

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

Doktori (Ph.D.) tézis

**dr. Ujvári Balázs**

**EN1LY9**



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Anatómiai Intézet

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola (D95)  
Neuroendokrinológia és neurohisztológia (B-134/1993)  
Programvezető: Prof. Reglódi Dóra Ph.D., D.Sc.  
Témavezető: dr. Gaszner Balázs, Ph.D.

Pécs, 2022

## Bevezetés

### **A Parkinson-kór**

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 tüneteket két csoportra tudjuk osztani: a mozgáskoordinációt érintő *motoros*, illetve a vegetatív funkciókat és a hangulati életet befolyásoló *nem-motoros* tünetekre. A motoros tünetek okait közel fél évszázada kutatják, azonban a hangulati életet érintő elváltozások eredetével kapcsolatos kérdésekkel csak az 1990-es években kezdtek foglalkozni. A külső szemlélők számára a kór lefolyása a motoros funkciók látható romlásával jár együtt. A vezető tünetek közé tartoznak a rigor, a nyugalmi tremor és a bradykinesia. A nem-motoros tünetek közül a hangulati életet befolyásoló tényezők akár évekkel a motoros tünetek kialakulása előtt is megjelenhetnek és a betegség progressziójával arányosan súlyosbodhatnak. 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 igen jelentősek az emésztő rendszert érintő változások. A vezető, hangulati életet érintő, nem-motoros tünetek közé sorolható a szorongás és a depresszió.

A PD definitív diagnózisának felállításához 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 vizsgálatok a dopamin tartalmú neuronok mennyiségének 70%-os csökkenése mellett a még nem degenerálódott neuronokban alpha-synuclein ( $\alpha$ -Syn) tartalmú eosinophil zárványokat, úgynevezett Lewy-testeket (LB) is találunk.

Braak leírása szerint az  $\alpha$ -Syn zárványok a központi idegrendszerben (KIR) először a bulbus olfactoriusban, valamint a nucleus dorsalis nervi vagiban jelennek meg. Ezt követően, a második stádiumban, az agytörzsi szerotoninerg (5-HT) rendszerekben (caudalis raphe magokban) és a noradrenerg locus coeruleusban (LC) rakódnak le az eosinophil aggregátumok. Csak harmadik stádiumban indul el a zárványok megjelenése a SNpc területén. Ebben az állapotban az amygdala és az agytörzsből rostralisán elhelyezkedő raphe magok is érintetté válnak. A negyedik stádium alatt a SN már biztosan tartalmaz  $\alpha$ -Syn zárványokat, illetve megjelenik a hippocampusban és egyes corticalis régiókban, míg nem az ötödik és hatodik stádiumokban már szinte teljes cortex is károsodást mutat.

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.

A Parkinson-kórban elsődlegesen választandó gyógyszeres terápia legfőbb komponense a L-DOPA, mely per os alkalmazása során kombinált terápiában, DOPA-dekarboxiláz gátlókkal egészítik ki a kezelést. A terápia hatására a betegek többségében a rigor és a nyugalmi tremor javulnak, az esetek kisebb részében pedig szinte teljesen tünetmentes állapot érhető el, azonban átlagosan 3-5 év után a gyógyszerek hatása gyengül, dózis és/vagy hatóanyagváltás válhat szükségessé.

### **A motoros tünetek neuroanatómiai háttere**

A rigor, nyugalmi tremor és bradykinesia hátterében álló progresszív neurodegeneráció régóta jól ismert. A dopaminerg nigrostriatalis pálya sérül, 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. A dopamin szintjének további csökkenése, a striatum és a substantia nigra közti dopaminerg kapcsolat megszakadásának következtében az akaratlagos mozgások indítása nehezítetté válik. A motoros kör mind az indirekt pálya a D<sub>2</sub>-receptorok ligand kötés hiánya miatt, mind a direkt pálya D<sub>1</sub>-receptorok aktivitásának csökkenésén keresztül érintetté válik. Parkinson-kórban elhunyt személyek agyában a microgliák aktivitásának növekedését, valamint az astrocyták is reaktívvá válását is megfigyelték. Ezek az idegszövetben fellépő gyulladási folyamatok a betegség progressziójához is hozzájárulnak.

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

A betegség progressziója során extra-nigralis dopaminerg, noradrenerg, kolinerg és szerotoninerg pályák sérülése is hozzájárulhat a betegséghez társuló nem-motoros tünetek kialakulásához. A szerteágazó vizsgálatok ellenére a nem-motoros tünetek neurobiológiai háttere nagyrészt még mindig felfedezetlen. A Braak-féle leírásnál túl egyéb, korábbi kutatások kimutatták már, hogy nem csak az agytörzsi magokban vannak jelen Lewy-testek, hanem az enterális neuronokban és az enteroendokrin sejtekben is. Ismert jelenség az  $\alpha$ -Syn vándorlása a gastrointestinalis rendszer és a parasymphaticus agytörzsi magok között. Ezek közül, Parkinson-kóros betegekben jelentős a bolygóideg vegetatív magjának károsodása, ami mellett a periférián maga a nervus vagus is atrófiássá válik, ami magyarázhatja a vegetatív tünetek jelentős részét.

A noradrenerg rendszerek közül a locus coeruleus területén találtak  $\alpha$ -Syn zárványokat. A LC-n kívül az A5 régió is hozzájárul a vegetatív idegrendszer modulálásához. E két terület

degenerációja Parkinson-kórban a nem-motoros tünetek széles spektrumához járulhat hozzá, azonban fontos megjegyezni, hogy ezek megjelenése nem csupán a noradrenerg rendszer működésének megváltozására vezethetők vissza, hanem egyéb, kolinerg, szerotoninerg, GABAerg vagy glutamáterg rendszerek deficitjeivel is társulnak.

Az agytörzs raphe magjaiból kiinduló szerotoninerg rendszer szintén károsodik Parkinson-kórban, ami hozzájárulhat a nem-motoros tünetek és a tremor kialakulásához. A nucleus raphe dorsalis (DR) 5-HT neuronjai révén jelentős szerepet tölt be a stresszadaptációban és a hangulat szabályozásában. A kisebb számú dopaminerg sejtcsoportja a szociális izoláció, szeparáció folyamatában lejátszódó viselkedési minták kialakításában vesz részt. Ismert, hogy a cirkadián ritmus szabályozásában e sejtek együttesen részt vesznek, és degenerációjuk hozzájárulhat a Parkinson-kórban gyakran előforduló alvászavarokhoz. A nucleus raphe medianus (MNR) szerepe kevésbé ismert a DR-al összevetve, mégis, 5-HT sejteinek megváltozott működése kiemelten fontos a generalizált szorongásos zavar patomechanizmusa hátterében.

A ventralis tegmentalis area (VTA) a meso-cortico-limbikus rendszerhez sorolható dopaminerg agyterület, mely szerepet játszik a kognitív folyamatok szabályozásában, a motivációban és önjutalmazásban. Annak ellenére, hogy a Parkinson-kór motoros tüneteit a 60-70%-ot meghaladó SNpc dopaminerg neuronvesztés okozza, még előrehaladott Parkinson-kórban szenvedő betegeknél is átlagosan 50% a VTA dopaminerg sejtpusztulása, holott a SNpc és a VTA neuronok ugyanazt a neurotranszmittert szintetizálják, tárolják és szabadítják fel. A két terület eltérő vulnerabilitását az idegsejtek közötti elektrofiziológiai különbségek molekuláris háttere és a proteomot érintő fejlődésbiológiai különbségek is magyarázhatják.

### **Az Edinger-Westphal mag**

Az Edinger-Westphal mag (EW) a harmadik agyideg paraszimpatikus magja, mely a ganglion ciliaren történő átkapcsolás után a pupillomotoros funkciók szabályozásában és az akkomodációban játszik fontos szerepet. Hunter 1985-ben írta le, hogy Parkinson-kórban elhunytak szövetmintáiban „54%-os neuronpusztulást talált az EW rostralis részén”, valamint a sejtek 3%-a Lewy-testeket tartalmazott. Habár számos neuropatológiai leírás, köztük Braak klasszifikációja is említi ezt a jelenséget, legjobb tudásunk szerint nem végeztek vizsgálatokat a jelenség funkcionális jelentőségének feltárása érdekében. Mindazonáltal, fontos kiemelni, hogy a Parkinson-kórban nem jellemző sem a pupillomotoros funkciózavar sem az akkomodáció gyakoribb vagy jelentősebb mértékű gyengesége. Ez alapján felmerült annak lehetősége, hogy

a Hunter által 1985-ben megfigyelt neurodegeneráció a mag olyan sejtjeit érintheti, melyek nem vesznek részt a klasszikusan leírt pupillomotoros és akkomodációs funkcióban.

Később az EW-nak felismerték egy szubdivízióját, mely 1985-ben még nem volt ismert. Itt a pupillomotoros idegsejtekkel ellentétben, melyek kolinerg, peptiderg neuronok vannak és az innen eredő rostok nem jutnak el a ganglion ciliareba, hanem a központi idegrendszerben létesítenek kapcsolatokat, ezért ezt a részt centrális-projekciójú Edinger-Westphal magnak nevezzük (EWcp). A EWcp-ban található idegsejtek többsége urocortin 1 (UCN1) peptidet termel, és az urocortinerg perikaryonok megközelítőleg 80%-a a EWcp területére lokalizálódik. Az UCN1 a corticotropin-releasing hormon (CRH) család tagja és hatását a CRH<sub>1</sub> (anxiogén), illetve CRH<sub>2</sub> (anxiolitikus) receptorokon is kifejtheti, de nagyobb affinitást mutat az utóbbi iránt, mint maga a CRH. A CRH<sub>2</sub> receptorok központi idegrendszeri eloszlása jó anatómiai átfedést mutat az UCN1 tartalmú idegrostok által beidegzett agyterületekkel. UCN1 génkiütött egerek növekedett szorongási szintet mutatnak akut stressz hatására. Az UCN1, c-Fos és FosB expressziója akut és krónikus stressz hatására is emelkedik, mely a EWcp sejtjeinek aktivációját igazolja. Több állatmodellben, valamint depresszióval küzdő öngyilkos egyének autopsziás mintáiban is igazolták a EWcp érintettségét a hangulatzavarokban. Fontos kiemelni, hogy az urocortinerg EWcp neuronok részt vesznek az energia egyensúly szabályozásában is, és az itt elhelyezkedő neuronok közel 50%-a leptin receptort hordoznak sejtmembránjukon, mely megkülönbözteti őket a régió egyéb peptiderg és nem peptiderg idegsejtjeitől.

Hunter 1985-ös leírása alapján fogalmazódott meg bennünk az a feltételezés, hogy az akkor felfedezett neurodegeneráció az EW területén nem az EW preganglionáris, kolinerg divízióját, hanem a később definiált UCN1 tartalmú centrális projekciójú neuroncsoportot érintheti, és ennek hatása ilyen módon a Parkinson-kór nem-motoros, a hangulati állapotot érintő tüneteiben, mint a depresszió és szorongás nyilvánulhat meg.

Ezidáig csak néhány publikációban foglalkoztak az UCN1 és a PD közötti kapcsolattal. Ezek közül egy kiemelendő, ahol UCN1 adását vizsgálták Parkinson-kór modellekben. Itt különböző kísérleti elrendezésekben a tünetek javulását mutatták ki. Ezzel összhangban, az UCN1-ről is bebizonyították, hogy elősegíti a dopaminerg neuronok túlélését, de ezek a vizsgálatok exogén neuropeptidet alkalmaztak, és nem értékelték az endogén UCN1 hatásait és a hangulati állapotot.

### **A Parkinson-kór rotenon modellje**

Az emberben leírt 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. Széles körben elterjedt módszer a 6-hidroxi-dopamin (6-OHDA) lokálisan az agyba juttatva, mely unilaterálisan roncsolva a SN dopaminerg sejtjeit alkalmazható 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 megművelt szintézise után. Emelkedett Parkinson-kór kockázatról számoltak be a mezőgazdaságban különböző peszticidek, herbicidek (paraquat, maneb, rotenon) hatásának kitett populációkban, és ez a megfigyelés ezután további neurotoxin alapú PD-modellek kidolgozásához vezetett.

A számos lehetőség közül munkánk során a rotenon 6 hetes subcutan (s.c.) alkalmazásával idéztünk elő kísérletes Parkinson-kórt patkányokban. Azért esett a választásunk erre a modellre, mert ez az a modell, ami a betegség emberben ismert fő morfológiai jegyeit képes előidézni patkányban, mint a neurodegeneráció és intracytoplasmaticus alpha-synuclein aggregátumok megjelenése a SNpc területén.

### **Célkitűzések és hipotézisek**

#### **A Parkinson-kór rotenon modellje, patkányban**

Azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy a EWcp UCN1 tartalmú neuronjai károsodnak-e a szisztémás rotenonnal előidézett Parkinson-kór modellben a substantia nigrához hasonlóan. Feltételezésünk szerint a rotenon hatására a centrális-projekciójú Evinger-Westphal mag neuronjai a substantia nigra pars compactához hasonlóan károsodnak és ez lokális gyulladásos elváltozásokkal jár együtt, mely hozzájárul a szorongás és depressziószerű állapot, a betegség nem-motoros tüneteinek manifestációjához.

A EWcp hangulatzavarokban játszott kiemelt szerepének indirekt bizonyítása érdekében egyéb, a hangulatszabályozásban fontos szerepet játszó agyterületek jelentőségét is megvizsgáltuk. Azt feltételeztük, hogy amennyiben az EWcp játszik jelentős szerepet a hangulatzavarokban, egyéb területen nem történik jelentős változás a modellben.

## **A Parkinson-kórhoz társuló hangulatzavarok vizsgálata szelektív neuronirtás után**

Az első hipotézis vizsgálata során talált nem-motoros tünetek háttérében a EWcp morfológiai változásai állhatnak. Annak érdekében, hogy direkt módon is bizonyítsuk a mag UCN1 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 EWcp urocortinerg neuronjainak szelektív károsítása útján.

### **Anyagok és módszerek**

#### **Kísérleti elrendezés**

A rotenon modellben 35 darab, 11 hónapos hím Wistar patkányt osztottunk egy kontroll (n=12) és egy toxinnal injektált (n=23) csoportra. A kontroll csoport csak oldószert (steril napraforgóolaj és dimetil-szulfoxid (DMSO)), míg a kezelt csoport 1,5mg/kg/nap rotenont kapott 6 héten keresztül s.c. injekció formájában. A kísérlet során három különböző viselkedési tesztet végeztünk, eltérő napokon. A motoros funkciókat a rotarod performance teszttel (RPT) és az open field teszttel (OFT) tudtuk vizsgálni. A szorongási szintet az OFT, míg az anhedónia mértékét cukorpreferencia teszt (SPT) tudtuk monitorozni. Az állatok terminálása és a minták feldolgozása a hatodik hét után történt. A kísérlet alatt súlyos állapotromlás miatt 5 rotenon kezelt állatot kellett kíméletes végpontban részesíteni, míg a szövettani feldolgozás során további 6 egyed került kizárássra. Végül 12 kontroll és 12 rotenon kezelt állat mintáinak feldolgozását végeztük.

A leptin-saporinnal végzett neuron irtás hatásának vizsgálatához 32 darab, 3 hónapos hím patkányon altatásban sztereotaxiás műtétet hajtottunk végre. 16 állatnál a leptin-konjugált saporin oldattal szelektíven az UCN1 neuronokat irtottuk ki a EWcp területén, míg 16 patkányt kontrollként konjugátlan saporinnal injektáltunk. Műtét után 10 napos gyógyulási időszak következett, majd viselkedési teszteket végeztünk. Az állatok terminálása és a minták feldolgozása a műtétet követő harmadik hét végén történt. A minták feldolgozása során 8 állatnál 20%-nál kevesebb sejt pusztult el a EWcp területén, míg 6 patkány esetében a beavatkozás során a szűrőcsatorna eltért a tervezett anatómiai lokalizációtól. Ezeket az állatokat a további vizsgálatokból kizártuk, így csoportonként 9-9 patkányból nyert adatokon végeztük el a statisztikai analízist.

## **Immunjelölések**

A rotenon hatására bekövetkező dopaminerg neuronpusztulás mértékét anti-tirozin-hidroxiláz (TH), diamino-benzidin (DAB) jelöléssel tettük láthatóvá. A SN, VTA, LC, A5 régiókat tartalmazó metszeteken ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA1) és TH, a DR, MNR IBA1 és 5-HT, a CPu területén NeuN és TH kettős jelöléseket alkalmaztunk. Az EWcp területén bekövetkező micro- és astrogliosis meghatározása érdekében az UCN1 - IBA1 – glial fibrillary acidic protein (GFAP), a Parkinson-kórra jellemző változások felderítése céljából UCN1 –  $\alpha$ -Syn – TH hármas jelöléseket alkalmaztunk. A microgliák aktivitásának vizsgálatához az IBA1 markert CD68 jelöléssel egészítettük ki. A rotenon modellen a SNpc vizsgálatára tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) – GFAP – IBA1 és indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) – GFAP – IBA1 hármas immunjelöléseket alkalmaztunk.

A leptin-saporin modellben a lokális neuronirtás mértékét és fellépő neuroinflammációt UCN1 – GFAP – IBA1, UCN1 – caspase 3, UCN1 – NeuN jelölések segítségével vizsgáltuk. Kiegészítő vizsgálatként a SNpc TH – caspase 3 és GFAP – IBA1 kettős jelöléseit is elvégeztük.

## **Mikroszkópia és digitális képanalízis**

A DAB jelölt metszeteinket Nikon fénymikroszkóp és digitális kamera segítségével digitalizáltuk. Az immunfluoreszcensen jelölt minták esetében a digitalizálást Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóp segítségével végeztük el. Mindkét tanulmányban állatonként minden vizsgált agyterületről 4-6 reprezentatív fotót értékeltünk ki. A DAB jelölt metszeteken a TH-ir sejteket számoltuk. Többes immunfluoreszcens jelöléseket alkalmaztunk TH, UCN1, 5-HT, IBA1, GFAP,  $\alpha$ -Syn, CD68, TNFalpha és caspase 3 immunreaktivitás kimutatására. A fluoreszcens festékkel jelölt metszeteken sejtszámolást, specifikus jeldenzitás (SSD) mérést, valamint egyéb morfometriai analízist végeztünk a sejtduzzadás, és a glia aktiváció mértékének megítélésére. RNAscope *in situ* hibridizáció segítségével az EWcp *Ucn1* mRNS tartalmát mértük, melyet kombináltunk UCN1 – IBA1 kettős immunfluoreszcens jelöléssel és 4',6-diamidine-2'-phenylindole (DAPI) magfestéssel majd morfometriai analízist végeztünk a digitális felvételeken.

## **Statisztika**

A viselkedési tesztek eredményeit Z-score-ra számoltuk át, és ezeket az adatokat értékeltük. A 2-sigma tartományon túli adatokat kizártuk. Normál eloszlás esetén a csoportok közötti összehasonlítást kétmintás Student-féle t-próbát, nem normál eloszlás esetén pedig



Mann-Whitney-féle U-próbát alkalmaztunk. Az egyes változók közti összefüggések keresésére Spearman-féle korreláció analízist végeztünk. Az  $\alpha$  minden esetben 5% volt.

## **Eredmények és diszkusszió**

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

A rotenon modell validitását a viselkedési tesztek során tapasztalt motoros és nem-motoros zavarok létrejöttével, valamint a szövettani vizsgálatokkor talált SNpc dopaminerg sejtszám csökkenéssel és az  $\alpha$ -Syn zárványok megjelenésével támasztottuk alá.

A rotenonnal kezelt állatokban jelentős mozgáskoordinációs deficit alakult ki, amit a rotarod teszt eredményei egyértelműen megmutattak. Az általunk is használt RPT széles körben alkalmazott a motoros funkció vizsgálatára. A toxinnal injektált egyedek mozgásteljesítménye a kísérlet során progresszíven romlott és az utolsó héten gyakorlatilag nem voltak képesek fent maradni az eszközön. Az OFT során a rotenon kezelt állatoknál hosszabb immobilitási időt mértünk, ami szintén alátámasztja a mozgásszabályozást érintő károsodásokat így alkalmas a PD motoros tüneteinek kimutatására. Az OFT-ben a kontroll csoporthoz képest a rotenon kezelt patkányok több időt töltöttek a doboz fala mellett, ami megnövekedett szorongási szintre enged következtetni. A rotenon kezelt állatok a SPT folyamán kevesebb cukoroldatot fogyasztottak, mint a kontroll állatok, melyből az a következtetés vonható le, hogy nőtt az állatok anhedónia szintje, ami a depresszív tünetegyüttes része.

Annak érdekében, hogy az állatok mozgásképesége ne romoljon le a teljes immobilizációig, és hogy a kiválasztott viselkedési tesztek értékelhetők legyenek, előkísérletek során választottuk ki azt a legkisebb rotenon dózist (1,5 mg/kg/nap), ami előidézte a PD-szerű állapotot, de nem okozta az állatok súlyos mértékű általános állapotromlását. Fontos megemlíteni, hogy a csoportok közötti mozgás- és viselkedésbéli különbségek nem származhattak a DMSO okozta neuronkárosodásból, hiszen a kontroll csoport is ugyanakkora dózisban kapta az oldószert s.c. injekciózáskor, mint a rotenon kezelt.

A testtömegmérések alapján, a rotenonnal kezelt csoport átlagos testtömeg értéke a kontroll csoporttól jelentősen elmaradt. A rotenonnal kezelt csoportban a mellékvesék testtömeghez viszonyított relatív tömege 31%-kal nagyobb volt, míg a relatív thymus tömeg 26%-kal kisebbnek bizonyult. A mellékvese-, csecsemőmirigy-, és testtömegmérések eredményei arra utalnak, hogy a rotenon kezelt állatokban fokozódott a hypothalamus-hypophysis-mellékvese (HPA) tengely aktivitása, mely gyakori kísérőjelensége az emberi

depresszióknak, és a depresszió állatmodelljeiben is sokszor megfigyelhető. Az EWcp és a HPA tengely aktivitása között régóta ismert inverz reláció áll fenn, mely összhangban van jelen eredményeinkkel.

A szövettani vizsgálat minkét kritérium alapján bizonyította a rotenon modell validitását: a SNpc területén a két csoport összehasonlítása során 32,4%-kal kevesebb TH pozitív sejtet számoltunk a rotenon kezelt állatok esetében. Az ilyen arányú dopaminerg neuron pusztulás patkány modellben már elégséges a kórkép igazolására, mivel rágszálóban kisebb arányú neuronvesztés mellett is manifesztálódnak a motoros tünetek. A betegség másik jellemző hisztopatológiai ismérvét, az SNpc dopaminerg neuronjaiban megjelenő  $\alpha$ -Syn tartalmú intracelluláris Lewy-testek szintén sikerült megtalálnunk. 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. Irodalmi leírások további bizonyítékként említik, hogy a rotenon diffúz és fokális TH-ir rostszám csökkenést is okoz a striatumban, ami a kísérletünk során is megfigyelhető volt: 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.

A motoros funkciók eltérésének hátterében álló, a SNpc területén bekövetkezett neuromorfológiai változásokhoz hasonló arányú sejtszámvesztés történt a EWcp UCN1-ir területén is, valamint intracytoplasmaticus alpha-synuclein tartalmú partikulumokat is találtunk. A megnövekedett microglia aktivitás statisztikai korrelációban volt a SNpc területén talált nagyon hasonló mértékű elváltozásokkal rotenon kezelést követően. Ebből a EWcp/UCN1 sejteinek a SNpc/TH neuronjaihoz hasonló mértékű vulnerabilitására lehet következtetni. Ez a feltételezés a magok közös fejlődéstani eredete miatt nem meglepő, hiszen a SNpc/TH sejtek rokonságban állnak a EWcp/UCN1 neuronjaival.

A rotenon kezelt csoport metszetein sejtszámolás során észleltük, hogy a EWcp területén az UCN1 neuronok nagyobb méretűek és puffadt morfológiájúak, mint a kontroll állatok metszeteiben lévő sejtek. A rotenon kezelt csoport metszeteiben a csökkent sejtszám mellett emelkedett UCN1 jelintenzitást találtunk. Feltehetően a mitochondriális komplex I gátlása miatt kialakult energiadeficit következtében az UCN1 peptid felhalmozódott a perikaryonban a károsodott axonális transzportfolyamatok miatt. Annak érdekében, hogy ennek a jelenségnek a hátterét pontosabban megértsük, mRNS szintű vizsgálatokat is végeztünk.

RNAscope *in situ* hibridizáció után rotenon kezelt állataink metszetein jelentősen kevesebb nukleáris *Ucn1* mRNS transzkriptumot regisztráltunk, ami csökkent *Ucn1* mRNS

mennyiségre és indirekten csökkent UCN1 peptid szintézisre utal. Ezzel megegyező eltéréseket találtak egyrészt depresszió állatmodellekben, pl. krónikus stresszen átesett patkányok vizsgálata során, másrészt, depressziós, öngyilkosságot elkövetett elhunytak EWcp mintáiban. A látszólag ellentmondásos eredményt, miszerint emelkedett jelzenítés mellett csökkent a transzkriptumok száma, a sejt funkcionális károsodása magyarázhatja. 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.

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. Kisebb számban a DR területén is vannak dopaminerg sejtek, azonban ezek sem szenvedtek strukturális károsodást a rotenon modellben, és nem is volt jellemző a környezetükben a microgliák aktivációja.

A szerotoninről is jól tudjuk, hogy a hangulati szint beállításában az egyik legfontosabb neurotranszmitter, és a hangulatzavarok farmakoterápiájában is elsőrendű cél a szerotonin mennyiségének növelése az agyi szinapszisokban. Ismert az is, hogy 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. Ezzel szemben, eredményeink szerint ezeken a területeken a 5-HT tartalmú sejtek nem mutattak károsodást. 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 a LC és az A5 area 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, a VTA és a LC területén, mi nem találtunk károsodást ezekben a dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg rendszerekben. Ugyan mi kifejezetten alacsony dózisu (1,5 mg/ttkg/nap) rotenon kezelést alkalmaztunk, hogy az állatok általános állapota ne romoljon gyorsan, a rotenon alkalmazott adagja viszonylag szelektíven roncsolta a EWcp/UCN1 neuronokat a SNpc/TH sejtek mellett. Mivel a projektben nem vizsgáltunk minden olyan agyterületet, ami a hangulat szabályozásban szerepet játszik, nem zárhatjuk ki, hogy a károsodás az itt nem vizsgált régiókban is hozzájárulhatott a megfigyelt viselkedési eltérésekhez. Ilyen agyi területek közé tartozik a prefrontális cortex, az amygdala vagy a hippocampus.

Összefoglalva és a limitációkat figyelembe véve, 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.

### **Saporin indukált szelektív lokális neuron abláció az Edinger-Westphal magban kiváltja a Parkinson-kór nem motoros tüneteit, mozgászavar 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 közel 50%-ban sejt felszínükön leptin receptort hordoznak. A rotenon modellben látott 20-25% EWcp/UCN1 sejtvesztési arány elérése érdekében a 0,08 µl leptin-konjugált saporin bizonyult megfelelőnek. 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. 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 szerepére, és arra, hogy a mag sérülése magyarázhatja a hangulatzavarokat Parkinson-kórban.

## **Összefoglalás**

Állatkísérleteink során sikeresen alkalmaztuk a Parkinson-kór rotenon modelljét patkányokban. A toxinnal kezelt állatoknál a mozgáskoordinációt érintő szembetűnő zavarok mellett megjelent a szorongó magatartás és a depressziószerű tünetek, melyek a nem-motoros szimptomáknak feleltethetők meg. A Parkinson-kórra jellemző, emberben leírt szövettani elváltozásokat is reprodukálta az alkalmazott szisztémás toxin kezelés. A SNpc dopaminerg sejtjeinek részleges neurodegenerációján és a túlélő neuronokban  $\alpha$ -Syn zárványok megjelenésén túl, a neuroinflammációval együtt járó a micro- és astrogliosis is alátámasztják a modell validitását. Hasonlóan a dopaminerg SNpc területén megfigyelt morfológiai változásokhoz, a EWcp urocortinerg sejtpopulációjában is  $\alpha$ -Syn immunreaktív zárványok megjelenését és neurodegenerációt találtunk. A hangulatszabályozásban résztvevő egyéb dopaminerg, szerotoninerg és noradrenerg magcsoportok vizsgálata során azonban nem volt 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.

Kutatási projektünk végső következtetése az, hogy 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.

### **Kiemelt eredmények**

Sikeresen alkalmaztuk a Parkinson-kór szisztémás rotenon modelljét patkányban, az állatok a kórra jellemző motoros változásokon túl hangulatzavarokat is mutattak.

A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag részt vesz a Parkinson-kórhoz asszociált hangulatzavarokban, patkány állatmodellben.

A centrális-projekciójú Edinger-Westphal magban a túlélő urocortin 1 neuronok is funkcionális károsodást mutatnak rotenon kezelést után.

A hangulatot befolyásoló egyéb agyterületek nem szenvedtek jelentős morfológiai változást, ez indirekt módon támasztja alá a centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag szerepét.

A centrális-projekciójú Edinger-Westphal mag urocortin 1 neuronjainak szelektív irtása a rotenon modellben látott hangulatzavarokat reprodukálja motoros tünetek nélkül, direkt módon bizonyítva a sejtek hangulatzavarokban betöltött szerepét.

### **A disszertáció alapját képező 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 Feb 2;19(1):31. PMID: 35109869 **IF: 8,322 (2020)**

**Összesített impakt faktor: 8,322**

### **A disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó, egyéb 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 közlemények összesített impakt faktora 14,97**

**Független citációk száma: 17**

## Köszönetnyilvánítás

Mindenki előtt szeretnék köszönetet mondani **Gaszner Balázsnak**, témavezetőmnek, aki nem csak az alapkutatás 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 támogatott azután is, hogy elkezdtem a rezidensképzést.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, 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 adták mind a kísérletes, mind pedig az adatfeldolgozás során. Köszönöm, hogy munkájukkal és tanácsaikkal segítették a PhD dolgozatom elkészültét.

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

A szakmai segítséget az RNAscope technika kivitelezésében **Kormos Viktóriának** és **Kecskés Angélnak** köszönöm, valamint a konfokális mikroszkóp használatát **Berta Gergelynek**.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Reglódi 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 célokat is véghez tudom vinni. Külön kiemelném a fő támogatómat, **Mészáros Fannit**, aki szó nélkül eltűrte a munkából adódó stresszkezelési módszereimet is még várandósan is. Az ő figyelmessége és odaadása segített a legközvetlenebb módon.