenciahomológiát mutató UCN1 szintén anxiogén hatást indukál a CRH<sub>1</sub> receptoron. Ezzel szemben a CRH<sub>2</sub> receptoron hatva anxiolitikus hatást is közvetít (*Kozicz, 2007*). Több tanulmányban megerősítették, hogy UCN1 génkiütött egerek növekedett szorongási szintet mutatnak akut stressz hatására (*Vetter et al., 2002; Zalutskaya et al.,*

2007). Az UCN1 a GIT, endothelium, szív, placenta, vér (Petraglia, 1996; Bamberger 1998; Kohno, 2001) és a KIR több területén (nucleus olivaris superior lateralis része, PVN) is termelődik (Kozicz et al., 1998; Bittencourt et al., 1999). Az urocortinerg perikaryonok megközelítőleg 80%-a a EWcp területére lokalizálódik. A EWcp-ban az UCN1-gyel 100%-ban kolokalizáló kokain- és amfetamin-regulált transzkript peptid (CART) expressziójának megváltozása szerepet játszhat a hangulatzavarok patomechanizmusában (Kozicz et al., 2008; Bloem et al., 2011). Az UCN1, c-Fos és FosB expressziója akut és krónikus stressz hatására is emelkedik, mely a EWcp sejtjeinek aktivációját igazolja (Kozicz et al., 2001; Kozicz et al., 2008; Gaszner et al., 2012; Kormos et al., 2016).

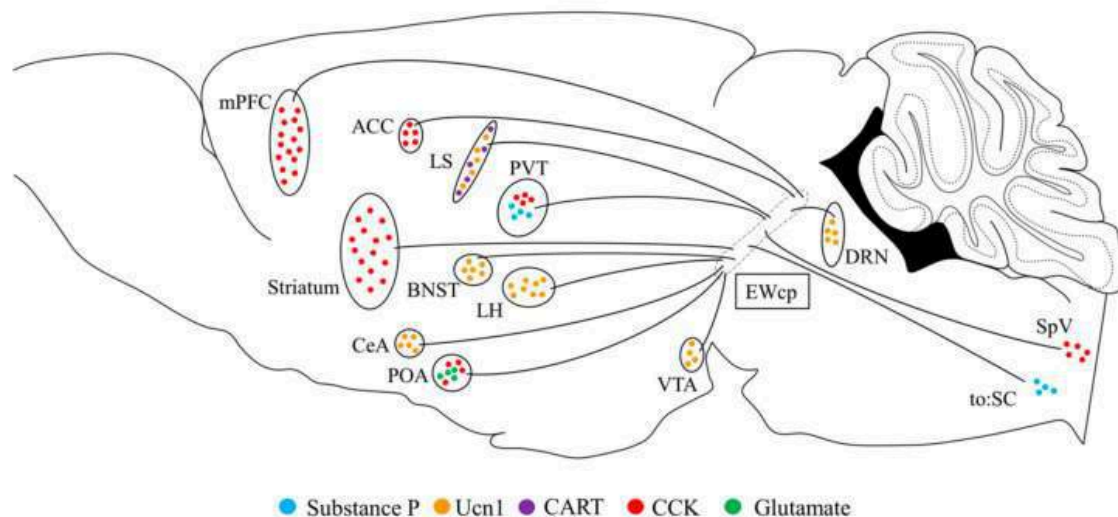
Dos Santos és kutatócsoportja anterográd, biotinilált dextrán-amin (DBA) és retrográd, koleratoxin B alegység jelölés segítségével határozta meg a EWcp összeköttetéseit. Kapcsolatai közül afferens beidegzését főleg a PVN-ből és a lateralis hypothamalicus területről kapja, melyeknek bizonyított szerepe van a stresszadaptációban (da Silva et al., 2013). A EWcp továbbá efferens kapcsolatban áll a limbikus rendszerhez tartozó területekkel, így a septum lateraléval, az amygdala centrális magjával, a nucleus interstitialis striae terminalissal és a lateralis hypothamalicus területtel. E területek szerepe ismert az érzelmek kifejeződésében, a szorongás és hangulat szabályozásában (Dos Santos et al., 2015) (7. ábra).



### 7. ábra – A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag összeköttetéseit.

A patkány agy sagittalis metszetén DBA injekció EWcp-ba történő adása után a kiemelt területeken jelent meg az injektált anyag. A fekete pontok a EWcp-t jelölik, míg az afferens és efferens pályák különböző színekkel vannak jelölve. Narancssárga és citromsárga: felszálló pályák, kék: medialis előagyi köteg. Piros: leszálló pályák, zöld: fasciculus longitudinalis medialis az agytörzsi magok és a gerincvelő felé. A rövidítések és a teljes lista a forrásban elérhető (Dos Santos et al., 2015).

A EWcp neuronjai számos jutalmazásban, stresszválaszban és energiaforgalomban szerepet játszó neuropeptidet is termelnek, mint a CART, cholecystokinint (CCK) és substance P (8. ábra). Számos tanulmány alátámasztja ezeknek a neuropeptideknek a szerepét alkohol- és drogfüggőségek kialakulásában (Zuniga et al., 2021). Több állatmodellben (Gaszner et al., 2009; Kormos et al., 2016), valamint öngyilkos egyének autopsziás mintáiban is igazolták a EWcp érintettségét a stresszadaptáció folyamataiban és a hangulatzavarokban (Kozicz et al., 2008).



**8. ábra – A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag efferens kapcsolatai.**

*A jelölt régiók az eltérő színekkel szimbolizált neuropeptideket és neurotranszmittereket fogadják a EWcp-ból. A rövidítések és a teljes lista a forrásban elérhető (Zuniga et al., 2020).*

Tekintettel a EWcp összetettségére a sejtek neurokémiai karakterisztikája szempontjából, a klasszikus, nem szelektív, mechanikai vagy elektromos lézió a terület minden sejttypusát károsítja, nem csak a hangulatszabályozásban is szerepet játszó UCN1 tartalmú neuronokat (Zuniga et al., 2020). Ezért ez a módszer nem alkalmas arra, hogy az UCN1 peptidet tartalmazó sejtek funkcióját vizsgáljuk, tehát arra más, szelektívebb módszert kell választani. Itt fontos kiemelni, hogy az urocortinerg EWcp neuronok közel 50%-a leptin receptort hordoznak felszínükön (Xu et al., 2011; Xu et al., 2021), mely megkülönbözteti őket a régió egyéb peptiderg és nem peptiderg idegsejtjeitől (Zuniga et al., 2020).

Habár egy több mint 30 évvel ezelőtti vizsgálatban „54%-os neuronpusztulást találtak az EW nucleus rostralis részén”, valamint a sejtek 3%-a Lewy-testeket tartalmazott emberi Parkinson-kóros mintákban, akkor további vizsgálatokat nem végeztek e megállapítások jelentőségének feltárása érdekében (Hunter, 1985).

Funkcionális neuronatómiai ismereteink alapján azt feltételeznénk, hogy az Edinger-Westphal magban bekövetkező neurodegeneratív folyamat következtében a belső szemizmokat érintő mozgászavar állna elő, aminek következtében pupillomotoros és akkomodációs zavarokat várnánk. Ezzel ellentétben, Parkinson-kórban nem jellemző a pupillomotoros funkciózavar és nem jár együtt az akkomodáció gyakoribb vagy jelentősebb mértékű gyengeségével sem (*Stankovic et al., 2019*).

Ez alapján fogalmazódott meg bennünk az a feltételezés, hogy az 1985-ben Hunter által felfedezett neurodeneráció az EW területén nem az EW preganglionáris, kolinerg divízióját, hanem a később definiált (*Kozicz et al., 2011*) peptiderg, UCN1 tartalmú centrális projekciójú neuroncsoportot érintheti, és ennek hatása ilyen módon nem a szemműködés zavarában, hanem a Parkinson-kór nem-motoros, a hangulati állapotot érintő tüneteiben, mint a depresszió és szorongás nyilvánulhat meg.

Ezidáig csak néhány publikációban foglalkoztak azzal a kérdéssel, hogy van-e kapcsolat az UCN1 és a PD között. Ezek közül kiemelendő egy, ahol UCN1 adását vizsgálták Parkinson-kór modellekben. Itt különböző kísérleti elrendezésekben a tünetek javulását mutatták ki (*Abuirmeileh et al 2007a; 2007b; 2008*). Ezzel összhangban az UCN1-ről is bebizonyították, hogy elősegíti a dopaminerg neuronok túlélését (*Huang et al., 2011*), de ezek a vizsgálatok exogén neuropeptidet alkalmaztak, és nem értékelték az endogén UCN1 hatásait és a hangulati állapotot.

### **1.7 A Parkinson-kór előidézésére használható állatkísérleti modellek**

A betegség tüneteinek előidézése, tanulmányozása és az állapotváltozás követése különféle laboratóriumi állatfajok segítségével sokféle módon történik. A vizsgálatokat gerinctelen és gerinces állatokon is el lehet végezni, de széles körben – etikai transzlációs és technikai szempontokat figyelembe véve – mégis a rágcsálók használata terjedt el.

Neurotoxinok lokális vagy szisztémás adminisztrációja következtében kialakult dopaminerg neurondegeneráció képezi az alapját megannyi Parkinson-kór modellnek. Elsőként a 6-hidroxidopamint (6-OHDA) fedezték fel, amelyet először a periférián alkalmaztak a szimpatikus idegek degenerálására, később pedig lokálisan az agyba juttatva a PD modellezésére. Az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) neurotoxint kémiai indukált parkinsonizmus kapcsán fedezték fel az 1-metil-4-fenil-4-propion-piperidin (MPPP) opioid gyógyszer megghiúsult szintézise után. Emelkedett Parkinson-kór kockázatról számoltak be a mezőgazdaságban különböző peszticidek

hatásának kitett populációkban, és ez a megfigyelés ezután további neurotoxin alapú PD-modellek kidolgozásához vezetett.

### **1.7.1 Szisztémás toxikus állatkísérleti modellek**

#### **1.7.1.1 MPTP**

Az MPTP toxicitását intravénás opiát típusú kábítószer-fogyasztók körében véletlenül fedezték fel. Bár önmagának az MPTP-nek nincs kábítószerhatása, előállításakor az MPPP nevű, a morfiumhoz és a petidinhez hasonló hatású szintetikus kábítószer is keletkezik, és fordítva. A drogfogyasztókban gyorsan kifejlődött egy Parkinson-kórra nagyban hasonlító mozgászavar és ezért az MPTP-t neurotoxinként tartjuk számon (*Langston, 2017*). Lipophil jellege miatt percekben belül könnyen átjut a vér-agy gáton. Az MPTP-t a gliasejtek veszik fel, amelyekben a MAO-B alakítja tovább. Az 1-methyl-4-phenylpyridinium blokkolja a mitochondriális komplex I-et, amely az ATP termelés csökkenésével, fokozott oxidatív stresszel, neuroinflammációval és végül sejthalállal jár (*Dauer et al., 2003*).

Az MPTP toxikus hatására a rágcsálók kevésbé érzékenyek. A patkányok szinte teljesen rezisztensek, míg egerek esetében megfigyelhető a neuronpusztulás a substantia nigra területén. MPTP indukált dopaminerg degeneráció egerekben korrelációt mutat a motoros funkcióvesztéssel. Ezen károsodások azonban napokon belül az injekció adása után gyógyuló tendenciát mutatnak és helyreállnak, nagyban korlátozva így a viselkedésben fellépő változások tanulmányozását. A jelenség hátterében a rágcsálók agyi ereinek alacsonyabb MAO-B aktivitása állhat (*Langston, 2017*). Az MPTP akut dózist leggyakrabban intraperitoneálisan adják be az egereknek, négy injekció 2 órás intervallumokban történő adagolása (20 mg/kg-ig) 90%-os striatalis dopamindepleciót és 70%-os dopaminerg neuronvesztést eredményezett a SNpc-ban alpha-synuclein aggregátum képződés nélkül (*Jackson-Lewis et al., 2007*).

MPTP-vel főemlősökben hatékonyabban tudunk Parkinson-szindrómát előidézni, mint rágcsálókban. Bilateralis parkinsonizmus több alacsony dózisú szisztémásan adagolt injekcióval érhető el, ugyanakkor hemiparkinsonizmus indukálására is lehetőség van intracarotid infúzióval (*Fox et al., 2010*). A tünetek a beadott dózis függvényében napokon belül, de akár több hónap után fokozatosan alakulnak ki és további pár hónapig perzisztálnak. Az MPTP dózisfüggő dopaminerg degenerációt okoz főemlősökben a

SNpc-ban és a putamenben egyaránt, valamint a Parkinson-kór szövettani képét utánozva az eosinophil aggregátumok is létrejöhetnek. L-DOPA adására a motoros tünetek is javulást mutatnak, amely ennek a modellnek a validitását alátámasztja. A kétoldali MPTP-parkinsonizmus néhány extranigrális patológiás elváltozást is mutat, amelyek közül kiemelendő az anosmia és az alvászavar (Fox et al., 2010).

#### **1.7.1.2 Peszticidek, herbicidek**

A Parkinson-kór modellezésben széleskörben elterjedtek bizonyos növényvédő és gyomirtó szerek, melyek tulajdonságaik alapján neurotoxinoknak minősülnek. A mezőgazdaságban használt kemikáliák és a parkinsonizmus kialakulása közti összefüggést nehéz alátámasztani az egyes szerexpozíciók pontos ismeretének hiánya miatt, azonban etiológiát tekintve környezeti faktorként merült fel a rotenon, a paraquat (PQ<sup>2+</sup>) és a fungicid hatású maneb is. Ezidáig ezen peszticideket és herbicideket leginkább rágcsálókban alkalmazták a Parkinson-kór modellezésére (Kamel, 2013).

##### **1.7.1.2.1 Paraquat**

A paraquat oxidatív stresszt indukálva dopaminerg degenerációt okoz. A PQ<sup>2+</sup> a sejtek redox ciklusán keresztül fejti ki toxikus hatását (Bonneh-Barkay et al., 2005). Makákókon végzett PET-vizsgálatok kimutatták, hogy a vér-agy gáton történő átjutás lassú és nem hatékony folyamat, illetve patkányok PQ<sup>2+</sup> expozíciója után is alacsony szintet mértek. Máiig nem teljesen tisztázott, hogy a paraquat nagy polaritása ellenére hogyan képes átjutni a BBB-en (Naylor et al., 1995). A PQ<sup>2+</sup>-t a DAT nem szállítja, hanem redoxireakció révén alakul át monokationos gyökké (PQ<sup>+</sup>), amely a dopaminerg neuronokba képes behatolni a DAT-on keresztül és citotoxicitást fejt ki (Rappold et al., 2011). A tisztázatlan hatásmechanizmusok ellenére paraquat modellt is alkalmaznak rágcsálókban a PD patológiájának megértésére, valamint a gyulladásoz és oxidatív stressz útvonalak gátlásának tanulmányozására. Egerekben a tartós paraquat-adagolás dopaminerg sejtvesztést okoz a SNpc-ban striatalis dopamindepléción és motoros tünetek nélkül. A paraquat nagy dózisa alkalmatlan a Parkinson-kór modellezésére, mivel tüdőfibrózist okoz, amelynek másodlagos hatása lehet a viselkedésre.

### 1.7.1.2.2 Rotenon

A rotenon a mezőgazdaságban alkalmazott széles spektrumú rovarölő szer, szagtalan, szobahőmérsékleten fehér színű por. Emberre kis dózisu, rövid időtartamú expozíció esetén nem veszélyes, azonban zsiroldékony tulajdonsága miatt hosszú távon felhalmozódhat a szövetekben. Sejtkárosító hatását a mitochondriumokban fejti ki, az elektrontranszport lánc gátlása útján, a komplex I és az ubiquinon között történő elektronátvitelt gátolva és ezzel a sejtben ATP hiányt okozva. Felhalmozódó reaktív oxigén szabadgyökök idézik elő a sejtkárosodást, amely a mitochondriális DNS károsodásához, végül a sejt apoptózisához vezet (*Li et al., 2000*). A rotenon hatása az egész szervezetben kimutatható, azonban citotoxikus hatásának mértéke nem azonos minden szervben. Főként a nagy energiaigényű szöveteket érinti, így a máj, a szívizom és az idegrendszer számos területén mutatható ki sejtelhálás. A KIR területén a motorkoordinációért felelős agyterületek érintettek (*Heinz et al., 2017*). Napi 3 mg/kg intraperitoneális rotenon injekció 6-10 napon keresztül elegendő ahhoz, hogy 45%-os dopaminerg neuronpusztulást okozzon a SNpc-ban, dopamindepléció a striatumban és motoros tüneteket, mint bradykinesia, posturalis instabilitás és rigiditás (*Cannon et al., 2009*). A rotenon nem-motoros tüneteket is kiválthat, ilyen az alvászavar patkányokban (*García-García et al., 2005*). A PD tüneteinek kísérletes kialakítására 2000 óta sikerrel alkalmazzák és ellentétben számos másik ágens által előidézett Parkinson-kórra, itt mindkét patognomikus eltérés detektálható, úgy, mint a dopaminerg sejtek pusztulása a substantia nigra területén, valamint a Lewy-testek megjelenése (*Blesa et al., 2014*). Ellentétben a széles körben alkalmazott 6-OHDA kezeléssel, itt a rotenon beadása nem lokálisan a SN területére történik.

A jelen disszertációban ismertett kísérlet során a rotenon 6 hetes subcutan (s.c.) alkalmazásával idéztünk elő kísérletes Parkinson-kórt patkányokban (*Konnova et al., 2018*). Azért esett a választásunk erre a modellre, mert a rendelkezésre álló kísérleti állatfajok között (egér, patkány) ez az a modell, ami a betegség emberben ismert fő morfológiai jegyeit képes előidézni, mint a neurodegeneráció és intracytoplasmaticus alpha-synuclein aggregátumok megjelenése a SNpc területén.

## **1.7.2 Intracerebrális neuronablációs technikák**

### **1.7.2.1 6-hidroxidopamin**

A 6-OHDA a dopamin és noradrenalin analóg molekulája. Endogén termelődése a dopamin-metabolitok hidroxilációjával történik és nagy mennyiségben fordul elő az emberi agy nucleus caudatusában (*Jackson-Lewis et al., 2012*). A 6-OHDA a vér-agy gáton nem képes átjutni, így ahhoz, hogy neurodegeneratív hatását ki tudja fejteni, közvetlenül az agyállományba kell injektálni. A 6-OHDA a mitochondriális komplex I gátlásával oxidatív stresszt indukál reaktív oxigén származék (ROS) képzésével, mint például szuperoxid- és hidroxil-szabadgyökök, illetve hidrogén-peroxid. A 6-OHDA intracerebrális injektálása lehetővé tette patkányokban a SNpc és a striatumnak a célzott vizsgálatát, létrehozva így akár unilaterális hemiparkinson modellt. Bilateralis injektálás gyakran adipositas, aphagiát, rohamokat és ezek következtében nagyarányú elhullást okozott (*Schober, 2004*).

Patkány SNpc-ba juttatott 6-OHDA 24 óra alatt nagyfokú dopaminerg degenerációhoz és pár nap alatt a striatalis dopamin 90%-ának elvesztéséhez vezet. A striatumba adott 6-OHDA 1-3 hét alatt okoz retrográd nigro-striatalis degenerációt. Unilaterális adagolás aszimmetrikus motoros diszfunkcióhoz és körbeforgó mozgáshoz vezetett (*Dauer et al., 2003*). Az emlősök agya sorozat-intracerebrális 6-OHDA injektálást igényel ahhoz, hogy az elváltozás manifesztálódjon, mely gyakrabban jár posztoperatív komplikációkkal. Ezen modellek alpha-synuclein zárványok tanulmányozására nem alkalmasak, azonban a nucleus subthalamicus túlműködése, a dyskinesia, anhedónia és depresszív viselkedési mintázatok jól figyelemmel kísérhetők (*Gubellini et al., 2015*).

### **1.7.2.2 Leptin-konjugált saporin**

Az intracerebrálisan adott saporin nem tartozik a specifikus Parkinson-kór modellek közé, mégis alkalmazhatjuk annak érdekében, hogy a szelektív idegsejtabláció útján a betegség nem-motoros tüneteit kiválthassuk. A módszerrel sztereotaxiás eszköz segítségével tulajdonképpen bármelyik agyterületben végezhető célzottan lézió, ha tudjuk, hogy az ablálni kívánt sejtek milyen rájuk jellemző, nagyfokú specificitást mutató receptorokat vagy egyéb markereket hordoznak felszínükön.



A saporin egy, az orvosi szappanfűben előforduló riboszóma inaktivációt okozó hatású és ezért mérgező, rendkívül stabil fehérje, mely önmagában nem képes átlépni az idegsejtek sejtthártyáján, így képtelen a citoplazmába jutni. Ha azonban a saporint egy olyan anyaghoz kötjük, ami képes a sejtbe bejutni, akkor az, például receptor-mediált endocytosis révén a citoplazmába kerül. A saporin sejtpusztító hatása a riboszóma funkciók megzavarásán keresztül a fehérjeszintézis leállítása útján megy végbe és apoptosist okoz (*Wiley et al., 2000*). Az elmúlt évtizedben több olyan saporin konjugátum került kereskedelmi forgalomba, amelyek meghatározott sejttípus-szelektív ablációra alkalmasak, *in vivo*.

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a EWcp urocortinerg neuronjainak közel 50%-a leptin receptort hordoz a sejt felszínén (*Xu et al., 2011*), de egyéb sejtek a közelebbi anatómiai régióban nem expresszálják azt. Ezt a tulajdonságot használtuk ki az EWcp/UCN1 sejtek célzott, szelektív ablációjánál sztereotaxiás műtét útján, úgy, hogy leptin-konjugált saporint juttatunk az idegsejtek környezetébe (l.d. 3.3 fejezet).

A fent említett Parkinson-kór modelleket összehasonlító táblázatot a *Függelék* (10. fejezet) részben.

## 2. Célkitűzések és hipotézisek

A disszertációban összefoglalt kísérletek során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag peptiderg sejtjei – különös tekintettel az urocortinerg sejtekre - károsodásuk révén hozzájárulnak-e a Parkinson-kór nem-motoros tüneteinek patkány állatmodellekben.

1. Első kísérletünk célja volt, hogy szisztémás rotenonnal előidézett Parkinson-kór modellben a substantia nigrában bekövetkezőkhöz hasonló változásokat keressünk a centrális-projekciójú Edinger-Westphal magban.

Azt feltételeztük, hogy a rotenon a substantia nigra pars compacta mellett elsősorban a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag neuronjainak károsodásával és a magban létrejövő gyulladással elváltozásokkal járhat együtt, mely kapcsolatban áll a betegség nem-motoros tüneteinek tekintett szorongás és depressziószerű állapot megjelenésével.

Annak indirekt bizonyítására, hogy a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag játszik fontos szerepet a fellépő hangulatzavarban indirekt megközelítéssel egyéb, a hangulatszabályozásban fontos szerepet játszó agyterületek jelentőségét is megvizsgáltuk, mert azt feltételeztük, hogy egyéb területen nem lép fel jelentős változás, amennyiben a centrális-projekciójú Edinger-Westphal játszik jelentős szerepet a hangulatzavarokban.

2. Annak érdekében, hogy direkt módon is bizonyítsuk a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 pozitív neuronjainak szerepét a nem-motoros tünetek létrejöttében, szelektív lokális neuronablációt végeztünk.

Azt feltételeztük, hogy a leptin-konjugált saporin intracerebrális injekciója a motoros tünetek megjelenése nélkül depressziószerű állapotot és szorongást idéz elő a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg neuronjainak szelektív károsítása útján.

### 3. Módszerek és felhasznált anyagok

#### 3.1 Kísérleti állatok

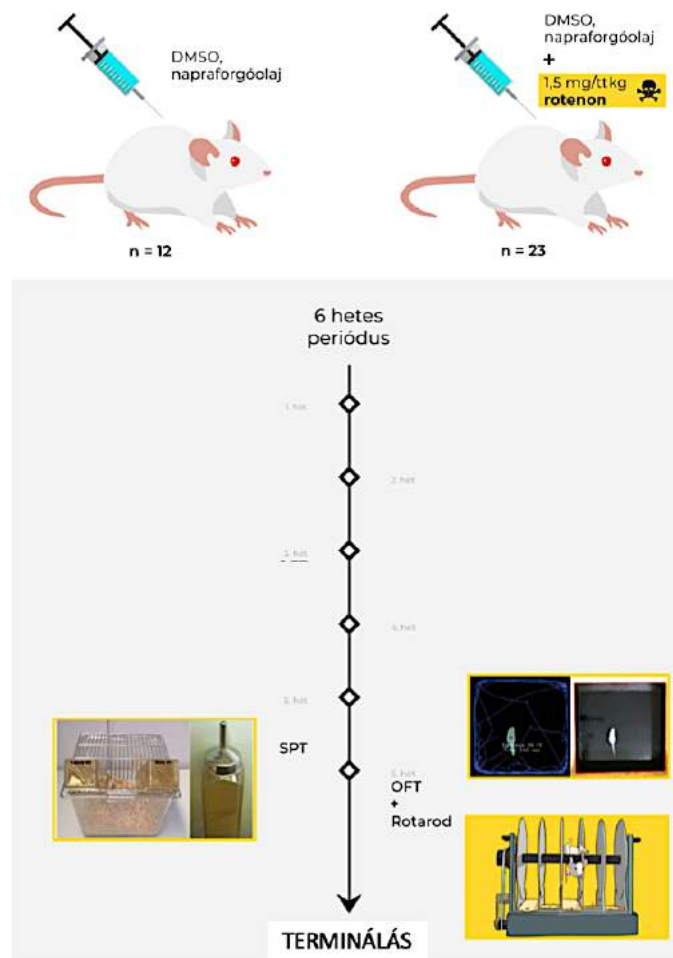
Kísérleteinket hím Wistar patkányon végeztük, amelyek a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán az Anatómiai Intézet állatházának tenyészetéből származtak. Az eredeti tenyészpárokat az Animalab Kft-től vásároltuk, mely a Charles River által tenyésztett laboratóriumi állatok magyarországi forgalmazója. Az állatokat 23-26°C közötti hőmérséklet és 60-80% relatív páratartalom mellett, 12 órás nappal/éjszaka ciklusokban - 6 és 18 óra közötti világítással - tartottuk. A szabványos polikarbonát ketrecekben (40 x 25 x 20 cm) 2-3 patkányt helyeztünk el. Gondozóink minden nap ellenőrizték, és feltöltötték a normál összetételű rágcsálótápot és az ivóvizet, így a kísérleti állatok *ad libidum* magukhoz vehették azokat. A kísérletet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanácsának támogató javaslata alapján a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyével végeztük (NÉBIH engedélyszám: BA02/2000-49/2017).

#### 3.2 A rotenon indukálta Parkinson-kór modell

A kísérlet során 35 darab, 11 hónapos hím patkányt két fő csoportra osztottuk, amelyek 6 héten át mindennap egy alkalommal, 8:30 és 9:30 között s.c. injekciós kezelésben részesültek. Szakirodalmi leírások (*Miyazaki et al., 2020*) és általunk elvégzett előkísérleti eredmények alapján határoztuk meg a dózisokat. A toxin injektált csoport (n=23) állatai 1,5 mg/kg rotenont (R8875-1G, Sigma, Budapest, Magyarország) kaptak steril napraforgóolaj (1 ml/kg) (8000-21-6, Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Magyarország) és dimetil-szulfoxid (DMSO - 20 µl/kg/nap) (Fisher Scientific, Loughborough, Egyesült Királyság) keverékében oldva. A kontroll csoport (n=12) egyedeit 1 ml/kg steril napraforgó olaj és ugyanúgy 20 µl/kg/nap DMSO oldatával kezeltük. Az injekciós kezelést 21G-s tűvel végeztük és az oldatokat az állatok hátbőre alá adtuk be, naponta váltogatva a jobb és bal oldal között. A patkányok testtömegét hetente kétszer mértük, hogy a testtömegre vonatkoztatott dózist pontosan ki lehessen számolni minden állatnál. Ezeket a méréseket alomcsere alkalmával végeztük, ezzel sem téve ki őket szükségtelen stressznek.

A 6 hetes kísérlet során három különböző viselkedési tesztet végeztünk, eltérő napokon. Az állatok terminálása és a minták feldolgozása a hatodik hét után történt (ld. alább). A kísérleti elrendezést a 9. ábra mutatja be részletesen.

A rotenon kezelt csoportból 5 állatot még a kísérlet során súlyos állapotromlás miatt kíméletes végpontban kellett részesítenünk. A szövettani elemzés után 6 másik rotenon kezelt állatot kellett kizárnunk, mivel náluk nem következett be legalább 20%-os dopaminerg neuronszám csökkenés a substantia nigra területén. Végül, 12 rotenon kezelt patkány adatait dolgoztuk fel a statisztikai elemzések során.



**9. ábra – A rotenon kísérlet *in vivo* szakaszának sémás bemutatása.**

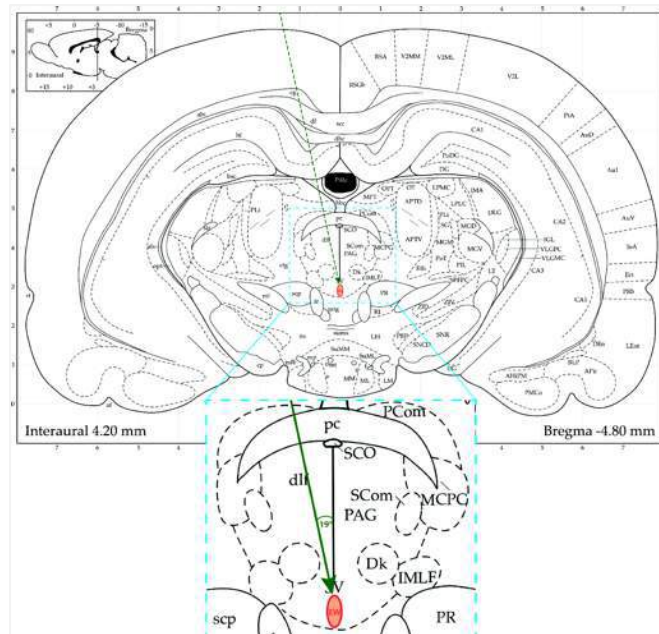
*Az idővonalon látható, mikor végeztük el a viselkedési és motoros teszteket. OFT (open field teszt), SPT (cukorpreferencia teszt), DMSO (dimetil-szulfoxid). (Pytel Bence, TDK hallgató illusztrációja).*

### 3.3 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtjeinek szelektív ablációja leptin-konjugált saporin segítségével

A szisztémás kezelés során megfigyelt motoros tünetek hátterében a substantia nigra pars compacta és a nigrostriatalis rendszer károsodása állhat. A hangulatzavarok hátterében feltételezhetően a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag UCN1 sejtek károsodása játszhat szerepet. A sejtkárosodás következményeinek vizsgálatára e neuronok szelektív, specifikus részleges irtását alkalmaztuk. Mivel a EWcp nem kizárólag urocortinerg sejtekből áll (*Zuniga et al., 2020*), a mag mechanikai vagy elektromos roncsolása az agyterület egyéb sejtjeit (*Zuniga et al., 2021*) is eliminálná, így ezzel a megközelítéssel az urocortinerg sejtek károsodásának következtében fellépő változások nem lennének vizsgálhatók. Az UCN1 idegsejtek szelektív ablációjának eléréséhez azt használtuk ki, hogy a sejteken kifejeződik a leptin-receptor, és ezért a leptin-konjugált saporin a neuronokhoz megkötődik, majd azokba receptor-mediált endocytosis révén szelektíven jut be. A saporin fehérjeszintézis gátlása útján károsítja a sejten belül végbemenő folyamatokat, ezzel végső soron a pusztulásokat okozva (*Xu et al., 2021*).

A kísérlet során 32 darab, 3 hónapos hím patkányon sztereotaxiás műtétet hajtottunk végre. 16 állatnál a leptin-konjugált saporin oldattal (#KIT-47, ATS INC, Carlsbad, CA, USA <https://atsbio.com/products/it47/>) szelektíven az UCN1 neuronokat irtottuk ki a centrális-projekciójú Edinger-Westphal területén, míg 16 patkányt kontrollként konjugátlan saporinnal injektáltunk. A műtétetekhez altatószerként intraperitonealisan adott ketamin (78 mg/kg, Richter, Budapest, Magyarország) és xylazin (13 mg/kg, Eurovet, Nagyatád, Magyarország) injekciót használtunk. A beavatkozás előtt a patkányok fejéről a szőrt leborotváltuk. Az állatok fejét sztereotaxiás eszközbe fogattuk, fejbőrüket sagittális irányban felvágtuk, majd a csontthártyát raspatoriummal finoman eltávolítottuk. Az így láthatóvá váló koponyavarratokat használtuk a tájékozódáshoz. A mag helyét a Paxinos-féle *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* atlasz alapján határoztuk meg (*Paxinos, 2007*). A calvaria megnyitásához fogászati fűrőt használtunk, mely segítségével egy nagyjából 3 mm átmérőjű lyukat fűrtünk. A Bregmától 1,5 mm-rel balra és 4,8 mm-rel caudalisan, a középvonallal 19° szöveget bezárva, a dura mater felszínétől 5,8 mm mélyre Hamilton-tűvel 0,08 µl leptin-konjugált saporint (n=16) vagy konjugátlan saporin (n=16) oldatot 30 másodperc alatt

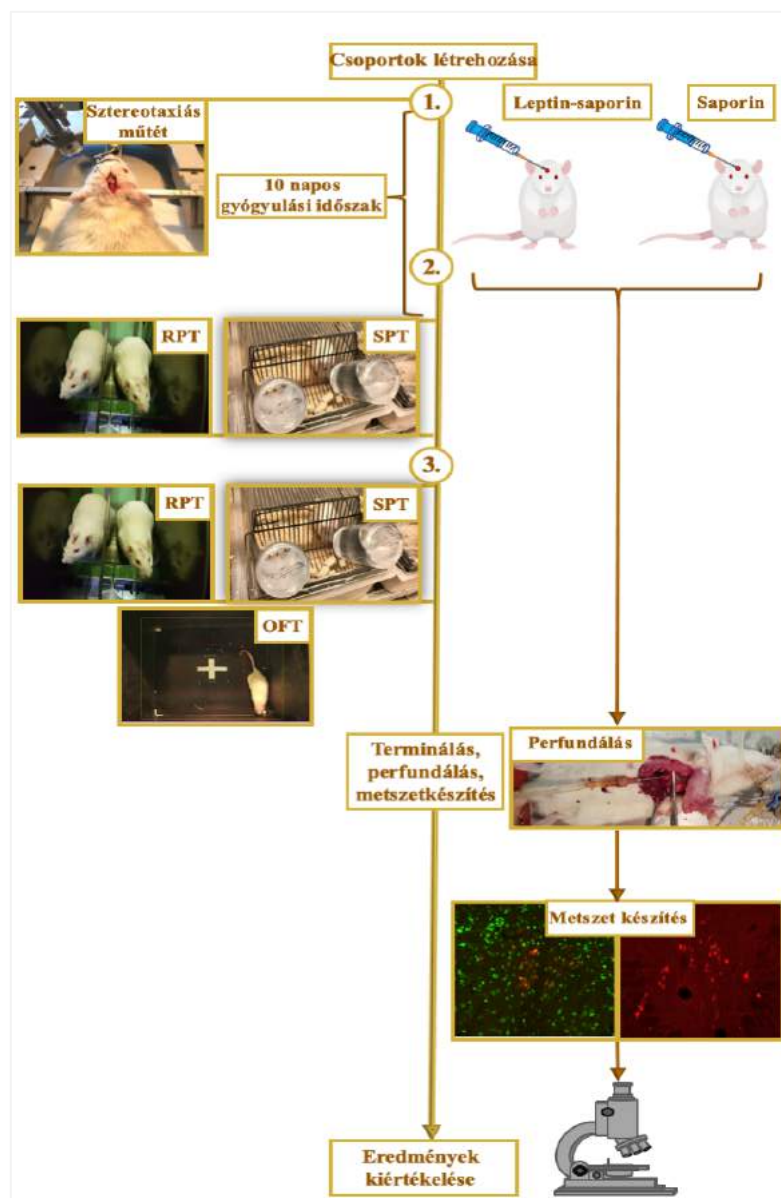
injektáltunk a EWcp területére. Újabb 30 másodperccel később 0,5 mm-rel húztuk vissza a tűt, ezután még 1 perc várakozás után távolítottuk el teljesen. Ezek után lokális fertőtlenítést követően a bőrszéleket egyszerű csomós öltésekkel egyesítettük. A beavatkozás teljes leírása elérhető a kutatócsoportunk más tagjai által korábban publikált tudományos folyóiratokban (*Xu et al., 2021; Füredi et al., 2017*) (10. ábra).



**10. ábra – A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag elhelyezkedése és a sztereotaxiás műtéttel történő ablációjának vázlatja.**

A EWcp helyét a piros kör jelzi, míg a Hamilton-tű szúrscatornájának útját a zöld szaggatott (felső kép) és zöld folytonos (kinagyított alsó kép) vonal jelöli. A mag elérését nehezíti, hogy középvonalú struktúra, így a vele egy verticalis tengelyen lévő struktúrákon – például sinus sagittalis superior – nem lehet áthaladni, ami miatt csak ferde szögben tudjuk elvégezni a behatolást (forrás: Paxinos, 2007).

Műtét után antibiotikum profilaxis mellett 10 napos gyógyulási időszak következett, ami után a rotenon kísérletben alkalmazott viselkedési teszteket végeztük el két alkalommal. Az elsőt a műtétet követő második héten, míg a kísérletek ismétlését a műtétet követő harmadik héten hajtottuk végre. Az állatok terminálása és a minták feldolgozása a műtétet követő harmadik hét végén történt (ld. alább). A kísérleti elrendezést a 11. ábra mutatja be részletesen.



11. ábra – A leptin-saporin kísérlet *in vivo* szakaszának sémás bemutatása. RPT: rotarod performance teszt, SPT: cukorpreferencia teszt, OFT: open field teszt. (Márton Zsombor Sándor, TDK hallgató ábrája)

A minták feldolgozása során derült ki, hogy 8 állatnál a leptin-konjugált saporin injekciós kezelés hatására 20%-nál kevesebb sejt pusztult el a EWcp területén. További 6 patkány esetében a beavatkozás során a szúracsatorna eltért a tervezett anatómiai lokalizációtól, a magon túl vagy előtt végződött, esetleg bevérzésből vagy a tú közvetlen roncsoló hatásából adódó fizikai károsodást találtunk. Ezeket az állatokat a további vizsgálatokból kizártuk, így csoportonként 9-9 patkányból nyert adatokon végeztük el a statisztikai analízist. A viselkedési tesztek közül a harmadik postoperatív héten végezték eredményeiből készítettünk statisztikát.

### 3.4 Viselkedési tesztek

#### 3.4.1 Rotarod teszt

A rotarod performance test (RPT) segítségével az állatok mozgáskoordinációját vizsgáltuk. A rotarod eszköz egy forgó hengerből, és ahhoz kapcsolódó számítógép által vezérelt motorból áll. A hengert kör alakú műanyag lemezek több részre osztják, így egyidőben akár 4 állat is vizsgálható, azok nem befolyásolják, vagy zavarják egymást (47750, Ugo Basile, Gemonio, Olaszország). A mozgó henger pályái alatt billenő tálcák vannak, amelyeket mikor a patkány leeséskor lenyom, egy, az állat felhelyezése során elindított stopper áll le, így határozva meg a hengeren eltöltött pontos időtartamot. Az állatoknak a méréseket megelőzően megtanítottuk, hogyan tudnak az eszközön mozogni, azon fennmaradni. A patkányok rotarodon töltött idejét két mérés átlagából számoltuk ki. Az állandó sebességen forgó hengeren töltött idő reprezentálja az állat fizikai állapotát, míg az időegységenként gyorsuló forgássebesség a motoros koordinációról ad információt. Kutatócsoportunk ez utóbbi beállítást használta. Az általunk használt beállítások mellett a sebesség 30 másodpercenként növekedett és a patkányok maximálisan 5 percet tolthettek fenn az eszközön. Minél hosszabb volt a mozgó hengeren eltöltött időtartam, annál jobb az adott állat mozgáskoordinációja (*Pritchett et al., 2003*) (12. ábra).

A rotenon modellben a 2-3. héten tanítottuk be az állatokat, majd a méréseket a 6. héten végeztük el. A leptin-saporin modellben a betanítás a műtét előtt zajlott, majd a műtét utáni 2. és 3. héten történtek a mérések.



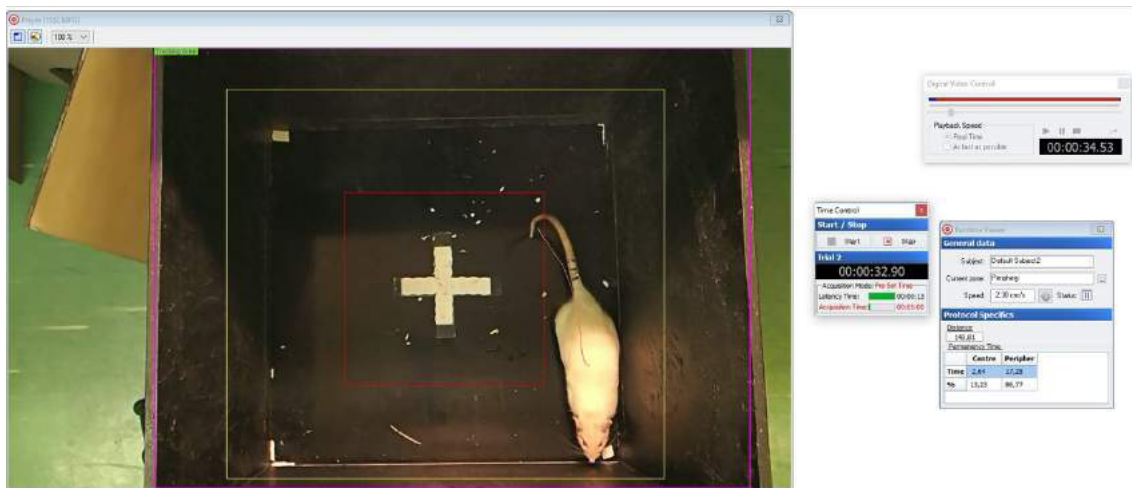
12. ábra – A rotarod performance teszt működés közben. (saját fénykép)



### 3.4.2 Open field teszt

Az open field teszt (OFT) segítségével az állatok motoros aktivitását és szorongási szintjét egyaránt meg tudjuk ítélni. A vizsgálat során az állatot egy homogén megvilágítású dobozba (50 x 50 x 25 cm) helyeztük, melynek alapja fekete-fehér négyzetekkel osztott területekkel centrális és fal melletti régióra van felosztva. A vizsgálat során minden patkányt egyesével helyeztünk be a dobozba, majd a doboz felett elhelyezett videokamera segítségével 5 percig videófelvételt készítettünk róla. A mérések között az állatok után az eszközt nedves és száraz törlőkendővel letisztítottuk. A felvételek kiértékelése *Smart Junior Tracking Programmal* (PanLab, Barcelona, Spanyolország) történt, ami az állat által megtett út hosszát és maximális sebességét, illetve a fal mellett eltöltött időtartamot számítja ki. Előbbi az állat motoros aktivitásáról ad információt, utóbbi a szorongás mértékét mutatja (*Valvassori et al., 2017*).

A rotenon modellben a hatodik hét, a neuronléziós kísérletből a harmadik hét méréseinek eredményein végeztük el a statisztikai analízist (13. ábra).



**13. ábra – Az open field teszt működése.**

A kép bal oldalán a készülő felvétel látható, míg jobb oldalon a kiértékelés *Smart Junior Tracking Software* segítségével. (Márton Zsombor Sándor, TDK hallgató fényképe)

### 3.4.3 Cukorpreferencia teszt

A cukorpreferencia teszt (SPT) az állatok anhedónia szintjére enged következtetni (*Liu et al., 2018*). A teszt előtti 48 órás időszakban a patkányokat megismertettük az édes ízzel, ketrecükbe a csapvíz mellé 1 m/m %-os szacharóz oldatot helyeztünk. A két itatósüveget 24 óra után megcseréltük, hogy a helypreferenciát megelőzzük. Ezt követően a SPT napjának reggelén megvontunk tőlük minden folyadékot, így a nap további

szakaszában szomjazásnak tettük ki az állatokat. A mérés idejére az állatokat egymástól elválasztva, egyesével helyeztük el a ketrecekben. Délután az egyik itatót 1 m/m %-os répacukoroldattal, a másikat csapvízzel töltöttük fel. Az üvegeket ezután a ketrecek tartóiba helyeztük és az állatokat 3 órára magukra hagytuk az aktív periódusuk kezdetekor. A 3 óra elteltével megmértük az oldatok fogyasztását és összehasonlítottuk a kísérlet kezdetén mért értékekkel. Az édes íz preferenciájának hiányából következtetni lehet az állat anhedónia szintjére. Az oldatok elfogyasztott mennyiségét a következő képlet segítségével analizáltuk: cukorpreferencia (%) =  $100 \times (\text{szacharóz oldat fogyasztott mennyiség} / \text{a teljes folyadék bevitel})$ . (Huang *et al.*, 2020) (14. ábra).

A rotenon modell SPT mérései közül az ötödik heti, míg a leptin-saporin modell esetében a harmadik heti mérés eredményei kerültek a statisztikába.



**14. ábra - Cukorpreferencia teszt elrendezés.**

*A vizet és a répacukoroldatot tartalmazó azonos méretű és alakú flakonok látszódnak. (saját fénykép)*

### **3.5 Mintaelőkészítés**

Az *in vivo* kísérletek végén a patkányokat 2 g/kg intraperitonealisan beadott uretán injekcióval (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) túlaltattuk, majd a mellüreget megnyitva hozzáférhetővé tettük a még dobogó szívet, és a felszálló aortába kanült vezetünk. A transzkardiális perfúzió 50 ml 0,1 M töménységű nátrium-foszfát pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS, pH: 7,4), majd 250 ml 4%-os paraformalin (Millonig pufferben) fixálószerrel történt.

Az állatok agyát eltávolítottuk és utófixálás céljából 4%-os formalinnal töltött csövekbe helyeztük, ahol a metszésig 4°C-on tároltuk. Mindkét mellékvesét és a thymust eltávolítottuk, majd tömegüket Sartorius precíziós mérleggel lemértük.

A morfometriai vizsgálatokhoz Leica VT1000 S vibratóm (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) segítségével a fixált agykból free floating technikával 30 µm-es coronális metszeteket készítettünk a chiasma opticum és a pedunculus cerebellaris medius közötti területekből, majd azokat rövid távon 0,01%-os nátrium-azidot tartalmazó PBS oldatban 4°C-on, hosszabb időre -20°C-on anti-freeze oldatban (1 l PBS + 600 ml etilén-glikol és 400 ml glicerol) tároltuk. A metszetekből 6 sorozatot gyűjtöttünk külön fiolákba helyezve.

A patkány sztereotaxiás atlasz (*Paxinos, 2007*) segítségével manuálisan válogattuk ki a vizsgálandó agyterületeket tartalmazó metszeteket a további szövettani vizsgálatok elvégzéséhez. Ezeknek a területeknek a koordinátáit az alábbi táblázat (1. táblázat) foglalja össze.

<b>Agyterület</b>	<b>A kiválasztott coronalis síkok Bregmától mért távolsága</b>
substantia nigra pars compacta	-5.16mm – (-6.24mm)
centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag	-5.88mm – (-6.72mm)
nucleus caudatus-putamen	-0.36mm – (-0.84mm)
ventralis tegmentalis area	-5.16mm – (-6.24mm)
nucleus raphe dorsalis	-6,96mm – (-7.32mm)
nucleus raphe medianus	-7.20mm – (-7.80mm)
locus coeruleus és A5 régió	-9.60mm – (-10,08mm)

*1. táblázat – A szövettani vizsgálatok során elemzett agyterületek koordinátái a Paxinos és Watson-féle sztereotaxiás patkány agy atlasz szerint (Paxinos, 2007)*

### **3.6 Szövettani módszerek**

#### **3.6.1 Dopaminerg sejtek diamino-benzidin jelölése**

A tirozin-hidroxiláz (TH) enzim által katalizált reakció a dopamintermelés sebességmeghatározó lépése. Az enzim a dopamintermelő idegsejtekben nagy mennyiségben fejeződik ki, ezért az enzim megfelelő marker a dopaminerg sejtek

vizsgálatához. A SNpc dopaminerg sejtjeinek vizsgálata a rotenon modell validitásának szövettani alátámasztásához szükséges.

Első lépésként 6x10 percig 0,1 M-os PBS-ben mostuk a kiválogatott metszeteket, ezzel eltávolítva az esetlegesen visszamaradt anti-freeze oldatot és fixálószeret. Ezt követően 30 percig 0,5%-os Triton X-100 detergenssel kezeltük a metszeteket, hogy az antitestek könnyebben penetráljanak a szövetekbe. A nem-specifikus kötőhelyek gátlásához 2%-os normál kecske szérumot (NGS, Jackson Immunoresearch, Europe Ltd. Suffolk, Egyesült Királyság) használtunk 60 percig, majd a metszeteinket 1:4000 hígítású nyúlból származó anti-TH antitest (Abcam, ab112) oldatában 16 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket 60 percre biotinilált kecske anti-nyúl gammaglobulinnal (1:200, Vectastain ABC Elite Kit, Vector Lbs. Burlingame, CA, Egyesült Államok) kezeltük. 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket 60 percre torma-peroxidáz enzimmel konjugált avidin-biotin komplexszel (Vectastain ABC Elite Kit, Vector) inkubáltuk. Újabb 2x15 perces PBS öblítést követően az immunreakciót 0.02%-os 3,3' diamino-benzidin (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok) kromogént és 0.00003 v/v% hidrogén-peroxidot tartalmazó Tris puffer (pH:7,4) oldattal kezeltük. A folyamat ellenőrzése szemkontroll alatt fénymikroszkóppal történt. A reakciót 7 perc elteltével PBS oldattal leállítottuk. A metszeteket felszálló alkoholsorban dehidráltuk, 2x10 percig xilolban derítettük, végezetül DePeX (Fluka Analytical, Németország) médiummal lefedtük. A diamino-benzidin jelöléssel festett metszeteken sejtszámolást végeztünk.

### **3.6.2 Immunfluoreszcens jelölések**

Metszeteinken kvalitatív és szemikvantitatív morfológiai és morfometriai analízist is végeztünk. A sejtszámoláson túl a neuronok és gliasejtek alakját, valamint a bennük termelődött különböző fehérjék specifikus jelendezítését (SSD) is meg tudtuk határozni. Egy metszeten egyidőben többféle primer antitest és eltérő emissziós spektrumú fluorofórokkal konjugált szekunder antitestek alkalmazásával többféle antigént is láthatóvá tudunk tenni. Ebben az alfejezetben az egyes modellekben használt többes jelölési kombinációkat foglalom össze táblázatos formában (2. táblázat). Az egyes festések további technikai részletei a függelékben található táblázatban olvasható, ezért az ott található részletek leírásától ehelyütt eltekintünk (antitest táblázat ld. Függelék).

Metszeteinket 4x15 percig PBS-ben mostuk, majd 10 percig 90 °C-on nátrium-citrát pufferben (pH=6,0) feltártuk, 2x15 percig PBS-ben öblítettük, majd 0,5%-os Triton X-100 detergens kezelés következett. A nem-specifikus kötőhelyek gátlására ebben az esetben 2%-os normál szamar szérumot használtunk (NDS, Jackson) 60 percig. A metszeteket a primer antitesteket tartalmazó oldatban (antitest táblázat ld. Függelék/ 2. táblázat) a kettős jelölések esetén 16 órán keresztül, szobahőmérsékleten, hármas jelöléseknél 48 órán át, 4°C-on inkubáltuk. 2x15 perc PBS-mosás után fluorofór-konjugált és/vagy biotinilált szekunder antitesteket tartalmazó PBS oldatba helyeztük a metszeteket kettős jelölések esetén 3 órára, míg hármas jelölések esetén 16 órára. A biotinnal jelölt szekunder antitestek detektálására streptavidin konjugált fluoreszcens festéket alkalmaztunk. Végül 2x15 perc PBS mosás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk, szobahőn szárítottuk, majd a PBS és glicerin egyenlő arányú keverékével fedtünk.

	<b>Immunfluoreszcens jelölési kombinációk</b>	<b>Jelölt agyterületek</b>
<b>Rotenon modell</b>	IBA1 (nyúl) – TH (egér)	SN, VTA, LC, A5
	IBA1 (nyúl) – 5HT (egér)	DR, MNR
	NeuN (egér) – TH (nyúl)	CPu
	UCN1 (kecske) – IBA1 (nyúl) – GFAP (egér)	EWcp
	UCN1 (kecske) – alpha-synuclein (egér) – TH (nyúl)	
	IBA1 (kecske) – CD68 (nyúl)	
	TNFalpha (nyúl) – GFAP (egér) – IBA1 (kecske)	SNpc
	iNOS (nyúl) – GFAP (egér) – IBA1 (kecske)	
<b>Leptin-saporin modell</b>	UCN1 (nyúl) – GFAP (egér) – IBA1 (kecske)	EWcp
	UCN1 (kecske) – caspase 3 (nyúl)	
	UCN1 (kecske) – NeuN (egér)	
	TH (egér) – caspase 3 (nyúl)	SNpc
	GFAP (egér) – IBA1 (kecske)	

*2. táblázat – A többes immunfluoreszcens festések antitest kombinációt összefoglaló táblázat*

### 3.6.3 Immunfluoreszcens jelölés RNAscope® *in situ* hibridizációval kombinálva

Az RNAscope® technika egy *in situ* hibridizációs vizsgálati módszer, mely a transzkriptumokat nagy érzékenységgel mutatja ki a bázispárosodás elvén alapuló specifikus probe-ok és a hozzájuk kapcsolt fluorofórok segítségével, a nem-specifikus kötődésekből adódó háttérzaj nélkül. A technika részletes leírása elérhető a vegyszerrendszert forgalmazó cég honlapján a <https://acdbio.com> URL alatt (ACD, Advanced Cell Diagnostics Inc.) közzétett protokollban. A módszert a fenti linken található leírás szerint, paraffinba ágyazott szövetmintákból készült 5µm vastag metszetek vizsgálatára optimalizálták. Kutatócsoportunk a PTE-ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet munkatársaival közösen kidolgozott egy olyan módosított protokollt, melyben optimalizáltuk a technikát 30µm vastag metszetekre (Nemes *et al.*, 2021). Tekintettel a PhD értekezés terjedelmi korlátaira, a jelölés részletes technikai leírásától itt eltekintünk és utalunk a publikált protokollokra (<https://acdbio.com>, és Nemes *et al.*, 2021).

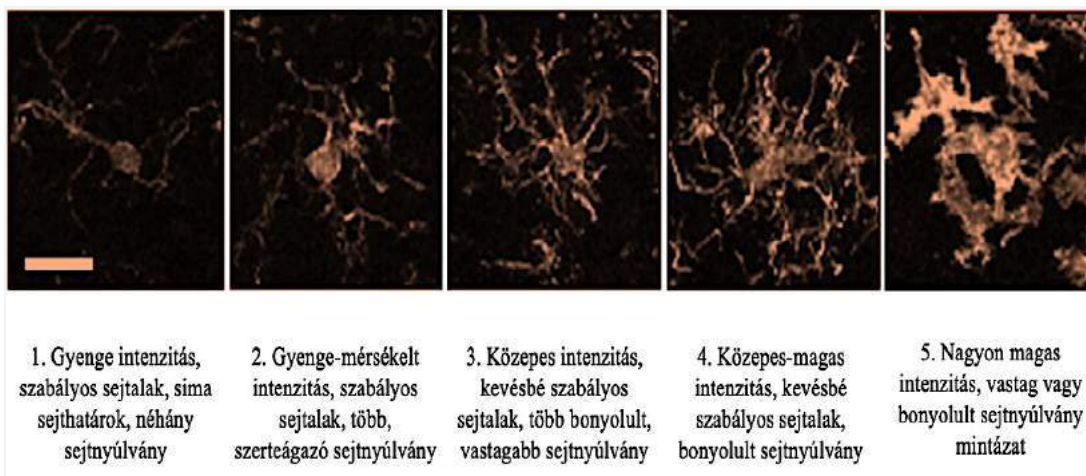
A jelöléshez a rotenon modellben toxinnal kezelt és kontroll állatokból egyenként 4-4 EWcp-t tartalmazó reprezentatív területet válogattunk ki és Superfrost ultra plus lemezekre húztuk. Az eljárás során oligonukleotid Z próbákat juttattunk a szövetbe, ahol azok specifikusan kötődtek az *Ucn1* mRNS-ekhez. A hibridizáció után jelamplifikáció következett, és a jelet Cy5 fluorofór segítségével detektáltuk. Véletlenszerűen válogatott EWcp metszeteket triplex pozitív kontroll probe-okkal (320891) vagy triplex negatív kontroll probe-okkal (320871) is hibridizáltattuk. A jelamplifikáció után a pozitív kontrollok jól detektálható jelet adtak, míg a negatív kontrollok esetén fluoreszcencia nem volt látható.

Ezt követően az előző pontban leírt módon kettős immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk kecske anti-UCN1 és nyúl anti-IBA1 antitestekkel 48 órán át tartó 4°C-on történő inkubáció alatt. Mosás után 3 órára Alexa 488 fluorofórral konjugált szamár anti-kecske és Cy3 fluorofórral kötött szamár anti-nyúl szérumba helyeztük a metszeteket, majd ezt követően diamidino-fenilindol (DAPI) magfestést alkalmaztunk, majd a metszeteket anti-fade médiummal fedtük.

### 3.7 Metszetek digitalizálása és morfológia

A DAB jelölt metszetek digitalizálásához az Anatómiai Intézet Nikon Microphot FXA fénymikroszkópját és Nikon Spot RT digitális kameráját használtuk. 1600\*1200 pixel felbontású képeket készítettünk, és a SNpc területén a TH pozitív sejtek számolása manuálisan történt ImageJ szoftver használatával, állatonként 4-5 felvételen.

A fluoreszcensen jelölt metszetek vizsgálatához a PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézetében található Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot vettük igénybe. A konfokális apertúra 80  $\mu\text{m}$ -re volt állítva, 20x (NA:0.5), 40x (NA:0.8) és 60x (NA:1.49 oil) objektíveket használtunk. A képek 1024\*1024 pixeles felbontásban kerültek mentésre. A használt fluorofórok gerjesztéséhez különböző hullámhosszú lézereket (DAPI = 405 nm, Alexa 488 = 488 nm, Cy3 = 550 nm, Cy5 és Alexa 647 = 647 nm) használtunk, és a gyártók által megadott emissziós maximumon (DAPI = 405 nm, Alexa 488 = 525 nm, Cy3 = 570 nm, Cy5 és Alexa 647 = 665 nm) regisztráltuk a jeleket. Kék (DAPI), piros (Cy3), zöld (Alexa 488) és fehér (Cy5 valamint Alexa 647) virtuális színeket használtunk. A mikroszkóp szoftverének segítségével minden csatornáról külön képet, illetve egyesített felvételt is készítettünk. Állatonként és agyterületenként 4-6 reprezentatív felvétel készült. A nem-szerkesztett képek kiértékeléséhez ebben az esetben is ImageJ programot használtunk. Kvantitatív eljárásokkal az egyes agyterületeken a sejtek, axon terminálisok vagy az mRNS transzkriptumok sejttagonkénti számát határoztuk meg. A SNpc dopaminerg neuronjait 6 darab egymástól 180  $\mu\text{m}$ -re elhelyezkedő reprezentatív metszési síkban számoltuk meg és a sejtszámok összegét adtuk meg. Egyes neuronok esetében a sejt méretet is meghatároztuk ImageJ szoftver segítségével történt területmérések útján. Az astrocyta és microglia aktivitást a gliasejtek morfológiájának értékelésére alkalmazott pontrendszer szerint értékeltük (*Harrison et al., 2019*), melynek részleteit a 15. ábra tartalmazza. Az immunjel erősségének mérése útján egyes esetekben meghatároztuk a specifikus jel denzitást, ami a citoplazmában jelenlévő jel és a háttérdenzitás ImageJ szoftverrel lemért értékek különbségeként adható meg. A módszer az antigének szemi-quantitatív mennyiségi meghatározására ad lehetőséget sejt szinten. A reprezentatív képeket publikációs és prezentációs célokra Adobe Photoshop szoftver használatával szerkesztettük.



**15. ábra - A reaktív gliózis pontozási rendszere (részlet).**

*Az IBA1 pozitív microgliákat érintő reaktív gliózis súlyossági fokozatainak meghatározására alkalmazott skála. A rendszer az IBA1 relatív mennyisége mellett figyelembe veszi a sejtek morfológiában bekövetkezett változásait is, amelyek legalább annyira fontos elemei a reaktív gliózis stádium besorolásában, mint a fluoreszcens intenzitás (forrás: Harrison et al., 2019).*

### 3.8 Statisztikai analízis

A viselkedési tesztek kiértékelése és a morfometria során kapott adatokból csoportátlagot, valamint standard hibát számoltunk. A viselkedési tesztek során mért abszolút értékeket nem tüntettük fel az ábrákon, ehelyett az eredményeket Z-score-ra számoltuk át a  $Z=(X-\mu)/\sigma$  képlet segítségével, ahol az X az állatok egyenkénti nyers adatait, a  $\mu$  a kontroll csoport átlagát, a  $\sigma$  pedig a standard deviációt jelöli (Guilloux et al., 2011). Az eredményeket ebben a formában ábrázoltuk. A 2-sigma tartományon túli adatokat kizártuk a további vizsgálatokból. A csoportok közötti összehasonlítást kétmintás Student-féle t-próbával végeztük, ahol az adatok normál eloszlást mutattak. Amennyiben az adatok nem mutattak normál eloszlást, Mann-Whitney-féle U-próbát alkalmaztunk. Spearman-féle korreláció analízist is végeztünk az egyes változók közti összefüggések keresésére. A statisztikai értékelést Statistica 8.0. szoftverrel végeztük, ahol minden esetben az  $\alpha = 5\%$  volt.



## 4. Eredmények

### 4.1 A szisztémás rotenon kezelés a Parkinson-kórhoz hasonló állapotot okozó patkányban, mely motoros és nem-motoros tünetekben is megnyilvánul

#### 4.1.1 A viselkedési tesztek eredményei a rotenon modellben

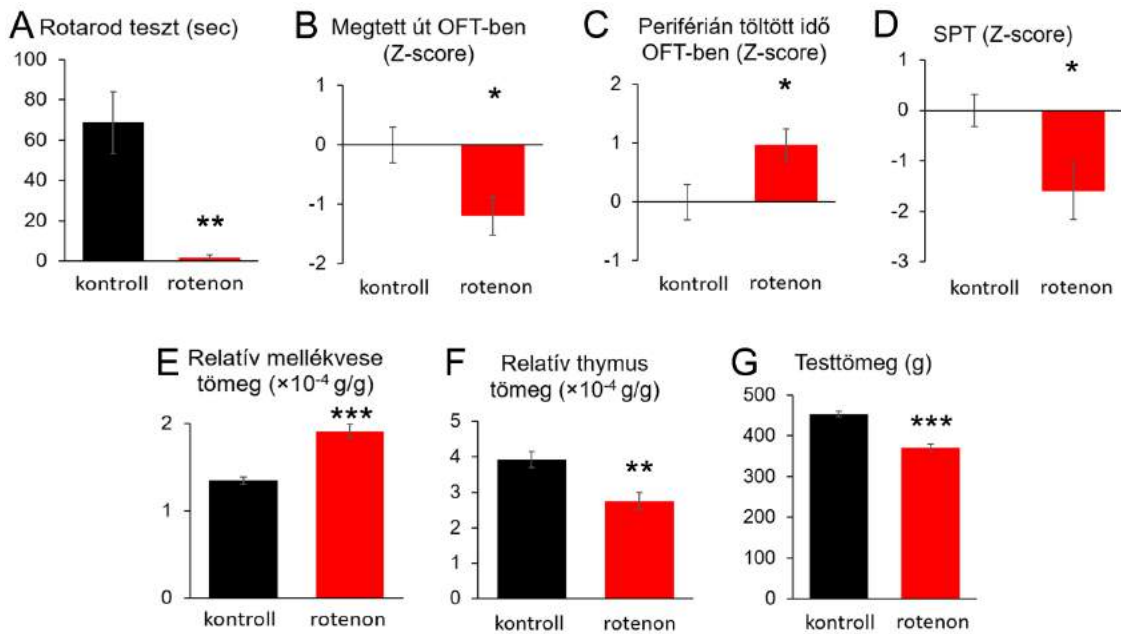
A szisztémás rotenon kezelés utolsó hetében végeztük el a rotarod tesztet, két nappal az állatok terminálása előtt. A mérés előtti szoktatás alkalmával is már jelentős mozgásbéli különbségek látszottak a két csoport állatai között. A kontroll csoport tagjai könnyebben és gyorsabban megtanulták, hogyan maradjanak fent a gyorsuló hengeren, míg a rotenon kezelt csoport tagjainak - akiknek a mozgáskoordinációs eltérések már a ketrecben látszottak - ez nehézséget okozott. A mérés alkalmával a kontroll állatok átlagosan  $68,83 \pm 15,37$  másodpercig tudtak a szerkezeten maradni, míg a másik csoport átlagosan  $1,75 \pm 1,25$  másodpercig. A két kísérleti csoport közötti eltérés igen jelentős volt és kifejezett motoros hanyatlást mutatott a rotenon injekciót kapó csoportban (16. ábra A panel) ( $p=0,002$ ).

Az open field teszt során több szempont szerint összehasonlítottuk a két csoport mozgását, de különös figyelmet fordítottunk a megtett útra és az eszköz falai mellett eltöltött idő arányára. Az open field teszt eredményei is alátámasztották a mozgási képességek közötti különbséget. A rotenon kezelt csoport egyedei átlagosan  $89,5 \pm 15,3$  másodpercig voltak mozdulatlanok, ami szignifikáns különbséget mutat a kontroll csoport állatainak átlagosan  $59,3 \pm 10,7$  másodpercig tartó immobilitási idejéhez képest (16. ábra B panel) ( $p=0,01$ ). Az OFT alapján az is kiderült, hogy az oldószerrel kezelt csoport egyedei átlagosan  $236 \pm 20,5$  másodpercet töltöttek a fal mellett, míg a rotenon kezelésén átesett társaiknál ez az idő elérte a  $285 \pm 6,2$  másodpercet, ami 21%-os növekedést jelentett. Ez szignifikánsan megnövekedett szorongási szintre enged következtetni a rotenon hatására (16. ábra C panel) ( $p=0,027$ ).

A cukorpreferencia teszt eredményei szerint a rotenonnal kezelt csoport állatainak édes íz iránti preferenciája  $65,8\% \pm 28,4\%$  volt, ami szignifikánsan elmaradt a kontroll csoport egyedeinek  $87,2\% \pm 12\%$  értékétől. Ezen adatokból arra tudunk következtetni, hogy megnövekedett az anhedónia szintje a rotenon kezelés hatására (16. ábra D panel) ( $p=0,029$ ).

#### 4.1.2 Szervtömegmérések eredményei a rotenon modellben

Közvetlenül az állatok leölése előtt is regisztráltuk testtömegüket. Eredményeink alapján a kontroll csoportnál átlagosan  $453,3 \pm 24,3$  g testtömeget mértünk, amelytől jelentősen elmaradt a rotenonnal kezelt csoport átlagos  $370,8 \pm 36,7$  g értéke (16. ábra G panel) ( $p=0,000005$ ). A terminálást követően a patkányokat perfundáltuk és a frissen preparált mindkét oldali mellékvesét, illetve a csecsemőmirigyet precíziós mérleggel lemértük. A mellékvesék testtömeghez viszonyított relatív tömege 31%-kal nagyobb volt a rotenonnal kezelt csoportban, ami szignifikáns eltérést mutat (16. ábra E panel) ( $p=0,0003$ ). Ezzel az értékkel egyezést mutat a 26%-kal csökkent relatív thymus tömeg (16. ábra F panel) ( $p=0,008$ ). Ezek az eredmények a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely (HPA) krónikus aktiválódására utalnak.



16. ábra - Viselkedési tesztek és a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely (HPA) működésére utaló paraméterek eredményei a rotenon modellben.

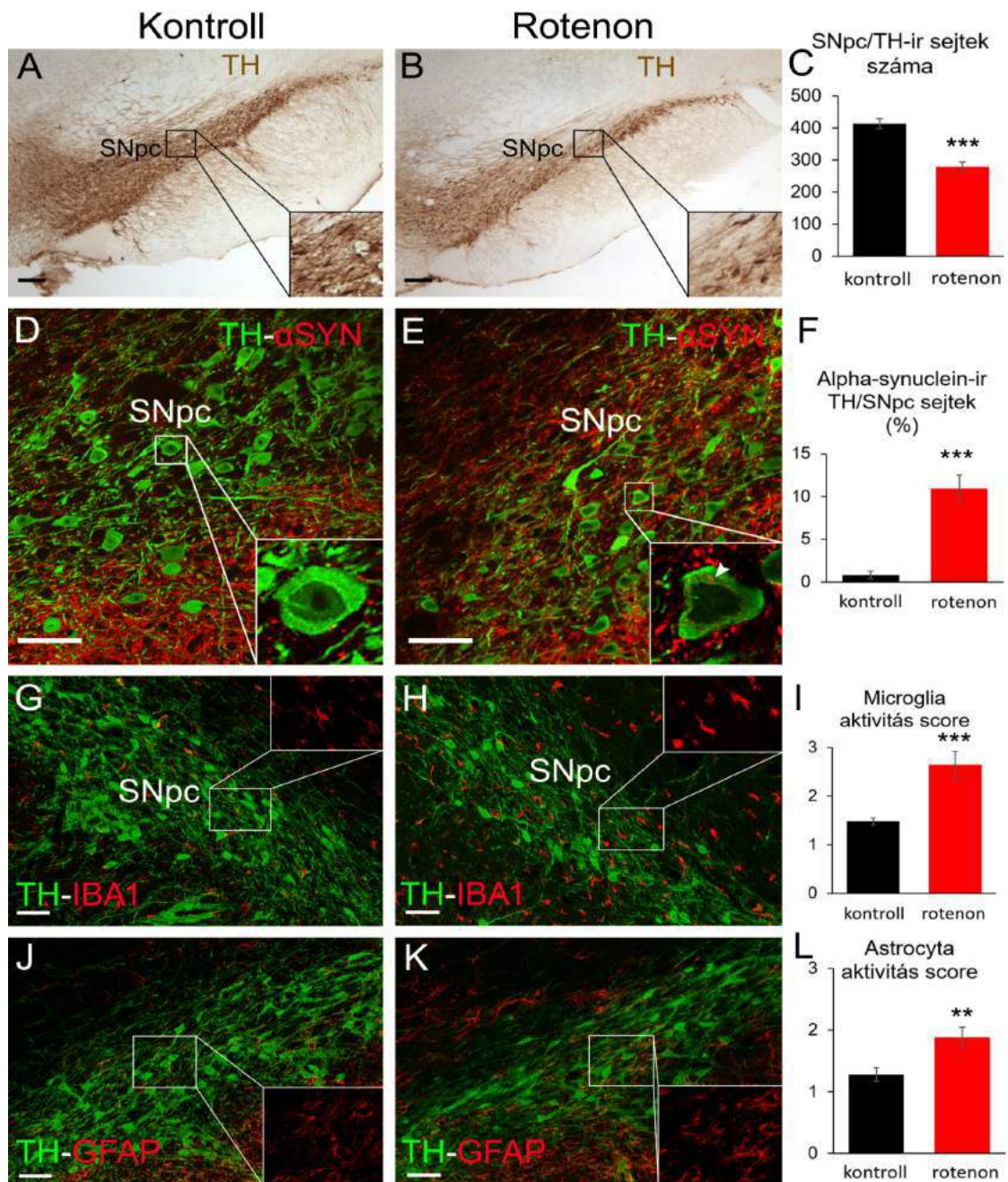
A rotarod tesztben (A) a rotenon kezelt állatok (piros oszlop) nem voltak képesek fennmaradni a forgó tengelyen, bizonyítva a mozgáskoordináció zavarát. Az open field teszt (OFT) során a rotenon kezelt csoportban csökkent a mozgási aktivitás (B), mely a hypokinesisnek feleltethető meg. Ugyanebben a tesztben (C) a rotenon kezelt állatok több időt töltöttek az eszköz centrális területe helyett a fal mellett, mely emelkedett szorongási szintre utal. A cukorpreferencia teszt (SPT) során a rotenon kezelt csoport kevesebb cukros vizet fogyasztott, mely az állatok anhedónia szintjének emelkedésére utal (D). Rotenon kezelést követően az állatok relatív mellékvese tömege megnőtt (E), míg a testtömegre vonatkoztatott csecsemőmirigy tömeg csökkent (F). A testtömeg csökkenése a rotenon kezelt csoportban szintén megfigyelhető volt (G), mely szintén a HPA tengely aktivációjára utal a rotenon kezelt állatoknál.

## **4.2 A szisztémás rotenon kezelés hatására a substantia nigra dopaminerg sejtjei mellett az Edinger-Westphal mag peptiderg neuronjai is károsodnak**

### **4.2.1 A substantia nigra és a striatum változásai a rotenon modellben**

A modell szövettani validitásának bizonyításához a substantia nigrát tartalmazó metszeteken először a tirozin-hidroxiláz enzimet tettük láthatóvá a dopamin tartalmú sejtokban DAB jelölés segítségével. Mindkét csoportban állatonként 6 különböző metszeten számolt sejtek összegének az átlagát hasonlítottuk össze egymással. A rotenon kezelt egyedekben átlagosan  $290 \pm 37$  db sejtet számoltunk, ami szignifikánsan kevesebb, mint a kontroll csoport patkányaiban regisztrált  $413 \pm 33$  db (17. ábra A-C) ( $p=0,0002$ ). A rotenon hatására bekövetkezett 32,4%-os sejtszám csökkenés alátámasztja a modellben elvárt neurodegeneráció megjelenését.

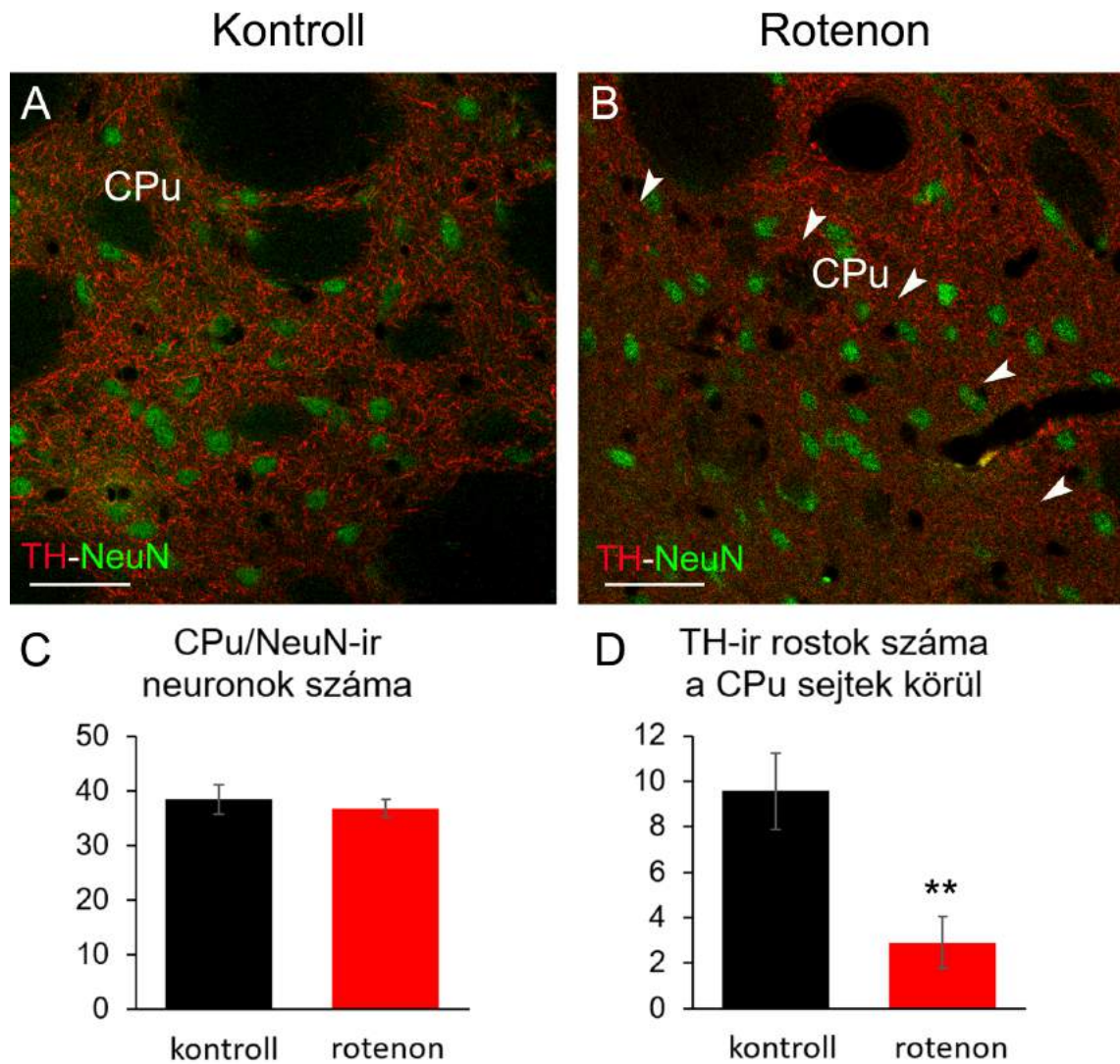
Mivel a kórfolyamatra jellemző intracytoplasmikus alpha-synuclein tartalmú zárványok ezzel a jelöléssel nem mutathatók ki, következő lépésként kettős immunfluoreszcens módszerrel kvantitatív és kvalitatív vizsgálatokat végeztünk. A rotenon kezelés hatására a SNpc/TH neuronjaiban az összes neuronra vonatkoztatva arányosan jelentősen több intracytoplasmaticus zárványt találtunk ( $10,96\% \pm 1,58\%$ ), mint a kontroll csoportban ( $0,82 \pm 0,42\%$ ), ami a modell validitásához szükséges második kritériumot is teljesíti. A különbség a két csoport között szignifikánsnak bizonyult (17. ábra D-F) ( $p=0,00005$ ). A sejtpusztulással egy időben zajló gliasejt válasz felderítése céljából microglia és astrocyta jelölést végeztünk. A microgliák nyúlványai rövidebbek, vastagabbak, kevésbé elágazók voltak, sejttestük mérete, aránya az egész sejt méretéhez képest megnőtt. Hasonlóan ehhez, az astrocyták is aktivációt mutattak, mely a GFAP jelölés intenzitásának szemmel látható növekedésében, az astrocyta nyúlványok megvastagodásában, gazdagabb elágazódásában és a sejttestek méretének növekedésében nyilvánult meg. A gliasejtek morfológiai jegyei alapján felállított pontrendszer szerint az IBA1 jelölés szerint (*Harrison et al., 2019*) jelentősen magasabb microglia- (17. ábra G-I) ( $p=0,0008$ ), míg a GFAP alapján megnövekedett astrocyta aktivitást láttunk (17. ábra J-L) ( $p=0,008$ ) a rotenon kezelés hatására.



**17. ábra - Szöveti elváltozások a substantia nigra pars compacta (SNpc) területén a rotenon modellben.**

Tirozin-hidroxiláz (TH) immunfestés barna diamino-benzidin kromogénnel a substantia nigra pars compacta (SNpc) területén: kontroll (A) és rotenon kezelt (B) állatból származó reprezentatív SNpc metszet kicsinyítési fotói. Rotenon hatására (piros oszlopok) csökkent a TH-immunreaktív (-ir) sejtek száma (C). A TH (zöld) – alpha-synuclein ( $\alpha$ SYN) (vörös) kettős jelölés (D, E) mutatja, hogy a rotenon kezelés hatására  $\alpha$ SYN-ir zárványok (nyílhegy, E) jelennek meg az SNpc TH-ir sejtjeiben (F). A terület károsodását alátámasztja a TH (zöld) - ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (vörös) kettős jelölés (G, H), ahol a kinagyított részleteken kivehető az aktivált microgliákra jellemző morfológia a rotenon kezelt csoportban (I). TH (zöld) – glial fibrillary acidic protein (GFAP) (vörös) kettős jelölés (J, K) mutatja, hogy astrocyta aktiváció is kialakult rotenon kezelés után (L). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  a Student-féle  $t$  tesztnél, illetve a Mann-Whitney-féle  $U$  tesztnél. Lépték: A, B: 200  $\mu$ m, D-K: 50  $\mu$ m.

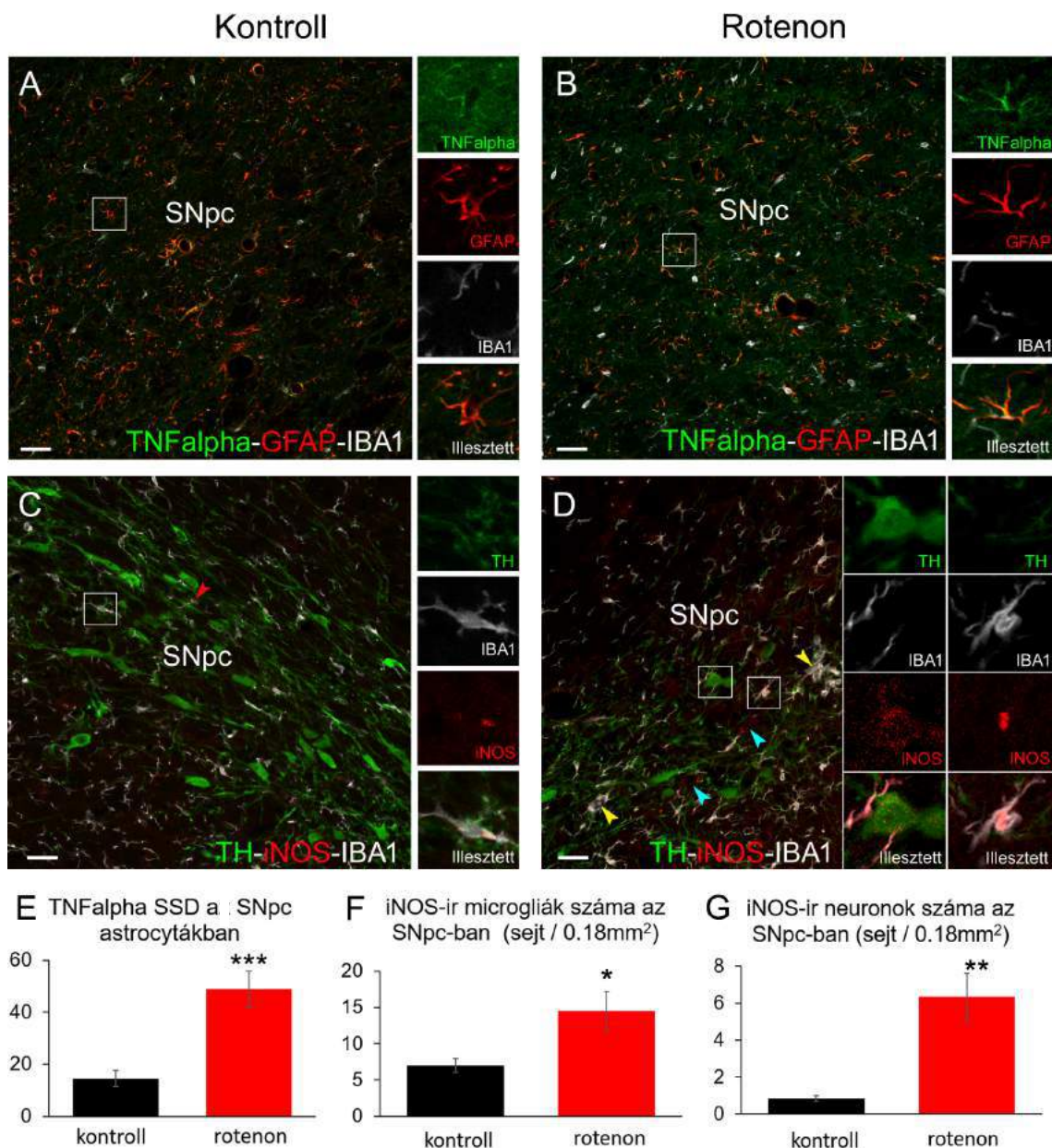
A SNpc/TH sejtszámcsökkenés hatását a striatumban, a SNpc projekciós területén is megvizsgáltuk. A TH-ir axonok száma diffúzan 69%-os csökkenést mutatott a nucleus caudatus-putamen (CPu) sejtjei körül ( $p=0,003$ ), valamint a striatum TH-ir rostjai bizonyos esetekben fokálisan teljesen eltűntek rotenon kezelés hatására az ott található NeuN immunpozitív neuronok körül. A CPu területén a rotenon hatására nem történt neuronpusztulás (18. ábra A-D) ( $p=0,57$ ).



**18. ábra - Tirozin-hidroxiláz (TH) tartalmú rostok károsodása a striatum (CPu) területén.**

Rotenon kezelés hatására (piros oszlop, D) a TH tartalmú rostok (piros, B) sűrűsége diffúzan csökken a striatum területén, az ott elhelyezkedő NeuN immunreaktív (zöld) neuronok körül, a kontrollhoz képest (A). Esetenként, fokálisan, a TH rostok gyakorlatilag eltűntek (D panel függőleges tengely). A fehér nyílhegyek egy ilyen terület határát jelölik. Rotenon kezelés hatására az idegsejtek száma nem változott a CPu területén (C).  $**p<0,01$  a Student-féle  $t$  tesztnél. Lépték:  $50\ \mu\text{m}$ .

További vizsgálataink kimutatták, hogy rotenon kezelés következtében a SNpc területén a kialakult oxidatív stressz miatt az astrocytákban megnövekedett az egyik fő proinflammatorikus citokin, a TNFalpha szintje (19. ábra A, B, E) ( $p=0,00006$ ). A microgliákban (19. ábra C, D, F) ( $p=0,025$ ) és a neuronokban (19. ábra C, D, G) ( $p=0,0016$ ) megnövekedett iNOS immunjel szintén a szabadgyökképződést támasztja alá.



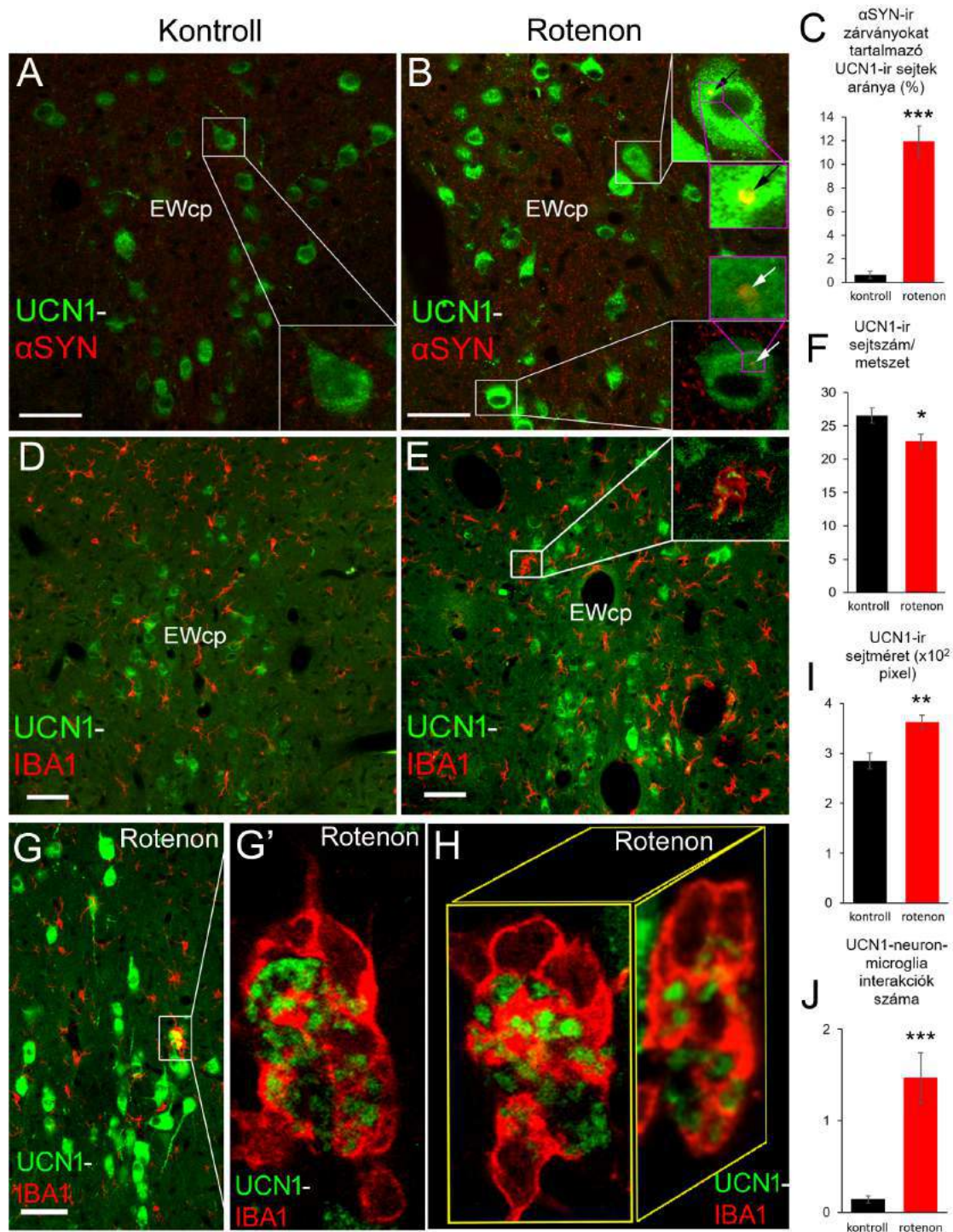
**19. ábra - A gyulladós folyamat és az oxidatív stressz a rotenon modellben.**

A kontroll csoporttal (A) összehasonlítva, rotenon hatására (B) a GFAP (vörös) immunreaktív astrocytákban egy proinflammatorikus citokin, a TNFalpha (zöld) nagyobb specifikus jelenítést (SSD) mutatott (E). Az ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunreaktív (IBA1-ir) microgliákban (fehér) a TNFalpha nem volt kimutatható. Ezzel ellentétben, az oxidatív stressz markereként ismert indukálható nitrogén-oxid szintáz (iNOS) immunjel (vörös, C és D) erősebb volt a rotenon kezelt állatokban detektálható microgliákban (F), különösen a rotenon kezelt állatokban megfigyelt, sárga nyílhegygel jelölt microglia csoportosulások (D) esetében. A kontroll csoportban a microgliák csak elvétve mutattak iNOS pozitivitást (piros nyíl és képzetét a C panelben). Rotenon kezelt állatokban gyenge iNOS immunjel volt megfigyelhető a substantia nigra pars compacta (SNpc) idegsejtjeiben is (kék nyilak és G), melyek esetenként TH pozitívak (zöld) voltak (ld. nagy nagyítású képzetét a fehér négyzetben látható sejtről a D panelben). \*\*\* $p < 0,001$  \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  a Student-féle  $t$  teszben. Lépték: 50  $\mu$ m.

#### 4.2.2 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtjeinek változásai a rotenon modellben

Alaphipotézisünket, miszerint a EWcp/UCN1 neuronok károsodnak a Parkinson-kór modelljében, alátámasztja, hogy a EWcp/UCN1 sejtjeinek számolása során hasonló arányú sejtszámcsökkenést találtunk a toxinnal kezelt állatokban a kontrollokhöz képest, mint a SNpc-ban. A kontroll csoport állataiból készült metszetekben átlagosan  $26,55 \pm 2,75$  db neuront számoltunk, míg a rotenon kezelt állatok metszetein ez a szám átlagosan  $21,72 \pm 1,88$  db volt, ami szignifikáns különbséget jelent (20. ábra A, B, F vs. korábbi ábra C) ( $p=0,019$ ). A vizsgálat során szembetűnő volt, hogy a rotenon kezelt patkányokból származó metszeteken az EWcp urocortinerg sejtjei a normális multipoláris neuronmorfológiától eltérően néztek ki. Az itt található UCN1-ir idegsejtek puffadtabbak voltak, valamint egy részüknél a citoplazma szabálytalanná vált, sejtésztesés jeleit mutatták. A sejtek keresztmetszeti területének meghatározása megerősítette megfigyelésünket: rotenon kezelés hatására az urocortinerg sejtek nagyobbak bizonyultak (20. ábra A, B, I) ( $p=0,0019$ ). A csökkent sejtszám melletti másik hasonlóság a SNpc-ban találtakkal, hogy rotenon kezelés hatására a EWcp/UCN1 neuronjainak  $11,94 \pm 1,28$  %-ában alpha-synuclein tartalmú zárványokat fedeztünk fel, mely szignifikánsan több ( $p < 10^{-6}$ ) a kontroll csoportban elvétele ( $0,62 \pm 0,33\%$ ) megfigyeltnél (20. ábra A, B, C). IBA1 jelölést alkalmazva derült fény arra, hogy a rotenon kezelt csoportban megfigyelt szabálytalan alakú UCN1-ir neuronokat és a belőlük származó sejttermelékeket reaktív microgliák takarították el. A kontroll csoporthoz képest közel 10-szer több neuronokat megközelítő microglia nyúlványt (IBA1-UCN1-ir interakció) számoltunk a toxinnal kezelt patkányoknál (20. ábra D, E, G, G', H) ( $p=0,0004$ ). Míg a kontroll csoport metszeteinél phagocytáló microgliát gyakorlatilag nem láttunk (átlagosan  $0,14 \pm 0,1$ /metszet), addig a rotenon kezelt csoportból készült metszeteken gyakran láttunk ilyen jelenséget ( $1,61 \pm 0,41$ /metszet, 20. ábra G, G', H). A konfokális mikroszkóp 3D-s képalkotási lehetőségének köszönhetően Z-stack rekonstrukciókat tudtunk az interakciókról készíteni, ezzel is bizonyítva, hogy a rotenon kezelés hatására integritásukat veszített EWcp/UCN1-ir sejteket valóban phagocytálták a reaktív microgliák (20. ábra G', H). A jelenségről készült videóanimációkat a jelen disszertáció alapját képező közlemény kiegészítéseként publikáltuk, és elérhető az alábbi webhelyen: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-022-02399-w>

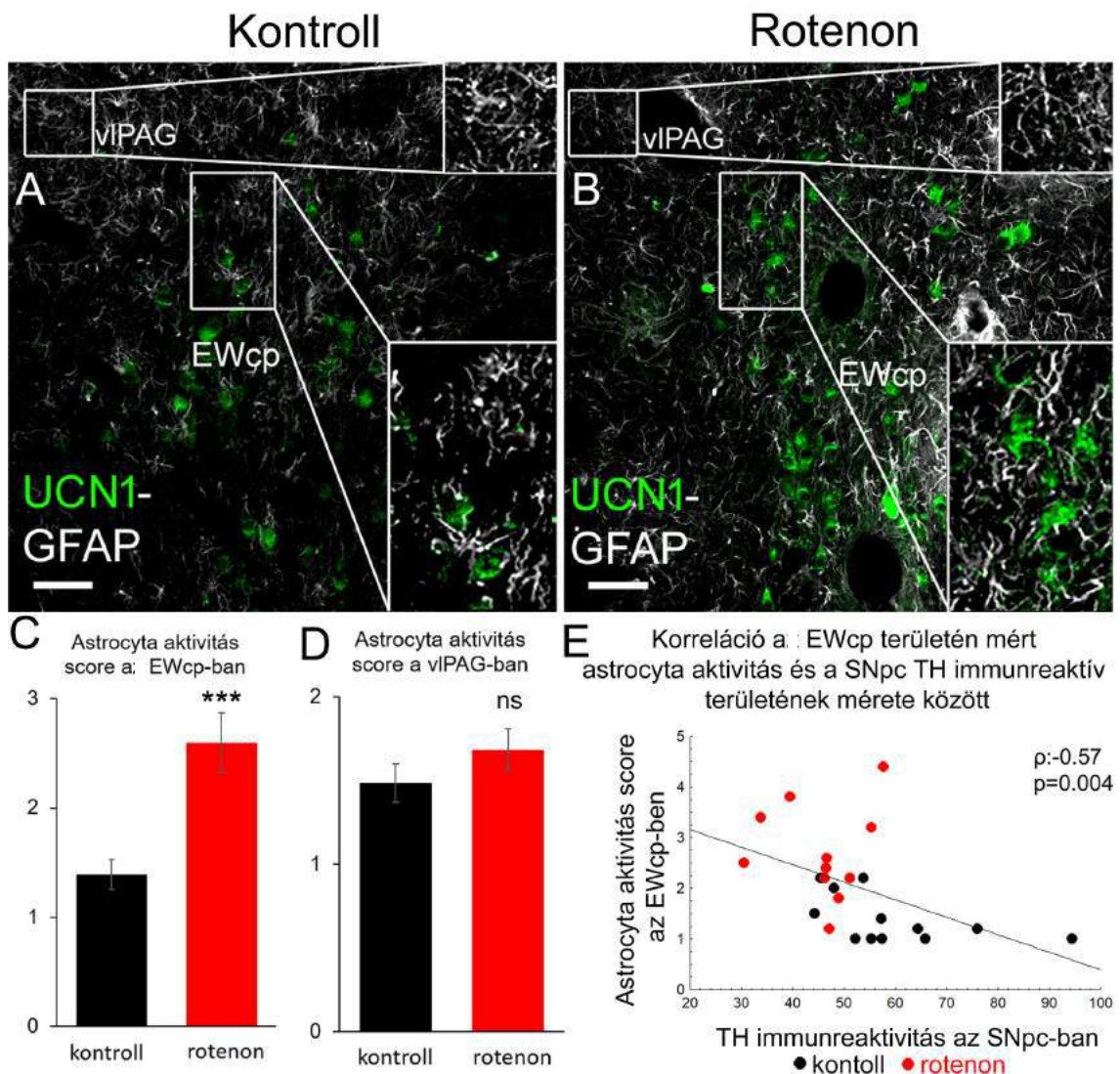




**20. ábra - A centrális-projekciójú Edinger-Westphal (EWcp) mag urocortin 1 (UCN1) tartalmú idegsejtjei károsodnak a Parkinson-kór rotenon modelljében.**

Az urocortin 1 (UCN1) (zöld) – alpha-synuclein (αSYN) (piros) kettős jelölés mutatja (A, B), hogy rotenon kezelés hatására a neuronokban αSYN-ir zárványok (nyilak, B) jelennek meg (C). Az UCN1-ir sejtek száma csökkent (F), a még élő sejtek morfológiája puffadt (B, I). Esetenként, a rotenon kezelt állatok mintáiban a pusztuló UCN1 neuronok is megfigyelhetők (E, G, G'), melyeket IBA1-ir microgliák (vörös) kebeleznek be. A H ábra a G és G' paneleken bemutatott pusztuló UCN1 neuront jeleníti meg nagy nagyítású Z-stack fotókból rekonstruált kétirányú virtuális metszeten. Hasonló interakciókat gyakorlatilag csak a rotenon kezelt állatok mintáiban láttunk (J). \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  a Student-féle  $t$  tesztben. Lépték: 50  $\mu$ m.

A neurodegenerációval együtt járó astrogliosis kimutatása érdekében GFAP immunjelölést is végeztünk a metszeteken. Hasonlóan a rotenon kezelés hatására bekövetkező microgliaaktiváció szintjéhez, a EWcp területén szignifikánsan magasabb astrocyta aktivitást detektáltunk (21. ábra A, B, C) ( $U(22) = -14,5$ ,  $p = 0,0009$ ). Az EWcp-vel azonos coronalis metszési síkban elhelyezkedő ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány (vlPAG) vizsgálata során ellenben nem találtunk szignifikánsan magasabb astrocyta aktivitást (21. ábra bal felső sarok kiemelt területe A, B ábrán, D) ( $U(22) = 52,00$ ;  $p = 0,24$ ), mely arra utal, hogy a jelenség nem diffúz, hanem lokális. A korreláció vizsgálatok szignifikáns fordított arányosságot tártak fel a SNpc/TH-ir terület mérete és az EWcp-ben található microglia (Spearman's  $\rho: -0,48$ ;  $p = 0,03$ ) és astrocyta (Spearman's  $\rho: -0,57$ ;  $p = 0,004$ ) sejtek aktivitása között.

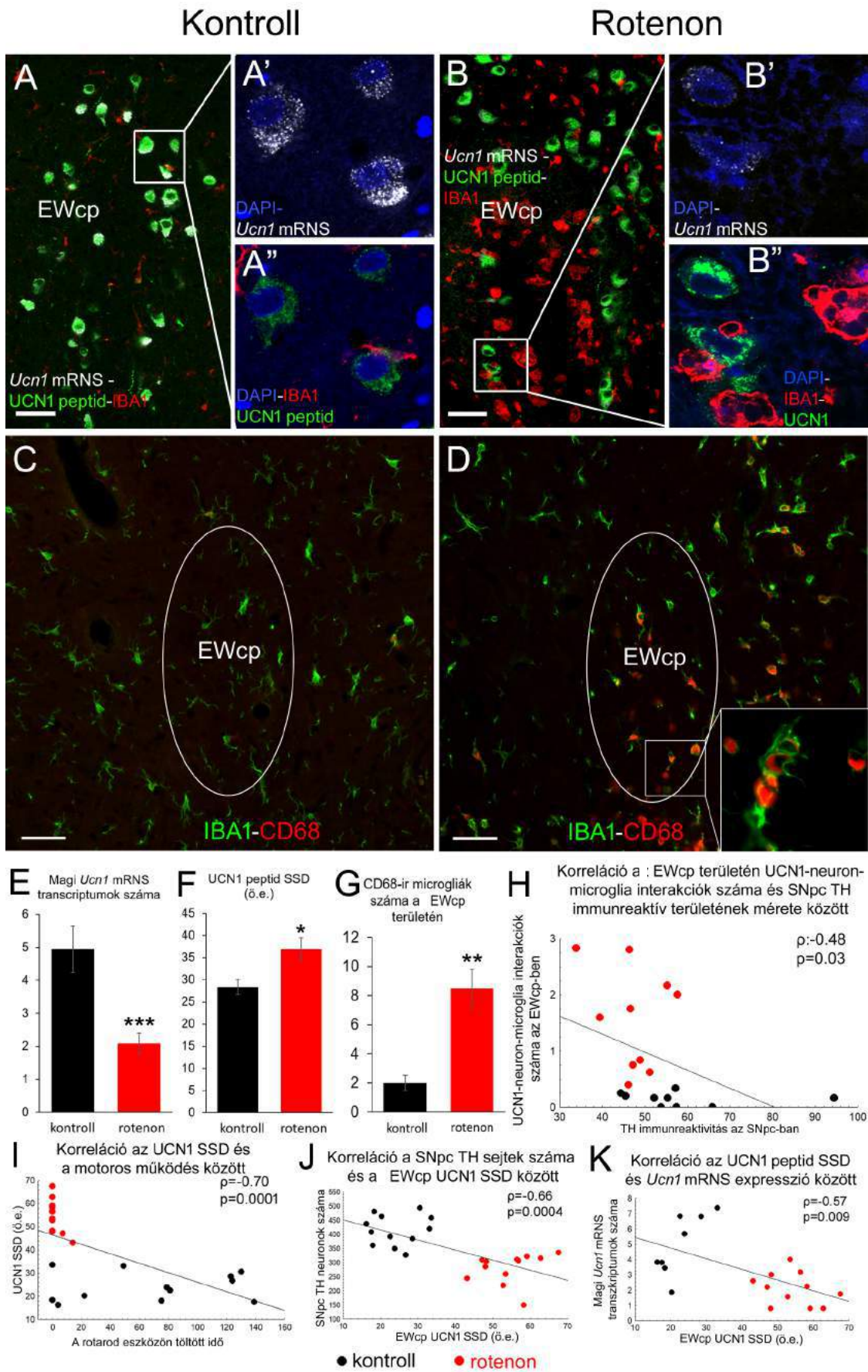


**21. ábra - A centrális-projekciójú Edinger-Westphal (EWcp) mag területén az astrocyták is aktiválódnak rotenon kezelés hatására.**

Az urocortin 1 (UCN1) (zöld) tartalmú idegsejtek környezetében a glial fibrillary acidic protein (GFAP) (fehér) immunreaktív astrocyták rotenon kezelés után aktiválódásra jellemző morfológiát mutattak (B, C). Az UCN1 neuronoktól távolabb, ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány (vIPAG) területén nem láttunk jelentős astroglia aktivitásnövekedést (B, D) a kontrollal (A) összehasonlítva. Az astrocyta aktivitás és a substantia nigra pars compacta tirozin-hidroxiláz immunreaktív (SNpc/TH-ir) sejteinek pusztulása közötti korrelációt az E ábra mutatja. (Vörös jelzések a rotenon, a fekete a kontroll csoport egyedeire utalnak.) ns: nem szignifikáns, \*\*\* $p < 0,001$  a Mann-Whitney-féle U tesztben. Lépték: 50  $\mu$ m.

Az EWcp/UCN1-ir sejtek méretének meghatározásával egy időben az UCN1 peptid specifikus jeldenzítését is megmértük. E morfológiai analízis során azt találtuk, hogy az UCN1 peptid jeldenzítése 126%-os emelkedést mutatott rotenon kezelés hatására (22. ábra A, A'', B, B'', F) ( $t(22)=-11,11$ ;  $p<10^{-6}$ ).

Az immunfluoreszcens jelölési eljárásokat RNAscope® *in situ* hibridizációs technikával kombinálva lehetőségünk volt az *Ucn1* mRNS partikulumok kvantitatív meghatározására. Az EWcp neuronok perikaryonjában nagyszámú, gyakran összefolyóan megjelenő cytoplasmaticus *Ucn1* mRNS partikulumot láttunk, melyek inhomogén módon, csoportokba rendeződve helyezkedtek el, főképp a rotenon kezelt állatokban. Ez a klaszterszerű, egyenlőtlen mRNS eloszlás megnehezítette a cytoplasmaticus mRNS partikulumok számolását. Ezzel szemben, a karyoplasmában különálló pontokként jelölődtek az *Ucn1* mRNS-ek (22. ábra A' és B'). Az intranuclearis *Ucn1* mRNS transcriptumok számlálása során 57,8%-os csökkenést találtunk rotenon kezelés hatására (22. ábra A', A'', B', B'', E). Erős negatív korrelációt találtunk a celluláris UCN1 peptid SSD értéke és a nuclearis *Ucn1* mRNS tartalom között (22. ábra K panel) (Spearman-féle  $\rho=-0,57$ ;  $p=0,009$ ). Ugyanezen a metszeteken IBA1 jelölést is végeztünk, és a nagyon alacsony *Ucn1* mRNS tartalmú EWcp neuronok közvetlen közelében phagocytáló morfológiát mutató microgliákat találtunk (22. ábra, B''). A CD68 jelölés megerősítette az elgondolást, hogy az idegsejtcsoportban látható hasonló alakú microgliák valóban aktív phagocytosist végeztek (22. ábra, C, D, G) ( $t(10)=-4,53$ ;  $p=0,001$ ). A korreláció vizsgálatok szintén megerősítették a EWcp PD-ban betöltött szerepét, mivel a EWcp/UCN1 tartalom korrelált, mind a rotarod teszttel ( $\rho=-0,70$ ;  $p=0,0001$ ), valamint a SNpc/TH sejtszámmal (22. ábra H, I, J) ( $\rho=-0,66$ ;  $p=0,004$ ). Ezzel szemben nem találtunk szignifikáns összefüggést a SNpc/TH immunreaktivitás és a TNFalpha ( $\rho:-0,26$ ;  $p=0,79$ ) vagy iNOS ( $\rho:-0,82$ ;  $p=0,42$ ) immunreaktivitás között.



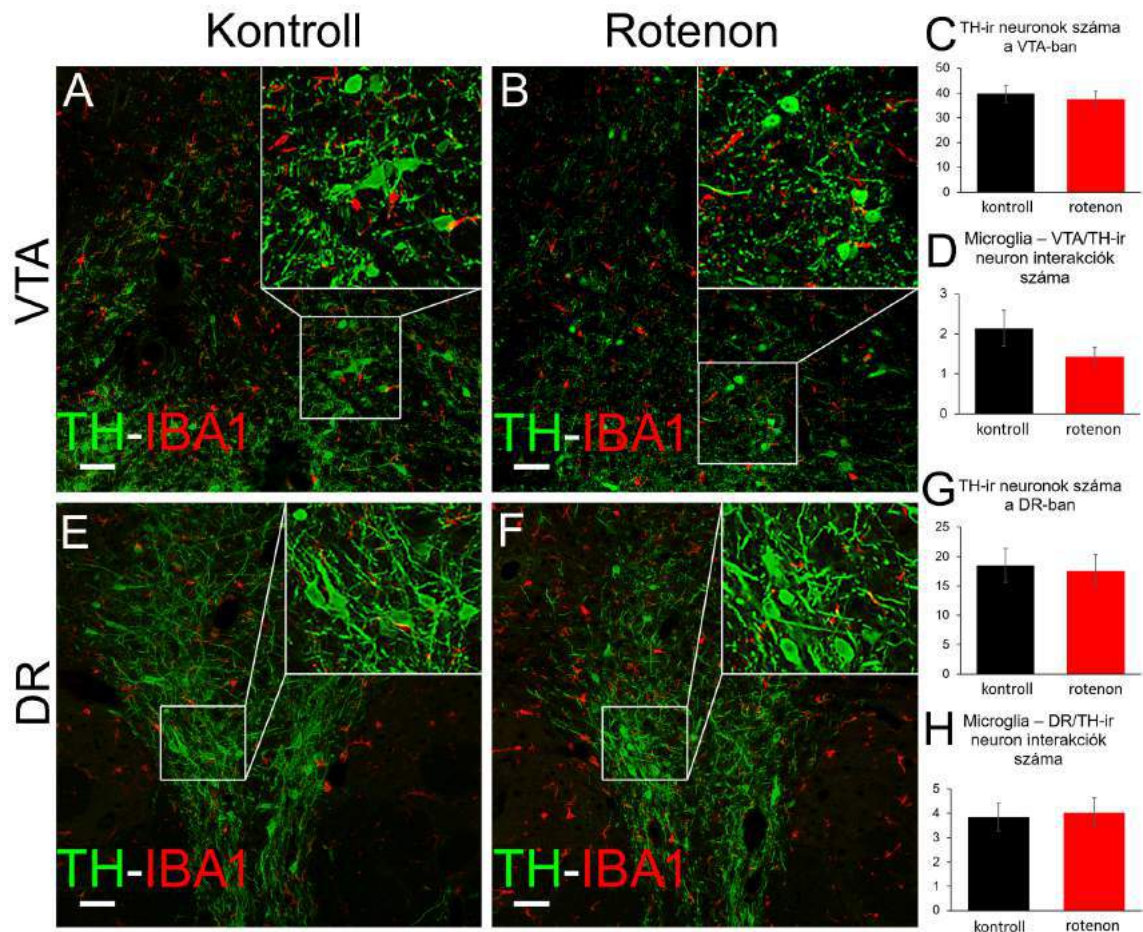
**22. ábra (61. oldalon) - A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén az urocortin 1 (UCN1) tartalmú idegsejtek funkcionális károsodást mutatnak rotenon kezelést követően.**

RNAscope® in situ hibridizáció (az Ucn1 mRNS fehér az A és B ábrán), valamint kettős immunfluoreszcens jelölés [(UCN1 peptid, zöld) és ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros az A és B panelben)] reprezentatív ábrái mutatják, hogy rotenon kezelés hatására az Ucn1 mRNS mennyisége csökkent a sejtekben (vö. A' és B'-t illetve E), míg a bennük tárolt UCN1 neuropeptid mennyisége nőtt (vö. A'' és B'' és F). Megfigyelhető, hogy az alacsony Ucn1 mRNS tartalmú neuronokat reaktív morfológiát mutató microglia sejtek (B'') közelítik meg. Az IBA1-ir microgliák (zöld C és D ábrán) CD68 (vörös a C és D ábrán) markert is tartalmaznak, mely a sejtek reaktív voltát bizonyítja a rotenon kezelt csoportban (D és H). A microglia-UCN1 neuron interakciók száma és a SNpc és tirozin-hidroxiláz tartalma közötti korrelációt a H panel mutatja. A Parkinson-kór szerű állapot és az UCN1 neuronok károsodása közötti kapcsolatot mutatja az I és J panel is. Az UCN1 neuronok peptid és Ucn1 mRNS tartalma között negatív korreláció állt fenn (K). (Vörös szimbólumok a rotenon, a fekete a kontroll csoport egyedére utalnak.) DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol magfestés (kék). ö.e.: önkényes egység. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  a Student-féle t tesztben. Lépték: 50  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.3 A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb agyterületek változásai a rotenon modellben**

A rotenon s.c. beadásával a toxin szövetek közti eloszlása – bár nem azonos mértékben - testszerte történt, így sejtkárosító hatását nem csak a nigrostriatalis rendszeren és a EWcp-ban fejthette ki. Annak érdekében, hogy a viselkedési tesztek során látott hangulatzavarok neurobiológiai hátterét feltárjuk, olyan, a hangulatszabályozásban résztvevő egyéb agytörzsi régiókat is tanulmányoztunk, melyek a meso-cortico-limbikus dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg rendszerekhez tartoznak.

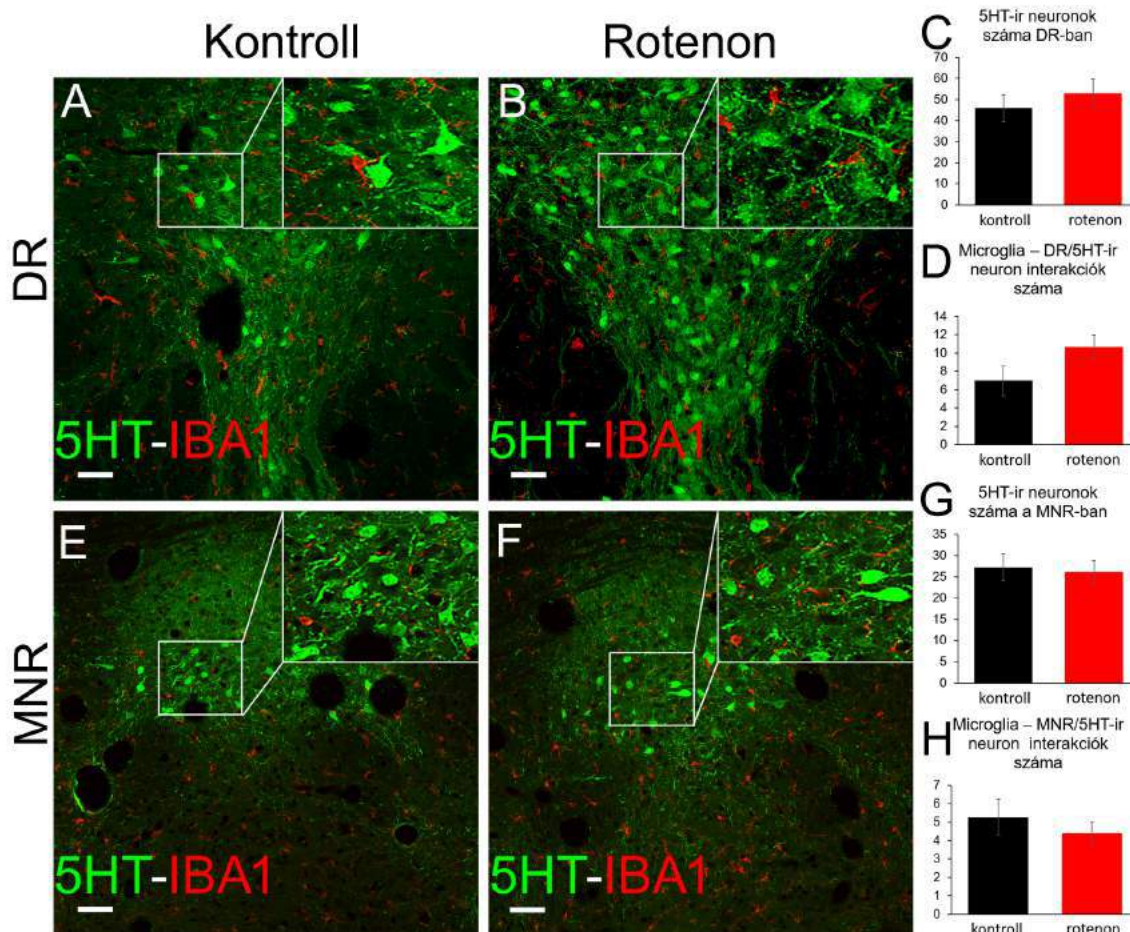
Szövettani vizsgálataink során azt találtuk, hogy sem a VTA (23. ábra, A, B, C) [(t(22)=0,48; p=0,63)], sem pedig a DR dopaminerg sejtei (23. ábra, E, F, G) [(t(16)=0,22; p=0,82)] nem károsodtak szignifikáns mértékben. Ezt támasztja alá a TH-ir sejtek és a microgliák közötti interakciók változatlan száma is a VTA (23. ábra A, B, D) és a DR (23. ábra, E, F, H) területén.



**23. ábra - A ventralis tegmentalis area (VTA) és a nucleus raphe dorsalis (DR) dopaminerg sejtjei nem károsodnak a Parkinson-kór rotenon modelljében.**

A tirozin-hidroxiláz (TH) (zöld) és az ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros) immunjelölés mutatja, hogy sem a VTA (B, C), sem a DR (F, G) területén nem lép fel jelentős dopaminerg sejtpusztulás a rotenon kezelt csoportban a kontrollhoz képest (A és E). Ennek megfelelően, a microglia-TH-neuronok közötti interakciók száma sem változott szignifikáns mértékben sem a VTA (B, D), sem a DR (F, H) területén. Lépték: 50  $\mu$ m.

Az általunk vizsgált szerotoninergerg magok közül sem a DR (24. ábra A, B, C) [(t(15)=-0,73; p=0,47)], sem a MNR (24. ábra E, F, G) [(t(15)=0,26; p=0,79)] területén nem találtunk 5-HT-ir neuronszám változást a két csoport összehasonlításakor. A rotenon kezelés hatására nem detektáltunk szignifikánsan több interakciót a szerotoninergerg idegsejtek és a microgliák között, sem a DR (24. ábra A, B, D) (t(15)=-1,76; p=0,099), sem a MNR (24. ábra E, F, H) (t(15)=0,78; p=0,44) területén.

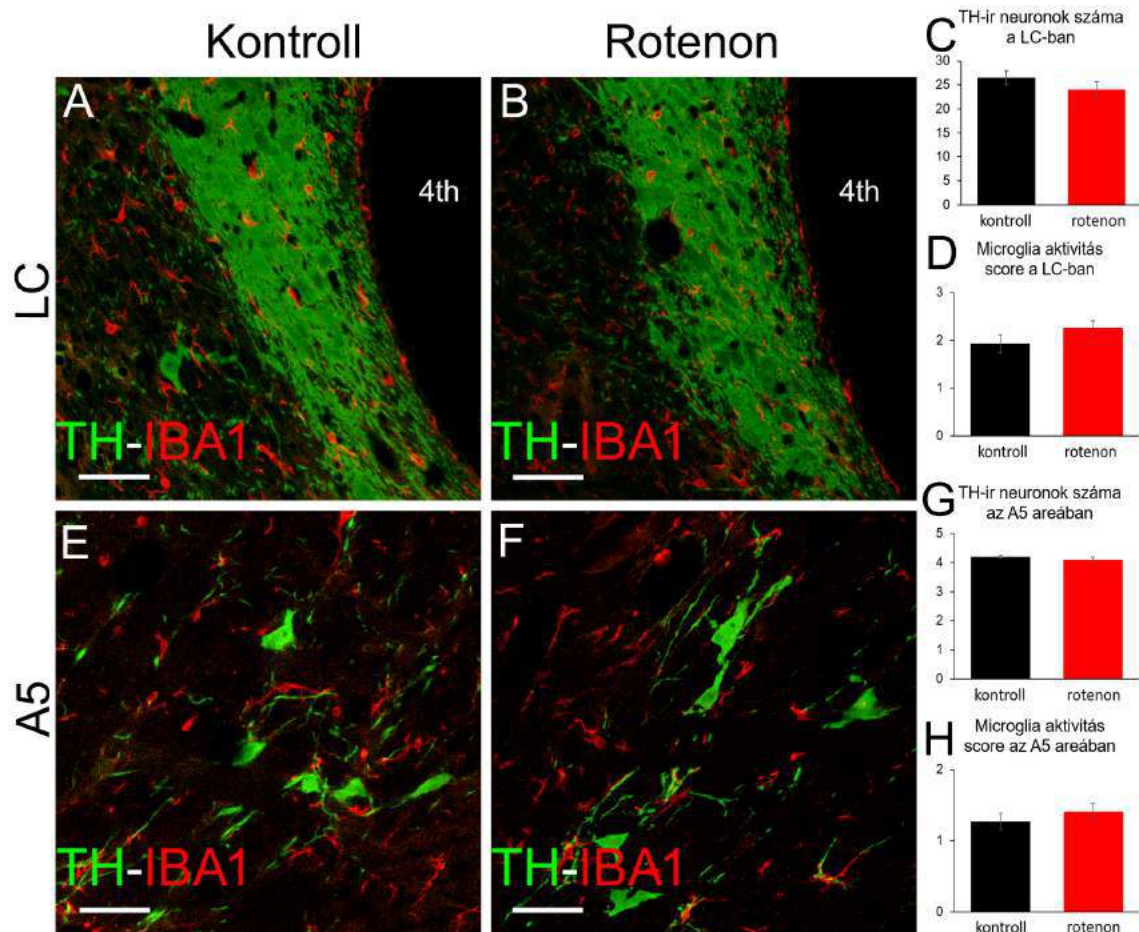


24. ábra - A nucleus raphe dorsalis (DR) és a nucleus raphe medianus (MNR) szerotonin (5-HT) tartalmú idegsejtjei nem károsodnak a Parkinson-kór rotenon modelljében.

Szerotonin (5-HT) (zöld) és ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros) immunjelölés mutatja, hogy sem a DR (B, C), sem a MNR (F, G) területén nem lép fel szerotoninerget sejtpusztulás a rotenon kezelt csoportban a kontrollhoz képest (A és E). Ennek megfelelően, a microglia-5-HT-neuronok közötti interakciók száma sem változott szignifikáns mértékben, sem a DR (B, D), sem a MNR (F, H) területén. Lépték: 50  $\mu$ m.

A noradrenerg agytörzsi magok vizsgálata során sem a LC (25. ábra A, B, C) [(t(18)=0,26; p=0,79)], sem pedig az A5 area (25. ábra E, F, G) [(t(18)=0,26; p=0,79)] nem mutatott sejtszám változást a rotenon modellben, ahogy a microglia aktiváció sem volt szignifikáns a LC (25. ábra A, B, D) (U(19)=3500; p=0,45) és az A5 sejtcsoport területén (25. ábra E, F, H) (U(18)=24,50; p=0,16).





**25. ábra - A locus coeruleus (LC) és az A5 sejtsorozat noradrenerg idegsejtjei nem károsodnak a Parkinson-kór rotenon modelljében.**

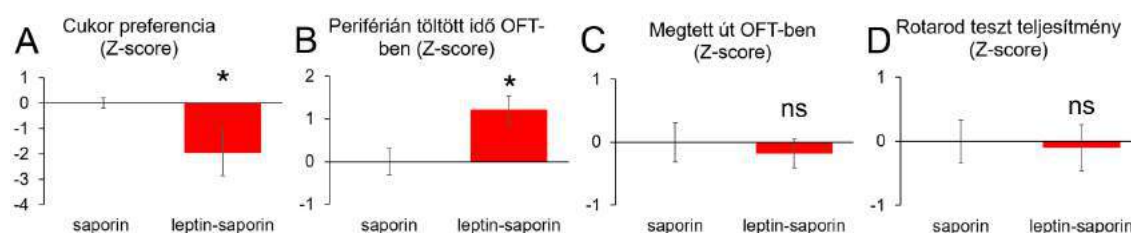
A tirozin-hidroxiláz (TH) (zöld) és ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) (piros) immunjelölés mutatja, hogy sem a LC (B, C), sem az A5 (F, G) területén nem lép fel noradrenerg sejtpusztulás a rotenon kezelt csoportban a kontrollhoz képest (A és E). Ennek megfelelően, a microglia-TH-neuronok közötti interakciók száma sem változott a LC (B, D) és az A5 area (F, H) területén. 4th: ventriculus quartus. Lépték: 50  $\mu$ m.

### 4.3 Saporin indukált szelektív lokális neuron abláció az Edinger-Westphal magban kiváltja a Parkinson-kór nem motoros tüneteit, mozgászavar nélkül

#### 4.3.1 Viselkedési tesztek eredményei a leptin-saporin modellben

A rotenon modellben megfigyelt hangulatzavarokhoz hasonló állapotot idézett elő a leptinnel konjugált saporin mikroinjekciója, melyet a EWcp/UCN1 neuronjainak szelektív irtására használtunk.

A részleges UCN1 neuron abláción átesett patkányok a SPT során kevesebb cukros oldatot fogyasztottak, mely megnövekedett anhedónia szintet jelent (26. ábra A panel) ( $t(16)=2,13$ ;  $p=0,048$ ). Ugyanezek az állatok OFT közben hosszabb időt töltöttek a doboz perifériás zónájában, ami szorongó állapotra enged következtetni (26. ábra B panel) ( $t(16)=-2,70$ ;  $p=0,015$ ). Fontos megjegyezni, hogy OFT során mindkét csoport állatai statisztikailag azonos távolságot tettek meg (26. ábra C panel) ( $t(16)=0,45$ ;  $p=0,65$ ), valamint a RPT során sem találtunk motoros funkcióromlást a leptin-saporin csoportban (26. ábra D panel) ( $t(16)=-0,20$ ;  $p=0,84$ ).

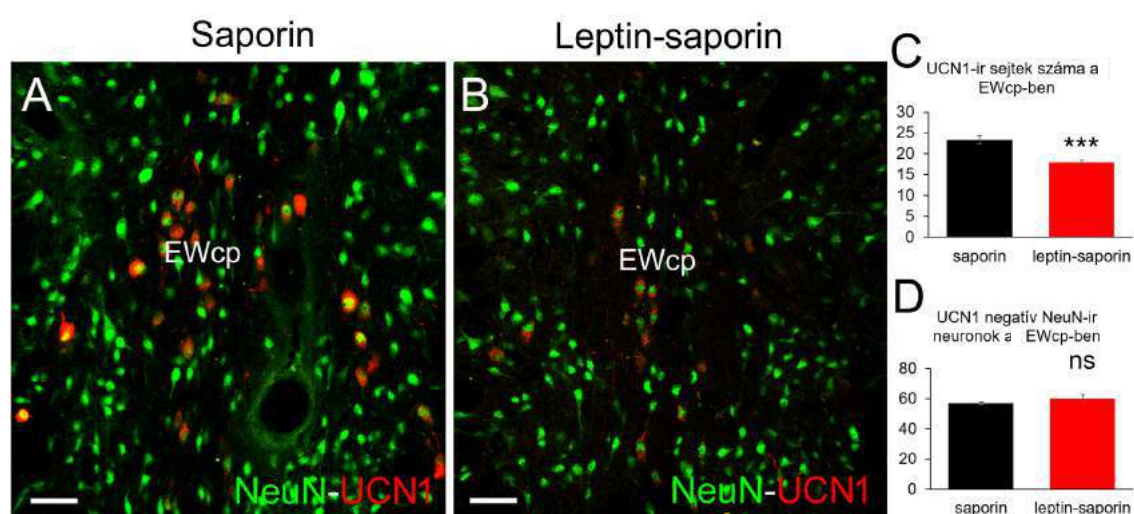


**26. ábra - Viselkedési tesztek eredményei a szelektív neuron abláció után a leptin-saporin modellben.**

Az állatok cukorpreferenciája a leptin-saporin által kiváltott neuron abláció hatására csökkent a kontroll csoporthoz képest (A), mely magasabb anhedónia szintre utal. Az open field tesztben (OFT) az állatok hosszabb időt töltöttek (B) a doboz fala mellett, mely a szorongásuk megnövekedett voltára enged következtetni a leptin-saporin kezelés után. A hangulati eltéréseket nem kísérte a lokomotoros aktivitás csökkenése OFT-ben (C) és az állatok mozgáskoordinációja is megtartott volt a rotarod tesztben (D) az UCN1 neuronok szelektív irtása után. A viselkedési eredményeket Z-score formájában ábrázoltuk. ns: nem szignifikáns,  $*p<0,05$  a Student-féle t tesztben.

### 4.3.2 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag változásai a leptin-saporin modellben

A EWcp-ba adott leptin-saporin injekció hatására az UCN1 sejtek száma 24,5%-os csökkenést mutatott a csak saporinnal injektált, kontroll csoport patkányaihoz képest (27. ábra A, B, C) [(t(16)=4.56; p=0.0003)], azonban a nem UCN1 pozitív sejtek számában nem történt szignifikáns változás, amely alátámasztja a neuronirtás szelektivitását (27. ábra A, B, D) [(t(16)=-1.15; p=0.26)].



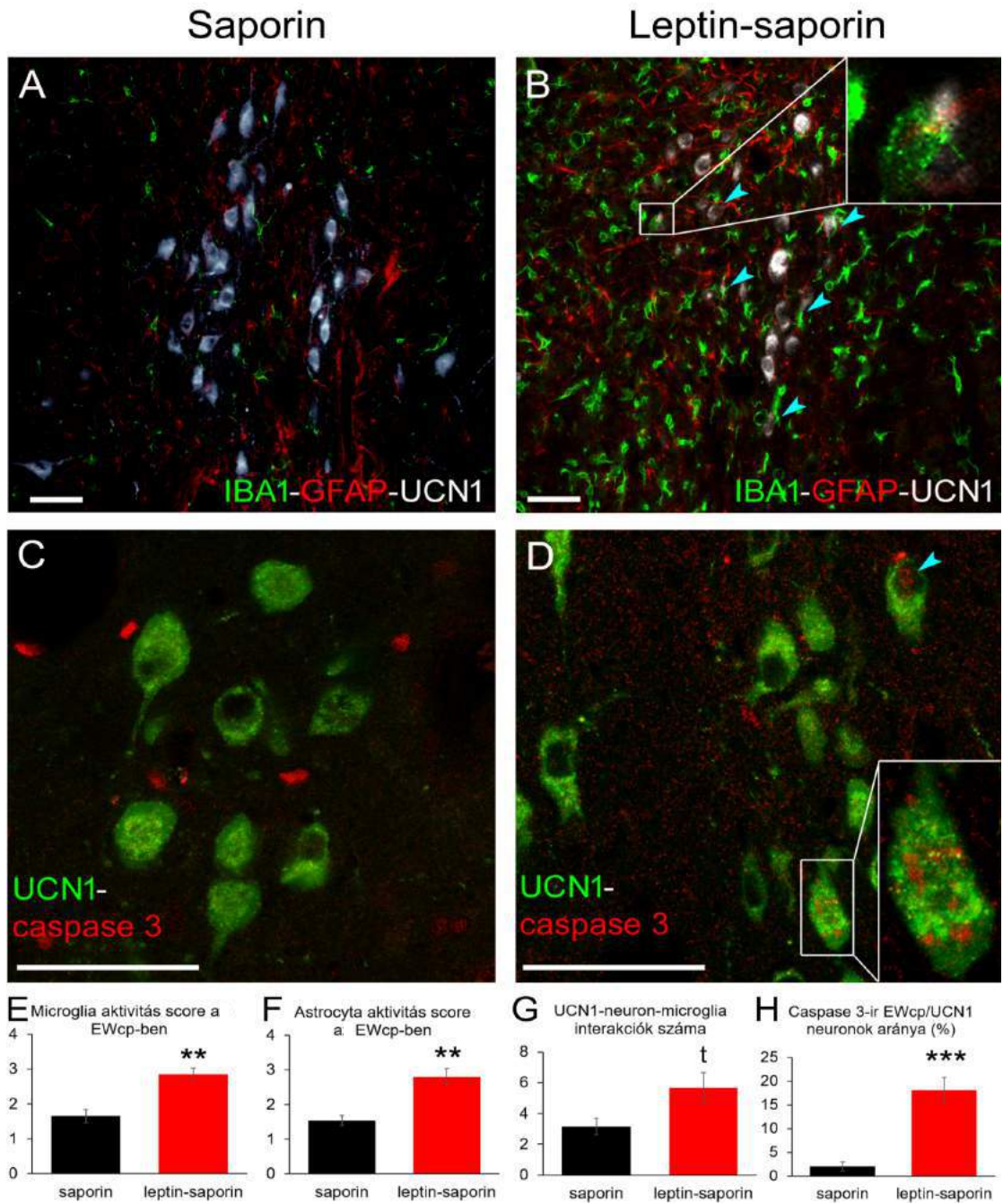
27. ábra - A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén végzett szelektív részleges urocortin 1 (UCN1) neuron abláció validálása.

Kettős immunfluoreszcens jelölés mutatja, hogy az UCN1 neuronok (vörös) száma csökkent leptin-saporin kezelés hatására (B, C) a csak saporinnal kezelt kontrollhoz képest (A). A EWcp területén található, UCN1 immunreaktivitást nem mutató, de NeuN (zöld) immunpozitív idegsejtek száma változatlan maradt, mely arra utal, hogy az abláció szelektív volt. (D) ns: nem szignifikáns, \*\*\* $p < 0,001$  a Student-féle  $t$  tesztben. Lépték: 50  $\mu$ m.

A lokálisan alkalmazott toxin sejtkárosító hatását a sejtszámok csökkenésén túl a microglia és astrocyta aktiválódás mértékével is be tudtuk mutatni. A microgliák nyúlványai megrövidültek és vastagabbak lettek, valamint az elágazódások száma is csökkent egy nyugvó microglia fenotípusához képest. Sejttestük mérete és aránya az egész sejt méretéhez képest megnőtt. Hasonlóan ehhez, az astrocyták is aktivációt mutattak, mely a GFAP jelölés intenzitásának szemmel látható növekedésében, az astrocyta nyúlványok megvastagodásában, gazdagabb elágazódásában és a sejttestek méretének növekedésében nyilvánult meg (Harrison *et al.*, 2019). Az alkalmazott pontrendszer alapján azt találtuk, hogy mind az IBA1 jelölt microgliák (28. ábra A, B, E)

( $U(12)=1,00$ ;  $p=0,006$ ), mind pedig a GFAP jelölt astrocyták (28. ábra A, B, F) ( $U(12)=0,00$ ;  $p=0,004$ ) aktivitása magasabb volt a leptin-saporin injektált patkányokban a EWcp területén, mint a saporinal kezelt állatok esetében. Ezzel összhangban, a microglia-UCN1-ir neuronok közötti interakciók száma nagyobb volt a szelektív neuronirtást követően, azonban statisztikailag e változás éppen nem ért el szignifikáns mértéket (28. ábra A, B, G) ( $t(10)=-2,21$ ;  $p=0,051$ ).

A saporin mikroinjekciót kapott kontroll állatokkal összehasonlítva, a leptin-konjugált saporinnal injektált állatokból származó mintában azt találtuk, hogy az UCN1-ir sejtekben a caspase 3 aktivitása magasabb volt (28. ábra C, D, H) ( $t(12)=-5,52$ ;  $p=0,0002$ ). Az enzim jelenléte arra utal, hogy az állatok terminálása idején még a sejtek egy részében apoptotikus folyamatok zajlottak.

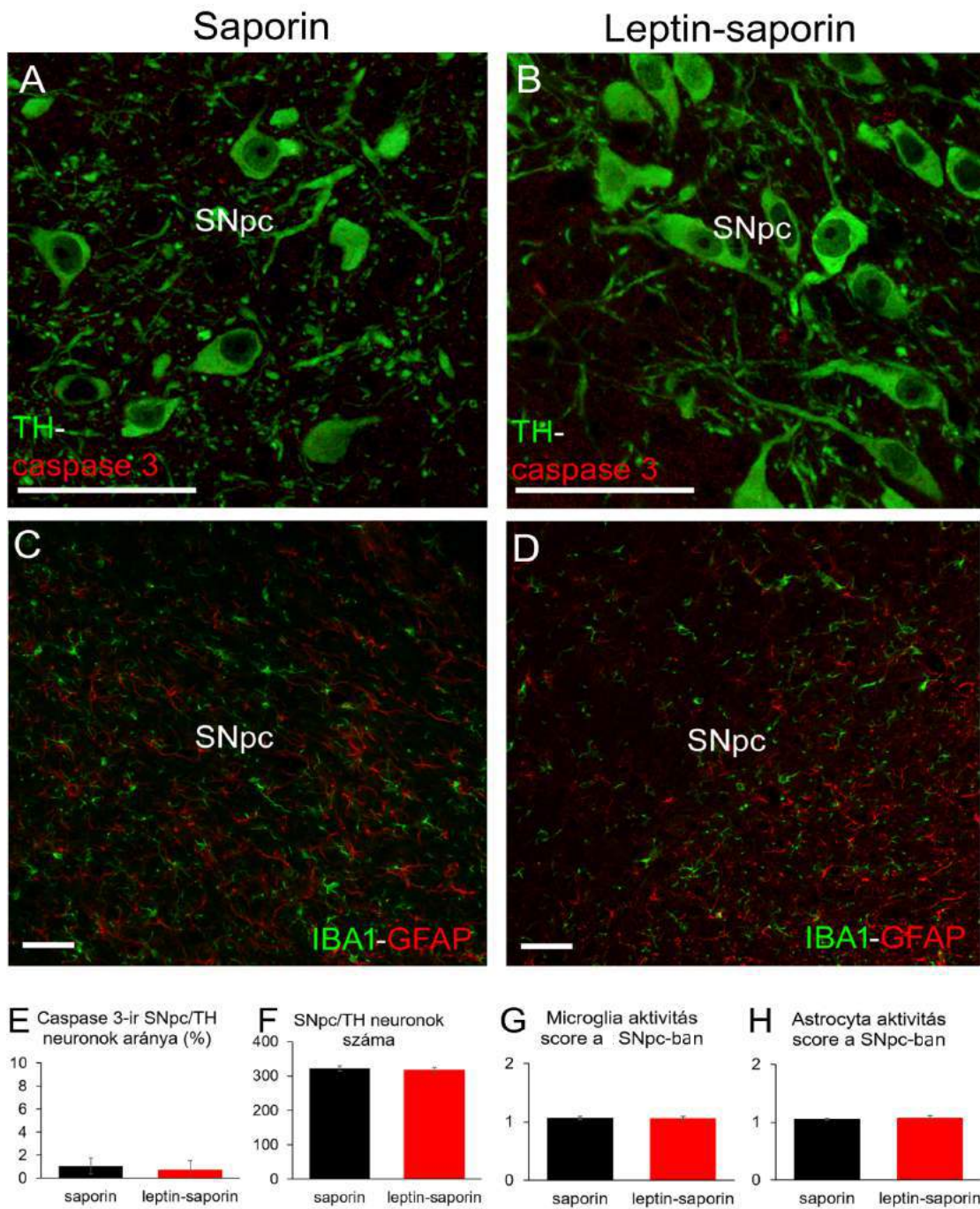


**28. ábra - A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén végzett szelektív részleges urocortin 1 (UCN1) neuron abláció reaktív gliózist és az urocortin 1 neuronok apoptózisát okozza.**

Hármas immunfluoreszcens jelölés mutatja, hogy az UCN1 neuronok (fehér) száma csökkent leptin-saporin kezelés hatására (B) a saporin kezelt kontrollhoz képest (A). A sejtek környezetében reaktív ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunreaktív (IBA1-ir) microgliákat (zöld az A és B panelben) és glial fibrillary acidic protein immunreaktív (GFAP-ir) aktív astrocytákat figyeltünk meg (vörös A és B panelben), melyet a fokozott aktivitásra utaló score értékek is alátámasztottak (E és F). Az UCN1 neuronok és a microglia sejtek közötti interakciók (kék nyílhegyek B-ben) száma is tendenciózusan (t) emelkedett, de ez nem érte el a szignifikancia mértékét (G). A EWcp UCN1 immunreaktivitást mutató sejteiben (zöld a C és D ábrán) leptin-saporin kezelés után gyakran látunk caspase 3 immunreaktivitást (vörös a C és D panelben), mely a sejtekben zajló apoptotikus folyamatra utal (H). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  a Student-féle t tesztben, illetve a Mann-Whitney-féle U tesztben. Lépték: 50  $\mu$ m.

### 4.3.3 A substantia nigra változásai a leptin-saporin modellben

A EWcp/UCN1 neuronjait célzó lokális injekció beadása nem befolyásolta a SNpc/TH-ir, dopaminerg sejtjeinek számát (29. ábra A, B, F) [(t(10)=0.41; p=0.68)], és ennek megfelelően a két csoport között ezen a területen a neuronokban nem változott a caspase 3 szintje sem (29. ábra A, B, E) (t(10)=0,79; p=0,43). Mivel a SNpc területén nem okoztunk direkt fizikai sérülést, illetve a toxin sem jutott a TH neuronokba. Tekintve, hogy a sejtek csak elvétele hordoznak leptin receptort ebben a régióban, a microgliák (29. ábra C, D, G) (U(12)=13.00; p=0.42), és astrocyták (29. ábra C, D, H) (U(12)=14,50; p=0,57) aktivitása sem változott, és nyugalmi állapotnak megfelelő képet mutatott a leptin-saporin injektált állatokban is.



**29. ábra -** A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag (EWcp) területén végzett szelektív részleges urocortin 1 neuron abláció nem idéz elő dopaminerg sejtpusztulást és reaktív gliózist a substantia nigra pars compacta területén.

A substantia nigra pars compacta (SNpc) területén a tirozin-hidroxiláz immunreaktív (TH-ir) (zöld A és B panelben) dopaminerg sejtekben nem találtunk caspase 3 immunreaktivitást (vörös az A és B panelben) (E), és a SNpc/TH sejtek száma a EWcp leptin-saporin injekciója után változatlan maradt (F). A SNpc/TH sejtek környezetében sem reaktív morfológiájú IBA1-ir (zöld a C és D panelben) microgliákat, sem aktív astrocytákat (GFAP, vörös a C és D panelben) nem találtunk, amit a glia alacsony aktivitási értékei is alátámasztottak (G és H). Lépték: 50  $\mu$ m.

## 5. Diszkusszió

A doktori értekezésben összefoglalt két különböző kísérletes megközelítés segítségével kutatócsoportunk arra a fő kérdésre kereste a választ, hogy a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtjeinek károsodása szerepet játszhat-e a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarok kialakulásában. Ennek érdekében először a szisztémásan ható rotenonnal előidézett Parkinson-kór modellt alkalmaztuk patkányokon, mely egy megbízható, validált és reprodukálható állatmodell. Sikert kimutatni, hogy a rotenon modellben az urocortinerg neuronok károsodnak patkányban. Mivel a rotenon szisztémásan fejti ki hatását, felmerült a kérdés, hogy az állatokban megfigyelt hangulati eltérések valóban csak a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag sejtjeinek pusztulásával magyarázhatók-e, vagy egyéb agyterületek is szerepet játszanak az állatok hangulatának megváltozásában. Ezért egy lokális, urocortin 1 tartalmú neuronokat célzó ablációt végeztünk a centrális-projekciójú Edinger-Westphal területén, hogy a motoros rendszert érintő változások nélkül kialakuló hangulatzavarokat össze tudjuk vetni a rotenon modellben találtakkal, és ezzel a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag kiemelt szerepét bebizonyítsuk.

### 5.1 A modell validitásának kritériumai

Annak érdekében, hogy a vizsgálatok során kapott eredményeink megbízhatóságát kimondhassuk, egy valid és reprodukálható Parkinson-kór modellt kellett alkalmaznunk. A rotenon kezelés hatásosságát mind az *in vivo* tesztek, mind a szövettani vizsgálatok során értékeltük. Habár a mai napig nincs olyan állatmodell, aminek nincs limitációja (Konnova et al., 2018; Betarbet et al., 2000), a rotenon indukálta Parkinson-kór modell a humán betegség több diagnosztikus kritériumát képes reprodukálni. Ezek közé tartozik a szisztémás mitochondriális károsodás, a nigrostriatalis dopaminerg rendszer szelektív károsítása, melynek részeként szabadgyök felszabadulással járó idegszöveti gyulladás is fennáll, mely microglia aktiválódást, reaktív gliózist von maga után. A szövettani kép kiegészül az alpha-synuclein zárványok jelenlétével, melyek megfeleltethetők az emberben leírt Lewy-testekkel (Betarbet et al., 2000), a betegség fontos diagnosztikus kritériumával.



## 5.2 Patkányokban rotenon hatására a Parkinson-kórban megfigyelhető motoros és nem-motoros tünetek jelentkeznek

A viselkedési tesztek közül a motoros rendszer érintettségét vizsgáló tesztek kimutatták, hogy a rotenonnal kezelt állatokban jelentős mozgáskoordinációs deficit alakult ki. Ezt a nagy fokú károsodást a rotarod teszt eredményei egyértelműen reprezentálták: a toxinnal injektált egyedek gyakorlatilag nem voltak képesek fent maradni az eszközön az utolsó héten elvégzett teszt során, holott a korábbi szoktatások alkalmával a két csoport között ekkora különbséget nem tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy a rotenon kezelt állatokban a toxin progresszív károsodást okozott. Az általunk is használt rotarod performance teszt széles körben alkalmazott a motoros funkció vizsgálatára (*Campos et al., 2013*), mivel megbízhatóan diagnosztizálhatók és követhetők a mozgásszervi deficittel járó kórfolyamatok. Az open field test során a rotenon kezelt állatoknál hosszabb immobilitási időt mértünk, ami szintén alátámasztja a mozgásszabályozást érintő károsodásokat és mivel a teszt méri az állatok lokomotoros aktivitását, alkalmas a PD motoros tüneteinek kimutatására (*Zaitone et al., 2012; Sun et al., 2019*). Az OFT-ben regisztrált eredményeinkből az látszik, hogy a kontroll csoporthoz képest a rotenon kezelt patkányok több időt töltöttek a doboz fala mellett, ami megnövekedett szorongási szintre enged következtetni (*Valvassori, 2017*). A rotenon kezelt állatok a SPT folyamán kevesebb cukoroldatot fogyasztottak, mint a kontroll állatok, melyből az vonható le, hogy nőtt az állatok anhedónia szintje, ami a „reward-seeking behavior”, a jutalomkereső magatartás hiányát jelenti, és a depresszív tünetegyüttes része lehet (*Scheggi et al., 2018*). Az *in vivo* eredményeink alapján tehát megállapítható, hogy sikerült Parkinson-kórszerű állapotot létrehozni, melyben nem csak a kórkép motoros, hanem a hangulati, nem motoros tüneteket is sikerült létrehozni.

Itt szeretnék kitérni arra, hogy a viselkedési tesztek során mozgó állaton végeztük a méréseket, annak ellenére, hogy a Parkinson-kór köztudottan egy mozgásszegénységet előidéző állapot. Így felmerülhet a kérdés, hogy mennyire megbízhatóak ezek a tesztek az alkalmazott modellben. Előkísérleteink során, több, itt részletesen nem tárgyalt viselkedésvizsgálati módszer előtesztelése is megtörtént (pl. forced swim test, light-dark box test). Mivel ezeknek az eredményét és értékelhetőségét nagymértékben torzította a mozgásszegénység, lemondtunk a használatukról, és végül azért esett a választás az OFT-re és a SPT-re, mert itt a patkányok nincsenek kitéve a csak megerőltető mozgásokkal

kezelhető veszélyes helyzeteknek. Az OFT-ben a periférián töltött hosszabb idő nem teljes mozdulatlanságot jelent, hiszen a mérés indításakor az állatokat a doboz közepére helyezük, tehát az aréna szélére önerőből jutottak el. A SPT során a kevesebb cukros oldat fogyasztása sem amiatt történt, mert a rotenon kezelt patkányok képtelenek lettek volna eljutni az itató edényhez, hiszen ha ez így lenne, akkor teszteltől függetlenül sem tudtak volna a ketrecben enni és inni és megfelelő táplálék- és folyadékbevitel hiányában hamar elpusztultak volna, vagy az állatetikai szabályoknak megfelelően a kíméletes végpontot kellett volna alkalmaznunk. Ennek elkerülésére, és azért, hogy a kiválasztott viselkedési tesztek értékelhetők legyenek, az előkísérletek során kiválasztottuk azt a legkisebb rotenon dózist, ami előidézte a Parkinson-kórszerű állapotot, de nem okozta az állatok súlyos mértékű általános állapotromlását.

A mellékvese-, csecsemőmirigy-, és testtömegmérések eredményei alapján a rotenon kezelt állatokban fokozódott a HPA tengely aktivitása, ami gyakran megfigyelhető jelenség a depresszióval járó állapotokban, mind állatmodellek (*Kormos et al., 2013; Farkas et al., 2017*), mind pedig az emberi depresszió esetében (*Deussing et al., 2018*). Az EWcp és a HPA tengely aktivitása között régóta ismert inverz reláció áll fenn (*Kozicz et al., 2007*), mely összhangban van jelen eredményeinkkel.

Fontos megemlíteni, hogy a rotenon oldószereként használt DMSO-nak önmagában is lehet neuronkárosító hatása, azonban az általunk hat héten át alkalmazott dózis olyan alacsony volt, hogy krónikus alkalmazásban sem okoz szignifikáns károsodást (*Willson et al., 1965*). A csoportok közötti mozgás- és viselkedésbéli különbségek nem származhattak a DMSO okozta károsodásból, hiszen a kontroll csoport is ugyanakkora dózisban kapta az oldószert s.c. injekciózáskor, mint a rotenon kezelt.

### **5.3 A rotenon hatására a substantia nigra területén a dopaminerg sejtek Parkinson-kórra jellemző morfológiai változásokon mentek keresztül**

A szövettani, *in vitro* vizsgálatok során sikerült igazolni a Parkinson-kór szerű állapot hátterében álló morfológiai elváltozásokat. A SNpc területén a két csoport összehasonlítása során 32,4%-kal kevesebb TH pozitív sejtet számoltunk a rotenon kezelt állatok esetében. Bár ez az arány jelentősen elmarad az emberben diagnosztikus 70%-os dopamin tartalmú sejtszámcsökkenéstől (*Poewe et al., 2017*), patkány modellben ez már elégséges a kórkép igazolására, mivel rágszálóban kisebb arányú neuronvesztés mellett is manifesztálódnak a motoros tünetek. A fajok közti eltérés egyik oka lehet, hogy a

degeneratív folyamatok nem hosszú évek alatt játszódnak le a modell alkalmazása során, hanem 6 hét alatt, ami nem tükrözi az emberekben látott dinamikát, ám a tünetek így is vizsgálhatók (*Cannon et al., 2009*). A betegség másik jellemző hisztopatológiai ismervét, az alpha-synuclein tartalmú intracelluláris Lewy-testek megjelenését a SNpc területén is sikerült megtalálnunk. A két kritérium együttes teljesülése tovább bizonyítja a rotenon modell validitását (*Prasad et al., 2020*).

A SNpc területén talált megnövekedett TNFalpha szint az astrocytákban, valamint a microglia és neuronális iNOS jel emelkedése további bizonyíték arra, hogy a rotenon hatására kialakul oxidatív stressz és a következetes neuroinflammáció. Ezek a faktorok együttesen járulnak hozzá a neurodegenerációhoz és tartják fenn a progressziót (*Clausen et al., 2020; Zhang et al., 2021*). Irodalmi leírások további bizonyítékként említik, hogy a rotenon által okozott, a SNpc területén kialakult sejtszámcsökkenés diffúz és fokális TH-ir rostszám csökkenéshez is vezethet a striatumban (*Höglinger et al., 2003*). A mi kísérletünk során is megfigyeltük ezeket a jelenségeket. A rotenon hatására diffúzan kevesebb TH-ir rostot találtunk a nucleus caudatus-putamen területén, továbbá, a striatalis neuropilben olyan körülírt területeket is találtunk, ahol a TH immunreaktivitás gyakorlatilag detektálhatatlanná vált (18. ábra).

#### **5.4 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin-1 neuronjai neurodegenerációt szenvednek, és a túlélő sejtek is funkcionális károsodást mutatnak a rotenon modellben**

Miután az *in vivo* tesztekkel sikerült a Parkinson-kórszerű állapotra jellemző motoros és az ahhoz társuló hangulatzavarokat kimutatni, valamint a SNpc dopaminerg sejteinek szövettani elemzésével a morfológiai diagnosztikai kritériumok is teljesültek, a EWcp urocortinerg sejteinek vizsgálatával folytattuk a rotenon modell elemzését.

Eredményeink azt mutatják, hogy a EWcp-ban talált UCN1 sejtszámcsökkenés mértéke, az intracytoplasmaticus alpha-synuclein tartalmú partikulumok jelenléte és a megnövekedett microglia aktivitás statisztikai korrelációban van a SNpc területén talált nagyon hasonló mértékű elváltozásokkal rotenon kezelést követően. Ebből a EWpc/UCN1 sejteinek a SNpc/TH neuronjaihoz hasonló mértékű toxinérzékenységre lehet következtetni. Ez a feltételezés a magok közös fejlődéstani eredete miatt nem meglepő, hiszen a SNpc/TH sejtek rokonságban állnak a EWpc/UCN1 neuronjaival (*Joksimovic et al., 2009*). A metszetekről konfokális lézerpásztázó mikroszkópot

használva készítettük a digitális felvételeket, így képesek voltunk a szövet 1  $\mu\text{m}$  vastagságú virtuális „szeleteit” vizsgálni (*Bayguinov et al., 2018*). Ennek a technikának a szövettani elemzések során azért van nagy jelentősége, mert így nagy biztonsággal mondhatjuk ki, hogy egy-egy alpha-synuclein aggregátum a sejten belül vagy azon kívül helyezkedik el. A nagy felbontásnak és a 60x-os nagyítású immerziós objektív lencsének köszönhetően a sejten belüli kompartmentekben is pontosan lokalizálható a fluoreszcencia, és a Z-stack képalkotási mód segítségével látható, hogy a keresett jel valóban egy síkban van-e egy másik struktúrával. Az alpha-synuclein mindkettő csoport metszeteiben az idegrostok terminálisában diffúzan jelen volt, ám csak a rotenon kezelt csoport metszeteiben láthattuk a fehérjét intracytoplasmatikusan akkumulálódni. Az aggregátumok morfológiája nagy hasonlóságot mutatott a SNpc területén látott Lewy-testeknek megfelelő zárványokkal.

Az alpha-synuclein jelöléseink kapcsán fontos megjegyeznünk a módszer egyik korlátját. Bár a SNpc-ban és a EWcp-ban intracytoplasmaticus alpha-synuclein immunreaktív zárványok elhelyezkedésük alapján és a kizárólag rotenon kezelt csoportban megfigyelt jelenlétük alapján minden bizonnyal Lewy-testszerű struktúráknak felelnek meg, az általunk használt antitest, hasonlóan számos más, kereskedelmi forgalomban kapható szérumhoz (*Kumar et al., 2020*), nem specifikus a Lewy-testekben előforduló aggregált, nagy molekulatömegű alpha-synuclein izotípusra, bár azt is felismeri.

A kóros alpha-synuclein halmozás mellett a rotenon kezelésen átesett állatokban az UCN1 neuronok számának csökkenését is megfigyeltük, valamint a túlélő neuronok morfológiai változásait is detektáltuk. Egyrészt a microgliák aktivitását értékeltük, másrészt a gliózis mértékét határoztuk meg GFAP jelöléssel. Megszámoltuk az UCN1-ir neuronok és az IBA1-ir microgliák közötti interakciókat (20. ábra), valamint morfológiai analízis során az astrocyták aktivitásának mértékét számszerűsítettük. A microgliák aktivitásából az IBA1 jelölés alapján arra következtettünk, hogy a rotenon kezelés hatására az energiadeficit miatt elpusztuló és széteső neuronokat aktiválódott microgliák kezdték el phagocytálni. Ezzel összhangban, az astrocyták jelölésére alkalmazott GFAP festés eredménye szerint a EWcp-ra lokalizált és a szomszédos vIPAG területén nem jellemző reaktív gliózis arra utal, hogy a EWcp/UCN1 neuronok szelektíven károsodnak a modellben. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy jelentősen több phagocytosis

történt a rotenon kezelés hatására, ami arra enged következtetni, hogy a sejtvesztési folyamat még a terminálás időpontjában is aktívan zajlott. Rotenon hatására több interakciót számoltunk az UCN1-ir megváltozott morfológiájú EWcp neuronok és a reaktív morfológiát mutató microglia sejtek között. A CD68 immunjelöléssel, mely a phagocytáló microgliák markere, sikerült igazolni, hogy a reaktív morfológiát mutató microgliák valóban phagocytáltak (Doorn *et al.*, 2014) (22. ábra).

A sejtszámolás során észleltük, hogy a rotenon kezelt csoport állataiból származó metszeteken a EWcp területén az UCN1 neuronok eltérő méretűek és morfológiájúak, mint a kontroll állatok metszeteiben lévő sejtek. A metszeteken az ImageJ program segítségével az UCN1 peptid jelenlétét is megmértük. A rotenon kezelt csoport metszeteiben a csökkent sejttség mellett emelkedett UCN1 jelintenzitást találtunk, valamint ezek a sejtek nagyobbak is voltak. Feltehetően a mitochontriális komplex I gátlása miatt kialakult energiadeficit következtében (Heinz *et al.*, 2017) az UCN1 peptid felhalmozódott a perikaryonban a károsodott axonális transzportfolyamatok miatt. Összességében tehát arra lehet következtetni, hogy a megnövekedett UCN1 SSD a peptid felhalmozódásának következménye, amit korábbi kísérletek során stresszhatásnak kitett egerekben is kimutattunk (Farkas *et al.*, 2017). Annak érdekében, hogy ennek a jelenségnek a hátterét pontosabban megértsük, mRNS szintű vizsgálatokat is végeztünk.

RNAscope® *in situ* hibridizáció után metszeteinken jelentősen kevesebb nukleáris *Ucn1* mRNS transzkriptumot regisztráltunk, ami csökkent *Ucn1* mRNS mennyiségre és indirekten csökkent UCN1 peptid szintézisre utal. Az itt megfigyelt *Ucn1* mRNS expresszió csökkenése összhangban van korábbi tanulmányokkal. Ilyen adatok egyrészt depresszió modellekből, krónikus stresszen átesett patkányok vizsgálataiból (Aschrafi *et al.*, 2016), másrészt depressziós, öngyilkosságot elkövetett elhunytak EWcp mintáiból (Kozicz *et al.*, 2008) származnak. A látszólag ellentmondásos eredményt, miszerint emelkedett jelenlét mellett csökkent a transzkriptumok száma, a sejt funkcionális károsodása magyarázhatja. A kezelés hatására kialakuló energiahiány feltehetően zavart okozott a celluláris transzportfolyamatokban (Heinz *et al.*, 2017), és így a peptid a károsodott axontranszport miatt nem jutott ki a perikaryonból, ezért megnövekedett az UCN1 SSD. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a EWcp/UCN1 idegsejtek morfológiai és funkcionális változásának szerepe lehet a PD-asszociált hangulatzavarok kialakításában az általunk alkalmazott toxikus állatmodellben, patkányban.

## **5.5 Az egyéb stresszválaszban résztvevő magok nem játszanak szerepet a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarok kialakításában a rotenon modellben**

A rotenon szisztémásan kifejtett hatása miatt a kísérlet tervezésekor felmerült a kérdés, hogy egyéb, hangulatszabályozásban jelentőséggel bíró terület károsodása is hozzájárulhat-e a Parkinson-kórban leírt nem-motoros tünetek kialakulásához.

A SNpc-hoz hasonlóan, többségében dopaminerg neuronokból álló VTA területéről származó metszeteket összehasonlítva nem láttunk jelentős különbséget sem a sejtszámokat, sem pedig a microglia aktivitást tekintve a két csoport között, pedig a mesocortico-limbikus dopaminerg rendszernek jól ismert a szerepe a hangulat szabályozásában (*Bariselli et al., 2016*). Dopaminerg sejtek emellett kisebb számban a DR területén is vannak, melyek szintén hozzájárulnak a hangulat és a napi ritmus szabályozásához (*Zhang et al., 2012; Lee et Lee., 2014*). Mégis azt találtuk, hogy e sejtek nem szenvednek strukturális károsodást a rotenon modellben, és nem is jellemző a környezetükben a microgliák aktivációja.

A szerotoninről is jól tudjuk, hogy a hangulati szint beállításában az egyik legfontosabb neurotranszmitter, és a hangulatzavarok terápiájában is elsőrendű cél a szerotonin mennyiségének növelése az agyban (*Hoffmann et al., 2017*). Ismert az is, hogy az agy fő szerotoninerget sejtcsoportjai, a raphe magok szintén károsodnak Parkinson-kórban, tehát kézenfekvő lenne, hogy a PD asszociált hangulatzavarokhoz a EWcp megváltozott működése mellett a DR és MNR funkcionális és/vagy strukturális károsodása is hozzájárul. Eredményeink ezzel szemben ezeken a területeken sem a dopaminerg, sem a 5-HT tartalmú sejtek károsodását nem mutatták. A sejtek száma nem csökkent szignifikáns mértékben a rotenon kezelés hatására, és a változás funkcionális morfológiai értelemben sem volt detektálható a 5-HT mennyiségében. Habár a microgliák valamelyest megnövekedett mennyiségben voltak jelen a DR területén, az eltérés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

A noradrenerg struktúrák közül az A5 area és A6 area (LC) vizsgálata során nem láttunk jelentős különbséget kontroll és a rotenon kezelt csoport között a TH-ir neuronszámok tekintetében. Bár ezeken a területeken is kissé emelkedett microglia aktivitást találtunk rotenon hatására, ez a változás sem volt statisztikailag szignifikáns. Amennyiben a noradrenerg sejtek súlyosan károsodtak volna a rotenon kezelés

hatására, az azokat megközelítő phagocytáló microgliákkal nagyobb számú interakciót vártunk volna, azonban ez nem következett be.

Habár számos korábbi tanulmány során leírtak változásokat a DR (*Borgonovo et al., 2017*), a VTA és a LC területén (*Goedert et al., 2001*), mi nem találtunk károsodást ezekben a dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg rendszerekben. Ennek az lehet a magyarázata, hogy mi kifejezetten alacsony dózisú (1,5 mg/kg) rotenon kezelést alkalmaztunk, elsősorban azért, hogy az állatok általános állapota ne romoljon le annyira, hogy ne tudjunk viselkedési tesztekét végezni. A kis dózis ellenére is arra utalnak eredményeink, hogy a rotenon alkalmazott adagja viszonylag szelektíven roncsolja a EWcp/UCN1 neuronokat a SNpc/TH sejtek mellett. Mindazonáltal, nem zárhatjuk ki, hogy a betegség késői stádiumában, vagy állatmodellünkben egy nagyobb dózisú rotenon kezelés vagy hosszabb adminisztráció mellett (*Zhang et al., 2017*) egyéb területek léziója is befolyásolhatja a nem-motoros tüneteket. Mivel a projektben nem vizsgáltunk minden olyan agyterületet, ami a hangulat szabályozásban szerepet játszik, nem zárhatjuk ki, hogy a károsodás az itt nem vizsgált (*Zhang et al., 2021*) régiókban is hozzájárulhatott a megfigyelt viselkedési eltérésekhez. Ilyen agyi területek közé tartozik a prefrontális cortex, az amygdala vagy a hippocampus. Habár erre kísérletes evidenciával nem rendelkezünk, mivel ezen limbikus területeket nem vizsgáltuk, úgy véljük, hogy ezek a területek az ebben a modellben megfigyelt hangulati eltérésekben csak kisebb szerepet játszhattak, mivel érintettségük a Parkinson-kórban nem, vagy csak igen előrehaladott stádiumban jellemző (*Braak et al., 2003*).

Összefoglalva és tekintetbe véve a fenti limitációkat is, eredményeink alapján kimondható, hogy a fent említett központok vizsgálata során talált nem szignifikáns eltérések indirekt módon támasztják alá a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag kiemelt szerepét a Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarok kialakulásában.

### **5.6 A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin-1 sejtjeinek lokális, részleges ablációja a rotenon modellben találtakhoz hasonló hangulati státuszt idézett élő motoros deficit nélkül**

A EWcp/UCN1 neuronjainak hangulati állapotot befolyásoló szerepét és ezeknek a sejteknek a károsodásával járó hangulatzavarokat lokális, szelektív ablációval is alá tudtuk támasztani. Ebben a kísérletben a EWcp/UCN1 neuronjainak azt a tulajdonságát használtuk ki, hogy sejt felszínükön leptin receptort hordoznak (*Xu et al., 2011*). A leptin-

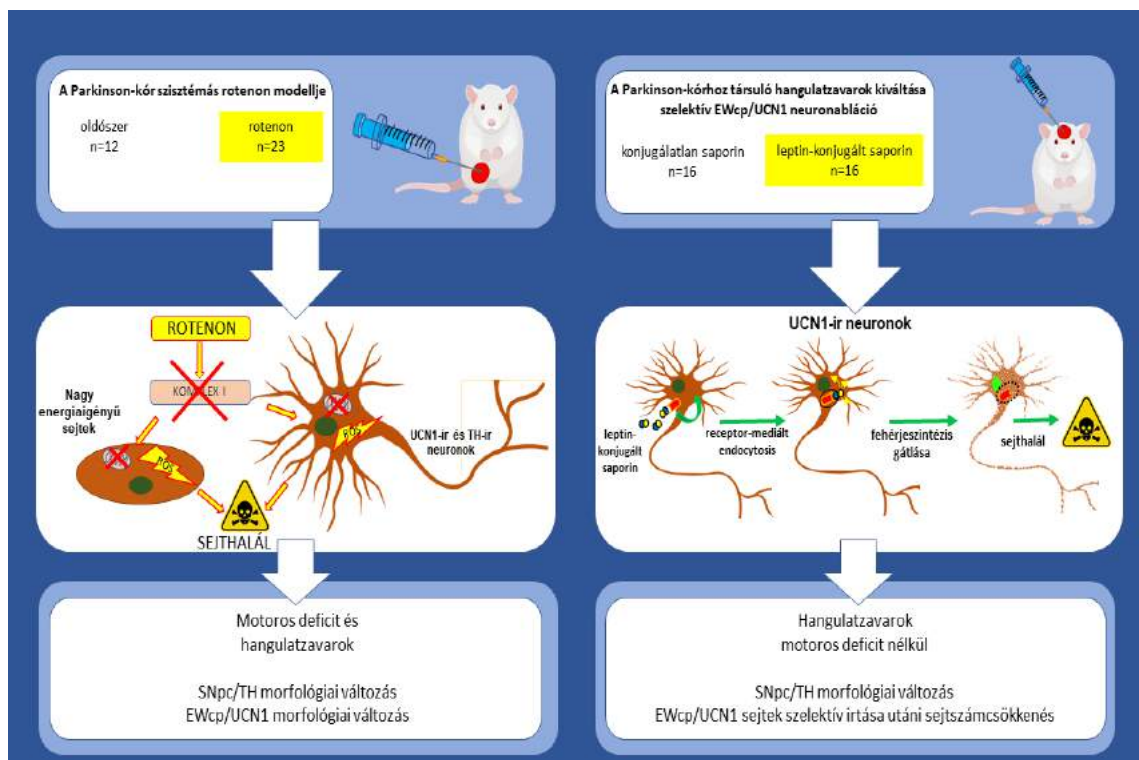
konjugált saporin receptor közvetített endocytosis révén jut be a sejtekbe, ami a riboszómális fehérjeszintézis gátlása révén (*Ferreras et al., 1993*) a sejtek apoptotikus halálához vezet (*Harris et al., 2020*). Mivel a leptin receptor csak a EWcp/UCN1 sejtek közel 50%-ára jellemző, így ezzel a módszerrel parciális UCN1 neuron elhalást tudunk elérni (*Xu et al., 2009*). A rotenon modellben látott 20-25% EWcp/UCN1 sejtvesztési arány elérése érdekében több, különböző leptin-konjugált saporin dózist is teszteltünk előkísérletek során. Végül a 0,08 µl leptin-konjugált saporin bizonyult megfelelőnek, ezzel tudtuk elérni a 20-25% közötti neurodegenerációt. A kutatócsoport tagjainak korábbi munkái alapján megállapítottuk, hogy a műtét után két hét szükséges a sejthalál kialakulásához (*Xu et al., 2021*). Mindazonáltal az elvégzett caspase 3 jelöléssel egy-egy UCN1 neuronban még a műtét utáni harmadik héten is zajló apoptotikus folyamatokat fedeztünk fel. A leptin-saporinnal kezelt patkányokból származó mintákban jelentősen magasabb aktivitást mutattak a microgliák, továbbá, az UCN1-ir sejtek és microgliák közti interakciók száma is jelentősen magasabb volt a leptin-konjugált saporinnal injektált csoportban, mely arra utal, hogy az UCN1 neuronok pusztulása nagyobb mértékű volt a leptin-saporin kezelt csoportban. Ennek ellenére aktivált microgliákat és astrocytákat a saporin kontroll csoportban is találtunk, de ez elsősorban a Hamilton-tű által okozott fizikai mikrotrauma, az injekció okozta szöveti volumenterhelés, és a BBB lokális károsodása miatt alakulhatott ki. Az abláció szelektivitását azzal támasztottuk alá, hogy kvantifikáltuk a EWcp területén a NeuN markerrel jelölt idegsejteket, melyek UCN1 immunnegatívak voltak, és azt láttuk, hogy e sejtek száma nem tért el a két csoportban.

A viselkedési tesztek során azt találtuk, hogy a leptin-konjugált saporinnal injektált állatok az OFT során megnövekedett szorongási szintet, a SPT eredményei alapján magasabb anhedónia szintet mutattak, ami a EWcp/UCN1 sejtjeinek degenerációjára vezethető vissza. Mivel a két csoport állatai által megtett távolság az OFT-ben nem mutatott különbséget és a RPT-ben is közel azonos ideig voltak képesek az eszközön fennmaradni, a parkinsonizmusra jellemző motoros tünetek náluk nem jelentkeztek. Ezzel összhangban, a SNpc dopaminerg sejtjeiben nem találtunk károsodást hiszen a EWcp-ben végzett lokális abláció erre a régióra nem terjedt ki. Ennek megfelelően, a SNpc microglia és astrocyta sejtjei inaktív morfológiát mutattak mind a saporin, mind pedig a leptin-saporin csoportban, vagyis a neuroinflammatorikus



folyamatok és a EWcp injekció fizikai hatása is lokális volt, és az nem érte el a SNpc területét.

Összefoglalva, a lokális szelektív parciális EWcp/UCN1 neuron pusztítás emelkedett szorongási szintet és depressziószerű állapotot hozott létre a patkányokban, de nem jelentek meg Parkinson-kórra jellemző motoros tünetek az állatokban. Ez további bizonyíték a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag hangulatszabályozásban betöltött kiemelkedő szerepéről, és arról, hogy a mag sérülése magyarázhatja a hangulatzavarokat Parkinson-kórban (30. ábra).



30. ábra – A disszertáció fő eredményeinek grafikus összefoglalása. (saját illusztráció)

## 6. Konklúzió

Kísérleteink során sikeresen alkalmaztuk a Parkinson-kór rotenon modelljét és a patkányokban a mozgáskoordinációt érintő szembetűnő zavarok mellett szorongást és depressziószerű tüneteket is találtunk, melyek a nem-motoros tüneteknek feleltethetők meg. A humán Parkinson-kórra jellemző szövettani elváltozásokat is reprodukálta az alkalmazott szisztémás toxikus protokoll. A SNpc dopaminerg sejtjeinek részleges neurodegenerációja, a túlélő neuronokban alpha-synuclein zárványok megjelenése, a neuroinflammáció, és a micro- és astrogliosis is alátámasztják a modell validitását. A dopaminerg SNpc területén megfigyelhető nagyon hasonló morfológiai változásokat találtunk a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortinerg sejtpopulációjában is. A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg magcsoportok vizsgálata során nem találtunk olyan szerkezeti vagy funkcionális elváltozást, amely magyarázná a hangulatzavarok kialakulását.

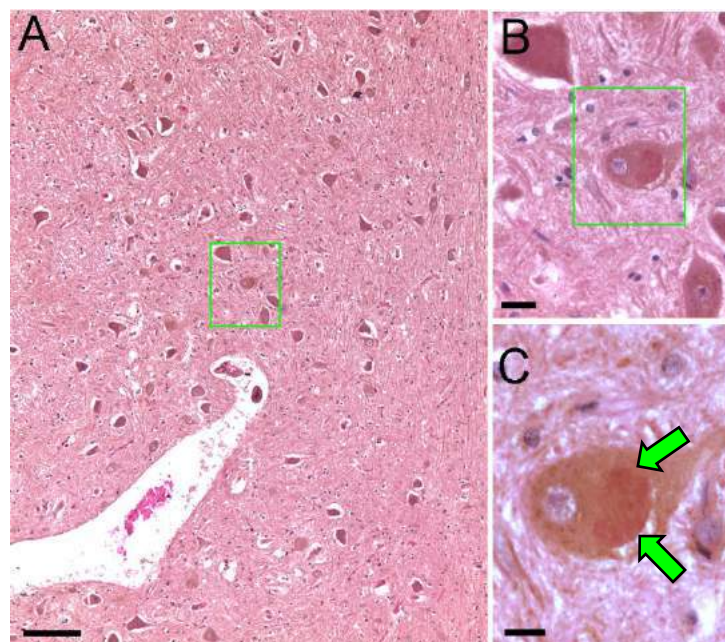
A EWcp/UCN1 idegsejtek szelektív, részleges irtása szorongásos, depressziószerű állapotot idézett elő a motoros tünetek megjelenése nélkül. Az itt előidézett sejtszámcsökkenés szinte azonos arányú volt a rotenon modellben találttal, és neuroinflammatorikus változásokkal járt együtt az UCN1 neuronok környezetében. A EWcp/UCN1 neuronok szelektív irtása tehát hangulatzavart okoz, mely magyarázatot adhat arra, hogy a Parkinson-kór miért jár hangulatzavarral.

A modellek limitációit is szem előtt tartva kijelenthetjük, hogy az általunk leírt változások együttesen alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 neuronjainak károsodása hozzájárulhat a Parkinson-kórhoz társuló nem-motoros tünetek kialakulásához. További humán vizsgálatokat tervezünk és végzünk annak érdekében, hogy ezeknek a megfigyeléseknek az esetleges diagnosztikai és terápiás relevanciáját ki tudjuk használni.

## 7. Folyamatban lévő és jövőbeli humán vizsgálatok

Kutatási projektünk indításakor azt is célul tűztük ki, hogy emberi szövetmintákon is végezzünk összehasonlító vizsgálatokat annak kimutatására, hogy a Parkinson-kórban elhunytak EWcp-ja területén találunk-e neurodegeneratív elváltozásokat más, olyan elhunytak mintáival összevetve, akik nem szenvedtek központi idegrendszeri betegségben. A 2020. március óta tartó COVID-19 pandémia miatt ezek a kísérletek sajnos nem készülhettek el, mert a szövetminták gyűjtése lehetetlenné vált, ezért ezek a vizsgálatok részben e disszertáció készítésekor folyamatban vannak, vagy jövőbeli terveink között szerepelnek.

Mindazonáltal, néhány Parkinson-kórban elhunyt archivált szövettani mintáit áttekintettük, és találtunk olyan eseteket, amelyek alapján feltételezzük (31. ábra), hogy a patkány modellben látott elváltozáshoz hasonlóan, a humán EWcp/UCN1 neuronjai is károsodnak a Parkinson-kórban, mely arra utal, hogy eredményeinknek translációs jelentősége is van. Az, hogy emberben milyen mértékben járul hozzá a EWcp/UCN1 neuronok károsodása és/vagy pusztulása a hangulatzavarokhoz, mint nem-motoros tünetekhez, hosszútávú kutatások tárgyát képezheti a jövőben.



**31. ábra – Parkinson-kórban elhunyt személy centrális-projekciójú Edinger- Westphal magjának egy UCN1 tartalmú (barna DAB csapadék) neuronjában eosinophil Lewy-test (zöld nyilak). DAB immunjelölés és hematoxin-eosin festés. Lépték: A: 100 $\mu$ m, B: 20  $\mu$ m, C: 10  $\mu$ m**

## 8. Köszönetnyilvánítás

Az Anatómiai Intézetben töltött közel 8 év alatt számtalan jellem- és személyiségformáló élménnyel gazdagodtam, életre szóló kapcsolataim születtek és diákok százainak adhattam át az emberi test szépségének tudását és remélem, az anatómia iránti szeretetet is. Ez a PhD disszertáció számomra nem csak egy tudományos értekezés összefoglalása, hanem egy többségében szép, de olykor igencsak terhes időszak zárófejezete is.

Mindenki előtt szeretnék köszönetet mondani **Gaszner Baláznak**, témavezetőmnek, aki nem csak az alap kutatás módszertanait tanította meg számomra, hanem oktatásmódszertani és – nem egyszer- a magánéleti dolgok terén is rengeteg segítséget és jó tanácsot nyújtott. Igazán jó témavezetőként TDK és DDK hallgató koromtól egészen PhD-s éveimen keresztül támogatta munkámat és követte ki számomra ezt az utat és támogatót azután is, hogy elkezdtem a rezidensképzést.

Hálás vagyok kutatótársaimnak, TDK hallgatóimnak és más orvostanhallgatóknak, így **Füredi Nórának**, **Kovács László Ákosnak**, **Farkas Józsefnek**, **Gaszner Tamásnak**, **Pytel Bencének**, **Márton Zsombor Sándornak**, **Bognár Máténak**, **Tanai Bálintnak**, **Török Zsófiának** és **Szemes Máténak**, akik idejüket és energiájukat áldozták a munkára mind a kísérletes, mind pedig az adatfeldolgozás során. Köszönöm, hogy tanácsokkal és építő kritikákkal segítették a PhD dolgozatom elkészültét.

Köszönettel tartozom a kutatócsoport asszisztenseinek, **Orbán Izabellának** és **Hegedüs Dánielnek**, akik nélkül a morfológiai munka alapja, az immunhisztológia nem készülhetett volna el ilyen magas minőségben. Hálás vagyok **Brumán Beatrixnak** a metszetek válogatásában nyújtott segítségével, illetve az **Anatómiai Intézet minden munkatársának**, akik bármilyen módon hozzájárultak a munkám sikerességéhez.

Szeretném megköszönni a szakmai segítséget az RNAscope<sup>®</sup> technika kivitelezésében **Kormos Viktóriának** és **Kecskés Angélának**, valamint a konfokális lézerpásztázó mikroszkóp használatát **Berta Gergelynek**.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Reglődi Dórának**, hogy lehetőséget biztosított számomra a kutatói és oktatói munkavégzésre az Anatómiai Intézetben.

Végül pedig hálával tartozom **családomnak, barátaimnak** a támogatásukért, akik a legnehezebb időkben is kiálltak mellettem és hittek abban, hogy ezt a célomat is véghez tudom vinni. Külön kiemelném a fő támogatómat, **Mészáros Fannit**, hiszen az ő figyelmessége és odaadása segített a legdirektebb módon.

*2014-2018-2022*

*PTE-ÁOK, Anatómia*

A kísérletek finanszírozási hátterét az alábbi pályázatok biztosították: 2020-4.1.1-TKP2020 (TKP2020-IKA-08) ; NKFIH, FK124188; KA-2019-12, KA-2021-23; ÚNKP-20-4-II-PTE-874; KA-2020-03; ÚNKP-20-4-II-PTE-547. További pályázatok: NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 “PEPSYS,” MTA-TKI14016; EFOP-3.6.2-16-2017-00008 “The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics”.

## 9. Alkalmazott rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke

5-HT	szerotonin 5-hidroxi-triptamin
6-OHDA	6-hidroxidopamin
BBB	vér-agy gát
CART	kokain- és amfetamin-regulált transzkript peptidet cocaine- and amphetamine regulated transcript
COMT	katekol-o-metiltranszferáz
CPu	nucleus caudatus-putamen caudate-putamen
CRH	corticotropin-releasing hormon
-ir	-immunreaktív
DA	dopamin
DAB	diamino-benzidin
DAMP	károsodással összefüggő molekuláris mintázat damage-associated molecular pattern
DAPI	diamino-phenylindol
DAT	dopamin-transzporter
DaTSCAN	dopamin-transzporter scan dopamin-transporter single photon emission computed tomography
DBA	biotinilált dextrán-amin
DBS	mély agyi stimuláció deep brain stimulation
DDC	dopa-dekarboxiláz
DMSO	dimetil-szulfoxid
DR	nucleus raphe dorsalis dorsal raphe nucleus
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMA	European Medicines Agency
EW	nucleus Edinger-Westphal
EWcp	centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag

FDA	Food and Drug Administration
GABA	gamma-amino-vajsav
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GI	gastrointestinalis
GIT	gastrointestinalis tractus
GPe	globus pallidus externus
GPi	globus pallidus internus
HPA	hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely hypothalamus-hypophysis-adrenal axis
IBA1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL-X	interleukin-x
iNOS	indukálható nitrogén-oxid szintáz inducible nitric oxide synthase
KIR	központi idegrendszer
L-DOPA	levodopa
LB	Lewy-testek Lewy body
LC	locus coeruleus
MAO-B	monoamin-oxidáz B
MNR	nucleus raphe medianus/ median raphe nucleus
MPP+	1-metil-4-phenylpyridinium
MPPP	1-metil-4-fenil-4-propion-piperidin
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MRI	mágneses rezonancia képalkotás magnetic resonance imaging
NA	noradrenalin
NA	numerikus apertúra
NÉBIH	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
NeuN	neuronal nuclear antigen
NGS	normás kecske szérum

	normal donkey serum
OFT	open field teszt open field test
PAG	periaqueductalis szürkeállomány periaqueductal gray matter
PAMP	kórokozó-asszociált molekuláris mintázat pathogen-associated molecular pattern
PBS	nátrium-foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat phosphate buffered saline
PD	Parkinson-kór / Parkinson's disease
PET	pozitron emissziós tomográfia/ positron emission tomography
PIR	perifériás idegrendszer
PQ <sup>2+</sup>	paraquat
PVN	nucleus paraventricularis
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
RPT	rotarod teszt/ rotarod performance test
s.c.	subcutan
SERT	szerootonin-transzporter
SN	substantia nigra
SNpc	substantia nigra pars compacta
SNpr	substantia nigra pars reticularis
SPECT	egyfoton-kibocsátásos, számítógépes metszeti képalkotás/ single-photon emission computerized tomography
SPT	cukorpreferencia teszt/ sucrose preference test
SSD	specifikus jelintenzitás/ specific signal density
thalamus VL	thalamus ventrolateralis magcsoportja
TH	tirozin-hidroxiláz



TLR	Toll-like receptor
TPH	triptofán-hidroxiláz
UCN1	urocortin 1
VLM	ventrolateralis medulla
vIPAG	ventrolateralis periaqueductalis szürkeállomány ventrolateral periaqueductal gray matter
VTA	ventralis tegmentalis area
$\alpha$ -Syn	alpha-synuclein

## 10. Függelék

Antitest neve	Forgalmazó	Cat#	Referencia PMID	RRID	Antigén / epitóp	Hígítás
<b>Anti-tirozin-hidroxiláz</b> (gazda: nyúl, poliklonális)	Abcam	ab112	[30500738]	AB_297840	Teljes hosszúságú fehérje patkány pheochromocytomából	1:2000
<b>Anti-tirozin-hidroxiláz</b> (gazda: egér, monoklonális)	Sigma	T2928	[17183538]	AB_477569	patkány tirozin- hidroxiláz	1:2000
<b>Anti-UCN1</b> (gazda: kecske, poliklonális)	Santa Cruz	SC1825	[17154253]	AB_2304014	C terminus fehérje fragmentum patkány UCN1	1:200
<b>Anti-UCN1</b> (gazda: nyúl, poliklonális)	Salk Institute Prof. WW. Vale	PBL#5779	[17444496]	AB_2315527	patkány UCN1 (aminosav 1–40)	1:20000
<b>Anti-GFAP</b> (gazda: nyúl, monoklonális)	Abcam	Ab33922	[30995489]	AB_732571	C terminus szintetikus fehérje (a szekvencia a gyártó által meghatározva)	1:1500
<b>Anti-GFAP</b> (egér monoklonális)	Novocastra	NCLLGFAP-GA5	[31045238]	AB_563739	Sertés gerincvelő	1:1000
<b>Anti-IBA1</b> (gazda: nyúl, poliklonális)	Wako Ltd.	019-19741	[16958086]	AB_83950	C terminus szintetikus fehérje of IBA1	1:1000

<b>Anti-IBA1</b> (gazda: kecske, poliklonális)	Wako Ltd.	011-27991	[31707103]		C terminussal megegyező szintetikus fehérje IBA1	1:500
<b>Anti-alpha- synuclein</b> (gazda: egér, monoklonális)	Abcam	Ab1903	[25446361]	AB_302665	Rekombináns az emberi alpha- synucleinnel teljesen megegyező szekvenciával	1:2000
<b>Anti-NeuN</b> (gazda: egér, monoklonális, (clone A60)	Millipore	MAB377	[16705682]	AB_2298772	Tisztított sejtmag egér agyból	1:1000
<b>Anti-5HT</b> (gazda: egér, monoklonális)	Universite' Claude Bernard, Lyon, France Dr. Lucienne Leger	Custom made	[27282087]		BSA-konjugált 5HT	1:20000
<b>Anti-CD68</b> (gazda: nyúl, poliklonális)	Abcam	ab125212	[33846342]	AB_10975465	szintetikus fehérje AFCITRRRQSTYQPL	1:100
<b>Anti-caspase 3</b> (gazda: nyúl, poliklonális)	Abcam	ab49822	[33098244]	AB_868673	aa167-175 a p17 alegységen belül (cleaved caspase)	1:4000
<b>Anti-TNFalpha</b> (gazda: egér, monoklonális)	Abcam	ab220210	[33846342]	AB_289258	Rekombináns TNFalpha-val egyező fehérje	1:200
<b>Anti-iNOS</b> (gazda: nyúl, monoklonális)	Abcam	ab178945	[32080625]	AB_286141	Rekombináns részlet (a beszállító tulajdonát képezi)	1:250

Normál Szamár Szérum	Jackson Immunoresearch	017-000-121		AB_2337258	.	2%
Alexa Fluor 488 számár anti-egér IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	706-545-148		AB_2340472	.	1:400
Alexa Fluor 488 számár anti-kecske IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	706-545-148		AB_2340472	.	1:600
Cy3 számár Anti-Nyúl IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	711-165-152		AB_2307443	.	1:800
Alexa Fluor 647 számár Anti-Nyúl IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	711-605-152		AB_2492288	.	1:500
Alexa Fluor 647 számár Anti-Kecske IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	705-605-003		AB_2340436	.	1:500
Biotin-SP (long spacer) számár anti-nyúl IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch	711-065-152		AB_2340593	.	1:200

	PARKINSON-KÓR ÁLLATMODELLEK				HUMÁN PARKINSON-KÓR
KIVÁLTÓ ÁGNES	MPTP	PARAQUAT	ROTENON	6-OHDA	MULTIFAKTORIÁLIS ETIOLÓGIA
FAJ	FŐEMLŐS	MAKÁKÓ/ EGÉR	EGÉR/ PATKÁNY	EGÉR/ PATKÁNY	EMBER
MAGATARTÁSI VÁLTOZÁSOK	PMID: 20887873	PMID: 22143804e	PMID: 32375371	PMID: 15503155	PMID: 31631455
DOPAMINERG NEURONKÁROSODÁS	VAN	VAN	VAN (MIN. 20%)	(LOKÁLIS ABLÁCIÓ UTÁN, AKÁR 90 %)	VAN (MIN. 70 %)
ALPHA-SYNUCLEIN ZÁRVÁNYOK	VAN	NINCS	VAN	NINCS	VAN

## 11. Irodalomjegyzék

**Abela AR**, Browne CJ, Sargin D, Prevot TD, Ji XD, Li Z, Lambe EK, Fletcher PJ. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*. **2020** May PMID: 32035145

**Abuirmeileh A**, Harkavyi A, Kingsbury A, Lever R, Whitton PS. The CRF-like peptide urocortin produces a long-lasting recovery in rats made hemiparkinsonian by 6-hydroxydopamine or lipopolysaccharide. *J Neurol Sci*. **2008** Aug PMID: 18508084

**Abuirmeileh A**, Harkavyi A, Lever R, Biggs CS, Whitton PS. Urocortin, a CRF-like peptide, restores key indicators of damage in the substantia nigra in a neuroinflammatory model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. **2007** Jul PMID: 17659087

**Abuirmeileh A**, Lever R, Kingsbury AE, Lees AJ, Locke IC, Knight RA, Chowdrey HS, Biggs CS, Whitton PS. The corticotrophin-releasing factor-like peptide urocortin reverses key deficits in two rodent models of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. **2007** Jul PMID: 17650114

**Amaral DG**, Sinnamon HM. The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog Neurobiol*. **1977** PMID: 202996

**Aschrafi A**, Verheijen JM, Gordebeke PM, Olde Loohuis NF, Menting K, Jager A, Palkovits M, Geenen B, Kos A, Martens GJ, Glennon JC, Kaplan BB, Gaszner B, Kozicz T. MicroRNA-326 acts as a molecular switch in the regulation of midbrain urocortin 1 expression. *J Psychiatry Neurosci*. **2016** Aug PMID: 27045550

**Balestrino R**, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. **2020** Jan; PMID: 31631455.

**Bamberger CM**, Wald M, Bamberger AM, Ergün S, Beil FU, Schulte HM. Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. **1998** Feb PMID: 9467598

**Barichella M**, Cereda E, Pezzoli G. Major nutritional issues in the management of Parkinson's disease. *Mov Disord*. **2009** Oct PMID: 19691125

**Bariselli S**, Glangetas C, Tzanoulinou S, Bellone C. Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem*. **2016** Dec PMID: 27546491.

**Bayguinov PO**, Oakley DM, Shih CC, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom*. **2018** Jul PMID: 29927100

**Beach TG**, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. **2010** Jun PMID: 20306269

**Becker T**, Becker T, Becker G, Seufert J, Hofmann E, Lange KW, Naumann M, Lindner A, Reichmann H, Riederer P, Beckmann H, Reiners K. Parkinson's disease and depression: evidence for an alteration of the basal limbic system detected by transcranial sonography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **1997** PMID: 9408098

- Bensimon G**, Ludolph A, Agid Y, Vidailhet M, Payan C, Leigh PN; NNIPPS Study Group. Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: the NNIPPS study. *Brain*. **2009** Jan PMID: 19029129
- Bereczki D**. The description of all four cardinal signs of Parkinson's disease in a Hungarian medical text published in 1690. *Parkinsonism Relat Disord*. **2010** May PMID: 19948422
- Berg D**, Postuma RB, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday GM, Hardy J, Lang AE, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord*. **2014** Apr PMID: 24619848
- Betarbet R**, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. **2000** Dec PMID: 11100151
- Bittencourt JC**, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol*. **1999** Dec PMID: 10553117
- Blesa J**, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. **2014** Dec PMID: 25565980
- Bloem B**, Xu L, Morava E, Faludi G, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific differences in the dynamics of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin-1 expressions in the midbrain of depressed suicide victims vs. controls. *Neuropharmacology*. **2012** Jan PMID: 21803054
- Bolaños JP**. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem*. **2016** PMID: 26968531
- Bonneh-Barkay D**, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res*. **2005** Mar PMID: 15790529
- Borgonovo J**, Allende-Castro C, Laliena A, Guerrero N, Silva H, Concha ML. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. **2017** Feb PMID: 27889469
- Bourdy R**, Barrot M. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci*. **2012** Nov PMID: 22824232
- Bouwknicht JA**, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull*. **2007** Apr PMID: 17303505
- Braak H**, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. **2003** Mar-Apr PMID: 12498954

- Braak H**, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* **2004** Oct PMID: 15338272
- Braak H**, Sastre M, Del Tredici K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **2007** Sep PMID: 17576580
- Brichta L**, Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat.* **2014** Dec PMID: 25565977
- Campos FL**, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci.* **2013** Nov PMID: 24324416.
- Cannon JR**, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* **2009** May PMID: 19385059
- Chaudhuri KR**, Healy DG, Schapira AH; National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006 Mar PMID: 16488379
- Chen Z**, Trapp BD. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem.* **2016** Jan PMID: 25693054.
- Cho JR**, Treweek JB, Robinson JE, Xiao C, Bremner LR, Greenbaum A, Gradinaru V. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Modulate Arousal and Promote Wakefulness by Salient Stimuli. *Neuron.* **2017** Jun PMID: 28602690
- Clausen BH**, Wirenfeldt M, Høgedal SS, Frich LH, Nielsen HH, Schrøder HD, Østergaard K, Finsen B, Kristensen BW, Lambertsen KL. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun.* **2020** Jun PMID: 32503645
- Cosentino M**, Kustrimovic N, Ferrari M, Rasini E, Marino F. cAMP levels in lymphocytes and CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell functions are affected by dopamine receptor gene polymorphisms. *Immunology.* **2018** Mar PMID: 28940477
- da Silva AV**, Torres KR, Haemmerle CA, Céspedes IC, Bittencourt JC. The Edinger-Westphal nucleus II: Hypothalamic afferents in the rat. *J Chem Neuroanat.* **2013** Dec PMID: 23619059
- Dahlström A**, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* **1964** Jul PMID: 5856530
- Daniel SE**, Lees AJ. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *J Neural Transm Suppl.* **1993** PMID: 8360656
- Dauer W**, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* **2003** Sep PMID: 12971891



- Deussing JM**, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev.* **2018** Oct PMID: 30109816
- Djang DS**, Janssen MJ, Bohnen N, Booij J, Henderson TA, Herholz K, Minoshima S, Rowe CC, Sabri O, Seibyl J, Van Berckel BN, Wanner M. SNM practice guideline for dopamine transporter imaging with <sup>123</sup>I-ioflupane SPECT 1.0. *J Nucl Med.* **2012** Jan PMID: 22159160
- Doorn KJ**, Moors T, Drukarch B, van de Berg Wdj, Lucassen PJ, van Dam AM. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.* **2014** Aug PMID: 25099483
- Dos Santos Júnior ED**, Da Silva AV, Da Silva KR, Haemmerle CA, Batagello DS, Da Silva JM, Lima LB, Da Silva RJ, Diniz GB, Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. The centrally projecting Edinger-Westphal nucleus--I: Efferents in the rat brain. *J Chem Neuroanat.* **2015** Oct PMID: 26206178
- Doty RL.** Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* **2012** May PMID: 22584158
- Engler H**, Doenlen R, Riether C, Engler A, Niemi MB, Besedovsky HO, del Rey A, Pacheco-López G, Feldon J, Schedlowski M. Time-dependent alterations of peripheral immune parameters after nigrostriatal dopamine depletion in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* **2009** May PMID: 19486644
- Farkas J**, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglödi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience.* **2017** Jun PMID: 28450265
- Fedtke N.**, Otto W. W., Prell T. **2018**: Ultrasonography of the Vagus Nerve in Parkinson's Disease. PMID: 30034363
- Ferreras JM**, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, Rocher MA, Soriano F, Mendéz E, Stirpe F. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta.* **1993** Oct PMID: 8218413
- Fox SH**, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog Brain Res.* **2010** PMID: 20887873
- Franco R**, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* **2007** Sep PMID: 17689291
- Füredi N**, Nagy Á, Mikó A, Berta G, Kozicz T, Pétervári E, Balaskó M, Gaszner B. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuropharmacology.* **2017** May PMID: 28267582
- García-García F**, Ponce S, Brown R, Cussen V, Krueger JM. Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. *Brain Res.* **2005** May PMID: 15854587

- Gaszner B**, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglodi D, Helyes Z. The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. **2012** Jan PMID: 22178610
- Gaszner B**, Van Wijk DC, Korosi A, Józsa R, Roubos EW, Kozicz T. Diurnal expression of period 2 and urocortin 1 in neurones of the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Stress*. **2009** Mar PMID: 18850494
- GBD 2016 Neurology Collaborators**. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. **2019** May; PMID: 30879893
- Gesi M**, Soldani P, Giorgi FS, Santinami A, Bonaccorsi I, Fornai F. The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. **2000** Aug PMID: 10940440
- Goedert M**, Jakes R, Anthony Crowther R, Grazia Spillantini M. Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy as  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Methods Mol Med*. **2001** PMID: 21318766
- Gubellini P**, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)*. **2015** Nov PMID: 26343921
- Guilloux JP**, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods*. **2011** Apr PMID: 21277897
- Gustavsson A**, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L, Gannon B, Jones DH, Jennum P, Jordanova A, Jönsson L, Karampampa K, Knapp M, Kobelt G, Kurth T, Lieb R, Linde M, Ljungcrantz C, Maercker A, Melin B, Moscarelli M, Musayev A, Norwood F, Preisig M, Pugliatti M, Rehm J, Salvador-Carulla L, Schlehofer B, Simon R, Steinhausen HC, Stovner LJ, Vallat JM, Van den Bergh P, van Os J, Vos P, Xu W, Wittchen HU, Jönsson B, Olesen J; CDBE2010Study Group. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*. **2011** Oct; PMID: 21924589
- Gyires K.**, Fürst Zs., Ferdinandy P. *Farmakológia és klinikai Farmakológia - egyetemi tankönyv* **2017** p. 440-444. ISBN: 978 963 226 738 8
- Halliday GM**, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW, Geffen LB. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res*. **1990** Feb PMID: 1691042
- Harris RBS**. Loss of leptin receptor-expressing cells in the hindbrain decreases forebrain leptin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2020** May PMID: 32228323
- Harrison L**, Pfluhrmann K, Schriever SC, Pfluger PT. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Mol Metab*. **2019** Jun PMID: 30979678

- Heinz S**, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep*. **2017** Apr PMID: 28374803
- Hirsch EC**, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. **2003** Jun PMID: 12846989
- Hofmann SG**, Curtiss J, Carpenter JK, Kind S. Effect of treatments for depression on quality of life: a meta-analysis. *Cogn Behav Ther*. **2017** Jun PMID: 28440699
- Höglinger GU**, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*. **2003** Feb PMID: 12558969
- Huang HY**, Lin SZ, Chen WF, Li KW, Kuo JS, Wang MJ. Urocortin modulates dopaminergic neuronal survival via inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and histone deacetylase. *Neurobiol Aging*. **2011** Sep PMID: 19875195
- Huang YL**, Zeng NX, Chen J, Niu J, Luo WL, Liu P, Yan C, Wu LL. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress. *Neural Regen Res*. **2020** Jun PMID: 31823896
- Hunter S**. The rostral mesencephalon in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. **1985** PMID: 2996284
- Italiani P**, Mazza EM, Lucchesi D, Cifola I, Gemelli C, Grande A, Battaglia C, Bicciato S, Boraschi D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PLoS One*. **2014** Feb PMID: 24498352
- Jackson-Lewis V**, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. **2012** Jan PMID: 22166429
- Jackson-Lewis V**, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*. **2007** PMID: 17401348
- Jankovic J**. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **2008** Apr PMID: 18344392
- Joksimovic M**, Anderegg A, Roy A, Campochiaro L, Yun B, Kittappa R et al. Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009** Nov PMID: 19850875
- Kamel F**. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science*. **2013** Aug PMID: 23950519
- Kim YE**, Jeon BS. Clinical implication of REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. **2014** PMID: 24613864

- 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** Jan PMID: 17956909
- Kohno M**, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Yamada R, Inoue KI, Kusaka Y, Kubo T, Elenkov IJ, Chrousos GP, Kondo M, Sano H. Urocortin expression in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: relation to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol Metab*. **2001** Sep PMID: 11549672
- Komoly S.**, Palkovits M. Gyakorlati neurológia és neuroanatómia egyetemi tankönyv: p. 189-198. **2018** ISBN: 978963226681 7
- Konnova EA**, Swanberg M. Animal Models of Parkinson's Disease. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; **2018** Dec PMID: 30702844
- Kormos V**, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Z, Gaszner B. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. **2016** Aug PMID: 27282087
- Kormos V**, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. **2013** Dec PMID: 24210138
- Kozicz T**, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, Horn AK, Toledo CA, Ryabinin AE. The Edinger-Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol*. **2011** Jun PMID: 21452224
- Kozicz T**, Li M, Arimura A. The activation of urocortin immunoreactive neurons in the Edinger-Westphal nucleus following stress in rats. *Stress*. **2001** Jun PMID: 22432129
- Kozicz T**, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience*. **2008** Apr 9 PMID: 18329817
- Kozicz T**, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. **1998** Feb PMID: 9527535
- Kozicz T**. CRF and CRF-related peptides in stress adaptation: from invertebrates to man. *Gen Comp Endocrinol*. **2007** Aug-Sep PMID: 17666206
- Kozicz T**. On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation. *Gen Comp Endocrinol*. **2007** Aug-Sep PMID: 17517410
- Kumar ST**, Jagannath S, Francois C, Vanderstichele H, Stoops E, Lashuel HA. How specific are the conformation-specific  $\alpha$ -synuclein antibodies? Characterization and validation of 16  $\alpha$ -synuclein conformation-specific antibodies using well-characterized preparations of  $\alpha$ -synuclein monomers, fibrils and oligomers with distinct structures and morphology. *Neurobiol Dis*. **2020** Dec PMID: 32971232
- Langston JW**. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis*. **2017** PMID: 28282815

**Lanzenberger R**, Kranz GS, Haeusler D, Akimova E, Savli M, Hahn A, Mitterhauser M, Spindelegger C, Philippe C, Fink M, Wadsak W, Karanikas G, Kasper S. Prediction of SSRI treatment response in major depression based on serotonin transporter interplay between median raphe nucleus and projection areas. *Neuroimage*. **2012** Nov PMID: 22828162

**Lastres-Becker I**, Ulusoy A, Innamorato NG, Sahin G, Rábano A, Kirik D, Cuadrado A.  $\alpha$ -Synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. **2012** Jul 15 PMID: 22513881

**Lazarini-Lopes W**, Corsi-Zuelli F, Padovan CM. Attenuation of stress-induced behavioral changes by activation of serotonin type 7 receptors in the median raphe nucleus of rats. *J Psychopharmacol*. 2020 Aug PMID: 32638619

**Le W**, Wu J, Tang Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci*. **2016** Sep PMID: 27708561

**Lee JS**, Lee HS. Reciprocal connections between CART-immunoreactive, hypothalamic paraventricular neurons and serotonergic dorsal raphe cells in the rat: Light microscopic study. *Brain Res*. **2014** Apr 15. PMID: 24642272

**Lee LN**, Huang CS, Chuang HH, Lai HJ, Yang CK, Yang YC, Kuo CC. An electrophysiological perspective on Parkinson's disease: symptomatic pathogenesis and therapeutic approaches. *J Biomed Sci*. **2021** Dec PMID: 34886870

**Li N**, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. **2003** Mar PMID: 12496265

**Liddle RA**. Parkinson's disease from the gut. *Brain Res*. **2018** Aug PMID: 29360467

**Liu MY**, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc*. **2018** Jul PMID: 29988104

**Loane C**, Wu K, Bain P, Brooks DJ, Piccini P, Politis M. Serotonergic loss in motor circuitries correlates with severity of action-postural tremor in PD. *Neurology*. **2013** May PMID: 23596065

**Lowry CA**, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. **2008** Dec PMID: 19120094

**Matthews GA**, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, Glober GF, Izadmehr EM, Thomas RE, Lacy GD, Wildes CP, Ungless MA, Tye KM. Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell*. **2016** Feb PMID: 26871628

**McGeer PL**, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. **1988** Aug PMID: 3399080

- Miklossy J**, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp Neurol*. **2006** Feb PMID: 16336966
- Miyazaki I**, Isooka N, Imafuku F, Sun J, Kikuoka R, Furukawa C, Asanuma M. Chronic Systemic Exposure to Low-Dose Rotenone Induced Central and Peripheral Neuropathology and Motor Deficits in Mice: Reproducible Animal Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. **2020** May PMID: 32375371
- Mulak A**, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. **2015** Oct PMID: 26457021
- Na SJ**, DiLella AG, Lis EV, Jones K, Levine DM, Stone DJ, Hess JF. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*. **2010** May PMID: 20169470
- Naylor JL**, Widdowson PS, Simpson MG, Farnworth M, Ellis MK, Lock EA. Further evidence that the blood/brain barrier impedes paraquat entry into the brain. *Hum Exp Toxicol*. **1995** Jul PMID: 7576819
- Nemes B**, Bölcskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, Hegedüs D, Pintér E, Helyes Z, Sándor Z. Human Somatostatin SST<sub>4</sub> Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *Int J Mol Sci*. **2021** Apr PMID: 33916620
- Oades RD**, Halliday GM. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res*. **1987** May PMID: 3107759
- Obeso JA**, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord*. **2017** Sep PMID: 28887905
- Paredes-Rodriguez E**, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguez C. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*. **2020** Apr PMID: 32322208
- Paxinos G**, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). **2007** New York: Elsevier Academic Press
- Peris J**, MacFadyen K, Smith JA, de Kloet AD, Wang L, Krause EG. Oxytocin receptors are expressed on dopamine and glutamate neurons in the mouse ventral tegmental area that project to nucleus accumbens and other mesolimbic targets. *J Comp Neurol*. **2017** Apr PMID: 2761543
- Perlmutter JS**, Mink JW. Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci*. **2006** PMID: 16776585
- Pertovaara A**. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol*. **2006** Oct PMID: 17030082

- Petraglia F**, Florio P, Gallo R, Simoncini T, Saviozzi M, Di Blasio AM, Vaughan J, Vale W. Human placenta and fetal membranes express human urocortin mRNA and peptide. *J Clin Endocrinol Metab.* **1996** Oct PMID: 8855842
- Poewe W**, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers.* **2017** Mar PMID: 28332488
- Postuma RB**, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* **2015** Oct PMID: 26474316
- Prasad EM**, Hung SY. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel).* **2020** Oct PMID: 33081318
- Pritchett K**, Mulder GB. The rotarod. *Contemp Top Lab Anim Sci.* **2003** Nov PMID: 14615963
- Rappold PM**, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011** Dec PMID: 22143804
- Robert H. Wilkins**, Irwin A. Brody. *Neurological Classics* **1997** ISBN-13: 978-1879284494
- Rodríguez-Violante M**, Zerón-Martínez R, Cervantes-Arriaga A, Corona T. Who Can Diagnose Parkinson's Disease First? Role of Pre-motor Symptoms. *Arch Med Res.* **2017** Apr PMID: 28882322
- Santos García**, T de Deus Fonticoba, E Suárez Castro, C Borrué, M Mata, B Solano Vila, A Cots Foraster, M Álvarez Sauco, A B Rodríguez Pérez, L Vela, Y Macías, S Escalante, P Esteve, S Reverté Villarroja, E Cubo, E Casas, S Arnaiz, F Carrillo Padilla, M Pu CSG. Non-motor symptoms burden, mood, and gait problems are the most significant factors contributing to a poor quality of life in non-demented Parkinson's disease patients: Results from the COPPADIS Study Cohort. Published online **2019**
- Sarkar C**, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun.* **2010** May PMID: 19896530
- Schapira AHV**, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* **2017** PMID: 28592904
- Scheggi S**, De Montis MG, Gambarana C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. *Int J Neuropsychopharmacol.* **2018** Nov 1;21(11):1049-1065. doi: 10.1093/ijnp/pyy083. PMID: 30239762
- Schneider SA**, Obeso JA. Clinical and pathological features of Parkinson's disease. *Curr Top Behav Neurosci.* **2015** PMID: 24850081
- Schober A**. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **2004** Oct PMID: 15503155

- Sikriwal D**, Ghosh P, Batra JK. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol.* **2008** PMID: 18611444.
- Sorrentino ZA**, Giasson BI, Chakrabarty P.  $\alpha$ -Synuclein and astrocytes: tracing the pathways from homeostasis to neurodegeneration in Lewy body disease. *Acta Neuropathol.* **2019** Jul PMID: 30798354
- Stanković I**, Petrović I, Pekmezović T, Marković V, Stojković T, Dragašević-Mišković N, Svetel M, Kostić V. Longitudinal assessment of autonomic dysfunction in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* **2019** PMID: 31320275
- Sun C**, Wang Y, Mo M, Song C, Wang X, Chen S, Liu Y. Minocycline Protects against Rotenone-Induced Neurotoxicity Correlating with Upregulation of Nurr1 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Biomed Res Int.* **2019** Mar PMID: 30949504
- Surmeier DJ**, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* **2017** Jan PMID: 28104909
- Svensson E**, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **2015** Oct PMID: 26031848
- Szatmári S Jr**, Ajtay A, Bálint M, Takáts A, Oberfrank F, Bereczki D. Linking Individual Patient Data to Estimate Incidence and Prevalence of Parkinson's Disease by Comparing Reports of Neurological Services and Pharmacy Prescription Refills at a Nationwide Level. *Front Neurol.* **2019** Jun; PMID: 31275231
- Szirmai I.** *Neurológia - egyetemi tankönyv*: p. 564-583. **2017** ISBN: 978963 226 643 5
- Tang Y.** Editorial: Microglial Polarization in the Pathogenesis and Therapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* **2018** May PMID: 29881344
- Valvassori S. Samira**, Roger B. Varela and João Quevedo **2017** *Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression*, Pages 991-1001, Open field test
- Vaughan J**, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature.* **1995** Nov PMID: 7477349
- Vetter DE**, Li C, Zhao L, Contarino A, Liberman MC, Smith GW, Marchuk Y, Koob GF, Heinemann SF, Vale W, Lee KF. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet.* **2002** Aug PMID: 12091910
- von Bernhardt R**, Eugenín-von Bernhardt L, Eugenín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* **2015** Jul PMID: 26257642
- Walter U**, Tsiberidou P, Kersten M, Storch A, Löhle M. Atrophy of the Vagus Nerve in Parkinson's Disease Revealed by High-Resolution Ultrasonography. *Front Neurol.* **2018** Sep PMID: 30319534



- Wang WY**, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med.* **2015** Jun PMID: 26207229
- Weitemier AZ**, Ryabinin AE. Lesions of the Edinger-Westphal nucleus alter food and water consumption. *Behav Neurosci.* **2005** Oct PMID: 16300431
- Wiley RG**, Kline IV RH. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods.* **2000** Nov PMID: 11074097
- Willson JE**, Brown DE, Timmens EK. A Toxicologic Study Of Dimethyl Sulfoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1965** Jan PMID: 14256595
- Witjas T**, Kaphan E, Azulay JP, Blin O, Ceccaldi M, Pouget J, Poncet M, Chérif AA. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling. *Neurology.* **2002** Aug PMID: 12177375
- Xu L**, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience.* **2009** Sep PMID: 19426783.
- Xu L**, Füredi N, Lutter C, Geenen B, Pétervári E, Balaskó M, Dénes Á, Kovács KJ, Gaszner B, Kozicz T. Leptin coordinates efferent sympathetic outflow to the white adipose tissue through the midbrain centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus in male rats. *Neuropharmacology.* **2021** Dec PMID: 34861283
- Xu L**, Scheenen WJ, Leshan RL, Patterson CM, Elias CF, Bouwhuis S, Roubos EW, Myers MG Jr, Kozicz T. Leptin signaling modulates the activity of urocortin 1 neurons in the mouse nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *Endocrinology.* **2011** Mar PMID: 21209012
- Yang W**, Hamilton JL, Kopil C, Beck JC, Tanner CM, Albin RL, Ray Dorsey E, Dahodwala N, Cintina I, Hogan P, Thompson T. Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. *NPJ Parkinsons Dis.* **2020** Jul PMID: 32665974
- Zaitone SA**, Abo-Elmatty DM, Elshazly SM. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. *Indian J Pharmacol.* **2012** Nov-Dec PMID: 23248410
- Zalutskaya AA**, Arai M, Bounoutas GS, Abou-Samra AB. Impaired adaptation to repeated restraint and decreased response to cold in urocortin 1 knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2007** Jul PMID: 17456638
- Zhang D**, Li S, Hou L, Jing L, Ruan Z, Peng B, Zhang X, Hong JS, Zhao J, Wang Q. Microglial activation contributes to cognitive impairments in rotenone-induced mouse Parkinson's disease model. *J Neuroinflammation.* **2021** Jan PMID: 33402167
- Zhang J**, Fan Y, Li Y, Zhu H, Wang L, Zhu MY. Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner. *J Neurochem.* **2012** Dec PMID: 23061525
- Zhang ZN**, Zhang JS, Xiang J, Yu ZH, Zhang W, Cai M, Li XT, Wu T, Li WW, Cai DF. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Res.* **2017** Jan PMID: 27876560

**Zuniga A**, Ryabinin AE. Involvement of Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus Neuropeptides in Actions of Addictive Drugs. *Brain Sci.* **2020** Jan PMID: 31991932

**Zuniga A**, Smith ML, Caruso M, Ryabinin AE. Vesicular glutamate transporter 2-containing neurons of the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus regulate alcohol drinking and body temperature. *Neuropharmacology.* **2021** Dec PMID: 34555367

## **12. Publikációk és fontosabb eredmények listája**

### **A disszertáció témájához kapcsolódó első szerzős közlemény**

**Ujvári B**, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N, Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *J Neuroinflammation*. **2022** PMID: 35109869 **IF: 8,322 (2020)**

**Összesített impakt faktor: 8,322**

### **A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények**

Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, **Ujvári B**, Kormos V, Csernus V, Hashimoto H, Reglődi D, Gaszner B. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. **2017** PMID: 28450265. **IF: 3,382**

Kovács LÁ, Berta G, Csernus V, **Ujvári B**, Füredi N, Gaszner B. Corticotropin-Releasing Factor-Producing Cells in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Extended Amygdala Show Age-Dependent FOS and FOSB/DeltaFOSB Immunoreactivity in Acute and Chronic Stress Models in the Rat. *Front Aging Neurosci*. **2019** PMID: 31649527 **IF: 3,266**

Reglődi Dóra, **Ujvári Balázs**, Fábíán Eszter, Farkas József, Gaszner Balázs, Lubics Andrea, Opper Balázs, Horváth Gabriella, Rékási Zoltán, Hollósy Tibor. Amit nem hittünk volna... Az anatómia digitális oktatása, mint sikertörténet. *ORVOSKÉPZÉS* (2021)

**Összesített impakt faktor: 6,648**

**Eredeti közlések összesített impakt faktora: 14,97**

**Fontosabb tudományos eredmények:**

**2019. október 31. - Pro Scientia Aranyérem**

**2019. április 23-26. - XXXIV. OTDK Konferencia, DE-ÁOK, Pathológia, morfológia szekció - különdíj**

**2017. április 18-21. – XXXIII. OTDK Konferencia, PTE-ÁOK, Anatómia, Morfológia I. szekció – I. helyezés**

**13. A disszertáció alapját képező tudományos folyóiratban publikált cikk**

RESEARCH

Open Access



# Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson’s disease in the rat

Balázs Ujvári<sup>1,4</sup>, Bence Pytel<sup>1</sup>, Zsombor Márton<sup>1</sup>, Máté Bognár<sup>1</sup>, László Ákos Kovács<sup>1,4</sup>, József Farkas<sup>1,4</sup>, Tamás Gaszner<sup>1,4</sup>, Gergely Berta<sup>2</sup>, Angéla Kecskés<sup>3</sup>, Viktória Kormos<sup>3</sup>, Boglárka Farkas<sup>1</sup>, Nóra Füredi<sup>1,4</sup> and Balázs Gaszner<sup>1,4\*</sup> 

## Abstract

**Background:** The neuropathological background of major depression and anxiety as non-motor symptoms of Parkinson’s disease is much less understood than classical motor symptoms. Although, neurodegeneration of the Edinger–Westphal nucleus in human Parkinson’s disease is a known phenomenon, its possible significance in mood status has never been elucidated. In this work we aimed at investigating whether neuron loss and alpha-synuclein accumulation in the urocortin 1 containing (UCN1) cells of the centrally-projecting Edinger–Westphal (EWcp) nucleus is associated with anxiety and depression-like state in the rat.

**Methods:** Systemic chronic rotenone administration as well as targeted leptin–saporin-induced lesions of EWcp/UCN1 neurons were conducted. Rotarod, open field and sucrose preference tests were performed to assess motor performance and mood status. Multiple immunofluorescence combined with RNAscope were used to reveal the functional–morphological changes. Two-sample Student’s *t* test, Spearman’s rank correlation analysis and Mann–Whitney *U* tests were used for statistics.

**Results:** In the rotenone model, besides motor deficit, an anxious and depression-like phenotype was detected. Well-comparable neuron loss, cytoplasmic alpha-synuclein accumulation as well as astro- and microglial activation were observed both in the substantia nigra pars compacta and EWcp. Occasionally, UCN1-immunoreactive neuronal debris was observed in phagocytotic microglia. UCN1 peptide content of viable EWcp cells correlated with dopaminergic substantia nigra cell count. Importantly, other mood status-related dopaminergic (ventral tegmental area), serotonergic (dorsal and median raphe) and noradrenergic (locus ceruleus and A5 area) brainstem centers did not show remarkable morphological changes. Targeted partial selective EWcp/UCN1 neuron ablation induced similar mood status without motor symptoms.

**Conclusions:** Our findings collectively suggest that neurodegeneration of urocortinergic EWcp contributes to the mood-related non-motor symptoms in toxic models of Parkinson’s disease in the rat.

**Keywords:** Rotenone, Saporin, Urocortin 1, Depression, Anxiety, Rat, RNAscope, Immunofluorescence

\*Correspondence: balazs.b.gaszner@aok.pte.hu

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Research Group for Mood Disorders, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12., 7624 Pécs, Hungary  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

Parkinson's disease (PD) is characterized by classic motor symptoms including rigor, tremor and bradykinesia attributed to neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and consequent loss of striatal dopaminergic afferentation [1]. According to the self-assessment of patients, non-motor symptoms deteriorate their quality-of-life more dramatically than motor symptoms themselves [2]. Therefore, the attention has been recently turning to PD-associated non-motor symptoms, such as anxiety and depression. While the main neuropathological hallmarks of motor symptoms such as Lewy body (LB) and Lewy neurite accumulation as well as nigral neurodegeneration are relatively well-investigated [1], much less knowledge has collected explaining the non-motor psychiatric symptoms. Anxiety disorders as well as major depression have been linked with altered noradrenergic, serotonergic and dopaminergic neurotransmission [3], but the underlying neuropathology of PD-associated mood disorders is poorly understood. Not surprisingly, the currently available pharmacotherapeutic strategies sharing the goal to increase serotonin (5-HT) and/or norepinephrine levels in the brain, provide limited efficacy [4].

Some neuropathological observations may explain the association between PD and mood disorders. For instance, LBs accumulate in the serotonergic raphe nuclei [3], dopaminergic ventral tegmental area (VTA) as well as in the norepinephrergic locus ceruleus (LC) [5]. Besides these, neurodegeneration and LB accumulation have been observed in PD in the dorsal vagal nuclear complex and in the Edinger–Westphal nucleus (EW) [6, 7].

Classically, cholinergic parasympathetic preganglionic neurons of the EW project to the ciliary ganglion controlling the sphincter pupillae and ciliary muscles. Based on this, patients with PD would be expected to suffer from compromised pupillary light reflex and lens accommodation [8]. However, this is usually not the case, even though it is known that the "rostral part of the EW suffers 50% neural loss and 3% of the cells contain Lewy bodies" [6]. This paradox suggested us that the recently defined peptidergic centrally-projecting (EWcp) division [9] of the EW may be affected.

The EWcp expresses leptin receptors [10] and a number of neuropeptides [11–14] including urocortin 1 (UCN1) [15, 16]. UCN1 belongs to the corticotropin-releasing hormone (CRH) peptide family [15] and activates both CRH receptors. The significance of CRH receptor signaling has been assessed in numerous biological functions including stress adaptation response [17]. The involvement of UCN1 in stress and depression models has been demonstrated in mouse [18, 19], rat [20–23]

and non-human primate [24] depression models. Importantly, EWcp samples of male depressed suicide victims contained decreased amount of *Ucn1* mRNA [25].

In this work our goal was to investigate the putative underlying mechanisms of mood disorders in PD. Our main hypothesis was that the specific loss or damage of EWcp/UCN1 neurons directly contributes to anxiety and depression as non-motor symptoms of PD.

To test this, a systemic chronic rotenone treatment model for PD was applied in the rat [26]. As EWcp/UCN1 neurons carry leptin receptors [10], a leptin-conjugated saporin-induced selective ablation of UCN1 neurons was also performed to validate the depression-like phenotype in rats. Behavioral, functional–morphological, biochemical and histopathological tools were used to test the motor coordination, mood status as well as morphological changes in the brain.

## Methods

### Animals

In-house bred male Wistar rats (breeding pairs purchased from Animalab Kft., Vác, Hungary) were housed in three-per-cage (40 × 25 × 20 cm) groups in temperature and humidity-controlled environment. Animals were supplied with standard rodent chow and tap water ad libitum. Experiments were approved by the Animal Welfare Committee of Pécs University, the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary and the National Food Chain Safety Office in Hungary (license No: BA02/2000-49/2017).

### Systemic rotenone treatment model of PD

Eleven-month-old animals were subjected to 6 weeks daily subcutaneous rotenone treatment [(R8875-1G, Sigma, Budapest, Hungary) ( $n=23$ ; 1.5 mg/kg/day rotenone dissolved in 20  $\mu$ l/kg/day dimethyl-sulfoxide (Fisher Scientific, Loughborough, UK) and 1 ml/kg sunflower oil vehicle (8000-21-6, Molar Chemicals Kft., Halásztelek, Hungary)] vs. vehicle injected controls ( $n=12$ ). Five rats due to humane endpoint and six others showing less than 20% SNpc dopaminergic neuron loss upon rotenone treatment were removed from the study [27]. Finally, 12 rotenone-treated rats were included.

### Sucrose preference test

The anhedonia level was determined by sucrose preference test (SPT). Seventy-two hours before testing 1 m/v% sucrose solution and tap water were offered. After 24 h, the place of the bottles was reversed. On the test day, water deprivation was applied between 6 a.m. and 4 p.m. Then, the two bottles were offered for individually caged animals for 3 h. Sucrose preference was calculated according to the widely used formula [28].

**Open field test**

The open field test (OFT) was performed in a brightly lit box [50 × 50 × 38 cm] with black background. Video recordings of 5 min were analyzed with SMART Junior Tracking software (PanLab, Barcelona, Spain) to assess the time spent in the periphery of the box, and the traveled distance [29].

**Rotarod test**

Rotarod performance test (RPT) was used to assess motor coordination. Animals were first pre-trained to run on the accelerating rotating axis three times. For testing, rats were placed on the axis of the device (47750, Ugo Basile, Gemonio, Italy) and the time interval rats spent on the rotating axis was registered [30].

**Targeted toxin-induced lesion of EWcp/UCN1 neurons**

The EWcp contains neuron populations that do not express UCN1 [14, 31]. Because in this project, our aim was to study the significance of UCN1 neuron loss, we applied a selective neuron ablation by saporin. This neurotoxin enters neurons only if it is conjugated to a substance that is internalized by receptor-mediated endocytosis and irreversibly inhibits the cells' protein synthesis [32]. As EWcp/UCN1 neurons carry leptin receptors [10], leptin-conjugated saporin injection provides a reliable tool to perform selective UCN1 neuron ablation [33].

Thirty-two rats were intraperitoneally anesthetized by ketamine (78 mg/kg, Richter, Budapest, Hungary) and xylazine (13 mg/kg, Eurovet, Nagyatád, Hungary). Using a stereotaxic apparatus, 0.08 μl leptin-conjugated saporin ( $n=16$ ) or saporin ( $n=16$ ) solution (#KIT-47, ATS INC, Carlsbad, CA, USA) was injected into the EWcp area. From a point 1.5 mm left and 4.8 mm caudal to the Bregma [34] an oblique injection path closing 19° angle with the vertical axis was set and the Hamilton needle was introduced to a depth of 5.8 mm [33, 35]. Compounds were injected in 30 s. Thirty seconds later, the needle was retracted by 0.5 mm, and 1 min later, it was removed.

If the magnitude of UCN1 neuron loss was less than 20% upon leptin-saporin treatment, the animal was excluded (8 rats) from the experiment. Six rats were excluded, because the injection path deviated from the planned route, or the needle caused physical damage in the EWcp. Finally, nine saporin (control) and leptin-saporin-injected rats were included into the statistics. Behavioral testing was performed after 10 days recovery as described above. Behavioral data were converted into  $Z$ -scores using the formula  $Z=(X - \mu)/\sigma$ , where

( $X$ ) represents the raw data of the individual animal, ( $\mu$ ) and ( $\sigma$ ) the mean and standard deviation of the control group, respectively [36]. Tissue sampling was performed 2 weeks after surgery.

**Tissue and sample preparation**

Intraperitoneally anesthetized (urethane, 1.4 g/kg, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) rats were perfused with 50 ml 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) followed by 250 ml 4% paraformaldehyde in Millonig's buffer. Brains were dissected and post-fixed for 14 days. Thymus and adrenals were collected and weighed.

Thirty μm coronal vibratome (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) sections in six series were collected between the optic chiasm and middle cerebellar peduncle. Sections were stored in PBS containing 0.01% sodium azide at 4 °C [22].

**Multiple immunofluorescence labeling**

Sections of caudate-putamen (CPu) [Bregma -0.36 mm - (-0.84 mm)], EWcp [Bregma -5.88 mm - (-6.72 mm)], SNpc [Bregma -5.16 mm - (-6.24 mm)], VTA [Bregma -5.16 mm - (-6.24 mm)], dorsal- (DR) [Bregma -6.96 mm - (-7.32 mm)] and median (MNR) raphe nucleus [Bregma -7.20 mm - (-7.80 mm)] LC and A5 noradrenergic cells [Bregma -9.60 mm - (-10.08 mm)] were manually selected [34] for multiple immunofluorescence labelings on samples from the rotenone model. After epitope retrieval (10 min, 90 °C, sodium-citrate buffer; pH 6.0), permeabilization (0.5% Triton X-100; Sigma) and 2% normal donkey serum (60 min) treatment, sections were incubated in cocktails of primary antibodies for double (16 h, room temperature) or triple labelings (48 h, 4 °C). Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1, rabbit)-tyrosine-hydroxylase (TH, mouse) double labeling was performed in the SN, VTA, LC and A5. 5-HT (mouse)-IBA1 labeling was conducted in the DR and MNR. CPu was assessed by TH (rabbit)-NeuN (mouse) labeling. UCN1 (goat)-IBA1-glia fibrillary acidic protein (GFAP, mouse); moreover, UCN1 (goat)-alpha-synuclein (mouse)-TH (rabbit) triple stainings were performed. Reactive microglia were identified by IBA1 (goat)-CD68 (rabbit) double labeling in the EWcp. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha, rabbit)-GFAP (mouse)-IBA1 (goat), moreover, inducible nitric oxide-synthase-(iNOS, rabbit)-GFAP (mouse)-IBA1 (goat) triple labelings were conducted in the SNpc. In the targeted toxin model, UCN1 (rabbit)-GFAP (mouse)-IBA1 (goat) and a UCN1 (goat)-TH (mouse)-caspase 3

(rabbit) triple labelings, moreover, a UCN1 (goat)–NeuN (mouse) double labeling was performed. The respective fluorophore-conjugated or biotinylated secondary sera were applied either for 3 h in double or overnight in triple stainings. Biotinylated donkey anti-rabbit serum was detected by Cy5-conjugated

streptavidin (Jackson, 1:1500, 3 h). Finally, sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried and covered with glycerol-PBS.

Antisera were characterized earlier as referenced in Table 1. Omission and non-immune serum replacement

**Table 1** Summary of antibody details

Antibody name	Vendor	Cat#	References	RRID	Antigen	Dilution
Anti-tyrosine-hydroxylase (host: rabbit, polyclonal)	Abcam	ab112	[65]	AB_297840	Full length protein from rat pheochromocytoma	1:2000
Anti-tyrosine-hydroxylase (host: mouse, monoclonal)	Sigma	T2928	[66]	AB_477569	rat tyrosine-hydroxylase	1:2000
Anti-UCN1 (host: goat, polyclonal)	Santa Cruz	SC1825	[21]	AB_2304014	C terminus peptide fragment of rat UCN1	1:200
Anti-UCN1 (host: rabbit, polyclonal)	Salk Institute Prof. WW. Vale	PBL#5779	[67]	AB_2315527	rat UCN1 (amino acids 1–40)	1:20,000
Anti-GFAP (host: rabbit, monoclonal)	Abcam	Ab33922	[68]	AB_732571	C terminus synthetic peptide (sequence commercially sensitive)	1:1500
Anti-GFAP (mouse monoclonal)	Novocastra	NCLLGFP-GA5	[69]	AB_563739	Porcine spinal cord	1:1000
Anti-IBA1 (host: rabbit, polyclonal)	Wako Ltd	019–19,741	[70]	AB_839504	C terminus synthetic peptide of IBA1	1:1000
Anti-IBA1 (host: goat, polyclonal)	Wako Ltd	011–27,991	[71]		Synthetic peptide corresponding to C-terminal of IBA1	1:500
Anti-alpha-synuclein (host: mouse, monoclonal)	Abcam	Ab1903	[72]	AB_302665	Recombinant full length protein corresponding to human alpha-synuclein	1:2000
Anti-NeuN (host: mouse, monoclonal, (clone A60))	Millipore	MAB377	[73]	AB_2298772	Purified cell nuclei from mouse brain	1:1000
Anti-5-HT (host: mouse, monoclonal)	Universite' Claude Bernard, Lyon, France Dr. Luciene Leger	Custom made	[18]		BSA-conjugated 5HT	1:20,000
Anti-CD68 (Host: rabbit, polyclonal)	Abcam	ab125212	[74]	AB_10975465	Synthetic peptide AFCITRRRQSTYQPL	1:100
Anti-caspase 3 (host: rabbit, polyclonal)	Abcam	ab49822	[75]	AB_868673	aa167–175 within the p17 subunit (cleaved caspase)	1:4000
Anti-TNF-alpha (host: mouse, monoclonal)	Abcam	ab220210	[74]	AB_2892586	Recombinant full length protein corresponding to human TNFalpha	1:200
Anti-iNOS (host: rabbit, monoclonal)	Abcam	ab178945	[76]	AB_2861417	Recombinant fragment (information is proprietary to the supplier)	1:250
Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch	017–000-121		AB_2337258	-	2%
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	706–545-148		AB_2340472	-	1:400
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	706–545-148		AB_2340472	-	1:600
Cy3 donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711–165-152		AB_2307443	-	1:800
Alexa Fluor 647 donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711–605-152		AB_2492288	-	1:500
Alexa Fluor 647 donkey Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	705–605-003		AB_2340436	-	1:500
Biotin-SP (long spacer) donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711-065-152		AB_2340593	-	1:200



of primary or secondary antibodies prevented all immunolabelings (images not shown).

### RNAscope in situ hybridization combined with immunofluorescence

In the rotenone model, four EWcp sections per animal were pretreated for RNAscope according to our recently developed protocol [37] optimized for 30  $\mu\text{m}$ -thick PFA fixed sections. Subsequent steps of RNAscope protocol was performed according to the supplier's suggestions. *Ucn1* mRNA was visualized by Cy5 (1:3000). A mouse *Ucn1* mRNA probe (Cat No: 466261, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) was used as mouse and rat UCN1 show full peptide sequence identity [38]. Some randomly selected sections were hybridized with triplex positive control probes for the rat (320891) or with triplex negative control probes (320871). After channel development positive control gave well-recognizable signal, while no fluorescence was seen in negative controls (images not shown).

Subsequently, slides were further processed for double-immunofluorescence using goat anti-UCN1 (1:175) and rabbit IBA1 (1:1000) for 48 h at 4 °C. After washes, Alexa 488-conjugated donkey anti-goat and Cy3-conjugated donkey anti-rabbit sera (1:500, 3 h) were used. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and covered with antifade medium.

### Microscopy, digitalization and morphometry

Samples were digitalized using Olympus FluoView 1000 confocal microscope with  $\times 20$  (NA: 0.5),  $\times 40$  (NA: 0.8) and  $\times 60$  (NA: 1.49 oil) objectives. The excitation and emission of fluorophores were set according to the built-in settings of the FluoView software (Fv10-ASW; Version 0102). Blue (DAPI), red (Cy3), green (Alexa 488) and white (Cy5 and Alexa 647) virtual colors were used.

Morphometry including counting of cells, nerve terminals and signal dots of the RNA labeling, densitometry

and cell size measurement was performed on non-edited digital images. Every quantitation was carried out on four to six images per animal. The intensity of fluorescent signal was semi-quantified by measurement of the cytoplasmic signal corrected for the background, yielding the specific signal density (SSD) [18]. The measurement and unbiased stereological cell counting [39] was performed by ImageJ software (version 1.52a, NIH). Glial cell morphology was conducted according to the scoring system by Harrison et al. [40]. For publication purposes, representative images were cropped, contrasted and edited using Adobe Photoshop software.

### Statistics

Data were presented as mean of the group  $\pm$  standard error of the mean. Statistics were performed by two-sample Student's *t* test after assessment of data distribution. Outlier data beyond the 2-sigma range were excluded. Spearman's rank test was also applied to search for correlations. Mann–Whitney *U* test was used to assess results of glial activity scores. Alpha was set to 5% in all cases.

### Results

#### Partial loss of EWcp/UCN1 neurons in the rotenone model is associated with depression-like phenotype and increased anxiety

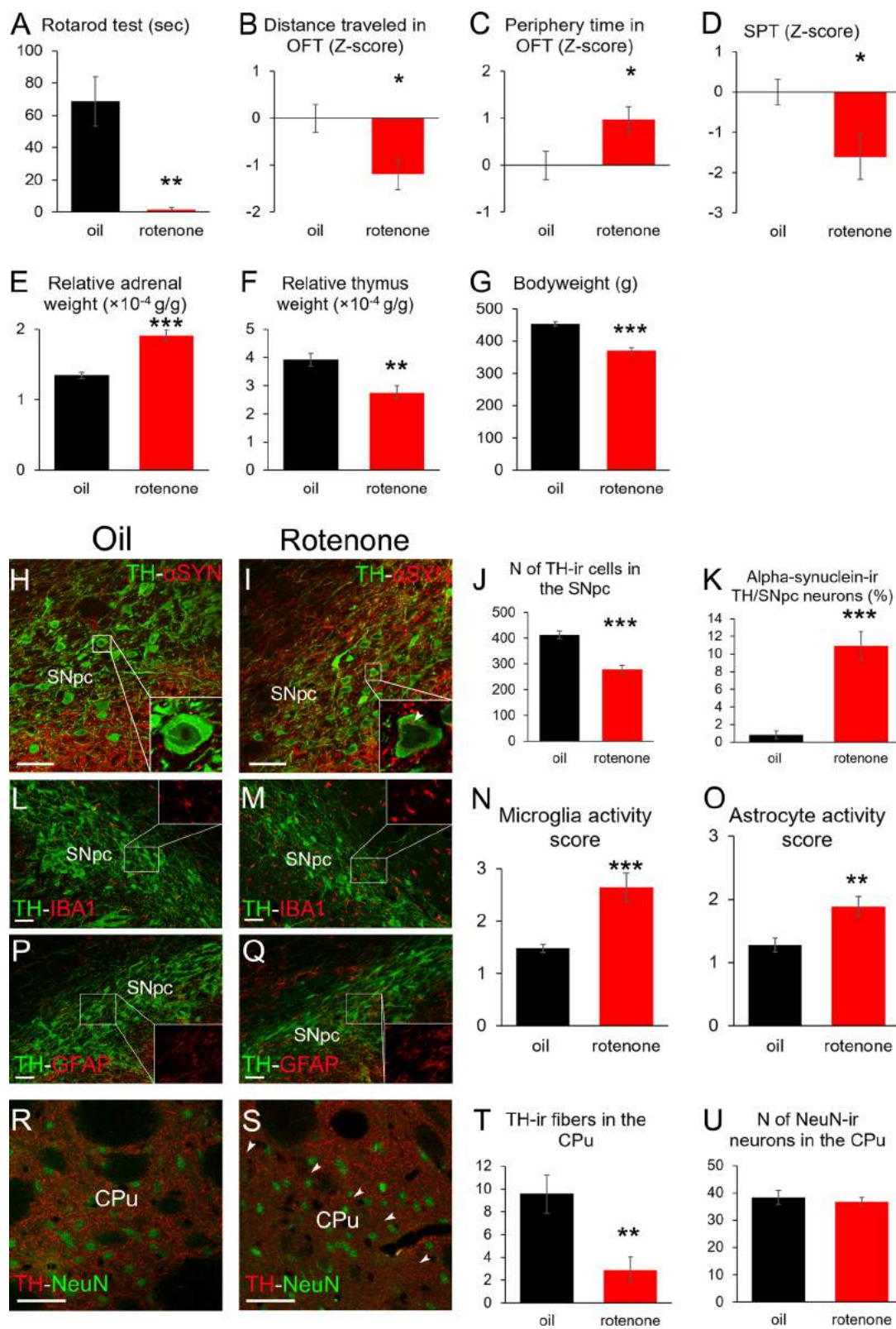
RPT revealed that rotenone-treated rats were practically unable to stay on the rotating rod ( $1.75 \pm 1.25$  s) in contrast to vehicle-treated animals which ran  $68.83 \pm 15.37$  s (Fig. 1A  $t(22) = 4.34$ ;  $p = 0.002$ ). In OFT, deterioration of motor skills was also reflected by the reduced distance traveled (Fig. 1B  $t(19) = 2.68$ ;  $p = 0.01$ ).

Regarding mood status, OFT revealed that parkinsonian rats spent more time (Fig. 1C,  $t(21) = 2.36$ ;  $p = 0.027$ ) in the periphery suggesting increased level of anxiety. The anhedonia level increased also upon rotenone treatment as rats consumed less sweetened fluid in SPT (Fig. 1D,  $t(22) = 2.34$ ;  $p = 0.029$ ). Increased relative adrenal weight

(See figure on next page.)

**Fig. 1** Increased anxiety and depression-like behavior in the rotenone model of Parkinson's disease. Rotenone-treated rats (red bars) were unable to run on the rotating rod in the rotarod test (A) and they moved less in the open field test (OFT) (B). The increased anxiety level was proven by longer time spent in the periphery of the OFT arena (C). Rotenone-treated rats drank less sweetened water in the sucrose preference test (SPT) suggesting increased anhedonia (D). Relative adrenal (E) and thymus (F) weights as well as bodyweight (G) data suggest increased hypothalamus–pituitary–adrenal axis activity in the rotenone-treated group compared to vehicle (oil) injected rats (black bars). Tyrosine-hydroxylase (TH, green in H, I)—alpha-synuclein ( $\alpha\text{SYN}$ , red in H, I) double labeling in the substantia nigra pars compacta (SNpc) revealed reduced SNpc/TH-immunoreactive (ir) cell count (J) in rotenone-treated rats. Cytoplasmic alpha-synuclein-ir inclusions (see arrowhead in insert of panel I) were observed upon rotenone treatment in SNpc/TH neurons (K). The assessment of microglia morphology in the SNpc by TH (green in L, M)—ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1, red in L, M) double labeling revealed increased activity score upon rotenone treatment (N). TH (green in P, Q)—glial fibrillary acidic protein (GFAP, red in P, Q) double labeling revealed also increased astrogliosis (O) in rotenone-treated rats. TH (red in R, S)—NeuN (green, R, S) labeling in the caudate-putamen (CPu) revealed reduced dopaminergic fiber density in rotenone-treated rats (T) occasionally with focal pattern (see the border of focal fiber loss area indicated by arrowheads in panel S). Rotenone treatment did not induce neuron loss in the striatum (U).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Student's *t* test or in Mann–Whitney *U* test in N and O.  $n = 8–12$ . Bars: 50  $\mu\text{m}$



**Fig. 1** (See legend on previous page.)

(Fig. 1E,  $t(21) = -5.22$ ;  $p = 0.0003$ ), reduced relative thymus weight (Fig. 1F,  $t(22) = 2.88$ ;  $p = 0.008$ ) and bodyweight (Fig. 1G,  $t(22) = 6.16$ ;  $p = 0.000005$ ) suggest long-term increased hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis activity in rotenone-treated rats.

The number of SNpc/TH-immunoreactive (ir) cells decreased by 32.4% (Fig. 1J,  $t(22) = 6.12$ ;  $p = 0.00004$ ) in rotenone-treated rats. Alpha-synuclein-ir inclusions were found in  $10.96 \pm 1.58\%$  of SNpc/TH neurons (Fig. 1H, I) in rotenone-treated rats, unlike ( $0.82 \pm 0.42\%$ ) in controls (Fig. 1K,  $t(20) = -6.18$ ;  $p = 0.00005$ ). In addition, IBA1 staining suggested elevated microglial (Fig. 1L–N,  $U(22) = 14$ ;  $p = 0.0008$ ) activation scores, while GFAP revealed increased astroglial activity (Fig. 1O–Q,  $U(22) = 26.5$ ;  $p = 0.008$ ) in rotenone-treated rats. The density of TH-ir nerve fibers was reduced by 69% (Fig. 1T,  $t(19) = 3.41$ ;  $p = 0.003$ ) in the CPu of rotenone-injected rats. Occasionally, also focal loss of striatal TH immunoreactivity was found (Fig. 1R, S). The counting of NeuN-ir cells revealed no neuron loss in the CPu (Fig. 1R, S, U,  $t(19) = 0.57$ ;  $p = 0.57$ ). Furthermore, in the SNpc of rotenone-exposed rats, increased TNF-alpha immunoreactivity in astrocytes (Fig. 2A–C,  $t(22) = -4.94$ ;  $p = 0.00006$ ) and elevated microglial (Fig. 2D–F,  $t(10) = -2.62$ ;  $p = 0.025$ ) and neuronal iNOS immunoreactivity (Fig. 2D, E, G,  $t(10) = -4.25$ ;  $p = 0.0016$ ) was detected, compared to controls.

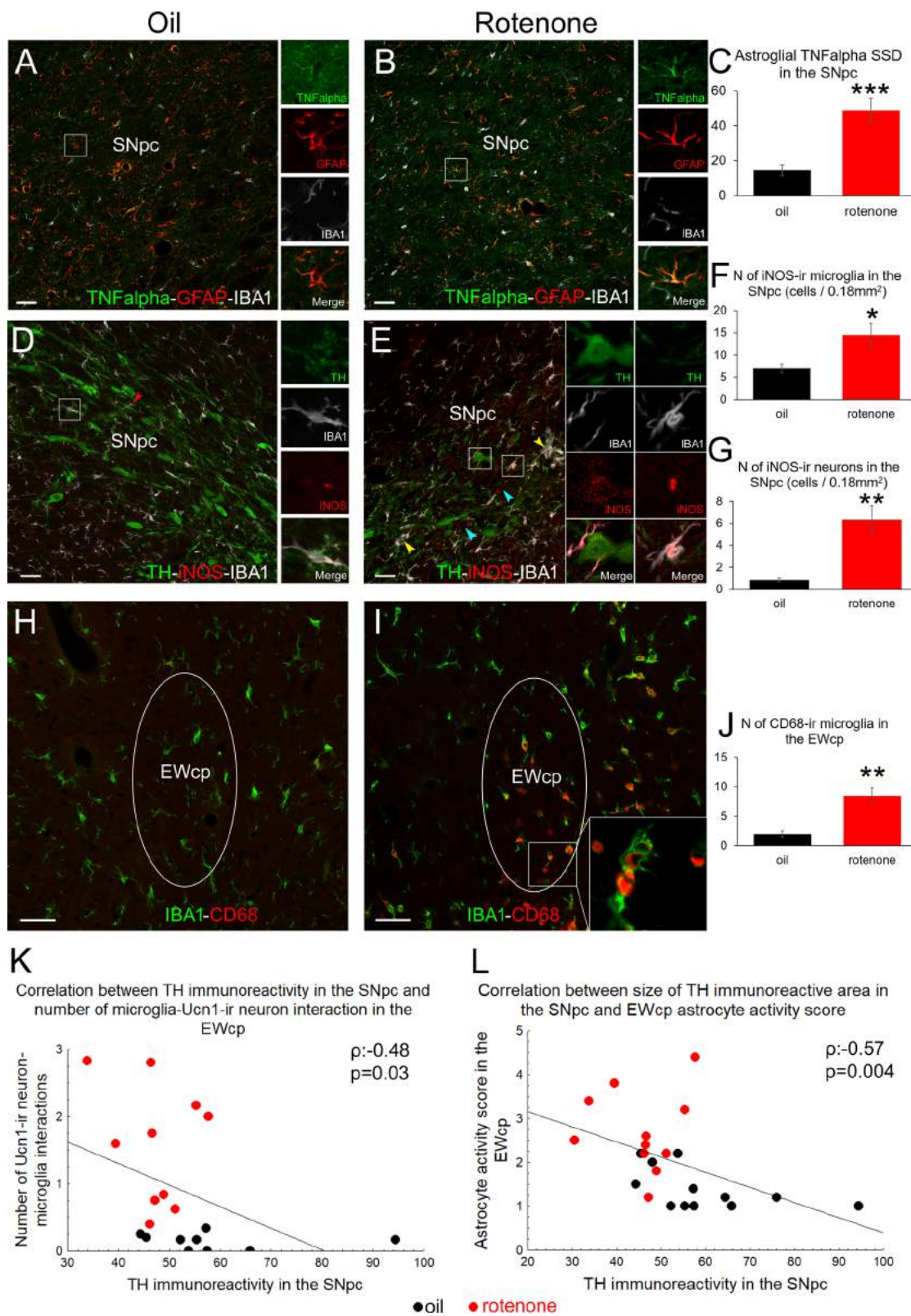
When testing our main hypothesis, we found that the number of UCN1 neurons decreased upon rotenone treatment (Fig. 3A–C,  $t(22) = 2.52$ ;  $p = 0.019$ ) and they showed pyknotic morphology (Fig. 3A, B, D,  $t(18) = -3.62$ ;  $p = 0.0019$ ). Occasionally, UCN1 neurons were found to disintegrate, where IBA1-ir microglial processes surrounded the UCN1-ir debris of the neurons (Fig. 3G, H, Additional file 1: video 1A, Additional file 2: video 1B). Microglia interacted about 10-times more frequently with UCN1 neurons in rotenone-treated

rats (Fig. 3I,  $t(18) = -4.28$ ;  $p = 0.0004$ ) than in controls. Alpha-synuclein-ir cytoplasmic inclusions were observed in  $11.94 \pm 1.28\%$  of the UCN1 neurons in rotenone-treated rats (Fig. 3B, E), unlike in controls (Fig. 3A, E;  $0.62 \pm 0.33\%$ ;  $t(20) = -8.52$ ;  $p < 10^{-6}$ ). GFAP labeling in the EWcp (Fig. 3J, K) revealed that rotenone induced also astrocyte activation (Fig. 3L; Mann–Whitney test;  $U(22) = -14.50$ ;  $p = 0.0009$ ). To test whether astrogliosis was restricted to EWcp within the periaqueductal gray matter (PAG), astrocyte morphology was assessed in the ventrolateral PAG (Fig. 3J, K) and no remarkable astrogliosis was seen here (Fig. 3M,  $U(22) = 52.00$ ;  $p = 0.24$ ). Correlation analyses revealed significant inverse relationship of the SNpc/TH immunoreactivity both with microglial (Fig. 2K; Spearman's  $\rho: -0.48$ ;  $p = 0.03$ ) and with astrocyte activity scores (Fig. 2L; Spearman's  $\rho: -0.57$ ;  $p = 0.004$ ) in the EWcp. In contrast, no correlation was found between SNpc/TH immunoreactivity and TNF-alpha (Spearman's  $\rho: -0.26$ ;  $p = 0.79$ ) or iNOS (Spearman's  $\rho: -0.82$ ;  $p = 0.42$ ) immunoreactivities (data not illustrated).

Rotenone treatment resulted in 126%-elevation of UCN1 peptide immunosignal (compare Fig. 3A with 3B or 3N with 3O") (Fig. 3Q,  $t(22) = -11.11$ ;  $p < 10^{-6}$ ). We successfully combined immunofluorescence with RNAscope in situ hybridization for *Ucn1* mRNA. The EWcp perikarya contained high amount of cytoplasmic *Ucn1* mRNA that was often inhomogeneously distributed in clusters of confluent signal dots, especially in rotenone-treated animals. This uneven distribution made the quantitation of cytoplasmic mRNA signal difficult. In contrast, well-countable *Ucn1* mRNA signal puncta were dispersed in the karyoplasm of neurons (Fig. 3N', O'). Quantitation of intranuclear *Ucn1* mRNA transcripts revealed decreased *Ucn1* mRNA expression by 57.8% in rotenone-treated rats (Fig. 3P;  $t(18) = -4.08$ ;  $p = 0.0008$ ). A strong negative correlation was found between cellular

(See figure on next page.)

**Fig. 2** Neuroinflammatory markers support the validity of the rotenone model. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha, green in **A** and **B**) specific signal density (SSD) in glial fibrillary acidic protein (GFAP; red in **A** and **B**)-expressing astrocytes was detected in the substantia nigra pars compacta (SNpc) as shown in graph **C** also. No TNF-alpha immunoreactivity was observed in ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1)-containing microglia (white in **A** and **B**). Inducible nitric oxide synthase (iNOS, red in **D** and **E**) immunoreactivity was detected only in very few IBA1 (white in **A** and **B**)-containing SNpc microglia in control rats (boxed area and red arrowhead in **D**). Rotenone treatment increased the number of iNOS immunoreactive (-ir) IBA-immunopositive microglia (inset in **E**) that occasionally formed active cell clusters (yellow arrowheads in **E**). Some faintly iNOS-ir nerve cell bodies (blue arrowheads in **E** and graph **G**) were also found and occasionally, TH-ir neurons also appeared to show weak iNOS positivity (see inset in **E**). IBA1 (green in **H** and **I**) and cluster of differentiation 68 (CD68, red in **H** and **I**) double-labeling revealed that upon rotenone treatment (**I**), the microglial cells in the centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus (EWcp) co-express CD68 (**J**) suggesting their reactivity. Black bars: vehicle (oil) injected rats, red columns: rotenone-treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Student's  $t$  test,  $n = 6$ . Bars: 50  $\mu\text{m}$ . Scatter plot **K** demonstrates the negative correlation between the TH immunoreactivity in the SNpc and EWcp microglial activity scores. Scatter plot **L** illustrates the inverse relationship between SNpc/TH immunoreactivity and astroglial activity scores



**Fig. 2** (See legend on previous page.)

UCN1-SSD and nuclear *Ucn1* mRNA content (Fig. 3T, Spearman's  $\rho = -0.57$ ;  $p = 0.009$ ). The IBA1 co-labeling identified some EWcp neurons with very low *Ucn1* mRNA content approached by reactive microglial cells showing phagocytotic morphology (Fig. 3O–O"). Similar microglia in other sections were found to co-express CD68 (Fig. 2H–J,  $t(10) = -4.53$ ;  $p = 0.001$ ). Correlation analyses also support the recruitment of EWcp in PD, as EWcp/UCN1 content correlated both with the rotarod performance (Fig. 3R, Spearman's  $\rho = -0.70$ ;  $p = 0.0001$ ) and SNpc/TH cell counts (Fig. 3S, Spearman's  $\rho = -0.66$ ;  $p = 0.004$ ).

The toxin distribution in systemic rotenone administration is not restricted to the dopaminergic SNpc and UCN1-ir EWcp. To test if the damage of other mood control-related brain regions contributed to PD-associated depression and anxiety in this model, we also studied dopaminergic, serotonergic and noradrenergic brainstem centers. Neither VTA (Fig. 4A–C,  $t(22) = 0.48$ ;  $p = 0.63$ ) nor DR (Fig. 4E–G,  $t(16) = 0.22$ ;  $p = 0.82$ ) suffered dopaminergic neuron loss. Assessment of TH-ir cell–microglia interactions revealed no significant rotenone effect in the VTA (Fig. 4A, B, D,  $t(21) = 1.30$ ;  $p = 0.20$ ) and DR (Fig. 4E, F, H,  $t(21) = -0.21$ ;  $p = 0.83$ ). No serotonergic neuron loss was found in the DR (Fig. 4I–K,  $t(15) = -0.73$ ;  $p = 0.47$ ) and MNR (Fig. 4M–O,  $t(15) = 0.26$ ;  $p = 0.79$ ). Rotenone treatment did not increase the number of microglia–5HT-ir neuron interactions in DR (Fig. 4, I, J, L,  $t(15) = -1.76$ ;  $p = 0.099$ ) and MNR (Fig. 4, M, N, P,  $t(15) = 0.78$ ;  $p = 0.44$ ) either. Noradrenergic neuron loss was found neither in the LC (Fig. 4Q–S,  $t(15) = 1.07$ ;  $p = 0.30$ ) nor in the A5 area (Fig. 4U–W,  $t(18) = 0.26$ ;  $p = 0.79$ ). No significant microglia activation was seen in the LC (Fig. 4Q, R, T,  $U(19) = 35.00$ ;  $p = 0.45$ ) and A5 (Fig. 4U, V, X,  $U(18) = 24.50$ ;  $p = 0.16$ ).

### Selective EWcp/UCN1 neuron ablation replicates mood status-related symptoms observed in parkinsonian rats

EWcp/UCN1 neurons were selectively ablated by targeted leptin–saporin toxin injection to test whether the administration causes similar behavioral anomalies to those observed in the rotenone model.

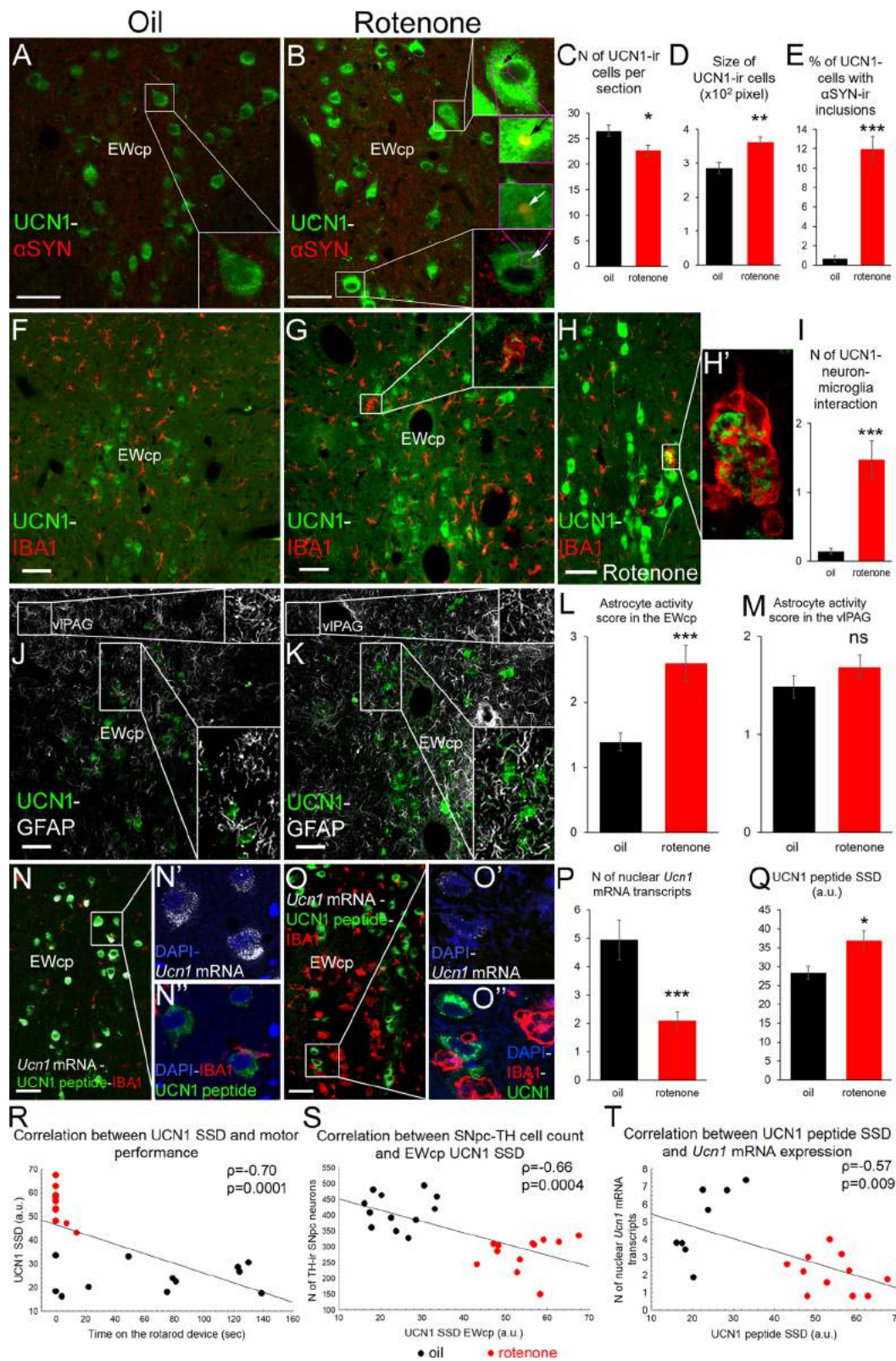
SPT revealed that leptin–saporin caused increased anhedonia (Fig. 5A,  $t(16) = 2.13$ ;  $p = 0.048$ ). The UCN1 neuron-ablated rats spent longer time (Fig. 5B,  $t(16) = -2.70$ ;  $p = 0.015$ ) next to the walls in OFT, suggesting increased anxiety. Importantly, these animals traveled the same total distance as controls (Fig. 5C,  $t(16) = 0.45$ ;  $p = 0.65$ ). RPT also showed that leptin–saporin injection did not affect motor performance (Fig. 5D,  $t(16) = -0.20$ ;  $p = 0.84$ ).

UCN1–NeuN labeling proved that leptin–saporin injection reduced the number of EWcp/UCN1 cells by 24.5% (Fig. 5E, G,  $t(16) = 4.56$ ;  $p = 0.0003$ ). No significant reduction of UCN1 immunonegative but NeuN-ir EWcp cells was seen (Fig. 5E, F, H,  $t(16) = -1.15$ ;  $p = 0.26$ ), suggesting selective neurodegeneration of EWcp/UCN1 neurons. In contrast to saporin-injected controls, a subset of UCN1 neurons in leptin–saporin treated rats were seen to contain nuclear caspase 3 immunoreactivity suggesting still ongoing apoptotic process (Fig. 5M–O,  $t(12) = -5.52$ ;  $p = 0.0002$ ). Both microglia (Fig. 5I–K,  $U(12) = 1.00$ ;  $p = 0.006$ ) and astrocyte (Fig. 5I, J, L,  $U(12) = 0.00$ ;  $p = 0.004$ ) activity scores were higher in the EWcp of leptin–saporin-injected rats than in saporin-treated controls. Microglia in UCN1-ablated rats showed a strong tendency (Fig. 5I, J, P,  $t(10) = -2.21$ ;  $p = 0.051$ ) to interact more frequently with UCN1 neurons.

In the SNpc, we did not observe dopaminergic neuron loss (Fig. 5Q, R, T,  $t(10) = 0.41$ ;  $p = 0.68$ ), considerable neuronal caspase 3 activity (Fig. 5Q–S,  $t(10) = 0.79$ ;  $p = 0.43$ ), micro- (Fig. 5U–W,  $U(12) = 13.00$ ;  $p = 0.42$ )

(See figure on next page.)

**Fig. 3** UCN1-immunoreactive (ir) neurons of the centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus (EWcp) undergo neurodegeneration and show altered functional neuromorphology in the rotenone model of Parkinson's disease. In rotenone-treated rats (red bars) the number of EWcp/UCN1 neurons (green in **B**) decreased (**C**), compared with oil-injected controls (**A**, black bars). EWcp/UCN1 neurons also showed swollen morphology (**D**), and contained alpha-synuclein ( $\alpha$ SYN, red) immunoreactive (ir) inclusions (see arrows in insets of panel **B** and histogram in **E**). Occasionally, ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1)-ir phagocytotic microglial cells (red **G**, **H**) were observed around UCN1 immunoreactive cell fragments (green) (inset in **G**, panels **H** and **H'** and see also Additional file 1: Video 1) and rotenone treatment increased the number of interactions between UCN1 neurons and microglia (**I**). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) labeling (white in **J**, **K**) revealed astrogliosis (**L**) upon rotenone treatment in the EWcp, while astrocyte activity score in the adjacent ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) remained unchanged (**M**). RNAscope in situ hybridization for *Ucn1* mRNA (white in **N**, **N'**, **O**, **O'**) revealed reduced expression (**P**) in rotenone-treated rats. Immunolabeling in the same preparations revealed increased UCN1 peptide specific signal density (SSD) of the cells (green in **N**, **N'**, **O**, **O'**) upon rotenone treatment (**Q**). Cells with very low *Ucn1* mRNA and high UCN1 peptide content were occasionally approached by phagocytotic microglial cells (IBA1, red in **O**, **O'**). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) labeling for nuclear staining is shown in blue (**N**, **N'**, **O**, **O'**). A negative correlation between UCN1 SSD and motor performance (**R**), SNpc/TH cell count and UCN1 SSD (**S**) as well as UCN1 SSD and *Ucn1* mRNA expression (**T**) was detected. a.u.: arbitrary unit; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Student's  $t$  test, or in Mann–Whitney  $U$  test in L and M). *ns* not significant;  $n = 8–12$ . Bars: 50  $\mu$ m



**Fig. 3** (See legend on previous page.)

and astrogliosis (Fig. 5U–W, X,  $U(12) = 14,50$ ;  $p = 0.57$ ) in the leptin–saporin model.

## Discussion

In the systemic toxic model of Parkinson's disease, rotenone was chosen to assess whether the PD-like state can be associated with morphological changes also within the peptidergic EWcp and whether it is accompanied with depression-like phenotype and anxiety. Next, a local neuron ablation was performed to examine whether the selective EWcp-damage causes comparable deterioration in the mood status.

### Anxiety and depression as non-motor symptoms of PD are detected in the rotenone model

Although not without limitations [41, 42], the rotenone model of PD reproduces many features of the human disease, including systemic mitochondrial impairment, selective dopaminergic nigrostriatal damage, microglia activation, alpha-synuclein accumulation with formation of LBs [43, 44]. The RPT, a widely used method [45, 46] unambiguously revealed severe motor coordination deficit in rotenone-treated rats. Reduced OFT locomotor activity further supported the deterioration of motor skills in full agreement with earlier studies [47, 48]. OFT also suggested increased anxiety in rotenone-treated rats [49]. In SPT, reduced sucrose consumption in parkinsonian rats suggested diminished reward-seeking behavior [50]. Although these in vivo results confirmed the efficacy of the PD model, one has to consider the limitations of these tests as motor skills of rats might directly affect their performance. Nevertheless, after pre-testing other mood-status assessing paradigms (e.g., forced swim test, light–dark box test) in our pilot studies, we decided for OFT and SPT as parkinsonian animals were also capable of performing these, and the within and between subject error was acceptable.

The number of SNpc/TH cells was reduced by 32.4% in rotenone-treated rats. Although this is considerably less than the 70% neuron loss in humans [1], rats with 20% loss of SNpc/TH neurons showed significantly impaired

motor skills. Furthermore, in line with others, we found neurons with cytoplasmic alpha-synuclein inclusions in SNpc/TH [51] that correspond to LB-like structures. These two observations strongly suggest the validity of our model. Increased SNpc/astroglia TNF-alpha immunoreactivity and elevated microglial and neuronal iNOS signal in the SNpc strongly suggest that the rotenone treatment-related oxidative stress and consequent neuroinflammation contributed to the neuron loss [52, 53]. Furthermore, in the rotenone model a diffuse striatal axonal loss and also drastic focal TH-ir fiber loss may be observed [54]. Indeed, we also measured reduced CPU/TH-ir fiber content in rotenone-treated rats, and found some circumscribed striatal neuropil areas with almost undetectable TH-ir (Fig. 1S).

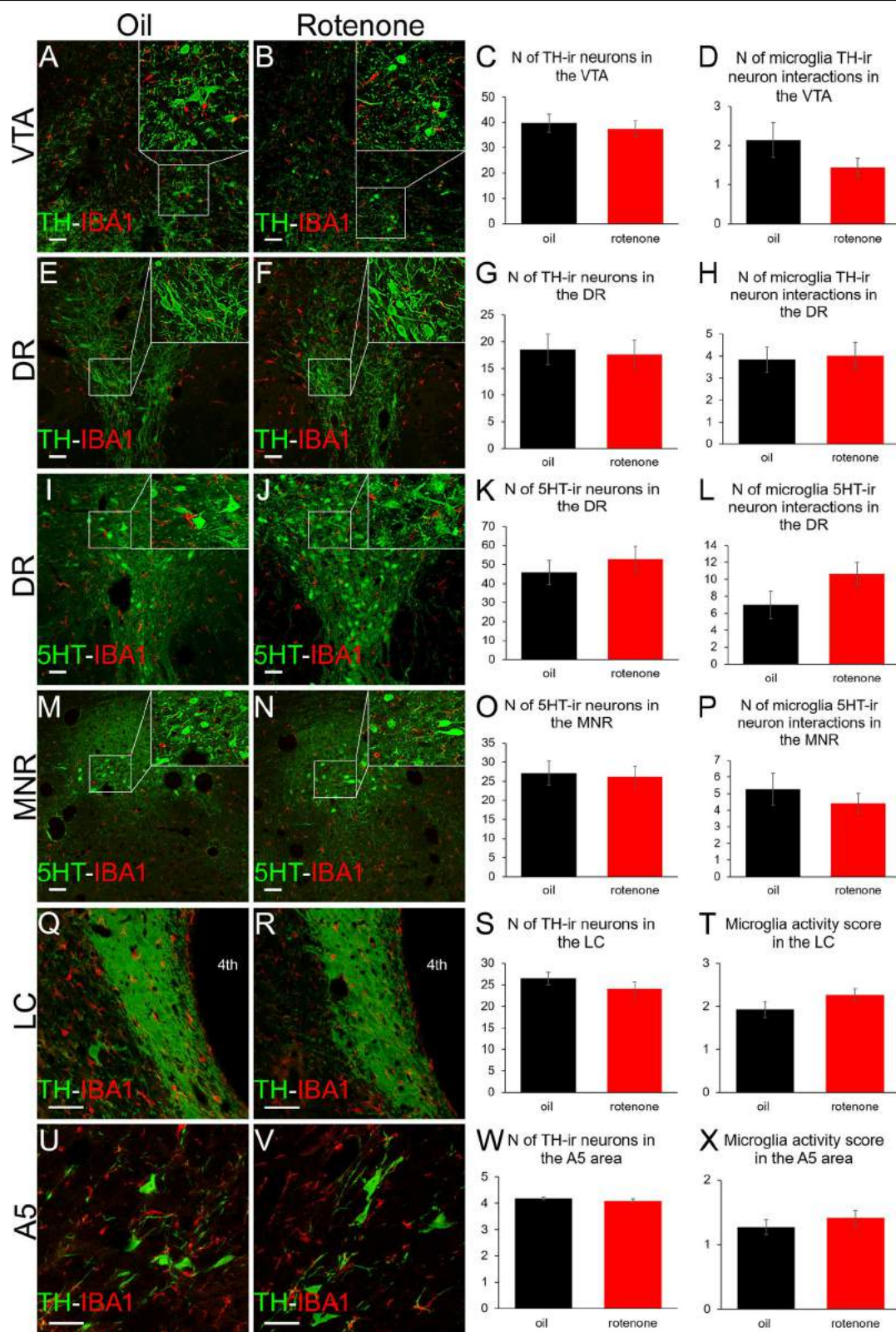
### EWcp/UCN1 neurons suffer neurodegeneration and surviving cells show functional damage in the rotenone model

The magnitude of neuronal loss, the presence of cytoplasmic alpha-synuclein-ir inclusions, corresponding to LB-like structures and the increased microglial activity in the SNpc was in line and in statistical correlation with micro- and astroglial activity as well as with UCN1–neuron loss of the EWcp suggesting their similar susceptibility to the toxic agent. This is not surprising as EWcp neurons are developmentally also closely related with SNpc/TH neurons [55]. Although obvious cytoplasmic alpha-synuclein immunoreactive inclusions suggested the presence of LB-like structures in the SNpc and EWcp, we have to state an important limitation here is that our antibody, similarly to numerous other commercially available sera [56], was not specific for the high molecular weight isoforms found in LBs in the rat.

Beyond the obvious interaction between UCN1-ir cell fragments (Fig. 3H') and CD68-ir reactive microglia (Fig. 2I) [57] that unambiguously proves the loss of EWcp/UCN1 cells, we also provide evidence that surviving UCN1 cells suffered functional damage. We assume that the mitochondrial complex I inhibition

(See figure on next page.)

**Fig. 4** Dopaminergic, serotonergic and noradrenergic centers do not show significant neurodegeneration or glial activation in the rotenone model in the rat. Dopaminergic neurons marked by tyrosine-hydroxylase (TH, green) labeling in the ventral tegmental area (VTA) (A, B) and dorsal raphe nucleus (DR) (E, F) do not show significant neurodegeneration as shown by histograms C and G, respectively. The number of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1, red in A, B, E, F)-ir microglia-TH neuron interactions remained unchanged both in the VTA (D) and DR (H) upon rotenone treatment. The number of serotonin (5-HT)-producing neurons of the DR (green, I, J) and median raphe nuclei (MNR, green, M, N) were not affected significantly as shown in panel (K) and (O), respectively. The number of microglia (IBA1, red in I, J, M, N)—5-HT neuron interactions did not change in the DR (L) and MNR (P). Noradrenergic cells of the locus ceruleus (LC, Q, R) and A5 noradrenergic cells of the ventrolateral medulla (U, V) shown by TH immunolabeling (green) did not suffer significant neurodegeneration upon rotenone treatment as shown in histograms (S) and (W), respectively. The microglial activity score (IBA1, red in Q, R, U, V) did not change in the LC (T) and in the A5 (X). 4th: fourth brain ventricle. Black bars: vehicle (oil) injected rats, red columns: rotenone-treated group.  $n = 7-12$ . Bars: 50  $\mu\text{m}$



**Fig. 4** (See legend on previous page.)



in UCN1 cells caused energy deficit [58] with consequent UCN1 peptide accumulation due to impaired axonal transport. The increased SSD of UCN1 suggests peptide accumulation in the perikarya of cells, which was also observed in stressed mice [19, 59]. The reduction of *Ucn1* mRNA message is in line with findings in EWcp samples of chronically stressed rats [23] and depressed suicide victims [25]. Adrenal-, thymus- and bodyweight data suggest increased HPA axis activity that is commonly associated with depression-like states in animal models [19, 60] and human depression [17].

Although PD-related neurodegeneration was shown to affect the DR [3], VTA and LC [5], we did not observe remarkable damage of these serotonergic, dopaminergic and noradrenergic cell populations in our rats. We cannot exclude that a higher rotenone dose [30] or a longer treatment period would have also affected these or other centers [53], that were not examined in this project but may affect mood status. Nevertheless, our rat model ultimately supports further the significance of the EWcp/UCN1 in PD-associated mood disorder.

#### Local targeted toxic UCN1–neuron ablation results in altered mood status

To further corroborate that EWcp/UCN1 neuron loss contributes to deterioration in the mood status, a local targeted UCN1 cell ablation was conducted. The leptin-conjugated saporin is internalized into leptin receptor positive cells leading to disturbed protein synthesis [61] and apoptotic neuron loss [62]. As in this area the leptin receptor expression is restricted to a part of EWcp/UCN1 cells [10, 63], a selective partial UCN1 neuron death was expected. After pre-tests with multiple leptin–saporin doses we achieved a cell loss that was

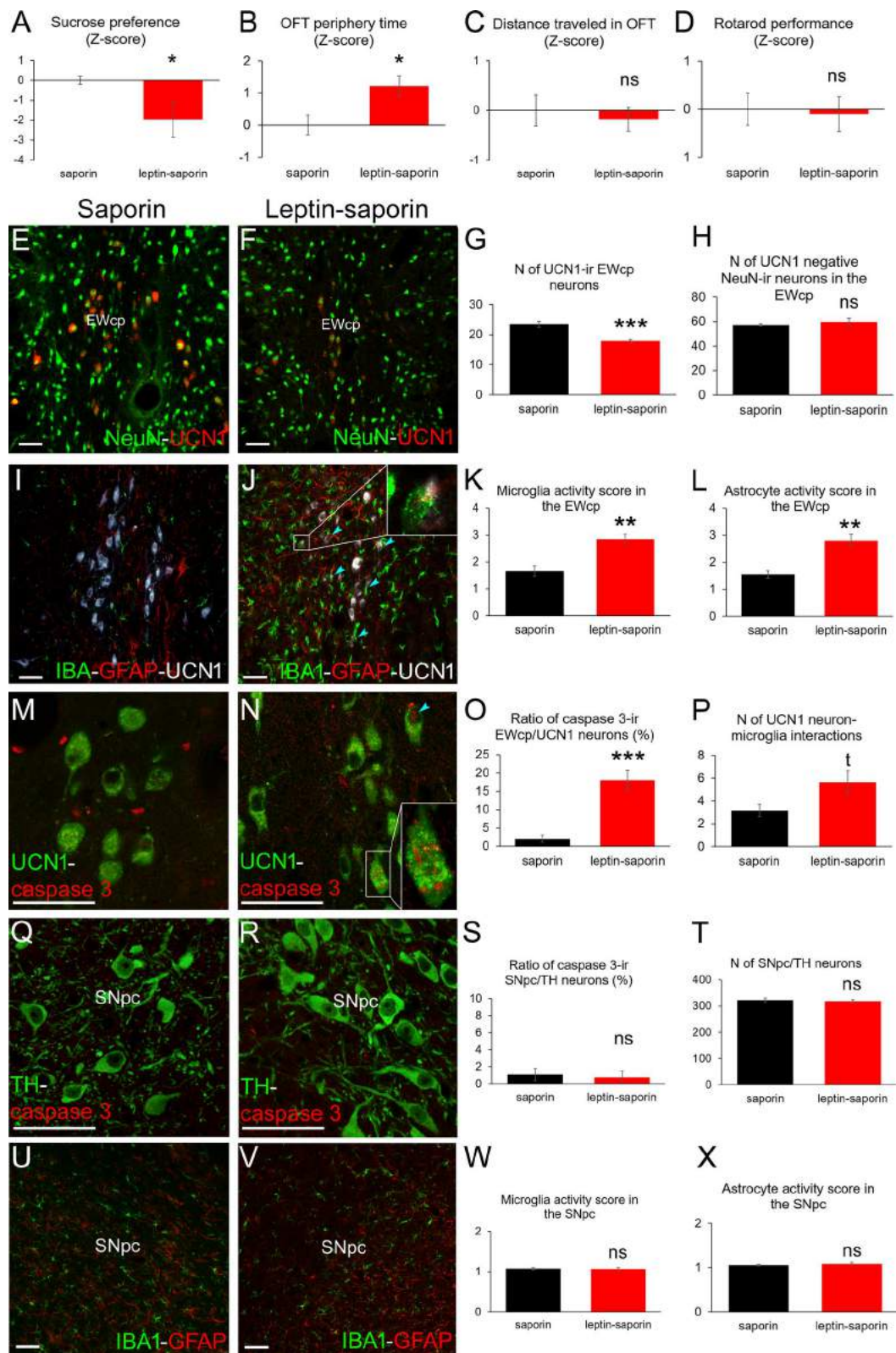
comparable with that observed in the rotenone model. Earlier works [33] and pre-tests suggested that the cell death requires 2 weeks in the leptin–saporin model. Nevertheless, the occasional caspase 3 immunoreactivity in UCN1 neurons suggested that in some cells the leptin–saporin-induced apoptotic process [64] was still in progress at the time of tissue sampling. Some activated micro- and astroglial cells were seen also in saporin-injected controls most likely due to the direct physical effect of the surgery. In leptin–saporin-treated rats both glial cell types were more reactive and microglia tended to interact more frequently with the UCN1 neurons. Nevertheless, the selectivity of ablation was confirmed by the unchanged number of UCN1 immunonegative, but NeuN positive EWcp cells upon leptin–saporin treatment. In leptin–saporin-injected animals, increased OFT-anxiety and SPT–anhedonia suggested that the loss of EWcp/UCN1 cells provoked mood changes but normal motor coordination and locomotor activity excluded parkinsonism. In line with this, dopaminergic neuron loss, apoptotic activity or reactive gliosis was not detected in the SNpc.

#### Conclusion

In this study we successfully applied the rotenone model of PD and detected the anxious and depression-like phenotype, considered as non-motor symptoms of PD in the rat. Selective local UCN1 neuron ablation evoked similar mood status without motor symptoms. With respect to the limitations, our findings collectively suggest that the impairment of the UCN1 neurons in the EWcp contribute to the non-motor symptoms of PD. Human studies have to determine the potential diagnostic and therapeutic significance of these observations.

(See figure on next page.)

**Fig. 5** Selective partial UCN1 neuron ablation in the centrally-projecting Edinger-Wesphthal nucleus (EWcp) causes increased anhedonia and anxiety level without affecting motor skills. Leptin–saporin-injected rats (red bars) show reduced preference to the sweetened water in the sucrose preference test (A). Open field test (OFT) revealed longer period of time spent in the peripheral part of the arena (B). Neither the total traveled distance in OFT (C) nor the rotarod test (D) revealed compromised motor performance of leptin–saporin-treated rats in comparison to saporin-injected controls (black bars). UCN1 (red)—NeuN (green) double labeling (E, F) revealed reduced UCN1/NeuN cell count upon leptin–saporin treatment (F, G), while the number of UCN1 immunonegative NeuN neurons remained unchanged in the EWcp (H). Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1)-immunoreactive (ir) microglia (green in I and J) showed increased activity upon leptin–saporin treatment (J, K) and tended to interact with UCN1-ir cells more frequently (see the blue arrowheads in J and graph P). Astrocytes showing glial fibrillary acidic protein (GFAP, red in I and J) were significantly (L) more active upon leptin–saporin injection (J), although some active cells were also seen in saporin-treated controls (I) representing reactive gliosis due to the effect of surgical manipulation. UCN1-ir (green in M and N) neurons were seen to contain the apoptotic marker caspase 3 (see the boxed area and blue arrowhead in N) in leptin–saporin injected rats (O), while in saporin-injected control animals, only some glial nuclei were positive for caspase 3 (M). Saporin (Q) and leptin–saporin injection (R) into the EWcp did not affect the number of tyrosine-hydroxylase (TH, green in Q and R)-ir cells in the substantia nigra pars compacta (SNpc) as revealed by unbiased stereological cell counting (T). Caspase 3 (red in Q and R) revealed no remarkable apoptotic activity of SNpc/TH (S). Both microglia (IBA, green in U and V) and astroglial (GFAP) activity scores remained basal (W and X, respectively) in both groups ( $n = 6-9$ ): tendency ( $p = 0.051$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Student's *t* test or in Mann–Whitney *U* test in K, L, W, X. *ns* not significant. Bars: 50  $\mu\text{m}$



**Fig. 5** (See legend on previous page.)

## Abbreviations

5-HT: Serotonin; CD68: Cluster of differentiation 68; CPU: Caudate–putamen; CRH: Corticotropin-releasing hormone; DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole; DR: Dorsal raphe nucleus; EW: Edinger–Westphal nucleus; EWcp: Centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; HPA: Hypothalamus–pituitary–adrenal axis; IBA1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1; iNOS: Inducible nitric oxide-synthase; LB: Lewy body; LC: Locus ceruleus; MNR: Median raphe nucleus; OFT: Open field test; PAG: Periaqueductal gray matter; PD: Parkinson's disease; RPT: Rotarod performance test; SNpc: Substantia nigra, pars compacta; SPT: Sucrose preference test; SSD: Specific signal density; TH: Tyrosine-hydroxylase; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha; UCN1: Urocortin 1 peptide; *Ucn1*: Urocortin 1 mRNA; VTA: Ventral tegmental area.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02399-v>.

**Additional file 1: Video 1A** shows a 3D reconstruction of confocal Z-stack images demonstrating a disintegrating UCN1 neuron (green) surrounded by phagocytotic IBA1 immunoreactive microglia (red) cells in the EWcp. (See the same cell in Fig. 3 also.).

**Additional file 2: Video 1B.** shows a 3D reconstruction of confocal Z-stack images demonstrating a disintegrating UCN1 neuron (green) surrounded by phagocytotic IBA1 immunoreactive microglia (red) cells in the EWcp. (See the same cell in Fig. 3 also.).

## Acknowledgements

Authors are grateful to Izabella Orbán, Beatrix Brumán, Dániel Hegedűs, Bálint Tanai MD, Dániel Kun MD, Edina Szabó-Meleg PhD, Ágnes Hunyady MD and Dóra Reglődi MD, PhD, DSc for their excellent technical help and suggestions.

## Authors' contributions

Animal experiments were performed by BU, BP, ZsM, MB, LÁK, JF, TG, BF, NF, and BG. Behavioral tests and their assessments were conducted by JF, BU, BP, ZsM, BF, NF, and BG. Tissue and sample preparation was done by BU, MB, LÁK, TG, and BG. Immunolabelings were performed by BU, NF, and BG. RNAscope was carried out by BU, AK, VK, and BG. Microscopy and digital imaging, morphometry was done by GB, BU, and BG. Data analysis and statistics were performed by BG, JF, NF, and BU. First manuscript draft was written by BU, supervised by BG. The study design, preliminary tests were planned and assessed by BU and BG. Figures were prepared by BU, GB, and BG. All authors contributed to the final version of the manuscript.

## Funding

Open access funding provided by University of Pécs. This work was financed by the Thematic Excellence Program 2021 Health Sub-program of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the EGA-16 project of the Pécs University, by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme (Project No: TKP2020-IKA-08) and by the Hungarian Scientific Research Fund (NKFIH, FK124188) to BG. VK and AK were sponsored by the research grant of the Medical Faculty, University of Pécs (KA-2019-12, KA-2021-23), and VK also by National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-20-4-II-PTE-874). NF was supported by the research grant of Pécs University Medical School KA-2020-03, and New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-20-4-II-PTE-547). AK was supported by János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. This work was also financed by NAP 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; GINOP-2.3.2-15-2016-00050 "PEPSYS," MTA-TKI14016; Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs and EFOP-3.6.2-16-2017-00008 "The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics".

## Availability of data and materials

The data sets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Experiments were approved by the Animal Welfare Committee of Pécs University, the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation in Hungary and the National Food Chain Safety Office in Hungary (license No: BA02/2000–49/2017).

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Research Group for Mood Disorders, Medical School, University of Pécs, Szigeti út 12., 7624 Pécs, Hungary. <sup>2</sup>Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. <sup>3</sup>Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School & Szentágotthai Research Centre, Molecular Pharmacology Research Group, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary. <sup>4</sup>Centre for Neuroscience, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary.

Received: 11 July 2021 Accepted: 24 January 2022

Published online: 02 February 2022

## References

- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;23(3):17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Kumaresan M, Khan S. Spectrum of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Cureus*. 2021;13(2): e13275. <https://doi.org/10.7759/cureus.13275>.
- Borgonovo J, Allende-Castro C, Laliena A, Guerrero N, Silva H, Concha ML. Changes in neural circuitry associated with depression at pre-clinical, pre-motor and early motor phases of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;35:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.11.009>.
- Starkstein SE, Brockman S. Management of depression in Parkinson's disease: a systematic review. *Mov Disord Clin Pract*. 2017;4(4):470–7. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12507>.
- Goedert M, Jakes R, Anthony Crowther R, Grazia SM. Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, and multiple system atrophy as  $\alpha$ -synucleinopathies. *Methods Mol Med*. 2001;62:33–59. <https://doi.org/10.1385/1-59259-142-6:33>.
- Hunter S. The rostral mesencephalon in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 1985;68(1):53–8. <https://doi.org/10.1007/BF00688956>.
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*. 2007;27(5):494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x>.
- Stanković I, Petrović I, Pekmezović T, Marković V, Stojković T, Dragašević-Mišković N, et al. Longitudinal assessment of autonomic dysfunction in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019;66:74–9. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.07.008>.
- Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, et al. The Edinger–Westphal nucleus: a historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol*. 2011;519(8):1413–34. <https://doi.org/10.1002/cne.22580>.
- Xu L, Scheenen WJ, Leshan RL, Patterson CM, Elias CF, Bouwhuis S, et al. Leptin signaling modulates the activity of urocortin 1 neurons in the mouse nonpreganglionic Edinger–Westphal nucleus. *Endocrinology*. 2011;152(3):979–88. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1143>.
- Innis RB, Aghajanian GK. Cholecystokinin-containing and nociceptive neurons in rat Edinger–Westphal nucleus. *Brain Res*. 1986;363(2):230–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91008-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91008-5).

12. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger–Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience*. 2010;170(2):478–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.001>.
13. Xu L, Janssen D, van der Knaap N, Roubos EW, Leshan RL, Myers MG Jr, et al. Integration of stress and leptin signaling by CART producing neurons in the rodent midbrain centrally projecting Edinger–Westphal nucleus. *Front Neuroanat*. 2014;3(8):8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00008>.
14. Zuniga A, Ryabinin AE. Involvement of centrally projecting Edinger–Westphal nucleus neuropeptides in actions of addictive drugs. *Brain Sci*. 2020;10(2):67. <https://doi.org/10.3390/brainsci10020067>.
15. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 1995;378(6554):287–92. <https://doi.org/10.1038/378287a0>.
16. Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1998;391(1):1–10. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19980202\)391:1%3c1::aid-cne1%3e3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19980202)391:1%3c1::aid-cne1%3e3.0.co;2-6).
17. Deussing JM, Chen A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2225–86. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>.
18. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, et al. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*. 2016;25(330):335–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.004>.
19. Farkas J, Kovács LÁ, Gáspár L, Nafz A, Gaszner T, Ujvári B, et al. Construct and face validity of a new model for the three-hit theory of depression using PACAP mutant mice on CD1 background. *Neuroscience*. 2017;23(354):11–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.019>.
20. Gaszner B, Csernus V, Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger–Westphal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 2004;480(2):170–9. <https://doi.org/10.1002/cne.20343>.
21. Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T. Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger–Westphal nucleus. *J Comp Neurol*. 2007;500(4):708–19. <https://doi.org/10.1002/cne.21177>.
22. Gaszner B, Jensen KO, Farkas J, Reglodi D, Csernus V, Roubos EW, et al. Effects of maternal separation on dynamics of urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor in the rat non-preganglionic Edinger–Westphal nucleus. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(5):439–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.05.006>.
23. Aschrafi A, Verheijen JM, Gordebeke PM, Olde Loohuis NF, Menting K, Jager A, et al. MicroRNA-326 acts as a molecular switch in the regulation of midbrain urocortin 1 expression. *J Psychiatry Neurosci*. 2016;41(5):342–53. <https://doi.org/10.1503/jpn.150154>.
24. Kozicz T, Bordewin LA, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger–Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(6):741–54. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.012>.
25. Kozicz T, Tilburg-Ouwens D, Faludi G, Palkovits M, Roubos E. Gender-related urocortin 1 and brain-derived neurotrophic factor expression in the adult human midbrain of suicide victims with major depression. *Neuroscience*. 2008;152(4):1015–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.050>.
26. Adam D. Pesticide use linked to Parkinson's disease. *Nature*. 2000;408(6809):125. <https://doi.org/10.1038/35041740>.
27. Zhu C, Vourc'h P, Fernagut PO, Fleming SM, Lacan S, Dicarolo CD, et al. Variable effects of chronic subcutaneous administration of rotenone on striatal histology. *J Comp Neurol*. 2004;478(4):418–26. <https://doi.org/10.1002/cne.20305>.
28. Huang YL, Zeng NX, Chen J, Niu J, Luo WL, Liu P, et al. Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress. *Neural Regen Res*. 2020;15(6):1150–9. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270414>.
29. Feyissa DD, Aher YD, Engidawork E, Höger H, Lubec G, Korz V. Individual differences in male rats in a behavioral test battery: a multivariate statistical approach. *Front Behav Neurosci*. 2017;17(11):26. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00026>.
30. Zhang ZN, Zhang JS, Xiang J, Yu ZH, Zhang W, Cai M, et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: dose exploration study. *Brain Res*. 2017;15(1655):104–13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.020>.
31. Zuniga A, Smith ML, Caruso M, Ryabinin AE. Vesicular glutamate transporter 2-containing neurons of the centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus regulate alcohol drinking and body temperature. *Neuropharmacology*. 2021;21(200): 108795. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108795>.
32. Wiley RG, Kline RH IV. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods*. 2000;103(1):73–82. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00297-1](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00297-1).
33. Xu L, Füredi N, Lutter C, Geenen B, Pétervári E, Balaskó M, et al. Leptin coordinates efferent sympathetic outflow to the white adipose tissue through the midbrain centrally-projecting Edinger–Westphal nucleus in male rats. *Neuropharmacology*. 2021;1(205): 108898. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108898>.
34. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. New York: Elsevier Academic Press; 2007.
35. Füredi N, Nagy Á, Mikó A, Berta G, Kozicz T, Pétervári E, et al. Melanocortin 4 receptor ligands modulate energy homeostasis through urocortin 1 neurons of the centrally projecting Edinger–Westphal nucleus. *Neuropharmacology*. 2017;15(118):26–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.002>.
36. Guilloux JP, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods*. 2011;197(1):21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019>.
37. Nemes B, Bölcskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, et al. Human somatostatin SST4 receptor transgenic mice: construction and brain expression pattern characterization. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3758. <https://doi.org/10.3390/ijms22073758>.
38. Squillacioti C, Pelagalli A, Liguori G, Mirabella N. Urocortins in the mammalian endocrine system. *Acta Vet Scand*. 2019;61(1):46. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0480-2>.
39. Ip CW, Cheong D, Volkmann J. Stereological estimation of dopaminergic neuron number in the mouse substantia nigra using the optical fractionator and standard microscopy equipment. *J Vis Exp*. 2017;127:56103. <https://doi.org/10.3791/56103>.
40. Harrison L, Pfuhlmann K, Schriever SC, Pfluger PT. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Mol Metab*. 2019;24:149–55. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.03.009>.
41. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014;15(8):155. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>.
42. Konnova EA, Swanberg M. *Animal Models of Parkinson's Disease*. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 5. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsons-disease.2018.ch5>
43. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1301–6. <https://doi.org/10.1038/81834>.
44. Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, et al. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis*. 2006;22(2):404–20. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.12.003>.
45. Campos FL, Carvalho MM, Cristóvão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, et al. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci*. 2013;26(7):175. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00175>.
46. Labib AY, Ammar RM, El-Naga RN, El-Bahy AAZ, Tadros MG, Michel HE. Mechanistic insights into the protective effect of paracetamol against

- rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Possible role of endocannabinoid system modulation. *Int Immunopharmacol*. 2021;94: 107431. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107431>.
47. Zaitone SA, Abo-Elmatty DM, Elshazly SM. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. *Indian J Pharmacol*. 2012;44(6):774–9. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.103300>.
  48. Sun C, Wang Y, Mo M, Song C, Wang X, Chen S, et al. Minocycline protects against rotenone-induced neurotoxicity correlating with upregulation of Nurr1 in a parkinson's disease rat model. *Biomed Res Int*. 2019;5(2019):6843265. <https://doi.org/10.1155/2019/6843265>.
  49. Valvassori S, Samira, Roger B, Varela and João Quevedo (2017): Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression, Pages 991–1001, Open field test
  50. Scheggi S, De Montis MG, Gambarana C. Making sense of rodent models of anhedonia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018;21(11):1049–65. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy083>.
  51. Prasad EM, Hung SY. Behavioral tests in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(10):1007. <https://doi.org/10.3390/antiox9101007>.
  52. Clausen BH, Wirefeldt M, Høgedal SS, Frich LH, Nielsen HH, Schrøder HD, Østergaard K, Finsen B, Kristensen BW, Lambertsen KL. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):81. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00957-y>.
  53. Zhang D, Li S, Hou L, Jing L, Ruan Z, Peng B, Zhang X, Hong JS, Zhao J, Wang Q. Microglial activation contributes to cognitive impairments in rotenone-induced mouse Parkinson's disease model. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):4. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02065-z>.
  54. Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*. 2003;84(3):491–502. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01533.x>.
  55. Joksimovic M, Anderregg A, Roy A, Campochiaro L, Yun B, Kittappa R, et al. Spatiotemporally separable Shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(45):19185–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904285106>.
  56. Kumar ST, Jagannath S, Francois C, Vanderstichele H, Stoops E, Lashuel HA. How specific are the conformation-specific  $\alpha$ -synuclein antibodies? Characterization and validation of 16  $\alpha$ -synuclein conformation-specific antibodies using well-characterized preparations of  $\alpha$ -synuclein monomers, fibrils and oligomers with distinct structures and morphology. *Neurobiol Dis*. 2020;146: 105086. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105086>.
  57. Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, van de Berg WDJ, Lucassen PJ, van Dam AM. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:90. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1>.
  58. Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Sci Rep*. 2017;4(7):45465. <https://doi.org/10.1038/srep45465>.
  59. Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger–Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res*. 2005;1046(1–2):172–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.012>.
  60. Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013;47(6):401–19. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.014>.
  61. Ferreras JM, Barbieri L, Girbés T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ, et al. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta*. 1993;1216(1):31–42. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90034-b](https://doi.org/10.1016/0167-4781(93)90034-b).
  62. Harris RBS. Loss of leptin receptor-expressing cells in the hindbrain decreases forebrain leptin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;318(5):E806–16. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00020.2020>.
  63. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger–Westphal nucleus. *Neuroscience*. 2009;162(4):1141–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.003>.
  64. Sikriwal D, Ghosh P, Batra JK. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(12):2880–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.004>.
  65. Cui J, Fu Y, Lu R, Bi Y, Zhang L, Zhang C, et al. Metabolomics analysis explores the rescue to neurobehavioral disorder induced by maternal PM2.5 exposure in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;169:687–95. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.037>.
  66. Parsons MP, Li S, Kiruac GJ. Functional and anatomical connection between the paraventricular nucleus of the thalamus and dopamine fibers of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 2007;500(6):1050–63. <https://doi.org/10.1002/cne.21224>.
  67. Korosi A, Kozicz T, Richter J, Veening JG, Olivier B, Roubos EW. Corticotropin-releasing factor, urocortin 1, and their receptors in the mouse spinal cord. *J Comp Neurol*. 2007;502(6):973–89. <https://doi.org/10.1002/cne.21347>.
  68. MacLeod G, Bozek DA, Rajakulendran N, Monteiro V, Ahmadi M, Steinhart Z, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screens expose genetic vulnerabilities and mechanisms of temozolomide sensitivity in glioblastoma stem cells. *Cell Rep*. 2019;27(3):971–986.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.047>.
  69. Kálmán M, Oszwald E, Pócsai K. Three-plane description of astroglial populations of OVLT subdivisions in rat: Tanyocyte connections to distant parts of third ventricle. *J Comp Neurol*. 2019;527(17):2793–812. <https://doi.org/10.1002/cne.24707>.
  70. Homma A, Li HP, Hayashi K, Kawano Y, Kawano H. Differential response of arcuate proopiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neurons to the lesion produced by gold thioglucose administration. *J Comp Neurol*. 2006;499(1):120–31. <https://doi.org/10.1002/cne.21097>.
  71. Ryan KM, Boyle NT, Harkin A, Connor TJ. Dexamethasone attenuates inflammatory-mediated suppression of  $\beta_2$ -adrenoceptor expression in rat primary mixed glia. *J Neuroimmunol*. 2020;15(338): 577082. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577082>.
  72. Wu F, Xu HD, Guan JJ, Hou YS, Gu JH, Zhen XC, et al. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2015;22(284):900–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.004>.
  73. Kim BG, Dai HN, Lynskey JV, McAttee M, Bregman BS. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans potentiates transplant-mediated axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J Comp Neurol*. 2006;497(2):182–98. <https://doi.org/10.1002/cne.20980>.
  74. Deng C, Zhang Q, He P, Zhou B, He K, Sun X, Lei G, Gong T, Zhang Z. Targeted apoptosis of macrophages and osteoclasts in arthritic joints is effective against advanced inflammatory arthritis. *Nat Commun*. 2021;12(1):2174. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22454-z>.
  75. Fan L, Zhou L. AG490 protects cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting the JAK2/3 signaling pathway. *Brain Behav*. 2021;11(1): e01911. <https://doi.org/10.1002/brb3.1911>.
  76. Kapralov AA, Yang Q, Dar HH, Tyurina YY, Anthony-muthu TS, Kim R, St Croix CM, Mikulska-Ruminska K, Liu B, Shrivastava IH, Tyurin VA, Ting HC, Wu YL, Gao Y, Shurin GV, Artyukhova MA, Ponomareva LA, Timashev PS, Domingues RM, Stoyanovsky DA, Greenberger JS, Mallampalli RK, Bahar I, Gabrilovich DI, Bayir H, Kagan VE. Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3):278–90. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0462-8>.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.